Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München
Univ. Prof. Dr. B. Hock

Konstruktion von scFv-, F_{ab}- und enzymkonjugierten Antikörperfragmenten für die Umweltanalytik

Doris Rau

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

Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

genehmigter Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann
Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Hock
2. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Die Dissertation wurde am 28.11.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.03.2002 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung 1

II Material und Methoden 14

1 Material 14
1.1 Reagenzien 14
1.2 Immunreagenzien 16
1.3 Probenpuffer, DNA- und Proteinmarker 16
1.4 Molekularbiologische Reagenzien 16
1.5 Klonierungsmaterial und Bakterienstämme 17
1.6 Pyrethroide, *s*-Triazine und deren Konjugate 18
1.7 Oligonukleotidprimer 19
1.8 Medien und Puffer 21
1.8.1 Zellkulturmedium 21
1.8.2 Medien und Agar zur Bakterienkultur 21
1.8.3 Pufferlösungen für ELISA 23
1.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot 25
1.8.5 DNA-Gelelektrophorese 26
1.8.6 Streptavidin-Affnitätschromatographie 26
1.8.7 Puffer für BIAcore-Messungen 26
1.9 Verbrauchsmaterial 27
1.10 Geräte 27

2 Methoden 29
2.1 Konstruktion eines Pyrethroid-spezifischen scFv-Antikörperfragments 29
2.1.1 scFv Phagen-System 29
2.1.1.1 Isolierung von mRNA 33
2.1.1.2 Synthese der Erststrang-cDNA 35
2.1.1.3 Selektive Amplifikation der V_L- und V_H-Regionen 36
2.1.1.4 Konjugation der V_L- und V_H-Regionen mit DNA-Linker 37
2.1.1.5 RV von scFv und pCANTAB 5E 39
2.1.1.6 Ligation von scFv-DNA mit dem Expressionsvektor pCANTAB 5E 41
2.1.1.7 Transformation von TG1 Bakterien mit pCANTAB 5E/scFv 41
2.1.1.8 Rettung des rekombinanten pCANTAB 5E Phagemids 43
2.1.1.9 Präparation von Phagenpartikeln zur Selektion 44

2.1.1.10 Selektion antigenspezifischer Phagen über *Panning* 45
2.1.1.11 Reinfektion der TG1-Bakterienzellen mit selektierten Phagenpartikeln 47
2.1.1.12 *Screening* der selektierten Phagenfraktion 47
2.1.2 Sequenzanalyse der positiven Klone 49
2.1.2.1 Konstruktion des scFv der Myeloma-Zellinie PAI-B_3Ag81 51
2.1.2.2 Sequenzanalyse 51
2.1.2.3 Datenbankanalyse 52
2.1.3 *Oligonucleotide site-directed* Mutagenese nach Kunkel 52
2.1.3.1 Einzelstrang-DNA-Isolierung 53
2.1.3.2 Oligonucleotide site-directed Mutagenese 54
2.1.4 Charakterisierung des scFv mit SDS-PAGE und Westernblot 56
2.1.4.1 Aufbereitung der Proben 56
2.1.4.2 SDS-PAGE von scFv 57
2.1.4.3 Westernblot von scFv 58
2.2 Konstruktion von *s*-Triazin-spezifischen F_{ab}-Antikörperfragmenten 58
2.2.1 Subklonierung der variablen Antikörperregionen in pASK99 60
2.2.1.1 Amplifikation der variablen Regionen des scFv 62
2.2.1.2 RV und Ligation der variablen Regionen mit pASK99 64
2.2.1.3 Ligation der Schwer- und Leichtketten in pASK99 67
2.2.2 Bakterielle Expression der F_{ab}-Varianten in pASK99 67
2.2.3 *Screening* der exprimierten F_{ab}-Antiköper 68
2.2.4 F_{ab}-Enzymimmunoassay 69
2.2.4.1 Auswertung des F_{ab}-Enzymimmunoassay 71
2.2.5 Reinigung und Konzentrierung der exprimierten F_{ab}-Fragmente 72
2.2.5.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie 73
2.2.5.2 Charakterisierung der gereinigten F_{ab}-Varianten im ELISA und über SDS-PAGE 73
2.2.5.3 Konzentrierung der F_{ab}-Fragmente 73
2.2.5.4 Konzentrationsbestimmung im BCA-Test 74
2.2.6 F_{ab}-Charakterisierung mit BIAcore Biosensor 74
2.2.6.1 Präparation des Sensorchips 75
2.2.6.2 Ermittlung der Affinitätsdaten der F_{ab}-Antikörper 75

2.3 Konstruktion des scFv(K47H)-aP Fusionsproteins 76
2.3.1 Die Klonierung der aP in pASK75 77
2.3.1.1 Aufbereitung von pASK75 für die Ligation 77
2.3.1.2 Amplifikation des aP-Gens aus pPHOA4 78
2.3.1.3 Ligation der aP mit pASK75 80
2.3.2 Klonierung des scFv-Fragments 81
2.3.2.1 Amplifikation von scFv aus pCANTAB 5E 81
2.3.2.2 Aufbereitung des Vektors pASK75/aP 82
2.3.2.3 Ligation von pASK75/aP und scFv(K47H) 82
2.3.3 Expression und *Screening* 83
2.3.4 Aufreinigung des Fusionsproteins 84
2.3.4.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie 84
2.3.4.2 Affinitätschromatographie mit Atrazin 85
2.3.5 Westernblot zur Proteincharakterisierung 85
2.3.6 ScFv(K47H)-aP-Enzymimmunoassay 86
2.3.6.1 Auswertung des scFv-aP-Enzymimmunoassays 86
2.3.6.2 Bestimmung der Kreuzreaktivität 86

III Ergebnisse 89

1 Konstruktion eines Pyrethroid-spezifischen scFv-Antikörperfragments 89
1.1 scFv Phagen-System 89
1.1.1 Selektive Amplifikation der V_H und V_L Regionen 90
1.1.2 Amplifikation des DNA-Linkers 93
1.1.3 Konjugation der V_H- und V_L-Regionen mit dem Linkerfragment 94
1.1.4 Ligation von scFv mit pCANTAB 5E 96
1.1.5 Isolation des rekombinanten pCANTAB 5E Phagemids 98
1.1.5.1 Präparation und antigenspezifische Selektion der Phagenpartikel 99
1.1.5.2 Reinfektion von TG1-Bakterienzellen mit den selektierten Phagenpartikeln 100
1.1.6 Expression und *Screening* von löslichen scFv der selektierten Phagenfraktion 101
1.2 DNA-Analyse der positiven Klone 103
1.2.1 Konstruktion des scFv der Myeloma-Zellinie PAI-B_3Ag81 104
1.2.2 Sequenzanalyse 106

1.2.3 Datenbankanalyse 107
1.3 *Oligonucleotide site-directed* Mutagenese nach Kunkel 110
1.4 Charakterisierung der mutierten Pyrethroid-spezifischen scFv-Klone 114
1.4.1 Analyse des scFv im ELISA 114
1.4.2 Charakterisierung des scFv mit Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot 116

2 Konstruktion von *s*-Triazin-spezifischen F_{ab}-Antikörperfragmenten 118
2.1 PCR-Amplifikation der variablen Regionen von scFv aus pCANTAB 5E 119
2.2 Ligation von V_H und V_L mit dem Vektor pASK99 122
2.3 Ligation der Schwer- und Leichtketten-Fragmente mit pASK99 125
2.4 Bakterielle Expression und *Screening* der F_{ab}-Antikörperfragmente 129
2.5 F_{ab}-Enzymimmunoassay 131
2.6 Reinigung und Konzentrierung der exprimierten F_{ab}-Fragmente 133
2.7 Charakterisierung der F_{ab}-Kinetik im BIAcore Biosensor 136

3 Konstruktion des scFv(K47H)-aP Fusionsproteins 138
3.1 Klonierungsstrategie 138
3.2 Aufbereitung des Vektors pASK75 139
3.3 Amplifikation der aP 141
3.4 Ligation der aP mit pASK75 142
3.5 Amplifikation des scFv-Fragments 144
3.6 Präparation des Vektors pASK75/aP 146
3.7 Ligation von scFv(K47H) mit pASK75/aP 146
3.8 Expression und *Screening* von scFv(K47H)-aP 147
3.9 Aufreinigung von scFv(K47H)-aP 150
3.9.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie 150
3.9.2 Atrazin-Affinitätschromatographie 150
3.10 Charakterisierung von scFv-aP 151
3.10.1 Westernblot mit scFv-aP 151
3.10.2 ScFv(K47H)-aP-Enzymimmunoassay 152
3.10.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität von scFv-aP 153

IV Diskussion 154

1 Konstruktion von Pyrethroid-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten 154

2 Konstruktion von s-Triazin-spezifischen F_{ab}-Antikörperfragmenten 164

3 scFv(K47H)-aP Fusionsprotein 175

V Zusammenfassung 192

VI Literatur 195

VII Anhang 219

Abkürzungsverzeichnis

A	Nukleobase Adenin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
aP	alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchinonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Nukleobase Cytosin
°C	Grad Celsius
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-triphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidin-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme linked immunosorbent assay*
EtOH	Ethanol
F_{ab}	Fragment *antigen binding*
Fv	Fragment *variable*
G	Nukleobase Guanin
Gluc	Glucose
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H_2O*	Wasser 18 Megohm (DNAse und RNAse frei), steril
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isoproyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
K	Kanamycin
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani

M	Molar
mAK	monoklonale Antikörper
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	*messenger* RNA
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektophorese
pAK	polyklonale Antikörper
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Pikomol
PMS	Permethrinsäure
POD	Peroxidase
RE	Restriktionsenzyme
rAK	rekombinante Antikörper
RLU	relative limunescence unit
RT	Raumtemperatur
RU	refractive unit
RV	Restriktionsverdau
s	Sekunde
scAb	*single-chain antibody*
scFv	*single-chain* Fv
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Nukleobase Thymin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trihydroxyaminomethan
U	Unit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktur eines Antikörpers und dessen Fragmente 4
Abbildung 2 Einige wichtige Vertreter der Pyrethroide 11
Abbildung 3 Einige wichtige vertreter der *s*-Triazine 12
Abbildung 4a Klonierungsschema des scFv-Fragments in pCANTAB 5E 30
Abbildung 4b Schema des Phagen-*Display*s 31
Abbildung 5 Phagemidvektor pCANTAB 5E 32
Abbildung 6 Chemische Struktur des Permethrin-Derivats t-PMS 46
Abbildung 7 Schema des indirekten, kompetitiven ELISA zum *Screening* der scFv-Klone .. 50
Abbildung 8 Expressionsvektor pASK99 59
Abbildung 9 Klonierungschema der variablen Schwer- und Leichtregionen in pASK99 61
Abbildung 10 Klonierungsschema für die Subklonierung von F_{ab} IPR-7 62
Abbildung 11 Atrazin-Derivat IPR mit C6-Spacer 68
Abbildung 12 Schema für den indirekten, kompetitiven ELISA zum *Screening* der F_{ab}-Klone 70
Abbildung 13 Schema für den direkten, kompetitiven F_{ab}-ELISA 71
Abbildung 14 Expressionsvektor pASK75 76
Abbildung 15 Klonierungsschema für das scFv-aP-Fusionsprotein 76
Abbildung 16 Klonierungsvektor pPHOA4 78
Abbildung 17 Schema des indirekten, kompetitiven ELISAs für das scFv-aP-Fusionsprotein 83
Abbildung 18 Überblick über Konstruktion des scFv und Anwendung des Phagen-*Display*-Systems 89
Abbildung 19 PCR-Produkte von V_H der Pyrethroid-spezifischen Zellinie 1/A5-7/C10 91
Abbildung 20 PCR-Produkte von V_L der Pyrethroid-spezifischen Zellinie 1/A5-7/C10 92
Abbildung 21 PCR-Produkte von Linkerfragment aus scFv K411B 93
Abbildung 22 Quantifizierung von V_H (4-5), V_L (7-9) und Linker (1-3) von der Zellinie 3/B4-1/F8 94
Abbildung 23 PCR-Produkte des scFv-Gens von Zellinie 1/A5-7/C10 95
Abbildung 24 pCANTAB 5E/K411B nach sequentiellem RV mit den RE *Sfi*I und *Not*I 96
Abbildung 25 scFv (1/A5) nach sequentiellem RV von mit den RE *Sfi*I und *Not*I 97
Abbildung 26 Verdrängung der Pyrethroid-scFv Klone 4H, 5F, 9D, 10B, 10F, 10H von t-PMS-OVA mit Bioallethrin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA 103

Abbildung 27 scFv-Klone 4H (1), 5F (2), 9D (3), 10B (4), 10F (5), 10H (6) nach sequentiellem RV mit den RE *Sfi*I und *Not*I 104
Abbildung 28 scFv(PAI-B_3Ag81) (1-3) und pCANTAB 5E (4-6) nach sequentiellem RV mit den RE *Sfi*I und *Not*I 105
Abbildung 29 *Screening* der scFv(PAI-B_3Ag81)-Klone 106
Abbildung 30 Datenbankanalyse von V_H(4H) 108
Abbildung 31 Datenbankanalyse von V_L(4H) 109
Abbildung 32 Datenbankanalyse von V_L(4H)-Del 28 110
Abbildung 33 Einzelstrang-Präparation von pCANTAB 5E/4H (4) 111
Abbildung 34 Doppelstrangsynthese von 4H-Del 28 112
Abbildung 35 Del 28-Klone 4H/11 (1), 4H/12 (2), 4H/21 (3), 4H/22 (4), 4H/31 (5), 4H/32 (6) nach RV mit RE *Not*I 113
Abbildung 36 Verdrängung der scFv-Klone 4H/21, 4H/22, 4H/31 von t-PMS-OVA durch Bioallethrin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA 115
Abbildung 37 Verdrängung des scFv 4H/31 von t-PMS-OVA durch Bioallethrin, Allethrin und S-Bioallethrin (je 10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA 116
Abbildung 38 SDS-Gel (a) und Westernblot (b) von scFv 4H/31 117
Abbildung 39 Klonierungsstrategie von pASK99-F_{ab} 118
Abbildung 40 PCR-Produkte der variablen Regionen V_H und V_L von Klon IPR-23 120
Abbildung 41 V_H-Gene des Klons IPR-7 nach Doppel-RV mit den RE *Pst*I und *Bst*EII 121
Abbildung 42 V_L-Gene des Klons IPR-7 nach sequentiellem RV mit den RE *Sst*I und *Xho*I 122
Abbildung 43 pASK99 nach RV mit den RE *Pst*I/*Bst*EII und *Sst*I/*Xho*I 123
Abbildung 44 pASK99-Leichtkette der Klone IPR-23 und IPR-53 nach Doppel-RV mit den RE *Nco*I/*Hind*III 125
Abbildung 45 pASK99-Fd der Klone IPR-23 und IPR-53 nach Doppel-RV mit den RE *Nco*I/*Hind*III 126
Abbildung 46 pASK99-Fd des Klons IPR-7 nach RV mit den RE *Xba*I/*Sst*I 126
Abbildung 47 pASK99-Leichtkette des Klons IPR-7 nach RV mit den RE *Xba*I/*Sst*I 127
Abbildung 48 Verdrängung der selektierten F_{ab} IPR-53 Klone aus den periplasmatischen Zellfraktionen von IPR-OVA durch Atrazin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA 130
Abbildung 49 F_{ab} IPR-7 (1),F_{ab} IPR-53 (2), F_{ab} IPR-23 (3) nach RV mit den RE *Xba*I und *Hind*III 131

Abbildung 50 Kalibrationskurven von F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23 bei Verdrängung durch Atrazin im direkten, kompetitiven ELISA 132
Abbildung 51 Verdrängung des affinitätsgereinigten Klons F_{ab} IPR-53/8 in den eluierten Fraktionen 1-8 und im Durchlauf (D) von IPR-OVA durch Atrazin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA 134
Abbildung 52 SDS-Gel der eluierten Fraktionen (1-6) nach Streptavidin-Affinitätschromatographie von F_{ab} IPR 53/8..... 135
Abbildung 53 SDS-Gel des affinitätsgereinigten F_{ab} 53/8 nach reduzierenden (1) und nicht-reduzierenden (2) Bedingungen 136
Abbildung 54 Sensorgramm für die Affinitätsbestimmung von F_{ab} IPR-53/8 (55 nmol) nach Korrektur des Hintergrunds. 137
Abbildung 55 Überblick über die Klonierungsstrategie von pscFv(K47H)aP..... 138
Abbildung 56 pscFvaP mit dem eingefügten Fusionsgen scFv-aP 139
Abbildung 57 pASK75 nach RV mit RE *Sal*I und *Eco*47III..... 140
Abbildung 58 PCR-Produkte von aP..... 141
Abbildung 59 Das amplifizierte aP-Gen nach Doppel-RV mit RE *Sal*I und *Eco*47III..... 142
Abbildung 60 Vergleich von zirkulären pASK75/aP-Plasmiden (1-3) mit Kontrollplasmid pASK75 (4) 143
Abbildung 61 RV zum Nachweis von pASK75/aP mit RE *Sal*I und *Eco*47III 144
Abbildung 62 PCR-Produkte von scFv aus pCANTAB 5E..... 145
Abbildung 63 Das amplifizierte scFv-Gen nach Doppel-RV mit den RE *Stu*I und *Sal*I 145
Abbildung 64 pASK75/aP nach sequentiellem RV mit den RE *Stu*I und *Sal*I 146
Abbildung 65 Verdrängung der vier scFv(K47H)-aP Klone von IPR-OVA durch Atrazin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA 148
Abbildung 66 Vier scFv-aP Klone (1-4) nach sequentieller RV mit den RE *Stu*I und *Eco*47III..... 149
Abbildung 67 SDS-Gel und Westernblot von scFv-aP 151
Abbildung 68 Kalibrationskurven von scFv(K47H)aP nach stündlichen Zeitintervallen bei Verdrängung durch Atrazin 152
Abbildung 69 „Tetrabodies“aus Strep-*Tag*-F_{ab}-Fusionsproteinen und Streptavidin..... 175
Abbildung 70 MCS von pASK75 mit klonierter aP-Sequenz..... 181
Abbildung 71 MCS von pASK75 mit scFv und aP..... 184
Abbildung 72 Kristalline Struktur der dimerischen alkalischen Phosphatase 187

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Primer für Fusionsprotein scFv-aP 19
Tabelle 2 Primer für Konstruktion des scFv 4H/41 19
Tabelle 3 Primer für Fab-Subklonierung 20
Tabelle 4 PCR-Ansatz zur Amplifikation der V_H-Region 36
Tabelle 5 Zeit-Temperatur-Profil der PCR zur Amplifikation von V_H aus der cDNA 37
Tabelle 6 PCR-Ansatz zur Amplifikation des Linkers 38
Tabelle 7 Konjugationsansatz von V_H, V_L und Linker 38
Tabelle 8 PCR-Ansatz zur Amplifikation des scFv-Fragments 39
Tabelle 9 Sequentieller RV des scFv-Fragments mit den RE *Sfi* I und *Not* I 40
Tabelle 10 Ligationsansatz von scFv und pCANTAB 5E 41
Tabelle 11 Präzipitationsansatz 42
Tabelle 12 Annealingansatz 54
Tabelle 13 Ansatz zur Synthese des Doppelstrangs 55
Tabelle 14 PCR-Ansatz zur Amplifikation der V_H-Region aus scFv 63
Tabelle 15 Doppel-RV-Ansatz von V_H 64
Tabelle 16 Sequentieller RV von V_L mit den RE *Sst*I und *Xho*I 65
Tabelle 17 Ligationsansatz von V_H und pASK99 66
Tabelle 18 Doppel-RV-Ansatz von pASK75 79
Tabelle 19 PCR-Ansatz zur Amplifikation des aP-Gens 80
Tabelle 20 Sequentieller RV von scFv(K4E7) 83
Tabelle 21 DNA-Konzentrationen der amplifizierten V_H- und V_L-Regionen der Zellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1/F8 93
Tabelle 22 Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien nach Elektroporation von *E. coli* TG1 mit pCANTAB 5E/scFv(1/A5) bzw. pCANTAB 5E/scFv(3/B4) 98
Tabelle 23 Sequenzervergleich der variablen Regionen der Pyrethroid (4H, 5F, 9D/10F, 10B/10H)- und Myeloma-scFv-Fragmente (L1/L3) 106
Tabelle 24 DNA-Konzentrationen der amplifizierten variablen Regionen V_H und V_L der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23 120
Tabelle 25 DNA-Konzentrationen der 2-fach geschnittenen V_H und V_L-Fragmente der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23 122
Tabelle 26 Mengenzusammensetzungen der einzelnen Ligationsreaktionen aus den DNA-Fragmenten der variablen Regionen und pASK99 123

Tabelle 27 Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien nach der Transformation von *E. coli* JM83 mit pASK99-V_H der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23 124

Tabelle 28 DNA-Konzentrationen der 2-fach geschnittenen Vektoren und Schwer- und Leichtketten-Fragmente der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23 127

Tabelle 29 Mengenzusammensetzungen [µl] der einzelnen Ligationsreaktionen aus den DNA-Fragmenten der Schwer- und Leichtketten und pASK99 127

Tabelle 30 Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien nach der Transformation von *E. coli* JM83 mit pASK99-V_H der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23 128

Tabelle 31 Nachweisgrenze (20 % B/B_0) und Testmittelpunkt (50 % B/B_0) in µg/l Atrazin der F_{ab}-Antikörperfragmente der Klone F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23 . 131

Tabelle 32 Konzentrationen der gereinigten F_{ab}-Antikörperfragmente der Klone F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23 134

Tabelle 33 Assoziationsrate k_a, Dissoziationsrate k_d und Gleichgewichts-Dissoziations-konstante K_D der drei F_{ab}-Varianten IPR-7, IPR-53 und IPR-23 136

Tabelle 34 Anzahl der Bakterienkolonien nach der Transformation von *E. coli* K12-JM83 mit pASK75/aP 142

Tabelle 35 Auswertung der Transformation von pscFv(K47H)aP in JM83 146

Tabelle 36 Kreuzreaktivität des scFv-aP Fusionsproteins im indirekten, kompetitiven ELISA 152

I Einleitung

Seit etwa Mitte des vorigen Jahrhunderts werden chemische Pflanzenschutzmittel eingesetzt, um die Erträge in der landwirtschaftlichen Produktion zu steigern und zu sichern. Heute gehört die Anwendung von Agrarchemikalien zur täglichen Praxis in der Landwirtschaft. Dem Nutzen der Pflanzenschutzmittel steht die Problematik der Rückstände der eingesetzten Xenobiotika in Wasser, Boden und Nahrung gegenüber. Die Umwelt- bzw. Pestizidanalytik ermöglicht die Erfassung dieser Kontaminationen und die Aufklärung über die Belastung des Ökosystems und der damit verbundenen möglichen Gefahren für die menschliche Gesundheit. Ein stetig wachsendes Umwelt- und Gesundheitsbewußtsein führte in der BRD zu verschärften gesetzlichen Regelungen für die Zulassung und Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (Pflanzenschutzgesetz von 1987), aber auch zur Festlegung von zulässigen Höchstmengen in Lebensmitteln (Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung 16.10.1989). Die EU setzte mit ihrer Trinkwasserverordnung von 1980 die zulässigen Grenzwerte von 0,1 µg/l für einen einzelnen Pflanzenschutz-Wirkstoff bzw. maximal 0,5 µg/l bei mehreren Substanzen fest (Weinhold et al., 1993; Kross et al., 1992). Eine neue Trinkwasserdirektive der EU vom 3.11.98 bestimmt für bestimmte Pestizide im Trinkwasser noch niedrigere Grenzwerte von 0,03 µg/l (barolo.ipc.uni-tuebingen.de/Ak/doktorarbeiten/ivo_stemmler/html). Diese Verordnung erfordert ein Monitoring dieser Chemikalien mit hoch-sensitiven Nachweismöglichkeiten, um diese Spurenanalytik durchführen zu können (Harris, 1999). Neben der Sensitivität werden Zuverlässigkeit, niedrige Kosten, Geschwindigkeit der Datengewinnung, einfache Handhabung und Mobilität für die Meßsysteme in der Umweltanalytik gefordert (Van Emon und Gerlach, 1998). Diesen Anforderungen können die klassischen Methoden der Analytik, z.B. GC (Gaschromatographie), GC/MS (Gaschromatographie/Massenspektrometrie), HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie), nicht vollständig entsprechen. Typische Kriterien der chromatographischen Methoden sind ein hoher Investitionsaufwand, große Probenvolumina und niedrige Durchsatzraten, die einen Einsatz dieser Instrumente nicht unbedingt befürworten. Als alternative Verfahren für die anspruchsvolle Umweltforschung sind Technologien zu nennen, die spezifische Bindungseigenschaften biologischer Komponenten (z.B. Antikörper, Enzyme, Rezeptoren und DNA/RNA) zu umweltrelevanten Schadstoffen nutzen. Immunchemische Analysetechniken, die auf dem Einsatz von Antikörpern und deren spezifischer Reaktion zum Antigen basieren, weisen eine extreme Sensitivität auf und sind einfach und rasch unter vergleichsweise geringen Kosten durchzuführen (Kramer

und Hock, 1995). Den Auftakt dieser Technologie bildeten die Verwendung von Antikörpern und die Entwicklung von Radioimmunoassays (RIA) in der medizinischen Diagnostik (Berson und Yalow, 1959). Diese Testverfahren wurden später durch Enzymimmunoassays und verwandte Techniken ergänzt und verbessert (Hock, 1993). Die gängigsten immunchemischen Verfahren sind Immunoassays, Immunochromatographie und Immunosensoren in der Analytik gelöster Stoffe sowie Immunoassays und immunhistochemische Methoden für die Erfassung gebundener Rückstände. Der Einsatz von Antikörpern kann für das Umwelt-Monitoring von Agrochemikalien mittels Immunoassays (Scholthof et al., 1997; Yau et al., 1998; Chiu et al., 2000) oder für das *Screening* von Chemikalien für die Entwicklung neuer Pestizide (Webb et al., 1997; Webb und Hall, 2000a, b) erfolgen. Eine weitere Anwendung wäre das Entfernen von organischen Stoffen oder Mikroorganismen aus dem Wasser über Affinitätschromatographie (Graham et al., 1995). In den letzten Jahren haben sich die immunchemischen Verfahren bei hohem Probendurchsatz (Hennion und Barcelo, 1998) und in Bezug auf rasche Ergebnisgewinnung gegenüber den chromatographischen Techniken (Dankwardt et al., 1995; Lydy et al., 1996) oder elektrophoretischen Verfahren wie CE (Kapilarelektrophorese; Heegaard und Kennedy, 1999) im Bereich von xenobiotischen Kontaminationen der Umwelt und bei Lebensmittelskontrollen bewährt. Weitere Vorteile bieten die immunchemischen Methoden bei der Bestimmung von Spurenkontaminationen in sehr begrenzten Probenvolumina, z.B. Pestizidanalyse in Nebeltropfen, und bei der Analyse von flüssigen Probenmatrices ohne vorherige Aufreinigung bei Feldmessungen vor Ort. Auch bei der Analytik von Molekülen mit hoher Masse oder von hydrophilen Substanzen eignet sich die Immunchemie mehr als konventionelle Meßtechniken (Weller, 1997). Dennoch erscheint es sinnvoll, die Methoden der klassischen wie immunchemischen Analytik ergänzend einzusetzen. Kramer et al. (2001a) berichteten beispielsweise über eine mit hohem Probenaufkommen verbundene Erfassung von Herbizid-Kontaminationen in Gewässern mit Hilfe einer Kombination aus antikörpergestützter Analyse für das Vor*screening* mit anschließender Validierung der Ergebnisse über klassische Referenzanalytik.

Immunchemische Methoden ermöglichen die Messung in unterschiedlichsten Matrices wie Luft (Wex et al., 1995), Boden (Van Elsas et al., 1998), Wasser und biologischem Material. Damit sind eine Reihe von Applikationen wie Aufklärung des Transports und der Verteilung von freigesetzten Pestiziden in der Umwelt (Sarmah et al., 1998), chemische

und mikrobielle Rückstandsanalyse in Nahrungsmitteln (Lopez-Avila et al., 1996; Morsy et al., 1996; Nunes et al., 1998; Mitchell et al., 1998), Belastung von Innenräumen und Expositionsnachweis von Arbeitern (Eduard und Heederik, 1998) in der Umweltanalytik möglich.

Die Antikörperstruktur

Antikörper (AK) sind Glykoproteine aus der Gruppe der Immunglobuline, die von Wirbeltierorganismen als Abwehrreaktion gegen eingedrungene Krankheitserreger oder Fremdstoffe (Antigene) gebildet werden. Als Besonderheit besitzen diese Moleküle Bindungsstellen (Paratope), die es ihnen erlauben, mit bestimmten Teilstrukturen der Antigene, den Epitopen (Alzari et al., 1988), eine Bindung einzugehen. Dadurch werden im Körper Prozesse ausgelöst, die das Antigen für den Organismus unschädlich machen. Nach Antigenkontakt werden ruhende B-Zellen selektiv aktiviert und deren Vermehrung und Differenzierung eingeleitet. Nach der von Burnet (1959) formulierten Klonselektionstheorie hat jede B-Zelle bereits ihre Spezifität programmiert. Die Ursache für die große Vielfalt von ca. 10^8 unterschiedlichen Spezifitäten liegt in den Kombinationsmöglichkeiten der codierenden Genabschnitte und in der Vielzahl somatischer Mutationen und Rekombinationen während der Entwicklung des Immunsystems und der B-Zellreifung (Tonegawa, 1983). So erhält jeder Organismus ein individuelles Antikörperrepertoire.
Die Immunglobuline (Ig) lassen sich in fünf Klassen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) sowie entsprechende Subklassen unterteilen. Mit einem Anteil von rund 70-80 % an der gesamten Immunglobulinfraktion stellt das IgG die Hauptkomponente dar (Roitt et al., 1995) und wird besonders häufig für immunchemische Fragestellungen verwendet.

Die Grundstruktur eines Antikörpers der Klasse IgG (Abb.1) enthält vier Polypeptidketten, zwei identische Leichtketten (L-Ketten) und zwei identische Schwerketten (H-Ketten), deren Größen je nach Antikörper variieren. Sie werden durch nicht kovalente Bindungen und Disulfidbrücken verknüpft, deren Zahl und Lage zwischen den Spezies aber auch zwischen verschiedenen Subklassen variiert. Die L-Ketten existieren in zwei serologisch unterscheidbaren Varianten, der Kappa (κ)- und der Lambda (λ)-Form. Beide Ketten bestehen aus einem relativ konstanten Bereich (C-Teil) und einem variablen Bereich (V-Teil). Im variablen Bereich existieren Regionen, in denen eine extrem hohe Variabilität in

der Aminosäurenzusammensetzung zu beobachten ist. Diese Bereiche werden als hypervariable Regionen oder CDRs (*complementarity determining regions*) bezeichnet.

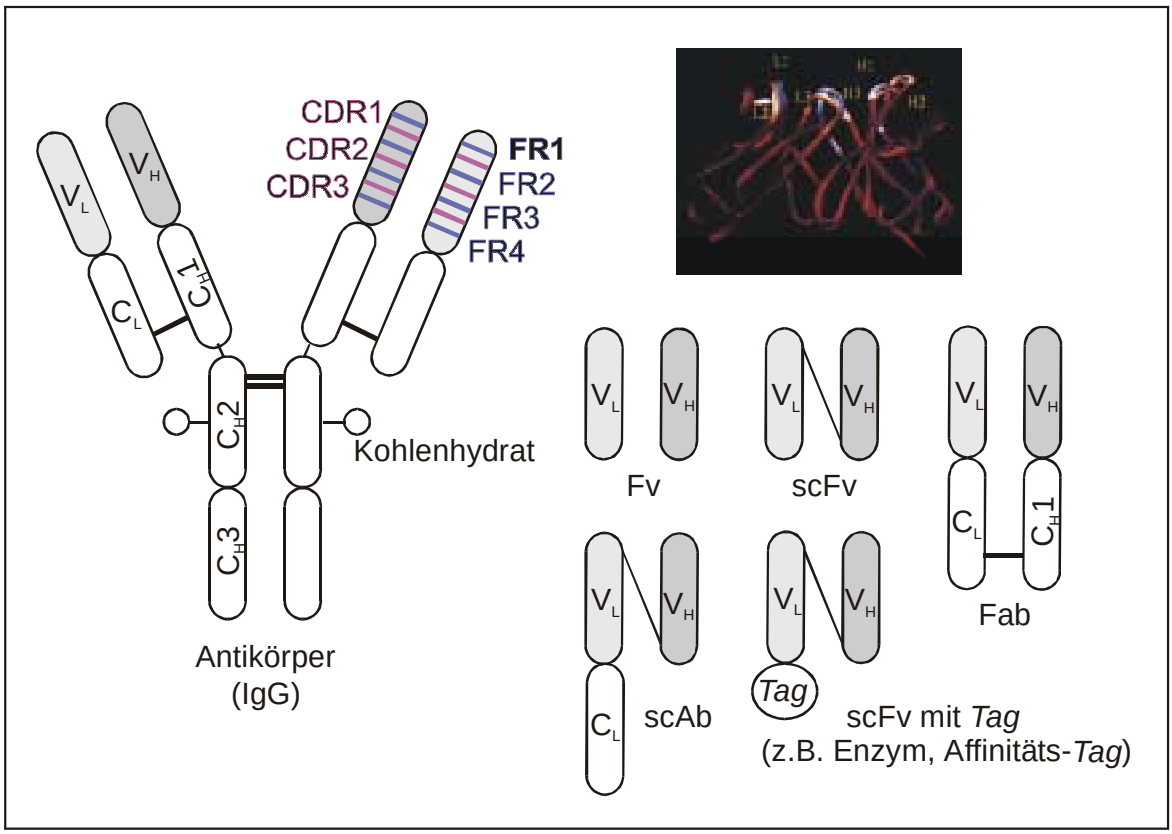


Abbildung 1 Struktur eines Antikörpers und dessen Fragmente. Links: Domänenstruktur eines nativen Antikörpers der Klasse IgG mit Segmentierung der V_H- und V_L-Gene in die Rahmenregionen FR1-4 und hypervariablen Regionen CDR1-3. Rechts oben: Modell der V_H- und V_L-Domäne. L1-3: V_H CDR1-3; H1-3: V_L CDR1-3 (Vargas-Madrazo et al., 1995). Rechts unten: Domänenstrukturen von Antikörperfragmenten: Fv (Fragment *variable*), scFv (*single-chain* Fragment *variable*), Fab (Fragment *antigen binding*), scAb (*single-chain antibody*)

Durch Ausbildung von Peptidschleifen (Abb. 1) in den zwei variablen Regionen des AK können sich die insgesamt sechs CDRs der H- und L-Ketten zusammenlagern und bilden somit die eigentlichen Paratope (Padlan, 1994). Der Kontakt zwischen AK und Antigen erfolgt in den CDRs aber nur über wenige Aminosäuren (20-30 %). Die übrigen Aminosäuren der CDRs sind nicht zugänglich oder sind für den Kontakt zwischen den CDRs der entsprechenden H- und L-Ketten verantwortlich (Abergel et al., 1994). Mit ihrer Ladung tragen sie erheblich zur Bindung bei (Smith-Gill, 1994). Darüber hinaus sind für

die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung aber auch die acht konservierten Rahmenregionen (FR, *framework regions*) der variablen Regionen des AK von Bedeutung (Padlan, 1994). Die V_H- wie die V_L-Domäne verfügen über jeweils drei CDRs, die von den Rahmenregionen FR 1-4 flankiert sind (Wu und Kabat, 1970). Neben einer erhöhten Sequenzvariabilität gegenüber den umgebenden Rahmenregionen treten in den CDRs auch Unterschiede in der Länge auf.

Für die Bindung zwischen dem Paratop des AK und der antigenen Determinante des Liganden sind Coulomb-Kräfte (= elektrostatische Kräfte), Lifshitz-van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen sowie Ca^{2+}-Brücken verantwortlich (van Oss, 1992). Die Affinität und Selektivität eines Antikörpers zum Antigen ist durch die Summe der intermolekularen Kräfte und über den Grad der Komplementarität festgelegt.

Synthese von Antikörpern und deren Fragmenten

Die Antikörperproduktion erfolgte zu Beginn der Antikörpertechnologie hauptsächlich durch Immunisierung von Vertebraten, um polyklonale Antiseren zu erhalten. Erste immunchemische Testsysteme in der Umweltanalytik basierten ausschließlich auf polyklonalen Antikörpern (pAK; Haas und Guardia, 1968; Centeno et al., 1970). Die Mehrzahl der relevanten Substanzen in der Umweltanalytik, sogenannte Haptene, weisen ein geringes Molekulargewicht auf und sind so den antigenen Determinanten gleichzusetzen. Sie können zwar von einem AK erkannt und gebunden werden, wirken jedoch nicht immunogen. Die Kopplung mit immunogenen Trägerproteinen [z.B. Rinderserumalbumin (BSA)] führt zu einer Immunantwort, die zur Generierung diverser Testsysteme eingesetzt wurde (Sherry, 1992; Dankwardt et al., 1997). Aufgrund des komplexen Gemisches der Seren aus unterschiedlichsten Antikörpern sind eine definierte Spezifität und Affinität zu einem bestimmten Antigen nur annäherungsweise zu erreichen. Die Produktionsspanne eines einzelnen Tieres, das die gewünschten pAKs entwickelt, ist allerdings limitiert. Außerdem garantieren diese Seren keine konstanten AK-Qualitäten über längere Zeiträume hinweg.

Die Entwicklung der Hybridomtechnologie von Köhler und Milstein (1975) stellte eine wichtige Alternative zur AK-Produktion über Antiseren dar. Mit dieser Strategie gelang es, monoklonale Antikörper (mAK) in theoretisch unbegrenzten Mengen zu gewinnen, die absolut identische Affinitäten und Spezifitäten gegenüber einem definierten Antigen besitzen. Dies leitet sich aus dem zentralen immunologischen Dogma ab, nach dem jeder

B-Lymphozyt einen definierten Antikörper synthetisiert, der gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet ist, einer Immunglobulinklasse und Subklasse zugeordnet werden kann, eine definierte Affinitätskonstante besitzt und über festgelegte biologische Eigenschaften verfügt (Roitt et al., 1995).

Andererseits erscheinen selbst die Möglichkeiten der Hybridomtechnik begrenzt, wenn das gesamte Spektrum des natürlichen AK-Repertoires genutzt werden soll. Dies zeigt sich in dem Umfang immunchemischer Tests, die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt für die Umweltanalytik konzipiert wurden. Von den 300 relevanten Pflanzenschutzmitteln sind nur ca. 70 mit Immunoassays zu erfassen (Kramer und Hock, 1995). Weitere Schwachstellen dieser Technlogie sind die letalen Wirkungen von hochtoxischen Analyten bei der Immunisierung, die begrenzte Möglichkeit zur Modifikation von Spezifität und Affinität eines mAK und die Instabilität von etablierten Hybridomlinien. Auch die langen und aufwendigen Entwicklungszeiten und die anspruchsvolle Pflege einer Säugerzellenkultur sind Nachteile dieser Produktionstechnik.

Die AK-Produktion mit Hilfe von rekombinanter DNA-Technologie stellt die dritte Möglichkeit zur Gewinnung von AK für die Umweltanalytik dar. Hier steht die gentechnische Nutzung des Immunrepertoires bzw. der Antikörper-codierenden Gene von Säugerorganismen im Vordergrund. Ab den achtziger Jahren kam die Gentechnologie auf diesem Gebiet in der Medizin zum Einsatz. Die Synthese chimärer und humanisierter AK aus Human- und Maus-AK durch Transfer bestimmter Gensegmente (Fv- und CDR-Transfer, siehe Abb.1) war Vorreiter von Modifikationen der Antigenbindungsstellen durch gerichtete Mutagenese, Produktion von bindungsrelevanten AK-Teilstücken und Konstruktion kombinatorischer Gen-Bibliotheken (Kramer und Hock, 1995). Bedeutende Fortschritte in der Konstruktion von rekombinanten AK (rAK) konnten mit Hilfe von umfangreichen Informationen über Antikörpersequenzen (Kabat et al., 1991) und der PCR-Methode (*polymerase chain reaction;* Larrick et al., 1989) zur Isolation der Antikörpergene erzielt werden. So war es möglich, ganze Repertoires von V_H- und V_L-Genen aus den Zellen des Immunsystems zu isolieren und anschließend in geeignete Wirtszellen zu klonieren (Orlandi et al., 1989; Sastry et al., 1989). Die Nutzung des Bakteriums *E. coli* als Wirtszelle zur Gewinnung von funktionellen Antikörperfragmenten wurde von Better et al. (1988) und Skerra und Plückthun (1988) etabliert. Um das *Screening* von spezifischen Antikörperklonen aus Antikörperbibliotheken mit bis zu 10^9 unterschiedlichen Klonen effektiver zu gestalten, wurde die Selektionsstrategie *in vivo* mittels des Phagen-*Display* (Smith, 1985; Parmley und Smith, 1988; Smith und Scott,

1993) imitiert. Bei Kontakt mit dem Antigen wird der B-Lymphozyt, der den spezifischen Antikörper zunächst membrangebunden an der Oberfläche präsentiert, aktiviert und zur Vermehrung angeregt. Diese klonale Selektion einer spezifischen Zelle aus der Masse des B-Lymphozyten-Pools wird *in vitro* über die Fusion von Antikörpergenen mit Hüllprotein codierenden Genen von Bakteriophagen und der anschließenden Präsentation von funktionell gefalteten Fusionsproteinen an der Phagenoberfläche erreicht (McCafferty et al., 1990; Clackson et al., 1991; Kang et al., 1991). Aufgrund dieser physischen Verbindung des Genotyps mit dem Phänotyp zu einer biologischen Einheit lassen sich über die Bindung zum Antigen spezifische Antikörperfragmente bzw. deren Gene selektieren.

Die Technik der rAK ermöglicht, neben der Reduzierung des Zeitaufwands (von 6-9 Monaten für mAK auf 3-4 Wochen für rAK), der Expression funktioneller AK-Fragmente und der Modifikation der Antikörper im Hinblick auf Spezifität und Affinität, den Verzicht auf Neuimmunisierungen und somit auf Tierversuche. Wegen der kurzen Generationsdauer von Bakterien und der relativ leichten Handhabung, im Vergleich zur Zellkultur bei mAK, bietet dieses Verfahren eine Beschleunigung und Erleichterung bei der Gewinnung von großen AK-Mengen.

Aufgrund der Tatsache, daß die AK-Bindungsstellen ihre Targets in einem molaren Verhältnis von 1:1 binden, erscheint ein Antikörper mit dem Molekulargewicht von 150 kD zu einem Target mit 200 Da unökonomisch (Harris, 1999). Folglich ist die Konstruktion der kleinsten Erkennungseinheit bzw. des Fragments mit dem geringsten Molekulargewicht, das die Affinität zu dem spezifischen Antigen beibehält, ein erstrebenswertes Ziel. Denn je kleiner das Fragment ist, umso größer ist die Zahl der Bindungsstellen je Proteineinheit und umso geringer fallen die Produktionskosten je Einheit aus. Durch Isolation der Leicht- und Schwerketten-DNA-Sequenzen wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von AK-Fragmenten mit Antigen-Bindungsaffinität entwickelt. Das kleinste Molekül, Fv (Fragment des variablen Teils), besteht nur noch aus den variablen Regionen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L, vgl. Abb. 1, S. 4). Da den Fv-Fragmenten die kovalente Verknüpfung beider Ketten durch die Cysteine der konstanten Ketten fehlt, erfolgt die Stabilisierung der Fragmente durch die Verbindung der variablen Domänen über ein flexibles Linkerfragment zu einem einzigen Proteinstrang. Dabei entstehen die sogenannten single-chain Fv (scFv) Fragmente. V_H und V_L interagieren über nicht-kovalente Bindungen, wobei der Linker die Assoziation der beiden

Ketten zur korrekten Konfiguration unterstützt. Durch Verkürzung des Linkers können sich monovalente scFv zu bivalenten Molekülen zusammensetzen (Harris, 1999). Eine weitere Variante des scFv stellt das scAb (single-chain antigen binding) Fragment mit der zusätzlichen konstanten Region der Leichtkette (C_L) dar. Durch Anfügen einer konstanten Region beider Ketten an das Fv-Fragment entsteht das F_{ab}-Fragment (Fragment des antigenbindenden Teils), das über eine Disulfidbrücke an den Cysteinen der konstanten Regionen C_H und C_L stabilisiert wird.

