

**Entwicklung und Evaluierung
von rekombinanten Antikörpern
zur Detektion von Trinitrotoluenderivaten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Mladen Simonović

Zaječar, Jugoslawien

Hamburg 2004

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2000 bis März 2004 am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, der Universität Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Bredehorst
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Antikörper und deren Fragmente

1.2. Phagendisplaytechnik

1.3. Nachweisverfahren für niedermolekulare Verbindungen

1.4. Aufgabenstellung

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Enzyme

2.1.2. Zellkultur

2.1.3. Chemikalien und Bioreagenzien

2.1.4. Antikörper

2.1.5. Affinitätsmatrices

2.1.6. Puffer und Lösungen

2.1.7. Medien

2.1.8. Geräte

2.1.9. Zelllinien/Bakterienstämme

2.1.10. Vektoren

2.1.11. Antikörperfragmente

2.1.12. Helferphagen

2.1.13. Oligonukleotide

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Molekularbiologische Standard-Techniken

2.2.1.2. Polymerase Kettenreaktion und Amplifikation von DNA-Fragmenten

2.2.1.3. Alkoholpräzipitation mit Pellet Paint[®] Co-Precipitant

2.2.1.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.2.1.5. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

2.2.1.6. Lagerung von *E.coli*-Klonen

2.2.1.7. Präparation von Plasmid-DNA

2.2.2. Phagentechniken für Phagemid-Systeme

2.2.2.1. Darstellung von M13K07-Helferphagen

2.2.2.2. Titerbestimmung von M13-Phagen

2.2.2.3. Darstellung rekombinanter Phagen (Rescue)

2.2.3. Rekombinante Expressionen von Antikörpern in unterschiedlichen Systemen

2.2.3.1. Prokaryotische Expression in *E. coli*

2.2.3.1.1. Periplasmatische Expression in *E. coli*

2.2.3.1.2. Präparation des periplasmatischen Extraktes

2.2.3.1.3. Nativer Zellaufschluß

2.2.3.1.4. IMAC (Immobilized Metallion Affinity Chromatography)

2.2.3.2. Eukaryotische Expression in Hefen

2.2.3.2.1. Protein-Expression in *Pichia pastoris*

2.2.3.2.2. Lagerung von *Pichia pastoris*-Klonen

2.2.3.2.3. Expression der Zielproteine

2.2.3.3. Eukaryotische Expression in Mammalia

2.2.3.3.1. Transfektion und transiente Expression in HEK-Zellen

2.2.3.3.2. Generierung kontinuierlich exprimierender Zelllinien

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Proteinbiochemische Standard-Techniken

2.2.4.2. Elektrophoretischer Proteintransfer

2.2.4.3. Reinigung von Antikörperfragmenten und Analoga

2.2.4.4. Dialyse

2.2.4.5. Herstellung unterschiedlicher TNP-Protein-Konjugate

2.2.4.6. Herstellung von TNP-Tris

2.2.4.7. Biotinylierung

2.2.5. Immunologische Methoden

2.2.5.1. Immunprinting von Proteinen auf PVDF-Membranen

2.2.5.2. ELISA

2.2.5.2.1. Direkter Assay

2.2.5.2.2. Kompetitiver Assay

2.2.6. Charakterisierung des Bindungsverhaltens rekombinanter Antikörper

2.2.6.1. Affinitätsmessung in Lösung mittels kompetitiven ELISA

3. Ergebnisse

3.1. Evaluierung von unterschiedlichen Antikörper-Fragmenten

3.1.1. Analyse unterschiedlicher TNP-Proteinkonjugate

3.1.1.1. TNP-BSA-Konjugate

3.1.1.2. TNP-Casein-Konjugat

3.1.2. Monovalente Antikörper 11B3- und 3.5-scFv

3.1.3. Bivalente Konstrukte 11B3- und 3.5-IgG Δ C1

3.1.3.1. Expression in humanen HEK 293 Zellen

3.1.3.2. Expression in Hefe

3.1.4. Etablierung der Parameter für den Assay

3.1.4.1. Untersuchung unterschiedlicher TNP-BSA-Konjugate

3.1.4.2. Mindestmenge am Immunoreagenz zur Detektion

3.1.4.3. Inhibition von 11B3-IgG Δ C1 durch TNP-Tris

3.1.4.4. Verdrängungsassay

3.1.4.5. Optimierung der Vorinkubationszeit

3.1.4.6. Detektionsmittel

3.1.4.7. Entwicklungszeit

3.1.5. Vergleich der Konstrukte 3.5-IgG Δ C1 und 11B3-IgG Δ C1

3.1.5.1. Bivalenter Antikörper 11B3-IgG Δ C1

3.1.5.2. Bivalenter Antikörper 3.5-IgG Δ C1

3.1.6. Vergleich zwischen 3.5-scFv und 11B3-scFv

3.1.7. Affinitätsmessung

3.2. Evaluierung von β -Lactamase-Fusionsproteinen

3.2.1. scFv- β -Lactamase-Fusionsproteine

3.2.2. ProteinA- β -Lactamase

3.2.3. Assay mit β -Lactamase-Fusionsproteinen

3.2.4. Rekombinante 11B3-scFv-Phagen

3.2.4.1. Monovalente 11B3-scFv-Phagen

3.2.4.2. Pentavalente monofunktionelle 11B3-scFv-Phagen

3.2.4.3. Pentavalente bifunktionelle 11B3-scFv-Phagen mit der β -Lactamase

3.2.5. Assay mit rekombinanten 11B3-scFv-Phagen

3.2.5.1. Monovalente 11B3-scFv-Phagen

3.2.5.2. Pentavalente monofunktionelle 11B3-scFv-Phagen

4. Diskussion

4.1. Klonierung und Expression der rekombinanten Immunoreagenzien

4.2. Vergleich der Immunoreagenzien in einem TNP-Assay

4.3. Charakterisierung der Antikörper

4.4. Vergleich der Ergebnisse mit der internationalen Literatur

4.4.1. Auswahl von TNT-Derivaten als Haptene

4.4.2. TNT-Biosensoren

4.4.3. Die β -Lactamase

4.5. Ausblick

5. Zusammenfassung

5. Abstract

6. Literatur

7. Anhang

7.1. Sequenz von 11B3-scFv

7.2. Sequenz von 3.5-scFv

7.3. Sequenz der β -Lactamase

7.4. Sequenz von ProteinA

7.5. Vektormappen

Abkürzungen

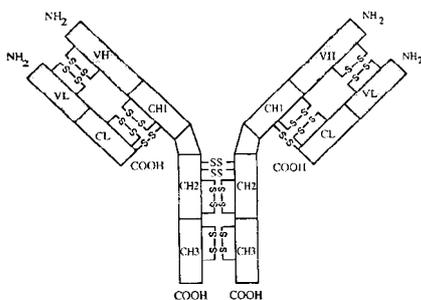
ABTS	2,2'-Azino-bis(2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	Brom-chlor-enoylphosphat
BMGY	gepuffertes Glycerol-Komplexmedium
BMMY	gepuffertes Methanol-Komplexmedium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CDR	Complementarity determining region
Cfu	Colony forming unit/ml
CMV	Cytomegalovirus
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbentassay
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
Fab	antigenbindendes Fragment
Fc	kristallisierbares Fragment
FKS	Fötale Kälberserum
HEK	Human embryonic kidney
His	Histidin
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
lacZ	β -Galactosidase kodierendes Gen
LB	Luria Bertani
MCS	Klonierungsstelle
MPBS	Milchpulver-PBS
mRNA	Messenger -RNA
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblue tetrazolium
OD	Optische Dichte
ori	Origin of replication
pA	Protein A
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-Puffer mit EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris EDTA Saccharose
TCA	Trichloressigsäure
TNB	Trinitrobenzen
TNP	Trinitrophenol
TNT	Trinitrotoluen
TNBS	Trinitrobenzen-Sulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TPBS	Tween-PBS
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaureat
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
xg	Mehrfaches der Gravitation
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
β-Lac	β-Lactamase

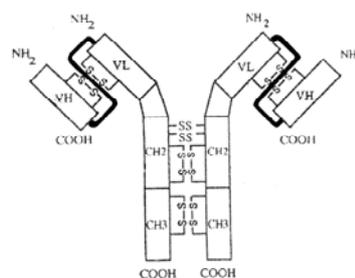
1. Einleitung

1.1. Antikörper und deren Fragmente

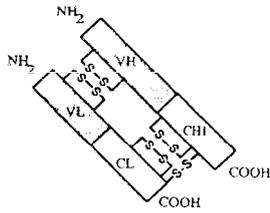
Das IgG-Molekül ist der Prototyp für die Grundstruktur eines Antikörpers (Abb. 1). Dieses Molekül besteht aus zwei leichten von ca. 23 kDa und zwei schweren Ketten von ca. 53 kDa, die über Disulfidbrücken und nichtkovalente Interaktionen verknüpft sind. Die leichte Kette besteht aus zwei Regionen: der variablen V_L und der konstanten C_L , während die schwere Kette aus einer variablen (V_H) und drei konstanten Domänen (C_{H1} - C_{H3}) konstituiert ist. Beim Menschen gibt es insgesamt zwei Typen von leichten Ketten, λ und κ , sowie fünf Isotypen der schweren Kette, nach denen die Hauptklassen der Antikörper klassifiziert werden: IgG, IgM, IgE, IgA und IgD. Die leichte Kette mit den V_H - und C_{H1} -Regionen der schweren Kette setzen das Fab-Fragment (ab – antigen binding) zusammen. Zwei schwere Domänen C_{H2} und C_{H3} , die dimerisiert und über Disulfidbrücken verknüpft sind, konstituieren ein Fc-Fragment (c – crystallizable). Dieses Fragment besitzt einige Effektorfunktionen, die durch die Bindung von Komplementproteinen oder Zellrezeptoren vorkommen. Für die unmittelbare Bindung des Antigens sind die V_L - und die V_H -Domäne verantwortlich. Diese zwei Domänen stellen zusammen ein Fv (Fragment variable) dar (Skerra *et al.*, 1988). Wenn diese beiden Domänen über einen flexiblen Peptidlinker kovalent verknüpft sind, handelt es sich um ein scFv (sc – single chain Fragment variable) (Huston *et al.*, 1988, Takkinen *et al.*, 1991, Whitlow *et al.*, 1993). Ein genetisch modifizierter Antikörper mit den deletierten C_L - und C_{H1} -Regionen, in dem die Antigenbindung über die zwei scFvs stattfindet, wird IgG Δ C1 genannt.



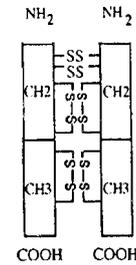
Antikörper IgG



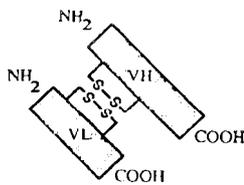
Antikörper IgG Δ C1



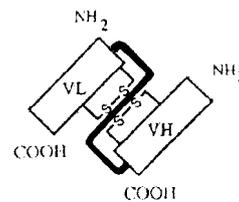
Fab Fragment



Fc Fragment



Fv Fragment



scFv Fragment

Abb. 1. Schematische Darstellung vom IgG-Antikörper und dessen Fragmenten

Das scFv- und das Fv-Fragment sind die kleinsten Einheiten, die die gesamten Bindungseigenschaften eines Antikörpers tragen. ScFv-Fragmente sind bis heute gegen diverse Zellrezeptoren, toxische Proteine und Tumorantigene generiert worden (Chaudhary *et al.*, 1989, Batra *et al.*, 1990). Fusioniert man die scFvs mit Proteinen (Enzyme, Immunotoxine), so setzt man diese bifunktionellen Konstrukte für therapeutische (Immunotherapie) oder analytische (Detektionsreagenzien) Zwecke ein (Chaudhary *et al.*, 1990, Gandecha *et al.*, 1994).

1.2. Phagendisplaytechnik

Ein Vorteil der scFv-Fragmente besteht in der Möglichkeit, sie auf filamentösen Bakteriophagen exponieren zu können. Einer der am häufigsten benutzten Phagen ist der *E.coli*-Bakteriophage M13. Das Phagenom besteht aus einer einzelsträngigen DNA, die von der Proteinhülle umgeschossen ist. Die Präsentation von Antikörper-Fragmenten wurde ursprünglich durch direkte Modifikation des Phagenom durchgeführt, wobei zusätzlich eine Resistenz und Schnittstellen eingebracht und so Phagenvektoren generiert wurden (McCafferty *et al.*, 1994). Alternativ hierzu werden sogenannte Phagemid-Vektoren verwendet, die eine Kopie des Gens für die Hüllproteine und ein Verpackungssignal tragen. Diese Vektoren erfordern zusätzlich die genetische Information des Phagen, die durch Superinfektion der Vektor-tragenden Zellen mit den entsprechenden Helferphagen erlangt wird (Abb. 2). Für die Fusion der Zielproteine eignen sich meistens die Hüllproteine g3p, deren Kopienzahl sich auf 5 beläuft, und g8p, das in etwa 2700 Kopien präsent ist. Durch die Auswahl des Fusionsgens (g3 oder g8) im Phagenvektor, kann somit ein monovalentes (Barbas *et al.*, 1991) oder ein polyvalentes Display (Kang *et al.*, 1991) erzielt werden.

Bei der Klonierung einer scFv-Bibliothek erhält man rekombinante Phagen, die auf ihrer Oberfläche scFv tragen, die mit Hüllproteinen die Fusionsproteine konstituieren. Jeder Phage kann nur einen bestimmten scFv tragen, den er genetisch kodiert. Diese Technik (Smith, 1985, Burton 1991) ermöglicht die Selektion einzelner antigenbindender Klone aus einer großen vielfältigen Bibliothek. Bei der Selektion wird zunächst das Zielmolekül auf einer Oberfläche immobilisiert. Nach der Zugabe der Selektanden erfolgt der Nachweis der gebundenen Phagen durch ELISA. Die Elution wird durch eine drastische pH-Änderung (Kang *et al.*, 1991), eine enzymatische Spaltung mit Proteasen (Griffiths *et al.*, 1994) oder eine Kompetition mit freiem Zielmolekül (Clackson *et al.*, 1991) ausgeführt.

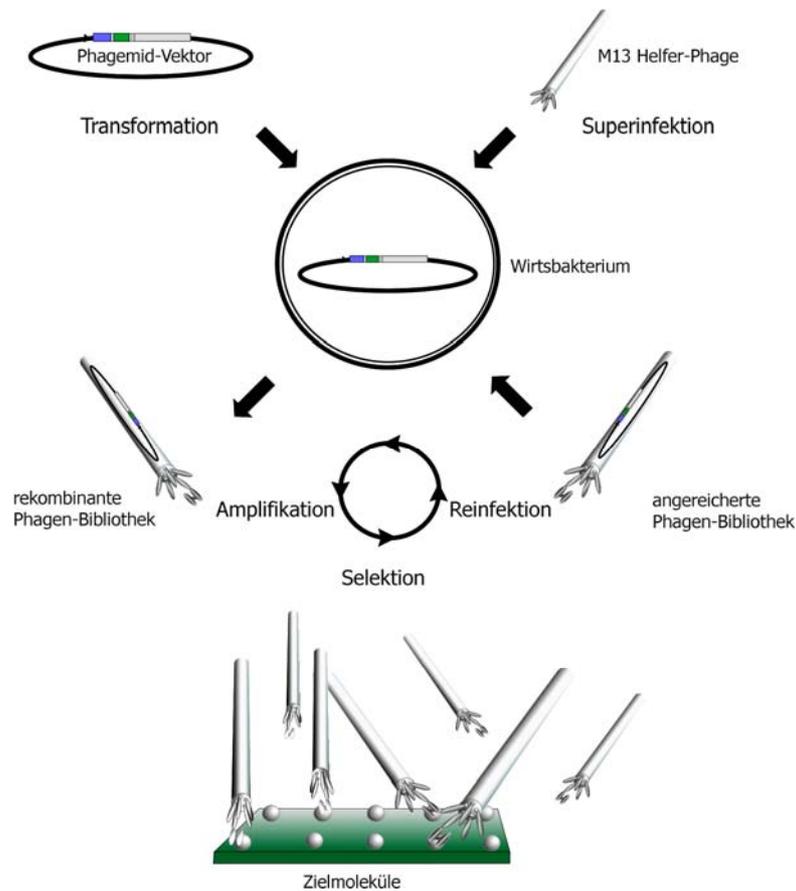


Abb. 2. Darstellung der Phage-Display-Technik

1.3. Nachweisverfahren für niedermolekulare Verbindungen

Antigene mit einem niedrigen Molekulargewicht (unter 5000 Da) nennt man Haptene. Sie sind nicht immunogen und rufen keine Immunantwort im Organismus hervor. Die meisten Haptene besitzen nur ein Epitop und eignen sich somit nicht für die Detektion im nonkompetitiven Format in einem sogenannten „sandwich ELISA“ (Engvall, Perlman, 1971). Im „sandwich ELISA“ wird das Antigen einerseits durch den immobilisierten, andererseits durch den markierten Antikörper eingeschlossen, wobei die Bindung dieser Antikörper über zwei unterschiedliche Epitope erfolgt. Neuere Arbeiten im Gebiet des modifizierten

„sandwich ELISA“ ermöglichen auch die Detektion der Haptene in einem nonkompetitiven Format (Suzuki *et al.*, 2000, Yokozeki *et al.*, 2002). Dabei wird eine der variablen Regionen der leichten oder der schweren Kette des Hapten-spezifischen Antikörpers mit Markerenzymen fusioniert und die Tatsache ausgenutzt, dass die Assoziation dieser zwei Regionen zu einem Fv-Fragment in Präsenz vom Antigen stark favorisiert ist. Dieser Assay nennt sich „open sandwich ELISA“ und beruht auf dem Prinzip der Bindung eines Proteins V_H -Tag bzw. V_L -Tag durch den Tag-spezifischen immobilisierten Antikörper. In der Präsenz des Haptens wird das Fusionsprotein V_L - bzw. V_H -Markerenzym zugegeben und die Antigenbindung ausgelöst. Nach der Zugabe des Enzym-spezifischen Substrats wird das Signal gemessen.

Das am häufigsten benutzte Verfahren zur Detektion von Haptenen ist der kompetitive ELISA (Engvall, Jonsson *et al.*, 1971). Dabei muss man beim immobilisierten Antikörper eine Konkurrenz zwischen dem markierten und unmarkierten Hapten durchführen. Aufgrund des verdrängten markierten Haptens ergibt sich ein quantitatives Signal. Je höher die Hapten-Konzentration in der zu untersuchenden Probe ist, desto weniger markierte Hapten-Moleküle binden an die Antikörper.

Als ein häufig verwendeter kompetitiver ELISA dient der Immunoassay, der auf der Immobilisierung des Antigens beruht. Im Falle einer Haptendetektion ist das zu immobilisierende Antigen ein chemisch synthetisiertes Hapten-Protein-Konjugat. Die Vorinkubation und partielle Sättigung des Antikörpers mit der Hapten-haltigen Probe ermöglichen eine Konkurrenz mit dem Immobilisat und Verdrängung des freien Antigens. Der Antikörper kann mit dem Amplifikator kovalent gekoppelt werden und somit als direktes Detektionsmittel dienen oder in einem zwei-Komponenten-System mit dem markierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden.

Alle Immunoassays benötigen zur Detektion des Signals in der abgelaufenen Immunreaktion ein amplifizierendes System, das die qualitative Erkennung oder qualitative Messung erlaubt. Das markierte Hapten kann zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion unterschiedliche Komponenten tragen. Eine Markierung des Antigens mit radioaktiven Isotopen ermöglicht die gut etablierte und hochsensitive radioaktive Detektion in einem radioimmuno-Assay (Utiger *et al.*, 1962), die zugunsten nicht-radioaktiver Amplifikationssysteme zurückgedrängt wird.

Die Fluoreszenzdetektion ist dabei das häufig verwendete amplifizierende System (Emmert, 1958). Die fluoreszenzaktiven Moleküle werden durch Lichteinstrahlung zur Emission eines langwelligeren Sekundärlichtes angeregt. Durch die Markierung mit fluorophoren Molekülen

oder Enzymen, die inaktive in fluoreszenzaktive Verbindungen umsetzen, werden die Haptene detektiert.

Chemi-, elektro- oder biolumineszente Sensoren funktionieren auf dem Prinzip der Erzeugung von Lichtenergie (Photonen) durch die Aktivierung des Markermoleküls, das vorher mit dem zu detektierenden Hapten oder Antikörper gekoppelt wurde. Das Markermolekül wird dabei zur Photonemission durch chemische, biochemische (enzymatische) oder Elektrodenreaktionen angeregt (Arakawa *et al.*, 1979, Ege *et al.*, 1984, Ulitzur *et al.*, 1987).

Das klassische optische (photometrische) Verfahren umfasst die Fusion des Hapten-spezifischen Antikörpers mit einem Enzym (Avrameas, 1969), das zu messende Farbänderung durch den Umsatz vom Substrat hervorruft (Engvall *et al.*, 1972, King *et al.*, 1979, Johnson *et al.*, 1980, Goka *et al.*, 1987). Dies ist die am häufigsten verwendete Methode zur Detektion der Zielmoleküle in einem Immunoassay.

Eine enorme Verstärkung des Signals erzielt man mit der Einführung des sekundären Antikörpers, der zum Zweck einer optischen Detektion mit einem Markerenzym chemisch gekoppelt ist, und mit dem man die zeitlich und finanziell aufwendige Methode der Markierung des jeweiligen Primärantikörpers umgeht (Butler *et al.*, 1978). Die Amplifikation des Signals durch sekundäre Antikörper wird damit erklärt, dass sie an mehrere Stellen eines Immunoglobulins binden können, und dass somit an einem Hapten-spezifischen Antikörper mehrere Detektionsenzyme hängen. Als ein analoges Detektionsmittel kann auch das Konjugat ProteinA- bzw. ProteinG-Enzym dienen, das selektiv an eine Stelle des Fc-Teils bestimmter IgG-Isotypen bindet, und etwas geringere Signalverstärkung im Vergleich zum Einsatz des Sekundärantikörper aufweist (Bjork *et al.*, 1972, Bjork *et al.*, 1984). Die Enzyme, die in den meisten Assays als Antikörper- oder ProteinA- bzw. ProteinG-Konjugate fungieren, sind alkalische Phosphatase und Meerrettich Peroxidase (Shannon *et al.*, 1966). Die zeichnen sich durch eine hohe Wechselzahl aus und ermöglichen daher eine schnelle Detektion.

Die Sichtbarmachung des gebundenen Primärantikörpers kann nicht nur über die Immunreaktion, sondern auch durch andere Bindungssysteme erfolgen. Ein hochspezifisches System mit hoher Empfindlichkeit ist der außerordentlich stabile Komplex zwischen Biotin und Avidin (Streptavidin), wobei der Primär- oder der Sekundärantikörper biotinyliert wird (Guesdon *et al.*, 1979, Kendall *et al.*, 1983, Nerurkar *et al.*, 1984). Die Peroxidase oder alkalische Phosphatase dienen als Amplifikatoren, die biotinyliert werden, und somit an das tetravalente Avidin oder Streptavidin unter Absättigung dreier Bindungsstellen binden. Die verbleibende Bindungsstelle bindet an den vorher biotinylierten Primär- bzw.

Sekundärantikörper. Wenn die Enzyme mehrfach biotinyliert sind, entstehen sehr große (Strept)Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe, die zu einer erhöhten Empfindlichkeit dieser Methode führen.

Als eine Alternative zu den optischen Detektionssystemen bietet sich die elektrochemische Detektion an (Eggers *et al.*, 1982). Im Unterschied zu optischen Assays zeichnet sich die elektrochemische Detektion mit einer Toleranz von Partikeln und Farbstoffen aus, da nur elektrochemisch aktive Substanzen an den Elektroden zum Signal führen. Damit ist die Detektion durch störende Einflüsse von Kontaminationen nicht begrenzt und es besteht keine Notwendigkeit zur Probenvorbereitung durch eine Präkonzentration.

1.4. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neuartige rekombinante Immunoreagenzien zur Detektion von TNT entwickelt werden. Als Modell-Hapten wurde das TNT-Analogon TNP-Tris gewählt. Einerseits sollten monovalente scFv-Antikörperkonstrukte mit bivalenten Antikörpern verglichen werden, um den Einfluss der Valenz und Molekülgröße auf die Antigenbindung in Immunoassays zu untersuchen. Andererseits sollten verschiedene Antikörper-Enzym-Fusionsproteine mit bifunktionellen Phagen, die auf ihrer Oberfläche sowohl TNT-spezifische scFv-Fragmente als auch multiple Markerenzyme tragen, dargestellt und miteinander verglichen werden. Als Modellenzym wurde die β -Lactamase verwendet, da sie als ein Einzelkettenmolekül geringer Größe optimale Voraussetzungen für die Konstruktion von Fusionsproteinen bietet. In Hinsicht auf sein Bindungsverhalten und Affinität sollte das sensitivste Immunoreagenz in einem Assay zum Nachweis von TNP-Tris eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Enzyme

Die folgenden verwendeten Enzyme wurden üblicherweise von NEB (Frankfurt), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Sigma (Taufkirchen), AGS (Heidelberg), Invitrogen life technologies (Karlsruhe) oder Clontech (Palo Alto, Ca.) bezogen:

Restriktionsenzyme

RNase

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase und T4-DNA-Ligase

Taq-DNA-Polymerase, weitere DNA-Polymerasen und Mischungen

Reverse Transkriptasen

2.1.2. Zellkultur

Medien, deren Zusätze sowie Zellkulturgefäße wurden bezogen von:

RPMI 1640, DMEM, GMEM, Penicillin G, Streptomycin sowie Trypsin-EDTA: Invitrogen life technologies (Karlsruhe)

Fötale Kälberserum (FKS): Biochrom (Berlin)

Zellkulturflaschen: Nunc (Wiesbaden), Greiner (Frickenhausen)

Nukleoside (Adenosin, Guanosin, Cytosin, Uracil, Thymidin), Aminosäuren (L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure): Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.1.3. Chemikalien und Bioreagenzien

Standard-Chemikalien, Salze, etc. wurden üblicherweise von Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), peqLab (Erlangen) oder Calbiochem (Schwalbach) bezogen. Speziellere Reagenzien sind jeweils gesondert aufgeführt.

2.1.4. Antikörper

Als primäre Antikörper, Direktkonjugate oder sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Invitrogen life technologies (Karlsruhe):

Anti MYC-Antikörper (9E10)
Anti MYC-Antikörper (9E10)-HRP-Konjugat
Anti MYC-Antikörper (9E10)-AP-Konjugat
Anti His-Antikörper

Sigma (Taufkirchen):

Ziege anti-human IgG schwere Kette Antikörper Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert
Ziege anti-human IgG Fc-Region Antikörper Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert
Ziege anti-human IgG schwere Kette Antikörper Peroxidase (HRP) konjugiert
Ziege anti-human IgG Fc-Region Antikörper Peroxidase (HRP) konjugiert
Ziege anti-maus IgG ganzes Molekül Antikörper Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert
Ziege anti-rabbit IgG ganzes Molekül Antikörper Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert

Amersham Pharmacia Biotech (USA):

Maus anti-M13 Antikörper
Maus anti-M13 Antikörper HRP-Konjugat

Chemicon International (USA):

Rabbit anti- β -Lactamase polyklonales Serum

Roche (Grenzach-Wyhlen):

Streptavidin-HRP-Konjugat

2.1.5. Affinitätsmatrices

Protein A/G-Agarose wurde bezogen von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca.) und Ni-NTA-Agarose von QIAGEN (Hilden).

2.1.6. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit möglich, vor Gebrauch autoklaviert.