Die antigenbindende Funktion eines AK-Fragments kann durch Fusion an einen heterologen Fusionspartner, wie z.B. Enzyme, Peptide oder Rezeptorliganden, auf eine zusätzliche Eigenschaft erweitert werden. Diese bifunktionellen Antikörper sind künstliche Moleküle, die im natürlichen AK-Repertoire nicht enthalten sind. Beispielsweise erleichterte die genetische Kopplung von Peptiden (z.B. Strep-*Tag*, His-*Tag*) die Aufreinigung von exprimierten AK-Fragmenten (Skerra et al., 1994). Brégégère und Bedouelle (1992) fusionierten die variablen Regionen eines Maus-AK mit dem Maltose-Bindeprotein (malE) von *E. coli* zum Zweck der Reinigung über Affinitätschromatographie basierend auf gebundener Amylose. Die Fusion von Streptavidin an scFv-Antikörper ermöglichte die affinitätschromatographische Aufreinigung unter Verwendung von Biotin-Analogen (Dübel et al., 1995). Benito et al. (1993) vereinfachten das Monitoring und die Quantifizierung der Produktion von Fusionsproteinen, indem sie das Enzym ß-Galactosidase als Marker verwendeten. Die Staphylococcen-Proteine A und B sind beliebte Fusionspartner, da aufgrund ihrer Immunoglobulin-Bindungsbereiche eine einfache IgG-Affinitätschromatographie zur Reinigung der Fusionsproteine durchgeführt werden kann (Gandecha et al., 1992 und 1994; Stahl und Nygren, 1997). Auch das Enzym Glutathion-S-Transferase wurde als *affinity tag* verwendet und führte zur Entwicklung des pGEX-Fusionssystems, das auf die Expression einer Vielzahl von Proteinen abgestimmt ist (Kaplan et al., 1997). Im Bereich der Medizin entwickelten Rodriguez et al. (1995) ein Fusionsprotein aus Krebsantikörpern und dem Enzym ß-Lactamase, das zur Aktivierung eines Giftstoffes beitrug und somit dessen zytotoxische Aktivität gegenüber benachbarten Tumorzellen erhöhte.
Fusionierte Marker-Enzyme finden auch ihre Anwendung in Immunoassays und stellen eine Alternative für die chemisch gekoppelten Antigen- bzw. Antikörper-Konjugate dar. Durch rekombinante Synthese von Fusionsproteinen aus rAK und Reporterenzymen ließe sich ein äquimolares Verhältnis zwischen dem antigenbindenden und dem enzymatischen

Teil herstellen und die Unsicherheit der Kopplung auf Proteinebene verhindern (Kramer und Hock, 1995). Allgemein übliche Enzyme zur Erstellung von Enzymtracern in Assays mit Farbnachweis sind Peroxidase und alkalische Phosphatase (aP).

Die aP ist ein homo-dimerisches Zink-Metalloprotein, das umfassend von Bradshaw et al. (1981), Chang et al. (1986) und Kim und Wyckoff (1991) charakterisiert wurde. Der Einsatz beim Nachweis bestimmter Analyten im ELISA erfolgt aufgrund der Farbreaktion, die durch Enzymaktivität hervorgerufen wird. Beim Einsatz der aP als rekombinanter Enzymmarker ist zu beachten, daß dieses Enzym in dimerischer Form nur im Periplasma von *E. coli* enzymatisch aktiv ist (Derman und Beckwith, 1995). Dies setzt die Steuerung der Translokation aus dem Cytoplasma in das Periplasma durch bestimmte Leader-Sequenzen (z.B. *omp*A) bei der Expression voraus. Neben der Detektionshilfe bietet die fusionierte aP den Vorteil der Affinitätssteigerung zum Antigen durch Dimerisierung.

Rekombinante Antikörperfragmente in der Umweltanalytik

Viele umwelttoxische Substanzen sind, bezogen auf die Immunantwort, niedermolekulare Haptene mit Molekülgrößen von unter 1000 Da, was die Konstruktion und Anwendung von rAK neben der zahlreichen Vorteile in der Umweltanalytik plausibel erscheinen läßt. Überwiegend beschränkt sich die Technologie von rekombinanten Antikörpern auf die Klonierung und funktionelle Expression von Antikörper-codierenden Genen aus etablierten Hybridomlinien. Die erste Klonierung im Umweltbereich wurde von Ward et al. (1993) berichtet. Hierbei verhinderten jedoch einige technische Probleme bei der Isolierung der Antikörper-Gene und deren Expression die Entwicklung eines geeigneten Assay zum Nachweis von Xenobiotika. Nachfolgend wurden rAK gegen eine Reihe relevanter Xenobiotika wie Diuron (Bell et al., 1995), Paraquat (Graham et al., 1995), s-Triazine (Kramer und Hock, 1996a), Atrazin (Byrne et al., 1996), Cyclohexadion (Webb et al., 1997), Parathion (Garrett et al., 1997), Dioxin (Lee et al., 1998a), Picloram (Yau et al., 1998), Mecoprop (Strachan et al., 1999), Chlorpyrifos (Alcocer et al., 2000) und polychlorierte Biphenyle (Chiu et al., 2000) aus Hybridomlinien synthetisiert, die sich ähnlich den mAK für den quantitativen Nachweis von Xenobiotika eignen. Diese Arbeiten zeigten sowohl Ähnlichkeiten (Kramer und Hock, 1996a; Lee et al., 1998a; Alcocer et al., 2000) als auch geänderte analytische Eigenschaften (Graham et al., 1995; Byrne et al., 1996) der rAK gegenüber den parentalen mAK. Die Eignung der entwickelten

Immunoassays für den Einsatz von Umweltproben unter Realbedingungen wurde bis jetzt nur von Kramer (2001b) dokumentiert.

Eine Alternative zu Hybridomlinien, die als Quelle für V-Gene dienen, sind Genbibliotheken, die ein ganzes Immunrepertoire beinhalten. Ein erster Versuch, diese Technolgie in die Umweltanalytik aufzunehmen, stammte von Karu et al. (1994). Die isolierten Diuron-spezifischen AK-Fragmente aus dieser Bibliothek reagierten jedoch nur schwach mit dem Analyten und waren somit für eine Spurenanalytik ungeeignet. Die nachfolgenden Forschungen auf diesem Gebiet ergaben erfolgreichere Ergebnisse. Li et al. (1999) isolierten ein Atrazin-spezifisches AK-Fragment aus einer AK-Bibliothek aus Splenozyten immunisierter Kaninchen. Kramer (2001a) generierte eine *s*-Triazin-selektive Genbibliothek aus Milzgewebe von immunisierten Mäusen, aus der sich hochaffine AK-Fragmente für die Triazin-Analytik isolieren ließen. Mittlerweile existieren kommerzielle AK-Bibliotheken (z.B. HuCAL, Knappik et al., 2000), die grundsätzlich für die Umweltanalytik einsetzbar sind.

Neben den scFv- (Kramer und Hock, 1996a; Garrett et al., 1997; Webb et al., 1997) und den F_{ab}-Formaten (Ward et al., 1993; Karu et al., 1994) findet auch das scAb-Fragment (Grant et al., 1999) Anwendung in der Umweltanalytik. Auch die Wirtssysteme werden im Hinblick auf gesteigerte Produktion und einfachere Reinigung variiert. Zusätzlich zu *E. coli* werden Hefezellen (Lange et al., 2001) und Pflanzen (Longstaff et al, 1998; Strachan et al., 1998) unter Verwendung von geeigneten Expressionssystemen zur Generierung von rAK eingesetzt.

Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die erwähnten Vorteile der rekombinanten Antikörpertechnologie durch Generation unterschiedlicher rekombinanter AK-Fragmente mit verschiedenen Zielsetzungen für die Umweltanalytik genutzt werden. Dies beinhaltet die Konstruktion eines Pyrethroid-spezifischen scFv-Fragments mittels Generierung einer selektiven AK-Bibliothek mit den V-Genen einer bereits etablierten Hybridomlinie (Pullen und Hock, 1995a) und Isolation eines affinen Klons über Phagen-*Display*, um den Nachweis von Pyrethroiden in Umweltproben zu ermöglichen. Pyrethroide (Abb. 2) sind synthetische Insektizide, die primär die Nervenreizleitung bei Insekten und Invertebraten beeinträchtigen (Naumann, 1990b).

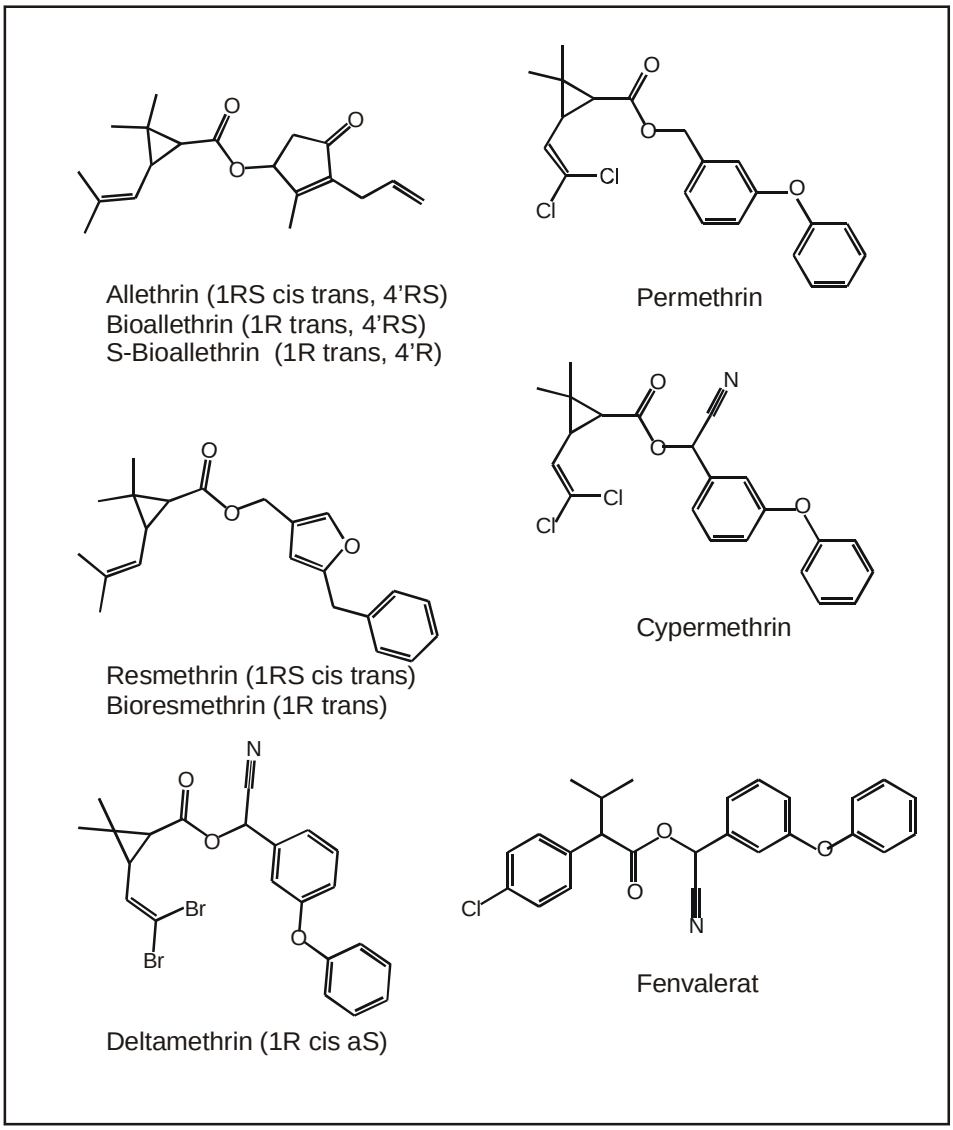


Abbildung 2 Einige wichtige Vertreter der Pyrethroide

Für den Menschen stellt die steigende Anwendung dieser Substanzen (Pullen, 1994) als Pflanzenschutzmittel in geschlossenen Räumen (Naumann, 1990a; Hildebrand, 1992), als Behandlungsmittel von landwirtschaftlichen Produkten (Meister, 1996) und als Medikamente in der Humanmedizin (Taplin et al., 1990; Snodgrass, 1992) eine Beeinträchtigung der Gesundheit dar (Müller-Mohnssen, 1993; Appel und Gericke, 1993). Neben dem Einsatz der klassischen Pestizidanalytik mittels GC, GC/MS oder HPLC (Blaß, 1990) wurden für den Nachweis von Pyrethroiden auch immunchemische Methoden auf Antikörperbasis (z.B. Wing und Hammock, 1979; Wraith et al., 1986; Pullen und Hock, 1995 a,b; Queffelec et al., 1998; Lee et al., 1998b) entwickelt. Jedoch liegen bisher keine Forschungsberichte über rAKs gegen Pyrethroide vor.

Eine weitere Zielsetzung, ein Verfahren zur optimalen Transformation vom scFv- in das F_{ab}-Format bei gleichbleibenden Bindungseigenschaften und im Hinblick auf eine industrielle Verwertung, soll mit der Umklonierung von *s*-Triazin-spezifischen scFv-Fragmenten (Kramer, 2001b) in einen geeigneten Expressionsvektor für *E. coli* realisiert werden. Die Herbizidgruppe der s-Triazine (Abb. 3) zählt zu den selektiv systemischen Photosynthesehemmern (Velthys, 1981; Tietjen et al., 1991) und dient zur Kontrolle von breitblättrigen Unkräutern in verschiedenen Kulturen, vorwiegend Mais.

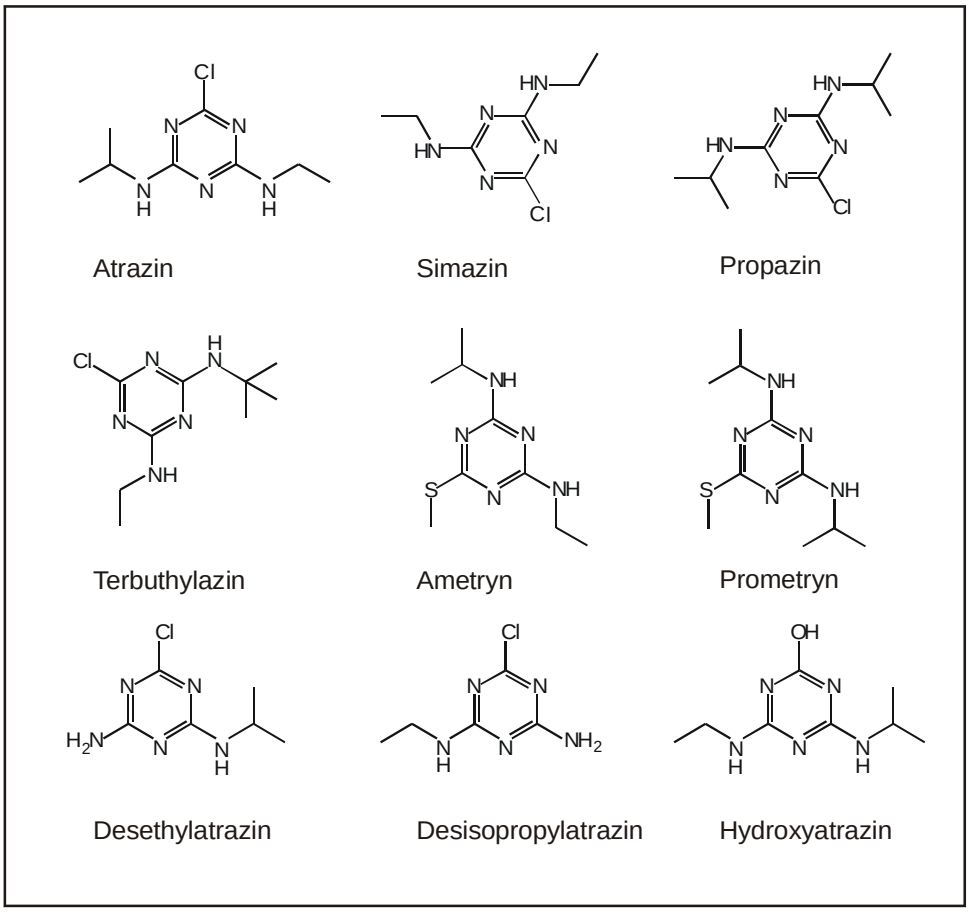


Abbildung 3 Einige wichtige vertreter der *s*-Triazine

Die hohe Persistenz, die weltweite Verbreitung der *s*-Triazine in Boden, Atmosphäre, Oberflächen- und Grundwasser (Thurman und Meyer, 1996; Guzzella et al., 1996; Kramer et al., 2001b) und die damit verbundenen Risiken für Mensch (Roloff et al., 1992; Meisner et al., 1993) und Tier (Simic et al., 1991; Fischer-Scherl et al., 1991) erfordern eine umfangreiche und präzise Triazin-Analytik. In dieser Gruppe fanden die rekombinanten Antikörper neben etablierten Immunoassays mit mAK (z.B. Karu et al., 1991; Giersch et

al., 1993) und pAK (z.B. Wittmann und Hock, 1989; Harrison et al., 1991) bereits Einzug (z.B. Ward et al., 1993; Kramer und Hock, 1996b; Strachan et al., 1998). So beschränken sich die folgenden Arbeiten mit diesen Herbiziden auf genetische Veränderungen von existierenden AK-Fragmenten, wie die Umklonierung von scFv-Fragmenten und die Konstruktion eines bifunktionellen AK-Fragments mit Marker-Funktion. Mittels Fusion des Enzym-Gens alkalische Phosphatase an ein Atrazin-spezifisches scFv-Fragment (Kramer und Hock, 1996a) entsteht nach funktioneller Expression in *E. coli* ein AK-Molekül sowohl mit Hapten-Bindungsaffinität als auch mit Enzymaktivität. Dadurch läßt sich der Einsatz von Immunoassays in der Umweltanalytik vereinfachen, da die Zugabe von konventionell Enzym-markierten Sekundärantikörpern entfällt. Das generierte Kassettensystem sollte derartig gestaltet sein, daß ein Austausch von AK-Fragmenten und somit die Anwendung auf andere Analyten erfolgen kann.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Reagenzien

Acrylamid 30 %	Roth, 3029.1
Agarose NEEO	Roth, 2267.1
Agarose 50-1000 bp	Roth, K297.1
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, 9592.3
Ampicillin	Boehringer Mannheim, 835242
Anhydrotetracyclin	Acros, 233131000
Avidin	Sigma,
Bacto Agar	DIFCO, 0140-01
Bacto Tryptone	DIFCO, 0123-17-3
Bacto Yeast extract	DIFCO, 0127-17-9
Bicinchoninsäure	Sigma, B-9643
Bromphenol-Blau	Sigma, B-3269
Chloramphenicol	Sigma, C-7795
Chloroform-Isoamyl-Alkohol	Amresco, X205
1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl)-carbodiimidmetho-4-toluolsulfonat (CMC)	Sigma,C-1011
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, D-5758
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, D- 4254
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, D-8779
di-Natrimhydrogenphosphat-dodecahydrat	Merck, 1.06579
Desthiobiotin	Sigma, D-1411
EDTA	Sigma, E-5134
Eisessig	Sigma, A-6283
Ethanol abs.	Serva, 11093
Ethidiumbromid	Sigma, E-8751
Formaldehyd 37 %	Fluka, 47629
D(+)-Glucose	Sigma, G-5400
Glutamin	Sigma, G-7513
Glycin	Roth, 3908.3
Glycerol	Sigma, G-5516

Glycogen	Pharmacia, 27-9254E
Harnstoffperoxid	Calbiochem, 666121
Hexamincobalt(III)chlorid	Sigma, H-7891
Hühnerovalbumin	Sigma, A-5378
4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure (HABA)	Sigma, H-5126
Isopropanol	Sigma, I-9516
Isoproyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma, I-9003
Kalciumchlorid	Sigma, C-3306
Kaliumchlorid	Sigma, P-4504
Kanamycin	ICN, 70560-51-9
Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat	Sigma, C-2284
Magermilchpulver	Reformhaus
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Sigma, M-0250
Magnesiumsulfat	Sigma, M-7506
Manganchlorid-4-Hydrat	Sigma, M-3634
2-Mercaptoethanol	Sigma, M-6250
Mineralöl	Sigma, M-5904
Natriumacetat	Sigma, S-8625
Natriumcarbonat, wasserfrei	Fluka, 71355
Natriumchlorid	Merck, 1.06404
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, L-4509
Natriumhydrogencarbonat	Merck, 1.06329
Natriumhydroxid	Merck, 1.06498
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, 104-0
ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck, 1.00552
Penicillin G	Sigma, PEN-K
Phenol-Chloroform	Roth, A156.1
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma, P-5413
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, A-7906
Salzsäure min. 37 %	Riedel-de Haen, 30721
Schwefelsäure 95-97 %	Merck, 1.00807
Silbernitrat	Riedel-de Haen, 10220
TEMED	Roth, 2367.3
3,3’, 5,5’-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma, T-2885

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, T-8524
Trypanblau	Sigma, T-6146
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Serva, 37470
Wasser, 18 Megohm (Dnase-+ Rnase-frei)	Sigma, W-4502
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, 1.08597

Alle nicht aufgeführten Chemikalien besaßen ebenfalls Analysen-Qualität und wurden bei den Firmen Merck und Sigma bezogen.

1.2 Immunreagenzien

Anti-E-*Tag*-IgG	Amersham, 27-9412-01
Anti-E-*Tag*-HRP-Konjugat	Amersham, 27-9413-01
Hybridomlinien 1/A5-7/C10, 3/B4-1/F8	Dr. Sabine Pullen, TU-Erlangen
Streptavidin-POD	Roche, 1089153
Ziege-anti-Maus-POD-Konjugat (polyvalent)	Sigma, A-8924
Ziege-anti-Maus-POD-Konjugat (Fc-spezifisch)	Sigma, A-0186

1.3 Probenpuffer, DNA- und Proteinmarker

DNA-Marker

Marker II	Eurogentec, MW-0020-10
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, SM0243
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3	MBI Fermentas, SM0193

Molekulargewichtsmarker

Roti-Marker 10-100	Roth, P-050.1

Probenpuffer

6x Mass Loading Dye Solution	MBI Fermentas, R0621
Puffer Roti-Load1 4x konz., red.	Roth, 929.1

1.4 Molekularbiologische Reagenzien

First-strand cDNA Synthesis Kit	Pharmacia, 27-9261-01
Gene amp-PCR-Core Kit	Perkin Elmer, N8080009
QiagenExII	Qiagen, 20051
Qiagen Plasmid Purification Mini Kit	Qiagen, 12125

QIA prep Spin M13 Kit		Qiagen, 27704
Quick Prep mRNA Purification Kit		Pharmacia, 27-9254-01
Restriktionsenzyme:	*Eco*47 III	MBI Fermentas, ER0321
	*Eco*91 I (*BstE* I)	ER039
	Hind III	ER0501
	Nde I	ER0581
	Nco I	ER0571
	Pst I	ER0611
	Sac I	ER1131
	Sal I	ER0641
	Xba I	ER0681
	Xho I	ER0691
	Not I	Eurogentec, RE 1800-10
	Sfi I	RE 1970-10
T4 DNA-Ligase		New England Biolabs, 202S

Die jeweils optimalen Puffer für die Enzyme werden vom Hersteller mitgeliefert.

1.5 Klonierungsmaterial und Bakterienstämme

Expressionsvektoren:	pASK 75 pASK 99	Prof. Dr. A. Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München, Freising
Klonierungsvektor pPHOA 4		Dr. C. Schmidt-Dannert, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart
Phagemidvektor pCANTAB 5E		Pharmacia, Freiburg
M13K07 Helferphagen		New England Biolabs, N0315S
scFv-Antikörper-Gene:		Dr. Karl Kramer, Lehrstuhl für Botanik
	K47H	Wissenschaftszentrum Weihenstephan,
	IPR-7, IPR-23, IPR-53	TU-München, Freising

E. coli-Bakterienstämme:

DH5α^+	GifcoBRL
JM83	Dr. K. Kramer, Lehrstuhl für Botanik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München, Freising
TG1	Pharmacia, Freiburg
CJ236	New England Biolabs

1.6 Pyrethroide, *s*-Triazine und deren Konjugate

Pyrethroide:

Allethrin	Ehrensdorfer, C 101000
Bioallethrin	C 106100
S-Bioallethrin (Esbiol)	C 132100
trans-Permethrinsäure-OVA-Konjugat (t-PMA-OVA)	Dr. Sabine Pullen, TU-Erlangen

s-Triazine

Ametryn	Ehrensdorfer, C 101500
Atrazin	C 103300
Desethylatrazin	C 103310
Desisopropylatrazin	C 103203
Propazin	C 164400
Simazin	C 169500
Terbuthylazin	C 173000
Dichloratrazin	C 103410
Dichlorsimazin	C 103478
4-Chlor-6-isopropylamino-1,3,5-triazin-2-aminohexan -OVA-Konjugat (IPR-OVA)	Dr. K. Kramer, Lehrstuhl für Botanik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München, Freising

Die Stammlösungen der einzelnen Pyrethroide wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Methanol:Aceton (12:88, v/v)-Gemisch angesetzt. Die *s*-Triazine wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst; die Stammlösung von Simazin wurde in DMF in einer Konzentration von 0,1 mg/ml angesetzt.

1.7 Oligonukleotidprimer

Alle Primer wurden von der Firma Eurogentec, Belgien; synthetisiert.

Tabelle 1 Primer für Fusionsprotein scFv-aP

Name	**Sequenz 5'-3'**
PHOABACK	CGATAGTCGACCGGACACCAGAAATGCCTGTTC
PHOAFOR	AGCATAGCGCTCATGGTGTAGAAGAGATCGGTC
scFvBACK	GTTAGGCCTTGGCCCAGCCGGCCATGGC
scFvFOR	CTAGTCGACTGCGGCCGCCGTTTGATTTC
pASK75-P1	GTGGCACTGGCTGGTTTCGC
pASK75-P2	GATCCGTGACGCAGTAGCGG
PHOA-X1	CGTGGCATCCTGCAACTCTGCG
PHOA-X2	CCCAACGATTCTGGAAATGGC
PHOA-X3	GATCCTGTTTATCGATTGACGC
PHOA-X4	CAACCCTGGCGCAGATGACCG

Tabelle 2 Primer für Konstruktion des scFv 4H/41

Name	**Sequenz 5'-3'**
VH1BACK	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
VH1FOR2	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC
VK2BACK	GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA
MJKFONX-Mix	
MJK1FONX	CCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC
MJK2FONX	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
MJK4FONX	CCGTTTTATTTCCAACTTTGTCC
MJK5FONX	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
VH1BACKSfiI	GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTS MARCTGCAGSAGTCWGG

Tabelle 2 (Fortsetzung)

JKNotI-Mix	
JK1NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC
JK2NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
JK4NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTTATTTCCAACTTTGTCCC
JK5NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
LinkBACK	GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
LinkFOR	TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTC
PCANTAB-S1	CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC
PCANTAB-S3	GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG
PCANTAB-S4	CCAGAGCCACCTCCGCCTGAACC
PCANTAB-S6	GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG
KUNKDEL	GTAAATATTTTGGCTGGC

M= A oder C, R= A oder G, S= C oder G, W= A oder T, Y= C oder T

Tabelle 3 Primer für Fab-Subklonierung

Name	**Sequenz 5'-3'**
V_HSUBFabBACK*	CAGGTGAAACTGCAGSAGTCWGG
V_HSUBFabFOR*	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTSCC
V_LSUBFabBACK*	GACATYGAGCTCACYCAGTCTCCA
V_LSUBFabFOR*	CAGTTTSAKCTCGAGCTTGGTSCC
SEQU1	AGACAGCTATCGCGATTG
SEQU2	TCCCTCCGACCTCTGAC
SEQU3	CACTGGCACTCTTACCG
SEQU4	CAGCGTTTACACGCGG

* Kramer et al. (2001a)

Alle Primer lagen in lyophilisierter Form vor. Die Konzentration je Primer wurde mit H_2O* auf 100 pmol/µl eingestellt.
Die Primer-Mischungen MJKFONX-Mix und JKNotI-Mix sind äquimolare Gemische aus den zugehörigen Primern.

1.8 Medien und Puffer

TES-Puffer

0,2 M Tris-HCl (pH 8,0)
0,5 mM EDTA
0,5 M Saccharose

1.8.1 Zellkulturmedium

Fötales Kälberserum (FCS)	Bioconcept
RPMI 1640 mit Hepes (25 mmol/L)	GifcoBRL, 13018-023

Normalmedium (NM)

500 m RPMI 1640 mit Hepes
55 ml FCS
5,5 ml 200 mM Glutamin
5,5 ml 10^3 M Mercaptoethanol-Lösung (50 ml Mercaptoethanol ad 76 ml H_2O, frisch hergestellt)
NM bei –20 °C lagern.

1.8.2 Medien und Agar zur Bakterienkultur

Ampicillin (Amp)

20 mg in 1 ml H_2O dest. lösen und mit 0,2 µm Filter sterilfiltrieren.

Chloramphenicol (Cm)

30 mg in 1ml Ethanol lösen.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium), pH 7,0

10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Yeast
10 g NaCl
ad 1000 ml H_2O dest., autoklavieren.

LB-Amp-Medium

100 µg/ml Ampicillin zu LB-Medium geben.

LB-Amp-Agar

15 g/l Bacto-Agar zu LB-Medium geben, autoklavieren.

Nach Abkühlen die Flüssigkeit mit 100 µg/ml Ampicillin versetzen und in sterile Petrischalen gießen.

LB-Amp-Cm-Medium

100 µg/ml Ampicillin

15 µg/ml Chloramphenicol

zu LB-Medium geben.

LB-Amp-Cm-Agar

15 g/l Bacto-Agar zu LB-Medium geben, autoklavieren.

Nach Abkühlen die Flüssigkeit mit 100 µg/ml Ampicillin und 15 µg/ml Chloramphenicol versetzen und in sterile Petrischalen gießen.

M9-Agar

(I) 5x M9 Salzlösung**:**	(II) Agar
2,5 g NaCl	200 ml 5x M9 Salzlösung
5 g NH_4Cl	2 ml 1M $MgSO_4$
64 g Na_2HPO_4	0,1 ml 1M $CaCl_2$
15 g KH_2PO_4	20 ml 20 % Glucose
ad 1000 ml H_2O dest.	15 g Agar
	ad 1000 ml H_2O dest., autoklavieren

Nach Abkühlen die Flüssigkeit mit 400 µl Thiaminhydrochlorid (sterilfiltriert) versetzen und in sterile Petrischalen gießen.

2xYT-Medium

17 g Bacto-Trypton

10 g Bacto-Yeast-Extract

5 g NaCl

ad 1000 ml H_2O dest., autoklavieren.

2xYT-AmpGlu-Medium

100 µg/l Ampicillin

55,6 ml/l 2M Glucose-Lösung (sterilfiltriert)

zu 2xYT-Medium geben.

SOB-Medium, pH 7,0

20 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Yeast-Extract

0,5 g NaCl

10 ml 250 mM KCl-Lösung

ad 1000 ml H_2O dest.

Nach Autoklavieren Lösung mit 5 ml 2M $MgCl_2$-Lösung (autoklaviert) versetzen.

SOB-Agar

30 g/l Bacto-Agar zu SOB-Medium geben, autoklavieren.

Nach Abkühlen die Flüssigkeit in sterile Petrischalen giessen.

SOBAmpGlu-Agar

100 µg/ml Ampicillin

55,6 ml 2M Glucose-Lösung (sterilfiltriert)

ad 1000 ml SOB-Agar

Die Flüssigkeit in sterile Petrischalen giessen.

SOC-Medium

10 ml 2M Glucose-Lösung (sterilfiltriert)

5 ml 2M $MgCl_2$-Lösung (autoklaviert)

100 µg/ml Ampicillin

ad 1000 ml SOB-Medium.

1.8.3 Pufferlösungen für ELISA

Pico Luminol/Enhancer Solution	Pierce, 1856155
Pico Stable Peroxide Solution	Pierce, 1856156

Carbonatpuffer, 50 mM, pH 9,6

50 mM Na2CO3

50 mM $NaHCO_3$

500 ml gelöstes $NaHCO_3$ vorlegen; pH 9,6 mit gelöstem Na_2CO_3 einstellen.

PBS (Phosphate buffered saline) 80 mM, pH 7,4

10 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$

70 mM Na_2HPO_4

145 mM NaCl

PBS-Waschpuffer

100 ml PBS (80 mM, pH 7,4)

900 ml H_2O dest.

0,5 ml Tween 20

TBS (Tris buffered saline), 50 mM, pH 7,2

50 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 mM $MgCl_2$

10 mM $NaCl_2$

TBS-Waschpuffer

100 ml TBS (50 mM, pH 7,2)

900 ml H_2O dest.

0,5 ml Tween 20

aP-Substratpuffer, 70 mM, pH 9,8

70 mM Diethanolamin

aP-Substrat

0,5 mg *p*-Nitrophenylphosphat/ml aP-Substratpuffer

POD-Substrat

(I) Chromogenlösung

1,2 mM TMB

8 mM H_3PO_4

12 mg/l Penicillin G

10 % DMSO

(II) Substratpuffer

3,5 mM $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$

132 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$

3 mM Harnstoffperoxid

Unmittelbar vor Gebrauch 1 Teil Lösung (I) mit 2 Teilen Lösung (II) mischen.

1.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Laufpuffer für Elektrophorese

3,5 mM SDS
25 mM Tris/HCl
190 mM Glycin

SDS-Polyacrylamid-Gel

Trenngel	Sammelgel
3,5 ml Acrylamid 30%	660 µl Acrylamid 30%
2,59 ml H_2O dest.	2,75 ml H_2O dest.
3,75 ml Tris/HCl (1 mol/l, pH 8,7)	500 µl Tris/HCl (1mol/l, pH 6,8)
90 µl SDS (10%)	40 µl SDS (10%)
70 µl APS (200 mg/ml)	24 µl APS (200 mg/ml)
4 µl TEMED	4 µl TEMED

Lösungen für die Silbernitrat-Färbung

(I) Fixierlösung	(II) Thiosulfatlösung	(III) Silbernitratlösung
100 ml Eisessig	200 mg $Na_2S_2O_3$	2 g $AgNO_3$
400 ml EtOH	ad 1000 ml H_2O dest.	200 µl CH_2O (37%)
ad 1000 ml H_2O dest.		ad 1000 ml H_2O dest.

(IV) Entwicklerlösung	(V) Stoplösung
30 g Na_2CO_3	5 g Glycin
~ 40 µg $Na_2S_2O_3$	ad 1000 ml H_2O dest.
500 µl CH_2O (37%)	
ad 1000 ml H_2O dest.	

10x Transferpuffer für Westernblot (ph 8,3)

390 mM Glycin
480 mM Tris
0,37 % SDS

POD-Substrat für Westernblot

(I)Substratpuffer (pH 3,8)	(II)TMB Stammlösung	(III)H_2O_2 Lösung
200 mM KH_2-Citrat	0,375 g TMB	3,3 ml H_2O_2 30 %
1 mM Sorbinsäure	5 ml DMSO	ad 100 ml H_2O dest.
	ad 25 ml Methanol	

1 % Dextransulfat in Lösung (I) lösen und unmittelbar vor Gebrauch 500 µl Lösung (II) und 100 µl Lösung (III) zugeben.

1.8.5 DNA-Gelelektrophorese

Agarose-Gel

0,7-1,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (s.u.) durch Erhitzen lösen.
Nach Abkühlung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) versetzen.

50x-TAE-Puffer, pH 8,0

242g Tris
57,1 ml Eisessig
20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
ad 1000 ml H_2O dest.

1.8.6 Streptavidin-Affnitätschromatographie

(I) Laufpuffer	**(II) Elutionspuffer**	**(III) Regenerationspuffer**
100 mM Tris/HCl, pH 8,0	2,5 mM Desthiobiotin	5 mM HABA
150 mM NaCl		
1 mM EDTA		

(II) und (III) jeweils in (I) lösen.

1.8.7 Puffer für BIAcore-Messungen

Amine Coupling Kit	Biosensor, BR-1000-50
PBS Tablets	Sigma, P-4417

Elutionspuffer, pH 2,8

1,5 M Glycin/HCl

1.9 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen (1,5–2 ml)	Nalgene
Dialyseschlauch SpectraPor CE	Roth
Flusszelle IFC	BIAcore
Glaspipetten (10 ml)	Pyrex
Mikrotiterplatten	Greiner
(F-Form, Bindungsaffinität hoch)	
PCR-Gefäße (0,5 ml)	Sarstedt
PCR-Pipettenspitzen	Gilson
CP 10 (0,5-10 µl)	
CP 100 (10-100 µl)	
Petrischalen (Ø 8,5 cm), (Ø 14,5 cm)	Greiner
Pipettenspitzen	
1-50 µl, 10-1000 µl	Sarstedt
0,1-10 µl	Gilson
Plastikpipetten (50 ml)	Greiner
Schnappdeckelgefäße	Eppendorf
(600 µl, 1,5 ml, 2 ml)	
Sensor Chip CM5	Biacore, 0344
Skalpellklingen	Bayha
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Sartorius
Zellkulturflaschen (25, 225 cm^2)	Renner
Zentrifugenröhrchen (30 ml, 50 ml)	Falcon, Sorvall
Zentrifugenbecher (250 ml)	Sorvall

1.10 Geräte

BIO-RAD Econo System	BIO-RAD, München
Biosensor BIAcore ^{TM} 2000	BIAcore, Uppsala, Schweden
Brutschrank, BB 6220 CU	Heraeus, Osterode
Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer GNA 100, 200	Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer BlueVertical 100/C	Serva, Heidelberg
Elektrophorese-Spannungsversorgung	Pharmacia, Freiburg
Elektroporationsgerät Easyject one	Equibio, Erlangen

Horizontalschüttler KL2	E. Bühler, Tübingen
Inkubationsschüttler G24/25	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kamera Camag Reprostar	Polaroid, Massachusetts, USA
Mikroprozessor pH Meter ph 535, MultiCal	WTW, Weilheim
Mikrotiterplatten-Waschautomat 96PW	SLT, Crailsheim
PCR-Express	Hybaid, Heidelberg
Photometer LP 300	DR Lange, Berlin
Pipetten Pipetman (10, 100, 1000 µl)	Gilson, Langenfeld
Reader SPECTRAFlour Plus	Tecan, Crailsheim
Rührzelle 8010	Amicon, Lexington
mit Membran XM 10.000, 50.000 MW	Filtron, Karlstein
Sterilbank Clean Air CA/RE 4	Haan, Kaarst
Tank Blot Spannungsversorgung Power Supply Model 250/2.5	BIO-Rad, München
Tank Blot System Trans Blot™ Cell	BIO-Rad, München
Umkehrmikroskop, Wilovert II	Wild-Leitz, München
Verdrängungspipetten Microman (10, 100 µl)	Gilson, Langenfeld
Wasserbad Thermostat 2761	Eppendorf, Hamburg
NK 22	Haake, Berlin
Zentrifuge Sorvall RC-5B	DuPont Instruments, Wiesbaden

2 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden etablierte Standardtechniken der Molekularbiologie für unterschiedliche Zielsetzungen benutzt. Diese Verfahren umfassen im Wesentlichen die Amplifikation von DNA-Sequenzen, den Restriktionsverdau von Vektoren und Insertionen, die Ligation von Vektor-DNA mit Antikörpergenen und die Transformation von *E. coli* mit rekombinierten Vektoren über die $CaCl_2$-Methode oder Elektroporation, daneben die Analyse und Präparation von DNA in der Gel-Elektrophorese, die Reinigung und Präzipitation von DNA sowie die Analyse von Expressionsprodukten im SDS-PAGE und Westernblot. Sofern die einzelnen Methoden nicht näher aufgeführt sind, wird sich auf die in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Techniken bezogen.

2.1 Konstruktion eines Pyrethroid-spezifischen scFv-Antikörperfragments

2.1.1 scFv Phagen-System

Wesentliche Schritte des scFv Phagen Systems sind in den Abbildungen 4a und b dargestellt. Abbildung 4a (S. 30) zeigt die Konstruktion des scFv-Fragments aus mRNA und die Ligation mit dem Phagemid pCANTAB 5E. Die Methodik des Phagen-*Display*s wird in Abbildung 4b (S. 31) präsentiert.

Als mRNA-Quelle dienen Hydridomzellen bzw. Populationen von B-Lymphozyten, die Antikörper sezernieren. Im Anschluß an die mRNA-Isolierung und die cDNA-Erststrangsynthese werden die variablen Regionen der Leicht- und Schwerketten selektiv über PCR amplifiziert. Die entsprechenden Amplifikate lassen sich elektrophoretisch auftrennen und isolieren. Da Heterodimere aus den variablen Leicht- und Schwerkettenregionen aufgrund fehlender intermolekularer Disulfidbrücken zur Dissoziation neigen, werden die DNA-Fragmente in einer zweiten PCR über eine DNA-Linkersequenz zusammengefügt, die für $(Gly_4Ser)_3$ codiert. In einer abschließenden PCR werden die korrekt zusammengefügten scFv-Gene amplifiziert und zugleich durch die Primer mit einer *Sfi* I-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *Not* I-Schnittstelle am 3'-Ende versehen. Nach Isolierung über eine Gelelektrophorese und anschließendem Verdau mit den Restriktionsenzymen (RE) *Sfi* I und *Not* I, werden die scFv Fragmente mit dem Phagemid pCANTAB 5E ligiert.

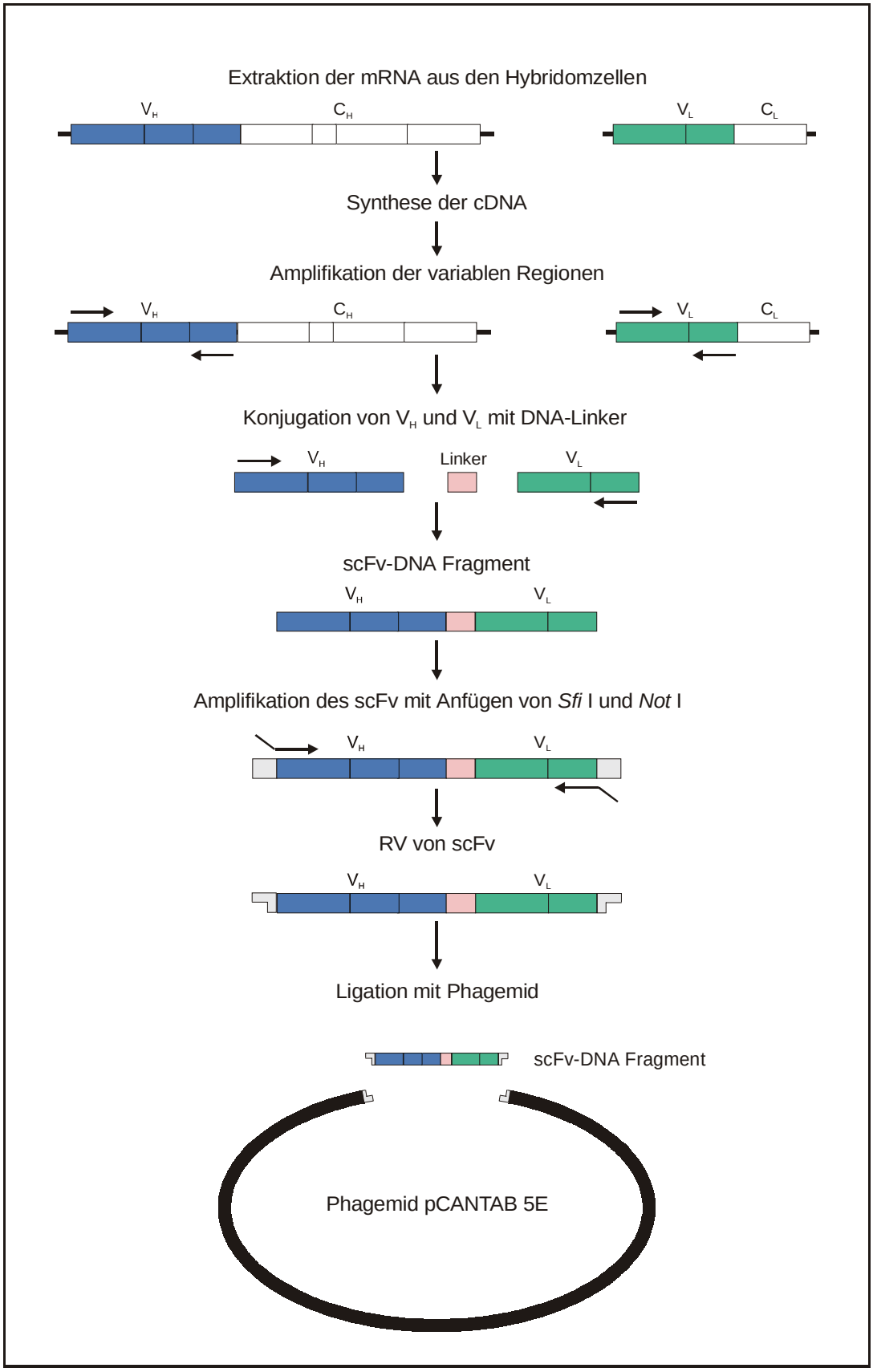


Abbildung 4a Klonierungsschema des scFv-Fragments in pCANTAB 5E

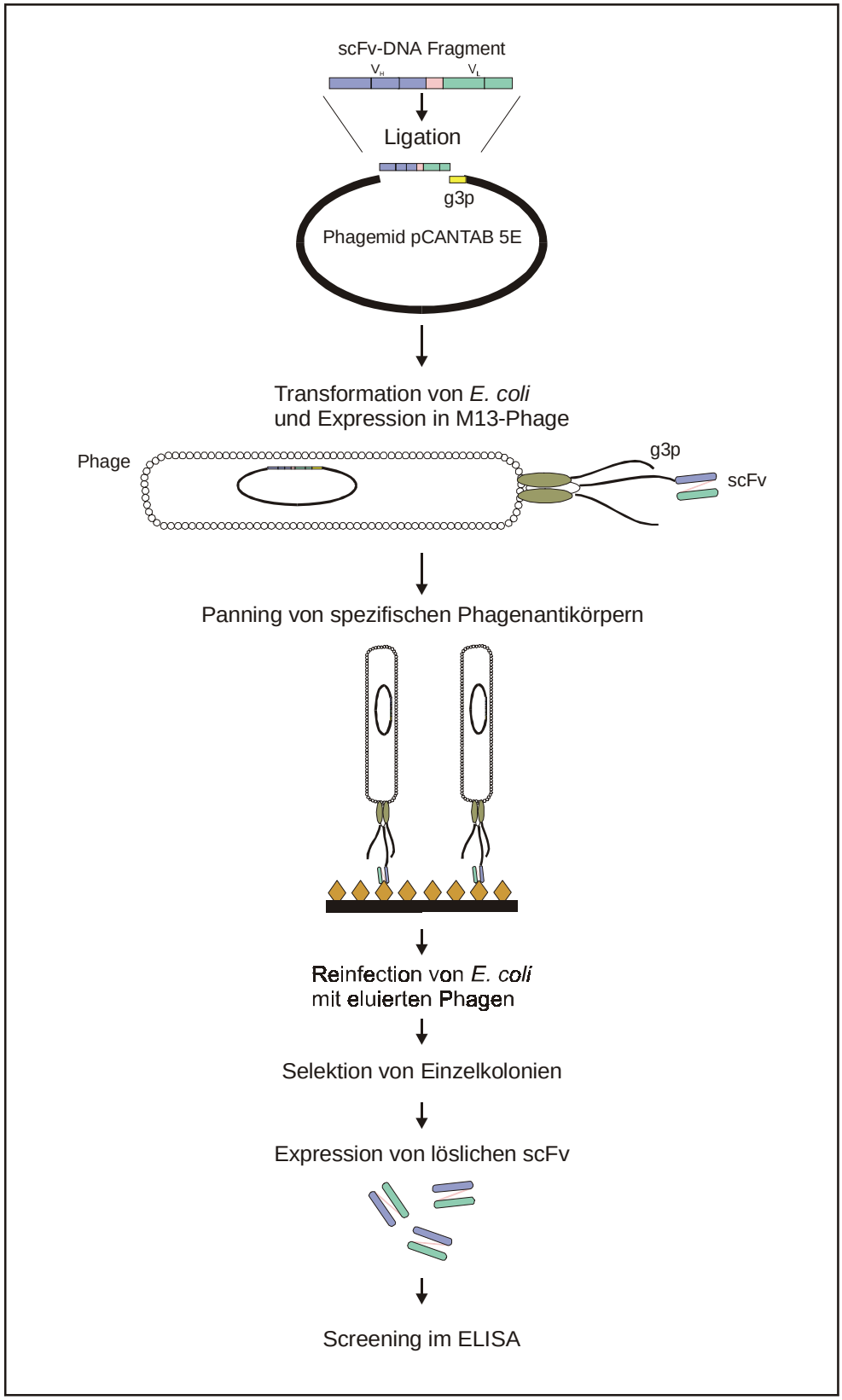


Abbildung 4b Schema des Phagen-*Display*s

Das Phagemid (Abb. 5) ist in der Weise konstruiert, daß das scFv-Gen *upstream* zu einer verkürzten Form des C-terminalen Teilstücks des Gen*III* (fd gene 3) inseriert wird, das für das kleinere Oberflächenprotein pIII von Bakteriophagen codiert. Auf diese Weise erhält man ein scFv-pIII Fusionsgen. Die Transkription dieses Gens steht unter der Kontrolle des induzierbaren *lac* Promoters (P_{lac}), der durch den lac Iq Gen codierten *lac* Repressor reguliert wird. Die Signalsequenz des g3p-Leaders leitet den Transport des Proteins in das Periplasma von *E. coli*, wo es durch die g3p Hauptdomäne an die Spitze des Phagen integriert wird. Weiterhin enthält der Vektor die codierende Sequenz für das Peptid E-*Tag*, welches im ELISA oder bei der Proteinaufreinigung über die Affinitätsreaktion mit dem spezifischen Anti-E-*Tag*-Antikörper Verwendung findet. Die Translation des scFv-E-*Tag* Gens wird durch das Amber Stop-Codon terminiert. In der *E. coli* Suppressor-Linie TG1 wird dieses Stop-Codon teilweise überlesen. So werden scFv-g3p Fusionsproteine produziert und an der Phagenoberfläche präsentiert. Zusätzlich zum Ampicillinresistenz-Gen (Amp^r) befinden sich die Replikationsstartstellen des M13 Phagen (M13 ori) und des *E. coli* Plasmids (ColE1 ori) auf der Vektor-DNA.

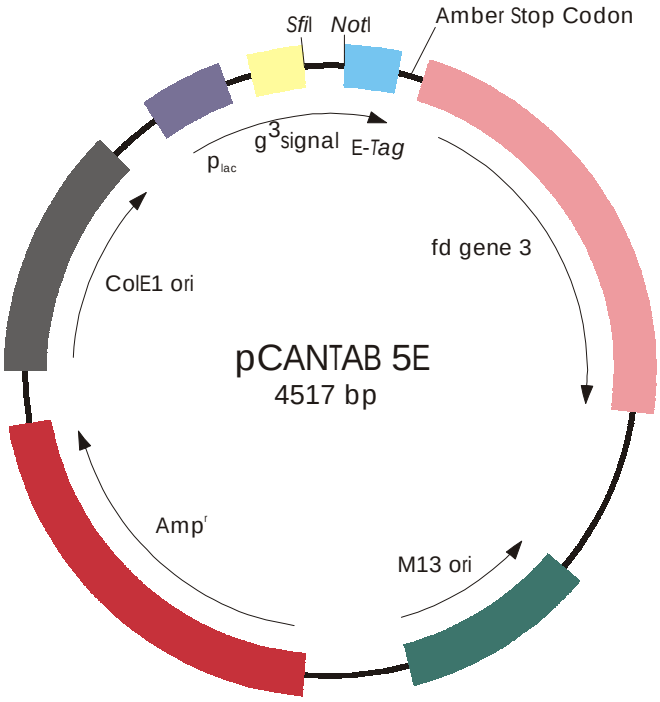


Abbildung 5 Phagemidvektor pCANTAB 5E

Nach Insertion des scFv-Gens in pCANTAB 5E transformiert man kompetente *E. coli* TG1 mit dem rekombinanten Phagemid.

Das scFv-Gen*III* Fusionsgen wird nachfolgend über eine Superinfektion der transformierten Bakterienzellen mit M13KO7 Helferphagen isoliert. Die Induktion mit IPTG initiiert die Synthese kompletter rekombinanter Phagenpartikel, die aus dem Periplasma der Bakterienzellen in den Kulturüberstand abgegeben werden. Diese Phagen tragen das einzelsträngige Phagemid, das für das scFv-pIII Fusionsprotein codiert. Das entsprechende scFv wird an der Phagenoberfläche präsentiert, wobei das pIII-Teilstück als integraler Bestandteil in der Phagenhülle verankert ist. Spezifische Phagen lassen sich über haptenbeschichtete Festphasen selektieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dafür das *Panning* verwendet. Bei dieser Selektionsmethode wurden die Phagen in haptenbeschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Spezifische Phagen binden über das präsentierte scFv an das immobilisierte Hapten, während sich ungebundene Phagen durch Spülen mit Waschpuffer entfernen lassen. Anschließend werden *E. coli* TG1 Zellen mit den selektierten Phagen infiziert und auf Selektionsmedium ausplattiert, um Einzelkolonien zur Expression von löslichen scFv zu erhalten. Die Spezifität der individuellen scFv-Klone wird im Enzymimmunoassay über Verdrängung mit dem Hapten bestimmt. Positive Klone werden sequenziert und die Antikörperfragmente affinitätschromatographisch aufgereinigt.

2.1.1.1 Isolierung von mRNA

Hybridomzellen wurden als mRNA-Quelle verwendet. Die Zellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1/F8, die monoklonale Antikörper gegen die Pyrethroide Bioallethrin bzw. S-Bioallethrin produzieren (Pullen und Hock, 1995a), wurden in Kultur genommen. Die erforderlichen Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Normalmedium im Brutschrank bei 37 °C, 95% Luftfeuchte und 5% CO_2 zur Stabilisierung des pH-Wertes im Kulturmedium. Alle 2-3 Tage erfolgte in der Regel ein Mediumswechsel. Drei große, gut bewachsene Zellkulturflaschen (225 cm^2) je Zellinie wurden zur Isolierung der mRNA verwendet, wobei eine Vitalität von über 90 % der gesamten Zellmenge wünschenswert war. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit Trypanblaufärbung bestimmt. Hierbei wurden die Zellen 1:10 in einer Trypanblaulösung verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter

einem Mikroskop ausgezählt. Die Zahl der lebenden Zellen wurde unter dem Ausschlußprinzip, d.h. keine Anfärbung der vitalen Zellen, bestimmt.

1. Zentrifugation von $5x10^6$ vitaler Hybridomzellen in Ausschwingrotorzentrifuge bei 4000 rpm und RT für 5 min
2. Resuspension der Zellen in 20 ml RPMI 1640 und anschließende Zentrifugation bei 4000 rpm und RT für 5 min

Zellrückstand auf Eis geben.

3. Extraktion der mRNA mit QuickPrep mRNA Purification Kit von Pharmacia.
   Die polyadenylierte mRNA wird hierbei nach Zellausschluß über poly(dT) Säulen affinitätschromatographisch isoliert.

Extraktion der mRNA

1. Resuspension des Zellrückstands mit 1,5 ml Extraktionspuffer (vollständig gelöst bei RT)
2. Hinzufügen von 3 ml Elutionspuffer und gründlich mischen
3. Zentrifugation bei max.Rotorgeschwindigkeit (z.B. in Sorvallzentrifuge RC-5B) bei RT für 5-10 min

Isolation der mRNA

1. Übertrag von 4 ml des Überstands auf die präparierte Oligo(dT)-Cellulose Spun Säule
   Verschließen der Säule und Invertieren für 10 min zum Mischen des Extraktes mit dem Säulenmaterial
2. Zentrifugation bei 350x g und RT für 2 min
3. Entfernen des Überstands und Zugabe von 3 ml Hochsalzpuffer
   Verschließen der Säule und Resuspension der Matrix durch vorsichtiges Mischen
   Säule in 15 ml-Zentrifugenröhrchen stellen und Zentrifugation wie (2)
4. 2x Wiederholung von (3)

5. Entfernen des Überstands und Zugabe von 3 ml Niedrigsalzpuffer
   Verschließen der Säule und Resuspension der Matrix durch vorsichtiges Mischen
   Säule in 15 ml-Zentrifugenröhrchen stellen und Zentrifugation wie (3)
6. Entfernen des Überstands und des Bodenverschlusses der SäuleZugabe von 3 ml Niedrigsalzpuffer und Zentrifugation wie (2)
7. Säule in steriles 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß stellen und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen geben
   Elution der gebundenen poly(A)+-DNA durch 3x Waschen mit je 0,25 ml Elutions-puffer (vorgewärmt auf 65 °C) und Zentrifugation wie (2)
8. Präzipitation der mRNA im Eluat (0,75 ml) unter Zugabe von 75 µl Kaliumacetat (2,5 mM pH 5,0), 10 µl Glycogen (10 mg/ml Glycogen in DEPC behandeltem H_2O dest.) und 1 ml eiskaltem Ethanol (95%) und Inkubation bei –20 °C für mindestens 30 min
9. Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4 °C für 5 min und Entfernen des Überstands Resuspension der präzipitierten RNA in 10 µl DEPC behandeltem H_2O dest

2.1.1.2 Synthese der Erststrang-cDNA

Die isolierte mRNA wird als Matrize zur Synthese der Erststrang-cDNA eingesetzt. Die Reaktion wird mit randomisierten Hexameren initiiert und über die reverse Transkriptase katalysiert. 10 µl poly(A)$^+$-RNA-Extrakt, der aus insgesamt 2,5x10^6 Zellen gewonnen wurde, wurde für die Synthese der Erststrang-cDNA verwendet.

1. Zwei Reaktionen wurden parallel wie folgt angesetzt:

Dithiotreitol (200 mM)	1 µL
Primed first strand mix **	11 µL
H_2O*	16 µL

   **Der *Primed first strand mix* ist Bestandteil des cDNA-Kits und enthält eine Mischung randomisierter Hexamere, dNTPs, reverse Transkriptase sowie reverse Transkriptase-Puffer.
2. Erhitzen von 10 µl mRNA (65 °C, 10 min), kurze Kühlung auf Eis und Zugabe von je 5 µl zu den Reaktionsansätzen aus 1.

3. Inkubation für 1 h bei 42 °C
4. Erhitzen der Ansätze für 3 min bei 100°C und Abkühlung auf Eis
   Lagerung der cDNA bei -20 °C

2.1.1.3 Selektive Amplifikation der V_L- und V_H-Regionen

V_H- und V_L-codierende Nukleotidabschnitte der cDNA wurden über PCR isoliert und amplifiziert, wobei die Erststrang-cDNA als Template diente.

Amplifikation von V_H

Folgendes Reaktionsgemisch wurde angesetzt:

Tabelle 4 PCR-Ansatz zur Amplifikation der V_H-Region

Komponente	**Volumen (µl)**	**Endkonzentration**
10x-PCR-Puffer	10	1x
25 mM $MgCl_2$	6	2,3 mM
dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	8	je 200 µM
VH1BACK**	1	0,1 nM
VH1FOR2	1	0,1 nM
cDNA	x	-
H_2O*	ad 100	-
TaqPolymerase (1:10)	5	2,5 Units

**Die exakten Sequenzen der V_H-spezifischen Primer sind in II, 1.7, Tabelle 2, S.19 verzeichnet.

Ein Kontrollansatz wurde mitgeführt, der H_2O* anstelle der cDNA enthielt.

Das Zeit-Temperatur-Profil (Tab. 5, S. 37) wurde in Abhängigkeit des verwendeten Primerpaares angelegt. Es wurde eine „*Hotstart*-PCR“ (Sambrook et al., 1989) durchgeführt, d.h. die TaqPolymerase wurde während der Anfangsdenaturierung dazugegeben.

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einer Gelelektrophorese (1,5 % Agarosegel) aufgetrennt und die DNA-Banden im Längenbereich zwischen 310 bis 350 Basenpaaren

(Längenvariation der PCR Banden in Abhängigkeit von CDR-Längen der amplifizierten variablen Domänen) aus dem Gel isoliert. Die Reinigung der DNA aus der Agarose erfolgte mit QiaEXII (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

Tabelle 5 Zeit-Temperatur-Profil der PCR zur Amplifikation von V_H aus der cDNA

	Dauer (s)	**Temperatur (°C)**	**Zykluszahl**
Anfangsdenaturierung	180	94	1
3-Schritt-Zyklus			31
Denaturierung	60	94	
Annealing	60	60	
Elongation	90	72	
Endelongation	480	72	1

Amplifikation von V_L

Für die Amplifikation von V_L wurden je 100 pmol des Primers VK2BACK und des Primer-Mixes MJKFONX eingesetzt. Die exakten Sequenzen der V_L-spezifischen Primer sind in II, 1.7, Tabelle 2, S. 19 verzeichnet. Die anderen Substanzen blieben gleich. Die PCR und die nachfolgenden Aufreinigungsschritte erfolgten wie unter Amplifikation der V_H-Regionen beschrieben.

2.1.1.4 Konjugation der V_L- und V_H-Regionen mit DNA-Linker

Die V_L and V_H Amplifikate werden über ein $(Gly_4Ser)_3$-codierendes DNA Linkersegment zusammengefügt. Das Linkergen wurde aus dem scFv-Fragment K411B (Kramer und Hock, 1996a) amplifiziert.

Amplifikation des DNA-Linkers

Der Ansatz der PCR zur Amplifikation des Linkers ist in Tabelle 6 (S. 38) wiedergegeben. Das Zeit-Temperatur-Profil aus II, 2.1.1.3, Tabelle 5 wurde übernommen mit 25 Zyklen und einer Senkung der Annealingtemperatur auf 45 °C. Die PCR und die Gelanalyse (3,5 % Agarosegel) erfolgte wie in 2.1.1.3 beschrieben.

Tabelle 6 PCR-Ansatz zur Amplifikation des Linkers

Komponente	**Volumen (µl)**	**Endkonzentration**
10x-PCR-Puffer	10	1x
25 mM $MgCl_2$	6	2,3 mM
dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	8	je 200 µM
LinkBACK**	1	0,1 nM
LinkFOR**	1	0,1 nM
K411B-Plasmid DNA	x	10 ng
H_2O*	ad 100	-
TaqPolymerase (1:10)	5	2,5 Units

**Die exakten Sequenzen der Linker-Primer sind in II, 1.7, Tabelle 2, S. 19 aufgeführt.

Konjugation der V_H- und V_L-Regionen mit dem Linkerfragment

Die einzelnen DNA-Fragmente wurden in einem äquimolaren Verhältnis zueinander gegeben. Zur Quantifizierung wurde eine analytische Elektrophorese mit einem Agarose (1,5 %)-Gel durchgeführt. Der Konjugationsansatz ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 7 Konjugationsansatz von V_H, V_L und Linker

Komponente	**Volumen (µl)**	**Endkonzentration**
10x-PCR-Puffer	3	1x
25 mM $MgCl_2$	2,8	2,3 mM
dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	10	je 800 µM
DNA: Linker	x	10 ng
V_H	x	70 ng
V_L	x	70 ng
TaqPolymerase (1:10)	5	2,5 Units

Die PCR erfolgte nach II, 2.1.1.3, Tabelle 5, S. 37 mit längerer Annealingzeit von 120 s. Das Reaktionsgemisch wurde in 3 µl-Aliquots aufgeteilt, die in einer weiteren PCR (Tab. 8) zur Amplifikation der zusammengefügten scFv-Fragmente verwendet wurden. Die verwendeten Primer fügten zugleich eine *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle am 5'- sowie eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende des scFv an.

Tabelle 8 PCR-Ansatz zur Amplifikation des scFv-Fragments

Komponente	**Volumen (µl)**	**Endkonzentration**
10x-PCR-Puffer	5	1x
25 mM $MgCl_2$	3	1,5 mM
dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	4	je 200 µM
VH1BACKSfiI**	1	0,1 nM
JK1NotI-Mix**	1	0,1 nM
Template-DNA	3	-
H_2O*	ad 50	-
TaqPolymerase (1:10)	5	2,5 Units

** Die exakten Sequenzen der scFv-Primer mit den Schnittstellen *Sfi* I und *Not* I sind in II,1.7, Tabelle 2, S. 19 verzeichnet.

Die Annealingtemperatur wurde auf 52 °C angesetzt, wobei die anderen PCR-Parameter mit denen aus II, 2.1.1.3, Tabelle 5, S. 37 identisch waren. Die PCR und die anschließende Gelanalyse wurden wie in II, 2.1.1.3 durchgeführt.

2.1.1.5 RV von scFv und pCANTAB 5E

Die scFv-Fragmente und das Phagemid pCANTAB 5E werden für die Klonierung mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I and *Not*I geschnitten, um komplementäre Enden für die nachfolgende Ligation zu erhalten. Da die zwei Enzyme verschiedene Puffer für optimale Bedingungen benötigen, wurde ein sequentieller RV unter Aufstockung der Puffersalze durchgeführt.

Folgende Reaktion mit Phagemid-DNA wurde angesetzt:

Tabelle 9 Sequentieller RV des scFv-Fragments mit den RE *Sfi* I und *Not* I

Komponente	**Stammlösung**	**Endkonzentration**	**Volumen (µl)**
I Puffer M	10x	1x	5
*Sfi*I	10 U/µl	5 U	0,5
DNA (Phagemid)		1 µg	X
H_2O*			ad 50
II Puffer H	10x	1x	5
*Not*I	10 U/µl	5 U	0,5
Tris	1 M	20 mM	2
NaCl	5 M	25 mM	0,5
DNA (Mix aus I)			50
H_2O*			ad 100

Ansatz I wurde mit Mineralöl beschichtet und bei 50 °C für 3 h inkubiert. Nachfolgend wurde Ansatz II unter die Mineralölschicht gegeben und der gesamte RV-Ansatz bei 37 °C für 4 h inkubiert. Die verdaute Phagemid-DNA wurde über ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden aus dem Gel geschnitten und mit QiaEXII (Qiagen) entsprechend dem dazugehörigen Protokoll extrahiert. Die Inkubationszeiten im scFv-RV wurden um 3 h gegenüber des Vektor-RV verlängert, da die Erkennungssequenzen der RE am 5'- bzw. 3'-Ende des scFv-Fragments lokalisiert sind. Zusätzlich wurden die Enzymmengen um 5 U erhöht. Der RV der scFv-Fragmente wurde sonst wie in Tabelle 9 beschrieben ausgeführt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der geschnittenen Fragmente über ein 1,5 %iges Agarosegel und die Aufreinigung der DNA mit QiaEXII (Qiagen).

2.1.1.6 Ligation von scFv-DNA mit dem Expressionsvektor pCANTAB 5E

Das scFv-Fragment, das mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I geschnitten wurde, wird mit dem ebenso präparierten Phagemid pCANTAB 5E durch das Enzym T4-DNA-Ligase ligiert. Pro Ligationsansatz (Tab. 10) werden ca. 500 ng DNA verwendet. Die Vektor-DNA wird in einem molaren Verhältnis von 1:3 zu der scFv-DNA eingesetzt.

Tabelle 10 Ligationsansatz von scFv und pCANTAB 5E

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen (µl)
pCANTAB 5E		125 ng	x
scFv		375 ng	x
H_2O*			ad 8,5
Puffer	10x	1x	1
T4 DNA Ligase	5 Weiss-Units/µl	2,5 Units	0,5

Phagemid- und scFv-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 8,5 µl gemischt. Auch ein Kontrollansatz ohne scFv wurde mitgeführt. Nach einer Inkubation für 5 min bei 45 °C erfolgten die Zugabe von 1 µl 10x Ligase Puffer und 0,5 µl T4-DNA Ligase (2,5 U/µl) auf Eis. Anschließend wurden der Reaktionsansätze über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.1.1.7 Transformation von TG1 Bakterien mit pCANTAB 5E/scFv

Die Transformation von Bakterien des *E. coli* Stammes TG1 wurde mit Elektroporation durchgeführt. Hierbei wird die Zellwand des Bakteriums mit einem Stromimpuls von 2,5 kV durchlässig gemacht. Vor der Elektroporation muß die zu transformierende DNA von Puffersalzen und Enzymen mit Hilfe der Phenol/Chlorform/Isoamyl (PCI)-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation gereinigt werden.

PCI-Extraktion

Hierbei werden Puffersalze aus dem Reaktionsgemisch von der DNA getrennt und Proteine denaturiert. Bei der anschließenden Ethanol-Fällung kann die DNA aus der wässrigen Phase gewonnen und in ein kleineres Volumen aufkonzentriert werden.

1. Zugabe von Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol (25:24:1) in gleichem Volumen wie vorliegender DNA-Mix (in 600 µl-Eppendorf-Gefäß)
2. Mischen mit Vortex bis sich eine Emulsion bildet
3. Zentrifugation bei 4600 rpm (Minizentrifuge 5403, Eppendorf) für 3 min
4. Abzug der wässrigen Phase (obere Schicht) und Transfer in steriles 600 µl-Eppendorf-Gefäß
5. Wiederholung der Schritte (1)-(4) bis kein Protein zwischen organischer und wässriger Phase mehr sichtbar ist

Um Verluste zu vermindern, kann eine Rück-Extraktion mit H_2O* durchgeführt werden [Wiederholung von (1)-(4)].

6. Zugabe von Chloroform:Isoamyl-Alkohol (24:1) in gleichem Volumen und Wiederholung der Schritte (2)-(4)
7. EtOH-Präzipitation

EtOH-Präzipitation

Hierbei wird die DNA präzipitiert und aufkonzentriert.

1. Ansetzen der Reaktion (Tab. 11)

Tabelle 11 Präzipitationsansatz

Komponente	**Stammlösung**	**Endkonzentration**	**Volumen (µl)**
DNA-Mix			x
Glykogen			1
Na-Acetat	250 mM	0,1 Volumina	x
EtOH abs.	100 %	2,2 Volumina	x

2. Inkubation bei –70 ºC für mind. 30 min
3. Zentrifugation bei 15.000 rpm für 15 min (Minizentrifuge 5403, Eppendorf)
4. Abzug des Überstands

5. Zugabe von 1 ml gekühltem EtOH (70 %) zu DNA-Rückstand
6. Zentrifugation bei 15.000 rpm für 5 min
7. Abzug des Überstands und Trocknen des DNA-Rückstands (ca. 15-30 min)
8. Kurzes Erwärmen im Wasserbad bei 60 ºC, um den DNA-Rückstand von der Gefäßwand zu lösen
9. Lösen des DNA-Rückstands in 5-10 µl (je nach DNA-Menge) H_2O*

Elektroporation

Das Pipettieren erfolgt auf Eis mit sterilen und gekühlten Pipettenspitzen, Eppendorfgefäßen und Elektroporationsküvetten.

1. Auftauen von elektro-kompetenten Bakterien auf Eis
2. Pro Ansatz Zugabe von gewünschter DNA-Menge zu 50 –100 µl elektro-kompetenten Bakterien in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß, vorsichtiges Mischen mit Pipettenspitze und Transfer des Transformationsansatzes in 2 mm-Küvette
3. Trocknen der Küvettenoberfläche und Einstellen in die Elektroporationskammer
   1x pulsieren (25 µF; 2,5 kV; 201 Ω)
4. sofortige Zugabe von 1 ml frischem, raumtemperierten SOC-Medium
5. Transfer der Suspension in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße und Inkubation bei 37º C und 250 rpm für 1 h
6. Ausplattieren von 100 µl Bakteriensuspension in 1:10-Verdünnungsreihe auf SOBAmpGluc-Agarplatten (bzw. LB-Amp-Agar für JM83-Bakterien) und Inkubation bei 30º C für 12-16 h

2.1.1.8 Rettung des rekombinanten pCANTAB 5E Phagemids

Das rekombinante Phagemid wird durch eine Superinfektion der transformierten Bakterien mit M13KO7-Helferphagen gerettet. Das Phagemid enthält hierzu die intergene Region von f1-Phagen mit dem entsprechenden DNA-Replikationsursprung sowie dem DNA-Packungssignal. Alle weiteren Funktionen werden über das Genom der M13KO7-

Helferphagen gesteuert. Auf diese Weise läßt sich durch Superinfektion mit M13KO7-Helferphagen die Synthese von scFv-präsentierenden Phagenpartikeln initiieren.

1. Beschickung von SOBAmpGluc-Agarplatten (Ø 14,5 cm) mit je 3 ml 2xYT-AmpGluc-Medium und Abnahme der Bakterienkolonien mit abgeflammtem Drigalskispatel
2. Inokulation von 10 ml 2xYT-AmpGluc-Medium mit mindestens 10^8 Bakterien/ml ($\cong OD_{600nm} \leq 0,1$).
   Inkubation der Bakterienkultur bei 37 °C und 250 rpm bis $OD_{600\ nm}$ 0,5 (= Mittlere logarithmische Wachstumsphase $\rightarrow 4 \times 10^8$ Zellen/ml)
3. Transfer von 5 ml ($\rightarrow 2 \times 10^9$ Zellen) der Kultur auf 50 ml 2xYT-AmpGluc-Medium
   Für die Infektion ist ein 5:1-Verhältnis von Phagen zu Bakterien nötig.
   Zugabe von $1x10^{10}$ cfu M13KO7 Helferphagen
4. Inkubation bei 37 °C ohne Schütteln für 30-45 min, weitere Inkubation für 30-45 min bei 37 °C und 250 rpm
5. Bestimmung der Anzahl an phageninfizierten Bakterien über Verdünnungsausstrich auf 2xYT-K-Agarplatten
6. Zentrifugation der Bakterien (1000xg, 10 min) und Dekantieren des Überstands. Abzug von vorhandenen Mediumsresten wegen Inhibition des *lac* Promoters durch Spuren von Glucose
7. Resuspendieren der Bakterien in 50 ml 2xYT-AmpK-Medium und Inkubation der Kultur über Nacht bei 30 C und 200 rpm

2.1.1.9 Präparation von Phagenpartikeln zur Selektion

Da das Amber Stop-Codon, das auf dem Phagemid zwischen der scFv-Insertion und dem Gen *III* liegt, nur teilweise unterdrückt wird, werden neben phagenassoziierten auch gelöste scFv gebildet. Die löslichen scFv werden über eine Präzipitation mit Polyethylenglykol entfernt, um eine unerwünschte Konkurrenz um die Antigenbindungsplätze mit den phagenassoziierten scFv in der nachfolgenden Selektion zu reduzieren.

1. Zenrifugation der Übernachtkultur bei 1000xg für 20 min
2. Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl (20 % (v/v) Polyethylenglycol 6000, 2,5 M NaCl) zum Kulturüberstand
   Vortexen für 5 min und Inkubation auf Eis für 1 h
3. Zentrifugation bei 4 °C und 1000xg für 20 min
   Dekantieren des Überstands und Abzug von verbliebenen Flüssigkeitsresten
4. Resuspendieren des Rückstands in 10 ml PBS (40 mM, pH 7,2) und Zentrifugation für 2 min zur Entfernung von restliche Zellbruchstücken der Bakterien
5. Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl zum Kulturüberstand
   Vortexen für 5 min und Inkubation auf Eis für 20 min
6. Zentrifugation bei 4 °C und 1000xg für 20 min
   Dekantieren des Überstands und Abzug von vorhandenen Flüssigkeitsresten zur Entfernung von Spuren des PEG
7. Resuspendieren des Rückstands in 2-3 ml PBS und Filtrieren mit einen 0.45 µm sterilen Spritzenfilter
8. Kurzfristige Lagerung präparierter Phagen auf Eis für einige Stunden

Die Phagenselektion sollte so schnell wie möglich durchgeführt werden, da vorhandene Proteasen in der Phagenlösung die scFv-Fragmente zerstören können.

2.1.1.10 Selektion antigenspezifischer Phagen über *Panning*

Die scFv-assoziierten Phagen präsentieren das scFv an der Phagenoberfläche. Diese Phagen können über haptenbeschichtete Festphasen selektiert werden. In der hier beschriebenen Selektionsmethode, dem *Panning*, diente eine Microtiterplatte, die mit dem OVA gekoppelten Permethrin-Derivat t-PMS (Abb. 6, S. 46) beschichtet war, als Festphase zur Selektion.

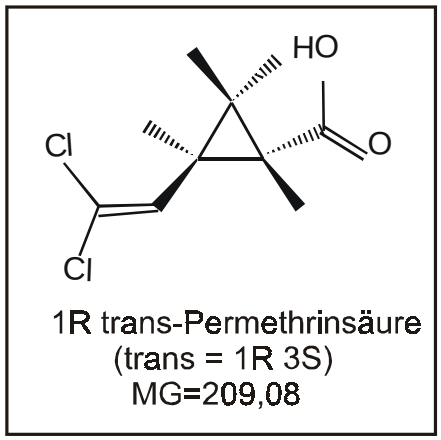


Abbildung 6 Chemische Struktur des Permethrin-Derivats t-PMS

Selektion der spezifischen Phagenpartikel

1. Beschichten von Microtiterplatten (Greiner) mit 100 µl des Hapten-Konjugats t-PMS-OVA (10 µg/ml in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6) je Kavität
   Inkubation über Nacht bei 4 °C

Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur dürchgeführt.

2. 3x Waschen mit 300 µl PBS-Waschpuffer je Kavität
3. Reduktion der unspezifischen Bindung von Phagen an die Polystyrol-Oberfläche durch Blockieren mit 300 µl Magermilchpulver (1% (w/v) in PBS) für 1h
4. 3x Waschen mit 300 µl PBS-Waschpuffer je Kavität
5. Verdünnung der 2 ml Phagenlösung in 8 ml PBS mit 2 % (w/v) Magermilchpulver und 0.05 % Tween 20 und Inkubation für 15 min
   Zugabe von 100 µl Phagenlösung je Kavität und Inkubation für 1,5 h
6. Entfernung von ungebundenen Phagen durch 10x Waschen mit PBS-Waschpuffer innerhalb 1h. Die Kavitäten werden mit je 300 µl PBS-Waschpuffer gefüllt und zwischen den einzelnen Waschschritten für 5 min inkubiert.
7. 3x Spülen der Platte mit PBS

2.1.1.11 Reinfektion der TG1-Bakterienzellen mit selektierten Phagenpartikeln

Die scFv-Gene der selektierten Phagen werden durch Infektion mit *E. coli* TG1-Zellen isoliert.

1. Infektion von je 100 µl exponentiell wachsenden TG1 (OD_{600nm} um 0.8) je Kavität mit eluierten Phagen (vorgewärmt auf 37 °C) durch Inkubation bei 37 °C für 1 h
2. Zusammenführen der Zellsuspensionen aus den einzelnen Kavitäten
3. Titrieren der phageninfizierten Bakterien durch Ausplattieren von 100 µl unverdünnter Zellsuspension und seriellen Zehnfach-Verdünnungen der Suspension auf SOBAmpGluc-Agarplatten mit anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C
   Ermittlung der cfu (*colony forming units*) durch Auszählen der gebildeten Bakterienkolonien.
4. Transfer einzelner Kolonien in 200 µl 2xYT-AmpGlu-Medium je Kavität auf einer 96er Micronicplatte (Micronic Systems) mit Inkubation über Nacht bei 30 °C und 250 rpm
5. Ausplattieren von je 0,5 ml der Bakteriensuspension auf SOBAmpGluc-Agar (große Platten) und Inkubation und über Nacht bei 30 °C
6. Beschickung der SOBAmpGluc-Platten mit 2x3 ml 2xYT-AmpGluc-Medium und Abnahme der Bakterienkolonien mit abgeflammtem Drigalskispatel
7. Zentrifugation der Bakterien bei 1000xg für 10 min und Resuspension des Rückstands in 1 ml Einfriermedium
   Aliquotieren des Ansatzes in 0,5 ml (in Cryo-Gefäße) und Lagerung bei -70 °C

2.1.1.12 *Screening* der selektierten Phagenfraktion

Expression von löslichen scFv

Vom Phagenpartikel getrennte, als löslich bezeichnete scFv lassen sich in ausreichender Menge in TG1-Bakterien exprimieren. Das Amber Stop-Codon, das sich zwischen dem 3'-Ende des scFv und der 5'-Seite des Gen *III*-Teilstücks befindet, wird auch in dieser Suppressor-Linie zum Teil erkannt. Ein geringer Glucoseanteil von 0,1 % im Medium

unterdrückt den *lac* Promoter in der ersten Wachstumsphase. Die Glucose wird bis zu Beginn der Induktion mit IPTG metabolisiert.

1. Auftauen eines Cryogefäßes mit selektierten Phagen
   Ausplattieren von je 50 µl serieller Verdünnungen im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-9} auf SOBAmpGluc-Platten und Inkubation über Nacht bei 30 °C
2. Transfer von Einzelkolonien in 200 µl 2xYT-AmpGluc-Medium je Kavität einer 96er Zellkulturplatte und Inkubation über Nacht bei 30 °C und 200 rpm
3. Transfer von je 100 µl der Übernachtkulturen auf je 1 ml 2xYT-Amp-Medium mit 0.1 % (w/v) Glucose in einer 96er Micronic-Platte und Inkubation bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer mittleren OD_{600nm} von ca. 0,8 (ca. 2-4 h Inkubationsdauer). Währenddessen: Lagerung der Zellkulturplatte aus 3. als Sicherheitskopie nach Zusetzen von Einfriermedium bei -70 °C
4. Zugabe von 100 µl 2xYT-Amp-Medium mit 6 mM IPTG je Kavität und Inkubation der Micronic-Platten für 16-24 h bei 30 °C und 250 rpm
5. Zentrifugation der Platten bei 1000xg für 30 min
   Abzug des Überstands für die Evaluierung im nachfolgenden ELISA

Screening der exprimierten scFv-Fragmente im ELISA

Die scFv der aspirierten Kulturüberstände werden im ELISA auf haptenspezifische Bindung und Verdrängung untersucht. Es wurde ein indirekter, kompetitiver ELISA (Abb. 7, S. 50) in 96-Microtiterplatten durchgeführt. Da es sich hier um einen heterogenen Assay handelte, erfolgte nach jedem Inkubationsschritt ein Waschschritt. Die Mikrotiterplatte wurde dazu dreimal mit 350 µl PBS-Waschpuffer je Kavität in einem ELISA-Waschautomaten gewaschen. Die Volumenangaben verstehen sich stets pro Kavität, Verdünnungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in 50 mM PBS, pH 7,4, vorgenommen. Die einzelnen Arbeitsschritte sind nachfolgend dargestellt:

Coaten:	200 µl t-PMS-OVA (10 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht, 4 °C
Blockieren:	300 µl OVA (1% (w/v) in PBS), 1 h, RT

Inkubation:	100 µl Bioallethrin (10.000 µg/l) bzw. PBS 100 µl bakterieller Kulturüberstand, 1h, RT Vor Zugabe: Zentrifugation des Kulturüberstands bei 1000xg für 10 min und Vorinkubation mit Magermilchpulver (1% (w/v) in PBS) für 15 min, RT
Sekundärantikörper:	200 µl Anti-E-*Tag* IgG-POD (1:10.000), 1h, RT Das Anti-E-*Tag* IgG-POD Konjugat bindet spezifisch an ein Pepitd, das durch die E-*Tag* Sequenz codiert wird. Diese Sequenz befindet sich am 3'-Ende der scFv-Insertion im Phagemid pCANTAB 5E
Farbreaktion:	200 µl POD-Substrat (2 Teile H_2O_2 : 1 Teil Chromogen), 20-30 min, RT
Abstoppen:	50 µl 2 M H_2SO_4
Messung:	Absorption (Multiscan ELISA Reader) λ = 450 nm

2.1.2 Sequenzanalyse der positiven Klone

Die Plasmidpräparation jedes positiven Klones wurde durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Sicherheitskopien auf SOBAmpGluc-Agar ausgebracht und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Kultur eines jeden Klones durch Transfer einer gut isoliert gewachsenen Einzelkolonie in 10 ml 2xYT-AmpGluc-Medium. Nach Inkubation bei 30 °C über Nacht wurden die einzelnen Plasmide mit Qiagen Mini DNA Purification Kit entsprechend dem dazugehörigen Protokoll isoliert. Die DNA wurde bei –20 °C gelagert. Sicherheitskopien der jeweiligen Klone à 300 µl wurden mit je 2 Tropfen Glycerol bei –70 °C eingefroren.

Ein RV mit den Restriktionsenzymen *Sfi* I und *Not* I wurde zur Analyse der Klonierung des scFv-Fragments in den Expressionsvektor pCANTAB 5E angesetzt. Der sequentielle Restriktionsansatz für jeden Klon erfolgte nach II, 2.1.1.5, Tabelle 9, S. 40 und wurde anschließend in einem 1 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

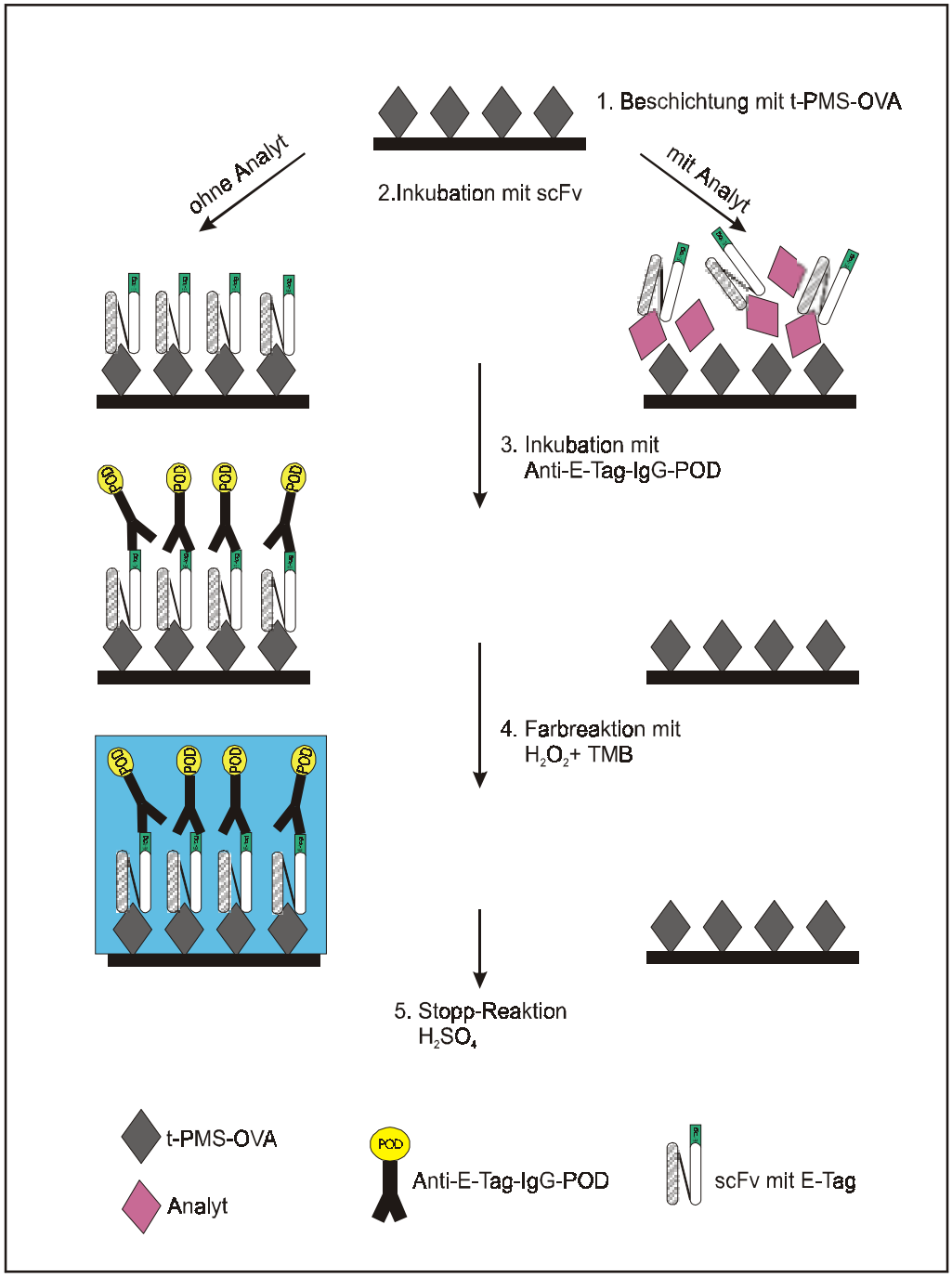


Abbildung 7 Schema des indirekten, kompetitiven ELISA zum *Screening* der scFv-Klone

Die Sequenzierung der einzelnen Klone wurde von der Firma SequiServe (Vaterstetten/ Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Sequenzierungsprimer PCANTAB-S1, -S3, -S4 und-S6 aus II, 1.7, Tabelle 2, S. 19 verwendet.