BCIP Stocklösung	0.5% (w/v)	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat in DMF
Breaking Buffer	50 mM 1 M 5% (v/v)	Natriumdihydrogenphosphat, pH 7.4 EDTA Glycerol
CAPS-Puffer	10 mM 10%	CAPS, pH 11.0 Methanol
Citratpuffer	50 mM	Citronensäure, pH 4.0
Coomassie-Färbelösung	0.25% (w/v) 45% (v/v) 45% (v/v) 10% (v/v)	Coomassie-Brilliant-Blau R-250 Methanol Wasser Eisessig
Coomassie-Entfärber	45% (v/v) 45% (v/v) 10% (v/v)	Methanol Wasser Eisessig
Detektionspuffer (für AP)	0.1 M 0.1 M 0.1 M	Tris-HCl, pH 9.5 MgCl ₂ NaCl
Detektionspuffer (für HRP)	4 mg 15 ml 30 µl	ABTS Citratpuffer, pH 4.0 H ₂ O ₂ (30%)
DNA-Breaking Buffer	2% (v/v) 1% (v/v) 100 mM 10 mM 1 mM	Triton X-100 SDS NaCl Tris-HCl, pH 8.0 EDTA

2. Material und Methoden

DNA Loading Buffer	20% (w/v) 100 mM 0.025% (w/v) 0.025% (w/v)	Ficoll 400 EDTA Bromphenol-Blau Xylenxyanol FF
Gelbeladungspuffer (6x)	0.25% (w/v) 0.25% (w/v) 15% (w/v)	Bromphenol-Blau Xylen Cyanol FF Ficoll 400 in Sammelgelpuffer
Glycin-Elutionspuffer	50 mM	Glycin, pH 3.0
Lösung I	50 mM 25 mM 10 mM	Glucose Tris-HCl, pH 8.0 EDTA
Lösung II	0.2 M 1%	NaOH SDS
Lösung III	3 M 5 M	bezogen auf Kalium bezogen auf Acetat
MES	0,1 M	MES pH 4,7
Nitrocefin	1 mM 5% (v/v) 95% (v/v)	Nitrocefin DMSO 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7.0
PAGE-Laufpuffer (5x)	0.125 M 0.96 M 0.5%	Tris-HCl, pH 8.3 Glycin SDS
PAGE-Trenngelpuffer (4x)	1.5 M 0.4%	Tris-HCl, pH 8.8 SDS
PAGE-Sammelgelpuffer (4x)	0.5 M 0.4%	Tris-HCl, pH 6.8 SDS
PBS	10 mM 150 mM	Na-Phosphat, pH 7.2 NaCl
SDS Stocklösung	10% (w/v)	Natriumdodecylsulfat in ddH ₂ O
TAE (50x)	2 M 50 mM	Tris/Acetat, pH 8.5 EDTA
TES-Puffer	0.2 M 0.5 mM 0.5 M	Tris-HCl, pH 8.0 EDTA Saccharose

2. Material und Methoden

TPBS	10 mM 150 mM 0.1%	Na-Phosphat, pH 7.2 NaCl Tween-20
Tris-Puffer	1 M	Tris-HCl, pH 9.0

2.1.7. Medien

Alle Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert, wobei eventuelle Zugabe von Antibiotika oder anderen Zusätzen nach Abkühlen auf 50° C erfolgte.

500 x B (0.2% Biotin)	20 mg ad 100 ml	Biotin H ₂ O, steril filtrieren
BMGY-, BMMY-Medium	10 g 20 g ad 700 ml 100 ml 100 ml 2 ml 100 ml 100 ml (BMMY: 100 ml	Hefe-Extrakt Pepton H ₂ O autoklavieren 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0 10 x YNB 500 x B 10% Glycerol, steril filtriert 10% Methanol, steril filtriert)
CHO-Medium (ohne FKS)	50 ml 18.1 ml 5 ml 5 ml 10 ml 5 ml ad 500 ml	10x BHK21 7.5%iges Na ₂ CO ₃ 100x nicht-essentielle Aminosäuren 100 mM Natriumpyruvat Nukleoside G+A ddH ₂ O
CHO-Medium (10% FKS)	450 ml 50 ml 5 ml	CHO-Medium (ohne FKS) FKS Pen/Strep
10 x D (20% Dextrose)	200 g ad 1 l	D-Glucose
G+A	je 600 mg ad 100 ml	L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure ddH ₂ O, steril filtriert, Lagerung bei 4° C
1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0)	132 ml 868 ml	1 M K ₂ HPO ₄ 1 M KH ₂ PO ₄ , pH 6.0

2. Material und Methoden

LB-Medium	10 g/l 5 g/l 10 g/l	NaCl Hefe-Extrakt Bacto-Trypton, pH 7.3
LB-Medium-Platten	1 l 15 g	LB-Medium Agarose
Nukleoside	je 175 mg 60 mg ad 500 ml	Adenosin, Guanin, Cytosin, Uracil Thymidin ddH ₂ O, steril filtriert
SOB Medium	20 g 5 g 0.5 g 2.5 mM ad 1000 ml 10 ml 1M	Trypton Hefe Extrakt NaCl KCl ddH ₂ O, pH 7.5 einstellen, autoklavieren MgCl ₂ (steril filtriert)
SOC Medium	40 mM	Glucose in SOB Medium
TSS	85% (v/v) 10% (w/v) 5% (v/v) 50 mM	LB-Medium PEG 8000 DMSO MgCl ₂ , pH 6.5
10 x YNB	34 g 100 g	YNB (Yeast Nitrogen Base) Ammoniumsulfat, ad 1 l dH ₂ O, steril filtrieren
YPD-Medium	10 g 20 g ad 900 ml 100 ml	Hefe-Extrakt Pepton (Platte: 20 g Agar) dH ₂ O, autoklavieren 10 x D
2YT-Medium	5 g/l 10 g/l 16 g/l	NaCl Hefe-Extrakt Bacto-Trypton, pH 7.3
2YT-Medium-Platten	1 l 15 g	2YT-Medium Agarose

2.1.8. Geräte

Sepatech (Hannover)	Heraeus Megafuge 1.0
Eppendorf (Hamburg)	centrifuge 5415 C, centrifuge 5417 C, centrifuge 5417 R

2. Material und Methoden

Amersham Pharmacia Biotech: (Freiburg)	UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 3000
Hybaid-AGS (Heidelberg):	PCR-Sprint-Thermoblock PCR-OmniGene-HB TR3-Block Easy-Cast-Minigel-System für Agarosegelelektrophorese
New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen)	innova™ 4300 incubator shaker innova™ 4330, refrigerated incubator shaker
SANYO Electric CO, Ltd, (Japan):	SANYO CO ₂ -Inkubator MCO-17AI
SLT-Instruments: (Gröding, Österreich)	EasyReader EAR 400AT
Intas (Göttingen):	Video-Image-System
Steiner (Hamburg):	UV-Transilluminator (302 nm, 90 W)
Hoefler Scientific Instruments: (San Francisco, CA, USA)	Minigel-Set LKB 2050 MIDGET für SDS-PAGE
Gössner GmbH&Co. (Hamburg):	Laborautoklav GLA; Fabr. Nr. 940306

2.1.9. Zelllinien/Bakterienstämme

Bei den eingesetzten Bakterienstämmen handelte es sich um verschiedene *E. coli* K12-Stämme. Für Klonierungen und Standard-Anwendungen molekularbiologischer Arbeiten wurden primär DH5 α , Top10, etc. eingesetzt. Im Rahmen der Arbeiten mit den Antikörper-Bibliotheken wurde meist der F⁺ supE-Stamm TG1 herangezogen.

Für Expressionen wurden meist die Expressionsstämme BL21 und BL21 (DE3) sowie die Stämme HB2151 und DH5 α genutzt (Stratagene, Clontech, Palo Alto, Ca).

TG1:	supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5 (rK- mK-) [F ⁺ traD36 proAB lacIqZ Δ M15]
BL21:	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , dcm, ompT, hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻), gal.
BL21 DE3:	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , dcm, ompT, hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻), gal λ (DE3).
DH5:	F ⁻ , endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r _K ⁻ ,m _K ⁺), supE44, relA1. Φ 80 Δ lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF),U169

Tabelle 1. Genotypen der genutzten Bakterienstämme

Für die rekombinante Expression in der Hefe *Pichia pastoris* wurde der Stamm GS115 von Invitrogen life technologies (Karlsruhe) genutzt.

Zur rekombinanten Expression in Mammalia wurden die Expressionszelllinien CHO K1 und HEK 293 verwendet.

2.1.10. Vektoren

Der im Rahmen der Klonierung eingesetzte Phagemid-Vektor pHEN2 sowie der Phagenvektor fd-Tet wurden zur Verfügung gestellt von G.Winter, Center of Protein Engineering, MRC Cambridge.

Der pCANTAB Vektor wurde von Amersham Pharmacia Biotech erworben.

Die Vektor-Systeme pcDNA3.1+ und pPICZ α -ABC zur eukaryotischen Expression in Mammalia und der Hefe *Pichia pastoris* wurden kommerziell von Invitrogen life technologies (Karlsruhe) bezogen.

Der *E. coli*-Expressionsvektor pET26b(+) wurde von Novagen (Schwalbach) kommerziell erworben.

2.1.11. Antikörperfragmente

Die scFv-Fragmente 11B3 und 3.5 sowie die Gene für ProteinA und die β -Lactamase waren im Arbeitskreis vorhanden.

2.1.12. Helferphagen

Der im Rahmen der unterschiedlichen Phagendarstellungen genutzte Helfer-Phage M13K07 wurde kommerziell von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) erworben.

2.1.13. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert (Tab. 2).

Name	Sequenz 5`-3`	Zielsequenz	Schnittstellen
βLac Bam vor	Ggatccgatgcacccagaaacgctggtg aa	βLac	Bam H I
βLac Xho rück	Ctcgagccaatgcttaatcagtgaggcac c	βLac	Xho I
11B3 Nco vor	Catgccatggcccaggtgaagctg	11B3-scFv	Nco I
11B3 Nco rück	Catgccatggcccgtttatttcca	11B3-scFv	Nco I
pET (T7) vor	Taatcgactcactatagg	pET26	
pET rück	Gctagttattgctcagcgg	pET 26	
Aox vor	Gactggtccaattgacaagc	Aox-Gen	
Aox rück	Gcaaatggcattctgacatcc	Aox-Gen	
11B3 Bsi vor	Gatccgtacgtgtgggatggcccaggtga ag	11B3-scFv	Bsi W I
11B3 Asc rück	Gatcggcgcgccacctaggacggtcagc ttg	11B3-scFv	Asc I
Lmb 3	Acaggaaacagctatgaccatg	Insert in pHEN2	
fdseq	Gcaaaacctcatacagaaaattcatt	Insert in pHEN2	
11B3 Sfi vor (pPICZαB)	Gatcggccagccggccttatggcccag gtgaag	11B3-scFv	Sfi I
3.5 scFv rück	gatcggcgcgccacctaggacggtcagct tggt	3.5-scFv	AscI
3.5 Ende vor	ttcggcgcagggaccaag	3.5-scFv	
pA Nco vor	Catgccatggaacaacgcataacc	Protein A	Nco I
pA Nco rück	Gatcccatggcatttgttatctgcaggtc	Protein A	Nco I
βLac Not vor (pET)	Aaggaaaaagcggccgcacaccaga aacgctggtg	βLac	Not I

βLac Not rück (pET/pHEN2)	Gatcgcggccgccaatgcttaatcagtg a	βLac	Not I
βLac Not vor (für 3.5-βLac)	Gatcgcggccgcacaccagaaacgctg gtg	βLac	Not I
βLac Eco rück (für 3.5-βLac)	Gatcgaattctcagtggtggtggtggtggt gctcgagccaatgcttaatca	βLac	Eco R I
11B3 Nde vor	Ggaattccatagggccaggtgaagctg	11B3-scFv	Nde I
11B3 Not rück (pET)	Attcttatgcgccgcccgtttattccagc tt	11B3-scFv	Not I
11B3 Hind vor (pHEN2)	Gccaagcttatggccaggtgaagctg	11B3-scFv	Hind III
11B3 Sfi vor (pHEN2)	Ataatggcccagccggccatggcccagg tgaagctg	11B3-scFv	Sfi I
βLac Sfi vor	Ataatggcccagccggccatgcaccag aaacgctggtgaa	βLac	Sfi I
11B3 Not rück (pHEN2)	Gatcgcggccgcccgtttattccagctt	11B3-scFv	Not I

Tabelle 2. Benutzte Oligonukleotide.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Molekularbiologische Standard-Techniken

Ligation, Restriktionsverdau, Dephosphorylierung von DNA, Agarose-Gelelektrophorese, Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen, klassische Plasmid-Präparationen, etc. wurden nach etablierten Standardverfahren durchgeführt.

2.2.1.2. Polymerase Kettenreaktion und Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) dient der *in vitro* Amplifikation kleinster DNA-Mengen unter Verwendung von Oligonukleotiden bekannter Sequenz. Die Oligonukleotide werden so gewählt, daß sie das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Die Enden des Amplifikats tragen somit definierte Sequenzen und können auf diese Weise mit Modifikationen versehen werden.

Das Prinzip der PCR beruht auf drei Reaktionsschritten: die zu amplifizierende DNA wird zunächst denaturiert. Bei gemäßigten Temperaturen binden die Oligonukleotide spezifisch an den ihnen komplementären DNA-Strang (Annealing) und es erfolgt die oligonukleotid-abhängige Verlängerung der Komplementärstränge durch hitzestabile DNA-Polymerasen (Elongation) in Gegenwart von freien dNTPs. Dieser Prozeß wird zyklisch wiederholt, was in einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente resultiert. Als DNA-Polymerase hat sich insbesondere die thermostabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq) bewährt, die ihr Temperatur-Optimum bei 72° C besitzt. Sie besitzt eine hohe 5'-3'-Polymeraseaktivität, aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. In Einzelfällen wurden hier Pwo-Polymerase oder Gemische verschiedener Polymerasen eingesetzt, um die Lesegenauigkeit zu erhöhen, und damit das Risiko von Mutationen zu minimieren.

2.2.1.3. Alkoholpräzipitation mit Pellet Paint[®] Co-Precipitant

Pellet Paint[®] (Novagen, Schwalbach) ist ein farbiges Kopräzipitans, das speziell langwierige Alkoholpräzipitationen bei -20° C umgeht. Sowohl RNA als auch DNA können dabei aus sehr gering konzentrierten Lösungen präzipitiert werden. Das Präzipitat erscheint rötlich, so daß die Lokalisation im Reaktionsgefäß während der Waschschrte vereinfacht wird.

Eine Fällung mit Alkohol wurde meist nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion zur Entfernung von Puffersalzen und Restproteinen oder auch zur Aufkonzentration durchgeführt. Die wässrige Phase wurde mit 2 µl Pellet Paint[®], einem Zehntel Volumenteil 3 M Natriumacetat und einem Volumenäquivalent Isopropanol oder alternativ mit 3 Volumenteil 96% (v/v) Ethanol versetzt und kurz vermischt. Durch Zugabe der Salzlösung mit leicht saurem pH-Wert wird gewährleistet, daß eine quantitative Fällung der DNA erfolgt, wohingegen der Alkohol bewirkt, daß DNA-Moleküle dehydratisieren und assoziieren. Die Fällung erfolgte bei RT für 2 min. Im Anschluß wurde das Präzipitat durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 14000 xg pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Präzipitat

2. Material und Methoden

zunächst mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol, dann mit 500 µl 96% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach wiederholtem fünfminütigem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Pellet für einen Zeitraum von 10-15 min getrocknet und dann in einer geeigneten Menge Wasser aufgenommen.

2.2.1.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA wurde am BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) vorgenommen. Die Quantifizierung erfolgte unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Extinktionen bei 280 und 260 nm automatisch in µg/ml.

2.2.1.5. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

2 ml 2YT-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 37° C und 220 rpm inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 100 ml 2YT-Medium inokuliert und die Zellen bei 37° C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1.0 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min auf Eis gekühlt und dann für 10 min bei 1000 xg und 2° C sedimentiert. Die Zellen wurden in 50 ml eiskaltem Wasser vorsichtig resuspendiert. Dieser Schritt wurde analog wiederholt. Danach wurde erneut zentrifugiert und die Zellen in je 10 ml 10% (w/v) Glycerol resuspendiert. Nach abschließender Zentrifugation wurden die Zellen in 1-2 ml 10% Glycerol resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

Die Transformation erfolgte dann mittels Elektroporation, deren Transformationseffizienz die der klassischen Hitzeschockmethode, die unter Verwendung bivalenter Kationen durchgeführt wird, bei weitem übertrifft. Hierbei werden Poren in der Zellwand durch kurzfristiges Anlegen einer Spannung von bis zu 20 kV und bei möglichst hohem Widerstand der DNA-Zell-Lösung aufgebrochen, womit ein Eindringen zirkulärer DNA in die Zelle ermöglicht wird.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit einer geeigneten Menge des Ligationsansatzes (ca. 0.5 µl) versetzt und 1 min in einer Elektroporationsküvette auf Eis inkubiert. Dann wurde die Küvette kurzfristig einer Spannung von 2500 V ausgesetzt und der Ansatz direkt danach mit 1 ml frischem SOC- oder 2YT-Medium supplementiert und in ein Rundbodenröhrchen überführt. Nach Inkubation bei 37° C und 220 rpm für einen Zeitraum von 1 h wurden jeweils 100 µl der Zellen auf Agarplatten der jeweiligen Resistenz ausgebracht und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.1.6. Lagerung von *E.coli*-Klonen

Auf Agarplatten bleiben *E. coli* Kulturen bei 4° C mehrere Monate lebensfähig. Für die Langzeitlagerung wurden Glycerol-Stockkulturen bei –80° C eingefroren. Dazu wurden von einer über Nacht bei 37° C und 230 rpm gewachsenen Kultur Aliquots von 1 ml mit Glycerol bis zu einer finalen Konzentration von 15-30% supplementiert, in Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80° C gelagert.

2.2.1.7. Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA im kleineren Maßstab erfolgte üblicherweise nach etablierten Protokollen. Präparationen in mittlerem oder größerem Maßstab für Transfektionen von Mammalia oder Transformation von *Pichia pastoris*, was eine Abwesenheit von Endotoxinen u.ä. erfordert, erfolgten meist unter Verwendung kommerzieller Systeme wie des *EZNA Plasmid Midi Preparation Kits* (Peqlab, Erlangen), wobei die Durchführung stets nach Herstellerangaben erfolgte.

2.2.2. Phagentechniken für Phagemid-Systeme

2.2.2.1. Darstellung von M13K07-Helferphagen

Ein Volumen von 0.5 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur des Supressor-Stammes *E. coli* TG1 wurde zu 4 ml einer auf 42° C temperierten Soft-Agar-Lösung gegeben, kurz vermischt und auf eine vortemperierte 1xYT-Platte, auf der zuvor M13K07- oder pKM13-Helferphagen ausgestrichen worden waren, gegossen. Die Gleichmäßigkeit der Verteilung wurde dabei durch sofortiges Schwenken sichergestellt. Nach dem Aushärten wurde die Platte für einen Zeitraum von 12 h bei 37° C inkubiert. Bereiche gut ausgebildeter Plaques wurden mit einer Impföse in 200-400 ml 2xYT-Kanamycin-Medium inokuliert und für einen Zeitraum von 10-16 h bei 37° C und 250 rpm geschüttelt. Nach der Zentrifugation der zellulären Bestandteile wurde der Überstand mit 1/5 Volumenanteil PEG/NaCl versetzt und die Phagen bei 4° C für einen Zeitraum von 2-12 h präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 4000 U/min und 4° C für 30 min wurde der Überstand entfernt, kurz rezentrifugiert und das

Präzipitat in 5 ml PBS resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 10000 xg und 4° C für einen Zeitraum von 30 min wurde der nun phagenhaltige Überstand von zellulären Restbestandteilen abgetrennt, mit Glycerol auf eine finale Konzentration von 15-30% versetzt, aliquotiert und bei -20° C gelagert. Abschließend wurde der Titer der generierten Stocklösungen ermittelt.

2.2.2.2. Titerbestimmung von M13-Phagen

Zur exakten Einstellung der Infektionsmultiplizität muß der Titer der jeweiligen Stocklösungen bekannt sein. Dazu wurden je 200 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur des Supressor-Stammes *E. coli* TG1 mit 200 µl einer geeigneten Verdünnung der Phagen in 2xYT-Medium versetzt, für einen Zeitraum von 30 min bei 37° C ohne Schütteln inkubiert und 100 µl dieser Lösung auf TYE-Platten der jeweils entsprechenden Resistenz ausgebracht. Üblicherweise wurden neben der Kontrolle serielle Verdünnungen im Bereich zwischen 10^{-6} bis 10^{-12} erstellt und analysiert. Die nach einer Inkubation bei 37° C für 12 h resultierenden Klone wurden ausgezählt und der Titer ermittelt. Durchschnittliche Titer lagen im Bereich von 10^{12} - 10^{13} cfu/ml.

2.2.2.3. Darstellung rekombinanter Phagen (Rescue)

Phagemid-tragende Zellen des Supressor-Stammes *E. coli* TG1 wurden in 2xYT-AG-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert. Dieser Wert läßt sich mit einer Zellzahl von 4×10^8 Zellen je ml korrelieren und stellt die Grundlage für die nachfolgende Infektion und ihre Infektionsmultiplizität dar. Bei Kulturen höherer Dichte wurde jeweils ein linearer Zusammenhang vorausgesetzt, wobei Kulturen mit Dichten über einer OD₆₀₀ von 0.8 grundsätzlich nicht verwendet wurden. Die Multiplizität der Infektion wurde je nach Ansatz zwischen 1 und 20 variiert, wobei höhere Werte eine monovalentes Display garantieren (Wildtyp wird bevorzugt), niedere hingegen ein multivalentes Display ermöglichen, wobei allerdings auch hier die monovalente Form dominieren wird. Nach der Zugabe der Helfer-Phagen zu einer geeigneten Zellzahl wurden diese bei 37° C ohne Schütteln für einen Zeitraum von 30 min inkubiert, bei 2500 xg für einen Zeitraum von 10 min abzentrifugiert und in 2xYT-AK-Medium resuspendiert. Sekretion der Phagen erfolgte über Nacht für einen Zeitraum von maximal 16 h bei 30° C und 250 rpm. Im Rahmen der Selektionen wurden üblicherweise Volumina von 10 ml infiziert und in Volumina von 50 ml resuspendiert.

Die Kultur wurde durch Zentrifugation bei 4000 xg bei 4° C für einen Zeitraum von 30 min von zellulären Bestandteilen befreit und die Phagen aus dem Überstand nach Zugabe von 1/5 Volumenanteil PEG/NaCl-Lösung für einen Zeitraum von mindestens 2 h auf Eis präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 3000 xg für 30 min bei 4° C wurde der Überstand entfernt und das Präzipitat nach der Rezentrifugation in PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 10000 xg und 4° C für 10 min wurde der nun phagenhaltige Überstand von zellulären Restbestandteilen abgetrennt, aliquotiert und bei 4° C gelagert. Abschließend wurde der Titer der Phagensuspensionen ermittelt.

2.2.3. Rekombinante Expressionen von Antikörpern in unterschiedlichen Systemen

2.2.3.1. Prokaryotische Expression in *E. coli*

Für die Produktion heterologer Proteine im Labor ist das gram-negative Bakterium *E. coli* aufgrund seines schnellen Wachstums in hohen Zelldichten, seiner relativ einfachen Genetik und der Verfügbarkeit einer Vielzahl von Vektor-Systemen das geeignetste prokaryotische System. Für *E. coli* konnte erstmals erfolgreich die Expression von funktionellen Antikörper-Fragmenten im Periplasma von Prokaryoten demonstriert werden. Die Sekretion in das periplasmatische Kompartiment wurde hier durch die genetische Fusion des Antikörperfragmentes mit einer Signalsequenz eines periplasmatischen Proteins forciert (Skerra und Plückthun, 1988; Better *et al.*, 1988). Das oxidative Milieu im periplasmatischen Raum erlaubt die erfolgreiche Faltung durch Ausbildung der Disulfid-Brücken (Glockshuber *et al.*, 1992).

Expression eines Proteins ohne Signalsequenz resultiert in seinem Verbleib in Cytoplasma. Native Isolierung ist durchaus mittels Ultraschall möglich unter Voraussetzung, dass das Protein in Cytoplasma löslich ist. Es muss berücksichtigt werden, dass das Cytoplasma kein oxidatives Kompartiment darstellt, so dass eigentliches Protein zur Erlangung seiner Funktionalität einer Verwendung redox-aktiver Systeme unterzogen werden muss.

Als Promotoren stehen der lac-Promotor und der virale T7-Promotor zur Verfügung. Abhängig von der Stärke dieser Promotoren müssen das Ausmaß der Induktion und die Temperatur, die in umgekehrtem Verhältnis zum Erfolg der Faltung stehen, gewählt werden. Zusätzlich zu *E. coli* stehen diverse andere Organismen zur Verfügung, in denen erfolgreich Antikörper-Fragmente exprimiert und teilweise funktionell in das Medium sekretiert werden konnten, was für präparative und kommerzielle Expressionen von enormem Vorteil ist. Für

einfache Expressionen im Labormaßstab muß sich bislang jedoch jeder Organismus bezüglich Handhabung und der Vielfalt der Möglichkeiten an *E. coli* messen lassen.

2.2.3.1.1. Periplasmatische Expression in *E. coli*

Kulturvolumina von 50 ml 2xYT-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden Klones inokuliert und über Nacht bei 37° C und 220 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 1000 ml 2xYT-Medium mit 0.1% Glucose und einer entsprechenden Antibiotikakonzentration inokuliert und die Zellen bei 37° C und 220 rpm bis zur OD₆₀₀ von 1 kultiviert. Daraufhin wurde durch Zugabe von IPTG in einer finalen Konzentration von meist 1 mM die Proteinexpression induziert und die Kultur über Nacht bei 25-30° C und 220 rpm inkubiert.

2.2.3.1.2. Präparation des periplasmatischen Extraktes

Der Expressionsansatz wurde auf 4° C abgekühlt und für einen Zeitraum von 15 min bei 4° C und 5000 xg zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml eiskaltem TES-Puffer resuspendiert und nach 3-5 min mit weiteren 30 ml eiskaltem 1/4 TES-Puffer versetzt, gut invertiert und für einen Zeitraum von 90 min auf Eis inkubiert. Der zelluläre Restbestandteil wurde dann bei 6000 xg und 4° C für 15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Da EDTA die Aufreinigung über Ni-NTA durch Komplexbildung des Ni²⁺ inhibieren könnte, wurde der periplasmatische Extrakt dann bei 4° C gegen 5 l PBS unter Verwendung von Slide-A-Lyzer-Kassetten (Pierce, Rockford, Ca.) für einen Zeitraum von mindestens 3 h, gegebenenfalls über Nacht, dialysiert.

2.2.3.1.3. Nativer Zellaufschluß

Proteine, die gezielt ohne Signalsequenz exprimiert werden, enden im cytoplasmatischen Kompartiment. Deren Reinigung erfolgt nativ unter der Voraussetzung, dass sie löslich sind. Das Zellpellet eines 1000 ml Expressionsansatzes wurde in 20 ml PBS resuspendiert. Dazu wurde eine Spatelspitze Lysozym gegeben und die Zellen wurden auf Eis durch 10-fach wiederholte 30-sekündige Sonifizierung aufgeschlossen. Der zelluläre Restbestandteil wurde dann durch Zentrifugation bei 20000 xg für einen Zeitraum von 20 min bei RT abgetrennt.

Der Überstand wurde abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und umgehend für die IMAC-Reinigung eingesetzt.

2.2.3.1.4. IMAC (Immobilized Metallion Affinity Chromatography)

Das Dialysat des periplasmatischen Extraktes oder der Extrakt des Zellaufschlusses wurde mit 5 ml Ni-NTA-Matrix und Imidazol in einer finalen Konzentration von 20 mM versetzt und über Nacht bei 4° C auf dem Rollbrett inkubiert. Die Matrix wurde dann bei 700 xg für einen Zeitraum von 10 min bei 4° C abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Matrix vorsichtig in 40 ml PBS mit 20 mM Imidazol resuspendiert, mehrfach invertiert und erneut bei 700 xg für einen Zeitraum von 10 min bei 4° C zentrifugiert. Die Matrix wurde erneut in 10 ml PBS mit 20 mM Imidazol aufgenommen und in eine kleine Durchflußsäule gegeben. Der Durchlauf wurde mit der Waschfraktion vereint und anschließend die gebundenen Proteine sukzessiv mit 300 mM Imidazol in PBS von der Matrix eluiert. Dabei wurden Fraktionen zu je 1 ml in Reaktionsgefäßen aufgefangen und durch Zugabe von jeweils 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 7.5, neutralisiert. Anschließend wurden die Fraktionen mittels eines 10-15% PAGE-Gels auf ihren Proteingehalt hin überprüft. Die geeigneten Fraktionen wurden vereint, gegen PBS, pH 7.4, dialysiert und abschließend durch eine analytische SDS-Gelelektrophorese auf Proteingehalt und Reinheitsgrad hin analysiert.

2.2.3.2. Eukaryotische Expression in Hefen

Hefen verbinden die eukaryotische Faltung und posttranslationale Modifikationen mit einer simplen Kultivierung. Der methylo trope Hefestamm *Pichia Pastoris* kann Methanol als einzige Kohlenstoffquelle metabolisieren und vermag rekombinante Proteine zu sekretieren und prozessieren. Rekombination am Alkohol-Oxidase-Locus reguliert die Proteinexpression über den starken Promotor der Alkohol-Oxidase. Das Enzym Alkohol-Oxidase katalysiert den ersten Schritt der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd. Die Sekretion wird mittels des α -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* erreicht. Bei der Zugabe von Glucose wird die Transkription des AOX1-Genes unterdrückt, wohingegen Glycerol zu einer Derepression führt. Für die anschließende Induktion wird Methanol verwendet.

Für die Expression von rekombinanten Antikörpern in *Pichia pastoris* stand der Vektor pPICZIgGscFv-Fc zur Verfügung, der eine Expressionskassette enthält. Als Signalsequenz diente der α -Faktor. Über die Schnittstellen SfiI und AscI können beliebige scFv in die

2. Material und Methoden

Kassette kloniert werden. Die Expression erfolgt dann mit den konstanten Fc-Regionen C_H2 und C_H3 als IgGΔC1-Dimer.