2.1.2.1 Konstruktion des scFv der Myeloma-Zellinie PAI-B_3Ag81

Die Hybridomzellen, die als mRNA Quelle zur Konstruktion des scFv dienten, gehen aus der Fusion von Lymphozyt und Myelom-Zelle hervor. Somit existieren 4 verschiedene variable Regionen zur scFv-Kombination, nämlich V_H und V_L des Lymphocyten und V_H und V_L der Myelom-Zelle. Diese 4 Regionen können auf 4 verschiedene Arten kombiniert werden, wobei nur eine Kombination, V_H und V_L des Lymphozyten, ein funktionelles Antikörperfragment bildet. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde ein scFv-Fragment der Myelom-Zelle synthetisiert unter Verwendung der Myelom-Zellinie PAI-B_3Ag81, die zur Fusion der Hybridomzellen verwendet worden war. Dabei wurde nach der gleichen Methode wie bei der Konstruktion des Pyrethroid-scFv (s. II, 2.1.1.1-2.1.1.7, S. 33ff) vorgegangen. Die Selektion der Klone erfolgte nur über SOBAmpGluc-Agar ohne Phagen-*Display*. Zur Expression der selektierten Klone wurden je 3 ml 2xYT-AmpGluc-Medium mit einer isoliert gewachsenen Bakterienkolonie angeimpft und für ca. 8 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 4500 rpm für 20 min zentrifugiert und der Zellrückstand in 10 ml 2xYT-Amp-Medium mit 1 mM IPTG resuspendiert. Die Expression erfolgte bei Inkubation für 20 h bei 30 °C und 250 rpm. Anschließend wurde die Kultur bei 5000 rpm für 20 min abzentrifugiert und der Überstand mit den löslichen scFv-Fragmenten für die Verwendung im ELISA abgezogen. Das *Screening* der exprimierten scFv-Fragmente wurde in einem negativen ELISA durchgeführt, d.h. daß Atrazin als Analyt verwendet wurde, da kein spezifisches Antigen für die Myelom-Zellinie zur Verfügung stand. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach dem Protokoll aus II, 2.1.1.12, S. 47ff unter Verwendung des Atrazinderivat-Konjugats IPR-OVA (vgl. II, 2.2.3, Abb. 11, S. 68) zum Beschichten der Mikrotiterplatte und des Analyten Atrazin zur Verdrängung.

Die Plasmide der positiven Klone wurden mit Qiagen Mini DNA Purification Kit isoliert und mit den Sequenzierungsprimern PCANTAB-S1, -S3, -S4 und -S6 (s. II, 1.7, Tabelle 2, S. 19) sequenziert. Die Sequenzen wurden zur Analyse der Pyrethroid-scFv herangezogen.

2.1.2.2 Sequenzanalyse

Die V_H- und V_L- Sequenzen der Pyrethroid-scFv-Fragmente wurden untereinander und mit denen des Myeloma-scFv-Fragments verglichen und auf Identität überprüft. Die positiven Klone wurden auch auf Proteinebene getestet, d.h. ob sich die scFv-Sequenzen

einschließlich der Startsequenz und des Stop-Codons nach der E-*Tag* Sequenz im Leserahmen befinden und durchgehende Proteine bilden.

2.1.2.3 Datenbankanalyse

Eine weitere Sequenzanalyse erfolgte mit der Datenbank ImMunoGeneTics [IMGT, the international ImMunoGeneTics database http://imgt.cines.fr:8104 (Initiator und Koordinator: Maurie-Paule Lefranc, Montpellier, Frankreich]. Diese Datenbank ist spezialisiert auf der Ebene der komplexen Genfamilien von spezifischer Immunantwort im Menschen und anderen Vertebraten. Der IMGT-Server ermöglicht den Zugang zu allen immungenetischen Daten und den Vergleich eines konstruierten Antikörpers mit diesen gespeicherten Daten. Die Datenbank enthält Keimbahngene der Maus, die Informationen über Ähnlichkeiten einer Antikörpersequenz mit Maus-IgG liefern. Die variablen Regionen werden jeweils separat in die Datenbank eingegeben und analysiert. Die Sequenz einer variablen Region wird dabei in ihre CDR- und FR-Regionen unterteilt, deren Größe und Aminosäurenzusammensetzung mit denen von gespeicherten Antikörpersequenzen verglichen wird. Die im Leserahmen befindlichen Basentripletts werden im Aminosäure-Code angegeben. Um zu erkennen, ob eine Antikörpersequenz vorliegt, können u.a. drei konservierte Aminosäuren, die an bestimmten Positionen in den Rahmenregionen einer Antikörpersequenz liegen, als Anhaltspunkte zur Analyse herangezogen werden. Dies sind die Aminosäuren Cystein an Position 23 in FR 1, Tryptophan bei 41 in FR 2 und ein weiteres Cystein an Position 104 in FR 3.

2.1.3 *Oligonucleotide site-directed* Mutagenese nach Kunkel

Eine allgemein angewandte Methode, um DNA an einer oder mehreren Positionen zu verändern, ist die *oligonucleotide site-directed* Mutagenese nach Kunkel (1985, Kunkel et al., 1987). Die Strategie dieser Mutagenese beruht auf der Klonierung des zu verändernden DNA-Segments in einen Vektor, dessen DNA in Einzelstrang-Format erhalten werden kann. Ein Oligonukleotid, das teilweise komplementär zu der zu mutierenden Region ist, hybridisiert an die Einzelstrang-DNA (ssDNA). Dieses Oligonukleotid enthält die gewünschte Mutation. Ein komplementärer DNA-Strang wird durch die DNA-Polymerase synthetisiert, indem das Oligonukleotid als Primer benutzt wird. Als Komplettierung der Synthese fügt das Enzym DNA-Ligase die Enden des neuen Stranges zusammen. Die

entstandene Doppelstrang-DNA ist somit bis auf die beabsichtigte Mutation homolog zur ssDNA und wird zur Transformation eines *E. coli* Stammes verwendet. Die transformierten Bakterien enthalten zum Teil die gewünschte Mutation und zum Teil die Original-DNA. Die Effektivität dieser Muatagenese ist abhängig von der Ausführung jedes einzelnen Schrittes dieser Methodik. Die Erfolgsquote liegt bei 50-80 % (Kunkel, 1985).

2.1.3.1 Einzelstrang-DNA-Isolierung

Der angewandte Phagemidvektor pCANTAB 5E zur Konstruktion des scFv 4H gegen Pyrethroide enthält bereits den M13 Origin. Dies ermöglichte die Gewinnung von ssDNA ohne Umklonierung des scFv-Fragments. Als Klonierungsstamm diente der *E. coli dut*$^-$ *ung*$^-$ Bakterienstamm CJ236. *E. coli dut*$^-$ Mutanten fehlt das Enzym dUTPase. Sie enthalten somit eine höhere Konzentration an dUTP, die mit dTTP um den Einbau in die DNA konkurrieren. *E. coli ung*$^-$ Mutanten fehlt das Enzym Uracil-N-glycosylase, das normalerweise Uracil aus der DNA entfernt. In der *E. coli dut*$^-$ *ung*$^-$ Mutante ist Uracil anstelle von Thymin in die DNA eingebaut und wird nicht entfernt. Diese Bakterien wurden dann mit M13KO7-Helferphagen infiziert, um ssDNA zu erhalten.

Transformation von CJ 236

1. PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff) des Phagemids pCANTAB 5E/4H
2. Elektroporation von elektro-kompetenten CJ236 mit dem Phagemid (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff)
   Mitführen einer Kontrolltransformation mit H_2O* anstelle von DNA
3. Ausplattieren auf LB-Amp-Cm-Agar, unverdünnt und in seriellen Zehnfach-Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-4} und Inkubation über Nacht bei 30 °C

Isolierung der Einzelstrang-DNA

1. Animpfen von 20 ml LB-Amp-Cm-Medium mit einer isolierten Einzelkolonie und Inkubation über Nacht bei 37 °C und 250 rpm
2. Transfer von 1ml der Übernachtkultur in 40 ml 2xYT-Amp-Cm-Medium und Inkubation bei 37 °C und 250 rpm bis OD_{600} 0,3 ($\cong 10^7$ cfu/ml)

3. Beimpfen mit $8x10^9$ pfu M13KO7 Helferphagen [M.O.I. (multiplicity of infection) = 20] und Inkubation für 1 h bei 37 °C und 250 rpm
4. Zugabe von 70 µg/ml Kanamycin und Inkubation für 6-24 h bei 37 °C und 250 rpm
5. Zentrifugation der Kultur bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min
6. Isolierung der Einzelstrang-DNA mit QIAprep Spin M13 Kit (Qiagen) nach entsprechendem Protokoll des Herstellers

2.1.3.2 *Oligonucleotide site-directed* Mutagenese

Der speziell synthetisierte Primer KUNKDEL (s. II, 1.7, Tab. 2, S.19) wurde an die ssDNA im Verhältnis 10:1 oder 5:1 hybridisiert. Er enthielt die gewünschte Mutation und war am 5'-Ende phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist nötig, um später die DNA zusammenfügen zu können. Der komplementäre zweite DNA-Strang wurde durch Zugabe der Enzyme DNA-Polymerase und Ligase synthetisiert. Die Produkte dieser *in vitro* Reaktion wurden dann zur Transformation von kompetenten *E. coli* ung^+ Zellen verwendet. Die Aktivität der Uracil-N-Glycosylase *in vivo* löst das Uracil aus der DNA, und die biologische Aktivität des Template DNA-Stranges wird reduziert. Somit entsteht die Mehrheit der Nachkommen aus dem komplementären Strang, der die gewünschte Mutation enthält.

1. Annealing des phosphorylierten Primers an die ssDNA

Tabelle 12 Annealingansatz

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen (µl)
ssDNA		0,2 µg	x
KUNKDEL	100 pmol	10 pmol	0,1
Puffer G (MBI Fermentas)	10x	1x	1
Tris	100 mM		1
H_2O*			ad 10

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min auf Tm + 20 °C erhitzt und anschließend auf RT abgekühlt. Nach kurzem Abzentrifugieren des Kondenswassers wurde das Gemisch auf 0 °C gelagert.

2. Synthese des Doppelstrangs

Tabelle 13 Ansatz zur Synthese des Doppelstrangs

Komponente	**Stammlösung**	**Endkonzentration**	**Volumen (µl)**
Ansatz aus 1.			10
Puffer B (MBI Fermentas)	10x	1x	10
Tris	100 mM		8
ATP	10 mM		4
DTT	100 mM		2
dNTPs	je 10 mM		20
T4 DNA-Polymerase	5 U/µl	2,5 U	0,5
T4 DNA-Ligase	5 U/µl	5 U	1
H_2O*			ad 100

Nach Inkubation für 5 min bei 0 °C und für weitere 5 min bei RT wurde das Reaktionsgemisch bei 37 °C für 2 h inkubiert. Eine Gelelektrophorese mit einem 1 %igem Agarosegel diente zur Kontrolle nach der Reaktion. Vor der Transformation eines *E. coli ung*$^+$ Bakterienstammes wurde eine PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation des Reaktionsansatzes durchgeführt. Elektro-kompetente Zellen des *E. coli* Stammes TG1 wurden elektroporiert (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff) und je 100 µl auf SOBAmpGluc-Agar unverdünnt und in seriellen Zehnfach-Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-4} ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C wurden Kulturen von Einzelkolonien in 2xYT-AmpGluc-Medium angelegt, um die Plasmide mit Qiagen Plasmid Purification Mini Kit zu isolieren. Zur Kontrolle der Transformation erfolgte ein RV mit dem Enzym *Not* I (s. II, 2.1.1.5, S. 39f) gefolgt von einer Gelanalyse über ein 1 %iges Agarosegel. Die ausgewählten

Plasmide wurden sequenziert und auf die Mutation im Vergleich mit der Template-DNA überprüft.

Von den eingefrorenen Sicherheitskopien wurden Kulturen zur Expression (s. II, 2.1.2.1, S. 51) angelegt und der Kulturüberstand für das *Screening* der exprimierten scFv verwendet. Das *Screening* wurde wie in II, 2.1.1.12, S. 47ff in einem indirekten, kompetitiven ELISA mit dem Analyten Bioallethrin ausgeführt. Zwei weitere Pyrethroide, Allethrin und S-Bioallethrin, wurden im gleichen Testformat zur Bestimmung von Kreuzreaktivitäten verwendet.

2.1.4 Charakterisierung des scFv mit SDS-PAGE und Westernblot

Das exprimierte Antikörperfragment wurde über Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Westernblot lokalisiert und dessen Größe bestimmt.

2.1.4.1 Aufbereitung der Proben

Sowohl der Überstand aus der Bakterienkultur als auch Periplasma- und Cytoplasmaextrakt wurden zur Analyse verwendet. Nach Expression (s. II, 2.1.2.1, S. 51) des scFv wurde die Bakterienkultur in 2x 5 ml geteilt und bei 4500 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem Filter (0,45 µm) filtriert. Der Überstand mit den extrazellulären, löslichen scFv-Antikörpern wurde 40-fach mit einer Trichloreisessig (TCA)-Präzipitation konzentriert. Zehn Prozent TCA wurden in 2 ml Zellkulturüberstand gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15.000 rpm für 10 min wurde der Rückstand in 50 mM PBS resuspendiert. Der Rest des Kulturüberstandes wurde bei –20 °C gelagert.

Der Periplasmaextrakt wurde aus einem der beiden Zellrückstände der Bakterienkultur gewonnen. Dazu wurde der Rückstand in 0,5 ml eiskaltem 1x TES-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 0,75 ml 1/5x TES-Puffer auf dem Vortex gemischt. Eine Inkubation auf Eis für 30 min folgte. Anschließend wurde das Gemisch bei 15.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand, der den Periplasmaextrakt enthielt, abgenommen. Der Extrakt ist bei –20 °C lagerbar.

Für die Gewinnung des Cytoplasmaextrakts wurde der zweite Zellrückstand in 0,5 ml 50 mM PBS gelöst und anschließend für 5 min gekocht. Nach Zentrifugation bei 15.000 rpm

für 10 min wurde der Überstand, der Cytoplasmextrakt, abgenommen und auf Eis zur weiteren Verwendung oder bei –20 °C gelagert.

2.1.4.2 SDS-PAGE von scFv

Die einzelnen Lösungen, der konzentrierte Überstand, der Periplasma- und der Cytoplasmaextrakt wurden zunächst elektrophoretisch (SDS-PAGE) in einem 10,5 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proben wurden in Probenpuffer 5:1 verdünnt. Der reduzierende Probenpuffer bewirkt eine Auflösung von Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine. Dabei lagert sich SDS an die Proteine und führt eine zusätzliche negative Ladung ein. Je größer das Protein ist, desto mehr SDS kann sich anlagern, und desto größer wird seine negative Ladung. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine beruht jedoch ausschließlich auf der unterschiedlichen Größe der verschiedenen Proteine. Die unterschiedliche Ladungsdichte der Proteine hat nur einen Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld (Westermeier, 1990). Je 8 µl der einzelnen Proben wurden neben einem Molekulargewichtsmarker so auf das Gel aufgetragen, daß nachfolgend das Gel in der Mitte geteilt werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V bei RT. Nach Teilung des Gels wurde die eine Hälfte mit Silbertnitrat gefärbt. Die einzelnen Arbeitsschritte der Färbung sind nachfolgend aufgeführt:

1. 3x 30 min Inkubation in Fixierlösung
2. 3x 20 min Inkubation in H_2O dest.
3. 1x 1 min Inkubation in Thiosulfatlösung
4. 1x 1 min Inkubation in H_2O dest.
5. 1x 20 min Inkubation in Silbernitratlösung
6. 1x 1 min Inkubation in H_2O dest
7. 1x 5-10 min Inkubation in Entwicklerlösung
   (Entwicklungsdauer je nach aufgetragener Proteinmenge)
8. 1x 15 min Inkubation in Stoplösung

2.1.4.3 Westernblot von scFv

Die zweite Hälfte des Proteingels wurde für einen Westernblot verwendet. Die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose (PVDF)-Membran erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Tank-Blotting Apparatur bei einer Spannung von 10 V über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 4 °C.
Anschließend wurde die Membran immunchemisch gefärbt. Die einzelnen Inkubationen wurden auf einem Horizontalschüttler durchgeführt. Die Arbeitsschritte sind nachfolgend dargestellt:

Blockieren:	Absättigung freier Bindungsstellen mit 10 % Magermilchpulver, 0,3 % Tween in 50 mM PBS für 1h
1. Immunreaktion:	Inkubation mit 8 µg/ml Anti-E-*Tag*-IgG in 50 mM PBS für 1,5h
2. Immunreaktion:	Inkubation mit Anti-Maus-IgG-POD Konjugat (1:6.000 in 50 mM PBS) für 1h
Waschen:	3x 50 mM PBS für je 2 min
Substratreaktion:	Zugabe von POD-Substrat für Westernblot (enthält Dextran-sulfat für die Immobilisierung des Farbstoffs auf der Membran), Inkubation 5-10 min, abstoppen mit H_2O dest.

2.2 Konstruktion von *s*-Triazin-spezifischen F_{ab}-Antikörperfragmenten

Die variablen Regionen von drei verschiedenen scFv-Antikörpern wurden aus dem Phagemid pCANTAB 5E isoliert und in den Expressionsvektor pASK99 kloniert. Der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Skerra (Lehrstuhl für Biologische Chemie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München) zur Verfügung gestellt. Die scFv-Fragmente IPR-7, -53 und –23 stammen aus der *s*-Triazin-spezifischen Antikörperbibliothek (Kramer, 2001a) und wurden über das OVA-gekoppelte Atrazinderivat 4-Chlor-6 (Isopropylamino)-1,3,5 Triazin-2-(6-Aminohexan)-Carboxylsäure (IPR) im *Screening* selektiert. Die Klone IPR-53 und IPR-23 wurden über evolutionäre Mutation aus dem scFv IPR-7 gewonnen (Kramer 2001b). Die Klone wurden freundlicherweise von Dr. Kramer (Lehrstuhl für Botanik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München) für diese Arbeit überlassen.

Der Vektor pASK99 (Abb. 8) ist für die Produktion von F_{ab}-Fragmenten aus Bakterien konstruiert. Er enthält die murinen, konstanten Regionen der Schwer (C_H1)- und der Leicht (C_L)-Kette des Maus-IgG. Diese dienen zur Konstruktion eines F_{ab}-Fragments durch Einfügen der variablen Regionen der Schwer (V_H)- und der Leicht (V_L)-Kette des scFv-Fragments. Die Expressionskassette des Vektors liegt unter der Transkriptionskontrolle des *tet*A-Promoters. Die Region von Promoter/Operator tet $^{p/o}$ ist getrennt von dem Repressionsgen tetR, um eine effektive Repression zu erzielen. Die Translokation von rekombinanten Proteinen in das Periplasma von *E. coli* wird durch den *omp*A-Leader bewirkt. Das Affinitätspeptid Strep-*Tag* II dient zur Aufreinigung von bakteriell produzierten Proteinen aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu Streptavidin. Weiterhin enthält der Vektor das Ampicillin-Resistenzgen (ß-Lactamase-Gen *bla*) und den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}), sowie die intergenen Regionen des Bakteriophagen f1 (f1-IG) und des Replikationsbeginns (ori).

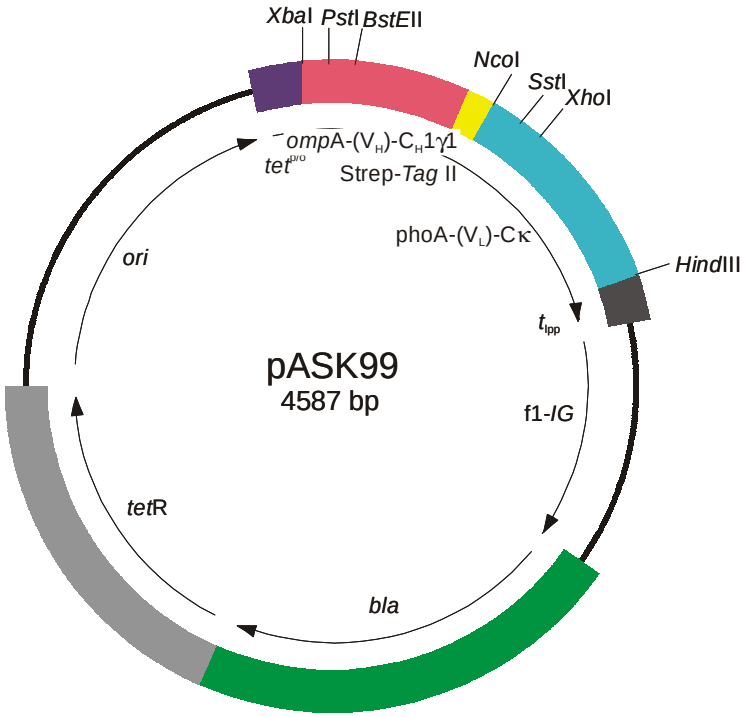


Abbildung 8 Expressionsvektor pASK99

2.2.1 Subklonierung der variablen Antikörperregionen in pASK99

Das Klonierungsschema ist in Abbildung 9 (S. 61) dargestellt. Die V_H- und V_L-Regionen der einzelnen Klone werden separat aus der Plasmid-DNA von pCANTAB 5E über PCR isoliert. Die zur Klonierung von V_H nötigen Restriktionsstellen *Pst*I/*Bst*EII befinden sich bereits auf dem V_H-Gen und werden mit dem jeweiligen Primerpaar amplifiziert. Bei V_L wird die 3'-Klonierungsstelle *Xho*I über den entsprechenden Primer an das V_L-Gen angefügt. Die Restriktionsstelle *Sst*I ist auf dem V_L-Gen lokalisiert. Nach Reinigung über Agarosegelelektrophorese und anschließender Extraktion aus der Agarose werden die Amplifikationsprodukte an den Klonierungsstellen mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Aufreinigung der variablen Antikörperfragmente erfolgt in einer weiteren Elektrophorese über Agarose. Durch Ligation mit den entsprechenden Präparationen des Expressionsvektors pASK99 werden die variablen Regionen separat an das 5'-Ende der konstanten Regionen C_H1 und C_L inseriert. Die V_H oder V_L enthaltenden Plasmide vermehrt man durch Transformation von kompetenten *E. coli* JM83-Zellen. Im nachfolgenden Restriktionsverdau wird das V_L-Plasmid mit den Enzymen *Nco*I und *Hind*III geschnitten, um das gesamte Leichtkettenfragment zu isolieren. Nach dem Reinigungschritt über eine Agarosegelelektrophorese erfolgt die Ligation des Leichtkettenfragments mit dem *Nco*I/*Hind*III-linearisierten Vektor pASK99. Der Vektor enthält das entsprechende V_H-Gen.

Dieser Klonierungsschritt ist für den Klon IPR-7 (Abb. 10, S. 62) abgeändert, da die Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms *Nco*I in dessen V_H-Region lokalisiert ist. Das V_H enthaltende Plasmid wird an den Restriktionsstellen *Xba*I und *Sst*I geschnitten und das isolierte Schwerkettenfragment über Agarose gereinigt. Anschließend ligiert man die gereinigten Fragmente mit dem *Xba*I/*Sst*I-linearisierten pASK99, der das dazugehörige V_L-Fragment enthält.

Die rekombinanten Plasmide werden zur Expression der F_{ab}-Antikörperfragmente in JM 83 Bakterien transformiert.

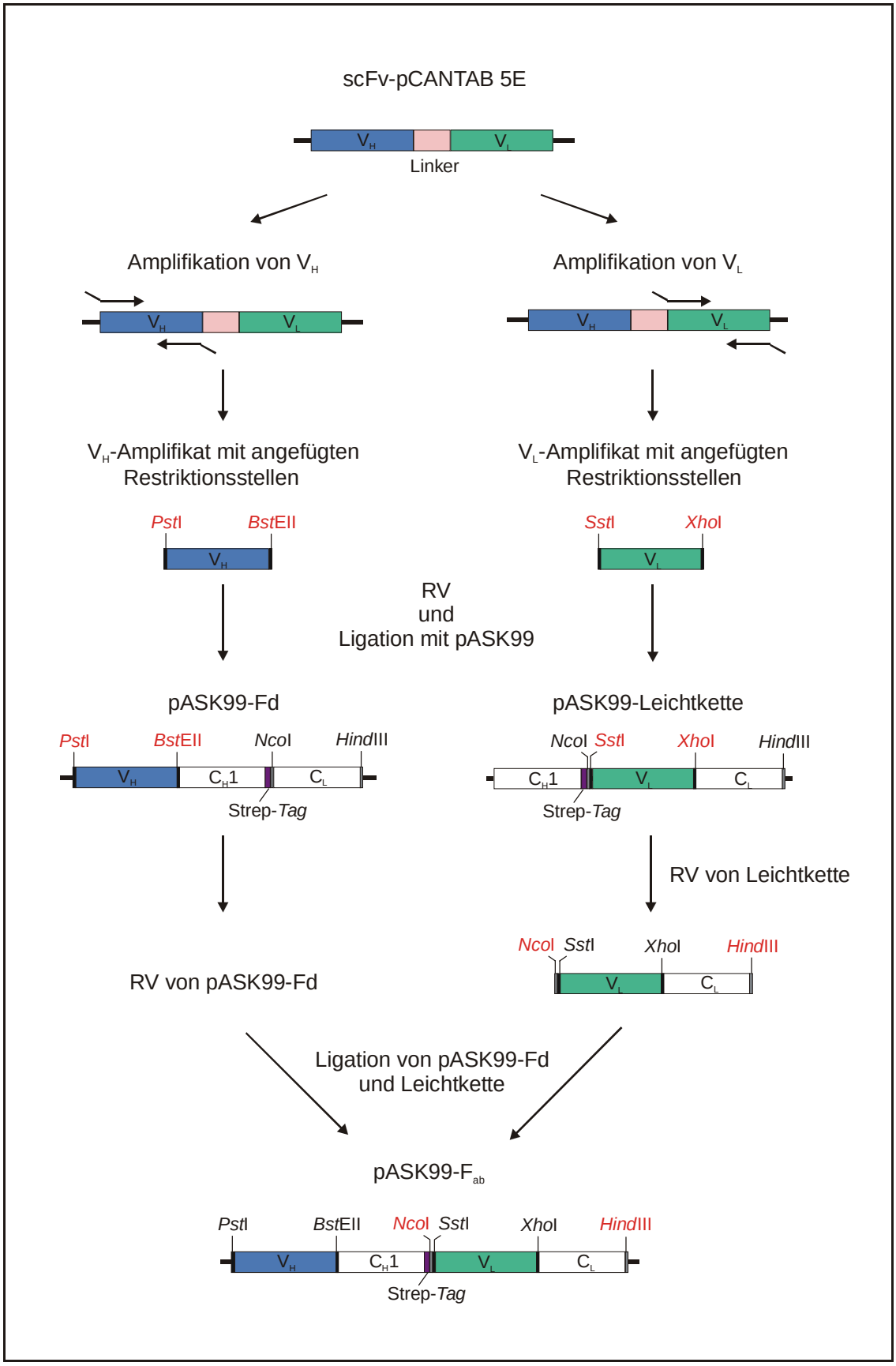


Abbildung 9 Klonierungsschema der variablen Schwer- und Leichtregionen in pASK99

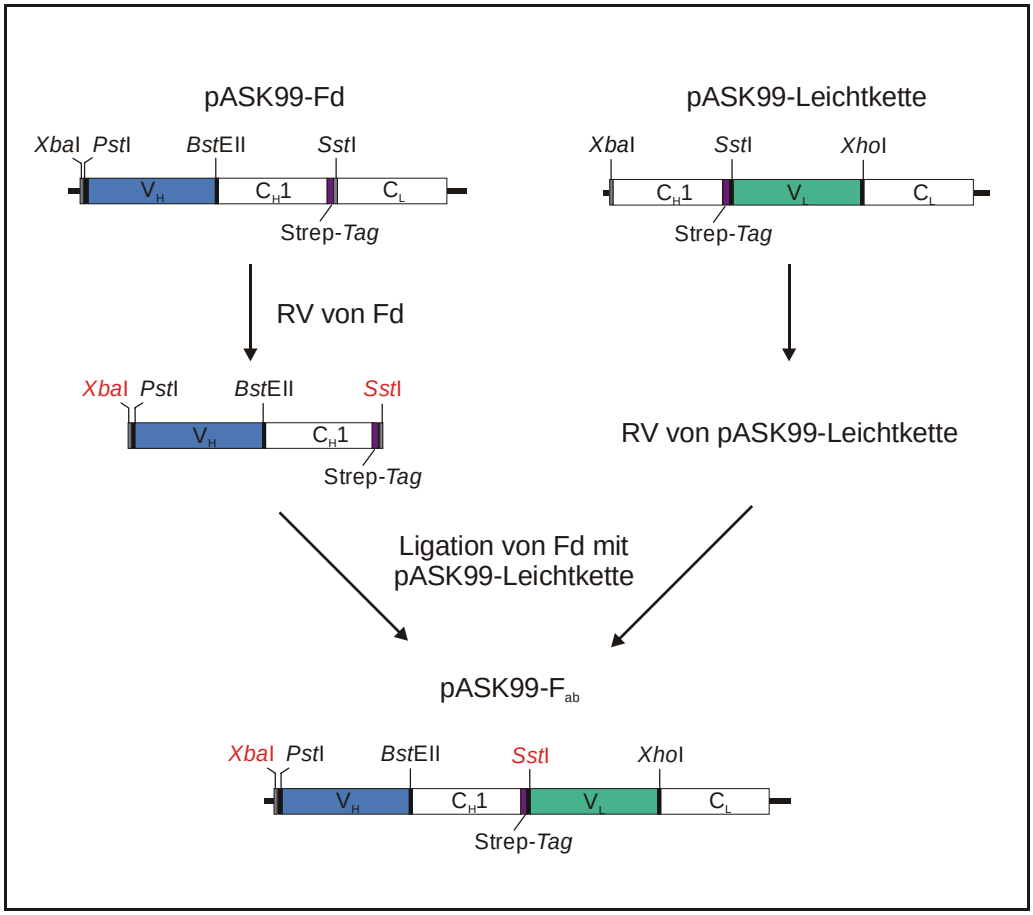


Abbildung 10 Klonierungsschema für die Subklonierung von F_{ab} IPR-7

2.2.1.1 Amplifikation der variablen Regionen des scFv

Die Klone IPR-7, IPR-23 und IPR-53 lagen als Sicherheitskopien in *E. coli* TG1-Bakterien vor. Nach Inkubation auf SOBAmpGluc-Agar für 12-16 h bei 30 °C wurde eine isolierte Einzelkolonie je Klon in 2xYT-AmpGluc-Medium für 16 h bei 30 °C und 250 rpm in Kultur genommen. Die pCANTAB 5E-Plasmide der Klone wurden aus der jeweiligen Bakterienkultur mit Qiagen Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Die variablen Regionen V_H und V_L der einzelnen scFv-Fragmente wurden über die PCR aus den pCANTAB 5E/scFv-Plasmiden isoliert. Über spezifische Primer wurden die zur Klonierung notwendigen Restriktionsstellen an das 3'-Ende der variablen Leichtkettenregion angefügt. Die Primer waren teilweise degeneriert, um die generische Subklonierung von murinen V-Regionen (Kramer et al., 2001b) zu ermöglichen.

Amplifikation von V_H

Die Restriktionsstellen für die Restriktionsenzyme *Pst*I und *Bst*EII wurden einschließlich der Sequenz von V_H über spezifische Primer amplifiziert. Folgende PCR-Reaktion (Tab. 14) wurde für jeden einzelnen Klon durchgeführt:

Tabelle 14 PCR-Ansatz zur Amplifikation der V_H-Region aus scFv

Komponente	**Volumen (µl)**	**Endkonzentration**
10x-PCR-Puffer	5	1x
25 mM $MgCl_2$	3	1,5 mM
dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	4	je 200 µM
V_HSUBFabBACK**	0,5	50 pM
V_HSUBFabFOR**	0,5	50 pM
Template-DNA	10	10 ng, 1 ng
H_2O*	ad 50	-
TaqPolymerase (1:10)	5	2,5 Units

**Die exakten Sequenzen der V_H-spezifischen Primer sind in II, 1.7, Tabelle 3, S. 20 verzeichnet

Die PCR wurde mit dem Zeit-Temperatur-Profil wie in II, 2.1.1.3, S. 36ff) durchgeführt. Zum Annealing wurde ein Temperaturgradient von 15 °C, bei 50 °C beginnend, eingesetzt, da die Annealingtemperaturen der Oligonukleotide V_HSUBFabBACK und V_HSUBFabFOR mit 67 °C bzw. 75 °C unterschiedlich hoch lagen. Die Auswertung der PCR erfolgte mit einer präparativen Gelelektrophorese (1,0 %iges Agarosegel). Zur Größenbestimmung der DNA diente ein 100 bp-Marker. Die Amplifikationsprodukte wurden aus dem Gel getrennt und mit QiaEX II (Qiagen) aus der Agarose isoliert.

Amplifikation von V_L

Die Klonierungsstelle *Sst*I war Bestandteil des V_L-Gens und des Backward-Primers, während die Restriktionsstelle *Xho*I über den Forward-Primer an die V_L-Sequenz angefügt wurde. Die PCR wurde unter Einsatz der Primer V_LSUBFabBACK und V_LSUBFabFOR wie bei V_H durchgeführt. Auch hier wurde wegen der Höhe der Annealingtemperaturen

von 69 °C für den Backward-Primer und 71 °C für den Forward-Primer ein Temperaturgradient von 15 °C, bei 50 °C beginnend, für die Hybridisierung der Primer eingesetzt. Die exakten Sequenzen der V_L-spezifischen Primer sind in II, 1.7, Tabelle 3, S. 20 verzeichnet. Die PCR-Auswertung erfolgte ebenfalls wie bei V_H.

2.2.1.2 RV und Ligation der variablen Regionen mit pASK99

Die Amplifikationsprodukte V_H und V_L wurden an den jeweiligen Restriktionsstellen im RV geschnitten und mit den entsprechenden Vektorpräparaten ligiert.

RV von V_H

Das amplifizierte V_H-Gen wurde mit den Enzymen *Pst*I und *Bst*EII und dem entsprechenden Puffer in einem Doppel-RV geschnitten. Die einzusetzende DNA-Menge ist abhängig von der Höhe der DNA-Produktion in der Amplifikation. Je Ansatz wurde die Hälfte der amplifizierten DNA verwendet. In Tabelle 15 ist der RV-Ansatz aufgeführt. Das Gemisch wurde bei 37 °C für 6 h inkubiert. Die Dauer der Inkubationszeit ergibt sich durch die Lage der Restriktionsstellen an den beiden Enden der V_H-Sequenz.
Die präparierten V_H-Regionen wurden über DNA-Gelelektrophorese (1 % Agarose) von Salzen und Enzymen getrennt und mit QiaEXII aus der Agarose isoliert.

Tabelle 15 Doppel-RV-Ansatz von V_H

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen (µl)
Puffer O^+	10x	1x	5
*Pst*I	10 U/µl	5 U	0,5
*Bst*EII	10 U/µl	5 U	0,5
DNA			X
H_2O dest.			ad 50

RV von V_L

Das Enzym *Xho*I benötigt die 2-fache Menge des Puffers von *Sst*I für optimale Bedingungen im RV. Deshalb wurde ein sequentieller RV (Tab. 16) zur Präparation des V_L-Gens angesetzt. Nach Inkubation des Ansatzes I bei 37 °C für 6 h wurde Ansatz II dazugegeben und bei 37 °C für weitere 6 h inkubiert.

Durch eine anschließende Gelelektrophorese (1 % (w/v) Agarosegel) wurde der RV-Ansatz gereinigt und die geschnittenen V_L-Gene mit QiaExII (Qiagen) aus der Agarose isoliert.

Tabelle 16 Sequentieller RV von V_L mit den RE *Sst*I und *Xho*I

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen (µl)
I Puffer M	10x	1x	5
*Sst*I	10 U/µl	5 U	0,5
DNA		1 µg	x
H_2O*			ad 50
II Puffer H	10x	1x	5
*Xho*I	10 U/µl	5 U	0,5
DNA (Mix aus I)			50
H_2O*			ad 50

RV von pASK99

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA von pASK99 wurden *E. coli* JM83-Zellen mit dem Vektor transformiert. Nach Übernachtkultur bei 30 °C auf LB-Amp-Agar wurde eine isolierte Einzelkolonie in LB-Amp-Medium bei 30 °C für 16 h kultiviert. Die anschließende Plasmidisolierung erfolgte mit Qiagen Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers.

Das Plasmid pASK99 wurde in zwei verschiedenen Ansätze mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Bst*EII bzw. *Sst*I und *Xho*I geschnitten. In jedem RV-Ansatz wurden 3 µl der Plasmidpräparation eingesetzt. Die beiden Reaktionen wurden wie bei V_H und V_L angesetzt. Die Inkubationszeiten konnten auf 3 h verkürzt werden, da eine zirkuläre DNA

vorlag. Nach dem RV wurden die unterschiedlichen Vektorpräparationen über Gelelektrophorese (0,7 % (w/v) Agarosegel) gereinigt und anschließend aus der Agarose mit QiaEXII (Qiagen) isoliert.

Ligation der variablen Regionen mit pASK99

Die 2-fach geschnittenen variablen Regionen und die entsprechenden Präparationen des Vektors pASK99 wurden jeweils in dem Verhältnis Vektor zu Insert 1:3 miteinander ligiert. Tabelle 17 zeigt den Ligationsansatz von V_H mit pASK99. Die Ligation der V_L-Region mit pASK99 wurde identisch durchgeführt. Die Reaktion ist in II, 2.1.1.6, S. 41 beschrieben. Das Endvolumen des Ligationsansatzes wurde je nach Volumen der gelösten DNA vergrößert. Eine Kontrolle ohne variable Region wurde jeweils mitgeführt, um den „Background", d.h. den Anteil an religiertem Vektor, zu bestimmen.

Tabelle 17 Ligationsansatz von V_H und pASK99

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen (µl)
pASK99		125 ng	x
V_H		375 ng	x
H_2O dest.			ad 10
Puffer	10x	1x	1
T4 DNA Ligase	5 Weiss-Units/µl	2,5 Units	0,5

Die Transformation von elektro-kompetenten JM83-Bakterien mit den ligierten Plasmiden pASK99-Fd und pASK99-Leichtkette wurde mit der Elektroporation durchgeführt. Hierfür wurde die DNA mit einer PCI-Extraktion und einer anschließenden EtOH-Präzipitation (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff) aufbereitet. Bei der Elektroporation wurden je Ansatz 100 µl kompetente JM83-Bakterien mit 1 µl DNA transformiert. Die Kontrolle mit Vektor-DNA und eine weitere Kontrolle ohne DNA zum Testen der kompetenten Bakterien wurden mitgeführt.

Nach Inkubation auf LB-Amp-Agar über Nacht bei 30°C erfolgte die Kultur von Einzelkolonien in LB-Amp-Medium für 16 h bei 30 °C. Die Plasmide der einzelnen Kolonien wurden mit Qiagen Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen) isoliert und durch

Sequenzieren auf das Klonierungsergebnis überprüft. Die Sequenzierung wurde von der Firma SequiServe (Vaterstetten) durchgeführt.

2.2.1.3 Ligation der Schwer- und Leichtketten in pASK99

Die Präparation von pASK99-Fd und pASK99-Leichtkette für die Ligation erfolgte im RV mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Hind*III. Bei dem Klon IPR-7 wurden die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Sst*I im RV verwendet, da die Erkennungssequenz von *Nco*I auf dem V_H-Gen von Klon IPR-7 lokalisiert ist. Die einzelnen Reaktionen wurden jeweils im Doppel-RV (s. II, 2.2.1.2, Tab. 15, S. 64) durchgeführt. Die verschiedenen Ansätze wurden über Gelanalyse (1 % (w/v) Agarosegel) aufgetrennt und die entsprechenden Banden mit QiaEXII aus der Agarose gelöst.
Die Ligation der herausgelösten Leichtketten-Fragmente und des 2-fach geschnittenen Vektors pASK99-Fd der Klone IPR-23 und IPR-53 erfolgte nach II, 2.2.1.2, Tab. 17, S. 66. Bei Klon IPR-7 wurde das Fd-Fragment mit dem entsprechend präparierten Vektor pASK99-Leichtkette ligiert. Die Ligation erfolgte wie in II, 2.2.1.2, Tab. 17 beschrieben. Nach PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff) wurden die ligierten Plasmide über Elektroporation in kompetente JM83 Bakterien eingeschleust. Nach Inkubation auf LB-Amp-Agar bei 30 °C für 12-16 h wurden je Klon 12 Kolonien in LB-Amp-Medium zur Expression kultiviert. Nebenbei erfolgten Plasmidisolationen der einzelnen Klone, um das Klonierungsergebnis mit Hilfe des RV zu überprüfen. Die Sequenzierung der klonierten F_{ab}-Fragmente einschließlich der Expressionskassette des Vektors pASK99 wurde von der Firma SequiServe (Vaterstetten) durchgeführt.

2.2.2 Bakterielle Expression der F_{ab}-Varianten in pASK99

1. Ausstrich des mit dem pASK99-Derivat transformierten *E. coli* K12-Stamms JM83 auf LB-Amp-Agar (100 µg/ml Ampicillin) und Übernachtinkubation bei 30 °C
2. Animpfung von 50 ml einer Übernachtkultur in LB-Amp-Medium (250 ml Kolben) mit einer frischen Einzelkolonie und Schüttelinkubation bei 30 °C und 250 rpm (ca. 16 h)
3. Animpfung von 2 l LB-Amp-Medium (2x 1 l Kolben) mit 40 ml der Übernachtkultur und Schüttelinkubation bei 22 °C und 200 rpm bis OD_{550} von 0,5 (ca. 3-5 h)
4. Induktion mit 20 µl Anhydrotetracyclin (20 mg/ml in DMF) unter Schütteln für 3-4 h

5. Zentrifugation der Zellen in Zentrifugenbecher (Sorvall GS3) bei 5000 rpm und 4 °C für 12 min
6. Abgießen des Überstandes und Abziehen von verbleibenden Flüssigkeitsresten mit einer Pipette

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

7. Resuspendieren der Zellsedimente in 20 ml 100 mM Tris/HCl ph 8,0, 0,5 M Saccharose, 1 mM EDTA (vorgekühlt) und Inkubation auf Eis für 30 min

8. Abzentrifugieren der Sphäroplasten bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min

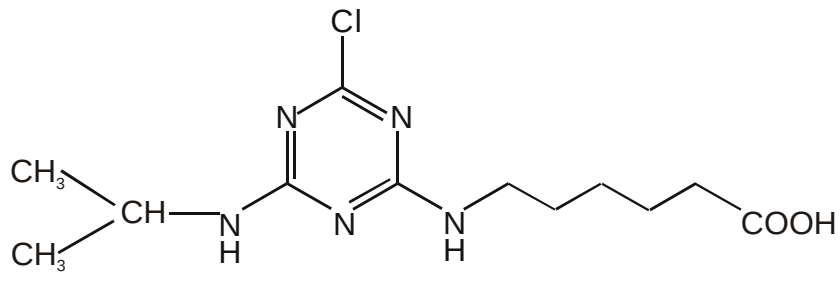
9. Klärung des Überstandes durch weitere Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4 °C für 15 min

10. Dialyse der periplasmatischen Zellfraktion in Dialyseschläuchen (Ausschlußgrenze 8000 Da) über Nacht bei 4 °C gegen 5 l 150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA

11. Sterilfiltration (0,2 µm) zur Abtrennung partikulärer Bestandteile des Periplasmaextraktes und Aufbewahrung bei –20 °C

2.2.3 *Screening* der exprimierten F_{ab}-Antiköper

Über Bindung an das immobilisierte, OVA-gekoppelte IPR-Derivat (Abb. 11) wurden die positiven Klone ermittelt.



2-Chlor-4-(6-aminohexansäure)-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin (IPR-Derivat)

Abbildung 11 Atrazin-Derivat IPR mit C6-Spacer

Folgender indirekter, kompetitiver ELISA (Abb. 12, S. 70) wurde für das *Screening* der exprimierten F_{ab}-Antikörper durchgeführt:

Beschichtung:	200 µl IPR-OVA (5 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht, 4 °C
1. Immunreaktion:	100 µl Atrazin (10.000 µg/l) bzw. PBS 100 µl Periplasmaextrakt (unverdünnt, 1:10, 1:100), 1 h, RT
2. Immunreaktion:	200 µl Ziege-anti-Maus-IgG-POD Konjugat (1:5.000), polyvalent, 1 h, RT
Farbreaktion:	200 µl POD-Substrat, 20-30 min, RT
Stoppen:	2 N H_2SO_4
Messung:	Absorption λ = 450 nm

Zwischen den einzelnen Inkubationen wurden 3-fache Waschschritte mit 10 mM PBS-Waschpuffer durchgeführt, um die ungebundenen Partikel aus den Kavitäten der Microtiterplatten zu entfernen.