2.2.3.2.1. Protein-Expression in *Pichia pastoris*

Die Kultivierung der Hefen erfolgte generell bei 29-30° C auf den entsprechenden Agarplatten im Brutschrank bzw. in Flüssigkultur bei 230-250 rpm im Schüttelinkubator.

2.2.3.2.2. Lagerung von *Pichia pastoris*-Klonen

Auf Agarplatten bleiben *Pichia pastoris* Kulturen bei 4° C mehrere Monate lebensfähig. Für die Langzeitlagerung wurden Glycerol-Stockkulturen bei -80° C eingefroren. Dazu wurde eine 10 ml YPD-Kultur mit entsprechendem Antibiotikum bis zu einer OD₆₀₀ von 5-10 kultiviert und die Zellen bei 1500 xg und 4° C für einen Zeitraum von 5 min abzentrifugiert. Die Hefen wurden in 1 ml YPD-Medium mit einem Glycerolgehalt von 15% resuspendiert und in sterilen Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

2.2.3.2.3. Expression der Zielproteine

Ein Kulturvolumen von 25 ml Phosphat-gepuffertes, Glycerol-haltiges Komplexmedium BMGY in einem 300 ml Erlenmeyerkolben wurden mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte inokuliert und über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 3-6 bei 30° C und 230-250 rpm kultiviert. Nach Zentrifugation bei 1500 xg bei RT für einen Zeitraum von 5 min wurden die Zellen im Methanol-haltigen Induktionsmedium BMMY resuspendiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 verdünnt. Die Proteinexpression erfolgte dann für einen Zeitraum von 3 Tagen bei 29.5° C und 230 rpm. Um den Verlust an Methanol durch Verdunstung auszugleichen, und die Induktion aufrechtzuerhalten, wurde alle 24 h Methanol in Endkonzentration von 0.5% zur Kultur zugegeben. Zur Analyse der Expression wurde der Expressionsansatz zentrifugiert (1500 xg, 30 min, 4° C), der Überstand mittels Ultrafiltration (NMWL 100000) 50-fach konzentriert und durch Zugabe von 1/5 Volumen 1 M Tris pH 9.0 neutralisiert. Nach Zugabe von 200 µl Protein A/G-Agarose wurde über Nacht unter Rollen bei 4° C inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit 50 mM Glycin-Puffer pH 3 für 1-2 min eluiert und sofort

durch 1 M Tris pH 9.1 neutralisiert. Die Analyse der Expression erfolgte durch Auftrennung über eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot und einem Immunprinting.

2.2.3.3. Eukaryotische Expression in Mammalia

Für die Expression von IgG Δ C1-Dimeren in Säugerzellen wurden üblicherweise humane HEK-Zellen eingesetzt. In der Expressionskassette kann ein beliebiger scFv mit IgG-Domänen C_H2 und C_H3 fusioniert werden. Dabei wird die Signalsequenz aus der Ratte zur Sekretion der rekombinanten Antikörper verwendet. Der Vektor pcDNA3.1/Zeo, der neben einem CMV-Promotor ein Zeocin-Resistenzgen enthält, ermöglichte die Generierung stabiler Zelllinien. Die Reinigung der Proteine erfolgte über Protein A/G-Agarose.

2.2.3.3.1. Transfektion und transiente Expression in HEK-Zellen

24 h vor der Transfektion wurden frisch passagierte Zellen mit 2 ml serum-haltigen Medium in Zellkultur-Gefäße geeigneter Größe, meist Platten mit 6 Vertiefungen, überführt. Am Tag der Transfektion soll die Konfluenz der Zellen bei 50-90% liegen. Zur Transfektion mit Hilfe des *GenePorter* Reagenzes (peqLab, Erlangen) wurden 500 μ l serumfreies Medium mit 15 μ l *GenePorter* Reagens sowie 500 μ l serumfreies Medium mit der erforderlichen Menge der vektoriellen DNA, meist 4-8 μ g, vermischt. Anschließend wurden beide Ansätze vereint und für einen Zeitraum von 15-45 min bei RT inkubiert. Zur Transfektion mit *LipofectAmin Plus* (Invitrogen life technologies, Karlsruhe) wurden 100 μ l serum-freies Medium mit 6 μ l *LipofectAmin Plus* Reagenz und 3-10 μ g DNA vermischt und für einen Zeitraum von 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 μ l Medium mit 4 μ l *LipofectAmin Plus* vermischt, zu den Ansätzen gegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert.

Zwischenzeitlich wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 2 ml serum-freiem Medium gewaschen. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und bei 37° C inkubiert. Nach einem Zeitraum von 3-5 h wurde das Medium abgenommen und 2 ml serumhaltiges Medium auf die Zellen gegeben. Das Zellwachstum und die Proteinsekretion erfolgten für drei Tage bei 37° C. Nach der Zentrifugation bei 174 xg für 5 min wurde der Antikörper-haltige Überstand abgetrennt und der IgG Δ C1 mittels Protein A/G-Agarose gereinigt. Das Pellet wurde in eine größere Schale mit 10 ml FKS-haltigem Medium überführt, um eine stabile Zelllinie zu gewinnen.

2.2.3.3.2. Generierung kontinuierlich exprimierender Zelllinien

Für Maximierung der Ausbeuten wurde die Generierung stabil exprimierender Linien angestrebt, wobei von den jeweiligen Ansätzen der transienten Expression ausgegangen wurde. Dazu wurde das Antibiotikum Zeocin in einer finalen Konzentration von 100-1000 µg/ml in das Kultur-Medium zugegeben und die Zellen kontinuierlich in Kultur gehalten und subkultiviert. Die Kultivierung selbst erfolgte in Gewebekulturflaschen aus Polystyrol unter 5%-CO₂-Begasung bei 37° C und 95% Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator. Das Passagieren der Zellen erfolgte unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung, die in Verbindung mit mechanischer Einwirkung auf das Kulturgefäß die Zellen vom Boden ablöst. Das EDTA komplexiert dabei bivalente Ionen wie Calcium und Magnesium, die für die Adhäsion essentiell sind, das Trypsin hingegen wirkt proteolytisch auf die Adhäsionsproteine. Zu dieser Zellsuspension wurde umgehend nach dem Ablösen FKS-haltiges Medium zugegeben, das inhibierend auf Trypsin und die Komplexbildung wirkt. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank durchgeführt.

Nach wenigen Wochen wurde die Präsenz der Zielproteine im Überstand verifiziert, um eine bloße Resistenz ohne die korrelierende Expression auszuschließen.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Proteinbiochemische Standard-Techniken

PAGE-Verfahren, Protein-Bestimmungen, etc. wurden generell nach etablierten Standard-Verfahren durchgeführt (Ausubel *et al.* , 1991).

2.2.4.2. Elektrophoretischer Proteintransfer

Durch elektrophoretischen Transfer lassen sich Proteine auf Membranen immobilisieren und stehen somit weiteren Anwendungen und Charakterisierungen zur Verfügung. Bei dem angewendeten *Semi-Dry*-Verfahren kam eine Trans-Blot *Semi-Dry* Transfer Cell Apparatur (BioRad, München) zum Einsatz. Dabei wird zunächst die entsprechende Membran, üblicherweise eine PVDF-Membran, durch Inkubation für einen Zeitraum von 10 s in Methanol aktiviert, anschließend für einen Zeitraum von 5 min in H₂O und für einen Zeitraum

von 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Im Fall einer Verwendung von Nitrocellulose-Membranen läßt man diese für einen Zeitraum von 5 min in H₂O quellen und äquilibriert sie anschließend für einen Zeitraum von 5 min in Transferpuffer. Auf der unteren Elektrode der Blot-Einheit wurde ein luftblasenfreies Sandwich aus 3 Lagen in Transferpuffer getränkten Filterpapiers, der Membran, dem SDS-PAGE-Gel und weiteren 3 Lagen getränkten Filterpapiers gebildet. Durch Auflegen der zweiten Elektrode und des Abschlussdeckels wurde die Apparatur geschlossen und eine entsprechende Stromstärke angelegt. Die Dauer des elektrophoretischen Transfers richtete sich nach dem Molekulargewicht der jeweiligen Proteine und lag zwischen 30 und 90 min.

2.2.4.3. Reinigung von Antikörperfragmenten und Analoga

Protein A und Protein G sind bakterielle Proteine, die sich durch hohe Affinitäten und Spezifitäten gegenüber Domänen von Immunglobulinen auszeichnen. Gekoppelt an Agarose oder Sepharose sind sie zur Aufreinigung von Antikörpern oder Fragmenten einsetzbar. Die hier eingesetzte ProteinA/G-PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca.) bindet vor allem den Fc-Bereich der Immunglobuline.

Zur Isolierung der rekombinanten Immunglobuline wurde der Kulturüberstand der HEK-Zellen abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 174 xg und RT zentrifugiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Analog wurde der Hefezellkulturansatz bei 1500 xg und RT zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurden 50 µl der Agarose-Matrix je 2 ml Kulturüberstand zugegeben und über Nacht bei 4° C auf dem Rollbrett inkubiert. Nachfolgend wurde die Agarose-Matrix bei 3800 xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen, in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 3800 xg abzentrifugiert. Zur nativen Elution der Immunglobuline wurden 100 µl 50 mM Glycin, pH 3.0, zugesetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Agarose wurde bei 3800 xg abzentrifugiert und der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde noch zweifach mit je 100 µl 50 mM Glycin, pH 3.0, und abschließend denaturierend mit 200 µl nicht-reduzierendem PAGE-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden mit einem Zehntel Volumenteil Tris-HCl, pH 7.5, neutralisiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

2.2.4.4. Dialyse

Zur Reduzierung des Salzgehaltes wurden bis zu 15 ml des PBS-Extraktes in Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassetten mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 10 kDa überführt und für mindestens 3 h gegen ca. 5 l PBS oder andere adäquate Puffer bei 4° C dialysiert.

2.2.4.5. Herstellung unterschiedlicher TNP-Protein-Konjugate

Es wurden 6 mg BSA und 6 mg TNBS·xH₂O (molares Verhältnis 1:250) in 6 ml PBS pH 7.2 gelöst (Wannlund *et al*, 1983) und auf dem Rollbrett bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einer Stunde wurde ein Aliquot von 2 ml abgenommen und zur weiteren Aufreinigung aufbewahrt. Das Gemisch wurde weiter inkubiert und nach insgesamt 3 h Inkubation wurde ein weiteres Aliquot von 2 ml isoliert. Die übrigen 2 ml auf dem Rollbrett wurden weiter über Nacht inkubiert. Alle drei Aliquots wurden einer TCA-Fällung unterzogen. Es wurden jeweils gleiche Mengen (2 ml) an 10% TCA zugegeben und die Gemische für 15 min auf Eis stehen gelassen. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 5000 xg bei RT für 10 min separiert und danach jeweils in 2 ml PBS pH 7.2 aufgenommen. Die gelbe Lösung wurde dann auf eine PD-10 Säule für Gelchromatographie gegeben und mit 20 ml PBS eluiert. Es wurden die Fraktionen von 1 ml gesammelt und ein Elutionsprofil erstellt. Alle Fraktionen wurden zunächst einer Absorptionsmessung bei 340 nm zur Bestimmung von TNP-Konzentration unterzogen. Absorptionsmaximum des TNP bei 340 nm ist 15500 M⁻¹cm⁻¹ (Wannlund *et al*, 1983). Aufgrund einer TNP-Eichgeraden mit dem Konzentrationsbereich von 10 bis 1000 nmol/ml im 100 mM Tris-Puffer pH 9.0 wurde die Konzentration von TNP in gegebenen Fraktionen bestimmt. Als Nullprobe diente der 100 mM Tris-Puffer pH 9.0. Anschließend erfolgte eine Absorptionsmessung bei 595 nm zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford-Reagenz. Die Eichgerade von BSA im Bereich 2.5-25 µg/ml und die abgelesenen Absorptionswerte der gesammelten Fraktionen ermöglichten ebenso eine Bestimmung der Proteinkonzentration.

Als alternatives Konjugat wurde das TNP-Casein hergestellt. Die Erzeugung erfolgte ähnlich wie beim TNP-BSA, indem 60 mg Casein in 6 ml PBS mit 60 mg TNBS versetzt (molares Verhältnis etwa 1:60), und über Nacht auf einem Rollbrett im Dunkeln bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde die lösliche Fraktion abgenommen und über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Bestimmung der TNP-Dichte und der Proteinkonzentration erfolgten wie bei den TNP-BSA-Konjugaten.

2.2.4.6. Herstellung von TNP-Tris

18 mg TNBS·xH₂O wurde in 1 ml 100 mM Tris-Puffer pH 9.0 gelöst. Tris wurde gewählt, da es bei diesem pH-Wert eine ungeladene NH₂-Gruppe besitzt (pK_a=8.1), und somit mit TNBS vorreagieren kann. Somit wird die Reaktion zwischen TNBS und freien NH₂-Gruppen von Lysinresten im Antikörper verhindert. Diese TNP-Tris-Lösung wurde weiter mit demselben Tris-Puffer auf 1:1000 verdünnt und die Absorption bei 340 nm vermessen, wobei es davon ausgegangen wurde, dass sich das Absorptionsmaximum und der Extinktionskoeffizient von TNP-Tris mit denen von TNBS überlappen bzw. nur gering abweichen. Aufgrund des erhaltenen Wertes von 0.362 und des bekannten Extinktionskoeffizienten von 14500 cm⁻¹M⁻¹ wurde die Konzentration von 2.5×10⁻⁵ M für diese Ausgangslösung ausgerechnet (Coffee *et al.*, 1971).

2.2.4.7. Biotinylierung

Biotinylierung von scFvs

Um ein Verstärkungssystem zur Detektion von Antikörpern zu ermöglichen, wurde die Biotinylierung von scFvs ausgeführt. Es wurde üblicherweise nach dem Protokoll vom Hersteller (Pierce, USA) verfahren. Das vorhandene Biotin war mit einer NHS-Gruppe versehen, die in die Reaktion mit primären Aminen eingeht. Somit werden praktisch die Lysinreste in Proteinen biotinyliert. Ein molares Verhältnis zwischen Biotin-NHS und Protein von 12:1 beim Ansetzen und die Inkubationszeit von 30 min bei RT in PBS mit anschließender Dialyse ermöglichten den Modifizierungsgrad von 3-5 Biotin-Molekülen pro scFv. Die mit Biotin gekoppelten scFvs wurden weiter einer Detektion mit Streptavidin-Konjugaten ausgesetzt.

Herstellung eines TNP-Biotin-Konjugates

Um ein TNP-Biotin als Antigen für die Affinitätsmessungen herzustellen, braucht man ein Biotin-Konjugat, das Aminogruppen als reaktive Gruppen besitzt. Ein geeignetes Konjugat wie Biotin-SLC-Hydrazid reagiert mit freier Sulfatgruppe von TNBS. 500 µl einer 1 mg/ml TNBS-Lösung im MES-Puffer wurde mit 1.25 µl einer 100 mg/ml EDC-Lösung (im MES-

Puffer) gemischt. Dazu wurde 2.5 µl einer 50 mM Biotin-SLC-Hydrazid-Lösung in DMSO gegeben und 2 h bei RT auf dem Rollbrett inkubiert. Dieses Reaktionsgemisch wurde danach zentrifugiert und der Überstand einer HPLC unterzogen, um die Reaktanden vom Reaktionsprodukt zu separieren. Die einzelnen Fraktionen wurden danach auf einer Streptavidin-Oberfläche im ELISA getestet.

2.2.5. Immunologische Methoden

2.2.5.1. Immunprinting von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach dem elektrophoretischen Transfer wurde die Membran für einen Zeitraum von 2 min in PBS gewaschen und anschließend für einen Zeitraum von mindestens 20 min in 5% MPBS bei RT blockiert. Danach wurde die Membran in 2% MPBS mit einer geeigneten Antikörper- oder Direkt-Konjugat-Konzentration überführt, und für mindestens 120 min bei RT bzw. über Nacht bei 4° C geschüttelt. Die Membran wurde nachfolgend für je 2 min zweifach mit TPBS und zweifach mit PBS gewaschen. Für Detektionen, in denen mit alkalischer Phosphatase konjugierte sekundäre Antikörper notwendig waren, wurde die Membran dann in 2% MPBS mit einer geeigneten Antikörper-Konzentration für 45-90 min inkubiert und erneut jeweils dreifach mit TPBS und PBS gewaschen.

Zur Entwicklung wurden die Membranen kurz in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5 äquilibriert und danach in eine Färbelösung (12.5 ml 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 100 µl 1 M MgCl₂, 125 µl BCIP, 1.25 ml NBT) überführt. Die Färbung wurde unter Lichtausschluß bis zur deutlichen Abzeichnung der Banden durchgeführt. Im Anschluß wurde die Membran mit Wasser gewaschen und getrocknet.

2.2.5.2. ELISA

2.2.5.2.1. Direkter Assay

Zur Durchführung einer ELISA-Analyse wurde standardmäßig eine „96-Wells“-Platte über Nacht bei 4° C mit entsprechendem TNP-BSA-Konjugat belegt. Als ausschließliche Negativkontrolle bei jedem Assay wurden nur mit BSA belegte Vertiefungen parallel benutzt. Nach dem Waschen dreimal jeweils mit kalten PBS und TPBS wurde für 45 min bei RT mit

BSA blockiert. Nach gleichem Waschprozeß wurde das Antikörper-haltige Reagenz für 1 h bei RT unterm Schütteln inkubiert. Anschließend wurde gewaschen, der detektierende Antikörper draufgegeben und für 1 h bei RT unterm Schütteln inkubiert. Beim Einsatz des sekundären Antikörpers wurde dieser Schritt mit dem AP- oder HRP-konjugierten sekundären Antikörper wiederholt. Nach dem Waschen wurde die entsprechende Entwicklungslösung zugegeben und das Signal im ELISA-Reader nach 10 min vermessen.

Als Entwicklungslösungen dienten ABTS-Lösung für HRP und 16 mM para-Nitro-Phenyl-Phosphat (pNPP) in TBS pH 9.5 für AP (Bretaudiere *et al.*, 1984).

Es wurden standardgemäß Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.5.2.2. Kompetitiver Assay

Die kompetitive ELISA-Analyse wurde analog dem direkten Assay durchgeführt. Es wurde lediglich das jeweilige Immunoreagenz vor der Übertragung auf die Platte mit der entsprechenden Konzentration des Antigens TNBS für ein Intervall von 5 bis 60 min vorinkubiert, um eine Signalunterdrückung zu erzielen.

2.2.6. Charakterisierung des Bindungsverhaltens rekombinanter Antikörper

2.2.6.1. Affinitätsmessung in Lösung mittels kompetitiven ELISA

Die Methode beruht auf der Messung von Antikörpern, die nach der Vorinkubation mit freiem Antigen an das immobilisierte Antigen binden (Friguet *et al.*, 1985). Die Antikörper in einer bestimmten Konzentration und das Antigen, dessen Konzentration variiert, werden für 1 h inkubiert, bis das Gleichgewicht entstanden ist. Der Assay an der Festphase, die mit dem Antigen belegt ist, ermöglicht die Bestimmung der Konzentration des freien Antikörpers im Gleichgewicht.

Die Vorbereitungen für die Affinitätsmessung umfassen die Bestimmung der minimalen Antikörperkonzentration, die im ELISA detektierbar ist, und die sich in dem Bereich befindet, wo die Absorption ihr direkt proportional ist. Die Absorptionen in diesem Konzentrationsbereich müssen eine lineare Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration zeigen. Zu diesem Zweck wurden in einem direkten ELISA die Vertiefungen mit einer stark verdünnten TNP-BSA-Lösung (100 µl einer 1 µg/ml Verdünnung in PBS) über Nacht bei 4°

C belegt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe der Antikörper in den Konzentrationen 10^{-8} , 5×10^{-9} , 1×10^{-9} und 5×10^{-10} M in Volumina von 400 μl angesetzt und jeweils 100 μl in drei belegte (dreifache Bestimmung) und eine unbelegte Vertiefung (Negativkontrolle) gegeben. Danach wurden sie für 30 min bei RT inkubiert. Die jeweiligen Verdünnungen des Antikörpers wurden anschließend in einem zweiten ELISA analysiert. Nach dem dreimaligen Waschen jeweils mit TPBS und PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem anti-hu-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Es wurde erneut dreimal jeweils mit TPBS und PBS gewaschen, mit der ABTS detektiert und die Absorption bestimmt.

Die jeweiligen Verdünnungen wurden in einem weiteren ELISA Test analysiert, wobei jedoch nur eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Nach der Ermittlung der Absorption wurden die Messreihen der zwei ELISA-Tests tabellarisch und graphisch dargestellt. Aus dem Unterschied zwischen den Absorptionen für eine Antikörperkonzentration lässt sich berechnen, wie viel Prozent der Antikörper gebunden ist. Die angesetzten Konzentrationen an belegten Antigen und die Inkubationszeit beim ELISA sind so gering, dass nur eine kleine Menge (5-10%) des ungesättigten Antikörpers an das immobilisierte Antigen bindet. Somit wird sichergestellt, dass das Gleichgewicht in der Lösung während des ELISA nicht beeinträchtigt wird.

Anschließend erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse im Format Absorption gegen die Antikörperkonzentration. Die Antikörperkonzentration, die für weitere kompetitive ELISA gewählt wurde, betrug 1×10^{-9} M, da die Absorption hier noch eine genügend große Differenz für die messbare Unterdrückung des Signals durch freies Antigen ergeben hat.

Ein kompetitiver ELISA wurde mit der konstanten Antikörperkonzentration von 1×10^{-9} M und einer variierenden Antigenkonzentration von 1×10^{-8} bis 1×10^{-10} M durchgeführt. 200 μl einer 1×10^{-9} M Antikörperverdünnung wurde zunächst für 1 h bei RT mit 200 μl der entsprechenden Verdünnung seines Antigens vorinkubiert, bis ein Gleichgewicht entstand. Als Positivkontrolle wurde nur der Antikörper inkubiert. Danach wurden die Proben in die ELISA-Platte überführt, die genauso belegt wurde, wie im Protokoll für den direkten ELISA (100 μl einer 1 $\mu\text{g/ml}$ Verdünnung) beschrieben ist. Danach wurden 100 μl der jeweiligen Antikörper-Verdünnungen auf die ELISA-Platte gegeben (doppelte Bestimmung und Negativkontrolle) und weiter, wie beim direkten ELISA beschrieben, inkubiert und behandelt. Es wurde die Absorption ermittelt und die K_d -Werte berechnet.

Die Affinität eines Antikörpers definiert sich als der reziproke Wert seiner Dissoziationskonstante ($K_a = 1 / K_d$). Die Dissoziationskonstante wird aus der folgenden Formel ausgerechnet:

2. Material und Methoden

$$K_d = (AK_t * AG - AG * x) / x$$

AK_t – Gesamtkonzentration der Paratope (beim bivalenten Antikörper ist sie dem zweifachen Wert der Antikörperkonzentration gleich).

x – Konzentration des AK-AG-Komplexes.

$x = AK_t - AK$, wobei AK die Konzentration des freien Antikörpers ist, und aufgrund der folgenden Formel ausgerechnet wird:

$$AK = (AK_t * A) / A_0$$

A_0 ist die Absorption der Probe, die nur den Antikörper (ohne Antigen) enthält.

A ist die Absorption vom Well, wo der Antikörper zusammen mit dem Antigen einer bestimmten Konzentration inkubiert wurde.

AG – Konzentration des freien Antigens.

$AG = AG_t - x$, wobei AG_t die Gesamtkonzentration des inkubierten Antigens ist.

Aufgrund dreier unterschiedlicher Antigenkonzentrationen wurden drei K_d -Werte bestimmt und anschließend gemittelt. Der Durchschnittswert stellt den K_d -Wert dar.

3. Ergebnisse

3.1. Evaluierung von unterschiedlichen Antikörper-Fragmenten

Ausgehend von zwei im Arbeitskreis vorhandenen scFv-Fragmenten gegen TNP wurde eine ganze Reihe der Immunoreagenzien generiert. Die eigentlichen Fragmente sind unterschiedlichen Ursprungs: der 11B3 ist ein muriner Antikörper (Whelan *et al.*, 1993), während der 3.5 scFv als ein selektierter humaner scFv aus einer synthetischen Griffin-Bibliothek vorliegt. Die Darstellung dieser Fragmente erfolgte in unterschiedlichen Formaten. Sie wurden in monovalenter Form als einzelne scFvs sowie als Fusionsproteine mit der β -Lactamase exprimiert. Diese Fusion hat die Bifunktionalität solcher Immunoreagenzien zur Folge. Weiterhin wurden die scFvs für die Erzeugung der bivalenten Antikörper genutzt. Um die scFvs in einem bivalenten Format einsetzen zu können, wurde die Herstellung von IgG Δ C1-Konstrukten angestrebt. Weiterhin wurden die scFvs auf den filamentösen Phagen exponiert. Dabei kann man eine Bifunktionalität erreichen, indem neben einem scFv die β -Lactamase dargestellt wird. In dieser Art und Weise wurden monovalente und pentavalente Phagen mit und ohne β -Lactamase hergestellt.

Um die Bindungseigenschaften von Antikörpern in einem Immunoassay zu analysieren, wurden sowohl freie TNP-Tris als auch TNP-Proteinkonjugate eingesetzt.

3.1.1. Analyse unterschiedlicher TNP-Proteinkonjugate

Die Durchführung von Immunoassays basiert auf der Immobilisierung eines Interaktionspartners auf der Festphase. Die Immobilisierung des TNP als Antigen auf der Mikrotiterplatte verlangt die Existenz eines größeren Moleküls, das dieses Antigen auf seiner Oberfläche trägt. Als Hapten-tragendes Molekül wurde primär BSA gewählt und als ein alternatives Molekül wurde Casein verwendet.

3.1.1.1. TNP-BSA-Konjugate

Um BSA chemisch zu modifizieren, wurde die Kopplungsreaktion mit TNBS für diverse Inkubationszeiten vorgenommen. Die verschiedenen Inkubationszeiten sollen ermöglichen, die TNP-BSA Konjugate mit unterschiedlicher Dichte von TNP zu produzieren.

BSA enthält 607 Aminosäuren, davon 60 Lysinreste, deren NH_2 -Gruppen in Reaktion mit der SO_3 -Gruppe der TNBS treten. Die Protein- und die TNP-Konzentrationsbestimmung ergaben folgende Werte:

Konjugat (Inkubationszeit)	c(TNP) nmol/ml	c(BSA) nmol/ml	Anzahl TNP pro BSA
1 h	135.8	47.8	3
3 h	210.4	43.5	5
über Nacht	675.0	13.5	52

Tab. 3. Überblick der synthetisierten TNP-BSA-Konjugate.

Nach der Synthese der Konjugate wurde die Trennung der freien, unreaktierten TNBS vom TNP-BSA mittels einer Gelchromatographie durchgeführt. Es wurden die Fraktionen von 1ml gesammelt. Das Elutionsprofil der Trennung der freien TNBS vom Konjugat mit der Dichte von 3 TNP pro BSA wurde durch photometrische Messung der Fraktionen erstellt (Abb. 3). Alle drei Konjugate wurden weiter in einem Assay zum Nachweis der Reaktivität von TNT-spezifischen Antikörpern charakterisiert (siehe 3.3.1).

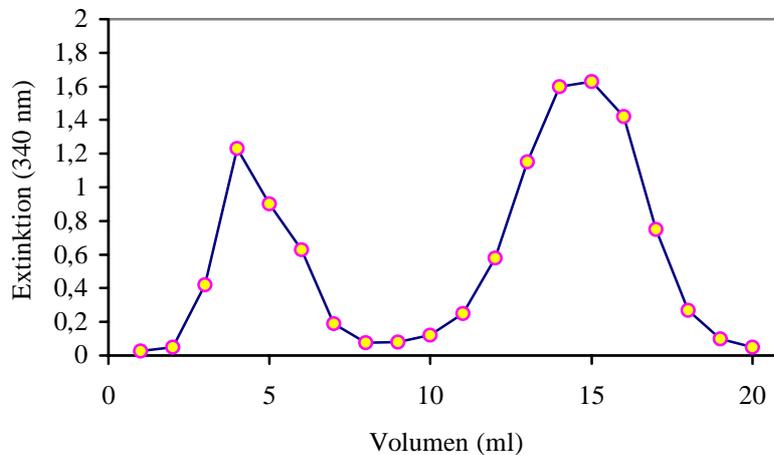


Abb. 3. Trennung der freien TNBS vom TNP-BSA-Konjugat mit der Dichte von 3 TNP pro BSA mittels Gelchromatographie.

Es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt und einer Absorptionsmessung bei 340 nm zur Überprüfung der Präsenz der TNBS unterzogen. Anschließend wurden alle Fraktionen mit dem Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung vermischt und deren Absorption bei 595 nm abgelesen. Die Farbe der Fraktionen 2-6 wies darauf hin, dass sich das TNP-BSA Protein in denen befindet, was die photometrische Messung bestätigte. Die Absorptionsmessung zeigte weiter, dass ab der 10. Fraktion die freie TNBS eluiert.