2.2.4 F_{ab}-Enzymimmunoassay

Die sekretierten F_{ab}-Antikörper der im *Screening* ermittelten, positiven Klone wurden in einem direkten, kompetitiven ELISA (Abb. 13, S. 71) gemessen. Die periplasmatischen Extrakte mit den F_{ab}-Fragmenten wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Die Messung erfolgte über Chemilumineszenz im Luminometer. Der ELISA lief nach folgendem Schema ab:

Beschichtung:	150 µl Ziege-anti-Maus-IgG (5 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht, 4 °C
1. Immunreaktion:	150 µl Periplasmaextrakt (in PBS verdünnt) 1,5 h, RT
2. Immunreaktion:	100 µl Atrazin-Standardreihe (PBS, 0,01-10.000 µg/l) 50 µl IPR-POD-Konjugat (1,5 µg/ml), 1:32.000 in PBS 1 h, RT

Substratreaktion: 50 µl Pico Luminol/Enhancer Solution
50 µl Pico Stable Peroxide Solution

Messung: Lumineszenz in RLU (= relative luminescence units)

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgten 3-fach Waschschritte mit 10 mM PBS-Waschpuffer.

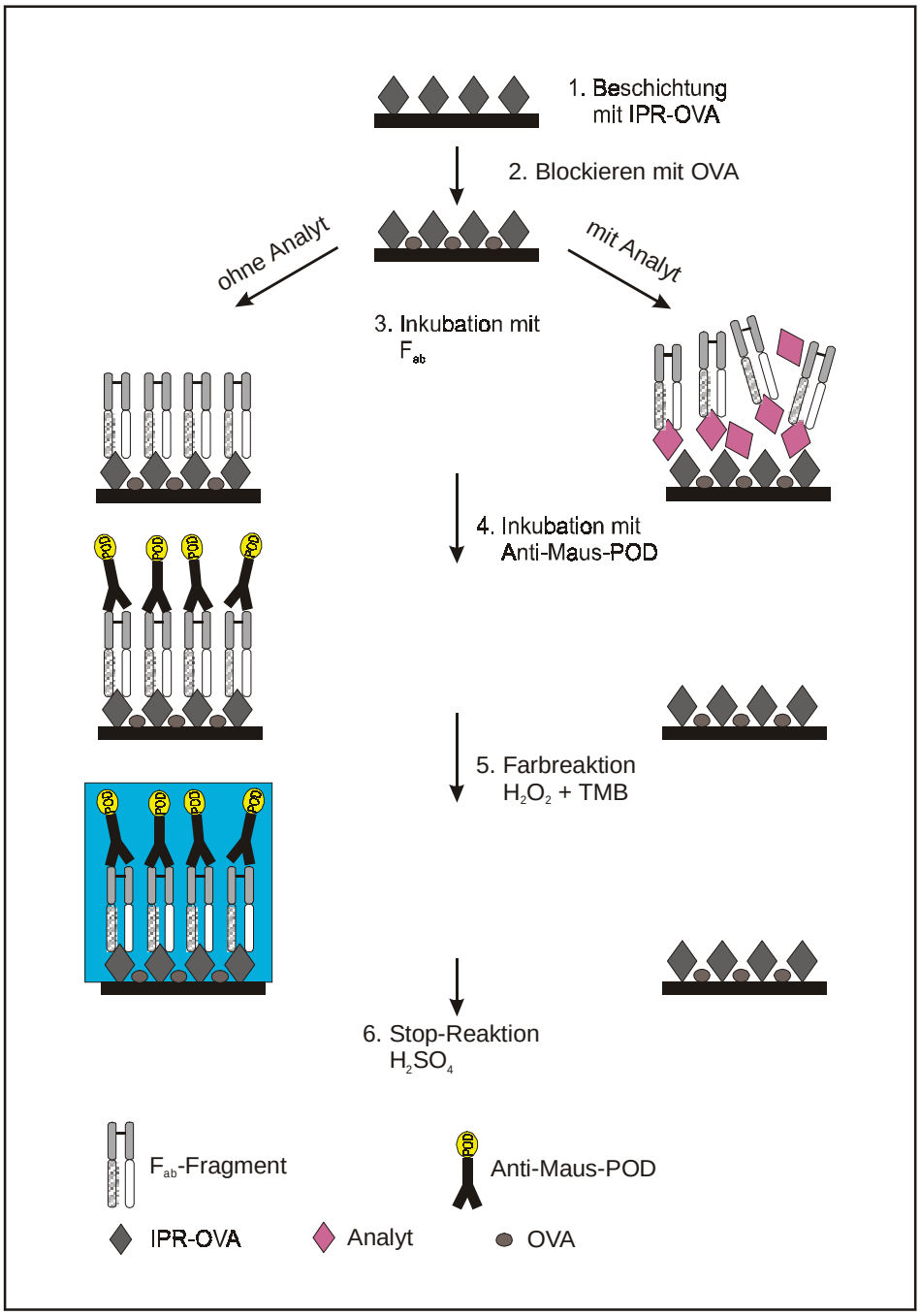


Abbildung 12 Schema für den indirekten, kompetitiven ELISA zum *Screening* der F_{ab}-Klone

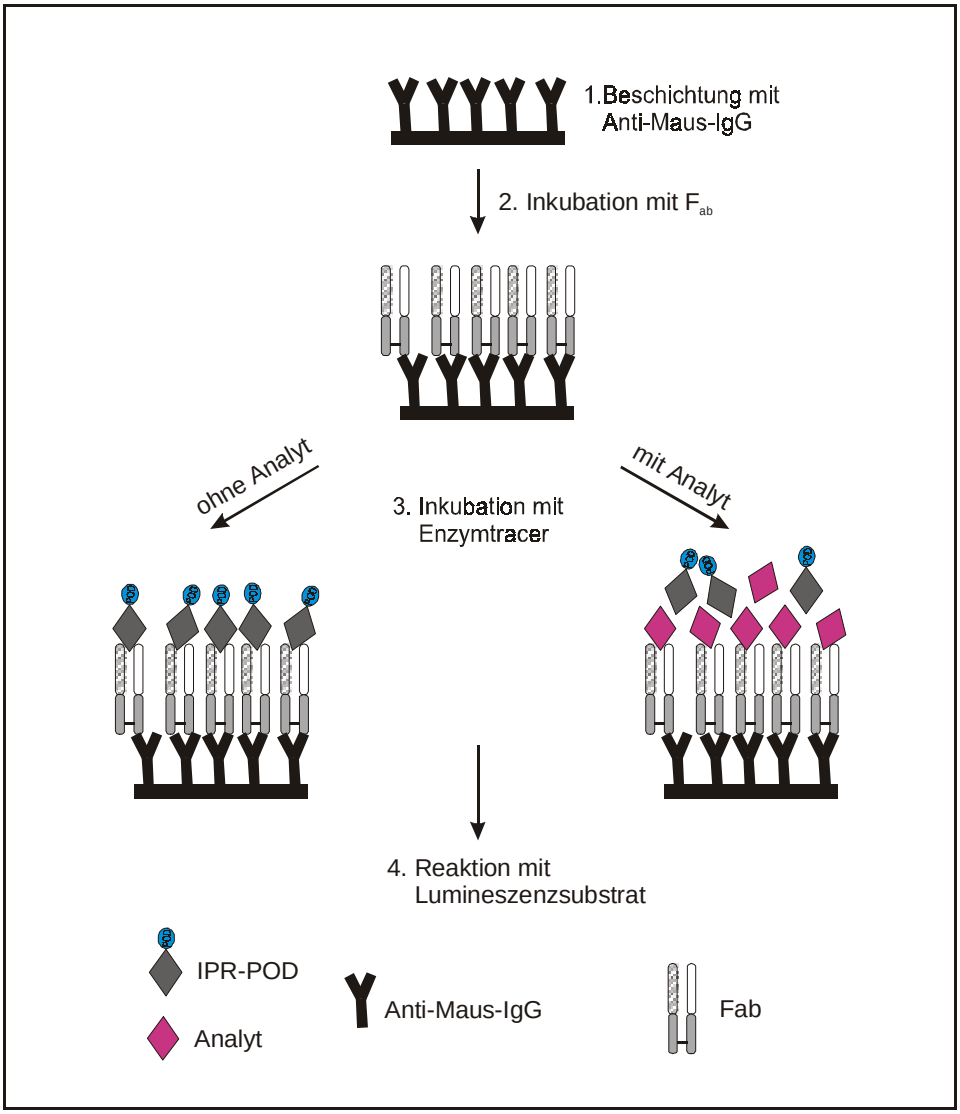


Abbildung 13 Schema für den direkten, kompetitiven F_{ab}-ELISA

2.2.4.1 Auswertung des F_{ab}-Enzymimmunoassay

Der F_{ab}-Enzymimmunoassays zeigte eine konzentrationsabhängige Reaktion. Die Auftragung der Lumineszenzwerte über der logarithmierten Atrazinkonzentration resultierte in einem sigmoiden Kurvenverlauf. Das 4-Parameter-logistische Modell (Rodbard und Hutt, 1974) wurde zum Anpassen der Kurve verwendet:

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

mit y = Lumineszenz

x = Konzentration des Analyten

a = maximale Lumineszenz

b = minimale Lumineszenz

c = Konzentration am Testmittelpunkt

d = Steigung am Testmittelpunkt

Zum Vergleich verschiedener ELISA-Kurven mußte eine Normierung der Daten durchgeführt werden. Diese erfolgte durch die Transformation der Meßwerte in % B/B_0-Werte:

$$(2) \qquad \%B/B_0 = \frac{A - A_0}{A_{max} - A_0} \times 100$$

mit A = Lumineszenzwert des Standards bzw. einer Probe

A_0 = Lumineszenzwert des Nullwertes (TBS)

A_{max} = Lumineszenzwert der maximalen Atrazin-Konzentration

Die $\%B/B_0$-Werte liegen zwischen 0 und 100 %. Der Bereich zwischen 20 und 80 $\%B/B_0$ wird als Meßbereich der Standardkurve definiert (Rodbard, 1971), wobei der 80 %-Wert die obere, der 20 %-Wert die untere Nachweisgrenze des ELISA darstellt. Als untere Bestimmungsgrenze ist die kleinste Stoffmenge definiert, die quantitativ bestimmt werden kann und sich signifikant vom Nullwert unterscheidet (Ebel und Kamm, 1983).

2.2.5 Reinigung und Konzentrierung der exprimierten F_{ab}-Fragmente

Die Aufreinigung der exprimierten F_{ab}-Fragmente erfolgte mit einem affinitätschromatographischen Verfahren. Immobilisiertes Streptavidin bindet reversibel die F_{ab}-Antikörper über das Strep-*Tag* II, alle übrigen Komponenten des Periplasmaextraktes werden nicht gebunden. Als Affinitätsmedium wurde Sepharose verwendet. Das bakteriell produzierte Core Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* bindet besser an das Strep-*Tag* II als kommerziell erwerbbares Streptavidin (Schmidt und Skerra, 1994a). Das Säulenmaterial wurde freundlicherweise von Prof. Skerra (Lehrstuhl für biologische Chemie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan) zur Verfügung gestellt.

2.2.5.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde bei 4 °C durchgeführt und mit einem Durchflussphotometer bei λ = 280 nm und einem daran gekoppelten Schreiber verfolgt.
Die Streptavidin-Affinitätssäule wurde mit dem 5-10 fachen Säulenvolumen an Laufpuffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH8, 1 mM EDTA) mit einer Flußrate von 20 ml/h equilibriert. Die aufbereitete periplasmatische Fraktion wurde über die Säule gepumpt und anschließend die Säule erneut mit dem 5-10 fachen Säulenvolumen an Laufpuffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Die Elution der gebundenen Fab-Fragmente erfolgte in Fraktionen mit 2,5 mM Desthiobiotin in Laufpuffer. Die Säule wurde mit 5 mM HABA regeneriert bis sie eine satt orangene Farbe annahm und anschließend mit Laufpuffer 60-90 min gespült, bis die orangene Farbe vollkommen ausgewaschen war. Die Lagerung der Säule erfolgte im Laufpuffer bei 4 °C.

2.2.5.2 Charakterisierung der gereinigten F_{ab}-Varianten im ELISA und über SDS-PAGE

Der Durchlauf und die eluierten Fraktionen wurden im indirekten, kompetitiven ELISA auf ihren F_{ab}-Gehalt und die Funktionalität der F_{ab}-Fragmente getestet. Die Durchführung des ELISA lief wie in II, 2.2.3, S. 68f beschrieben ab.
Der Reinheitsgrad der verschiedenen, F_{ab}-enthaltenden Fraktionen wurde elektrophoretisch (SDS-PAGE) mit einem 10,5 %igem Polyacrylamidgel überprüft. Die einzelnen Proben, die Periplasmafraktion und der Säulendurchlauf wurden in reduzierendem Probenpuffer 3:1 verdünnt und je 8 µl auf das Gel neben einem Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V bei RT. Das Gel wurde anschließend mit Silberfärbung ausgewertet (s. II, 2.1.4.2., S.57).

2.2.5.3 Konzentrierung der F_{ab}-Fragmente

Eluate mit löslichen F_{ab} Antikörpern wurden gegen PBS über Nacht dialysiert und mittels Ultrafiltration konzentriert. Der Konzentrierungsschritt erfolgte mit Hilfe einer Rührzelle mit einer Membran von 10 kDa Ausschlußgrenze. Die zu konzentrierende Probe wurde dabei unter Druck von 2 bar durch die Membran gedrückt. Moleküle größer 10 kDa wurden von der Membran zurückgehalten. Alle Substanzen kleiner 10 kDa gingen ungehindert durch die Membran. Somit gelang es, die F_{ab}-Moleküle (Molekulargewicht

~50 kDa) im Konzentrat zurückzuhalten. Ein Verstopfen der Membran wurde durch einen Magnetrührer in der Rührzelle verhindert. Die Konzentrierung wurde auf Eis durchgeführt.

2.2.5.4 Konzentrationsbestimmung im BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der aufgereinigten F_{ab}-Antikörper erfolgte mit Hilfe des Bicinchinonsäure-Tests (Smith et al., 1985). Unter akalischen Bedingungen reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{1+} (Biuret-Reaktion). Kupfer (I)-Ionen bilden mit Bicinchinonsäure einen violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden Standardreihen von BSA (0,01-100 µg/l) angesetzt. Jeweils 10 µl der Standards bzw. der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf eine Mikrotiterplatte zusammen mit jeweils 200 µl Kupfer-BCA-Lösung (1 Teil $CuSO_4$-Lösung zu 50 Teile Bicinchinonsäurelösung) aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Die resultierende Absorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Anhand der BSA-Standards wurden die Proteingehalte der F_{ab}-Lösungen errechnet. Nach Abzug der Absorption des Leerwertes von den Absorptionsmittelwerten der einzelnen Standards wurden die absoluten Absorptionsmittelwerte gegen die Proteinstandards aufgetragen und eine Standardkurve gebildet. Anhand dieser Geraden konnte die Proteinmenge der aufgetragenen Probe bestimmt werden. Die Konzentration der aufgetragenen Probe wurde mit Hilfe der Software ICN, EIA 3 ermittelt. Die Konzentration des Proteins in mg/ml ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$(3) \qquad \frac{\text{mg Protein} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{ml eingesetzte Probe}}$$

2.2.6 F_{ab}-Charakterisierung mit BIAcore Biosensor

Die Interaktionen zwischen F_{ab}-Antikörper und Ligand wurden mittels eines optischen Biosensors (BIAcore 2000^{TM}) mit dem Sensorchip CM5 gemessen. Als Laufpuffer kam 10 mM PBS zum Einsatz, dem zur Verminderung unspezifischer Bindungen 0,005 % Tween zugesetzt wurde.

2.2.6.1 Präparation des Sensorchips

Für die kovalente Kopplung des Liganden IPR-OVA (vgl. II, 2.2.3, Abb. 11, S. 68) an den Sensorchip CM5 wurde die Aminkopplungsmethode verwendet. Dabei wurden die Carboxylgruppen des Carboxydextrans des Sensorchips mit Hilfe einer Mischung von wasserlöslichen N-Ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und durch Zugabe von N-Hydroxysuccimid (NHS) in einen reaktiven Ester umgewandelt. Proteine können über freie NH_2-Gruppen an den NHS-Ester gebunden werden.
Die Aktivierung der Dextranoberfläche des Chips erfolgte durch Injektion von 30 µl einer äquimolaren Mischung aus NHS (0,1 M in Aqua dest.) und EDC (0,1 M in Aqua dest.). Für die Messung wurden 2 der 4 parallelen Messkanäle auf der Messzelle verwendet. Das Kopplungskonjugat IPR-OVA war in Kopplungspuffer (0,1 mg/ml in 10 mM Na-Format, pH 3,5) gelöst, und 400 µl von der Lösung wurden bei einer konstanten Flussrate von 10 µl/min in den ersten Messkanal appliziert. Eine spezifische Oberfläche mit 4125 RU (refractive unit) wurde präpariert. Die Maßeinheit RU entspricht der an der Sensorchipoberfläche gebundenen Substanzmenge (1000 RU entsprechen dabei 1 ng/mm^2). Der zweite Meßkanal diente als Referenzkanal. Dafür erfolgte die Kopplung von OVA (0,01 mg/ml in Kopplungspuffer) an die Oberfläche schrittweise durch repetitive Injektionspulse (20 s) bei einer konstanten Flussrate von 10 µl/min. Dabei wurde darauf geachtet, daß in der Mess- und Kontrollspur die gleiche Menge an spezifischem bzw. unspezifischem Protein immobilisiert wurde. Nach der Immobilisierung wurde die restliche Menge an NHS-Ester durch Injektion von 30 µl 1M Ethanolamin, pH 8,5, deaktiviert.

2.2.6.2 Ermittlung der Affinitätsdaten der F_{ab}-Antikörper

Die F_{ab}-Antikörperlösungen wurden vor der Anwendung im Biosensor mit Laufpuffer 1:5 verdünnt. Vier Konzentrationen je F_{ab}-Klon wurden für die Messungen verwendet, nämlich 100 %, 75 %, 50 % und 25 % der F_{ab}-Stammlösungen. Je 130 µl der F_{ab}-Konzentrationen wurden bei einer konstanten Flussrate von 10 µl/min injiziert. Der Verlauf der Sensorgramme wurde aufgezeichnet und anschließend die Kinetikdaten mit Hilfe der BIAevaluation Software (Version 2.1) errechnet. Der Sensorchip wurde nach jedem Lauf mit Elutionspuffer regeneriert.

2.3 Konstruktion des scFv(K47H)-aP Fusionsproteins

Die Konstruktion des Fusionproteins aus dem Atrazin spezifischen scFv-Antikörper K47H (Kramer und Hock, 1996a) und dem Enzym alkalische Phosphatase (aP) aus *E. coli* erfolgte in dem Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994b). Das scFv-aP-Konstrukt wurde in dem transformierten *E. coli* Stamm JM83 mit Hilfe des Vektors vermehrt und exprimiert. Die Eigenschaften des pASK75-Vektors (Abb. 14) entsprechen denen des Vektor-Derivats pASK99 (vgl. II, 2.2, Abb. 8, S. 59). Jedoch enthält pASK75 eine *multiple cloning site* (MCS) mit anderen RE, das Affinitätspeptid Strep-*Tag* und keine murinen konstanten Domänen.

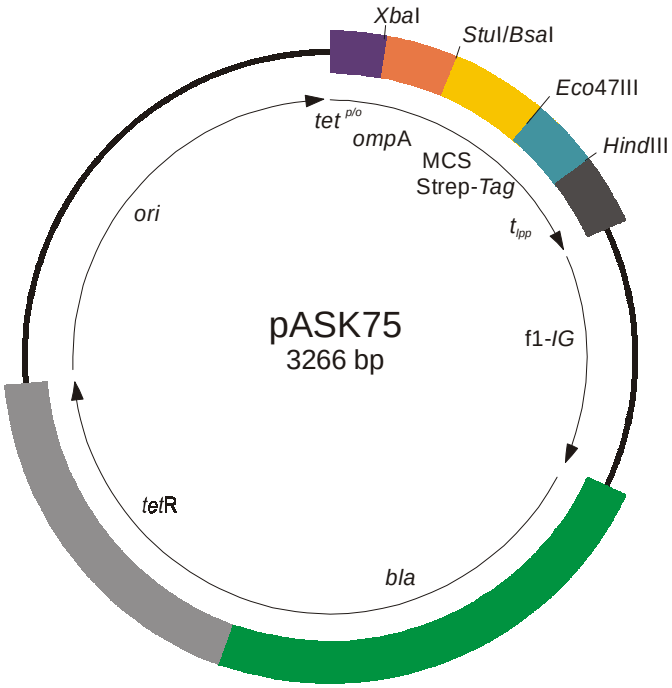


Abbildung 14 Expressionsvektor pASK75

Die Klonierung des Fusionsgens (Abb. 15, S. 77) wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst erfolgte die Klonierung des amplifizierten aP-Gens in den Expressionsvektor pASK75 über die Restriktionsstellen *Eco*47III und *Sal*I in der MCS des pASK75-Vektors. Das aP-Gen wurde *upstream* an die Sequenz des Strep-*Tag*s eingefügt. Der zweite Schritt umfasste die Klonierung des amplifizierten scFv-Gens an die 5'-Seite der aP Sequenz. Hierbei wurde das Antikörperfragment über die Restriktionsstellen *Xho*I und *Sal*I in den Expressionsvektor inseriert.

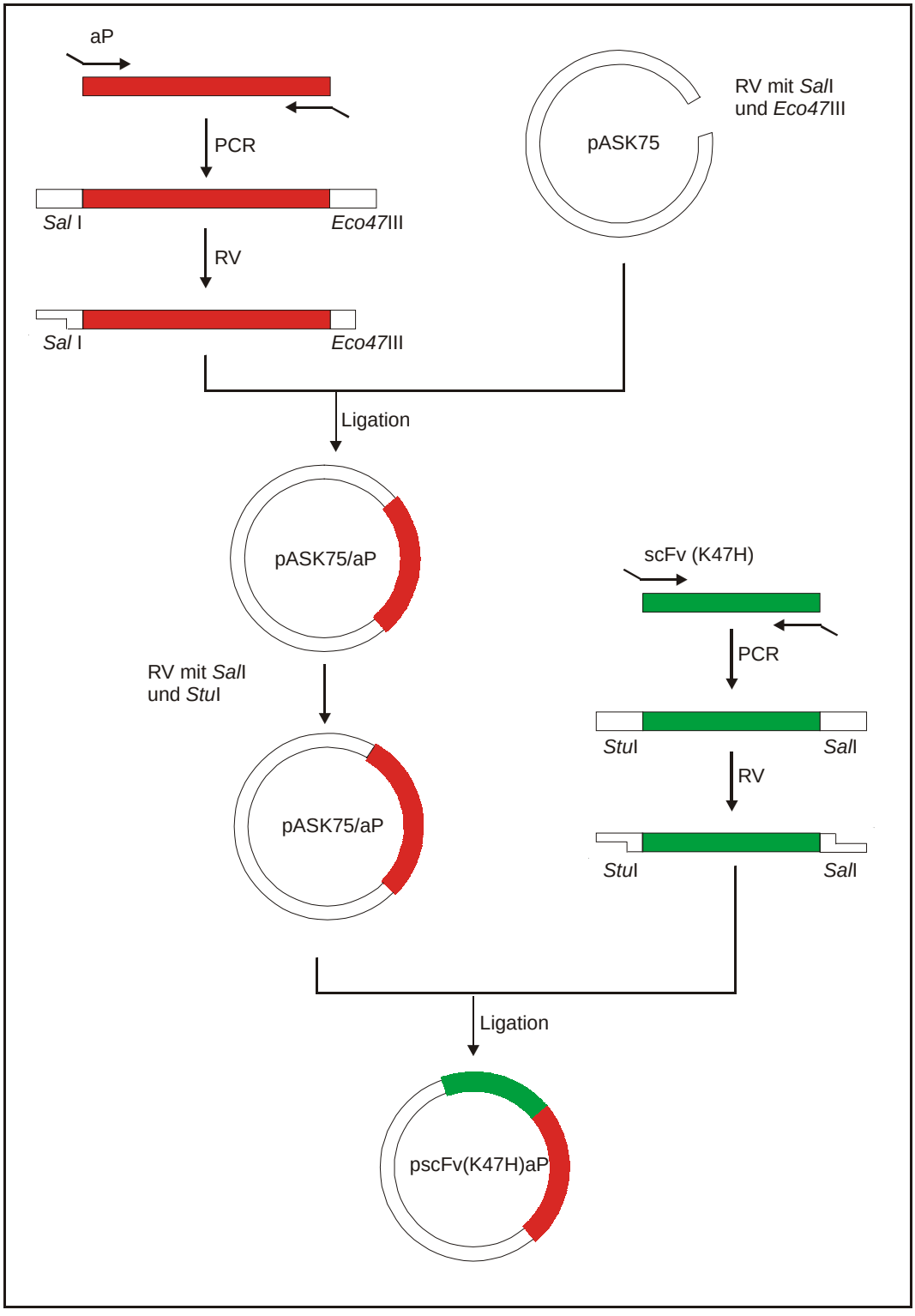


Abbildung 15 Klonierungsschema für das scFv-aP-Fusionsprotein

2.3.1 Die Klonierung der aP in pASK75

Die Umklonierung des Gens der alkalischen Phosphatase aus dem Klonierungsvektor pPHOA4 in den Expressionsvektor pASK75 wurde in zwei Hauptschritten durchgeführt. Zuerst erfolgte die Aufbereitung des Vektors pASK75, d.h. Transformation in den *E. coli*-Stamm JM83 zur Vermehrung, Plasmidisolation und Linearisierung des Plasmids durch den RV den beiden für die Klonierung bestimmten Restriktionsstellen der Enzyme *Sal*I und *Eco*47III. Anschließend wurde der Vektor pPHOA4 in den *E. coli*-Stamm DH5α kloniert, das Plasmid isoliert und das aP-Gen mit Hilfe der PCR amplifiziert. An das Amplifikat waren durch die Primer der PCR die gleichen Restriktionssequenzen angefügt worden. Nach dem RV mit den beiden Enzymen *Sal*I und *Eco*47III entstanden kompatible Enden, die zur Ligation zwischen dem aP-Gen und dem linearisierten pASK75-Vektor dienten. Das ligierte Plasmid pASK75/aP wurde in den Bakterienstamm JM83 transformiert, isoliert und durch einen RV auf Länge und Inhalt überprüft.

2.3.1.1 Aufbereitung von pASK75 für die Ligation

Der Expressionsvektor pASK75 wurde für diese Arbeit freundlicherweise von Prof. Skerra (Lehrstuhl für Biologische Chemie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München) zur Verfügung gestellt. Das isolierte Plasmid wurde zur Vermehrung in den Bakterienstamm JM83 mit der $CaCl_2$-Methode transformiert. Der pASK75-Vektor lag in einer Konzentration von 20 ng/µl vor. Zur Transformation wurden 1,5 ng DNA auf 50 µl Bakterien verwendet.

Zur Weiterbearbeitung und Überprüfung des Plasmids in den transformierten Bakterien wurde eine gut isolierte Einzelkolonie des Transformationsansatzes in LB-Amp-Medium bei 30 °C und 250 rpm für 12-16 h inkubiert und das Plasmid mittels Qiagen Plasmid Purification Mini Kit nach der Anleitung des Herstellers isoliert. Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Anschließend erfolgte ein RV des Vektors mit den RE *Eco*47III und *Sal*I. Die Komponenten des Restriktionsansatzes sind in Tabelle 18 aufgelistet. Die Plasmid-DNA wurde für 2, 3 und 4 h bei 37 °C inkubiert. Der linearisierte pASK75-Vektor wurde zur Überprüfung und Aufreinigung in einem präparativen 0,7 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Länge der DNA-Banden wurde anhand des Markers II bestimmt. Die Banden wurden aus dem Gel mit QiaEXII isoliert.

Tabelle 18 Doppel-RV-Ansatz von pASK75

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen (µl)
Puffer O^+ (MBI Fermentas)	10x	1x	5
Eco 47 III	10 U/µl	5 U	0,5
Sal I	10 U/µl	5 U	0,5
DNA			3
H_2O dest.			ad 50

2.3.1.2 Amplifikation des aP-Gens aus pPHOA4

Der Vektor pPHOA4 (Abb. 16) mit dem aP-Gen wurde freundlicherweise von Dr. Schmidt-Dannert (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt.

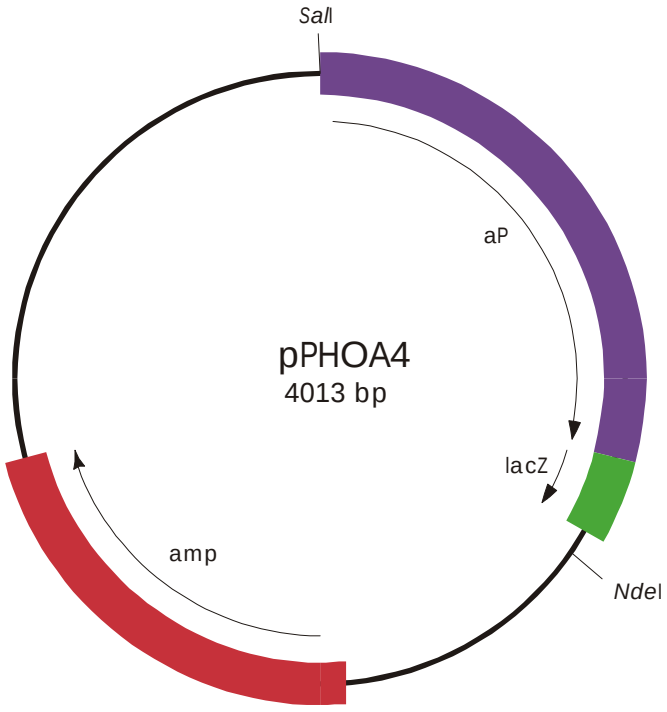


Abbildung 16 Klonierungsvektor pPHOA4

Transformation von pPHOA4 in DH5α

Zur Aufbewahrung und Vermehrung wurde der Klonierungsvektor pPHOA4 mit dem Gen der aP in den *E. coli*-Stamm DH5α^+ transformiert. Diese Transformation wurde mit der $CaCl_2$-Methode durchgeführt Der zu transformierende Vektor lag in einer Konzentration von 20 ng/µl vor. Die nötige Arbeitskonzentration von 1 ng/µl wurde zu 50 µl kompetente DH5α^+-Bakterien gegeben. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Amp-Agar in seriellen Zehnfach-Verdünnungen ausgebracht. Eine Kontrolle ohne DNA wurde mitgeführt, um ein Auftreten von Fremdplasmiden mit dem Ampicillin-Resistenz-Gen zu überprüfen. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung (s. II, 2.3.1.1, S. 78) einer isoliert gewachsenen Bakterienkolonie. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

PCR-Amplifikation des aP-Gens

Zur Vervielfältigung der aP-Sequenz und zum Anfügen der Restriktionsstellen *Sal*I und *Eco*47III wurde eine PCR mit dem Plasmid pPHOA4 als Template durchgeführt. Der Ansatz ist in Tabelle 19 (S. 81) wiedergegeben. Eine Kontrolle ohne Template wurde mitgeführt, um Fehlamplifikationen auszuschließen. Das Zeit-Temperatur-Profil aus II, 2.1.1.3, Tabelle 5, S. 37 wurde mit einer Annealingtemperatur von 61 °C und einer Zyklenzahl von 25 abgeändert. Die PCR und die nachfolgende Reinigung der Amplifikate über ein 0,8 %iges Agarosegel erfolgte wie in II, 2.1.1.3, S. 36 beschrieben.

RV des amplifizierten aP-Gens

Das amplifizierte aP-Gen wurde in einem RV an den Restriktionsstellen *Sal*I und *Eco*47III geschnitten. Der Ansatz erfolgte wie in II, 2.3.1.1, Tabelle 18, S. 79. Da bei dem Amplifikat die Schnittstellen direkt an beiden Enden des DNA-Fragments lokalisiert sind, können sich die Restriktionsenzyme weniger leicht an die Erkennungssequenzen anlagern. Aus diesem Grund wurde die Inkubationszeit der Enzyme auf 6 h bei 37 °C verlängert. Anschließend erfolgte eine Gelanalyse (0,8 % Agarose) und die Aufreinigung der geschnittenen aP-Banden aus dem Gel mit QiaEX II.

Tabelle 19 PCR-Ansatz zur Amplifikation des aP-Gens

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer	5	1x
25 mM $MgCl_2$	3	1,5 mM
dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	4	je 200 µM
PHOABACK**	1	0,1 nM
PHOAFOR**	1	0,1 nM
Template-DNA	10	1 ng
H_2O*	ad 50	-
TaqPolymerase (1:10)	5	2,5 Units

**Die exakten Sequenzen der aP-spezifischen Primer sind in II, 1.7, Tabelle 1, S. 19 verzeichnet.

2.3.1.3 Ligation der aP mit pASK75

Nach dem RV von pASK75 und dem aP-Fragment lagen je ein "sticky end" an den *Sal*I-Sequenzen und ein "blunt end" an den *Eco*47III-Sequenzen vor. Die Ligation von Fragmenten mit "blunt ends" ist im allgemeinen weniger effektiv (Sambrook et al., 1989). Deshalb wurde unter diesen Bedingungen die Konzentration an zugegebener T4 DNA-Ligase bei der Ligation auf 5 Weiss-Units gegenüber den üblich eingesetzten 2,5 Weiss-Units erhöht. Die Ligation des linearisierten Vektors pASK75 und dem aP-Insert erfolgte in dem Verhältnis Vektor zu Insert 1:3 nach II, 2.1.1.6, S. 41. Eine Kontrolle ohne aP-Insert wurde mitgeführt, um den Anteil an religiertem Vektor zu bestimmen.

Die Transformation von elektro-kompetenten JM83-Bakterien mit dem ligierten pASK75/aP-Plasmid und dem Kontrollansatz erfolgte über Elektroporation (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff). Hierfür wurde die DNA mit einer PCI-Extraktion und einer anschließenden EtOH-Präzipitation (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff) aufbereitet. An die Elektroporation schloß sich die Plasmidisolation von Einzelkolonien des Transformationsansatzes. Der Ansatz wurde in seriellen 10-fach Verdünnungen auf LB-Amp-Agar ausplattiert und bei 30 °C für 12-16 h inkubiert. Die Einzelkolonien wurden in LB-Amp-Medium für 16 h bei 30 °C kultiviert und deren Plasmide mit Qiagen Plasmid Purification Mini Kit isoliert. Die Analyse erfolgte über Gelelektrophorese in einem 0,8 %iges Agarose-Gel.

2.3.2 Klonierung des scFv-Fragments

Das scFv(K47H)-Gen wurde aus dem Vektor pCANTAB 5E amplifiziert und in den pASK75/aP-Vektor an das 5'-Ende des aP-Gens inseriert. Zuerst erfolgte die Plasmidisolation des pCANTAB 5E-Vektors (s. II, 2.1, Abb. 5, S. 32) mit anschließender Amplifikation des scFv-Fragments unter Anfügung der Klonierungsstellen *Sal*I und *Stu*I. Durch nachfolgenden RV des amplifizierten aP-Gens und des Vektors pASK75/aP mit den beiden Restriktionsendonukleasen entstanden die zur Ligation nötigen kompatible Enden. Der Bakterienstamm JM83 wurde mit dem ligierten Plasmid pscFvaP transformiert, das Plasmid isoliert und durch einen RV auf Länge und Inhalt überprüft.

2.3.2.1 Amplifikation von scFv aus pCANTAB 5E

TG1 Bakterien mit dem pCANTAB 5E(K47H)-Plasmid wurden in 2xYT-AmpGluc-Medium bei 30 °C und 250 rpm kultiviert. Die Plasmidisolation erfolgte mit Qiagen Plasmid Purification Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers.

Die PCR wurde wie in II, 2.3.1.2, Tab. 19, S. 81 durchgeführt. Mit den eingesetzten Primern scFvBACK und scFvFOR wurden die Restriktionsstellen *Sal*I und *Stu*I an das scFv-Gen angefügt. Die Primer enthielten zusätzlich die Erkennungssequenzen der in der rekombinanten Antikörpertechnologie häufig verwendeten RE *Sfi*I und *Not*I. Eine Template-Konzentration von 10 ng wurde eingesetzt. Das Zeit-Temperatur-Profil war identisch mit dem der aP, nur die Annealingtemperatur wurde auf 50 °C verändert. Eine präparative Gelanalyse (1 % Agarose) folgte mit anschließender Isolation der DNA-Banden aus dem Gel mit Hilfe des QIAEX II Kits.

Das amplifizierte scFv-Fragment wurde in einem sequentiellen RV mit den RE *Sal* I und *Stu* I unter Aufstockung der Puffersalze an den Klonierungsstellen geschnitten. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 20 (S. 83) aufgeführt. Die Inkubation der Ansätze I und II erfolgte nacheinander für ca. 8 h je Ansatz bei 37 °C. Der RV wurde mit einer Gelelektrophorese (1 % Agarose) analysiert und die DNA-Banden von der Agarose mit QiaEX II gereinigt.

Tabelle 20 Sequentieller RV von scFv(K4E7)

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen (µl)
I Puffer B^+	10x	1x	5
*Stu*I	10 U/µl	5 U	0,5
DNA			x
H_2O*			ad 50
II Puffer O^+	10x	1x	5
*Sal*I	10 U/µl	5 U	0,5
Tris	1 M	20 mM	2
NaCl	2,5 M	25 mM	2
DNA (Mix aus I)			50
H_2O*			ad 100

2.3.2.2 Aufbereitung des Vektors pASK75/aP

Mit einem sequentiellen RV-Ansatz (s. II, 2.3.2.1, Tab. 20) wurde das Plasmid pASK75/aP mit den Enzymen *Sal*I und *Stu*I linearisiert. Die Reaktion wurde mit 1,5 µl DNA angesetzt. Nach einer Gelanalyse (0,7 % Agarose) wurden die Banden aus den Agaroseblöcken isoliert.

2.3.2.3 Ligation von pASK75/aP und scFv(K47H)

Das 2-fach geschnittene scFv-Fragment wurde mit dem 2-fach geschnittenen Plasmid pASK75/aP an den Restriktionsstellen *Sal*I und *Stu*I ligiert. Ligationsansatz und Reaktion wurden wie in II, 2.1.1.6, S. 41 durchgeführt.

Die Ligation wurde mit einer PCI-Extraktion und anschließender EtOH-Präzipitation (s. II, 2.1.1.7, S. 41ff) aufbereitet. Die Elektroporation erfolgte nach II, 2.1.1.7, S. 41ff mit kompetenten JM83 Bakterien. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Amp-Agar für 12-16 h bei 30 °C inkubiert. Acht isolierte Klone wurden zur weiteren Analyse ausgewählt, die Plasmide pscFvaP isoliert und nach einem RV mit den Enzymen *Sal*I und *Stu*I auf Länge des Inserts überprüft. Die Fragmentlängen wurden anhand des Markers II in einem 0,8 %igem Agarosegel bestimmt.

Die Sequenzierung von vier Plasmiden wurde von der Firma SequiServe (Vaterstetten) übernommen.

2.3.3 Expression und *Screening*

Die Expression des scFv-aP-Fusionsproteins erfolgte nach II, 2.2.2, S. 67. Aus je 50 ml Bakterienkultur wurden 2 ml Periplasmaextrakt gewonnen. Nach Dialyse gegen 100 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA wurde der Periplasmaextrakt in einem indirekten, kompetitiven ELISA (Abb. 17) getestet.

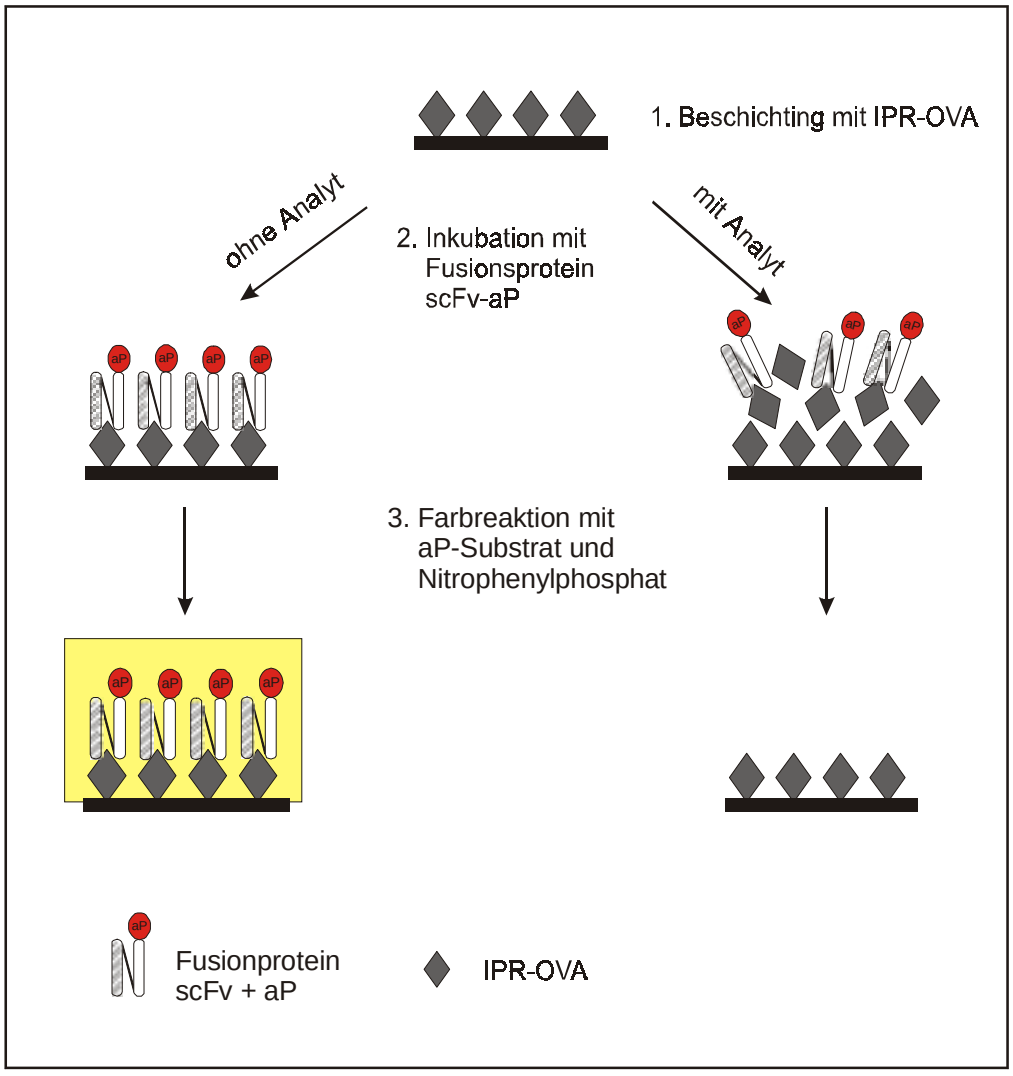


Abbildung 17 Schema des indirekten, kompetitiven ELISAs für das scFv-aP-Fusionsprotein

Da es sich um einen heterogenen Assay handelt, war nach jedem Inkubationsschritt ein Waschschritt nötig. Die Mikrotiterplatte wurde dazu dreimal mit 350 µl TBS-Waschpuffer je Kavität in einem ELISA-Waschautomaten gewaschen. Die aP-Reaktion wird durch Zugabe des aP-spezifischen Substrats hervorgerufen. Bei der Umsetzung des Substrats 4-Nitrophenylphosphat entsteht durch Abspaltung des Phosphats das gelbgefärbte Nitrophenol, dessen Farbintensität als Maß für die Enzymaktivität steht und bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wird. Die Volumenangaben verstehen sich stets pro Kavität. Verdünnungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in 50 mM TBS, pH 7,2, vorgenommen.
Folgende Reaktionsschritte waren erforderlich:

Coaten:	200 µl IPR-OVA (5 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht, 4 °C
Immunreaktion:	100 µl Atrazin (10.000 µg/l) bzw. TBS 100 µl Periplasmaextrakt (unverdünnt, 1:10, 1:100), 1h, RT
Enzymreaktion:	200 µl aP-Substrat mit 0,5 mg/ml *p*-Nitrophenylphosphat
Messung:	Photometer λ = 405 nm

2.3.4 Aufreinigung des Fusionsproteins

Zwei Methoden zur Aufreinigung des Fusionsproteins aus dem dialysierten Periplasmaextrakt wurden durchgeführt. Die Streptavidin-Affinitätschromatographie beruht auf der Affinität des Strep-*Tag*s zu Streptavidin. Das Strep-*Tag* ist an das 3'-Ende des Fusionsgens gekoppelt. Bei der Atrazin-Affinitätschromatographie wird die Affinität des scFv(K47H) zu Atrazin genutzt.

2.3.4.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die Chromatographie wurde wie in II, 2.2.5.1, S. 72 beschrieben durchgeführt. Nach der Elution wurden 2 ml-Fraktionen aufgefangen und sowohl im ELISA (s. II, 2.3.3, S. 68f) als auch im SDS-PAGE (s. II, 2.1.4.2, S. 57) überprüft.

2.3.4.2 Affinitätschromatographie mit Atrazin

Hierbei diente die Affinität des scFv(K47H)-Antikörpers gegenüber Atrazin zur Aufreingung des Fusionsproteins. Es wurde ein Niederdruckchromatographiesystem mit UV-Detektor und Schreiber verwendet. Ein Säule mit dem Volumen von 2 ml EAH-Sepharose wurde präpariert. Die Sepharose wurde nach den Angaben des Herstellers zur Kopplung aufbereitet. An 10 µM Aminogruppen/ml EAH-Sepharose wurde das Atrazin-Derivat IPR (s.. II, 2.2.3, Abb. 11, S.68) im 100-fachen Überschuß gekoppelt. Die Kopplung erfolgte über CMC, das in der gleichen Molarität wie der Ligand zugegeben wurde. Unter Rotationsinkubation bei Raumtemperatur erfolgte mit 0,5 M HCl eine pH-Wert-Kontrolle (pH 5,5-6) über 1 h. Nach anschließender Rotatonsinkubation über Nacht bei RT wurde die Sepharose abzentrifugiert und 4 mal unter pH-Wechsel (0,1 M Acetat-Puffer, pH 4,5, 0,1 M Tris/HCl, ph 8,3) gewaschen. Vor dem Bepacken der Säule wurde das Gel nochmals zweimal mit PBS gewaschen; das Säulenmaterial wurde in PBS mit 0,02 % NaN_3 gelagert. Die Chromatographie erfolgte bei 4 °C. Die Atrazin-Säule wurde mit dem 5-10-fachen Säulenvolumen an Bindungspuffer (80 mM PBS, pH 7,4) äquilibriert. Mit 0,3 ml/min wurde der dialysierte Periplasmaextrakt über die Säule gepumpt und anschließend die Säule erneut mit dem 5-10-fachen Volumen an Bindungspuffer gewaschen, bis das UV-Signal das Ausgangsniveau erreicht hatte. Die Elution der gebundenen scFv(K47H)-aP-Moleküle erfolgte mit 1,5 M Glycin/HCl, pH 2,5. Es wurden 2 ml-Fraktionen aufgefangen. Durchlauf und Eluate wurden im ELISA auf ihren Gehalt an Fusionsproteinen überprüft.

2.3.5 Westernblot zur Proteincharakterisierung

Für die Charakterisierung des exprimierten Fusionsproteins wurde ein Westernblot durchgeführt. Zunächst wurde dabei der Periplasmaextrakt durch eine SDS-Gelelektrophorese mit einem 10,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Der Periplasmaextrakt wurde in Probenpuffer 3:1 verdünnt und so auf das Gel aufgetragen, daß nachfolgend in der Mitte das Gel geteilt werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V bei RT. Nach Teilung des Gels wurde ein Teil mit Silbertnitrat (s. II, 2.1.4.2, S. 57) gefärbt, der andere Teil für einen Westernblot verwendet. Der Westernblot wurde wie in II, 2.1.4.3, S. 58 durchgeführt.

Die einzelnen Arbeitsschritte für die immunchemische Färbung der Membran sind nachfolgend dargestellt:

1. Blockieren:	Absättigung freier Bindungsstellen mit 3 % BSA-TBS; 1h, RT, Schüttler
2. Blockieren:	Absättigung der Biotincarrier-Proteine des Cytoplasmas mit 2 µg/ml Avidin in TBS; 10 min, RT, Schüttler
Affinitätsreaktion:	Inkubation mit Streptavidin-POD; 1:3000 in TBS, 1h, RT, Schüttler
Substratreaktion:	Zugabe von POD-Substrat für Westernblot (enthält Dextransulfat für die Immobilisierung des Farbstoffs auf der Membran), Inkubation 5-10 min, abstoppen mit H_2O dest.

Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils dreimal mit TBS, 0,03 % Tween, gewaschen

2.3.6 ScFv(K47H)-aP-Enzymimmunoassay

Um die Funktionalität des Fusionsproteins zu überprüfen, wurde der indirekte, kompetitive ELISA aus II, 2.3.3, S. 84f. verwendet. Für die Kompetition wurden eine Atrazin-Standardreihe (0,1-10.000 µg/l) und PBS als Kontrolle eingesetzt. Der Periplasmaextrakt wurde vor dem Einsatz im ELISA in einer Rührzelle mit der Ausschlußgrenze von 50 kDA aufkonzentriert und von kleineren Proteinen gereinigt. Der Periplasmaextrakt wurde in einer Verdünnung von 1:100 in TBS eingesetzt. Die Messung erfolgte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Enzymreaktion.

2.3.6.1 Auswertung des scFv-aP-Enzymimmunoassays

Die Auswertung der scFv-aP-Enzymimmunoassays erfolgte wie in II, 2.2.4.1, S. 71, wobei hier die Absorptionswerte verrechnet wurden.

2.3.6.2 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Das Bindungsverhalten des Fusionsproteins an das IPR-OVA Konjugat wurde auch in Gegenwart von acht verschiedenen *s*-Triazinen untersucht. Zur Ermittlung dieser Kreuzreaktvitäten wurden Standardlösungen von Atrazin und der zu untersuchenden

Substanzen Amethryn, Desethylatrazin, Deisopropylatrazin, Propazin, Simazin, Terbuthylazin, Dichloroatrazin und Dichlorosimazin in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000 µg/l angesetzt. Der Test erfolgte nach II, 2.3.3, S. 84. Die Kalibrationskurven wurden mit Hilfe der 4-Parameter-Logistik erstellt.
Im Anschluss daran wurde die Konzentration von Atrazin (C_1) und der zu untersuchenden Substanz (C_2) am Testmittelpunkt (50 %B/B_0) der Kalibrationskurven ermittelt und der Quotient aus C_1 und C_2 gebildet. Die Angabe zur Kreuzreaktivität erfolgt in Prozent relativ zu Atrazin.

$$\%KR = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \qquad (4)$$

mit C_1 = Konzentration von Atrazin bei 50 %B/B_0
C_2 = Konzentration der kreuzreagierenden Verbindung bei 50 %B/B_0

Dabei ist die Kreuzreaktivität von Atrazin gleich 100 %. Die Konzentrationen aller sonstigen Substanzen (C_S) lassen sich durch Multiplikation mit der Kreuzreaktivität als Atrazinäquivalente (C_E) ausdrücken.

$$C_E = C_S \times KR \qquad (5)$$

mit C_S = Konzentration der kreuzreagierenden Substanz
C_E = Atrazinäquivalent-Konzentration
KR = Kreuzreaktivität

III Ergebnisse

1 Konstruktion eines Pyrethroid-spezifischen scFv-Antikörperfragments

1.1 scFv Phagen-System

Zur Konstruktion von Pyrethroid-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten wurde die Technik des Phagen-*Display*s unter Verwendung des Phagemidvektors pCANTAB 5E von Pharmacia angewandt. Abbildung 18 gibt einen Überblick über die Methodik.

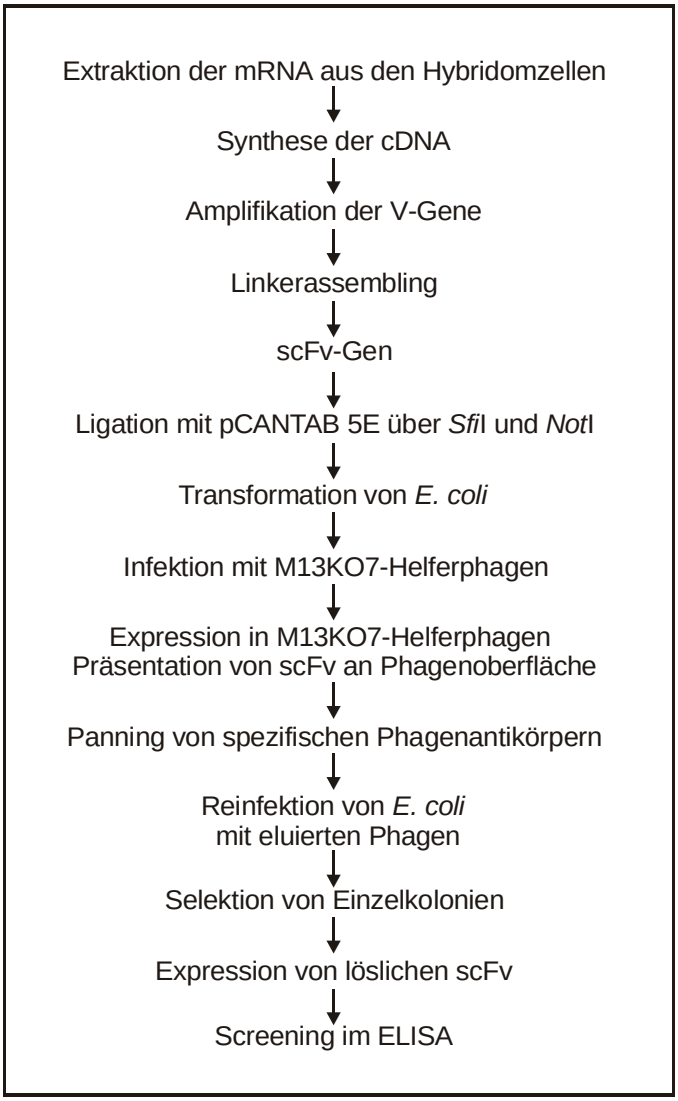


Abbildung 18 Überblick über Konstruktion des scFv und Anwendung des Phagen *Display* Systems

Als mRNA-Quelle dienten die Hybridomzellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1F/8 (Pullen und Hock, 1995a), die Antikörper gegen die Pyrethroide Bioallethrin und S-Bioallethrin

sezernieren. Nach mRNA-Isolierung und cDNA-Erststrang-Synthese erfolgte mittels PCR die selektive Amplifikation der variablen Regionen der Schwer- und Leichtketten. In einer weiteren PCR wurden die beiden DNA-Fragmente über eine Linkersequenz zusammengefügt. Die resultierenden scFv-Antikörper wurden abschließend über PCR amplifiziert und zugleich mit den Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I am 5'-Ende bzw. 3'-Ende versehen. Über die angefügten Restriktionsstellen erfolgte die Ligation der scFv-Fragmente mit dem Phagemid pCANTAB 5E. Aufgrund der Konstruktion des Phagemids (s. II, 2.1, Abb.5, S. 32) entstand nach Insertion des scFv in pCANTAB 5E ein Fusionsgen aus dem scFv-Fragment und dem Gen*III*, das für das Oberflächenprotein p*III* von Phagen codiert. Während der Expression in der *E. coli* Suppressor-Linie TG1 entstanden durch Überlesen des Stop-Codons scFv-g3p Fusionsproteine, die nach Infektion mit M13KO7 Helferphagen an der Phagenoberfläche präsentiert wurden. Bei der Selektion der scFv-tragenden Phagen im *Panning* banden die spezifischen Phagen über das scFv an das Hapten-Konjugat t-PMS-OVA, das an Microtiterplatten immobilisiert worden war. Im Anschluß an die Selektion wurden *E. coli* TG1 Zellen mit den selektierten Phagen infiziert. Durch Ausplattieren auf Selektionsmedium bildeten sich Einzelkolonien, die nach Kultivierung und Induktion mit IPTG lösliche scFv exprimierten. Die einzelnen scFv-Klone wurden im Enzymimmunoassay auf ihre Spezifität zu t-PMS-OVA über Verdrängung mit Pyrethroid-Analyten getestet.

1.1.1 Selektive Amplifikation der V_H und V_L Regionen

Als DNA-Matrize zur Amplifikation der V_H und V_L Regionen diente die cDNA, die aus isolierter mRNA synthetisiert wurde. Zur Gewinnung der mRNA wurden die Hybridomzellen der Pyrethroid-Zellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1F/8 in Kultur genommen (vgl. II, 2.1.1.1, S. 33). Nach ca. 4 Wochen waren drei große Zellkulturflaschen mit den Antikörper sezernierenden Zellen bewachsen, die zur mRNA-Isolation verwendet wurden. Über Trypanblaufärbung wurde der Anteil vitaler Zellen auf 1×10^6/ml bzw. $0{,}9 \times 10^6$/ml für die Zellinien 1/A5-7/C10 bzw. 3/B4-1/F8 bestimmt. Die Volumina 5,5 ml bzw. 6 ml der Zellsuspensionen von 1/A5-7/C10 bzw. 3/B4-1/F8 entsprachen der benötigten Anzahl von 5×10^6 vitale Hybridomzellen (inklusive 10 % Zusatz für etwaige Verluste) und wurden abzentrifugiert. Die anschließende mRNA-Extraktion (vgl. II, 2.1.1.1, S. 34) erfolgte mit Hilfe des QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia), wobei die polyadenylierte mRNA nach Zellausschluß über poly(dT) Säulen affinitätschromatographisch isoliert wurde. Nach EtOH-Präzipitation wurde der poly(A)$^+$-

RNA-Extrakt für die Synthese der Erststrang-cDNA (vgl. II, 2.1.1.2, S. 35) verwendet. Die Synthesereaktion wurde über reverse Transkriptase katalysiert. Die gewonnenen cDNA beider Zellinien wurde bei –20 °C gelagert und zur Amplifikation der variablen Regionen eingesetzt.

Selektive Amplifikation der V_H- und V_L- Regionen

Unter Verwendung der Erststrang-cDNA als Template wurden die variablen Regionen der beiden Pyrethroid-Zellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1/F8 in separaten PCR-Reaktionen (vgl. II, 2.1.1.3, Tab. 4, S. 36) mit den entsprechenden Primern amplifiziert. In der PCR von V_H wurden unterschiedliche Volumina an cDNA eingesetzt, nämlich 3, 5 und 10 µl. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne cDNA mitgeführt. Die Reaktion erfolgte als „*Hotstart*-PCR“ mit einer Zyklenzahl von 31 und dem Zeit-Temperatur-Profil: 94 °C/60 s Denaturierung, 60 °C/60s Annealing, 72 °C/90s Elongation (vgl. II, 2.1.1.3, Tab. 5, S. 37). Die Annealingtemperatur berechnete sich aus den Oligonukleotidprimern VH1BACK und VH1FOR2 (s. I, 1.7, Tab.2, S. 19). Die PCR-Ansätze wurden über DNA-Gelelektrophorese (1,5 % Agarosegel) analysiert. Das Gelphoto (Abb. 19) zeigt die Banden der amplifizierten V_H Region der Zellinie 1/A5-7/C10.

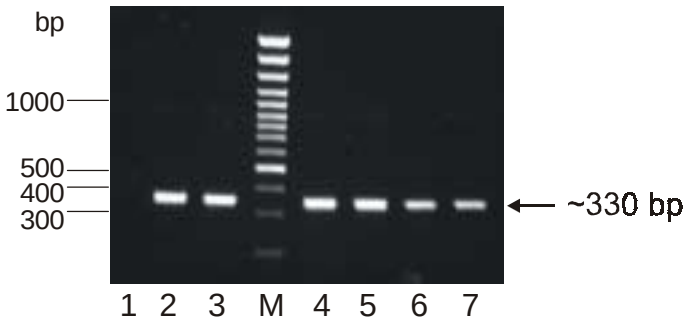


Abbildung 19 PCR-Produkte von V_H der Pyrethroid-spezifischen Zellinie 1/A5-7/C10 bei 10 µl (2-3) bzw. 5 µl (4-5) bzw. 3 µl (6-7) eingesetzter cDNA. (1) Kontrolle, (M) Marker

Je Geltasche waren 20 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen. Anhand des 100 bp Markers ließen sich die DNA-Banden einer Länge von ca. 330-350 bp zuordnen. Die verschiedenen Template-Mengen der cDNA ergaben keine auffallenden Unterschiede. Die Banden mit 10 µl [Abb. 19, Gelspuren (2)-(3)] bzw. 5 µl eingesetzter cDNA [Abb. 19, Gelspuren (4)-(5)] waren bezüglich der DNA-Menge gleichzusetzen, wohingegen die amplifizierte DNA-Menge der Banden mit 3 µl cDNA [Abb. 19, Gelspuren (6)-(7)] etwas geringer ausfiel. Bei der Kontrolle ohne cDNA [Abb. 19, Gelspur (1)] war keine DNA-Bande zu erkennen. Die

DNA-Mengen der Banden lagen zwischen 80-250 ng, geschätzt an den 100 ng DNA der 500 bp-Bande des aufgetragenen Markers. Die Isolation der Banden aus dem Agarosegel ergab eine geschätzte Gesamt-DNA-Konzentration von ca. 50 ng/µl.

Die Amplifikation der V_L Region verlief wie bei V_H, nur unter der Verwendung der V_L-Primer VK2BACK und MJKFONX-Mix (s. I, 1.7, Tab. 2, S. 19). Als Template wurden wiederum 3, 5 und 10 µl cDNA eingesetzt. Das Zeit-Temperatur-Profil war identisch mit dem angewandten Profil der V_H-Amplifikation. Abbildung 20 präsentiert die Gelanalyse der V_L-PCR der Zellinie 1/A5-7/C10.

Abbildung 20 PCR-Produkte von V_L der Pyrethroid-spezifischen Zellinie 1/A5-7/C10 bei 3 µl (1-2) bzw. 5 µl (3-4) bzw. 10 µl (6-7) eingesetzter cDNA. (8) Kontrolle, (M) Marker

Die elektrophoretisch aufgetrennten Banden hatten eine Länge von ca. 310 bp. Ein Unterschied in der amplifizierten DNA-Menge war bei den verschiedenen Ansätzen mit 3 µl [Abb. 20, Gelspuren (1)-(2)], 5 µl [Abb. 20, Gelspuren (3)-(5)] und 10 µl [Abb. 20, Gelspuren (6)-(7)] nicht zu erkennen. Die V_L-Banden wurden aus dem Gel getrennt und die DNA aus der Agarose isoliert. Bei der Kontrolle ohne cDNA [Abb. 20, Gelspur (8)] war keine Bande zu erkennen. In Tabelle 21 (S. 93) sind die Konzentrationen der amplifizierten DNA-Fragmente nach Isolation aus der Agarose wiedergegeben.

Tabelle 21 DNA-Konzentrationen der amplifizierten V_H- und V_L-Regionen der Zellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1/F8

Variable Regionen	Konzentration [ng/µl]
1/A5-7/C10	
V_H	50
V_L	22
3/B4-1/F8	
V_H	61
V_L	36

1.1.2 Amplifikation des DNA-Linkers

Zur Verknüpfung der beiden variablen Regionen diente eine DNA-Linkersequenz, die für $(Gly_4Ser)_3$ codiert. Dieses DNA-Fragment wurde aus dem Phagemid pCANTAB 5E/scFv K411B (Kramer und Hock, 1996a) über PCR isoliert. Dazu erfolgte die Kultivierung des Klons K411B in 2xYT-Medium und die anschließende Plasmidisolation mit einer DNA-Konzentration von 0,65 µg/µl. Die Amplifikation erfolgte nach II, 2.1.1.4, Tabelle 6, S. 38 mit den Primern LinkBACK und LinkFOR (s. I, 1.7, Tab. 2, S. 19). Es wurden 5 Reaktionen à 5 ng Plasmid-DNA angesetzt. Im Zeit-Temperatur-Profil (vgl. II, 2.1.1.3, Tab. 5, S. 37) wurden die Anealingtemperatur auf 45 °C gesenkt und die Zyklenzahl auf 25 verkürzt. Die PCR wurde über DNA-Gelelektrophorese (3,5 % Agarosegel) (Abb. 21) ausgewertet.

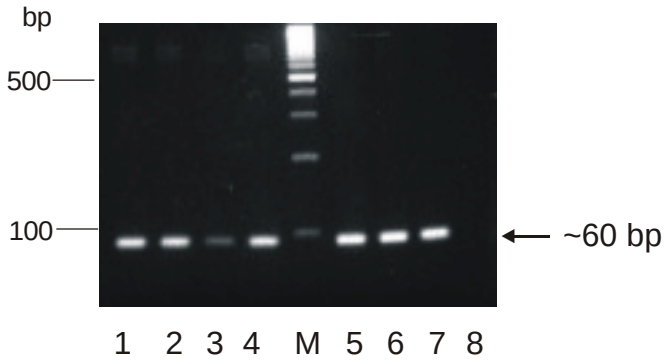


Abbildung 21 PCR-Produkte von Linkerfragment aus scFv K411B. (M) Marker

Die amplifizierten Linker-Banden wiesen aufgrund der angefügten Sequenzüberschneidungen mit den variablen Regionen eine Länge von ca. 60 bp auf. Die DNA (ca. 250 ng je Bande) wurde aus der Agarose isoliert und die Gesamtlösung der einzelnen PCR-Ansätze auf eine DNA-Konzentration von 58 ng/µl bestimmt.

1.1.3 Konjugation der V_H- und V_L-Regionen mit dem Linkerfragment

Die einzelnen DNA-Fragmente V_H, V_L und das Linkergen wurden in einem äquimolaren Verhältnis zusammengefügt, um scFv Fragmente zu erhalten. Zur Quantifizierung der geeigneten DNA-Mengen erfolgte eine Gelelektrophorese mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Fragmente. Abbildung 22 zeigt die Quantifizierung der DNA-Fragmente der Zellinie 3/B4-1/F8 in einem 1,5 %-igen Agarosegel.

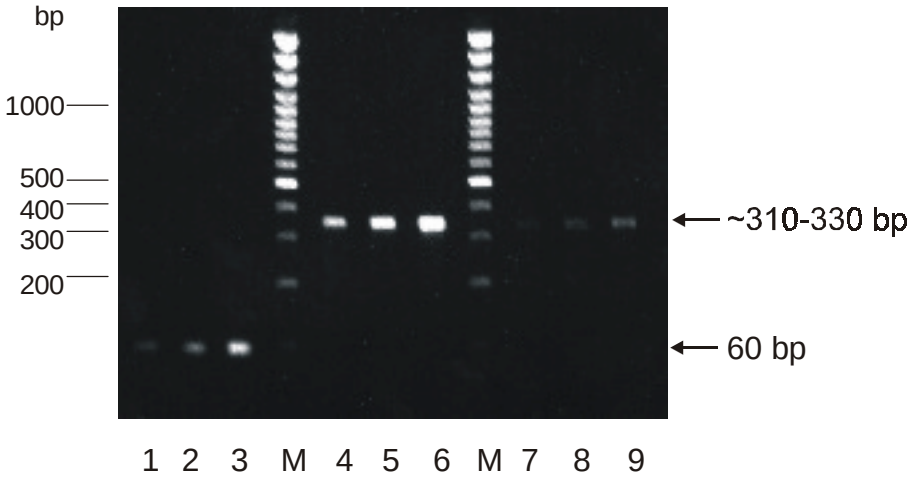


Abbildung 22 Quantifizierung von V_H (4-5), V_L (7-9) und Linker (1-3) von der Zellinie 3/B4-1/F8. (M) Marker

Das Linkerfragment war mit 116 ng [Abb. 22, Gelspur (3)], 58 ng [Abb. 22, Gelspur (2)] und 29 ng [Abb. 22, Gelspur (1)] aufgetragen. Die DNA-Mengen von V_H entsprachen 183 ng [Abb. 22, Gelspur (6)], 91 ng [Abb. 22, Gelspur (5)] und 46 ng [Abb. 22, Gelspur (4)] und von V_L 72 ng [Abb. 22, Gelspur (9)], 36 ng [Abb. 22, Gelspur (8)] und 18 ng [Abb. 22, Gelspur (7)].

Für die nachfolgende PCR zur Konjugation der variablen Regionen mit dem DNA-Linker wurden 10 ng des Linkers und je 50-60 ng der variablen Regionen eingesetzt. Im Falle der Zellinie 3/B4-1/F8 wurden 1,7 µl einer 1:10-Verdünnung des Linkers, 1,2 µl von V_H und 2

µl von V_L in den PCR-Ansatz gegeben, wobei von der Zellinie 1/A5-7/C10 1,3 µl von V_H und 4 µl von V_L mit 1,7 µl der 1:10-Verdünnung des Linkers vermengt wurden. Nach Zugabe der weiteren PCR-Komponenten (vgl. II, 2.1.1.4, Tab. 7, S. 38) wurden die drei Fragmente nach 94 °C/5 min Anfangsdenaturierung mit 25 Zyklen à 94 °C/1 min, 60 °C/2 min und 72 °C/2 min zusammengefügt und die Reaktion bei 72 °C/8 min terminiert. Hierzu waren keine Primer nötig, da die einzelnen Gene über komplementäre Basen an den 3'- und 5'-Enden der Fragmente aneinander gelagert wurden. In einer weiteren PCR (vgl. II. 2.1.1.4, Tab. 8, S. 39) wurden je Zellinie 1, 3 und 5 µl des Reaktionsgemisches zur Amplifikation der zusammengefügten scFv-Fragmente verwendet. Über die eingesetzten Primer VH1BACKSfiI und JK1NotI-Mix wurden die zur nachfolgenden Klonierung in pCANTAB 5E nötigen Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I an das 5'- bzw. 3'-Ende des scFv angefügt. Mit der Annealingtemperatur von 55 °C und dem restlichen Zeit-Temperatur-Profil aus II, 2.1.1.3, Tabelle 5, S. 37 erfolgte die PCR, die anschließend in einer Gelelektrophorese (1,5 % Agarose) analysiert wurde. Abbildung 23 zeigt die Gelanalyse der PCR des scFv-Gens von Zellinie 1/A5-7/C10.

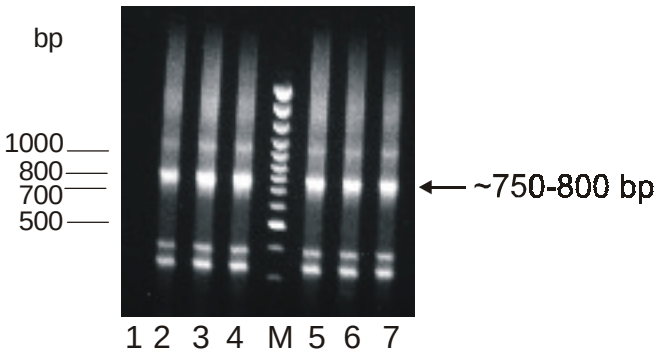


Abbildung 23 PCR-Produkte des scFv-Gens von Zellinie 1/A5-7/C10. (1) Kontrolle ohne DNA, (2-3) 1 µl DNA, (4-5) 3µl DNA, (6-7) 5 µl DNA, (M) Marker

Die PCR-Ansätze mit den Aliquots 1 µl [Abb. 23, Gelspuren (2)-(3)], 3 µl [Abb. 23, Gelspuren (4)-(5] und 5 µl [Abb. 23, Gelspuren (6)-(7)] wiesen keine Unterschiede am PCR-Produkt auf. Die Kontrolle ohne DNA [Abb. 23, Gelspur (1)] blieb ohne Amplifikationsprodukt. Das scFv-Gen war der Bande mit der Länge von ca. 750-800 bp gleichzusetzen. Die anderen Banden sind Nebenprodukte, die u.a. auf den Primer-Mix des Forward-Primers zurückzuführen waren. Die DNA-Menge einer scFv-Bande wurde anhand der DNA-Menge von 102 ng der 500 bp-Bande des Markers auf 100 ng geschätzt. Die scFv-Banden wurden aus dem Gel herausgetrennt und von der Agarose isoliert. Für die

nachfolgende Ligation mit dem Phagemid pCANTAB 5E standen DNA-Konzentrationen von ca. 35 ng/µl bzw. 26 ng/µl von scFv(1/A5) bzw. scFv (3/B4) zur Verfügung.

1.1.4 Ligation von scFv mit pCANTAB 5E

Zur Ligation des scFv-Fragments mit dem Phagemid pCANTAB 5E mußten sowohl das scFv-Gen als auch das Phagemid an den Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I geschnitten werden. Die Präparation erfolgte in einem sequentiellen RV (vgl. II, 2.1.1.5, S. 39f) mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I, deren unterschiedliche Pufferbedingungen unter Aufstockung der Puffersalze gewährleistet wurden. Aufgrund der endständigen Lage der Enzym-Erkennungssequenzen am scFv wurden die Inkubationszeiten im scFv-RV um 3 h gegenüber des Vektor-RV verlängert und die Enzymmengen um 5 U erhöht. Die eingesetzten DNA-Volumina im Vektor-RV betrugen 2 µl je Ansatz, was einer DNA-Menge von ca. 1,2 µg entsprach. Im scFv-RV wurden je Ansatz ca. 500 ng DNA verwendet, das entspricht den Volumina von 15 µl bzw. 20 µl der Lösungen scFv(1/A5) bzw. scFv(3/B4). Über DNA-Gelelektrophorese wurden die geschnittenen Fragmente aufgetrennt und anschließend aus der Agarose isoliert. Der RV des präparierten Phagemids pCANTAB 5E/scFv K411B wurde in einem 0,7 %-igem Agarosegel (Abb. 24) analysiert.

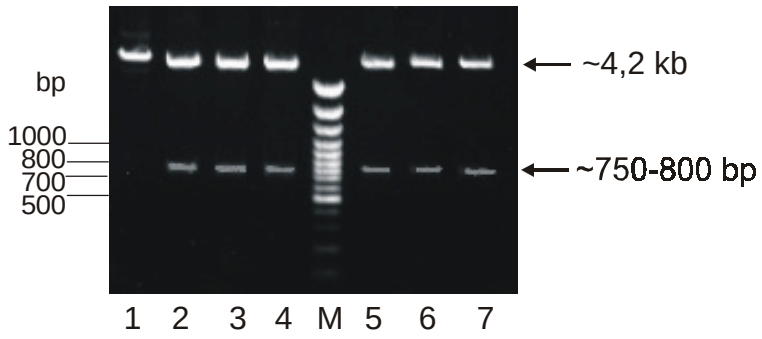


Abbildung 24 pCANTAB 5E/K411B nach sequentiellem RV mit den RE *Sfi*I und *Not*I.
(1) pCANTAB 5E/K411B linearisiert, (2-7) pCANTAB 5E/K411B 2-fach geschnitten,
(M) Marker

Der 1-fach linearisierte Vektor [Abb. 24, Gelspur (1)] war im Vergleich mit dem 2-fach geschnittenen Vektor [Abb. 24, Gelspuren (2)-(7)] aufgetragen. Im RV mit den beiden RE wurde das scFv-Fragment K411B mit der Länge von ca. 750-800 bp aus dem Vektor mit der Länge von ca. 4200 bp herausgetrennt, wohingegen bei der Vektorpräparation mit einem Enzym eine Bande der Länge von ca. 5 kb entstand. Die DNA-Menge einer

pCANTAB 5E-Bande, 2-fach geschnitten, entsprach ca. 200 ng. Nach Isolation der DNA aus der Agarose ergab sich eine DNA-Konzentration von ca. 100 ng/µl.

Die Gelanalyse (1,5 % Agarosegel) des RV von scFv(1/A5) ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Banden des scFv-Fragments hatten die Länge von ca. 770-800 bp, und die DNA-Menge pro Bande entsprach ca. 150 ng. Die isolierte DNA-Lösung wies eine Konzentration von ca. 30 ng/µl auf. Die Lösung von scFv(3B/4) hatte eine Konzentration von 28 ng/µl.

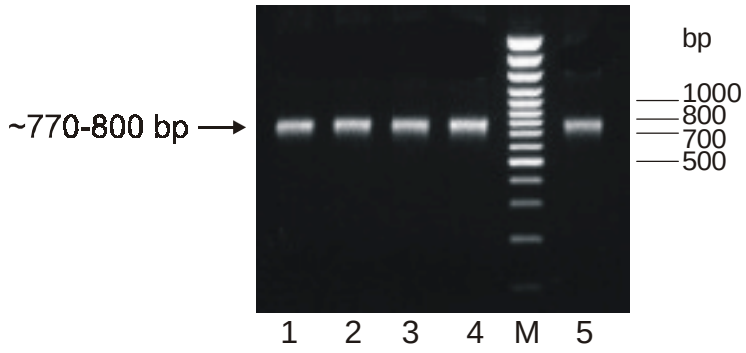


Abbildung 25 scFv (1/A5) nach sequentiellem RV von mit den RE *Sfi*I und *Not*I. (M) Marker

Die *Sfi*I/*Not*I-geschnittenen scFv-Fragmente und pCANTAB 5E-Plasmide wurden miteinander ligiert. Im Ligationsansatz (vgl. II, 2.1.1.6, Tab. 10, S. 41) wurde eine Gesamt-DNA-Menge von ca. 500 ng eingesetzt, wobei ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 eingehalten wurde. 1,7 µl Vektor-DNA wurden mit je 11 µl der scFv(1/A5)- bzw. scFv(3/B4)-DNA zusammengegeben, und die Ligationsansätze auf das Gesamtvolumen von 15 µl mit den entsprechenden Mengen an T4-DNA-Ligase und 10x Puffer erweitert. Eine Kontrolle ohne Insert wurde mitgeführt, um die Rate der Religation des 2-fach geschnittenen Vektors zu bestimmen. Nach Übernachtinkubation bei 16 °C wurden die Ligationsansätze über PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation von Salzen und Enzymen gereinigt (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41f) und in 6 µl H_2O* gelöst. Die präzipitierte DNA wurde anschließend über Elektroporation in *E. coli* TG1 eingeschleust. Je Ansatz wurden 100 µl elektro-kompetente Bakterien mit je 1 µl DNA (entspricht ca. 60 ng DNA) der verschiedenen Ligationsansätze und der Ligationskontrolle transformiert. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolltransformation ohne DNA, um die Präsenz von Fremdplasmiden auszuschließen. Nach erfolgter Transformation (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41ff) wurden die Bakterien in 1ml SOC-Medium bei 37 °C für 1 h im Schüttler inkubiert und je 100 µl

Bakteriensuspension in seriellen 10-fach Verdünnungen auf LB-Amp-Agar ausplattiert. Weitere 800 µl je unverdünnten Transformationsansatzes wurden auf große SOBAmpGluc-Platten (Ø 14,5 cm) ausgebracht und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Transformationsauswertung der Verdünnungsreihen ist in Tabelle 22 wiedergegeben. Bei der Transformationskontrolle (KT) waren keine Kolonien gewachsen, wohingegen sich drei Kolonien auf dem Agar der Ligationskontrolle $Trafo_{(K)}$ entwickelt hatten. Die Religationsrate des 2-fach geschnittenen pCANTAB 5E, angezeigt durch die Kolonienzahl der Ligationskontrolle, war im Vergleich mit der gewachsenen Bakterien bei unverdünnter Ausbringung zu vernachlässigen. Die Transformationsraten berechneten sich auf 1×10^7 bzw. 4×10^6 transformierte Zellen/µg DNA für scFv(1/A5) bzw. scFv(3/B4) und waren mit den Größen von Antikörperbibliotheken gleichzusetzen.

Tabelle 22 Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien nach Elektroporation von *E. coli* TG1 mit pCANTAB 5E/scFv(1/A5) [$Trafo_{[scFv(1/A5)]}$] bzw. pCANTAB 5E/scFv(3/B4) [$Trafo_{[scFv(3/B4)]}$]. KT: Transformationskontrolle ohne DNA, $Trafo_{(K)}$: Ligationskontrolle ohne Insert

Verdünnung	**Anzahl der gewachsenen Kolonien**			
	KT	$Trafo_{(K)}$	$Trafo_{[scFv(1/A5)]}$	$Trafo_{[scFv(3/B4)]}$
unverdünnt	-	3	∞*	∞*
10^{-1}			608	475
10^{-2}			70	53
10^{-3}			-	2

* entspricht einer sehr großen Anzahl von Kolonien, die nicht gezählt wurden

1.1.5 Isolation des rekombinanten pCANTAB 5E Phagemids

Durch Superinfektion der transformierten Bakterien mit M13KO7 Helferphagen wurde das rekombinante Phagmid mit scFv(1/A5) bzw. scFv(3/B4) isoliert. Dazu wurden die gewachsenen Bakterienkolonien von den großen SOBAmpGluc-Platten mit je 3 ml 2xYT-AmpGluc-Medium abgenommen und in Aliquots à 500 µl bei –70 °C eingefroren. Vor dem Einfriervorgang wurden zwei Aliquots je Klon für die folgenden Vorgänge des Phagen-*Display*s entnommen.

Für die Phageninfektion wurden als Starterkultur 10 ml 2xYT-AmpGluc-Medium mit ca. 10^8 Bakterien inokuliert, was in etwa einer 100-fachen Größenüberschreitung der Transformationsraten aus III, 1.1.1.4 entsprach. Die Bakterienanzahl wurde über $OD_{600\ nm}$-Messungen der Bakteriensuspensionen, die in 2xYT-AmpGluc-Medium verdünnt waren, ermittelt. Eine Bakteriensuspension mit einer OD_{600nm} 0,1 enthält ca. 10^8 Bakterien/ml. Somit ergaben sich für die OD_{600nm}-Werte 0,06 und 0,08 die Zellzahlen von 0,6 x 10^8/ml bzw. 0,8 x 10^8/ml für scFv(1/A5) bzw. scFv(3/B4). Die Starterkulturen der beiden Klone wurden bei 37 °C und 250 rpm für 3 h 40 min inkubiert, bis die mittlere logarithmische Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} 0,524 (entspricht ca. 5 x 10^8 Zellen/ml) erreicht war. Nach Transfer von je 5 ml (entspricht ca. 2,5 x 10^9 Zellen) der Bakteriensuspensionen in je 50 ml 2 x YT-AmpGluc-Medium erfolgte die Infektion der Bakterien mit Phagen in einem Verhältnis von 4:1 Phagen zu Bakterien. Dazu wurden je 100 µl der Phagenlösung (entsprach 1 x 10^{10} cfu M13-KO7 Helferphagen) in je 900 µl 2xYT-AmpGluc-Medium auf 37 °C erwärmt und in die Kulturmedien übertragen. Die Bakterien-Phagen-Suspensionen wurden 1-1,5 h kultiviert, anschließend zentrifugiert und nach Abzug sämtlicher Mediumsreste - wegen der Inhibition des *lac* Promoters durch Glucose - in je 50 ml 2xYT-AmpK-Medium resuspendiert. Durch die Zusätze Ampicillin und Kanamycin wurden die Phagen-infizierten Bakterien, die das rekombinante Phagemid pCANTAB 5E enthielten, selektiert.

1.1.5.1 Präparation und antigenspezifische Selektion der Phagenpartikel

Aufgrund der unvollständigen Unterdrückung des Amber Stop-Codons, lokalisiert zwischen scFv-Insertion und Gen *III* auf dem Phagemid, wurden neben den phagenassoziierten auch gelöste scFv-Fragmente produziert. Um die Konkurrenz zwischen den löslichen und phagenassoziierten scFv um die Antigenbindungsplätze zu verhindern, wurden die löslichen scFv über Präzipitation mit Polyethylenglykol entfernt (vgl. II, 2.1.1.9, S. 44). Zuvor erfolgte die Bestimmung des Phagentiters mittels OD-Messungen der Bakterien-Phagen-Lösungen bei 260 und 280 nm. Die Anzahl der phageninfizierten Bakterien berechnete sich bei der Kultur scFv(1/A5) mit dem OD-Mittelwert 1,05 und der Verdünnungstufe 1:10 auf 2,6 x 10^{12} pfu/ml. Bei scFv(3/B4) ergab sich aus dem OD-Mittelwert 0,67 und einer 1:5-Verdünnung ein Phagentiter von 8,5 x 10^{11} pfu/ml. Die Übernachtkulturen wurden anschließend abzentrifugiert und der Kulturüberstand mit 1/5 Volumen PEG/NaCl versehen. Nach Inkubation auf Eis und weiterer Zentrifugation wurde

der Rückstand in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Procedere wurde wiederholt und die präparierten Phagen sterilfiltriert.

Die nachfolgende Selektion antigenspezifischer Phagen über *Panning* (vgl. II, 2.1.1.10, S. 45f) wurde sofort an die Phagenselektion angeschlossen, um die Zerstörung der Verbindung zwischen dem scFv-Fragment und dem Phagen durch Proteasen in der Phagenlösung zu vermeiden. Die scFv-assoziierten Phagen präsentierten das scFv an der Phagenoberfläche und wurden über haptenbeschichtete Festphasen selektiert. Als Festphasen dienten im *Panning* Mikrotiterplatten, die mit dem Ovalbumin (OVA)-gekoppelten Hapten, Permethrinderivat trans-Permethrinsäure (t-PMS), beschichtet waren. Je Kavität waren 100 µl der 10 mg/ml t-PMS-OVA-Stammlösung über Nacht inkubiert. Vor Auftrag der Phagenlösung wurden die freien Bindungsstellen an der Polystyrol-Oberfläche mit Magermilchpulver blockiert, um unspezifische Bindungen der Phagen zu reduzieren. Die Phagenlösung wurde in einer 1:5-Verdünnung in PBS mit 2 % (w/v) Magermilchpulver und 0,05 % Tween 20 für 15 min vorinkubiert. Eine Gesamtmenge von 10^{10} Phagen wurde je Kavität zugegeben. Bezüglich der Titerbestimmungen ergaben sich die Volumina von 20 µl bzw. 60 µl Phagenlösung von scFv(1/A5) bzw. scFv(3/B4) je Kavität, die auf 100 µl je Kavität mit PBS aufgefüllt wurden. Nach Inkubation für 1,5 h wurden die ungebundenen Phagen mit PBS in 10-maliger Wiederholung weggewaschen. Ein 3-faches Spülen der Kavitäten mit PBS beendete die Selektion.

1.1.5.2 Reinfektion von TG1-Bakterienzellen mit den selektierten Phagenpartikeln

Die über t-PMS-OVA an die Mikrotiterplatten spezifisch gebundenen scFv-assoziierten Phagen dienten zur Reinfektion von *E. coli* TG1 Zellen (vgl. II, 2.1.1.11, S. 47), um die scFv-Gene der selektierten Phagen zu retten. Die Kultur von TG1 startete am Vortag mit dem Ausbringen der Zellen auf MM-Agar und der Inkubation bei 37 °C über Nacht. Drei Einzelkolonien wurden zum Animpfen von 10 ml 2xYT-Medium verwendet und die Kultur bei 37 °C und max. 200 rpm inkubiert, bis die Zellsuspension eine OD_{600nm} um 0,8 erreicht hatte. In dieser exponentiellen Wachstumsphase erfolgte die Zugabe der Bakterien in die einzelnen Kavitäten zu den immobilisierten, selektierten Phagen. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die phageninfizierten Bakterien aus den Kavitäten abgezogen und vermengt. Zur Ermittlung des cfu-Wertes wurde die Zellsuspension in seriellen Zehnfach-Verdünnungen auf SOBAmpGluc-Agar ausplattiert. Zusätzlich erfolgte die Ausbringung der Bakterien auf große SOBAmpGluc-Platten. Nach

Übernachtinkubation bei 30 °C wurden die cfu-Titer beider Stammklone durch Auszählen der gebildeten Bakterienkolonien bestimmt. Die Werte 3,6 x 10^5 cfu und 1,6 x 10^5 cfu ergaben sich für scFv(1/A5) bzw, scFv(3/B4). Achtundvierzig gut isolierte Einzelkolonien je Stammklon wurden in je 200 µl 2xYT-AmpGluc-Medium/Kavität auf einer 96er Micronicplatte über Nacht bei 30 °C und 250 rpm für die nachfolgende Expression der scFv-Fragmente kultiviert. Die übrigen Bakterienkolonien wurden mit 2xYT-AmpGluc-Medium von den SOBAmpGluc-Platten abgenommen und als Sicherheitskopien bei –70 °C eingefroren.