3.1.1.2. TNP-Casein-Konjugat

Als alternatives Konjugat wurde TNP-Casein hergestellt. Die Bestimmung des Derivatisierungsgrades ergab einen Wert von 13 TNP pro Casein. Da Casein ein heterogenes Gemisch von Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts (von 18 bis 30 kDa) darstellt, die zwischen 9 und 19 Lysinreste pro Molekül enthalten, wurde eine nahezu vollständige Sättigung erreicht. Das TNP-Casein wurde in einer Verdünnung von 50 µg/ml für die Beschichtung im Assay zum Nachweis von TNP eingesetzt.

3.1.2. Monovalente Antikörper 11B3- und 3.5-scFv

Die monovalenten Antikörper wurden mittels unterschiedlicher Klonierungsstrategien konstruiert und in prokaryotischen Systemen exprimiert. Der 3.5-scFv stand in gereinigtem Zustand zur Verfügung. Dieser scFv war mit His-Tag zur Reinigung und Myc-Tag zur Detektion versehen. Die Klonierung des 11B3-scFvs sah ebenfalls vor, dass stromabwärts des scFv-Gens die Sequenz für den HisTag (zur Reinigung) und die Sequenz für den MycTag (zur Detektion) liegen. Weiterhin war eine Signalsequenz zur sekretorischen Expression ins Periplasma stromaufwärts des scFv-Gens vorhanden. Zur Klonierung des 11B3-scFv wurde der Vektor pHen2 gewählt, dessen Schnittstellen SfiI und NotI die gewünschte Insertion ermöglichten. Da die Expression dieses Proteins periplasmatisch nicht erhalten werden konnte, wurde eine Klonierung für eine intrazelluläre Expression des 11B3-scFv angestrebt. Der 11B3-scFv wurde in den Vektor pET26 b(+) zwischen den Schnittstellen NdeI und NotI inseriert, wobei bei der Klonierung die Signalsequenz entfernt wurde, was in einer intrazellulären Expression resultieren sollte.

Das mit scFv-spezifischen Oligonukleotiden erhaltene PCR-Amplifikat wies die erwartete Höhe von 748 bp auf (siehe Abb. 4).

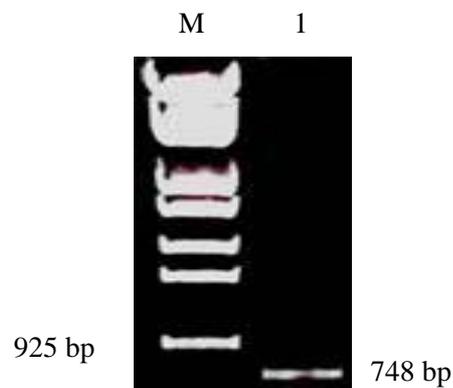


Abb. 4. Das Amplifikat von 11B3-scFv mit der Größe von 748 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pHEN2 klonierte 11B3-scFv-Insert mit Oligonukleotiden 11B3 Nde vor und 11B3 Not rück (pET). 5 µl Marker Eco130I (M) und 5 µl Amplifikat (1) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

3. Ergebnisse

Die Expression des 11B3-scFv erfolgte im *E.coli*-Stamm BL21 DE3 unter Verwendung des T7-Promotors. Der T7-Promotor bleibt unter Verwendung von Glucose inaktiv und wird in Anwesenheit von Lactose oder ihrer Analoga aktiviert. Nach intrazellulärer Expression wurden die Zellen aufgeschlossen und der cytosolische Überstand separiert. Das Protein wurde über Ni-NTA-Matrix aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Die Banden bei 28 kDa auf dem SDS-Gel und im Western-Blot bestätigten die erfolgreiche Expression des Antikörpers. (Abb. 5).

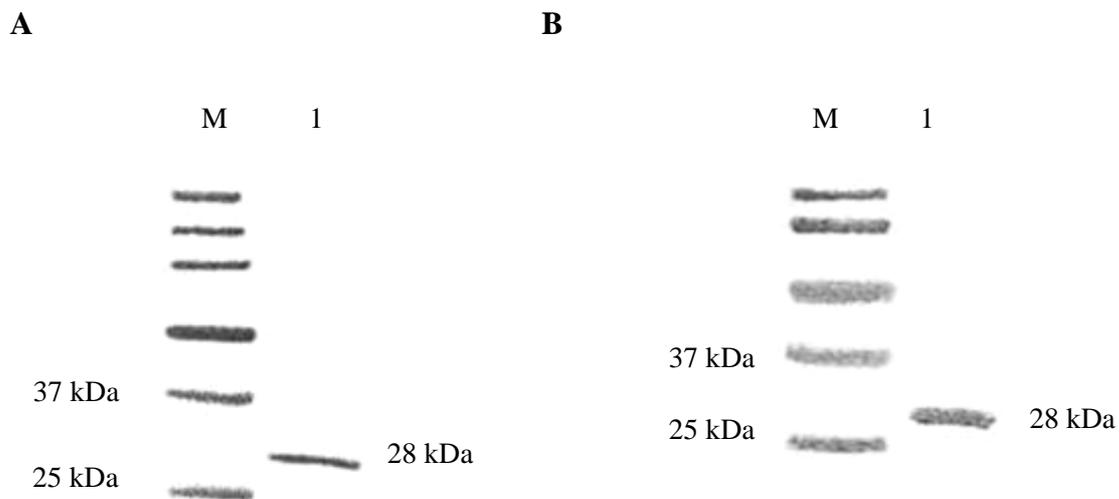


Abb. 5. SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot des gereinigten 11B3-scFv.

15 μ l der Proteinprobe (1) wurde unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12%-SDS-Gel zusammen mit 10 μ l Proteinmarker (M) aufgetrennt. **A:** das Protein wurde durch Coomassie-Färbung visualisiert. **B:** die Präsenz des Proteins wurde nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch Detektion mittels murinen anti-His-IgG-AK (1:2500) und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (1:2500) bestätigt.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung ergab einen Wert von 65 μ g/ml. Der Antikörper wurde weiterhin einer Biotinylierung unterzogen und in einem Assay zum Nachweis von TNP eingesetzt.

3.1.3. Bivalente Konstrukte 11B3- und 3.5-IgGΔC1

Das bivalente Konstrukt IgGΔC1 ist ein synthetisches Konstrukt, das nach der Klonierung des 11B3- bzw. 3.5-scFv-Gens in die Expressionskassette mit konstanten C_H2- und C_H3-Regionen der humanen γ-Kette erzeugt wurde. Der 3.5-IgGΔC1 war im Arbeitskreis vorhanden. Die Expression des 11B3-IgGΔC1 Konstruktes erfolgte parallel in zwei Expressionssystemen: der Hefe *Pichia Pastoris* und der humanen Zelllinie HEK 293.

3.1.3.1. Expression in humanen HEK 293 Zellen

Als Expressionskassette stand der Vektor pcDNA3.1 mit einem starken viralen Promotor zur Verfügung. In diesen Vektor wurden die schweren Regionen der humanen γ-Kette eingebracht. Für die Klonierung des 11B3-scFv-Gens eigneten sich die Schnittstellen BsiI und AscI. Auf die Ligation und Transformation folgte die Charakterisierung der Klone mittels PCR. Das hier gezeigte Amplifikat (Abb. 6) bestätigt die Klonierung des 11B3-scFv-Inserts in den Vektor.

Die rekombinante DNA wurde weiter zur Etablierung stabil sekretierender Zelllinien benutzt. Aus ca. 300 ml des Expressionsüberstandes wurde der Antikörper über die ProteinA-Agarose aufgereinigt. Als Eluent diente 20 mM Citratpuffer pH 3.0. Die neutralisierten Elutionsfraktionen wurden in Hinsicht auf die Präsenz des Proteins im SDS-Gel und mittels Western-Blot analysiert. Positive Fraktionen wurden gesammelt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Abb. 7 zeigt das gereinigte Protein im SDS-Gel und auf der PVDF-Membran. Die anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung ergab einen Wert von 90 µg/ml. Mit insgesamt 4.5 ml des Eluats lag die Gesamtmenge des Proteins bei 410 µg, so dass die Expressionsrate für eine Kultur von 300 ml 1.37 µg/ml betrug. Das so aufgereinigte Protein konnte in Assay zum Nachweis seiner Funktionalität direkt verwendet werden.

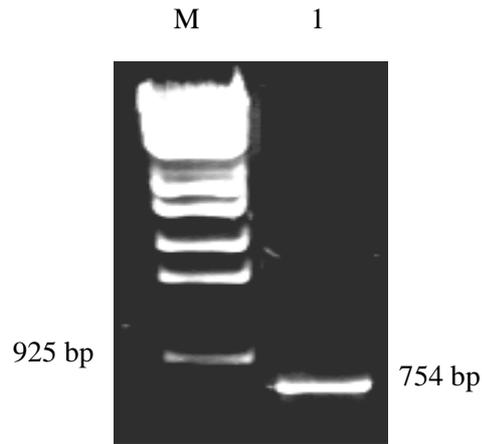


Abb. 6. Das Amplifikat von 11B3-scFv mit der Größe von 754 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pcDNA3.1 klonierte 11B3-scFv-Insert mit Oligonukleotiden 11B3 Bsi vor und 11B3 Asc rück. 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (1) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

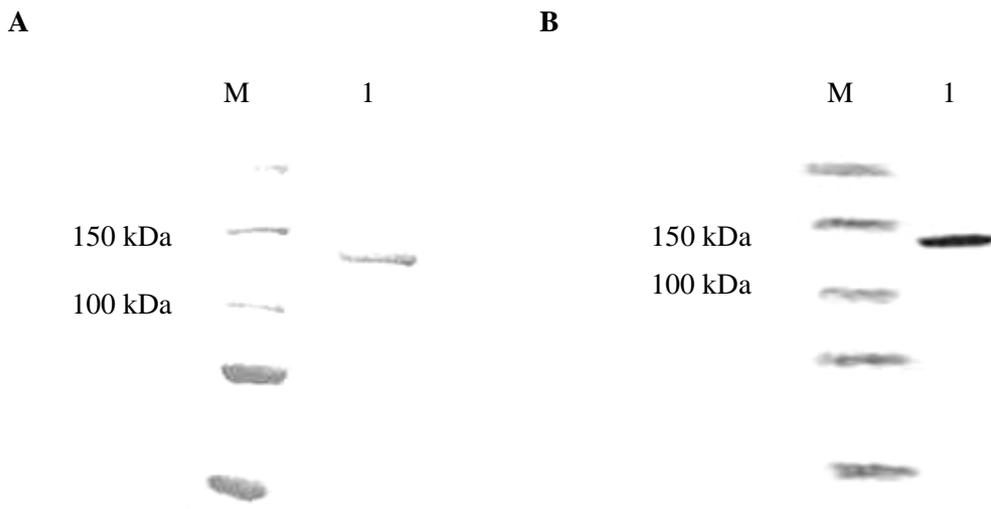


Abb. 7. SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot des gereinigten 11B3-IgGAC1.

10 μ l Proteinmarker (M) und 10 μ l der Proteinprobe (1) wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf einem 7.5%-SDS-Gel aufgetrennt. **A:** das Protein wurde durch Coomassie-Färbung visualisiert. **B:** die Präsenz des Proteins wurde nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch Detektion mittels anti-human-IgG-AP-Konjugat (1:2500) bestätigt.

3.1.3.2. Expression in Hefe

Für die Expression in der Hefe *Pichia Pastoris* wurde der Vektor pPICZ α B verwendet, in den schon die Gene für schwere Regionen der humanen γ -Kette eingebracht wurden. Die Klonierung des scFvs in diesen Vektor verlief über SfiI/AscI Schnittstellen. Nach der Ligation und Transformation von *E.coli* wurden die Klone mittels PCR überprüft. Die positiven Klone ergaben ein 757 bp großes Amplifikat mit scFv-spezifischen Oligonukleotiden (Abb. 8). Einer der selektierten Klone wurde zur Inokulierung einer über Nacht wachsenden Zeocin-haltigen Kultur und abschließend zur Isolierung der DNA gewählt. Die isolierte DNA wurde dann linearisiert und in die Hefezellen durch Elektroporation eingebracht.

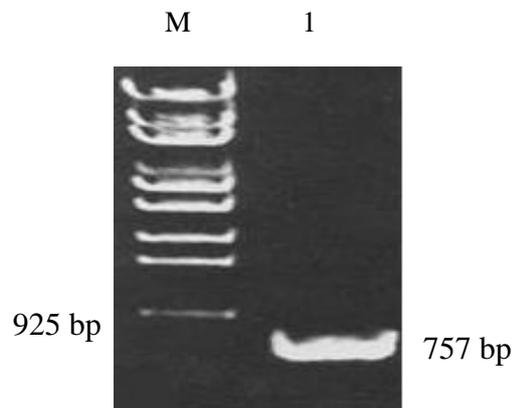


Abb. 8. Das Amplifikat von 11B3-scFv mit der Größe von 757 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pPICZ α B eingebrachte 11B3-scFv-Fragment mit Oligonukleotiden 11B3 Sfi vor (pPICZ α B) und 11B3 Asc rück. 5 μ l Amplifikat (1) und 5 μ l Marker Eco130I (M) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

Nach der Elektroporation der Hefe mit der isolierten DNA wurde die dreitägige Expression mit einem der selektierten Klone durchgeführt. Es wurde mit Methanol induziert. Die Analyse des Expressionsüberstandes erfolgte über ProteinA-Agarose. Danach wurde das Eluat mittels Western-Blot und SDS-Gel analysiert. Im Blot wurde das Protein in sehr geringer Menge mit dem anti-human-IgG-AP-Konjugat detektiert. Auf dem SDS-Gel konnte das Protein nicht visualisiert werden. Aufgrund dieser Umstände wurde auf die Expression in HEK-Zellen zurückgegriffen.

3.1.4. Etablierung der Parameter für den Assay

Als Modell für die Festlegung aller relevanten Parameter für den Assay diente der bivalente Antikörper 11B3-IgGAC1. Die sich mit diesem Molekül ergebenden Werte sollen dann die gezielte Analyse der weiteren Immunkomponenten ermöglichen.

3.1.4.1. Untersuchung unterschiedlicher TNP-BSA-Konjugate

Um eine maximale Signalintensität zu gewährleisten, wurden drei TNP-BSA-Konjugate mit unterschiedlicher Dichte von TNP im Assay getestet. Es wurden 50 µl einer 50 µg/ml Konzentration des jeweiligen Konjugates über Nacht bei 4° C auf der ELISA-Platte inkubiert. Nach dem Waschen wurde mit BSA blockiert und die 11B3-Antikörper-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde erneut gewaschen und der anti-human-IgG-HRP in einer Verdünnung von 1:2500 als Detektionsmittel zugegeben. Nach 1-stündiger Inkubation bei RT wurde gewaschen und mit ABTS-Lösung entwickelt. Das Signal wurde bei 405 nm nach 10 min vermessen (Abb. 9).

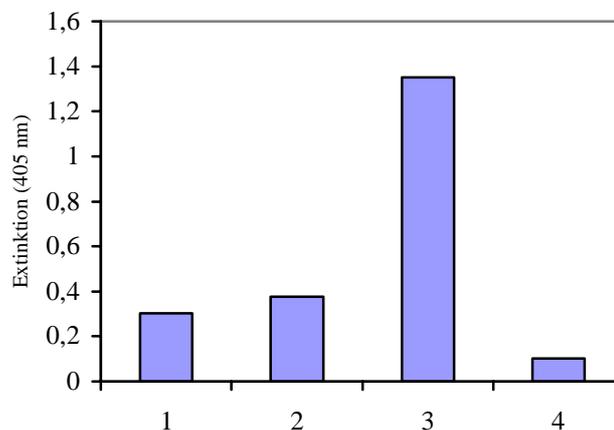


Abb. 9. ELISA zur Überprüfung der Bindungscharakteristika dreier unterschiedlicher TNP-BSA-Konjugate.

Es wurden die TNP-BSA-Konjugate mit einer Dichte von 3 (1), 5 (2) und 50 (3) TNP pro BSA getestet. Nach Beschichtung mit TNP-BSA-Konjugaten über Nacht in PBS erfolgten eine 60-minütige Inkubation der 11B3-IgGAC1-Lösung und eine 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Beschichtung mit BSA diente als Negativkontrolle (4).

Aus der Abb. 9 ist ersichtlich, dass das beste Signal das Konjugat mit 50 TNP pro BSA-Molekül ergab. Dieses Konjugat wurde für alle weiteren Experimente benutzt.

3.1.4.2. Mindestmenge am Immunoreagenz zur Detektion

Um die Sensitivität des Assays zu optimieren, wurde eine Minimierung der Antikörperkonzentration angestrebt. Die zu detektierende Menge des Antikörpers soll so gewählt werden, dass folgendes Verhältnis gewährleistet ist: Signal der Negativkontrolle < durch TNP-Tris unterdrücktes Signal < Signal ohne Unterdrückung.

Da bei einem direkten Assay mit konzentriertem 11B3-IgG Δ C1 ohne Inhibition ein starkes Signal schon nach zweiminütiger Entwicklung entstand, wurde eine Verdünnungsreihe von 1:50 bis 1:400 des Antikörpers angesetzt.

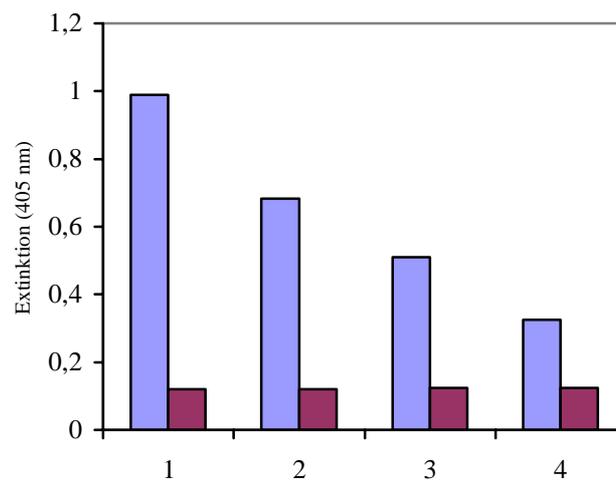


Abb. 10. Die Detektion der Minimalmenge des Antikörpers 11B3-IgG Δ C1.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurden die 11B3-Antikörper-Verdünnungen 1:50 (1), 1:100 (2), 1:200 (3) und 1:400 (4) für 60 min inkubiert. Es erfolgte die 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

Aufgrund der erhaltenen Reaktivitäten wurde eine Antikörperkonzentration von 225 ng/ml für die weiteren Assays ausgewählt. Das Signal bei dieser Verdünnung lag bei 0.325 und mit dem Signal von der Negativkontrolle von 0.125 ergab sich noch eine genügende Differenz für ein Signal von ca. 0.2 bei der Unterdrückung mit TNP-Tris.

3.1.4.3. Inhibition von 11B3-IgGAC1 durch TNP-Tris

Das primäre Ziel des Assays war, die Minimalmenge des Kompetitors TNP-Tris festzustellen, die eine noch meßbare Unterdrückung des Signal nach der Vorinkubation mit dem Antikörper ergibt. Zu diesem Zweck mußte eine geeignete Verdünnung von TNP-Tris generiert werden. In mehreren Ansätzen wurde jeweils 1-5 µl einer TNP-Tris-Verdünnung von 2.5×10^{-6} bis 2.5×10^{-8} M (in absoluten Werten: zwischen 1.0 pmol und 25 fmol) mit 60 µl AK-Konzentration 225 ng/ml für 1 h im Rollbrett bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Signale der jeweiligen Ansätze ermittelt (Abb. 11) und der Sättigungsbereich definiert, bei dem keine Signalunterdrückung mehr auftrat.

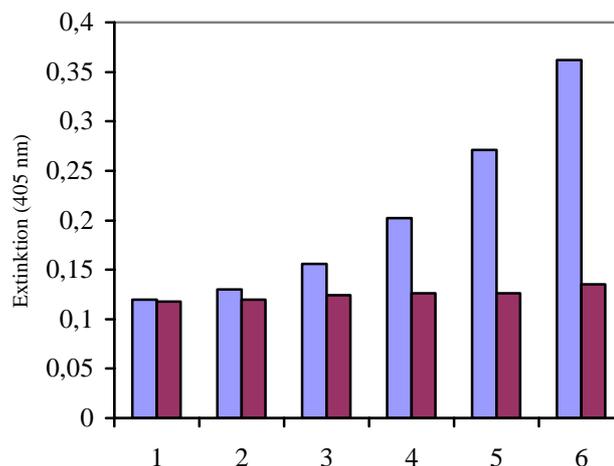


Abb. 11. Bestimmung der Detektionsgrenze für TNP-Tris im kompetitiven ELISA.

Nach Beschichtung mit TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurde 60 µl einer Antikörper-Verdünnung von 225 ng/ml für 1 h jeweils mit 2 pmol (1), 500 fmol (2), 200 fmol (3), 50 fmol (4) und 25 fmol (5) TNP-Tris vorinkubiert. Als Positivkontrolle (6) diente der Antikörper ohne TNP-Tris. Die Ansätze wurden dann auf der ELISA-Platte für 60 min inkubiert. Es erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

Aus dem Diagramm war zu ersehen, dass der Sättigungsbereich (volles Signalerlöschung) schon ab 200 fmol TNP-Tris beginnt. Eine signifikante Signalunterdrückung wurde bei einer Menge von 25 fmol festgestellt. Diese Menge stellte das Detektionslimit dar und bestimmte die Sensitivität des Assays.

3.1.4.4. Verdrängungsassay

Als eine Alternative zu einem Assay in kompetitivem Format bietet sich der Verdrängungsassay an. Die Sensitivität des Verdrängungsassays wurde mit dem 11B3-IgG Δ C1 als Modell geprüft. Dieser Antikörper hat zunächst an das immobilisierte TNP-BSA gebunden, worauf die Zugabe der freien TNP-Tris als Kompetitor folgte. Dabei wurde versucht, den Antikörper durch die Bildung des Komplexes mit TNP-Tris zu verdrängen.

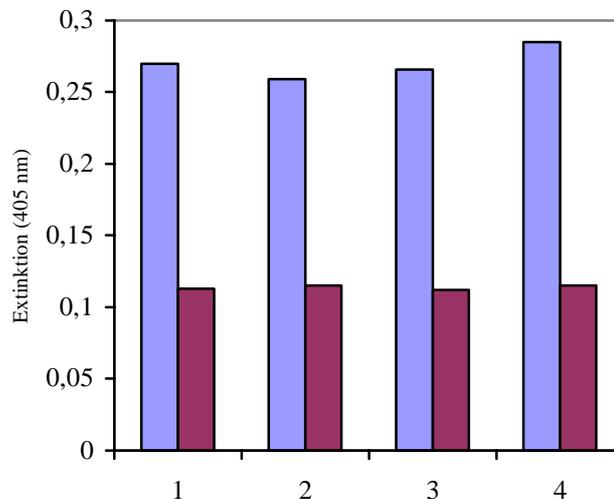


Abb. 12. Verdrängungsassay zum Nachweis der TNP-Tris.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurde 60 μ l 11B3-Antikörper-Verdünnungen 225 ng/ml inkubiert. Danach wurden für 1 h jeweils 50 fmol (1), 100 fmol (2) und 250 fmol (3) TNP-Tris inkubiert. Als Positivkontrolle (4) diente die Probe ohne TNP-Tris. Es erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

In einem Verdrängungsassay konnte durch den Einsatz einer geeigneten Menge (50-250 fmol) an freier TNP-Tris keine Reduktion des Signals festgestellt werden - das Signal blieb gleich jenem ohne Zugabe des Kompetitors (Abb. 12). Es wäre hier zu erwarten, dass eine wesentlich größere Menge an TNP-Tris erforderlich ist, um den Antikörper partiell von der Platte zu verdrängen. Somit hat sich diese Form des Assays als unsensitiv erwiesen und konnte nicht weiter betrachtet werden. Der kompetitive Assay wurde daher dem Verdrängungsassay vorgezogen.

3.1.4.5. Optimierung der Vorinkubationszeit

Zur Schnelligkeit des Assays trägt auch die Zeit der Vorinkubation bei. Zum Zweck der Zeitoptimierung wurde ein kompetitiver Assay mit dem 11B3-IgG Δ C1 ausgeführt, in dem der Antikörper und TNP-Tris unterschiedlichen Vorinkubationszeiten (von 5 bis 60 min) unterzogen worden sind.

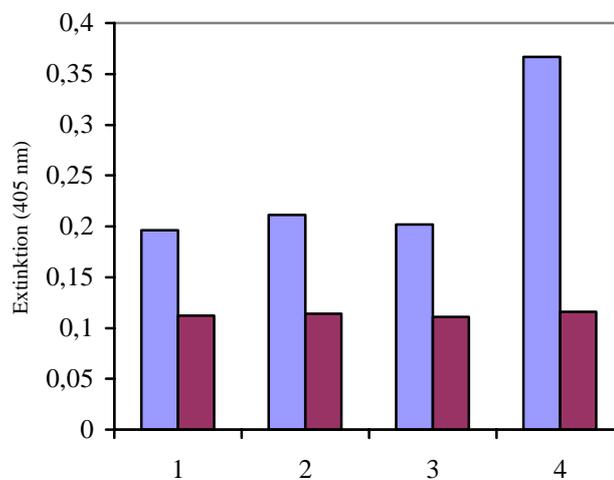


Abb. 13. Einfluss unterschiedlicher Vorinkubationszeiten auf die Nachweisgrenze der TNP-Tris im kompetitiven Assay.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurde 60 μ l 11B3-Antikörper-Verdünnungen (225 ng/ml) mit 25 fmol TNP-Tris jeweils für 5 min (1), 20 min (2) und 60 min (3) vorinkubiert. Als Positivkontrolle (4) diente der Antikörper ohne TNP-Tris. Die Ansätze wurden dann auf der ELISA-Platte für 60 min inkubiert. Es erfolgte die 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

Aus der Abbildung 13 ist ersichtlich, dass von der vorher beschriebenen 1-stündigen auf die ca. 5-minütige Vorinkubation übergangen werden konnte. In weiteren Experimenten wurde eine 5-minütige Vorinkubation vorgenommen.

3.1.4.6. Detektionsmittel

Um ein maximales Signal mit der Minimalmenge am Immunoreagenz zu erhalten, wurden vier unterschiedliche Detektionsmittel eingesetzt: ProteinA-HRP, ProteinA-AP, anti-human-IgG-AP (Fc-spezifisch) und anti-human-IgG-HRP (Fc-spezifisch). Jedes Konjugat wurde in zwei Verdünnungen getestet: 1:2500 und 1:10000. Unter Betrachtung des Hintergrundes erwiesen sich bei allen vier Konjugaten die 1:2500 Verdünnungen besser als die 1:10000.

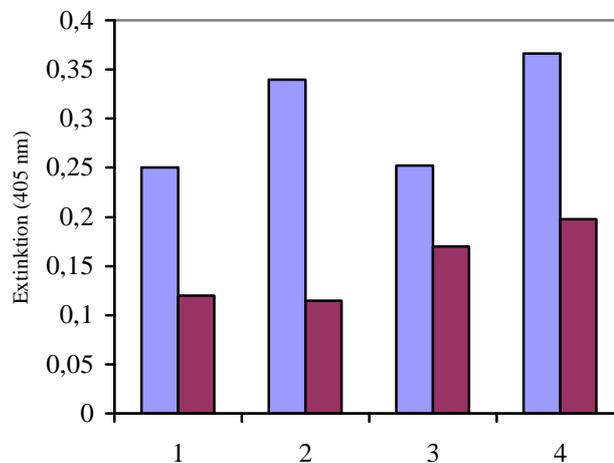


Abb. 14. Untersuchung der Sensitivität unterschiedlicher Detektionsmittel zum Nachweis des 11B3-IgGΔC1.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurde die 11B3-Antikörper-Verdünnung von 225 ng/ml für 60 min inkubiert. Es erfolgte die 60-minütige Inkubation jeweils mit unterschiedlichen Konjugaten: ProteinA-HRP (1), anti-human-IgG-HRP-Konjugat (2), ProteinA-AP (3) und anti-human-IgG-AP-Konjugat (4) (alle in einer Verdünnung von 1:2500). Die Farbentwicklung wurde für HRP-Konjugate mit ABTS bzw. für AP mit pNPP bei 405 nm vermessen.

Aus der Abb. 14 ist ersichtlich, dass beide ProteinA-Konjugate schwächere Signale ergaben als die Fc-spezifischen IgG-Konjugate. Dies ist die Folge der Tatsache, dass ProteinA, im Vergleich zu Fc-spezifischen IgG-Moleküle nur an eine Stelle des Immunoglobulins G binden kann.

Die AP-Konjugate ergaben einen höheren Hintergrund im Vergleich zu HRP-Konjugaten. Deshalb wurden die HRP-Konjugate den AP-Konjugaten vorgezogen. Von den zwei HRP-Konjugaten wurde der anti-hu-IgG-HRP wegen des um ca. 0.1 höheren Signals bevorzugt. In allen Experimenten mit humanen IgG Δ C1-Antikörpern wurde daher der anti-hu-IgG-HRP-Fc-spezifisch in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet, der immer vor dem jeweiligen Versuch frisch in 1.5% BSA in PBS angesetzt wurde.

3.1.4.7. Entwicklungszeit

Nach der Auswahl des optimalen Detektionsmittels bestand auch der Bedarf nach der Verkürzung der Entwicklungszeit. Kürzere Entwicklungszeiten bedeuten schnelleren Assay. Längere Entwicklungszeiten ergeben höhere Signale, aber eventuell auch einen höheren Hintergrund. Um die Entwicklungszeit zu optimieren, wurde der direkte Assay mit dem 11B3-IgG Δ C1 in Verdünnungen von 1:50 bis 1:400 auf der TNP-BSA-beschichteten Platte durchgeführt und das Signal nach 10 und nach 30 min vermessen (Abb. 15). Da sich bei einer Inkubationszeit von 30 min im Vergleich zu 10 min ein höheres Signal bei gleichbleibendem Hintergrund ergab, wurde im folgenden diese Zeit beibehalten.

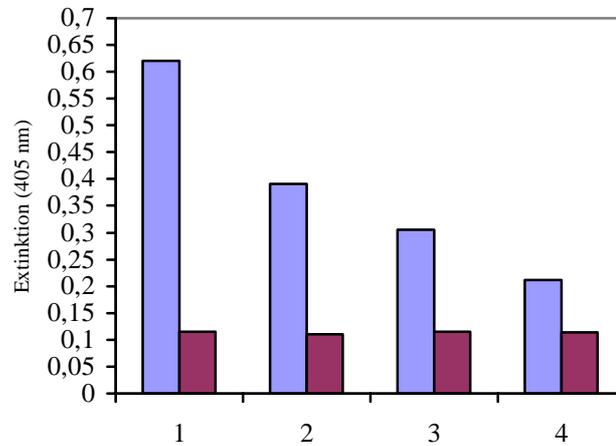
3.1.5. Vergleich der Konstrukte 3.5-IgG Δ C1 und 11B3-IgG Δ C1

3.1.5.1. Bivalenter Antikörper 11B3-IgG Δ C1

Dieser Antikörper lag in einer Konzentration von 90 μ g/ml vor.

Der Einsatz dieses Antikörpers mit der Optimierung der Bedingungen für den kompetitiven Assay wurde im vorherigem Kapitel beschrieben. Diese Daten führten zu der Schlußfolgerung, dass sich diese Immunokomponente im Assay als sehr sensitiv erwies. Durch den Einsatz von 60 μ l einer 225 ng/ml Antikörperlösung wurde die Menge von 25 fmol TNP-Tris nachgewiesen.

A



B

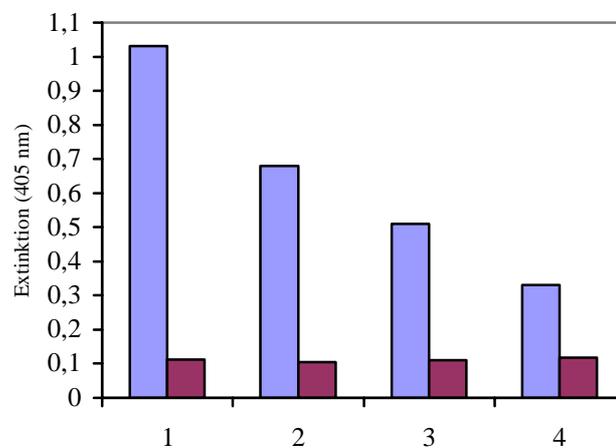


Abb. 15. Optimierung der Entwicklungszeiten im kompetitiven Assay zum Nachweis der TNP-Tris.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurden die 11B3-Antikörper-Verdünnungen 1.8 µg/ml (1), 900 ng/ml (2), 450 ng/ml (3) und 225 ng/ml (4) für 60 min inkubiert. Es erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405nm nach 10 min (**A**) und nach 30 min (**B**) vermessen.

3.1.5.2. Bivalenter Antikörper 3.5- IgGΔC1

Dieses Protein lag in einer Konzentration von 30 µg/ml. Mit insgesamt 7 ml des Eluats lag die Gesamtmenge an Protein bei 210 µg. Der aufgereinigte Antikörper konnte im Assay zum Nachweis von TNP-TRIS unter mit seinem Analogon etablierten Bedingungen verwendet werden. Als optimale Arbeitskonzentration erwies sich die 1:130 Verdünnung (ca. 225 ng/ml). Die Menge, die nach 5-minütiger Vorinkubation im kompetitiven Assay eine meßbare Signalunterdrückung ermöglichte, war 25 fmol TNP-Tris (Abb. 16). Somit erwies sich dieser Antikörper genauso sensitiv wie sein Analogon.

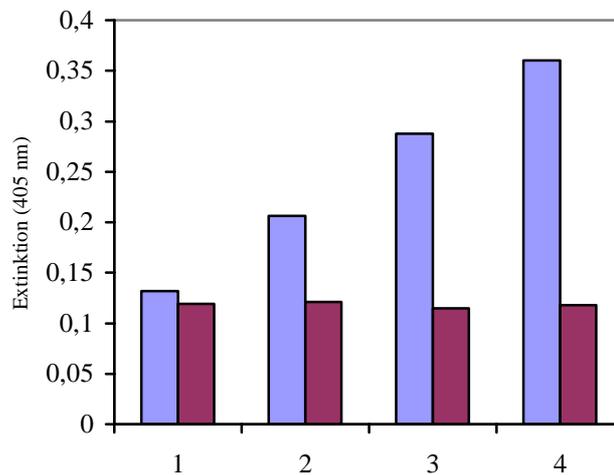


Abb. 16. Bestimmung der Detektionsgrenze für TNP-Tris im kompetitiven ELISA.

Nach Beschichtung mit TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurde 60 µl einer 3.5-Antikörper-Verdünnung von 225 ng/ml für 1 h jeweils mit 250 fmol (1), 100 fmol (2) und 25 fmol (3) TNP-Tris vorinkubiert. Als Positivkontrolle (4) diente der Antikörper ohne TNP-Tris. Die Ansätze wurden dann auf der ELISA-Platte für 60 min inkubiert. Es erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

3.1.6. Vergleich zwischen 3.5-scFv und 11B3-scFv

Die beiden scFvs ließen sich auf einer mit TNP-BSA bzw. TNP-Casein beschichteten Platte nicht spezifisch nachweisen. Deshalb entfiel deren Einsatz in einem Assay zur Detektion von TNP-Tris.

3.1.7. Affinitätsmessung

Es wurden zunächst direkte ELISA mit den beiden IgGΔC1 Antikörpern wie in Material und Methoden beschrieben ausgeführt, um die lineare Abhängigkeit der Absorption von der Antikörperkonzentration zu ermitteln. Es zeigte sich, dass alle angesetzten Konzentrationen im gewünschten linearen Bereich lagen. Es wurde auch die zweite Anforderung erfüllt, dass die Absorptionsdifferenz zwischen zwei ELISA-Durchführungen für jeweilige Verdünnungen keine 10% überstieg. Somit wurde sichergestellt, dass nur eine kleinere Fraktion des Antikörpers (in diesem Fall ca. 7%) an das immobilisierte Antigen bindet. Die folgende tabellarische und graphische Darstellung bezieht sich auf den 11B3-IgGΔC1:

AK-Konzentration (M)	A₄₀₅ - 1. ELISA Durchführung	A₄₀₅ - 2. ELISA Durchführung	Δ A₄₀₅ (%)
1x10 ⁻⁸	0.7045	0.6540	7.2
5x10 ⁻⁹	0.4897	0.4562	6.8
1x10 ⁻⁹	0.3924	0.3610	8.0
5x10 ⁻¹⁰	0.1349	0.1274	5.5

Tab. 4. Prozentsatz des gebundenen 11B3- IgGΔC1 an das immobilisierte TNP-BSA in einem ELISA.

Nach Beschichtung zweier Platten mit TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle wurde 100 µl des 11B3-IgGΔC1 jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen für 1 h inkubiert. Die selben Verdünnungen des Antikörpers wurden anschließend auf eine zweite ELISA-Platte überführt und für 1 h inkubiert. Es erfolgte auf den beiden Platten eine 60-minütige Inkubation mit anti-human-IgG-HRP-Konjugat (1:2500). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Aus dem Unterschied zwischen den Absorptionen für eine Antikörperkonzentration lässt sich berechnen, wieviel Prozent der Antikörper gebunden ist.

Es wurde weiter ein kompetitiver ELISA mit der Antikörperkonzentration von 1×10^{-9} M und einer Verdünnungsreihe mit TNP-Tris von 1×10^{-8} bis 1×10^{-10} M durchgeführt. Durch die Inhibierung des Antikörpers entstand wie erwartet eine Senkung der Absorption. Es wurden folgende Werte ermittelt:

Probenummer	Endkonzentration der TNP-Tris in 10^{-9} M	A_{405}
1	0	0.3620
2	0.8	0.2669
3	1.6	0.2018
4	6.4	0.1558
5	12.8	0.0869

Tab. 5. Einfluss der steigenden Konzentration des Kompetitors auf die Bindung des 11B3-IgG Δ C1 an das immobilisierte TNP-BSA.

Die Resultate haben gezeigt, daß die Konzentrationen von 8×10^{-8} , 1.6×10^{-9} und 6.4×10^{-9} M eine messbare Signalunterdrückung ergaben, und somit eine Bestimmung der Affinitätskonstanten bei den beiden Antikörpern ermöglichten.

Bei einer konstanten Gesamtkonzentration des Antikörpers von 1×10^{-9} M ließ sich der Wert von 2×10^{-9} M für die Gesamtkonzentration der Paratope ermitteln. Die anderen erforderlichen Werte wurden berechnet, wie in Materialien und Methoden beschrieben ist.

Probennummer	AG _t (nM)	AK (nM)	X (nM)	AG (nM)	K _d (nM)
1	0.8	1.475	0.525	0.275	0.77
2	1.6	1.115	0.885	0.715	0.90
3	6.4	0.861	1.139	5.261	3.98

Tab. 6. Übersicht der relevanten Konzentrationen für die Bestimmung der Dissoziationskonstante des 11B3-IgGΔC1.

AG_t – die Gesamtkonzentration des Antigens

AK – die Konzentration des freien Antikörpers

AG – die Konzentration des freien Antigens

X – die Konzentration des gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexes

K_d - die Dissoziationskonstante

Aus den drei ermittelten Werten für K_d vom 11B3-IgGΔC1 ließ sich der Durchschnittswert von 1.88×10^{-9} M berechnen. Auf die selbe Weise wurde die Dissoziationskonstante für den 3.5-IgGΔC1 bestimmt (Daten hier nicht gezeigt). Diese K_d betrug 1.59×10^{-9} M.

3.2. Evaluierung von β -Lactamase-Fusionsproteinen

3.2.1. scFv- β -Lactamase-Fusionsproteine

Die Zielsetzung war, die bifunktionellen Fusionsproteine zu generieren, die einerseits eine Immunokomponente, andererseits ein Enzym beinhalten. Als Ausgangsvektor für die Generierung eines Fusionsgens für die prokaryotische Expression der 11B3-scFv- β -Lactamase stand der Expressionsvektor pET26b(+) zur Verfügung. Dabei sollte das scFv-Gen am 5' Ende und das Gen für die β -Lactamase am 3' Ende positioniert werden. Als Schnittstellen für die Klonierung des Gens für β -Lactamase wurden im Vektor pET26b(+) BamHI am N- Terminus und XhoI am C-Terminus gewählt. Für die Klonierung des 11B3-scFv-Gens wurde im Vektor pET26b(+)- β -Lactamase die Schnittstelle NcoI gewählt. Die Überprüfung der Klone mittels PCR bestätigte die Präsenz der beiden Gene (Abb. 17).

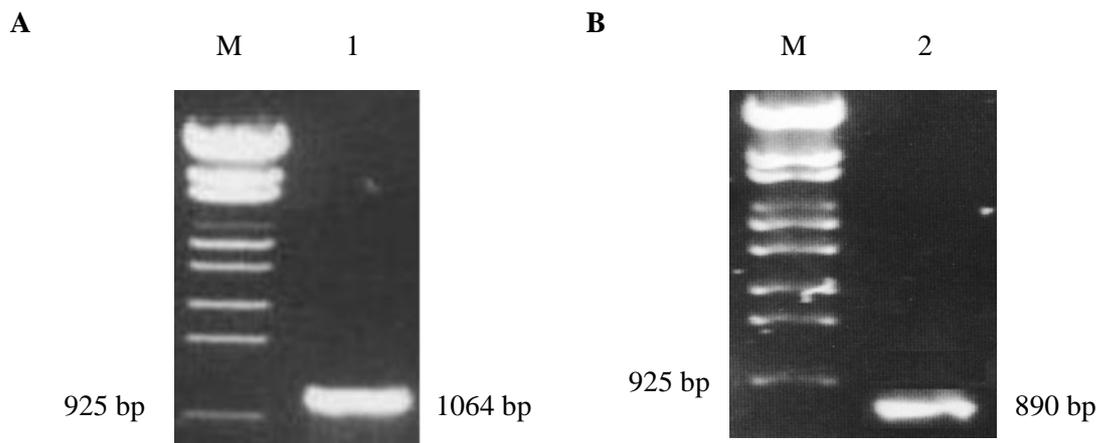


Abb. 17. A: Das Amplifikat der β -Lactamase mit einer Größe von 1064 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pET26 eingebrachte β -Lactamase-Gen mit den Oligonukleotiden pET (T7) vor und pET rück. 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (1) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

B: Das Amplifikat des 11B3-scFv mit der Größe von 890 bp. Amplifiziert wurde das in den Vektor pET26 eingebrachte 11B3-scFv-Gen mit den Oligonukleotiden pET (T7) vor und 11B3 Nco rück. 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (2) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

Als Grundvektor für die Konstruktion des Fusionsgens 3.5-scFv- β -Lactamase diente der Vektor pHEN2. Über die Schnittstellen SfiI und NotI wurde das Gen für den 3.5-scFv inseriert. Dieses Gen wurde stromabwärts der Region für die Signalsequenz eingebracht. Für die Klonierung der β -Lactamase wurden die Schnittstellen NotI und EcoRI gewählt. Die β -Lactamase sollte somit stromabwärts vom scFv, aber vor dem Stopcodon liegen. Da infolge dieser Schnittstellenauswahl die Sequenzen für das myc-Epitop und den His-Tag deletiert wurden, und somit keine Möglichkeit zur Detektion und vor allen Dingen zur Reinigung gegeben wurde, wurde die β -Lactamase aus dem Vector pET26b(+)- β -Lactamase mitsamt dem His-Tag amplifiziert.

Da der Vektor pHEN2 eine Ampicilin-Resistenz als Selektionsmarker besitzt, war die Überprüfung der eingebrachten β -Lactamase mittels β -Lactamase-spezifischen Oligonukleotiden ausgeschlossen. Das erhaltene Amplifikat entsprach der erwarteten Bande von 863 bp (Abb. 18). Um die Präsenz des 3.5-scFv im selben Vektor zu prüfen, wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden lmb3 und 3.5 scFv rück durchgeführt. Im Agarose-Gel erschien die erwartete Bande von 879 bp (Abb. 18).

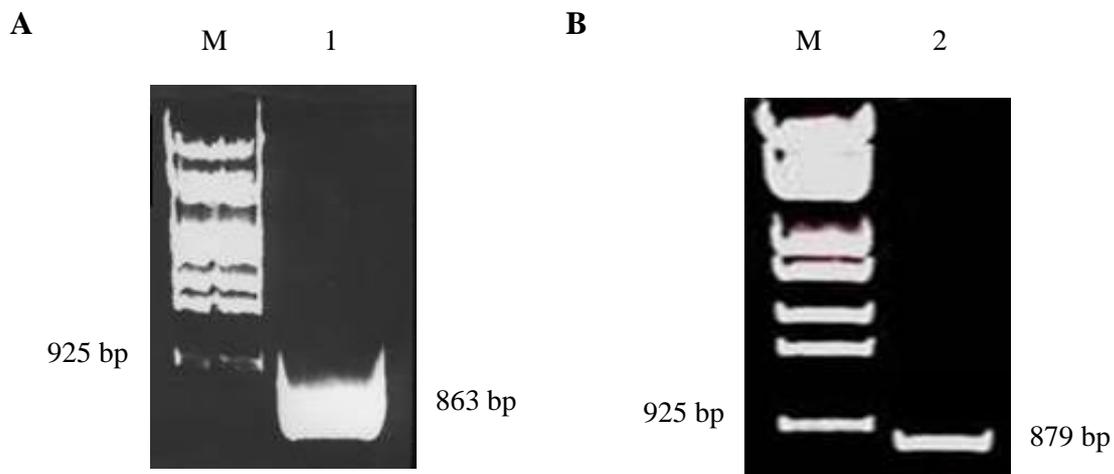


Abb. 18. A: Das Amplifikat der β -Lactamase mit der Größe von 863 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pHEN2 eingebrachte β -Lactamase-Gen mit den Oligonukleotiden 3.5 Ende vor und β Lac Eco rück (für 3.5- β Lac). 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (1) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

B: Das Amplifikat von 3.5-scFv mit der Größe von 879 bp. Amplifiziert wurde das in den Vektor pHEN2 eingebrachte 3.5-scFv-Gen mit den Oligonukleotiden lmb3 und 3.5 scFv rück. 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (2) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

Die Expression des Fusionsproteins 11B3-scFv- β -Lactamase erfolgte im *E.coli*-Stamm BL21 DE3. Nach der Expression bei 25° C wurden die Zellen vom Expressionsüberstand getrennt und der periplasmatische Extrakt isoliert. Das Fusionsprotein wurde aus dem periplasmatischen Extrakt über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und im SDS-Gel sowie im Western-Blot analysiert (Abb. 19). Die Bestimmung der Proteinkonzentration ergab einen Wert von 60 $\mu\text{g/ml}$.

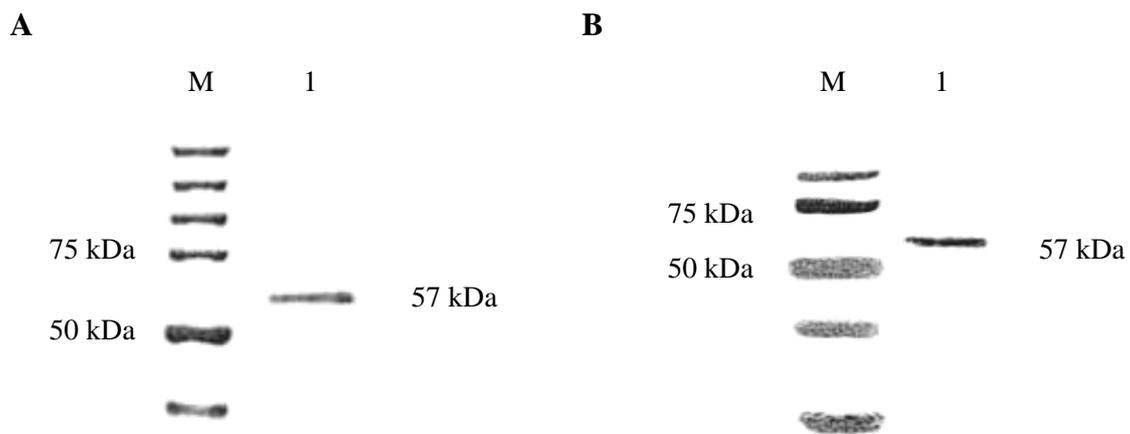


Abb. 19. SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot des gereinigten Fusionsproteins 11B3-scFv- β -Lactamase.

15 μl der Proteinprobe (1) und 10 μl Proteinmarker (M) wurde unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12%-SDS-Gel aufgetrennt. **A:** das Protein wurde durch Coomassie-Färbung visualisiert. **B:** die Präsenz des Proteins wurde nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch Detektion mittels murinen anti-His-IgG-AK (1:2500) und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (1:2500) bestätigt.

Die Bestätigung der Aktivität der β -Lactamase erfolgte durch die Zugabe des Substrats Nitrocefin. Anschließend wurde das Fusionsprotein einem Assay auf der Mikrotiter-Platte unterzogen, um die Bindungseigenschaften und Effizienz der Immunkomponente zu evaluieren.

Die Expression des Fusionsproteins 3.5-scFv- β -Lactamase erfolgte im *E.coli*-Stamm DH5 α periplasmatisch bei 30° C. Die Präsenz des Proteins wurde im periplasmatischen und im Zellextrakt mittels Immunoblot nachgewiesen (Abb. 20). Das Protein wurde über die Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und die Proteinkonzentrationsbestimmung ergab einen Wert von 60 μ g/ml. Das aufgereinigte Protein wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 20).

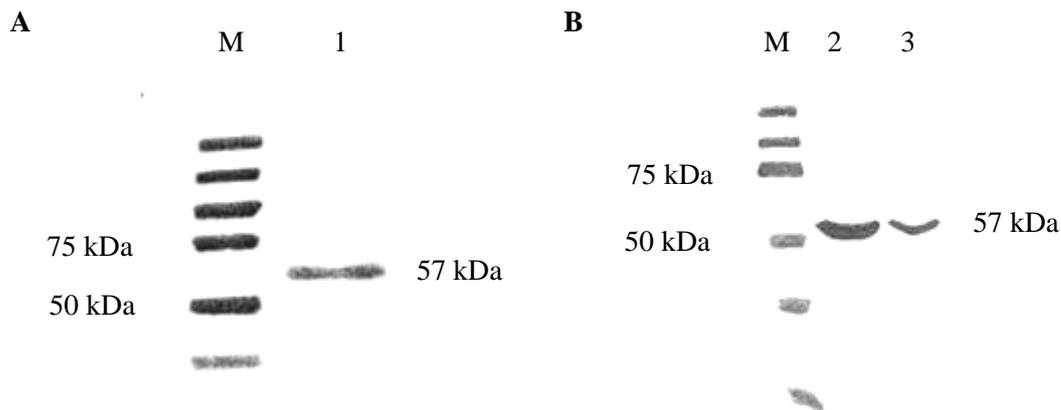


Abb. 20. **A:** SDS-PAGE-Analyse des gereinigten Fusionsproteins 3.5-scFv- β -Lactamase. **B:** die Analyse des Zell- und des periplasmatischen Extraktes mit dem Fusionsprotein 3.5-scFv- β -Lactamase.

10 μ l Proteinmarker (M) und 15 μ l der Proteinprobe wurde unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12%-SDS-Gel aufgetrennt. Das Protein (1) wurde durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die Präsenz des Proteins im Zell- (2) und im periplasmatischen (3) Extrakt wurde nach Transfer auf eine PVDF-Membran im Immunoblot durch Detektion mittels murinen anti-His-IgG-AK (1:2500) und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (1:2500) bestätigt.

3.2.2. ProteinA- β -Lactamase

ProteinA ist ein Protein aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, das aus fünf Domänen besteht, von denen jede in der Lage ist, die Fc-Region eines IgG zu binden. Das ProteinA besteht aus 273 Aminosäuren, enthält keine Disulfidbrücken und ist 30 kDa schwer.

Das ProteinA- β -Lactamase stellt ein bifunktionelles Immunoreagenz dar, das einerseits für die Bindung an IgG-Antikörper, andererseits für die enzymatische Detektion durch die β -Lactamase geeignet ist. Die Darstellung dieses Konstruktes erfolgte zwecks Detektion von IgG Δ C1-Molekülen.

3. Ergebnisse

Als Ausgangsvektor zur Klonierung und prokaryotische Expression wurde pET26b(+) gewählt. Das Gen für ProteinA ist 819 bp groß und stand im Arbeitskreis zur Verfügung. Die Strategie wurde so konzipiert, dass das ProteinA stromaufwärts der β -Lactamase zu klonieren war. Stromabwärts von der β -Lactamase sollte noch ein HisTag (zur Detektion und Reinigung) mit abschließendem Stopcodon sein. Als Schnittstelle für die Klonierung des ProteinA-Gens wurde NcoI gewählt. Nach der Ligation und Transformation erfolgte die Charakterisierung der Klone. Infolge der Tatsache, dass zur Klonierung nur eine Schnittstelle gewählt wurde, sollte das ligierte Segment mit der gleichen Wahrscheinlichkeit in der korrekten oder invertierten Orientierung vorliegen. Deshalb musste die Prüfung der Klone mit Fragment- und Vektor-spezifischen Oligonukleotiden geführt werden. Als Oligonukleotide bei dieser PCR dienten folgende Kombinationen: a) pET vor vs. ProteinA rück b) ProteinA vor – pET rück. Es wurden in beiden PCR-Ansätzen die erwarteten Banden erhalten: a) 986 bp und b) 985 bp (Abb. 21).

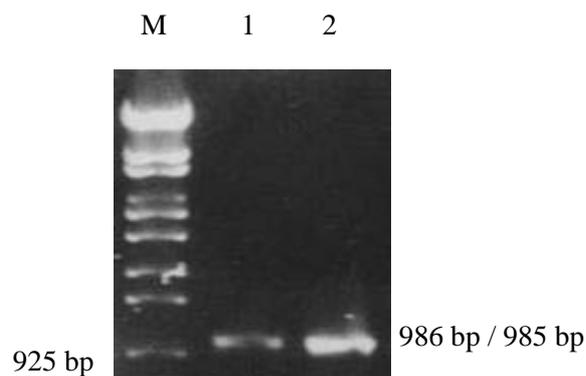


Abb. 21. 1: Das Amplifikat von ProteinA mit der Größe von 986 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pET26 eingebrachte ProteinA-Fragment mit Oligonukleotiden pET (T7) vor und pA Nco rück. 5 μ l Amplifikat (1) und 5 μ l Marker Eco130I (M) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

2: Das Amplifikat von ProteinA mit der Größe von 985 bp. Amplifiziert wurde das in den Vektor pET26 eingebrachte ProteinA-Fragment mit Oligonukleotiden pA Nco vor – pET rück. 5 μ l Amplifikat (2) und 5 μ l Marker Eco130I (M) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

Um das ProteinA mit β -Lactamase zu supplementieren, wurde als Schnittstelle zur Klonierung NotI gewählt. Nach der Ligation und Transformation erfolgte die Charakterisierung der Klone. Aufgrund der Tatsache, dass wie bei ProteinA zur Klonierung

3. Ergebnisse

nur eine Schnittstelle gewählt wurde, sollte das ligierte Segment mit der gleichen Wahrscheinlichkeit in der korrekten oder invertierten Orientierung vorliegen. Deshalb eigneten sich für die Prüfung der Klone keine Fragment-spezifischen Oligonukleotide. Als Oligonukleotide bei dieser PCR dienten folgende Kombinationen: a) ProteinA vor – β Lac rück b) β Lac vor – pET rück. Mit dieser PCR wurden erwartungsgemäß die Amplifikate von a) 1693 bp und b) 912 bp erhalten (Abb. 22).

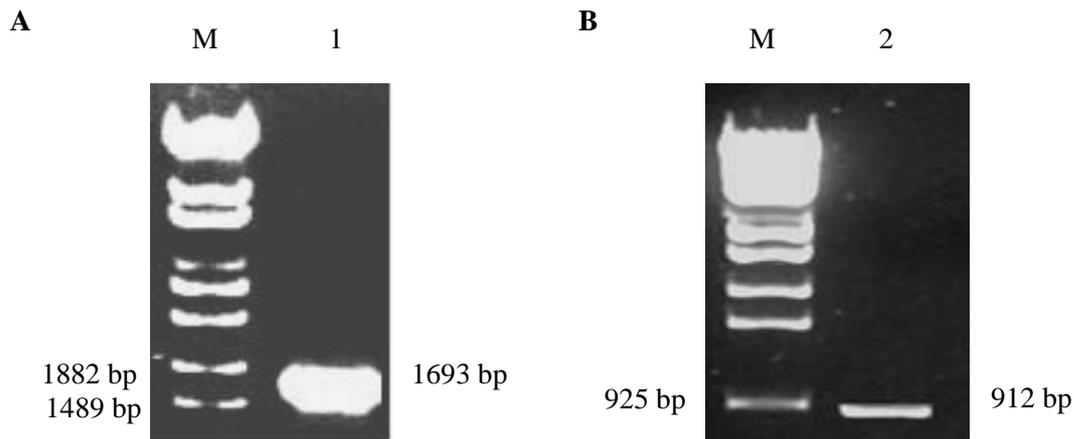


Abb. 22. A: Das Amplifikat von ProteinA- β -Lactamase mit der Größe von 1693 bp.

Amplifiziert wurden die in den Vektor pET26 eingebrachten ProteinA- und β -Lactamase-Gen mit Oligonukleotiden ProteinA vor und β -Lac Not rück (pET, pHEN2). 5 μ l Amplifikat (1) und 5 μ l Marker Eco130I (M) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

B: Das Amplifikat von β -Lactamase mit der Größe von 912 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pET26 eingebrachte β -Lactamase-Gen mit Oligonukleotiden β Lac Not vor (pET) und pET rück. 5 μ l Amplifikat (2) und 5 μ l Marker Eco130I (M) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

Die Expression wurde bei der Temperatur von 25° C und IPTG in einer Konzentration von 0.5 mM durchgeführt. Die Präsenz des Proteins wurde im periplasmatischen und im Zellextrakt mittels Immunoblot nachgewiesen (Abb. 23). Nach der Reinigung des Proteins aus dem dialysierten periplasmatischen Extraktes über die NiNTA-Säule erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. 23). Aufgrund der gewählten Klonierungsstrategie verfügt das Fusionsprotein aus ProteinA und der β -Lactamase über 566 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 62 kDa. Die detektierten Banden entsprachen diesen Erwartungen.