1.1.6 Expression und *Screening* von löslichen scFv der selektierten Phagenfraktion

Lösliche, von Phagenpartikeln getrennte scFv wurden in der *E. coli* Suppressor-Linie TG1 exprimiert. Dazu wurden die Übernachtkulturen der Einzelkolonien in 2xYT-Amp-Medium mit 0,1 % (w/v) Glucose in die Kavitäten von zwei weiteren Micronic-Platten umgesetzt. Der geringe Anteil an Glucose im Medium unterdrückte in der ersten Wachstumsphase den *lac* Promoter und war bis zu Beginn der Induktion abgebaut. Die Inkubation bei 30 °C und 200 rpm dauerte ca. 5 h bis die mittlere OD_{600nm} 0,8 erreicht war. Währenddessen wurde die Zellkulturplatte mit den Resten der Übernachtkultur als Sicherheitskopie bei –70 °C eingefroren. Zur Initiation der Expression von scFv wurden 25 µl 2xYT-Amp-Medium mit dem Induktor IPTG je Kavität zugegeben. Die Expression erfolgte bei 30 °C und 250 rpm für 20 h. Die Bakterienkulturen wurden abzentrifugiert und der Überstand für das nachfolgende *Screening* von funktionellen scFv verwendet.

Das *Screening* der scFv auf t-PMS-spezifische Bindung und Verdrängung wurde im ELISA (vgl. II, 2.1.1.12, S. 47f) durchgeführt. Vier Mikrotiterplatten waren mit dem Konjugat t-PMS-OVA beschichtet. Die freien Bindungsstellen an der Polystyroloberfläche wurden mittels eines Blockierungsschrittes mit 1 % OVA besetzt. Je Klon wurden 4 Standardwerte (PBS, 50, 500, 10.000 µg/l Bioallethrin) zur Verdrängung à 100 µl eingesetzt. Die Überstande der zentrifugierten Kulturen aus den Micronic-Platten wurden auf die Kavitäten der Mikrotiterplatten verteilt, d.h. je 100 µl der zwei Kavitäten je Klon wurden auf 4 Kavitäten je Mikrotiterplatte übertragen. Nach 1-stündiger Inkubation erfolgte die Reaktion mit dem Peroxidase-gekoppelten Anti-E-*Tag*-Antikörper. Die Farbreaktion, hervorgerufen durch den enzymatischen Umsatz des zugegebenen POD-Substrats, wurde nach Abstoppen der Reaktion im ELISA Reader bei 450 nm gemessen.

Nach Auswertung der Meßdaten ließen sich 30 Klone von dem Hapten-Konjugat t-PMS-OVA durch Bioallethrin verdrängen. Dabei wurden OD-Unterschiede von 0,07-0,15 zwischen dem PBS-Wert und dem höchsten Bioallethrin-Wert (10.000 µg/l) gemessen und es war eine deutliche Abstufung zwischen den einzelnen Bioallethrin-Konzentrationen zu erkennen.

In einer erneuten Expression wurden diese 30 Klone für eine weitere ELISA-Analyse präpariert. Die Mikrotiterplatte, die zu Beginn des *Screening*s eingefroren worden war, wurde dazu kurz angetaut, um etwas Zellsuspension der gewünschten Klone mit einer Pipette abzuziehen. Gleich anschließend an diesen Vorgang wurde die Platte wieder eingefroren. Die Zellsupensionen hingegen wurden zu 200 µl 2xYT-AmpGluc-Medium je Kavität auf eine andere Mikrotiterplatte transferiert und bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, bis die Kulturen trübe waren. Je Kavität und Klon wurde ein Aliquot von 5 µl entnommen und auf 500 µl 2xYT-AmpGluc-Medium je Kavität einer Micronic-Platte für eine weitere Inkubation über Nacht bei 30°C und 250 rpm übertragen. Die Platte mit dem Rest der Starterkultur wurde als Sicherheitskopie bei –70 °C eingefroren. Eine anschließende Kultivierung von 300 µl Bakterienkultur je Klon wurde in je 5 ml 2xYT-AmpGluc-Medium mit einer geringeren Glucose-Menge von 0,1 % (w/v) in 50 ml Falcon-Gefäßen bei 30 °C und 250 rpm für ca. 5 h durchgeführt. Die darauffolgende Expression der scFv-Fragmente wurde durch Zugabe von je 530 µl 2xYT-Amp-Medium mit 6 mM IPTG initiiert. Der ELISA erfolgte wie beim ersten *Screening* (vgl. II, 2.1.1.12, S. 47f) mit den Überständen der abzentrifugierten Bakterienkulturen. Allerdings wurde die Verdünnungsreihe des Bioallethrin-Standards auf die Konzentrationswerte PBS, 1, 10, 50, 100, 500, 1.000, 10.000 µg/l erweitert. Die Überstände mit den scFv-Fragmenten wurden vor Auftrag auf die Mikrotiterplatte in PBS mit 1 % (w/v) Magermilchpulver in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 für 15 min inkubiert. Die Auswertung des ELISA zeigte eine deutliche Verdrängungsreaktion bei sechs Klonen, gemessen an dem niedrigsten (PBS) und dem höchsten Wert (10.000 µg/l Bioallethrin), wobei die Abstufung der Konzentrationen sich bei den Absorptionen nicht immer widerspiegelte. Abbildung 26 zeigt die Verdrängung der sechs scFv-Fragmente von t-PMS-OVA durch Bioallethrin. Die Klone 4H und 5F können der Zellinie 1/A5-7/C10 zugeordnet werden. 9D, 10B, 10F und 10H stammen aus der Antikörperbibliothek 3/B4-1F/8. Aufgrund der geringen Absorptionsunterschiede wurde überprüft, in welchem Ausmaß die scFv-Fragmente in den Überstand sekretiert wurden. Dazu erfolgte die Untersuchung des Periplasmaextraktes der

einzelnen Klone im ELISA. Hierbei wurden weder eine signifikante Bindung noch eine Verdrängung der Klone festgestellt.

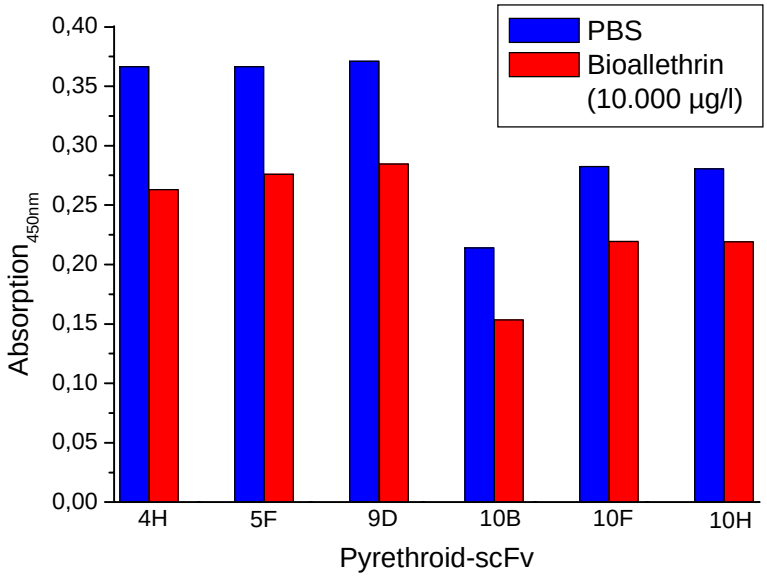


Abbildung 26 Verdrängung der Pyrethroid-scFv Klone 4H, 5F, 9D, 10B, 10F, 10H von t-PMS-OVA mit Bioallethrin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA

1.2 DNA-Analyse der positiven Klone

Die im *Screening* ermittelten, positiven Klone wurden zur Plasmidisolation für die Sequenzanalyse erneut kultiviert. Die Sicherheitskopie lieferte dazu das Ausgangsmaterial, welches zur Gewinnung von Einzelkolonien auf SOBAG-Agar über Nacht inkubiert wurde. Je Klon wurde eine Einzelkolonie in 10 ml 2xYT-AmpGluc-Medium während einer Übernachtinkubation kultiviert. Die Plasmidpräparationen (vgl. II, 2.1.2, S. 49) bzw. die scFv-Gene in den Plasmiden wurden mittels der Sequenzierprimer pCANTAB-S1, -S3, -S4 und-S6 (s. I, 1.7, Tab. 2, S. 19) von der Firma SequiServe (Vaterstetten) sequenziert. Der Vergleich der einzelnen Sequenzen ergab unterschiedliche scFv-Gene. Sowohl die Klone 9D und 10F als auch 10B und 10H waren jeweils identisch. Die Sequenzen von 4H, 5F, 9D/10F und 10B/10H differierten voneinander.

Auch die Überprüfung der sechs Plasmide im RV spiegelten diese Differenzen wieder. Die Gelanalyse des sequentiellen RV mit den Enzymen *Sfi*I und *Not*I (vgl. II, 2.1.1.5, Tab. 9, S. 40) der einzelnen Klone ist in Abbildung 27 dargestellt.

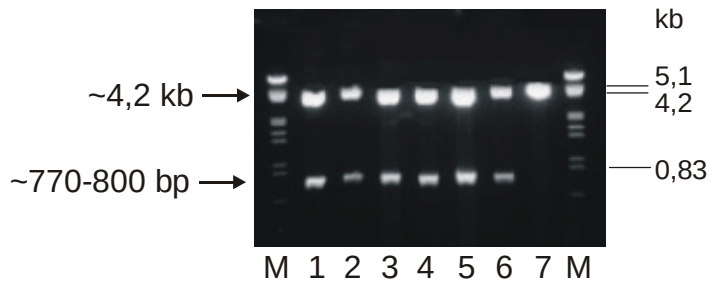


Abbildung 27 scFv-Klone 4H (1), 5F (2), 9D (3), 10B (4), 10F (5), 10H (6) nach sequentiellem RV mit den RE *Sfi*I und *Not*I. (7) pCANTAB 5E/scFv(1A/5) linearisiert, (M) Marker

Die Plasmide der Klone 4H [Abb. 27, Gelspur (1)], 5F [Abb. 27, Gelspur (2)], 9D [Abb. 27, Gelspur (3)], 10B [Abb. 27, Gelspur (4)], 10F [Abb. 27, Gelspur (5)] und 10H [Abb. 27, Gelspur (6)] waren in zwei DNA-Banden getrennt worden, wobei die Banden mit der Länge von ca. 4,2 kb den 2-fach geschnittenen Plasmiden pCANTAB 5E und die kürzeren Banden (ca. 750 bp) den scFv-Genen entsprachen. Dies bewies die erfolgreiche Insertion des scFv-Gens in den Phagemidvektor. Die Kontrolle, das 1-fach geschnittene Plasmid [Abb. 27, Gelspur (7)], wies nur eine DNA-Bande mit der Länge von ca. 5 kb auf. Die verschiedenen Längen der scFv-Fragmente in der Gelanalyse bestätigten die Unterschiede der überprüften Gensequenzen.

1.2.1 Konstruktion des scFv der Myeloma-Zellinie PAI-B_3Ag81

Ein scFv-Fragment der Myelom-Zellinie wurde synthetisiert, um eine mögliche Ursache für die aufgetretenen Unterschiede in den Sequenzen der selektierten scFv-Gene zu finden, nämlich die Kombinationsmöglichkeiten der V_H- und V_L-Gene der Hybridomzellen-Fusionspartner Lymphocyt und Myelom-Zelle (vgl. II, 2.1.2.1, S. 51).
Die Methodik zur Konstruktion des scFv-Fragments der Myeloma-Zellinie war die gleiche wie bei dem Pyrethroid-spezifischen scFv (vgl. II, 2.1.1.1-2.1.1.7, S. 33ff). Die isolierte mRNA von PAI-B_3Ag81 diente als Matrize zur Synthese der cDNA, die als Template-DNA in den Amplifikationen der V_H- und V_L-Region der Myelom-Zelle eingesetzt wurde. Die amplifizierten variablen Regionen wurden über das Linker-Fragment miteinander verbunden und das entstandene scFv(PAI-B_3Ag81)-Fragment in das pCANTAB 5E Phagemid inseriert. Abbildung 28 (S. 105) zeigt die Gelanalyse des sequentiellen *Sfi*I/*Not*I-RV des scFv(PAI-B_3Ag81)-Gens [Abb. 28, Gelspuren (1)-(3)] und des Vektors pCANTAB 5E [Abb. 28, Gelspuren (4)-(6)] mit den Bandengrößen von ca. 750 bp bzw. 4,2 kb.

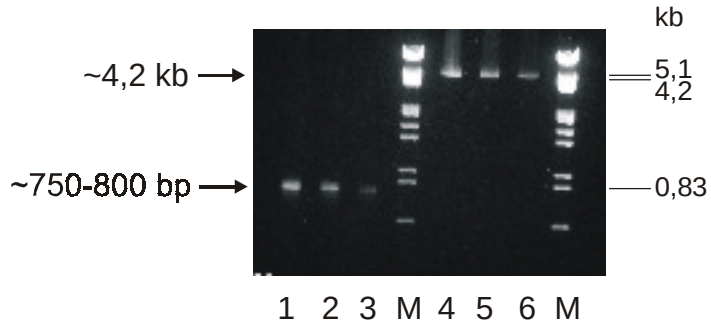


Abbildung 28 scFv(PAI-B_3Ag81) (1-3) und pCANTAB 5E (4-6) nach sequentiellem RV mit den RE *Sfi*I und *Not*I. (M) Marker

Die Selektion der transformierten TG1 Bakterien erfolgte über SOBAG-Agar ohne Phagen *Display*. Drei isolierte Einzelkolonien wurden in 2xYT-AmpGluc-Medium kultiviert, und die anschließende Expression der scFv mit 1 mM IPTG induziert. Nach 20-stündiger Inkubation wurden die Kulturen zentrifugiert und die Überstände mit den löslichen scFv im ELISA eingesetzt. Aufgrund des fehlenden spezifischen Antigens für die Myelom-Zellinie wurde das *Screening* der exprimierten scFv-Fragmente in einem „negativen" ELISA (vgl. II, 2.1.2.1, S. 51) durchgeführt, d.h. daß ein unspezifischer Analyt, Atrazin, verwendet wurde. Die Mikrotiterplatte wurde mit IPR-OVA beschichtet und die zugegebenen, scFv enthaltenden Kulturüberstände mit PBS bzw. Atrazin im Überschuß (10.000 µg/l) verdrängt. Die Detektion der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte unter Einsatz des Anti-E-*Tag*-IgG-POD Konjugats und der anschließenden Farbreaktion zwischen POD und dem Substrat. Abbildung 29 zeigt die gemessenen Absorptionen der drei Myelom-scFv Antikörper. Die Klone L1 und L4 banden nicht an den Analyten Atrazin, was aus den geringen Absorptionen sowohl bei der Verdrängung durch Atrazin als auch bei der Kontrolle mit PBS durch abzulesen war.

Die Sequenzanalyse der isolierten Plasmide (vgl. II, 2.1.2.2, S. 51) bestätigte die Identität der beiden scFv-Fragmente L1 und L4. Die Sequenz des Myeloma-scFv L1/L4 ist im Anhang wiedergegeben.

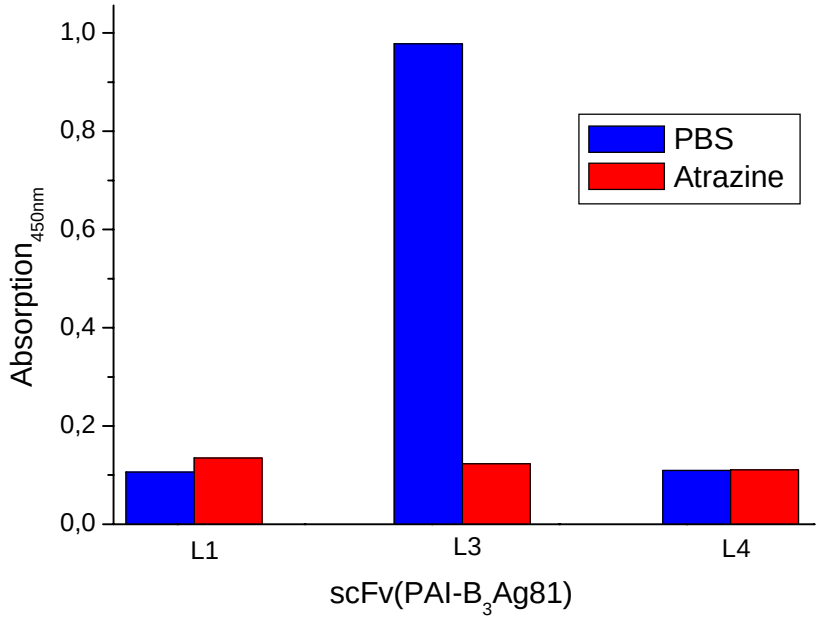


Abbildung 29 *Screening* der scFv(PAI-B_3Ag81)-Klone

1.2.2 Sequenzanalyse

Die Sequenz des scFv(PAI-B_3Ag81) L1/L4 wurde zum Vergleich mit den ermittelten Sequenzen der Pyrethroid-Klone herangezogen. Da die Linkersequenz bei allen scFv-Fragmenten identisch war, wurden ausschließlich die variablen Regionen der einzelnen Antikörper-Fragmente miteinander verglichen (Tab. 23).

Tabelle 23 Sequenzervergleich der variablen Regionen der Pyrethroid (4H, 5F, 9D/10F, 10B/10H)- und Myeloma-scFv-Fragmente (L1/L4)

		V_H				
		4H	5F	9D/10F	10B/10H	L1/L4
V_L	4H	4H				
	5F		5F			
	9D/10F					
	10B/10H					10B/10H
	L1/L4			9D/10F		L1/L4

Der Vergleich ergab, daß die Klone 9D/10F und 10B/10H die V_L bzw. V_H Region des Myeloma-scFv enthielten. Die Klone 4H und 5F hingegen bestanden aus eigenen, untereinander nicht identischen V_H- und V_L-Regionen und wurden zur weiteren Analyse verwendet.

Bei Untersuchung der scFv-Sequenzen von 4H und 5F auf Proteinebene (vgl. II, 2.1.2.2, S. 51) zeigte sich, daß die beiden scFv-Fragmente nicht als vollständige Proteine gelesen werden konnten. Sie enthielten ein bzw. zwei Stop-Codons in der V_L Region. Dieses Basentriplett, das Opal Stop-Codon, verhinderte das Lesen der kompletten Antikörpersequenz und folglich die Expression des Antikörperproteins.

1.2.3 Datenbankanalyse

Die Sequenzen der scFv-Fragmente 4H und 5F wurden mittels der Datenbank IMGT [The international ImMunoGeneTics database http://imgt.cines.fr:8104, Lefranc, 1999; Riuz et al., 2000; vgl. II, 2.1.2.3, S. 52] auf Ähnlichkeiten mit bereits registrierten Keimbahngenen der Maus überprüft. Die variablen Regionen der beiden Klone wurden jeweils separat in die Datenbank eingegeben. Die V-Gene wurden dabei in die CDR- und FR-Regionen unterteilt und die Sequenzen in Basentripletts und im entsprechenden Aminosäure-Code aufgeschlüsselt. Die Datenbankanalyse von V_H des Klons 4H (Abb. 30, S. 108) bestätigte den korrekten Leserahmen.

Als Anhaltspunkte für die Übereinstimmung der überprüften Sequenz mit einem Maus-IgG dienten drei konservierte Aminosäuren (in roten Buchstaben angegeben) in den Rahmenregionen, nämlich Cystein (TGC; C) an Position 23 in FR1, Trypthophan (TGG; W) bei 41 in FR2 und Cystein (TGT; C) an Position 104 in FR3. Die Punkte anstelle der Basen stehen für zusätzliche Basen in den Keimbahngenen des Datenbankrepertoire, die bei der zu vergleichenden Sequenz fehlten.
Die Datenbankrecherche von 4H-V_L (Abb. 31, S. 109) zeigte eine Übereinstimmung mit der Aminosäure Cystein an Position 23, jedoch waren die anderen zwei Aminosäuren nicht vorhanden.

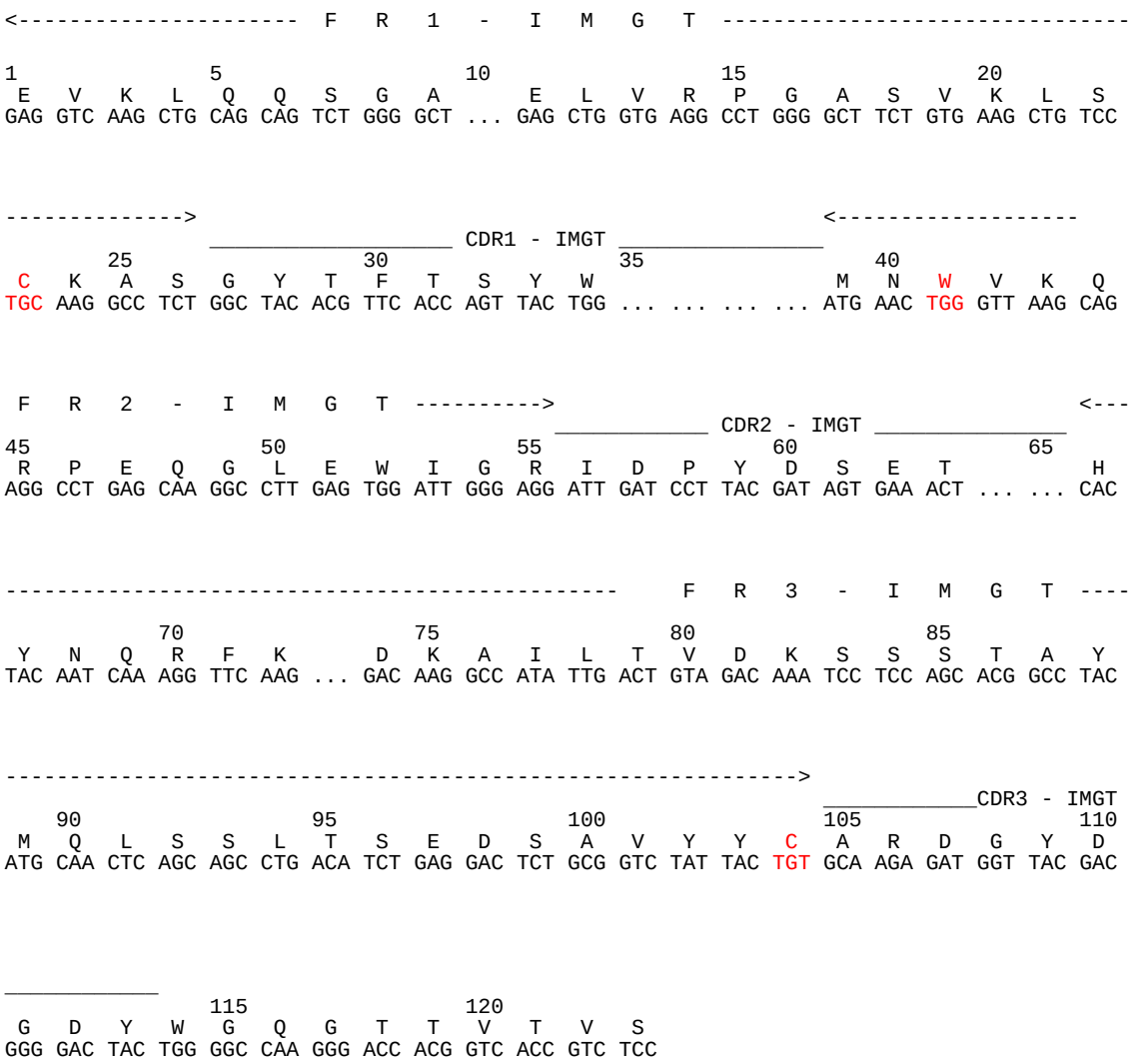
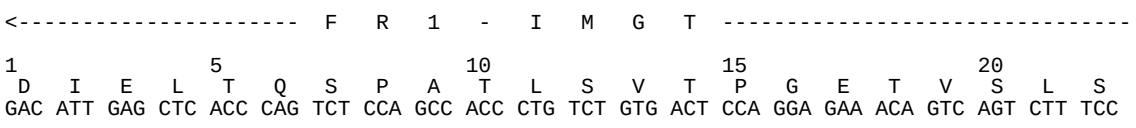


Abbildung 30 Datenbankanalyse von V_H(4H)

In FR3 war das Opal Stop-Codon an Position 100 aufgetreten. Nach genauer Analyse war die Ursache für dieses Stop-Codon eine Verschiebung des Leserahmens durch die zusätzliche Base Adenin in der dadurch codierten Aminosäure Lysin (K) auf der Position 28. Nach Entfernen dieser Base ergab die erneute Datenbankanalyse der modifizierten V_L-Region (Abb. 32, S. 110) eine dem Maus-IgG vergleichbare variable Region im korrekten Leserahmen mit den konservierten Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Cystein an den Positionen 23, 41 und 104 (in roten Buchstaben angegeben).



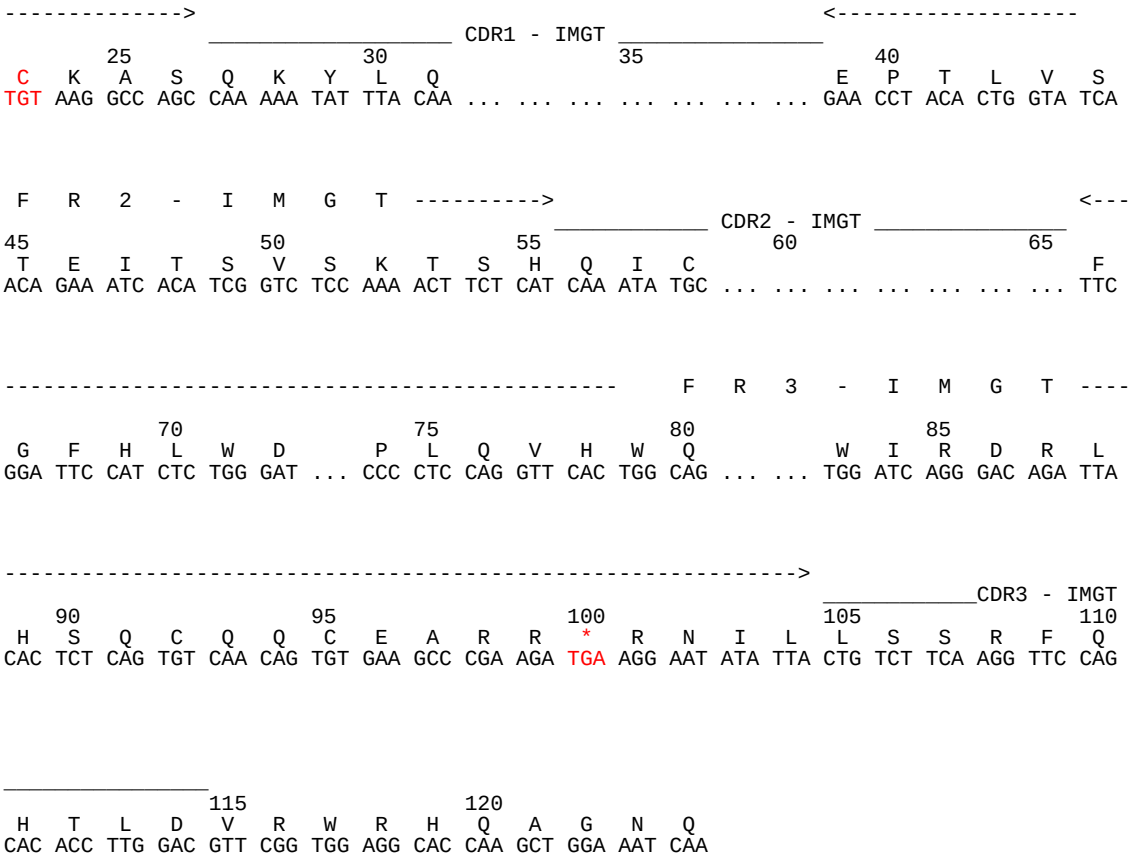


Abbildung 31 Datenbankanalyse von V_L(4H)

Der Pyrethroid-Klon 5F wurde auch mit Hilfe der Datenbank IMGT analysiert. Hier ergaben sich allerdings weder für die V_H- noch für die V_L-Region übereinstimmende IgG-Strukturen.

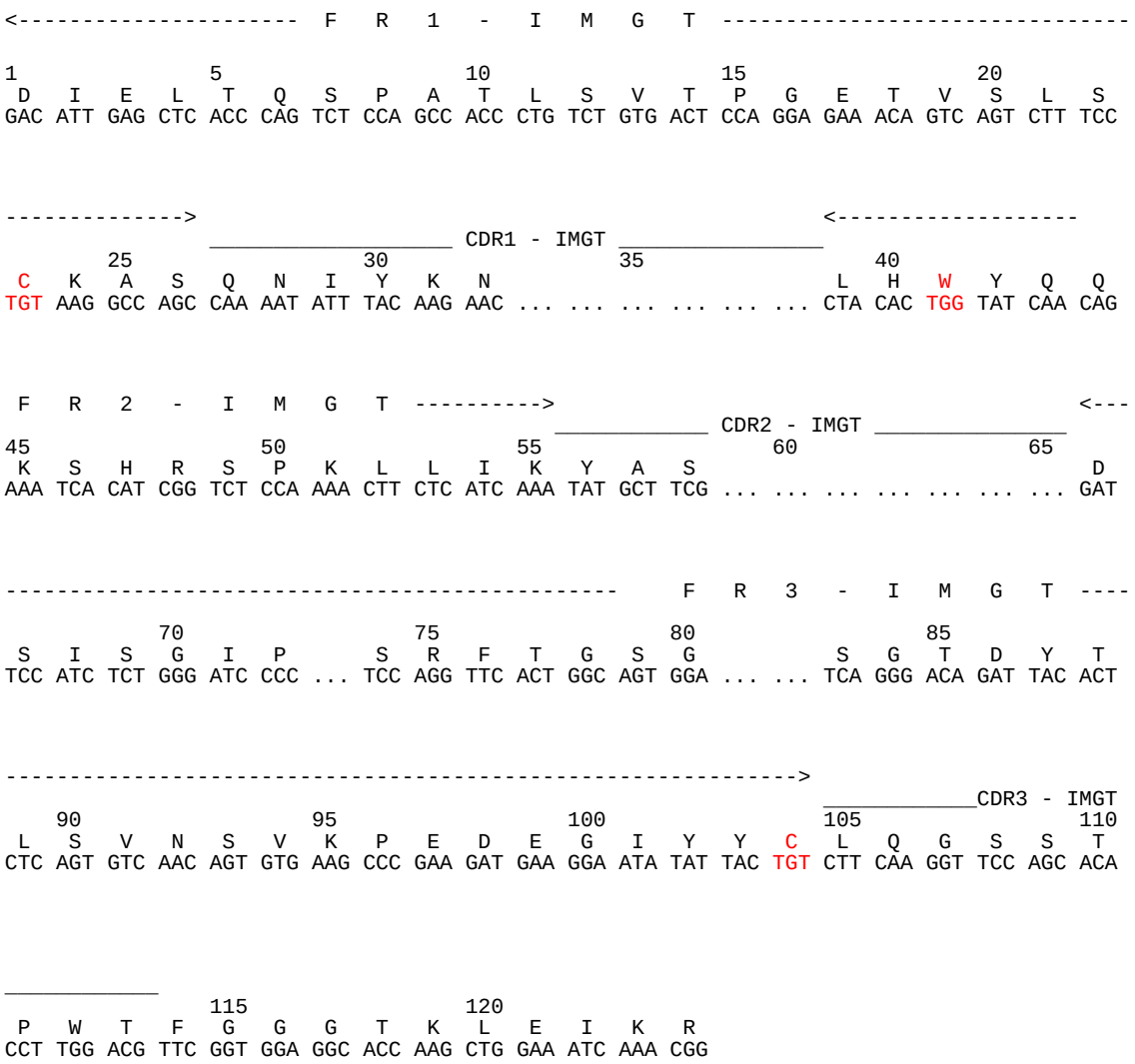


Abbildung 32 Datenbankanalyse von V_L(4H)-Del 28

1.3 *Oligonucleotide site-directed* Mutagenese nach Kunkel

Die zusätzliche Base Adenin in der V_L-Region des Pyrethroid-Klons 4H (s. Abb. 31, S. 109) konnte über die *oligonucleotide site directed* Mutagenese nach Kunkel (1985; Kunkel et al, 1987; vgl. II, 2.1.3, S. 52) aus der DNA entfernt werden.

Der Vektor pCANTAB 5E beinhaltete den M13 *ori* (s. II, 2.1, Abb.5, S. 32), wodurch die Gewinnung von Einzelstrang-DNA (ssDNA) ohne Umklonierung des scFv-Gens möglich war. Der bei der Einzelstrangsynthese eingesetzte *E. coli dut*$^-$ *ung*$^-$ Stamm CJ236 verursachte den Einbau der Base Uracil in die DNA anstelle der Base Thymin aufgrund der fehlenden Enzyme dUTPase und Uracil-N-glycosylase (vgl. II, 2.1.3.1, S. 53). Das Einbringen der in PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41f) gereinigten Vektor-DNA pCANTAB 5E/4H in CJ236 erfolgte über Elektroporation. Hundert µl elektro-kompetenten Bakterien wurden mit 1 µl (entsprach ca. 34 ng DNA)

rekombinanter Phagemid-DNA transformiert. Eine Kontrolle ohne DNA wurde mitgeführt, um eine Kontamination mit Fremdplasmiden auszuschließen. Die Ansätze wurden auf LB-AmpCm-Agar in seriellen Zehnfach-Verdünnungen (unverdünnt, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht ergab sich eine Transformationsrate von 3,4 x 10^8 Zellen/µg DNA. Demgegenüber waren die zwei gewachsenen Einzelkolonien des Kontrollansatzes zu vernachlässigen. Eine isolierte Einzelkolonie wurde in LB-AmpCm-Medium kultiviert. Der Medienzusatz Chloramphenicol (Cm) ermöglichte die Selektion der Chloramphenicol-resistenten Bakterien CJ236. Die Übernachtkultur wurde in einer 1:40-Verdünnung in 2xYT-Amp-Cm-Medium umgesetzt und bis zu einer OD_{600nm} 0,3 inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde im M.O.I.-Faktor 20 mit 80 µl der M13KO7-Helferphagen-Stammlösung von 1 x 10^{11} pfu/ml beimpft, was ca. 8 x 10^9 pfu Helferphagen entsprach. Nach Vollendung der ersten Stunde der 20 h-Schüttelinkubation erfolgte die Zugabe von Kanamycin. Die Suspension wurde abzentrifugiert und die ssDNA aus dem Zellrückstand isoliert (vgl. II, 2.1.3.1, S. 53). In Abbildung 33 ist die Gelanalyse der Einzelstrang-Präparation [Abb. 33, Gelspur (4)] im Vergleich zu dem ssDNA-Marker des M13mp18 Phagen [Abb. 33, Gelspur (1)] und dem M13mp19RF DNA-Marker [Abb. 33, Gelspur (2)] zu sehen. Weiterhin waren auf das 0,8 % Agarosegel das zirkuläre Plasmid pCANTAB 5E/4H [Abb. 33, Gelspur (3)] und die ssDNA des M13KO7-infizierten Bakterienstammes CJ236 [Abb. 33, Gelspur (5)] aufgetragen.

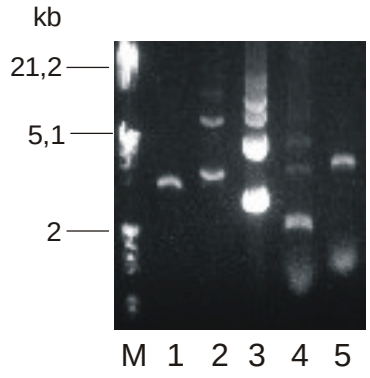


Abbildung 33 Einzelstrang-Präparation von pCANTAB 5E/4H (4). (1) ssDNA-Marker M13mp18, (2) DNA-Marker M13mp19RF, (3) pCANTAB 5E/4H zirkulär, (5) ssDNA CJ236, (M) Marker

Die aufgetragenen DNA-Mengen der Marker entsprachen 0,3 µg DNA. Die Bande der ssDNA des Klons 4H war in etwa mit der des ssDNA-Markers gleichzusetzen und entsprach deshalb ca. 0,3 µg ssDNA pro 10 µl aufgetragener Probe, was die

photometrische Messung der ssDNA-Konzentration von ca. 28 µg/ml bei 260 nm unter Einbezug des Wertes OD_{260nm} 1 = ca. 36 µg/ml bestätigte.

Die isolierte ssDNA von 4H wurde zur Hybridisierung mit dem speziell synthetisierten Oligonucleotid KUNKDEL eingesetzt. Der Primer (s. I, 1.7, Tab. 2, S.19) war bis auf die fehlende Base Adenin komplementär zur ssDNA und am 5'-Ende phosphoryliert. Die Phosphatgruppe war zur Verknüpfung der Enden des neu synthetisierten DNA-Stranges nötig. Unterschiedliche Mengen an ssDNA (0,12 µg, 0,2 µg und 0,3 µg DNA) wurden zusammen mit dem Primer und den anderen Reaktionskomponenten (vgl. II, 2.1.3.2, Tab. 12, S. 54) auf 70 °C für 5 min erhitzt. Der Ansatz mit 0,3 µg DNA wurde auf das Gesamtvolumen von 15 µl unter prozentualer Erhöhung der Reaktionskomponenten erweitert. Die auf Eis gelagerten Reaktionsgemische wurden zur Synthese des Doppelstrangs mit der T4 DNA-Polymerase und der T4 DNA-Ligase (vgl. II, 2.1.3.2, Tab.13, S. 55) nach Inkubation auf Eis und RT bei 37 °C für 2 h inkubiert. Eine Kontrolle ohne DNA wurde mitgeführt. Die Synthese wurde in einer DNA-Gelelektrophorese mit einem 0,7 %-igem Agarosegel (Abb. 34) überprüft.

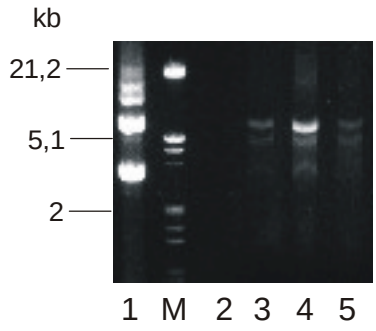


Abbildung 34 Doppelstrangsynthese von 4H-Del 28 nach Einsatz von 300 ng (3), 200 ng (4) und 120 ng (5) ssDNA. (1) pCANTAB 5E/4H zirkulär, (2) Kontrolle ohne ssDNA, (M) Marker

Die verschiedenen DNA-Mengen der zur Synthese eingesetzten ssDNA ergaben unterschiedliche Mengen an Doppelstrang-DNA (dsDNA). Die dsDNA der 200 ng ssDNA (Ansatz 2) [Abb. 34, Gelspur (4)] zeigte die stärkste Bande, wohingegen die dsDNA mit 300 ng (Ansatz 3) und 120 ng (Ansatz 1) [Abb. 34, Gelspur (3) bzw. (5)] in etwa identisch waren. Die Kontrolle [Abb. 34, Gelspur (3)] wies keine DNA auf. Die aufgetragene

dsDNA aller Konzentrationen hatte ungefähr das gleiche Laufmuster wie das zirkuläre Phagemid von 4H [Abb. 34, Gelspur (1)].

Anschließend erfolgte die Reinigung der dsDNA von Puffersalzen und Enzymen über PCI-Extraktion und die Volumeneinengung auf 6 µl über EtOH-Präzipitation. Die Transformation des *E. coli ung*$^+$ Stammes TG1 mit der Uracil enthaltenden dsDNA bewirkte den Austausch des Uracils mit Thymin und reduzierte die biologische Aktivität des Template DNA-Stranges (vgl. II, 2.1.3.2, S. 54). Die Elektroporation (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41ff) von je 100 µl elektro-kompetenten TG1-Zellen erfolgte mit je 1 µl der verschiedenen dsDNA-Synthesen (entsprach ca. 20-50 ng je Ansatz). Die Ansätze wurden auf SOBAG-Agar in seriellen Zehnfach-Verdünnungen ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die Auswertung der Transformation ergab Transformationsraten von 6,5 x 10^7-1,4 x 10^8 transformierte Zellen/µg DNA. Bei der Kontrolle ohne DNA war keine Bakterienkolonie gewachsen. Je Ansatz wurden 2 Bakterienkolonien für die Plasmidisolation kultiviert. Aus den Kulturen wurden Sicherheitskopien der Klone für die Expression angelegt. Ein einfacher RV mit dem Enzym *Not*I (s. II, 2.1.1.5, S. 39f) gab Aufschluß über den Erfolg der Transformation. Die Gelanalyse (1 % Agarose) des RV ist in Abbildung 35 wiedergegeben. Die Banden der Klone aus Ansatz 1 [Abb. 35, Klon 4H/11, Gelspur (1); Klon 4H/12,Gelspur (2)], aus Ansatz 2 [Abb. 35, Klon 4H/21, Gelspur (3); Klon 4H/22,Gelspur (4)] und aus Ansatz 3 [Abb. 35, Klon 4H/31, Gelspur (5); Klon 4H/32,Gelspur (6)] wiesen die gleiche Länge von ca. 5 kb auf.

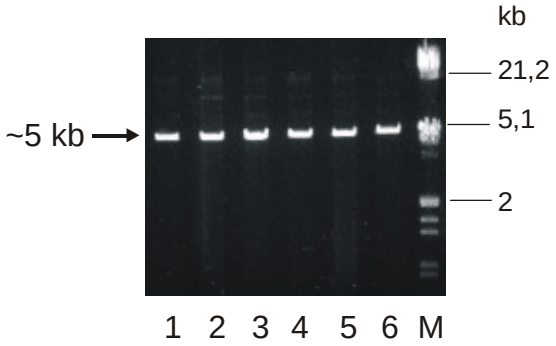


Abbildung 35 Del 28-Klonen 4H/11 (1), 4H/12 (2), 4H/21 (3), 4H/22 (4), 4H/31 (5), 4H/32 (6) nach RV mit RE *Not*I. (M) Marker

Die Sequenzierung der einzelnen Klone zeigte, daß die Deletion der Base Arginin bei den Klonen 4H/21, 22 und 31 geglückt war. Die Klone 4H/11, 12 und 32 zeigten keine Mutation an der gewünschten Stelle. Daraus ließ sich eine 50 % Erfolgsquote der

Mutagenese ableiten. Die Sequenzen der Klone mit Mutation waren identisch. Die gemeinsame Sequenz ist im Anhang aufgeführt.

1.4 Charakterisierung der mutierten Pyrethroid-spezifischen scFv-Klone

1.4.1 Analyse des scFv im ELISA

Die Sicherheitskopien der mutierten Klone 4H/21, 4H/22 und 4H/31 wurden zur Expression (vgl. II, 2.1.2.1, S. 51) der scFv-Fragmente kultiviert. Das *Screening* der exprimierten scFv wurde in einem indirekten, kompetitiven ELISA (vgl. II, 2.1.1.12, S. 47f) durchgeführt. Die verwendeten Microtiterplatten waren mit t-PMS-OVA (10 µg/ml) beschichtet. Die freien Bindungsstellen wurden in dem Blockierungsschritt mit 0,3 % OVA belegt. Die abzentrifugierten und sterilfiltrierten Überstände der Bakterienkulturen wurden unverdünnt und in 1:10- und 1:100-Verdünnungen (in PBS mit 0,3 % OVA) aufgetragen. Die Verdrängung der scFv von dem Beschichtungskonjugat erfolgte mit Bioallethrin (10.000 µg/l). PBS diente als Kontrolle. Die gebundenen scFv wurden mit dem Sekundärantikörper Anti-E-*Tag*-IgG-POD detektiert. Nach Inkubation des POD-Substrats für ca. 30 min wurde die Farbreaktion gestoppt und bei 450 nm gemessen. Abbildung 36 (S. 115) zeigt die Absorptionen der Verdrängungsreaktion bei den Klonen 4H/21, 4H/22 und 4H/31.

Eine Verdrängungsreaktion war ausschließlich bei dem unverdünnten Überstand des Klons 4H/31 zu erkennen. Die Absorptionen der 1:10-Verdünnung von 4H/31 konnten aufgrund der Standardabweichungen keiner Verdrängung zugeordnet werden. Die scFv-Fragmente der anderen Klone und deren Verdünnungen ließen sich von Bioallethrin nicht verdrängen und wiesen höhere Absorptionen auf als bei PBS.