3.2.3. Assay mit β -Lactamase-Fusionsproteinen

Alle Fusionskonstrukte mit der β -Lactamase ließen sich bei den angemessenen Konzentrationen wegen der geringen Spezifität der β -Lactamase sehr schwach nachweisen. Deshalb entfiel deren Einsatz in einem Assay zur Detektion von TNP-Tris.

3.2.4. Rekombinante 11B3-scFv-Phagen

Mittels der Phage-Display-Technik wurde der 11B3-scFv auf der Phagenoberfläche dargestellt. Zu diesem Zweck wurden M13KO7-Helferphagen verwendet, wobei der scFv monovalent exponiert wurde. Zur Exponierung des 11B3-scFv wurden auch die fd-Tet-Phagen benutzt. Die fd-Tet-Phagen tragen den synthetischen Phagenvektor fd-Tet, der alle Gene für die Phagen Replikation und Inkapsulierung enthält. Der fd-Tet-Vektor besitzt dazu eine Tetracyclin-Resistenz und kann sich in *E.coli* autonom replizieren. Die fd-Tet-Phagen sollten ein pentavalentes Display des 11B3-scFvs ermöglichen. Diese Phagen sollten zusätzlich als bifunktionelle Partikel generiert werden, indem die β -Lactamase als Fusionspartner eines Hüllproteins exponiert wurde. Aus experimentellen Erwägungen wurde auf die Bifunktionalität bei den monovalenten Phagen verzichtet.

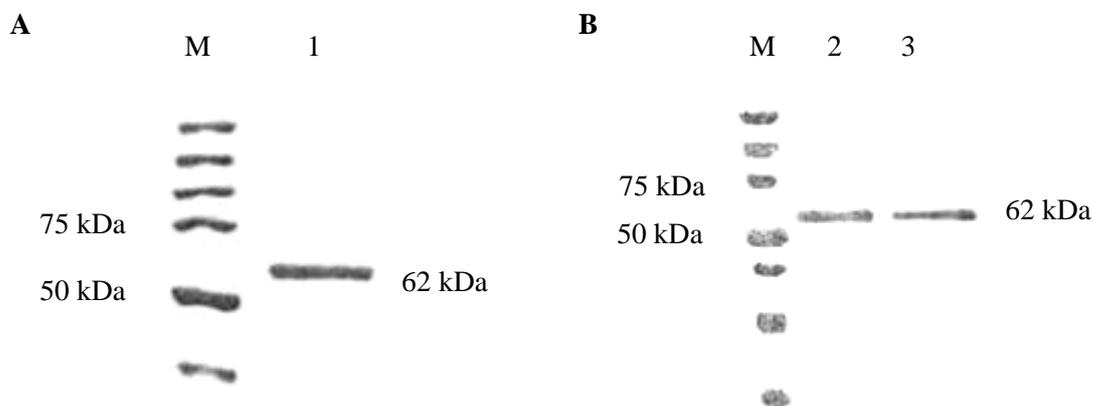


Abb. 23. **A:** SDS-PAGE-Analyse des gereinigten Fusionsproteins ProteinA- β -Lactamase. **B:** die Analyse des Zell- und des periplasmatischen Extraktes mit dem Fusionsprotein ProteinA- β -Lactamase.

10 μ l Proteinmarker (M) und 15 μ l der Proteinprobe wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12%-SDS-Gel aufgetrennt. Das Protein (1) wurde durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die Präsenz des Proteins im Zell- (2) und im periplasmatischen (3) Extrakt wurde nach Transfer auf eine PVDF-Membran im Immunoblot durch Detektion mittels murinen anti-His-IgG-AK (1:2500) und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (1:2500) bestätigt.

3.2.4.1. Monovalente 11B3-scFv-Phagen

Monovalente Phagen wurden aufgrund eines synthetischen Vektors (Phagemid) generiert, der sich als Plasmid in *E.coli* autonom replizieren kann. Das Phagemid hat aber auch den Replikationsursprung der M13KO7 Helferphagen, weswegen es sich in Anwesenheit dieser Helferphagen als Phagenvektor repliziert, und zur normalen Produktion der Phagenproteine und anschließenden Inkapsulierung führt. Die DNA der M13KO7 Phagen trägt die Kanamycin-Resistenz. Aufgrund der Tatsache, dass das g2 der M13KO7-DNA eine Mutation enthält, und dass das Produkt des g2 bevorzugt mit dem Phagemid interagiert, wird sich preferenziell die Phagemid-DNA zu fast 100% in rekombinanten Phagen befinden. Als Phagemid lag der Vektor pCANTAB5E vor. Dieses Phagemid verfügt über ein Ampicillin Resistenzgen und zur Fusion mit dem Zielmolekül mit dem g3. Durch die Fusion eines beliebigen Gens mit einem Gen für ein Phagenhüllprotein wird dieses als Fusionsprotein exponiert. Da *E.coli* mit den Wildtyp Phagen infiziert werden müssen, werden die Hüllproteine sowohl als Wildtyp als auch rekombinant auf der Phagenoberfläche exponiert.

Wenn man vor dem g3 ein scFv-Gen kloniert, so entsteht ein Phagemid mit dem Fusionsgen scFv-g3, das nach der Infektion mit Helferphagen und anschließenden Replikation und Transkription als Fusionprotein auf der Phagenhülle erscheint. Da das Protein g3p normalerweise auf dem Capsid in fünf Kopien vorkommt, ist es möglich, das Verhältnis des Wildtyp- und des Fusionsprotein durch die unterschiedlichen MOI zu variieren. Um nur eine Kopie des scFvs auf der Phagenhülle zu präsentieren (monovalentes Display), muss man die Phagemid-tragenden Zellen mit einer hohen MOI mit Helferphagen infizieren, damit bevorzugt das Wildtyp-g3p in das Capsid eingebracht wird.

Das vorher mit entsprechenden Oligonukleotiden amplifizierte 11B3-scFv-Gen war vor das g3 über SfiI und NotI in den pCANTAB5E einzubringen. Nach den Restriktionsverdau von Vektor und Insert wurde die DNA gereinigt und ligiert. Anschließend wurden die Klone mittels einer PCR auf die Präsenz des 11B3-scFv geprüft (Abb. 24). Einer der positiven Klone wurde zur Gewinnung der Phagen gewählt. Nach einer Infektion mit Helferphagen mit einer MOI von 10 wurden die rekombinanten Phagen isoliert. Der Titer dieser Phagen betrug 1.0×10^{12} .

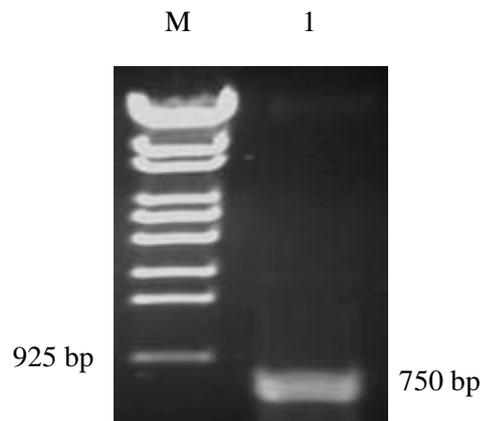


Abb. 24. Das Amplifikat von 11B3-scFv mit der Größe von 750 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pCANTAB5E eingebrachte 11B3-scFv-Fragment mit Oligonukleotiden 11B3 Nco vor und 11B3 Nco rück. 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (1) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

3.2.4.2. Pentavalente monofunktionelle 11B3-scFv-Phagen

Pentavalente monofunktionelle Phagen wurden so konstruiert, dass sie auf ihrer Oberfläche alle Wild-Typ Proteine trugen ausgenommen des Proteins g3p, das als Fusiosprotein mit dem 11B3-scFv vorkommt. Um eine entsprechende Phagenhülle zu generieren, musste das g3 mit dem Gen für den 11B3-scFv fusioniert werden. g3 liegt auf der Phagenoberfläche in 5 Kopien vor, so dass man durch die Insertion eines scFv-Gens vor dem g3 in den Phagenvektor fd-Tet anschließend ein pentavalentes Display erwarten kann.

Die Insertion des 11B3-scFv erfolgte über die Restriktion mit SfiI/NotI. Nach der Ligation und Transformation wurden die Klone mittels einer PCR mit den Fragment-spezifischen Oligonukleotiden charakterisiert (Abb. 25).

Da der Vektor fd-Tet einen Phagenvektor darstellt, war es nur erforderlich, diesen Vektor in die TG1-Zellen einzubringen. Die Phagen replizieren sich autonom und werden aus den bakteriellen Zellen ins Medium sekretiert. Nach dem Wachstum einer 500-ml Kultur über Nacht in Tetracyclin-haltigem Medium wurden die Phagen isoliert. Der Titer betrug 8.0×10^9 .

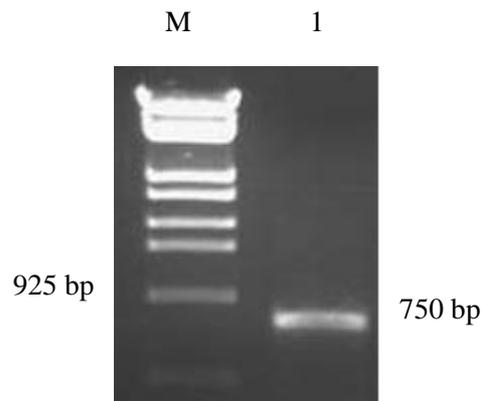


Abb. 25. Das Amplifikat von 11B3-scFv mit der Größe von 750 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor fd-Tet eingebrachte 11B3-scFv-Fragment mit Oligonukleotiden 11B3 Nco vor und 11B3 Nco rück. 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (1) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

3.2.4.3. Pentavalente bifunktionelle 11B3-scFv-Phagen mit der β -Lactamase

Pentavalente bifunktionelle Phagen sind so angestrebt, fünf Kopien des 11B3-scFvs und eine hohe Anzahl der β -Lactamase-Moleküle auf der Hülle zu tragen. Der 11B3-scFv wurde an g3p und die β -Lactamase an g8p fusioniert. Ein entsprechendes bifunktionelles Agens, das gleichzeitig eine Immuno- und Enzymkomponente trägt, sollte einerseits eine hohe Sensitivität aufgrund einer großen Anzahl von Detektormolekülen und zudem extrem gute Bindungseigenschaften aufgrund der erhöhten Avidität durch fünf zusammenwirkende scFvs besitzen.

Für die Darstellung der Phagen wurden zwei Vektoren genutzt: der Phagenvektor fd-Tet mit dem 11B3-scFv-Gen und das Plasmid pCANTAB5E mit dem Gen für die β -Lactamase. Der Vektor pCANTAB5E, der schon g8 beinhaltet, stand im Arbeitskreis zur Verfügung. Um das Gen für die β -Lactamase vor das g8 einzubringen, wurde die Strategie des Restriktionsverdaus mit SfiI/Not gewählt. Der Vektor und das mit entsprechenden Oligonukleotiden amplifizierte Gen für die β -Lactamase wurden mit ausgewählten Enzymen verdaut, gereinigt und ligiert. Nach der Transformation wurden die Klone mittels eines SfiI/NotI Verdaus auf das Fragment geprüft. Zusätzlich wurden die Klone über eine PCR mit Fragment-spezifischen Primern analysiert (Abb. 26). Die Anwesenheit des Gens für die β -Lactamase wurde mit beiden Methoden verifiziert.

Um diese Phagen zu produzieren, wurden die TG1 Zellen mit pCANTAB5E-g8- β -Lactamase mit pentavalenten monofunktionellen Phagen bei einer OD von 0.5 infiziert. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 1, was bedeutet, dass das rekombinante g8p von pCANTAB5E bevorzugt wurde. Da der pCANTAB5E in diesem Fall kein g3 enthält, ist das pentavalente Display des rekombinanten g3p-11B3-scFv vom Phagen-fd-Tet Vektor bei beliebiger MOI gewährleistet.

Nach Infektion und 30-minütiger Inkubation wurde der Ansatz pelletiert und die Zellen in 500 ml eines 2YT-Mediums mit Tetracyclin und Ampicillin überführt. Nach dem Wachstum über Nacht wurden die Phagen isoliert. Trotz wiederholter Versuche gelang es nicht, den Titer dieser Phagen zu bestimmen.

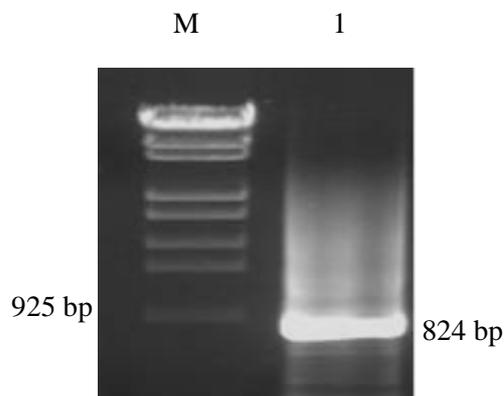


Abb. 26. Das Amplifikat der β -Lactamase mit der Größe von 824 bp.

Amplifiziert wurde das in den Vektor pCANTAB5E eingebrachte β -Lactamase-Gen mit den Oligonukleotiden β Lac Sfi vor und β Lac Not rück (pET/pHEN2). 5 μ l Marker Eco130I (M) und 5 μ l Amplifikat (1) wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

3.2.5. Assay mit rekombinanten 11B3-scFv-Phagen

3.2.5.1. Monovalente 11B3-scFv-Phagen

Monovalente Phagen waren in einem Titer von 1.0×10^{12} vorhanden. Die Funktionalität dieser Phagen sollte in einem Assay zum Nachweis des TNP verifiziert werden.

Detektion mittels anti-M13-IgG-HRP-Konjugat

Die 1:2 und die 1:5 im 2% Milchpulver verdünnten monovalenten Phagen wurden in einer Menge von 30 µl in die jeweilige Vertiefung der ELISA-Platte gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde jeweils 50 µl einer anti-M13-IgG-HRP-Verdünnung (1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 und 1:10000) dazu gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Zugabe der ABTS-Lösung wurde die Extinktion schon nach 10 min vermessen, da sich die Farbe schnell entwickelt hatte. Alle Konzentrationen verursachten einen extrem hohen Hintergrund (ca. 0.21 bis 0.29), wobei sich deren positives Signal zwischen 0.24 und 0.36 bewegte. Der geringste Hintergrund von 0.21 war bei der Phagenverdünnung von 1:5 und einer anti-M13-IgG-HRP-Verdünnung von 1:10000 (Abb. 27). Das positive Signal auf TNP-BSA-Vertiefungen lag bei 0.29. Da der Hintergrund im Verhältnis zum positiven Signal hoch war, konnte man mit diesem System keinen kompetitiven Assay durchführen.

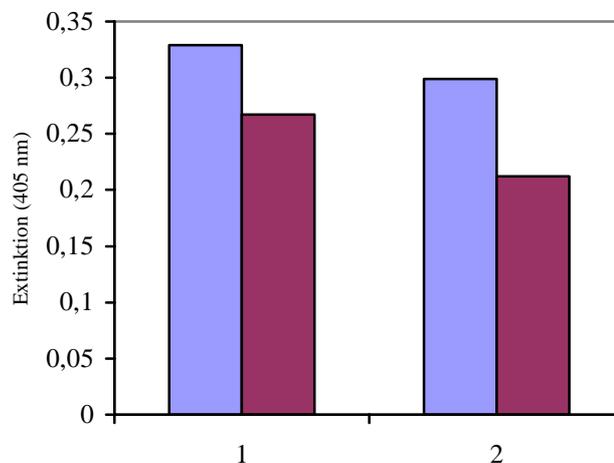


Abb. 27. Detektion der monovalenten Phagen auf TNP-BSA-ELISA-Platte mit dem Einsatz des primären Antikörpers.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurden die Phagen-Verdünnungen 1:2 (1) und 1:5 (2) im 2% MPBS für 60 min inkubiert. Es erfolgte die 60-minütige Detektion mit anti-M13-IgG-HRP (1:10000). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

Detektion mittels anti-M13-IgG und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat

Der direkte Assay mit diesen Detektionsmitteln wurde mit der 1:5 Phagenverdünnung durchgeführt. Im Einsatz waren die vom Hersteller empfohlene 1:100 Verdünnung des primären Antikörpers anti-M13-IgG und die 1:5000 Verdünnung des sekundären Antikörpers. Beide Antikörper wurden für 1 h inkubiert. Nach der Zugabe von pNPP und einer Entwicklung von 10 min wurde die Extinktion bei 405 nm vermessen. Das hier resultierende Problem war wieder ein extrem hoher Hintergrund (Wert von 0.253) im Vergleich zum positiven Signal von 0.51 (Abb. 28). Jedoch war das Verhältnis zwischen dem Signal und dem Hintergrund mit diesen Detektionsmitteln besser als mit dem Ein-Komponenten-System. Auch in mehreren nachfolgenden Experimenten ohne und mit Kompetitor konnte dieser störende Hintergrund nicht reduziert werden. Aus diesem Grund wurde auf die Durchführung eines kompetitiven Assays mit diesen Phagen ebenfalls verzichtet.

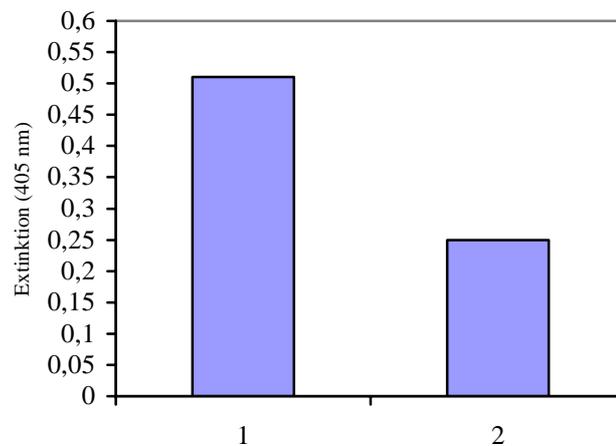


Abb. 28. Detektion der monovalenten Phagen auf TNP-BSA-ELISA-Platte mit dem Einsatz des primären und sekundären Antikörpers.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS (1) über Nacht und BSA als Negativkontrolle (2) wurde die Phagen-Verdünnung 1:5 im 2% MPBS für 60 min inkubiert. Es erfolgte die 60-minütige Inkubation mit anti-M13-IgG (1:100) und anschließend die Detektion mit anti-Maus-IgG-AP (1:5000). Die Farbentwicklung mit pNPP wurde bei 405 nm vermessen.

3.2.5.2. Pentavalente monofunktionelle 11B3-scFv-Phagen

Pentavalente monofunktionelle Phagen waren in einem Titer von 8.0×10^9 vorhanden. Ihre Funktionalität sollte ebenfalls im Assay zum Nachweis des TNP bestätigt werden.

Detektion mittels anti-M13-IgG-HRP-Konjugat

Der direkte Assay wurde analog jenem bei den monovalenten Phagen durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, dass die eingesetzten Phagenverdünnungen von 1:2 bis 1:3000 variierten. Die pentavalenten Phagen ließen sich hervorragend detektieren. Die Verdünnungen bis 1:200 kamen weiterhin nicht in Betracht, weil das erhaltene Signal zu groß war. Im Unterschied zu monovalenten Phagen, erschien hier kein hoher Hintergrund, auch nicht bei hoch konzentrierten Phagen. Als optimale Verdünnung für die Durchführung eines kompetitiven Assays erwies sich die 1:3000 Verdünnung mit dem Signal 0.335 zum Kontrollsignal von 0.126 (Abb. 29).

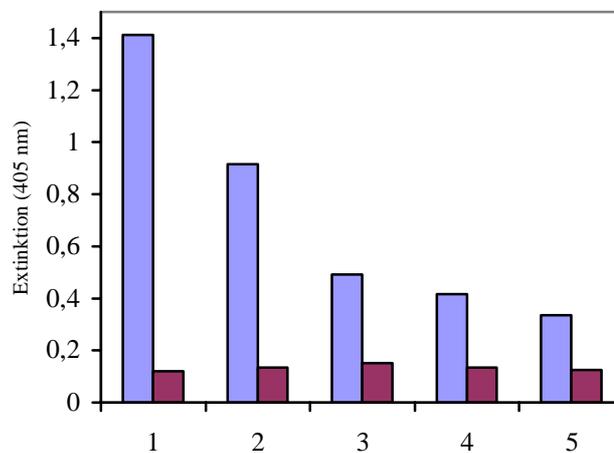


Abb. 29. Detektion der pentavalenten Phagen auf TNP-BSA-ELISA-Platte.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurden die Phagen-Verdünnungen 1:2 (1), 1:20 (2), 1:200 (3), 1:1000 (4) und 1:3000 (5) im 2% MPBS für 60 min inkubiert. Es erfolgte die 60-minütige Detektion mit anti-M13-IgG-HRP (1:5000). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

Die Durchführung des kompetitiven Assays erfolgte mit den etablierten Verdünnungen 1:3000 bei Phagen (Titer 2.67×10^6) und 1:5000 bei anti-M13-IgG-HRP-Konjugat. Eine 5-minütige Vorinkubation von jeweils 60 μl der Phagenverdünnung mit einer Konzentrationsreihe von TNP-Tris (2.5×10^{-5} bis 2.5×10^{-8} M, jeweils 1 μl) führte aber zu keiner Signalunterdrückung verglichen mit der entsprechenden Positivkontrolle ohne Kompetitor. Aufgrund dieser Feststellung leitet sich die Schlußfolgerung ab, dass diese Phagen wegen ihrer Pentavalenz mit einer angemessenen Konzentration von TNP-Tris nicht zu inhibieren sind, und somit für keinen sensitiven Assay geeignet sind.

Detektion mittels anti-M13-IgG und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat

Der direkte Assay mit diesen Detektionsmitteln wurde mit der 1:3000 Phagenverdünnung durchgeführt. Im Einsatz waren vom Hersteller empfohlene 1:100 Verdünnung von anti-M13-IgG und 1:5000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (anti-Maus-IgG-AP-Konjugat). Beide Antikörper wurden für 1 h inkubiert. Nach der Zugabe von pNPP und einer Entwicklung von 30 min wurde die Extinktion bei 405 nm vermessen. Die Phagen ließen sich sehr gut detektieren, dazu mit schwachem Hintergrund.

Einsatz der pentavalenten Phagen für die Detektion von TNP

Um diese Phagen für eine Detektion von TNP einsetzen zu können, wurde versucht, die Konzentration des Kompetitors drastisch zu erhöhen, um zu sehen, ob die Phagen überhaupt inhibierbar sind. Aufgrund dessen wurde eine Konzentrationsreihe der TNP-Tris im Bereich von 2.5 M bis 2.5×10^{-4} M angesetzt und davon jeweils 1 μl mit 60 μl der Phagenverdünnung 1:3000 für unterschiedliche Zeiten (5, 10, 15, 20, 30 und 60 min) vorinkubiert. Danach wurde der Assay wie bereits beschrieben durchgeführt und das anti-M13-HRP-Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000 als Detektionsmittel eingesetzt. Bei der Optimierung der Vorinkubationszeit wurde festgestellt, dass kein Signalunterschied zwischen den angegebenen Zeiträumen besteht. Als optimale Vorinkubationszeit für den Assay wurde auch hier 5 min gewählt.

Bei der Feststellung der inhibierenden Konzentration der TNP-Tris erwies sich, dass die niedrigste Verdünnung von 2.5×10^{-4} M gar keine Signalunterdrückung zur Folge hatte. Die niedrigste meßbare Unterdrückung erfolgte mit der TNP-Tris-Konzentration von 2.5×10^{-3} M.

Die TNP-Tris-Konzentration, die das Signal vollkommen unterdrückt, ist 2.5 M. Somit wurde festgestellt, a) dass die komplette Inhibierung der 1.6×10^5 Phagen ($60 \mu\text{l}$ einer 2.67×10^6 Verdünnung) mit einer Menge von $2.5 \mu\text{mol}$ TNP-Tris ($1 \mu\text{l}$ der 2.5 M Lösung) entsteht, b) dass mit diesen Phagen das Detektionslimit von TNP-Tris 2.5 nmol ($1 \mu\text{l}$ der $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ Lösung) beträgt (Abb. 30).

Derselbe Assay mit denselben Parametern wurde auch mit dem Detektionsmittel anti-M13-IgG und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat ausgeführt. Das Detektionslimit von 2.5 nmol TNP-Tris ($1 \mu\text{l}$ der $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ Lösung) wurde auch hier bestätigt.

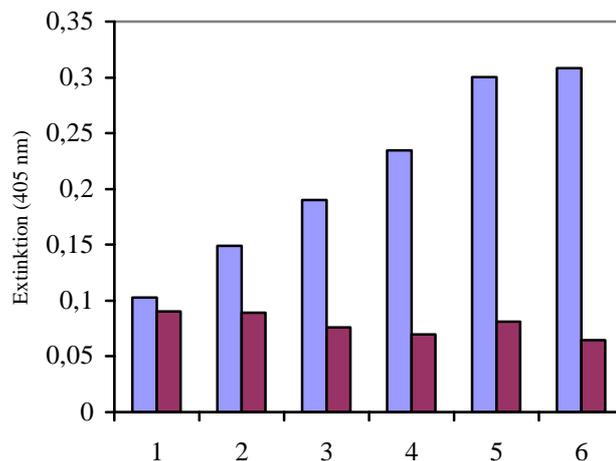


Abb. 30. Ermittlung des Inhibitionsbereiches für pentavalente Phagen auf TNP-BSA-ELISA-Platte.

Nach Beschichtung mit dem TNP-BSA in PBS über Nacht und BSA als Negativkontrolle (jeweils dunkelgrau) wurden die pentavalenten 11B3-scFv-Phagen in einer Verdünnung von 1:3000 im 2% MPBS für 1 h jeweils mit unterschiedlichen Mengen der TNP-Tris ($2.5 \mu\text{mol}$ (1), 250 nmol (2), 25 nmol (3), 2.5 nmol (4), 250 pmol (5) TNP-Tris) vorinkubiert. Als Positivkontrolle (6) diente der Antikörper ohne TNP-Tris. Die Ansätze wurden dann auf der ELISA-Platte für 60 min inkubiert. Es erfolgte die 60-minütige Inkubation mit anti-M13-IgG-HRP (1:5000). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unterschiedliche rekombinante Immunoreagenzien zur Detektion von TNP und seinen Derivaten erzeugt und evaluiert werden. Ein kompetitiver TNP-ELISA wurde etabliert, in dem der Einfluß der Valenz und der Molekülgröße auf deren Bindungseigenschaften und Affinität untersucht wurde, wobei als Hauptanforderungen an Assay eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie kurze Analysezeiten gestellt wurden.

Rekombinante Antikörper	scFv-Format	11B3-scFv
		3.5-scFv
Rekombinante Antikörper-IgGΔC1-Format	IgGΔC1-Format	11B3-IgGΔC1
		3.5-IgGΔC1
Rekombinante Antikörper-β-Lactamase Fusionsproteine	scFv-β-Lactamase	11B3-scFv-β-Lactamase
		3.5-scFv-β-Lactamase
Selbständige Detektionsmittel		ProteinA-β-Lactamase
Phagen-scFv		Monovalente 11B3-scFv-Phagen
		Pentavalente 11B3-scFv-Phagen
Phagen-scFv-β-Lactamase		Pentavalente 11B3-scFv-Phagen mit multi β-Lactamase

Tabelle 7. Überblick der hergestellten anti-TNT-Immunoreagenzien.

4.1. Klonierung und Expression der rekombinanten Immunoreagenzien

Die bivalenten IgGΔC1-Konstrukte wurden erfolgreich in einer stabilen embryonalen humanen Zelllinie HEK-293 exprimiert. Die Deletion der C_H1-Region bot dabei den Vorteil eines niedrigeren Molekulargewichtes, das zu einer gesteigerten Sekretion beigetragen hat. Die hohe Expressionsausbeute erleichterte die Reinigung der 11B3- und 3.5-Antikörper über die ProteinA-Matrix. Als einziges Problem bei diesen Antikörpern erschien die Bestimmung des Molekulargewichtes, das zur exakten Bestimmung der Konzentration nötig ist. Die Primärsequenz hat eine Computer-berechnete Molekularmasse von 104 kDa ergeben. Das apparente Laufverhalten dieser Antikörper in SDS-Gel und Western-Blot lag aufgrund der Glycosylierung bei ungefähr 130 kDa. Die beiden Antikörper konnten im Western-Blot und in einem Assay zur Detektion von TNP mittels spezifischer Antikörper-Enzym-Konjugate nachgewiesen werden.

Die scFvs wurden in zwei unterschiedlichen Systemen exprimiert. Der monoklonale Antikörper 11B3-scFv war unter dem Lac-Promotor mit Signalsequenz periplasmatisch zu exprimieren, was gescheitert ist. Jedoch wurde dabei der Antikörper größtenteils in Einschlußkörpern im Cytosol exprimiert. Desweiteren wurde versucht, eine intrazelluläre Expression ohne Signalsequenz unter dem stärkeren T7-Promotor durchzuführen. Diese Expression ergab höhere Ausbeute am Antikörper mit einer Expressionsrate von 0.5 µg Protein / ml Kultur. Der 3.5-scFv wurde jedoch in *E.coli* periplasmatisch in sehr hohen Beuten exprimiert. Die Expressionsrate betrug 7 µg Protein / ml Kultur. Zur Detektion der beiden monovalenten Antikörper in einem ELISA wurde die Biotinylierung geplant, um diese Antikörper mittels eines Streptavidin-HRP-Konjugates zu detektieren. Da der unter T7-Promotor exprimierte 11B3-Antikörper kein myc-Epitop besass, entfiel seine Detektion mittels anti-myc-AK. Derselbe Antikörper, der in kleinen Mengen unter Lac-Promotor intrazellulär exprimiert wurde, verfügte über ein myc-Epitop, aber er konnte mit dem HRP-konjugierten anti-myc-Antikörper genauso wie der 3.5-scFv in einem TNP-ELISA nicht nachgewiesen werden.

Als der Grund für die schlechte Expressionseffizienz in *E.coli* kommt häufig die Präsenz von Codons für Arginin, Leucin und Isoleucin vor. Die niedrige Expressionsrate des 11B3-scFvs kann nicht mit der Präsenz von Codons für Arginin und Leucin verbunden werden, da diese Codons in einer größeren Anzahl beim 3.5-scFv präsent sind. Der 11B3-scFv enthält nur zwei Isoleucin-Reste mehr als der 3.5-scFv (8:6), so dass die Codons für Isoleucin auch als problematisch ausgeschlossen werden können. Der unterschiedliche Ursprung der zwei scFv-Proteine kann ein Grund für die Differenz in der Expressionseffizienz sein. Es könnte durchaus sein, dass es beim 11B3-scFv zu Problemen in den posttranslatorischen Modifikationen oder in der Faltung gekommen ist. Es ist aber auch möglich, dass es beim 11B3-scFv zur Formierung der hydrophoben Domänen in einem größeren Maß kommt als beim 3.5-scFv, wodurch eine Unlöslichkeit des Proteins zustande kommt. Eine Verbesserung der Löslichkeit für den 11B3-scFv könnte mit der Koexpression von bakteriellen Chaperonen oder der eukaryotischen Disulfid-Isomerase erzielt werden.

Die scFv-β-Lactamase-Fusionsproteine wurden periplasmatisch mit Signalsequenz in unterschiedlichen Systemen exprimiert. Das Fusionsprotein mit dem 11B3-scFv wurde unter starkem T7-Promotor und sein 3.5-Analogon unter schwächerem Lac-Promotor exprimiert. Die Auswahl eines starken Promotors beim 11B3-scFv-β-Lactamase erfolgte aufgrund der niedrigen Expressionsrate des 11B3-scFv als singulären Proteins. Die Expressionsausbeute beim 11B3-scFv-Fusionsprotein war besser als beim 11B3-scFv alleine und betrug 1 µg

Protein / ml Kultur. Die Fusionierung des 3.5-scFvs mit der β -Lactamase hat zur Verschlechterung der Expressionseffizienz (1.6 μ g Protein / ml Kultur) im Vergleich zum 3.5-scFv geföhrt. Mögliche Gründe dafür sind, dass die Fusionierung des schlecht exprimierenden Proteins eine bessere Expression und Sekretion durch die Steigerung des Molekulargewichtes zur Folge hat. Die Fusionierung der gut löslichen Proteine föhrt aber zu einer Senkung der Expressionsrate. Die Reinigung der Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Agarose) und die Charakterisierung über SDS-PAGE und Western-Blot. Der Einsatz dieser Proteine zur Detektion von TNT-Derivaten wurde mit der β -Lactamase als Detektionsagens durchgeführt. Beim Nachweis dieser Proteine in einem ELISA konnte keine Reaktivität wegen der geringen Sensitivität der β -Lactamase gezeigt werden. Der Grund für eine schlechte Reaktivität könnte sein, dass die scFv-Fusionsproteine nur in einem geringen Anteil nach der Expression oxidiert wurden. Die Bildung der Disulfidbrücke und die somit entstandene Funktionalität des scFv-Teils hätten durch die Reinigung dieser Fusionsproteine über die TNP-Matrix verifiziert werden können, wenn diese Matrix herstellbar gewesen wäre. Jedoch konnte die TNBS nicht erfolgreich über die Aminogruppe eines Affi-Gels gekoppelt werden. Beim Affi-Gel handelte es sich um die mit dem 6-Atom hydrophilen Spacer kreuzverknüpfte Agarose mit der terminalen Aminogruppe. Das über die TNP-Matrix gereinigte Protein wäre funktionell gewesen, da daran nur funktionelle Antikörper binden können. Da die Versuche, diese TNP-Matrix herzustellen, nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten, wurde zur Reinigung ausschließlich Ni-NTA-Agarose verwendet. Ein alternatives Verfahren zur Herstellung der TNP-Matrix wäre die Kopplung eines Proteins (BSA, Casein) über seine freien Aminogruppen mit der aktivierten Carboxylgruppe einer Agarose-Matrix, wobei allerdings ein größerer Spacer erforderlich wäre. Durch die anschließende Reaktion der übrig gebliebenen Aminogruppen des immobilisierten Proteins mit der freien TNBS könnte man eine TNP-Matrix generieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, Streptavidin als zu immobilisierendes Protein zu benutzen, wobei die Immobilisierung von TNBS durch ein TNBS-Biotin-Konjugat erreicht werden könnte. Aus zeitlichen Gründen wurden jedoch diese Methoden nicht durchgeführt.

Das Immunoreagenz ProteinA- β -Lactamase wurde auch in mässiger Ausbeute unter Verwendung des starken T7-Promotors periplasmatisch dargestellt. Die Expressionsrate betrug 1 μ g Protein / ml Kultur. Bei der Charakterisierung dieses Fusionsproteins in einem ELISA zum Nachweis von IgG-Molekülen konnte wegen der geringen Sensitivität der β -Lactamase keine Reaktivität gezeigt werden.

Die monovalenten monofunktionellen Phagen konnten in einem hohen Titer gewonnen werden. Jeder Versuch, das Gen für die β -Lactamase mit dem gVIII der Phagen zu fusionieren, um die monovalenten Phagen in bifunktionelle Reagenzien umzuwandeln, blieb erfolglos. Da sich die β -Lactamase als sehr schlechtes Detektionsagenz erwies, kann man mit sehr großer Wahrscheinlichkeit schließen, dass eine Exponierung der β -Lactamase zu keinem messbaren Signal führen würde. Die pentavalenten monofunktionellen Phagen konnten in keinem hohen Titer produziert werden. Bei pentavalenten bifunktionellen Phagen konnte kein Titer bestimmt werden, da in jedem Versuch die gleiche Anzahl der Klone in allen Verdünnungen persistierte, was möglicherweise auf eine permanente Kontamination hindeuten kann.

4.2. Vergleich der Immunoreagenzien in einem TNP-Assay

Zum Zweck einer Detektion von TNP und seinen Derivaten wurden nur drei rekombinante Immunoreagenzien verwendet: 11B3-IgG Δ C1, 3.5-IgG Δ C1 und die pentavalenten monofunktionellen Phagen. Die anderen Komponenten wurden wegen ihrer geringen Sensitivität bzw. Unspezifität nicht berücksichtigt.

Als ein TNP-Antigen beim Belegen der ELISA-Platte dienten grundsätzlich die TNP-BSA-Konjugate, die mit unterschiedlichen Dichten von TNP synthetisiert wurden. Infolge der Tatsache, dass das Konjugat mit der größten Dichte die beste Reaktivität zeigte, wurde dieses für weitere Analysen eingesetzt. Die hochkonzentrierte Ansätze von TNP-BSA beim Belegen der Platte erhöhen drastisch die einzusetzende Menge an freiem, konkurrentem TNP, das an den anschließend zugegebenen Antikörper bindet. Daher musste für eine geringere Nachweisgrenze die Minimalmenge an TNP-Träger beim Belegen verwendet werden. Die optimale einzusetzende Konzentration betrug 50 μ g/ml TNP-BSA-Lösung.

In einem ELISA zum Nachweis von TNP wurden beide IgG Δ C1-Konstrukte miteinander verglichen. Diese bivalenten Antikörper haben gute Bindungseigenschaften in einem direkten TNP-Nachweis aufgewiesen. Als Detektionslimit für TNP-Tris in einem kompetitiven ELISA wurde eine Menge von 25 fmol festgestellt. Ausgedrückt in Konzentrationseinheiten ist 1 μ l einer 2.5×10^{-8} M oder 100 μ l einer 2.5×10^{-10} M TNP-Tris-Lösung zu detektieren, was einem Bereich von 87 ppt (parts per trillion) oder 87 pg/ml entspricht. Die Antikörper selbst ließen sich in Verdünnung 1:1000 einer Lösung der Konzentration von 90 μ g/ml detektieren, was bei einem Volumen von 50 μ l pro Vertiefung einer Menge von 4.5 ng entspricht.

Ein direkter Vergleich der beiden bivalenten Antikörper mit ihren monovalenten Analoga wurde nicht durchgeführt, da die monovalenten Konstrukte auf einem immobilisiertem TNP-BSA-Antigen nicht spezifisch detektiert werden konnten. In den künftigen Erwägungen könnte die Immobilisierung der biotinylierten Antikörper auf einer Streptavidin-Festphase berücksichtigt werden. Jedoch müsste hier der kompetitive Assay ein markiertes Antigen miteinbeziehen, da die immobilisierte Komponente ein Antikörper ist.

Der Vergleich zweier scFv- β -Lactamase-Fusionsproteine wurde ebenso nicht ausgeführt. Der Einsatz dieser Fusionsproteine zur Detektion von TNT-Derivaten mittels der β -Lactamase ist wegen der geringen Sensitivität der β -Lactamase gescheitert. Künftige Entwürfe sollen den Einsatz der HRP oder AP als Fusionspartner involvieren, um ein sensitives Ein-Komponenten-System zu erzielen.

Wegen ihrer hohen Valenz konnte man die Bindung der pentavalenten Phagen an eine TNP-Festphase nicht mit einer angemessenen Konzentration von TNP-Tris inhibieren, so dass kein sensitiver Assay mit diesem Immunoreagenz entwickelt wurde. Trotz des relativ niedrigen Titeres konnte man diese Phagen mittels eines anti-M13-HRP-Konjugates überragend nachweisen. Als Detektionslimit bei diesen Phagen wurde die Menge von 2.5 nmol TNBS (1 μ l der 2.5×10^{-3} M Lösung oder 100 μ l der 2.5×10^{-5} M TNP-Tris-Lösung) etabliert, was einem Bereich von 8.7 ppm (parts per million) oder 8.7 μ g/ml entspricht.

4.3. Charakterisierung der Antikörper

Die Affinitäten der mono- und bivalenten anti-TNT-Antikörper sowie der Fusionsproteine 11B3-scFv- β -Lactamase und 3.5-scFv- β -Lactamase sollten mittels kompetitiven ELISA bestimmt werden. Diese Messungen im kompetitiven ELISA umfassten die Immobilisierung einer der zu interagierenden Komponenten und ermittelten somit keine reale Affinitätskonstante, die entstehen würde, wenn sich die beiden Komponenten frei in einer flüssigen Phase befänden. Die Antikörperkonzentration musste so gering wie möglich sein, da hohe Antikörperkonzentrationen auch hohe Antigenkonzentration zur Sättigung bei Vorinkubation brauchen, und somit Unsensitivität bringen. In einem kompetitiven ELISA konnten die K_d -Werte für beide IgG Δ C1-Antikörper berechnet werden. Die Messung der Affinitäten für die scFvs sowie für die scFv-Fusionsproteine war infolge deren geringen Spezifität bzw. Sensitivität nicht möglich.

Die monovalenten Konstrukte (scFvs) und die bivalenten Antikörper können sich hinsichtlich deren Affinitäten wesentlich unterscheiden, was ausschließlich von der Dichte des immobilisierten Antigens abhängt. Wenn bei einer Meßmethode viele Antigenmoleküle nahe beieinander liegen, also in Reichweite der beiden Bindungsregionen des IgGs, so kann sich dieses Molekül mit beiden Bindungsregionen festhalten. Damit ist seine Dissoziation wegen der zwei okkupierten Bindungsstellen erheblich erschwert, während die Dissoziation der scFvs infolge deren Monovalenz favorisiert ist. Bei einer anderen Methode, wenn die Antigendichte weniger ist, kann das IgG dagegen nur mit einem Arm haften. Vor allem die Dissoziation des Antikörpers ist jetzt einfacher – er scheint plötzlich eine geringere Affinität für sein Antigen im Vergleich zum monovalenten Konstrukt zu haben. Bei anderen bivalenten Formen, wie IgG Δ C1 oder dimere scFvs, kann man bei der geringen Antigendichte noch niedrigere Affinität erwarten als beim originalen IgG-Molekül, weil das Greifen zu den weit entfernten Antigenen wegen des sterischen Anspruchs bzw. kleinerer Molekülgröße zusätzlich erschwert ist.

Die K_d -Werte für beide IgG Δ C1 lagen im Bereich von 10^{-9} M, was einer hoch affinen Bindung entspricht, da sich die Dissoziationskonstanten der hoch affinen Antikörper im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-10} M bewegen. Eine sehr hoch affine Bindung ergeben die Antikörper, deren Dissoziationskonstante zwischen 10^{-10} und 10^{-12} M beträgt, und eine mäßige Bindung weisen die Antikörper auf, deren Dissoziationskonstante zwischen 10^{-6} und 10^{-8} M liegt. Die determinierte Affinitätskonstante vom 11B3-IgG Δ C1 lässt sich nur bedingt mit den publizierten Affinitätskonstanten seines IgG-Analogons vergleichen, da sich die zur Bestimmung verwendeten Methoden wesentlich unterscheiden. Im Arbeitskreis durchgeführte Untersuchungen mittels einer Gleichgewichtsdialyse zeigten für den 11B3-IgG einen K_d -Wert von 10^{-6} M.

Eine Affinitätssteigerung kann man *in vitro* durch die Einfügung zufälliger Mutationen durchführen. Zur Steigerung der Mutationsrate besteht die etablierte Verwendung der Mutatorstämme. Eine andere Möglichkeit ist die Durchführung einer sogenannten *error-prone* PCR. Dazu werden die Gene der variablen Regionen der schweren und leichten Kette einer PCR unterworfen, die zufällige Mutationen generiert. Hierzu wird die Mutationsrate durch den Einfluss unterschiedlicher dNTP-Konzentrationen, hoher Zyklenzahlen, langer Elongationszeit oder Zugabe der Mn^{2+} -Ionen erhöht. Die erzeugte PCR-Bibliothek sollte dann zur Selektion gegen TNT eingesetzt werden, um die Antikörperfragmente mit einer gesteigerten Affinität zu erhalten.

4.4. Vergleich der Ergebnisse mit der internationalen Literatur

4.4.1. Auswahl von TNT-Derivaten als Haptene

TNT-Derivate wurden aus mehreren Gründen als Modellhaptene gewählt. Erstens, die Herstellung von Explosionsstoffen, Pestiziden, Farben und anderen Kunststoffen hatte in der Kontamination der Grundböden und Wässer durch dinitroaromatische Produkte resultiert. Die am meisten gebrauchten Explosionsstoffe sind 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-Triazin (RDX) und Dinitrotoluol, deren Toxizität bei Pflanzen und Tieren nachgewiesen ist. Das TNT ist ein potentes Carcinogen und Mutagen (Levine *et al.*, 1990, Yinon *et al.*, 2002) und die Persistenz von TNT im Boden in der Nähe von militärischen Übungsplätzen ist ein reales Problem für die Umwelt. TNT tendiert dazu, aus dem Boden in umgebendes Gewässer zu migrieren, wodurch eine Steigerung an Kontamination entsteht, und wofür eine jahrelange Dekontamination erforderlich ist (Achtnich *et al.*, 1999). Zweitens, TNT und seine Derivate können kovalent an ein Trägerprotein gebunden werden, woraus ein multivalentes Antigen entsteht, das leicht auf einer Festphase immobilisiert werden kann. Drittens, der 11B3-Antikörper erkennt und bindet auch die TNT-Derivate und analoge Verbindungen wie z.B. 2,4,6-Trinitrobenzen, Methyl-2,4,6-Trinitrophenyl Nitramin, 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol, 2,4-Dinitrotoluol und 1,3-Dinitrotoluol (Charles *et al.*, 2004). Die Untersuchungen im Arbeitskreis haben die Kreuzreaktivität der anti-TNT-Antikörper auch gegenüber dem Chloramphenicol demonstriert. Die Bindung des Chloramphenicols als ein Mononitrobenzen-Derivat kann darauf hinweisen, dass eine planare aromatische Struktur als Antikörper-Epitop ausreicht. Es ist daher mit der größten Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass mit den anti-TNT-Antikörpern auch die aromatischen Abbauprodukte des TNT wie z.B. Hydroxylamino-Dinitrotoluol, Monoamino-Dinitrotoluol und Diamino-Nitrotoluol zu detektieren sind. Viertens, mehrere Assays mit TNT-Derivaten wurden durchgeführt, so dass die Daten und die publizierte Literatur zum Vergleich zur Verfügung stehen. Aufgrund all dieser Tatsachen besteht ein permanenter Bedarf nach einem schnellen, sensitiven, selektiven und zuverlässigen Protokoll zur Detektion von TNT, seinen Derivaten und Abbauprodukten.

4.4.2. TNT-Biosensoren

Die Hauptanforderungen an Biosensoren sind für alle Verwendungsbereiche sehr ähnlich und verstehen hohe Spezifität, Schnelligkeit, Sensitivität, wenige Kosten und Tragemöglichkeit. Dabei sollte die Analysenzeit so kurz wie möglich sein. Die Möglichkeit zur Vor-Ort-Analyse und die schnelle Auswertung der Ergebnisse gehören auch zu den wichtigsten Schwerpunkten. Daneben sollte das Verfahren automatisiert und das Gerät auch von nicht speziell geschultem Personal leicht zu bedienen sein.

Beim kontinuierlichem Durchflußassay kann man das Detektionslimit und die Signalintensität durch die Änderung der Flussgeschwindigkeit justieren. Eine Senkung der Flussgeschwindigkeit erhöht die Signalintensität wegen der größeren Interaktionszeit zwischen dem Antikörper und dem Antigen. Somit ist die Sensitivität des Assays indirekt proportional seiner Schnelligkeit. Die kontinuierlichen Durchflußassays sind generell sehr schnell und ermöglichen eine Detektion innerhalb von paar Minuten. Der ELISA ist zeitaufwendiger, versteht mehrere Inkubationsschritte, aber resultiert in einer zwei- bis dreistündigen Dauer. Durch die Reduzierung der Reaktionsvolumina sind erheblich kürzere Analysenzeiten möglich, da das Gleichgewicht des Affinitätskomplexes somit viel schneller entsteht als in Makrosystemen. Optimierte ELISA führen generell zur höheren Sensitivität im Vergleich zu Durchflußassays.

Bisherige Arbeiten auf diesem Feld basieren hauptsächlich auf einer minutenschnellen Detektion im Durchfluß-Immunsensor. Es wurde dazu gravitiert, die Probenmenge, die Zeit und die Kosten der Analyse zu minimieren, sowie multianalyte Immunsensoren zu entwickeln, um eine simultane Detektion diverser Antigene zu ermöglichen (Ekins, 1989, Ekins *et al.*, 1994, Kricka, 1992). In einem multianalyte-Format strebt man nach unterschiedlichen Detektions-Mitteln und -Schemen für unterschiedliche Antigene.

Die Detektionsmittel, die meistens implementiert wurde, sind fluoreszente Moleküle Fluorescein (Whelan *et al.*, 1993) und Cyanin-Diaminopentan (Sapsford *et al.*, 2002, Rabanny *et al.*, 2000, Goldman, Hayhurst *et al.*, 2003, Green *et al.*, 2002, Goldman, Cohill *et al.*, 2003, Narang *et al.*, 1998). Als Detektionsmöglichkeiten bewährten sich biolumineszente Enzyme wie Luciferase (Wannlund *et al.*, 1983), HPLC mit UV-Absorption (Köhne *et al.*, 1998) und elektrochemische Detektion (Bratin *et al.*, 1981).

Ein neuer Zugang zur Detektion von TNT sind die Rezeptor-Ligand-Interaktionen. Dadurch, dass das TNT an einen synthetischen Rezeptor auf der Oberfläche der bakteriellen Zellen bindet (Loren *et al.*, 2003), wird die Transkription eines vorher eingebrachten fluorescenten

4. Diskussion

Gens aktiviert, und somit die Konzentration des TNT aufgrund der vermessenen Fluoreszenz ermittelt.

Als eine Frage stellt sich der Ort einer Untersuchung auf TNT. Das momentane Standardprotokoll für die Quantifizierung von TNT im kontaminierten Boden und Gewässer ist „off-site“ Laboranalyse über „reversed-phase“ HPLC (U.S. environmental protection agency, SW-846, method 8330). „Vor Ort“ Methoden sind der schon erwähnte schnelle kontinuierliche Durchflußassay (Kusterbeck *et al.*, 1998, Charles *et al.*, 2000, Gauger *et al.*, 2001) sowie ELISA (Keuchel *et al.*, 1994, Fetterolf *et al.*, 1991) und Matrix-, Membran- oder Sol-Gel-Biosensor (Crockett *et al.*, 1999).

Die Nachweisgrenzen für TNT in bisherigen Arbeiten sind hier tabellarisch aufgeführt. Alle Assays wurden im kompetitiven Format ausgeführt.

Autoren/ Jahr	Methode	Detektion	Limit	Zeit	“Vor -Ort”
Goldman, Hayhurst 2003	Kontin. Durchfluß Immobil. TNB im Affi- Gel	Fluoreszent	1 ng/ml (1 ppb)	2 Std	Nein
Goldman, Cohill 2003	ELISA Immobil. AK auf Festphase	Fluoreszent	1 ng/ml (1 ppb)	10 min	Nein
Green 2002	Kontin. Durchfluß Immobil. TNP im Affi- Gel	Fluoreszent	2.5 ng/ml	10 min	Nein
Sapsford 2002	Kontin. Durchfluß Immobil. AK auf Festphase	Fluoreszent	5 ng/ml	5 min	Nein
Altstein 2001	ELISA Immobil. TNP-Konjugat auf Festphase	Optisch	400 pg/ml	1.5 Tage	Nein
Charles 2000	Kontin. Durchfluß Immobil. AK auf Membran	Fluoreszent	10 ng/ml	3 min	Ja

Rabbany 2000	Kontin. Durchfluß Immobil. AK auf Membran	Fluoreszent	1 ng/ml	5 min	Nein
Narang 1998	Kontin. Durchfluß Immobil. AK auf Kapillare	Fluoreszent	20 pg/ml	3 min	Nein
Kusterbeck 1998	Kontin. Durchfluß Immobil. AK auf Membran	Fluoreszent	10 ng/ml	2-5 min	Ja
Keuchel 1994	ELISA Immobil. AK auf Membran	Optisch	1 ng/ml	6 min	Ja
Whelan et al. 1993	Kontin. Durchfluß Immobil. AK im Affi- Gel	Fluoreszent	2.5 ng/ml	2-5 min	Ja
Fetterolf 1991	ELISA Immobil. TNP-Konjugat auf Festphase	Optisch	1 ng/ml	Mehrere Std	Nein
Wannlund 1983	BIA Immobil. AK im Affi- Gel	Elektro- lumineszent mit zwei Enzymen	2.2 fg/ml	6 Std	Nein

Tabelle 8. Überblick der vorhandenen Literatur über die Assays zur Detektion von TNT

Die Nachweisgrenze für das TNT-Analogon TNP-Tris wurde 87 pg/ml etabliert, was hinsichtlich der Größenordnung dem Detektionslimit des empfindlichsten Assays in der vorhandenen Literatur entspricht. Ein wichtiger Hinweis ist auch, dass hier mit dem bivalenten Antikörper im IgG Δ C1-Format gearbeitet wurde, während in allen publizierten Assays ein IgG-Format benutzt wurde. Man kann nicht mit Sicherheit behaupten, dass das erreichte Detektionslimit auch für TNT selbst gelten wird, da sich die Moleküle TNT und TNP-Tris im Wesentlichen unterscheiden. TNP-Tris enthält einen grossen Teil, der polar und voluminös ist, und kann für eine hoch affine Bindung entscheidend sein. Eine ausschlaggebende Untersuchung hinsichtlich der unterschiedlichen Affinität gegen diverse

TNT-Derivate wurde am TNP durchgeführt. Ein käuflich erworbenes Muster des TNP in Acetonitril konnte erst in um Faktor 10^2 konzentrierten Lösungen im Vergleich zu TNP-Tris-Lösungen nachgewiesen werden. Hiermit wird bewiesen, dass die unterschiedliche Polarität der funktionellen Gruppen und die sterischen Faktoren auf die Bindungsaffinität einen erheblichen Einfluss machen können.

4.4.3. Die β -Lactamase

β -Lactamasen sind Enzyme, die β -Lactam-Antibiotika inaktivieren. Sie stellen die Hauptursache für die Resistenz in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien dar und können entweder durch chromosomale oder durch Plasmid-DNA kodiert werden. β -Lactamase wurde 1940 von Abraham und Chain isoliert und als Penicilline und Cephalosporine spaltendes Enzym beschrieben (Abraham *et al.*, 1940). Bisher wurden rund 200 Enzyme identifiziert.

In dieser Arbeit wurde die aus *E.coli* stammende β -Lactamase „RTEM 1“ verwendet, die einen Wechselzahl von 269/s (für Cephalotin) und einen Km-Wert von 346 μ M (für Cephalotin) besitzt (Rodrigues *et al.*, 1995). Es wurde die β -Lactamase als Modell gewählt, da dieses Enzym klein ist (263 Aminoreste, 29 kDa), und nur aus einer Peptidkette mit einer Disulfidbrücke besteht. Als Substrat für die β -Lactamase wurde Nitrocefin benutzt (Guay *et al.*, 1980). β -Lactamase spaltet die Amidbindung im β -Lactam-Ring im Nitrocefin, wodurch die Abgangsgruppe 1-vinyl-2,4-dinitro-Benzen freigesetzt und aktiv wird.

Da sich die β -Lactamase in der optischen Detektion als ein sehr unsensitives Enzym mit einer niedrigen Wechselzahl erwiesen hat, sollte sie mit Enzymen wie alkalische Phosphatase oder Meerrettich Peroxidase ersetzt werden, deren Wechselzahlen um mehr als 2 Größenordnungen höher sind. Alternativer Einsatz der β -Lactamase im Sinne einer erhöhten Sensitivität könnte durch die Verwendung eines fluoreszenten Substrats wie CCF2 (Zlokarnik *et al.*, 1998) erfolgen.

4.5. Ausblick

Künftige Arbeiten im Gebiet der Detektion von TNT-Derivaten sollen vor allen Dingen die Erhöhung der Sensitivität tangieren. Monoklonale Antikörper, die mit einem umsatzstarken Enzym wie alkalische Phosphatase fusioniert sind, könnten potenziellerweise als

hochempfindliches Ein-Komponenten-Detektionssystem dienen. Alternativ könnte man auf einer Streptavidin-belegten Festphase die vorher biotinylierten scFvs immobilisieren und unter Verwendung der fluoreszent-markierten TNP-Moleküle einen kompetitiven Assay etablieren.

Eine Empfindlichkeitserhöhung um 2-3 Größenordnungen würde man mit einem nicht-kompetitiven ELISA erlangen (Suzuki *et al.*, 2000, Yokozeki *et al.*, 2002). Dabei sollte auch die Fluoreszenzdetektion berücksichtigt werden.

Bei der Übertragung von der optischen auf die elektrochemische Detektion sollen rekombinante Fusionsproteine mit einem geeigneten Enzym (alkalische Phosphatase, α -Galactosidase) kloniert und exprimiert werden, für welches schon ein elektrochemisch detektierbares Substrat zur Verfügung steht. Eine elektrochemische Detektion wird zu keiner erhöhten Sensitivität des Assays führen, sie würde aber einen schnellen Nachweis der TNT-Derivate auch in trüben Lösungen ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, neuartige rekombinante Immunoreagenzien zur Detektion von Trinitrotoluen-Derivaten als Modellhaptene zu generieren, und miteinander zu vergleichen. Dabei standen unterschiedliche anti-TNT-scFvs zur Verfügung: der 11B3-scFv, murinen Ursprungs, und der 3.5-scFv, der aus einer humanen synthetischen Bibliothek generiert worden war. Auf der Basis dieser zwei Fragmente wurden mono-, bi- und polyvalente rekombinante Immunoreagenzien in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen generiert, um den Einfluß der Valenz und Molekülgröße auf die Antigenbindung in Immunoassays zu untersuchen. scFv-Gene wurden in geeignete Vektoren eingebracht und die monovalenten ScFv-Proteine in *E.coli* exprimiert. Mittels Affinitätschromatographie wurden die scFvs gereinigt und in einem Assay in Hinsicht auf ihr Bindungsverhalten charakterisiert. Bivalente Antikörper in Form von IgG Δ C1-Molekülen wurden durch Insertion der scFv-Gene in eine Expressionskassette erzeugt, die die C_H2- und C_H3-Regionen der humanen schweren Kette des IgG-Moleküls enthielt. Diese Antikörper wurden in Säugerzelllinien HEK 293 exprimiert, über affinitätschromatographische Verfahren gereinigt und hinsichtlich ihrer Affinität und Bindungseigenschaften in einem Assay zum Nachweis vom TNT-Analogon TNP-Tris getestet. Weiterhin wurden ausgehend von den beiden scFvs bifunktionelle Fusionsproteine konstruiert, die eine direkte enzymatische Detektion durch die β -Lactamase als Fusionspartner ermöglichten. Die Funktionalität des scFvs und die enzymatische Aktivität der β -Lactamase wurden durch den Nachweis von TNP-Tris bestätigt. Weiterhin wurden filamentöse Phagen produziert, die nicht nur den spezifischen scFv in mono- und pentavalenter Form, sondern auch die β -Lactamase als Fusionspartner ihrer Hüllproteine trugen. Die Funktionalität der Phagen konnte in einem Immunoassay verifiziert werden. Mit einer Detektionsgrenze von 250 pM TNP-Tris-Lösung erwiesen sich die beiden IgG Δ C1-Moleküle in einem kompetitiven ELISA als sensitivste Immunoreagenzien.

5. Abstract

The aim of this work was to generate novel recombinant immunoreagents for detection of trinitrotoluene derivatives as model haptens and to compare them with each other. Thereby were two different anti-TNT-scFvs available: 11B3-scFv, with the mouse origin, and 3.5-scFv, which was obtained from a synthetic human scFv-library. Various mono-, bi- und polyvalent recombinant immunoreagents were produced in pro- and eucaryotic expression systems on the basis of these genes, in order to examine the influence of the valency and molecule dimension on the antigen binding. The scFv genes were cloned in the suitable vectors and the monovalent scFv proteins were expressed in *E.coli*. Using affinity chromatography the scFv proteins were purified and analysed in an assay concerning their binding characteristics. Bivalent antibodies in the form of IgG Δ C1 molecules were generated by the insertion of the scFv genes in the expression cassette, that contained the C_H2 and C_H3 regions of the human heavy chain of the IgG molecule. These antibodies were expressed in the mammalian cell line HEK 293, purified using affinity chromatography and tested in an assay for the detection of TNP-Tris regarding their affinity and binding characteristics. Further on bifunctional fusion proteins were constructed based on the two scFvs. They enabled a direct enzyme detection by the β -lactamase as a fusion partner. The functionality of the scFvs and the enzymatic activity of the β -lactamase were verified by the detection of TNP-Tris. Further, the filamentous phages were produced, that not only exposed the specific scFv in a mono- and pentavalent form on the surface, but also the β -lactamase as a fusion partner of their coat proteins. The functionality of the phages was confirmed in an immunoassay. Both IgG Δ C1 proved to be the most sensitive immunoreagents with the detection limit of 250 pM TNP-Tris solution in the competitive ELISA.

6. Literatur

Abraham E.P., Chain E., Nature (1940), **146**, 837

Achnich C., Pfortner P., Weller M.G., Niessner R., Lenke H., Knackmuss H.J.: Reductive transformation of bound trinitrophenyl residues and free TNT during a bioremediation process analysed by immunoassay. Environ. Sci. technol. (1999), **33**, 3421-3426.

Altstein M., Bronshtein A., Glattstein B., Zeichner A., Tamiri T., Almog J.: Immunochemical approaches for purification and detection of TNT traces by antibodies entrapped in a sol-gel matrix. Anal. Chem. (2001), **73**, 2461-2467

Arakawa H., Maeda M., Tsuji A.: Chemiluminescence enzyme immunoassay of cortisol using peroxidase as label. Anal. Biochem. (1979), **97**, 248-254

Avrameas S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry (1969), **6**, 43-52

Barbas C.F., Kang A.S., Lerner R.A., Benkovic S.J.: Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991), **88**, 7978-7982

Batra J.K., FitzGerald D., Gately M., Chaudhary V.K., Pastan I.: Anti-Tac(Fv)-PE40, a single chain antibody Pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells. J. Biol. Chem. (1990), **265**, 15198-15202.

Better M., Chang C.P., Robinson R.R., Horwitz A.H.: Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. Science (1988), **240**, 1041-1043

Bjorck L., Kronvall G.: Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* (1984), **133**, 969-974

Bjork I., Petersson B.A., Sjoquist J.: Some physiochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* (1972), **29**, 579-584

Bratin K., Kissinger P., Briner R., Bruntlett C.: Determination of nitro aromatic, nitramine and nitrate ester explosive compounds in explosive mixtures and gunshot residue by liquid chromatography and reductive electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* (1981), **130**, 295-311

Bretoniere J., Spillmann T.:
Methods Enzym. Anal. (1984), **4**, 75-82

Burton D.R.: Human and mouse monoclonal antibodies by repertoire cloning. *Trends biotechnol.* (1991), **9**, 169

Butler J.E., McGivern P.L., Swanson P.: Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of class-specific antibodies. *J. Immunol. Methods.* (1978), **20**, 365-383

Charles P., Gauger P., Patterson C., Kusterbeck A.: On-site immunoanalysis of nitrate and nitroaromatic compounds in groundwater. *Environ. Sci. technol.* (2000), **34**, 4641-4650

Charles P.T., Shriver-Lake L.C., Francesconi S.C., Churilla A.M., Rangasammy J.G., Patterson C.H. Jr., Deschamps J.R., Kusterbeck A.W.: Characterization and performance evaluation of in vivo and in vitro produced monoclonal anti-TNT antibodies for the detection of TNT. *J. Immunol. Methods* (2004), **284**, 15-26

Chaudhary V.K., Queen C., Junghans R.P., Waldmann T.A., FitzGerald D.J., Pastan I.: A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature* (1989), **339**, 394-397

Chaudhary V.K., Batra J.K., Gallo M.G., Willingham M.C., Fitzgerald D.J., Pastan I.: A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990), **87**, 1066-1070

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

Coffee C.J., Bradshaw R.A., Goldin B.R., Frieden C.: Identification of the sites of modification of bovine liver glutamate dehydrogenase reacted with trinitrobenzenesulfonate. *Biochemistry* (1971), **10**, 3516-3526

Crockett A.B., Craig H.D., Jenkins T.F.: Field sampling and selecting on-site analytical methods for explosives in water. EPA/600/S-99/002 (1999), U.S. Environmental protection agency, Washington

Ege D., Becker W.G., Bard A.J.: Electrogenerated chemiluminescent determination of $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ at low levels. *Anal. Chem.* (1984), **56**, 2413-2417

Eggers H.M., Halsall H.B., Heineman W.R.: Enzyme immunoassay with flow-amperometric detection of NADH. *Clin. Chem.* (1982), **28**, 1848-1851

Ekins R.P.: Multi-analyte immunoassay. *J. pharmacol. Biomed. Anal.* (1989), **7**, 155-168

Ekins R.P., Chu F.: Developing multianalyte assays. *Trends biotechnol.* (1994), **12**, 89-94

Emmart E.W.: Observations on the absorption spectra of fluorescein, fluorescein derivatives and conjugates. *Arch. Biochem. Biophys.* (1958), **73**, 1-8

Engvall E., Jonsson K., Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim. Biophys. Acta.* (1971), **25**, 427-434.

Engvall E., Perlman P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* (1971), **8**, 871-874

Engvall E., Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* (1972), **109**, 129-135

Fetterolf D., Mudd J., Teten K.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for trinitrotoluene (TNT) residue on hands. *Journal of forensic sciences* (1991), **36**, 343-349

Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E.: Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods.* (1985), **77**, 305-319

Gandecha A., Owen M.R., Cockburn W., Whitlam G.C.: Antigen detection using recombinant, bifunctional single-chain Fv fusion proteins synthesised in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* (1994), **5**, 385-390

Gauger P.R., Holt D.B., Patterson C.H., Charles P.T., Shriver-Like L.C., Kusterbeck A.W.: Explosives detection in soil using a field-portable continuous flow immunosensor. *J. hazard. Mater.* (2001), **83**, 51-63

Glockshuber R., Schmidt T., Pluckthun A.: The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* (1992), **31**, 1270-1279

Goldman E., Cohill T., Patterson C., Anderson G., Kusterbeck A., Mathew Mauro J.: Detection of 2,4,6-trinitrotoluene in environmental samples using a homogeneous fluoroimmunoassay. *Environ. sci. technol.* (2003), **37**, 4733-4736

Goldman E., Hayhurst A., Lingerfelt B., Iverson B., Georgiou G., Anderson G.: 2,4,6-trinitrotoluene detection using recombinant antibodies. *J. environ. monit.* (2003), **5**, 380-383

Green T., Charles P., Anderson G.: Detection of 2,4,6-trinitrotoluene in seawater using a reversed-displacement immunosensor. *Analytical biochemistry* (2002), **310**, 36-41

Griffiths A.D., Williams S.C., Hartley O., Tomlinson I.M., Waterhouse P., Crosby W.L., Kontermann R.E., Jones P.T., Low N.M., Allison T.J.: Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J.* (1994), **13**, 3245-3260

Guay, R., et al., *IRCS Med. Science* (1980), **8**, 209

Guesdon J.L., Ternynck T., Avrameas S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* (1979), **27**, 1131-1139

Hartley O.: The use of phage display in the study of receptors and their ligands. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* (2002), **22**, 373-392

Huston J.S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M.S., Novotny J., Margolies M.N., Ridge R.J., Brucoleri R.E., Haber E., Crea R.: Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1988), **85**, 5879-5883

Johnson R.B. Jr., Libby R.M., Nakamura R.M.: Comparison of glucose oxidase and peroxidase as labels for antibody in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunoassay* (1980), **1**, 127-137.

Kang A.S., Barbas C.F., Janda K.D., Benkovic S.J., Lerner R.A.: Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial Fab libraries along phage surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991), **88**, 4363-4366

Kendall C., Ionescu-Matiu I., Dreesman G.R.: Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Immunol. Methods.* (1983), **56**, 329-339

Keuchel C., Weil L., Niessner R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds. *Analytical sciences* (1992), **8**, 9-13

Keuchel C., Niessner R.: Rapid field screening test for determination of 2,4,6-trinitrotoluene in water and soil with immunofiltration. *Fresenius J. Anal. Chem.* (1994), **350**, 538-543

King T.P., Kochoumian L.: A comparison of different enzyme-antibody conjugates for enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods.* (1979), **28**, 201-210

Köhne A., Dornberger U., Welsch T.: Two-dimensional high performance liquid chromatography for the separation of complex mixtures of explosives and their by-products. *Chromatographia* (1998), **48**, 9-16

Koivunen E., Arap W., Rajotte D., Lahdenranta J., Pasqualini R.: Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med.* (1999), **40**, 883-888

Kricka L.G.: Multianalyte testing. *Clin. Chem.* (1992), **38**, 327-328

Kusterbeck A., Charles P.: Field demonstration of a portable flow immunosensor. *Field anal. Chem. Technol.* (1998), **2**, 341-350

Levine B., Furedi E., Gordon D., Barkely J., Lish P.: Toxic interactions of the munitions compounds TNT and RDX in F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* (1990), **15**, 373-380

Looger L., Dwyer M., Smith J., Hellinga H.: Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature* (2003), **423**, 185-189

McCafferty J., Fitzgerald K.J., Earnshaw J., Chiswell D.J., Link J., Smith R., Kenten J.: Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1994), **47**, 157-171

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* (1986), **24**, 17-27

Narang U., Gauger P., Kusterbeck A., Ligler F.: Multianalyte detection using a capillary-based flow immunosensor. *Analytical biochemistry* (1998), **255**, 13-19

Nerurkar L.S., Namba M., Brashears G., Jacob A.J., Lee Y.J., Sever J.L.: Rapid detection of herpes simplex virus in clinical specimens by use of a capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* (1984), **20**, 109-114

Rabbany S., Lane W., Marganski W., Kusterbeck A., Ligler F.: Trace detection of explosives using a membrane-based displacement immunoassay. *Journal of immunological methods* (2000), **246**, 69-77

Rodrigues M.L., Presta L.G., Kotts C.E., Wirth C., Mordenti J., Osaka G., Wong W.L.T., Nuijens A., Blackburn B., Carter P.: Development of a humanized disulfide-stabilized anti-p185HER2 Fv- β -lactamase fusion protein for activation of cephalosporin doxorubicin prodrug. *Cancer research* (1995), **55**, 63-70

Sapsford K., Charles P., Patterson C., Ligler F.: Demonstration of four immunoassay formats using the array biosensor. *Anal. Chem.* (2002), **74**, 1061-1068

Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y.: Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* (1966), **241**, 2166-2172

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

Smith G.P.: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (1985), **228**, 1315-1317

Soumillion P., Jaspers L., Bouchet M., Marchant B.J., Winter G., Fastrez J. : Selection of beta-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.* (1994), **237**, 415

Spillner E.: Selektion und Expression von rekombinanten Antikörpern für analytische und therapeutische Applikationen. Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Arbeitskreis Prof. Dr. R. Bredehorst, Universität Hamburg (2002)

Suzuki C., Ueda H., Mahoney W., Nagamune T.: Open sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of small haptens. *Analytical biochemistry* (2000), **286**, 238-246

Takkinen K., Laukkanen M.L., Sizmann D., Alfthan K., Immonen T., Vanne L., Kaartinen M., Knowles J.K., Teeri T.T.: An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Eng.* (1991), **4**, 837-841

Ulitzur S., Kuhn J.: Introduction of lux genes into bacteria: a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility, bioluminescence and chemoluminescence – new perspectives. *Wiley* (1987), 463-472

Utiger R.D., Parker M.L., Daughaday W.H.: Studies on human growth hormone. I. A radio-immunoassay for human growth hormone. *J. Clin. Invest.* (1962), **41**, 254-261

Wannlund J., DeLuca M.: Bioluminescent immunoassays. *Methods in enzymology* (1983), **92**, 426-432

Whelan J.P., Kusterbeck A.W., Wemhoff G.A., Bredehorst R., Ligler F.S.: Continuous flow Immunosensor for detection of explosives. *Analyt. Chem.* (1993), **65**, 3561-3565

Whitlow M., Bell B.A., Feng S.L., Filpula D., Hardman K.D., Hubert S.L., Rollence M.L., Wood J.F., Schott M.E., Milenic D.E.: An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng.* (1993), **6**, 989-995

Won W.D., Disalvo L.H.: Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl Environ Microbiol.* (1976), **31**, 576-580

Wu H., Yang W.P., Barbas C.F.: Building zinc fingers by selection: towards a therapeutic application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), **92**, 334

Yinon Y.: Field detection and monitoring of explosives. *Trends Anal. Chem.* (2002), **21**, 292-301

Yokozeki T., Ueda H., Arai R., Mahoney W., Nagamune T.: A homogeneous non-competitive immunoassay for the detection of small haptens. *Anal. Chem.* (2002), **74**, 2500-2504

Zlokarnik G., Negulescu P.A., Knapp T.E., Mere L., Burren N., Feng L., Whitney M., Roemer K., Tsein R.Y.: Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with β -lactamase as reporter. *Science* (1998), **279**, 84-88

7. Anhang

7.1. Sequenz von 11B3-scFv

1	ATGGCCCAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTAGCCTCGTGAAACCTTCTCAGACTCTG	60
1	M A Q V K L Q E S G P S L V K P S Q T L	20
61	TCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGCGACTCCATCACCAGTGGTTACTGGAACCTGGATCCGG	120
21	S L T C S V T G D S I T S G Y W N W I R	40
121	AAATTTCCAGGGAATAAACTTGAGTACATGGGGTCCATAACCTACAGTGGCAACACTTAC	180
41	K F P G N K L E Y M G S I T Y S G N T Y	60
181	TACAATCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCCATCACTCGAGACACATCTAAGGACCACTAC	240
61	Y N P S L K S R I S I T R D T S K D H Y	80
241	TTCTGCAGTTGAATTCTCTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATCC	300
81	F L Q L N S L T T E D T A T Y Y C A R S	100
301	CTTTATGGTAAGGTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGT	360
101	L Y G K V F D Y W G Q G T T V T V S S G	120
361	GGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATTGTGATGCCCCAG	420
121	G G G S G G G G S G G G G S D I V M P Q	140
421	TCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAAGGTCACCGTCACCTGCAAGGCCAGT	480
141	S Q K F M S T S V G D K V T V T C K A S	160
481	CAGAATGTGGGTAGTAATGTAGCCTGGTATCAAAAAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAAACA	540
161	Q N V G S N V A W Y Q K K P G Q S P K T	180
541	CTGATTTACTCGGCATCCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGAGCGCTTCACAGGAAGTGGA	600
181	L I Y S A S Y R N S G V P E R F T G S G	200
601	TCTGGGGCAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAATAT	660
201	S G A D F T L T I S N V Q S E D L A E Y	220
661	TTCTGTCAGCATTATAACAGCTATCCGTACACATTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAAATA	720
221	F C Q H Y N S Y P Y T F G G G T K L E I	240
721	AAACGG	726
241	K R	242

7.2. Sequenz von 3.5-scFv

```

1   ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG   60
1   M A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L   20
61  AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC   120
21  R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R   40
121 CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA   180
41  Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T   60
181 TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG   240
61  Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T   80
241 CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGA   300
81  L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R   100
301 CAGTATAGGCCTCTTCATAGTAGTAATTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCGAGT   360
101 Q Y R P L H S S N W G Q G T L V T V S S   120
361 GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGCACCTCAGTCTGTGCTGACT   420
121 G G G G S G G G G S G G S A L Q S V L T   140
421 CAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGC   480
141 Q P P S A S G T P G Q R V T I S C S G S   160
481 AGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCC   540
161 S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P   180
541 AAACCTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGC   600
181 K L L I Y R N N Q R P S G V P D R F S G   200
601 TCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCAATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT   660
201 S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A   220
661 GATTATTACTGTGCAGCATGGGATAACAGCCTGAATCGGATGGTATTCGGCGGAGGGACC   720
221 D Y Y C A A W D N S L N R M V F G G G T   240
721 AAGCTGACCGTCCTAGGT   738
241 K L T V L   246

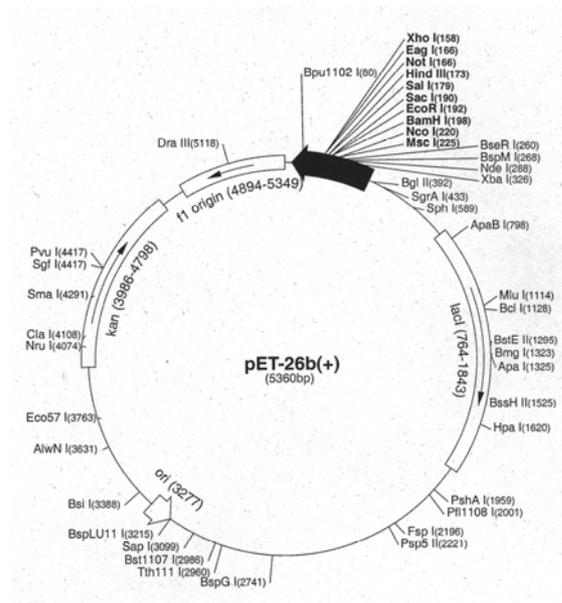
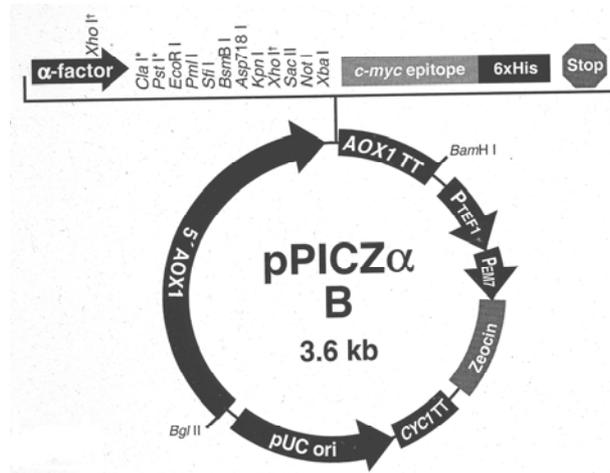
```

7.3. Sequenz der β -Lactamase

1	CACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT	60
1	H P E T L V K V K D A E D Q L G A R V G	20
61	TACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGT	120
21	Y I E L D L N S G K I L E S F R P E E R	40
121	TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAC	180
41	F P M M S T F K V L L C G A V L S R I D	60
181	GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC	240
61	A G Q E Q L G R R I H Y S Q N D L V E Y	80
241	TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCT	300
81	S P V T E K H L T D G M T V R E L C S A	100
301	GCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG	360
101	A I T M S D N T A A N L L L T T I G G P	120
361	AAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGG	420
121	K E L T A F L H N M G D H V T R L D R W	140
421	GAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCA	480
141	E P E L N E A I P N D E R D T T M P V A	160
481	ATGGCAACAACGTTGCGCAAATATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA	540
161	M A T T L R K L L T G E L L T L A S R Q	180
541	CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTT	600
181	Q L I D W M E A D K V A G P L L R S A L	200
601	CCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC	660
201	P A G W F I A D K S G A G E R G S R G I	220
661	ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGG	720
221	I A A L G P D G K P S R I V V I Y T T G	240
721	AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATT	780
241	S Q A T M D E R N R Q I A E I G A S L I	260
781	AAGCATTGG	789
261	K H W	263

7.4. Sequenz von ProteinA

1	ATGGAACAACGCATAACCCTGAAAGAAGCTTGGGATCAACGCAATGGTTTTATCCAAAGC	60
1	M E Q R I T L K E A W D Q R N G F I Q S	20
61	CTTAAAGATGATCCAAGCCAAAGTGCTAACGTTTTAGGTGAAGCTCAAAAACTTAATGAC	120
21	L K D D P S Q S A N V L G E A Q K L N D	40
121	TCTCAAGCTCCAAAAGCTGATGCGCAACAAAATAACTTCAACAAAAGATCAACAAAAGCGCC	80
41	S Q A P K A D A Q Q N N F N K D Q Q S A	60
181	TTCTATGAAATCTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAACGTAACGGCTTCATTCAA	240
61	F Y E I L N M P N L N E A Q R N G F I Q	80
241	AGTCTTAAAGACGACCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAAAC	300
81	S L K D D P S Q S T N V L G E A K K L N	100
301	GAATCTCAAGCACCGAAAGCTGATAACAATTTCAACAAAAGAACAACAAAATGCTTTCTAT	360
101	E S Q A P K A D N N F N K E Q Q N A F Y	120
361	GAAATCTTGAATATGCCTAACTTAAACGAAGAACAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTA	420
121	E I L N M P N L N E E Q R N G F I Q S L	140
421	AAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGCTAAAAAGTTAAATGAATCT	480
141	K D D P S Q S A N L L S E A K K L N E S	160
481	CAAGCACCGAAAGCGGATAACAAATTCAACAAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATC	540
161	Q A P K A D N K F N K E Q Q N A F Y E I	180
541	TTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCCTAAAAGAT	600
181	L H L P N L N E E Q R N G F I Q S L K D	200
601	GACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAAGCA	660
201	D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A	220
661	CCAAAAGCTGACAACAAATTCAACAAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTACAT	720
221	P K A D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H	240
721	TTACCTAACTTAACTGAAGAACAACGTAACGGCTTCATCCAAAGCCTTAAAGACGATCCG	780
241	L P N L T E E Q R N G F I Q S L K D D P	260
781	GGGAATTCCTCGGGGATCCGTCGACCTGCAGATAACAAAT	819
261	G N S R G S V D L Q I T N	273



Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bredehorst herzlichst danken, dass er mir die Stelle in seinem Arbeitskreis angeboten und somit mir die Möglichkeit gegeben hat, nach Deutschland zu kommen. Daran anknüpfend danke ich sehr dem DAAD für die thematische Akzeptanz und für die finanzielle Unterstützung während des gesamten Aufenthaltes in Deutschland. Frau Yourid aus dem DAAD bin ich für die permanente Hilfsbereitschaft und Gesprächsfreude besonders dankbar.

Dr. Edzard Spillner verdient meine unermessliche Dankbarkeit für die andauernde Unterstützung, für die Motivation, sowie für alle fruchtbaren und unfruchtbaren Diskussionen und Tratschgespräche, die wir unermüdlich geführt haben. Dr. Spillner bin ich auch sehr dankbar, dass er Zeit gefunden hat, meine ganze Arbeit inhaltlich und grammatikalisch zu redigieren.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn möchte ich meinen Dank aussprechen, dass er die Begutachtung dieser Arbeit akzeptiert hatte.

Bei Frau Leonie Bubenheim möchte ich mich für die Kommunikation bedanken, die noch vor meiner Aufnahme in Arbeitskreis angefangen hat, und für alles, was sie für mich im Sekretariat tun konnte.

Frau Monika Gunrem und Frau Martina Heinze aus dem Dekanat verdienen meine Dankbarkeit für die stete Hilfsbereitschaft und Angagement bei der Abgabe dieser Arbeit.

Daniela Otto danke ich für einen netten Kontakt und gute Laune.

Dr. Alexander Paul spreche ich großen Dank aus, dass er mich in die experimentelle Arbeit im molekularbiologischen Gebiet eingewiesen hat.

Herrn Prof. Dr. Hans, Herrn Prof. Dr. Blessin und Herrn Prof. Dr. Delmas aus dem Institut für Germanistik danke ich für die fruchtbaren Stunden des Deutschkurses, der zu einer reibungslosen Kommunikation mit den deutschen Kollegen, zu einer schriftlichen Kommunikation in unterschiedlichsten Bereichen sowie zum Gelingen des Schreibens dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die Bereitschaft, diese Arbeit zu lesen, möchte ich meinen Kolleginnen Kerstin Greunke, Dr. Johanna Kölln, Mark Matzas, Amir Sabri und Susanne Deckers großen Dank aussprechen.

Für die permanente Unterstützung während der Durchführung der Arbeit, für die Konsultationen hinsichtlich der Grammatik, für alle stundenlangen Diskussionen, sowie für alles Gute und Schlimme, was wir durchgemacht haben, möchte ich mich bei Martina Beckmann aus Bonn herzlichst bedanken.

Einigen Kolleginnen danke ich für die Schönheit, die sie diesem Arbeitskreis gegönnt haben.

Für die Arbeiten hinsichtlich der ÄKTA-Anlage bedanke ich mich sehr bei Thorsten Mix und Ingke Braren.

Für die Gestaltung der schriftlichen Endversion dieser Arbeit bedanke ich mich sehr bei Herrn Nebojša Begović und bei meinem Vater Dr. Branislav Simonović.

Meinem Bruder Branislav Simonović danke ich für die Optimierung und die Bearbeitung der Diagramme sowie für das optische Aussehen der Arbeit. Für das Interesse an der Arbeit sowie für die Unterstützung bedanke ich mich bei meiner Mutter Mirjana und Schwester Simona.

Für konstruktive Vorschläge, altruistische Denkweise und permanente Freude am Gespräch bin ich meinem Freund Vasilije Seratlić aus Belgrad sehr dankbar.

Herrn Rüdiger Bode danke ich für die angebotene Nebentätigkeit während des ganzen Studienaufenthaltes sowie für die Bereitschaft, wissenschaftliche und fachliche Gespräche zu führen. Frau Mirjana Bode, Frau Tatjana Dunz und Frau Gisela Woderich aus der Firma Marienfelde verdienen meine Dankbarkeit für die gute Laune, unvergessliche Zusammenarbeit und Erkundigung über meine Promotion.

Großen Dank für alles Positive verdienen all meine Kollegen, Diplomanden, Doktoranden und technische Assistenten Khadiga Jenjan, Michaela Mieke, Hannah Schröder-Borm, Heidi Lachnitt, Manfred Teppke, Lars Redecke, Benjamin Bockisch, Bruno Elsholz, Nadine Meyer, Uta Bußmeyer, Dr. Holger Bammert, Melanie van Yperen, Tudor Bartoi, Nicola Ott, Thorsten Riekman, Rana Farshbaf-Marab, Dr. Hyun-Jin Kim, Eresso Aga Geleta, Cordula Heske, Sabine Heinz und Jan Münster.

Am Ende möchte ich mich bei all denjenigen netten Leuten bedanken, die ich jemals kennengelernt habe, und die dazu beigetragen haben, dass ich mich in Deutschland wörtlich in keinem Moment wie ein Ausländer oder Fremder gefühlt habe.

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg, den 20.10.2004

Mladen Simonović