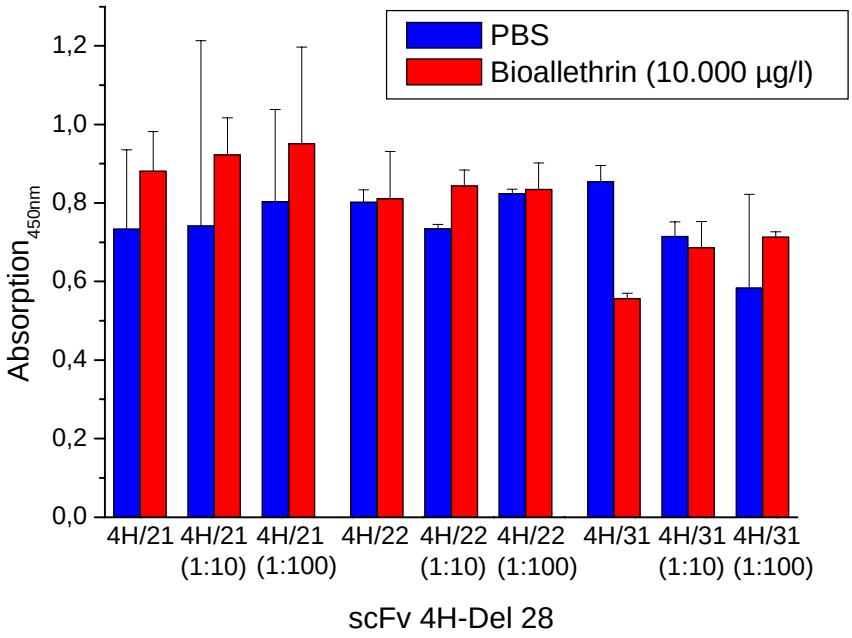


Abbildung 36 Verdrängung der scFv-Klone 4H/21, 4H/22, 4H/31 von t-PMS-OVA durch Bioallethrin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA

In einem weiteren ELISA wurde die Bindung des Klon 4H/31 gegenüber anderen Pyrethroiden überprüft. Neben Bioallethrin wurden Allethrin und S-Bioallethrin gewählt, da die verwendete Zellinie 1/A5 Kreuzreaktivitäten mit diesen isomerischen Substanzen aufwies (Pullen, 1994). Zusätzlich zur Kontrolle mit PBS wurde die Bindungsaffinität zu OVA getestet, indem die Mikrotiterplatte mit 10 µg/ml OVA beschichtet wurde. Der Überstand mit scFv4H/31 wurde unverdünnt und in einer 1:10-Verdünnung mit PBS aufgetragen. Der ELISA wurde wie in II, 2.1.1.12, S. 47f durchgeführt. Sowohl Allethrin als auch Bioallethrin konnten die scFv-Fragmente von dem Beschichtungskonjugat verdrängen, nicht jedoch S-Bioallethrin (Abb. 37, S. 116). Allerdings waren hohe Standardabweichungen zu verzeichnen, welche die Verdrängungsreaktionen überdeckten. Die Kontrolle mit OVA verlief negativ, wohingegen bei PBS eine leichte Verdrängungsreaktion zu erkennen war.

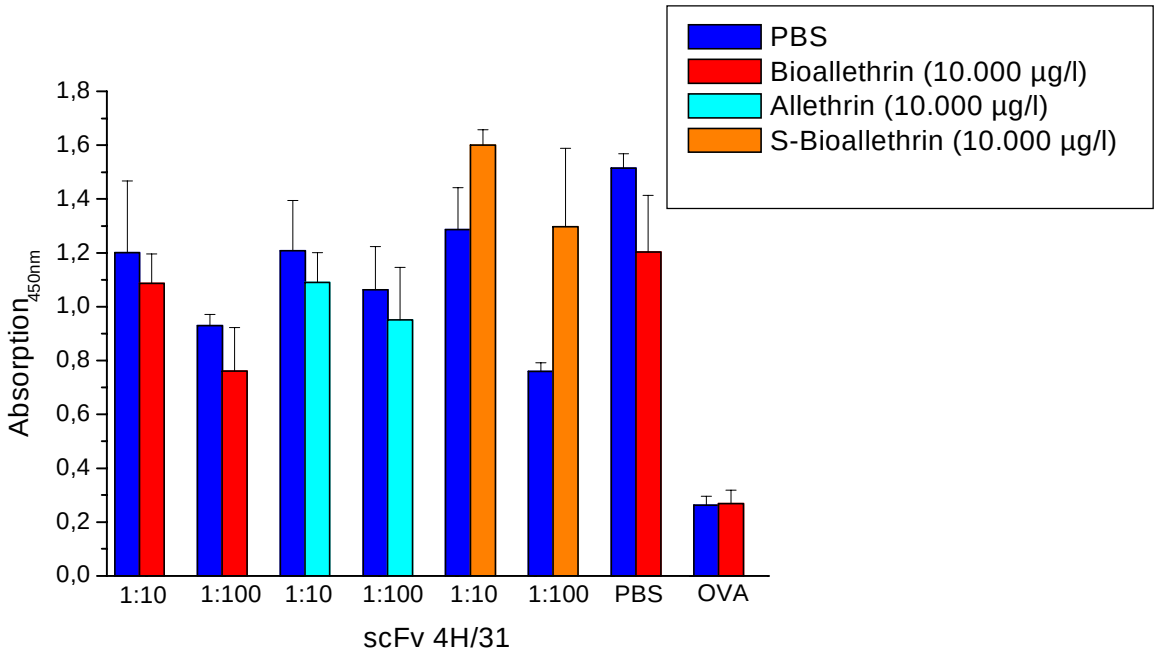


Abbildung 37 Verdrängung des scFv 4H/31 von t-PMS-OVA durch Bioallethrin, Allethrin und S-Bioallethrin (je 10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA

Der Klon 4H/31 wurde in einem weiteren ELISA analysiert (vgl. II, 2.1.1.12, S. 47f), in dem die Analyten Bioallethrin und Allethrin in verschiedenen Konzentrationen (PBS, 10 µg/l, 100 µg/l, 1000 µg/l und 10.000 µg/l) eingesetzt wurden. Der Überstand mit den löslichen scFv-Fragmenten wurde unverdünnt, in 1:10- und in 1:100-Verdünnungen aufgetragen. Hier ergab sich keine Verdrängung von 4H/31, weder durch Allethrin noch durch Bioallethrin.

1.4.2 Charakterisierung des scFv mit Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot

Mit Hilfe der SDS-PAGE und dem Westernblot wurde das exprimierte scFv-Fragment 4H/31 sowohl im Überstand als auch im Periplasma- und Cytoplasmaextrakt der Bakterienkultur lokalisiert und die Größe bestimmt. Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach Expression der scFv. Der Überstand wurde abgenommen, sterilfiltriert und über TCA-Präzipitation aufkonzentriert. Die abzentrifugierten Zellen der Bakterienkultur wurden für die Gewinnung der periplasmatischen Zellfraktion und des Cytoplasmaextraktes verwendet (vgl. II, 2.1.4.1, S. 56).

Die einzelnen Zell-Fraktionen und der Überstand wurden elektrophoretisch unter reduzierenden Bedingungen in einen 10,5 %-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt (vgl. II, 2.1.4.2, S. 57). Die Färbung des Gels erfolgte mit Silbernitrat (vgl. II, 2.1.4.2, S. 57).
Der zweite, identische Teil des Polyarylamidgels wurde nach der Elektrophorese im Westernblot eingesetzt (vgl. II, 2.1.4.3, S. 58) und die Proteinbanden auf eine PVDF-Membran übertragen. Die immunchemische Färbung erfolgte nach Inkubation von Anti-E-*Tag*-IgG und Anti-Maus-IgG-POD mit dem Westernblot-spezifischen POD-Substrat. Die Farbreaktion wurde nach 3 min mit H_2O dest. abgestoppt. Abbildung 38 (a) zeigt das SDS-PAGE mit den Proteinbanden des Periplasmaextrakts [Abb. 38a, Gelspur (1)], des Cytoplasmaextrakts [Abb. 38a, Gelspur (2)] und des Zellkultur-Überstands [Abb. 38a, Gelspur (3)].

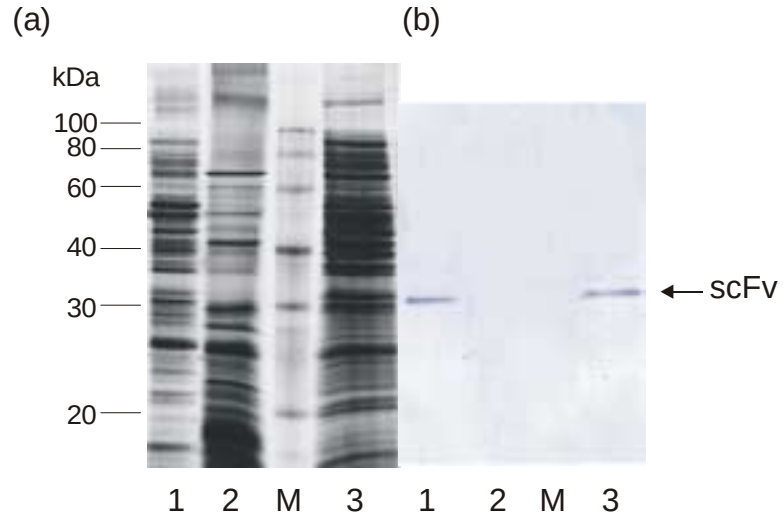


Abbildung 38 SDS-Gel (a) und Westernblot (b) von scFv 4H/31. (a): (1) Periplasmaextrakt 1:10 verdünnt, (2) Cytoplasmaextrakt 1:5 verdünnt, (3) Kulturüberstand konzentriert; (b): (1) Periplasmaextrakt 1:10 verdünnt, (2) Cytoplasmaextrakt 1:5 verdünnt, (3) Kulturüberstand konzentriert, (M) Marker

In Abbildung 38 (b) ist der entsprechende Westernblot mit den immunchemisch gefärbten Banden des scFv-Fragments im Periplasmaextrakt [Abb. 38b, Gelspur (1)] und Zellkultur-Überstand [Abb. 38b, Gelspur (3)] präsentiert. Im Cytoplasmaextrakt war keine scFv-Bande zu erkennen [Abb. 38b, Gelspur (2)]. Die Größe des scFv-Fragments lag bei ca. 30 kDa, was mit der über Computersoftware (DNA-Star, Wisconsin, USA) ermittelten Molekülgröße übereinstimmte.

2 Konstruktion von *s*-Triazin-spezifischen F_{ab}-Antikörperfragmenten

Drei *s*-Triazin-spezifische F_{ab}-Antikörperfragmente wurden aus den variablen Regionen (V_H und V_L) der entsprechenden scFv-Fragmente IPR-7, IPR-53 und IPR-23 und den murinen, konstanten Regionen von Maus-IgG konstruiert. Die konstanten Regionen der Schwer ($C_H1\gamma1$)- und Leichtkette ($C\kappa$) sind Bestandteile des Expressionsvektors pASK99. Die scFv Antikörper stammen aus einer *s*-Triazin-selektiven Antikörperbibliothek (Kramer, 2001a), wobei die Klone IPR-53 und IPR-23 über evolutionäre Mutation aus dem Template Antikörper IPR-7 gewonnen wurden (Kramer, 2001b). Durch Insertion der V_H- und V_L-Regionen der scFv Fragmente in den Vektor entstanden F_{ab}-Fragmente, die aus *E. coli* Bakterien sekretiert, affinitätschromatographisch aufgereinigt und mittels eines BIAcore Biosensor charakterisiert wurden.

Der Klonierungsprozeß ist in Abbildung 39 veranschaulicht. Die variablen Regionen wurden in separaten PCR-Reaktionen aus der scFv codierenden pCANTAB 5E Phagemid-DNA jedes IPR-Klones mit den jeweiligen Primerpaaren isoliert. Die Insertion der amplifizierten V_H Gene in pASK99 erfolgte wurde über die Restriktionsstellen *Pst*I und *Bst*EII. Die amplifizierten V_L Gene wurden über *Sst*I und *Xho*I kloniert.

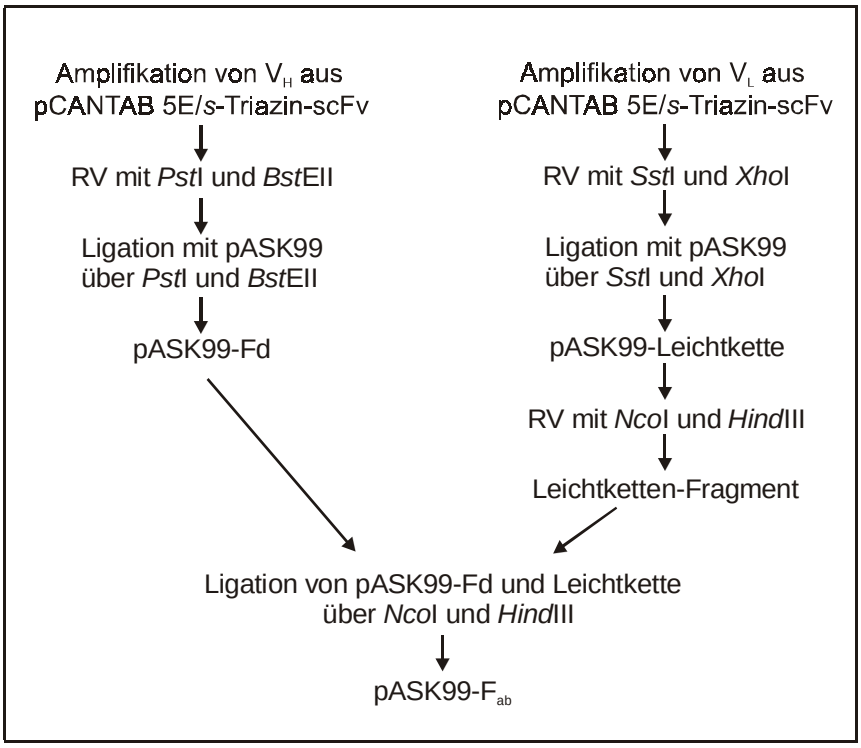


Abbildung 39 Klonierungsstrategie von pASK99-F_{ab}

Die Leichtketten-Fragmente aus den V_L enthaltenden Plasmiden wurden über die Restriktionsstellen *Nco*I und *Hind*III mit den pASK99-Fd Plasmiden ligiert. Bei Klon IPR-7 erfolgte die Klonierung der Schwerketten-Fragmente in die Leichtketten tragenden Plasmide über die Restriktionsstellen *Xba*I und *Sst*I, da die Erkennungssequenz von *Nco*I in dem V_H Gen enthalten ist. Die resultierenden pASK99-IPR Plasmide wurden sequenziert.

2.1 PCR-Amplifikation der variablen Regionen von scFv aus pCANTAB 5E

Die scFv/pCANTAB 5E Plasmide wurden aus Bakterienkulturen der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23 gewonnen und bei 260 nm auf die Konzentrationen von 0,44 µg/µl, 1,8 µg/µl bzw. 0,31 µg/µl bestimmt. Die Amplifikation der V_H- und V_L-Regionen aus den jeweiligen pCANTAB 5E Plasmiden erfolgte mittels PCR. Die V_H-spezifischen Primer V_HSUBFabBACK und V_HSUBFabFOR und die V_L-spezifischen Primer V_LSUBFabBACK und V_LSUBFabFOR waren mit Degenerationen synthetisiert worden, um eine Hybridisierung mit dem murinen Antikörperrepertoire zu ermöglichen (vgl. II, 1.7, Tab. 3, S. 20). Weiterhin enthielten die Primer die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Bst*EII für V_H bzw. *Sst*I und *Xho*I für V_L, um die variablen Gene in den Vektor pASK99 zu klonieren. Die Restriktionsstellen liegen in den Rahmen-Regionen 1 und 4 von V_H und V_L. Aufgrund der Höhe und der Unterschiede der Annealingtemperaturen der Oligonucleotide eines Primerpaares (vgl. II, 2.2.1.1, S. 62f) wurde für die Hybridisierungsphase in beiden PCR-Reaktionen ein Temperaturgradient von 15 °C, bei 50 °C beginnend, gewählt. Der PCR-Ansatz erfolgte nach Tabelle 14 (vgl. II, 2.2.1.1, S. 63). Je Klon und variabler Region wurden 10 und 1 ng Plasmid-DNA pro PCR eingesetzt. Um unspezifische Reaktionen der TaqPolymerase vor der DNA-Denaturierung zu umgehen, wurde das Enzym während der Anfangsdenaturierung zugegeben. Diese „Hotstart“-PCR-Reaktionen wurden nach dem Zeit-Temperatur-Profil aus II, 2.1.1.3, Tab. 5, S. 37 durchgeführt. Die Auswertung der einzelnen Ansätze erfolgte über eine präparative DNA-Gelelektrophorese. In Abbildung 40 ist die Gelanalyse des IPR-Klons 23 präsentiert. Auf dem 1,0 %-igen Agarosegel sind die DNA-Banden der V_H und V_L Region nach Amplifikation bei den drei verschiedenen Annealingtemperaturen 50,4 °C, 60 °C und 65,2 °C zu sehen.

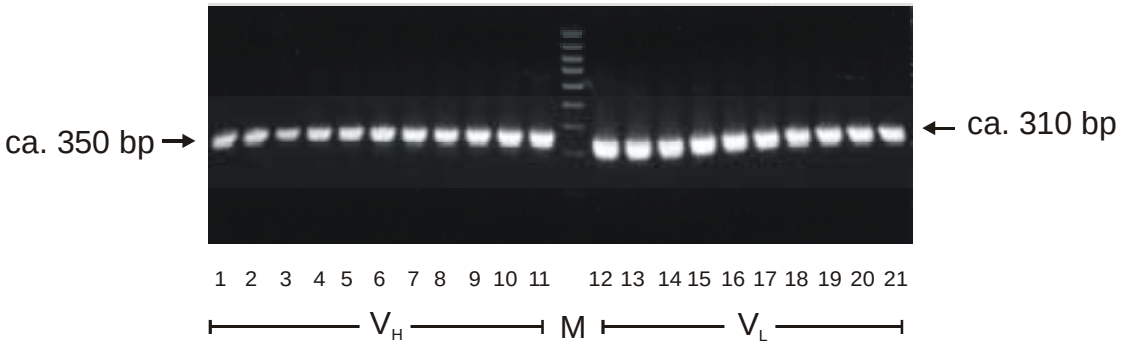


Abbildung 40 PCR-Produkte der variablen Regionen V_H und V_L von Klon IPR-23. V_H: variable Region der Schwerkette bei 50,4 °C (1)-(4), bei 60,2 °C (5)-(8), bei 65,2 °C (9)-(11); V_L: variable Region der Leichtkette bei 50,4 °C (12-14), bei 60,2 °C (15)-(18), bei 65,2 °C (19)-(21); (M) Marker

In den Gelspuren (1)-(11) und (12)-(21) wurden die amplifizierten V_H- bzw. V_L-Regionen elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Banden in den Gelspuren (1)-(4) und (12)-(14) im Annealing bei 50,4 °C, in (5)-(8) und (15)-(18) bei 60,2 °C und in (9)-(11) und (19)-(21) bei 65,2 °C entstanden waren. Die PCR-Ansätze der Template-Konzentrationen 1 und 10 ng erschienen in den Gelspuren (1), (2), (5), (6), (9), (12), (13), (15), (16), (19) bzw. (3), (4), (7), (8), (10), (11), (14), (17), (18), (20) und (21). Die Banden der V_H-Region befanden sich im Bereich von ca. 350 bp-Bande des 100 bp-Markers [Abb. 40, (M)], wohingegen die Banden der V_L-Region bei einer geringeren Länge von ca. 300-330 bp einzuordnen waren. Ein Unterschied bei den verschiedenen Konzentrationen und Temperaturen war nicht zu erkennen. Die DNA-Menge einer Bande wurde auf ca. 800 ng geschätzt, im Vergleich zu den aufgetragenen 500 ng des Markers. Die Amplifikationsprodukte der beiden variablen Regionen wurden aus dem Gel geschnitten und von der Agarose isoliert. Die resultierenden Konzentrationen der einzelnen Klone, unter Einberechnung von ca. 20 % Verlust bei der Aufreinigung, sind in Tabelle 24 (S. 121) wiedergegeben.

Für den nachfolgenden Restriktionsverdau (RV) der einzelnen V_H- und V_L-Regionen an den für die Klonierung in pASK99 relevanten Schnittstellen wurden je Klon und Ansatz ca. 2 µg DNA verwendet. Der RV von V_H erfolgte als Doppelverdau (vgl. II, 2.2.1.2, Tab. 15, S. 64) an den Restriktionsstellen *Pst*I und *Bst*EII mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Die Inkubationszeit von 6 h bei 37 °C ist auf die endständige Lage der Restriktionsstellen auf dem V_H-Gen zurückzuführen. Restriktionsenzyme können weniger leicht an die Erkennungssequenzen anlagern, wenn diese direkt an den Enden der

zu schneidenden DNA-Fragmente lokalisiert sind. Aus diesem Grund wurde die Inkubationszeit auf 6 h ausgedehnt.

Tabelle 24 DNA-Konzentrationen der amplifizierten variablen Regionen V_H und V_L der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23

Klon	**DNA-Konzentration [ng/µl]**	
	V_H	**V_L**
IPR-7	116	125
IPR-53	128	120
IPR-23	120	110

Die verdaute DNA wurde in einer Gelelektrophorese (1 % (w/v) Agarose) aufgetrennt. Abbildung 41 zeigt die geschnittenen Amplifikationsbanden des V_H-Gens von Klon IPR-7. Die einzelnen Banden mit der Länge von ca. 340 bp entsprachen etwa 400-500 ng DNA, gemessen an den aufgetragenen 500 ng des Markers.

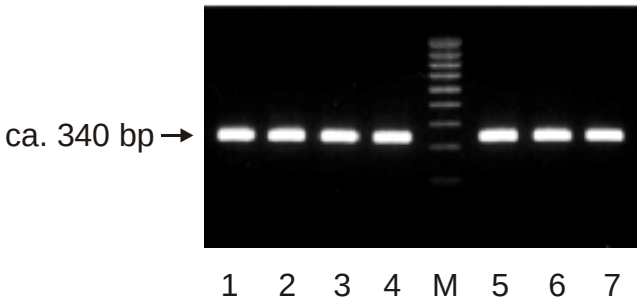


Abbildung 41 V_H-Gene des Klons IPR-7 nach Doppel-RV mit den RE *Pst*I und *Bst*EII. (1)-(7): V_H; (M) Marker

Die V_L-Regionen wurden in einem sequentiellen RV (vgl. II, 2.2.1.2, Tab. 16, S. 65) mit den Restriktionsenzymen *Sst*I und *Xho*I geschnitten. Der sequentielle RV war wegen der unterschiedlichen Pufferbedingungen der Enzyme erforderlich und wurde unter Aufstockung der Puffersalze durchgeführt. Die eingesetzte DNA-Menge je Ansatz betrug ca. 2 µg und die Inkubationszeiten wurden wie bei V_H auf 6 h angesetzt. Die Auswertung des RV erfolgte über Gelelektrophorese (1 % (w/v) Agarose). Auf dem Gelfoto (Abb. 42) sind die DNA-Banden der geschnittenen V_L-Fragmente von IPR-7 zu sehen.

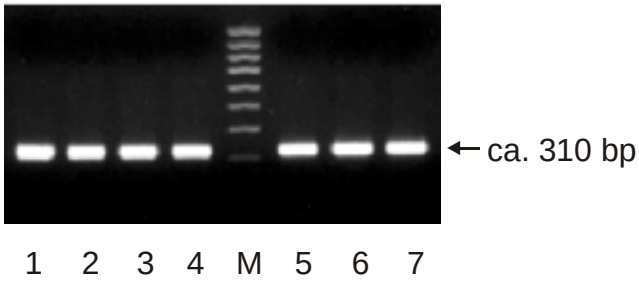


Abbildung 42 V_L-Gene des Klons IPR-7 nach sequentiellem RV mit den RE *Sst*I und *Xho*I. (1)-(7): V_L; (M) Marker

Die Schätzung der DNA-Menge anhand des Markers ergab ca. 400-500 ng pro Bande des V_L-Gens mit einer Länge von ca.310 bp. Die DNA-Konzentrationen der geschnittenen V_H- und V_L-Fragmente der einzelnen Klone nach Extraktion aus der Agarose sind in Tabelle 25 aufgelistet. Die Konzentrationen wurden unter Einbezug von 20 % Aufreinigungsverlust berechnet.

Tabelle 25 DNA-Konzentrationen der 2-fach geschnittenen V_H- und V_L-Fragmente der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23

Klon	**DNA-Konzentration [ng/µl]**	
	V_H	**V_L**
IPR-7	53	50
IPR-53	50	45
IPR-23	50	52

2.2 Ligation von V_H und V_L mit dem Vektor pASK99

Die variablen Regionen wurden separat in den entsprechend präparierten Expressionsvektor pASK99 inseriert. Dazu wurde Plasmid-DNA des Vektors aus transformierten *E.coli* JM83-Zellen mit einer DNA-Konzentration von 0,22 µg/µl isoliert. Anschließend folgten ein Doppel-RV (vgl. II, 2.2.1.2, Tab. 15, S. 64) der Vektor-DNA mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Bst*EII zur Klonierung des V_H-Gens, und ein sequentieller RV (vgl. II, 2.2.1.2, Tab. 16, S. 65) mit den Enzymen *Sst*I und *Xho*I für die V_L-Region. Je Ansatz wurden ca. 0,6 µg DNA verwendet. Die Inkubationszeiten wurden

auf 3 h gegenüber der RV-Reaktionen der variablen Regionen verkürzt, da die Restriktionsstellen in der zirkulären Plasmid-DNA nicht endständig exponiert waren. Abbildung 43 zeigt die elektrophoretische Auswertung der RV-Ansätze in einem 0,7%igem Agarosegel. Die unterschiedliche Präparation der Vektor-DNA mit den Enzymen *Pst*I/*Bst*EII [Abb. 43, Gelspuren (1)-(8)] und *Sst*I/*Xho*I [Abb. 43, Gelspuren (10)-(17)] ist nicht zu erkennen, da die Restriktionsstellen jeweils dicht aneinander auf der Vektor-DNA lokalisiert sind. Anhand des Markers wurde je Bande eine Länge von ca. 4,2 kb und eine DNA-Menge von ca. 200 ng bestimmt. Nach Isolation der DNA aus der Agarose standen Vektorpräparationen mit Konzentrationen von ca. 30 ng/µl für pASK99(*Pst*I/*Bst*EII) und pASK99(*Sst*I/*Xho*I) für die Ligation mit den variablen Genen zur Verfügung.

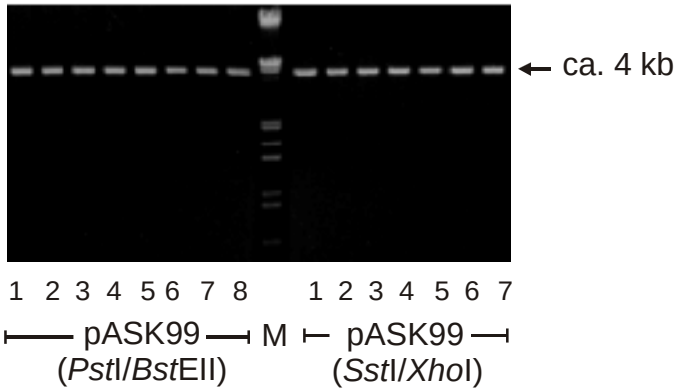


Abbildung 43 pASK99 nach RV mit den RE *Pst*I/*Bst*EII und *Sst*I/*Xho*I. pASK99(*Pst*I/*Bst*EII) (1)-(8): pASK99 2-fach geschnitten mit RE *Pst*I/*Bst*EII; pASK99(*Sst*I/*Xho*I) (1)-(7): pASK99 2-fach geschnitten mit RE *Sst*I/*Xho*I; (M) Marker

Die Ligation der einzelnen DNA-Fragmente erfolgte in einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3. Mit einer Gesamtmenge an DNA von 500 ng je Ligationsansatz ergaben sich folgende Zusammensetzungen in Tabelle 26 (S. 123). Die Endvolumina der Ligationen wurden auf 15 µl erweitert, inklusive der entsprechenden Menge an 10x Puffer und 5 % (v/v) T4 DNA Ligase (entspricht 3,75 Units). Eine Kontrolle ohne Insert wurde mitgeführt, um die Religation des 2-fach geschnittenen Vektors zu überprüfen. Nach Durchführung der Reaktionen (vgl. II, 2.1.1.6, S. 41) wurden die einzelnen Ansätze für die nachfolgende Elektroporation mit PCI extrahiert und die DNA mit Ethanol präzipitiert (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41f). Die DNA wurde in je 6 µl H_2O* resuspendiert.

Tabelle 26 Mengenzusammensetzungen der einzelnen Ligationsreaktionen aus den DNA-Fragmenten der variablen Regionen und pASK99

Klon	**V_H**	**pASK99(*Pst*I/*Bst*EII)**	**V_L**	**pASK99(*Sst*I/*Xho*I)**
IPR-7	7,1 µl	4,2 µl	7,5 µl	4,2 µl
IPR-53	7,5 µl	4,2 µl	8,3 µl	4,2 µl
IPR-23	7,5 µl	4,2 µl	7,2 µl	4,2 µl

Elektro-kompetente JM83 Bakterien wurden mit je 1 µl der verschiedenen Ligationen und ohne DNA transformiert und die Ansätze in seriellen 10-fach Verdünnungen (je 100 µl) auf LB-Amp-Agar ausplattiert (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41ff). Die Auswertung der Elektroporation mit pASK99-V_H der verschiedenen IPR-Klone [$Trafo_{(L)}$] und der Kontrollen ohne Insert [$Trafo_{(K)}$] und ohne DNA (KT) ist in Tabelle 27 wiedergegeben.

Tabelle 27 Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien nach der Transformation von *E. coli* JM83 mit pASK99-V_H [$Trafo_{(L)}$] der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23. $Trafo_{(K)}$: Ligationskontrolle ohne Insert; KT: Transformationskontrolle ohne DNA

Verdünnung	**Anzahl der gewachsenen Kolonien**				
	KT	$Trafo_{(K)}$	$Trafo_{(L)}$-IPR 7	$Trafo_{(L)}$-IPR 53	$Trafo_{(L)}$-IPR 23
unverdünnt	-	-	∞*	∞	∞
10^{-1}			∞	∞	∞
10^{-2}			561	728	262
10^{-3}			80	63	36

* entspricht einer großen Anzahl an Kolonien, die nicht gezählt wurden

Die Transformation verlief ohne Hintergrund, da keine Bakterienkolonien auf den Agarplatten der beiden Kontrollen gewachsen waren. Auch bei der Transformation von JM83 mit den pASK99-V_L-Plasmiden war kein Hintergrund an Fremdplasmiden zu erkennen. Die berechneten Transformationsraten lagen im Bereich zwischen 1,5 x 10^7 Zellen/µg DNA der Variante pASK99-V_L(IPR-53) und 1,2 x 10^8 Zellen/µg DNA von pASK99-V_H(IPR-7).

2.3 Ligation der Schwer- und Leichtketten-Fragmente mit pASK99

Einzelkolonien der verschiedenen Transformationsansätze aus III, 2.2, Tab. 27 wurden in LB-Amp-Medium kultiviert und die Plasmide der pASK99-Fd und pASK99-Leichtketten-Varianten aus den Bakterienzellen isoliert. Bei 260 nm wurden Plasmidkonzentrationen mit Werten zwischen 0,46-0,73 µg/µl gemessen. Die isolierten Schwerketten (Fd)- und Leichtketten-Plasmide der verschiedenen Klone wurden im RV für die Ligaton präpariert. Die Plasmide der Klone IPR-53 und IPR-23 wurden im Doppel-RV (vgl. II, 2.2.1.3, S. 67) an den Restriktionsstellen *Nco*I und *Hind*III mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Bei Klon-7 hingegen kamen die Enzyme *Xba*I und *Sst*I zum Einsatz, da die Restriktionsstelle *Nco*I Bestandteil des V_H-Gens von IPR-7 ist. Je Ansatz wurden ca. 2 µg DNA verwendet. Nach 3-stündiger Inkubation wurden die RV-Ansätze über Gelelektrophorese (1 % (w/v) Agarosegel) ausgewertet. Abbildung 44 zeigt die elektrophoretisch getrennten pASK99-Leichtketten-Plasmide der Klone IPR-23 [Abb. 44, Gelspuren (1)-(6)] und IPR-53 [Abb. 44, Gelspuren (7)-(11)] nach dem RV mit *Nco*I und *Hind*III.

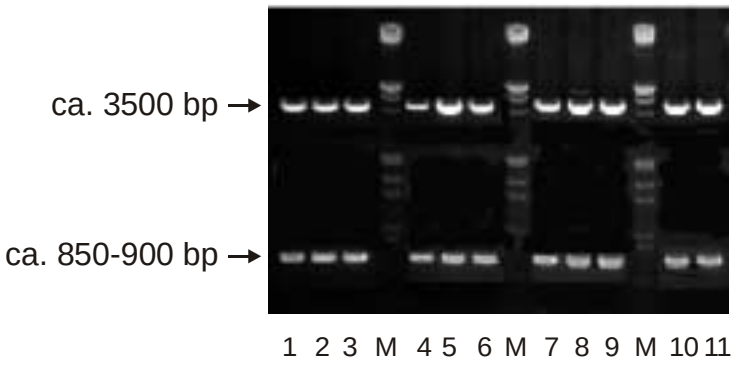


Abbildung 44 pASK99-Leichtkette der Klone IPR-23 und IPR-53 nach Doppel-RV mit den RE *Nco*I/*Hind*III

Die DNA-Banden der geschnittenen Plasmide beider Klone sind in die Banden des linearisierten, *Nco*I/*Hind*III-geschnittenen Vektors mit der Länge von ca. 3500 bp und in die herausgelösten Leichtketten-Fragmente mit der Länge von 850-900 bp zu unterteilen. Die DNA-Mengen der Leichtketten-Fragmente entsprachen ca. 300 ng pro Bande im Vergleich zu der aufgetragenen DNA-Menge des Markers von 0,5 µg.

Die 2-fach geschnittenen pASK99-Fd-Plasmide (Abb. 45) der Klone IPR-23 [Abb. 45, Gelspuren (1)-(4)] und IPR-53 [Abb. 45, Gelspuren (5)-(8)] setzen sich aus den Vektorfragmenten mit ca. 3800 bp Länge und den herausgetrennten DNA-Stücken

(inklusive Cκ-Regionen) mit einer Länge von ca. 500 bp zusammen. Die Banden der Vektorfragmente wurden auf eine DNA-Menge von ca. 500 ng pro Bande geschätzt, gemessen an den 0,5 µg DNA des aufgetragenen Markers.

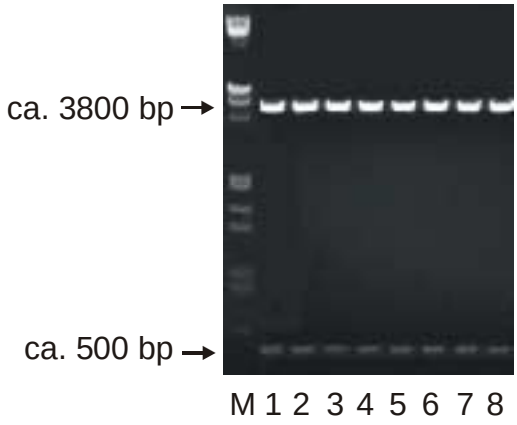


Abbildung 45 pASK99-Fd der Klone IPR-23 und IPR-53 nach Doppel-RV mit den RE *Nco*I/*Hind*III (1)-(8); (M) Marker

Die Gelanalyse (Abb. 46) des *Xba*I/*Sst*I-RV von pASK99-Fd(IPR-7) ergab eine Auftrennung des Plasmids in die Bande des 2-fach geschnittenen Vektors der Länge von ca. 3450-3500 bp und in die Bande des Fd-Fragments, einschließlich der Sequenz des Peptids Strep-*Tag*II, mit der Länge von ca. 850 bp. Die DNA-Mengen der zu isolierenden Banden des Fd-Fragments entsprachen ca. 200 ng pro Bande.

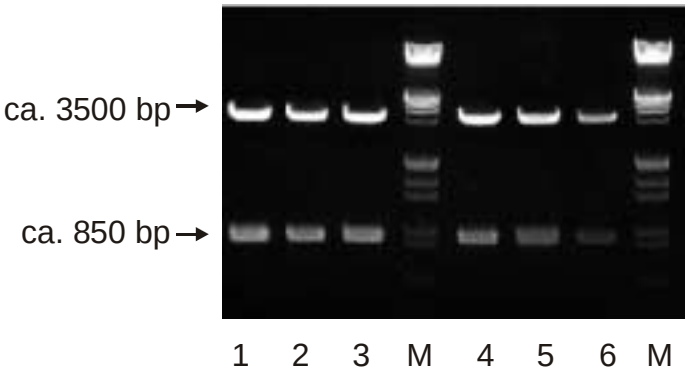


Abbildung 46 pASK99-Fd des Klons IPR-7 nach RV mit den RE *Xba*I/*Sst*I. (1)-(6): pASK99-Fd 2-fach geschnitten; (M) Marker

In Abbildung 47 (S. 127) sind die Banden des *Xba*I/*Sst*I-geschnittenen pASK99-Leichtketten-Plasmids von Klon IPR-7 zu sehen. Die im RV entstandenen Banden [Abb.47, (1)-(8)] mit der Länge von ca. 3800 bp und 540 bp waren dem linearisierten

Vektor bzw. dem herausgelösten DNA-Fragment, einschließlich der konstanten Region der Schwerkette, zuzuordnen. Mit Hilfe des Markers (0,5 µg DNA) wurde die DNA-Menge der Vektorfragmente auf ca. 400 ng je Bande bestimmt.

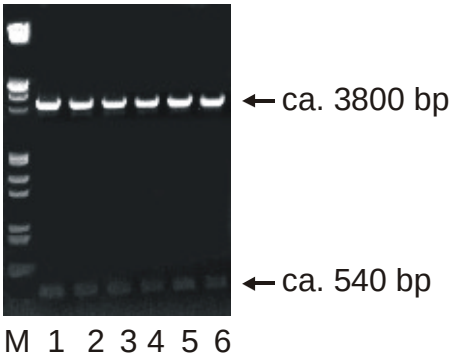


Abbildung 47 pASK99-Leichtkette des Klons IPR-7 nach RV mit den RE *Xba*I/*Sst*I. (1)-(6): pASK99-Leichtkette 2-fach geschnitten; (M) Marker

Die DNA-Banden der isolierten Schwer- und Leichtkettenfragmente sowie der linearisierten Vektoren wurden aus den Agarosepräparaten gelöst. In Tabelle 28 sind die DNA-Konzentrationen der einzelnen, zu ligierenden Fragmente jedes Klons aufgeführt, unter Einbezug von 20 % Verlust bei der Aufreinigung aus der Agarose.

Tabelle 28 DNA-Konzentrationen der 2-fach geschnittenen Vektoren und Schwer (Fd)- und Leichtketten-Fragmente der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23

Klon	**DNA-Konzentration [ng/µl]**		
	Fd	Leichtkette	Vektor
IPR-7	32	-	56
IPR-53	-	40	53
IPR-23	-	48	53

Für die Ligation der Schwer- und Leichtketten mit pASK99 wurden die verschiedenen DNA-Fragmente in einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 in einer Gesamtmenge von 500 ng je Ligationsansatz eingesetzt. In Tabelle 29 (S. 128) sind die Volumina der zu ligierenden Leichtketten- und Vektor-Fragmente der Klone IPR-53 und IPR-23 bzw. des zu ligierenden Fd- und Vektor-Fragments des Klons IPR-7 wiedergegeben.

Tabelle 29 Mengenzusammensetzungen [µl] der einzelnen Ligationsreaktionen aus den DNA-Fragmenten der Schwer (Fd)- und Leichtketten und pASK99

Klon	**Fd**	**pASK99(*Xba*I/*Xho*I)**	**Leichtkette**	**pASK99(*Nco*I/*Hind*III)**
IPR-7	11,7 µl	2,3 µl	-	-
IPR-53	-	-	9,4 µl	2,4 µl
IPR-23	-	-	7,8 µl	2,4 µl

Die Endvolumina der Ligationsansätze der Klone IPR-53 und IPR-23 wurden auf 15 µl und des Klons IPR-7 auf 17 µl erweitert, unter Berücksichtigung der entsprechenden Menge an 10x Puffer und T4 DNA Ligase. Eine Ligationskontrolle ohne Insert sollte die Religation des 2-fach geschnittenen Vektors überprüfen. Nach Beendigung der Ligationsreaktionen (vgl. II, 2.1.1.6, S. 41) wurden die Ansätze über PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41f) aufbereitet und in 6 µl H_2O* gelöst. Die anschließende Elektroporation (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41ff) erfolgte je Ansatz mit 100 µl elektro-kompetenten JM83 Bakterien und 1 µl Ligationsansatz (entspricht ca. 60 ng DNA). Eine Kontrolle ohne DNA wurde mitgeführt. Die transformierte DNA-Menge entsprach ca. 60 ng, berechnet aus der DNA-Menge des Ligationsansatzes abzüglich ca. 20 % Verlust bei der PCI- und EtOH-Reinigung. Die verschiedenen Transformationsansätze [$Trafo_{(L)}$] wurden in seriellen 10-fach Verdünnungen auf LB-Amp-Agar ausplattiert, die Ligations [$Trafo_{(K)}$]- und Transformationskontrolle (KT) nur als unverdünnte Proben. Die Transformationsauswertung (Tab. 30, S. 129) zeigt die Anzahl der auf dem Selektionsagar gewachsenen Bakterienkolonien. Aus den gewachsenen Bakterienkolonien der $Trafo_{(L)}$-Ansätze ließen sich unter Berücksichtigung von ca. 60 ng eingesetzter DNA Transformationsraten von 1×10^7- $3{,}3 \times 10^7$ transformierte Zellen/µg DNA errechnen. Da keine Kolonien auf den Agarplatten mit den Kontrollen KT und $Trafo_{(K)}$ gewachsenen waren, war eine Transformation von Fremdplasmiden auszuschließen. Eine Auswahl von isoliert gewachsenen Einzelkolonien wurden zur anschließenden Expression der F_{ab}-Fragmente verwendet.

Tabelle 30 Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien nach der Transformation von *E. coli* JM83 mit pASK99-V_H [$Trafo_{(L)}$] der Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23. $Trafo_{(K)}$: Ligationskontrolle ohne Insert; KT: Transformationskontrolle ohne DNA

Verdünnung	**Anzahl der gewachsenen Kolonien**				
	KT	$Trafo_{(K)}$	$Trafo_{(L)}$-IPR 7	$Trafo_{(L)}$-IPR 53	$Trafo_{(L)}$-IPR 23
unverdünnt	-	-	∞*	∞	∞
10^{-1}			608	1040	∞
10^{-2}			63	83	203
10^{-3}			4	8	15

*entspricht einer großen Anzahl an Kolonien, die nicht gezählt wurden

2.4 Bakterielle Expression und *Screening* der F_{ab}-Antikörperfragmente

Zwölf isoliert gewachsene Einzelkolonien je Klon, die nach der Transformation über LB-Amp-Agar selektiert worden waren, wurden zur Expression (vgl. II., 2.2.2, S. 67) der F_{ab}-Antikörperfragmente gepickt und in LB-Amp-Medium angezogen. Die Bakterienkultur der einzelnen Klone erfolgte in je 10 ml bei Schüttelinkubation, bis die Bakteriensuspensionen eine OD_{550} von 0,5 erreicht hatten. Zur Induktion des *tet*A Promoters wurden 0,4 µM Anhydrotetracyclin zugegeben und die Induktionsdauer auf 4 h eingestellt. Die exprimierten F_{ab}-Antiköperfragmente wurden über Zell-Lyse mit Saccharosepuffer aus dem Periplasma der *E. coli* Zellen gewonnen.

Das *Screening* der F_{ab}-Antikörper wurde in einem indirekten, kompetitiven ELISA (vgl. II, 2.2.3, S. 68f) durchgeführt. Die Antikörperfragmente in den periplasmatischen Zellfraktionen banden an das immobilisierte Beschichtungskonjugat IPR-OVA in den Kavitäten der Mikrotiterplatten. Die Verdrängung der F_{ab}-Fragmente von IPR-OVA erfolgte mit einer Überschußkonzentration (10.000 µg/l) Atrazin bzw. PBS. Durch Zugabe des POD-gekoppelten Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG) wurden die über das IPR-OVA-Konjugat immobilisierten F_{ab}-Fragmente markiert. Die enzymatische Reaktion, ausgelöst durch POD-Substrat, wurde im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Das *Screening*ergebnis wird am Beispiel des Klons IPR-53 in Abbildung 48 (S. 130) präsentiert.

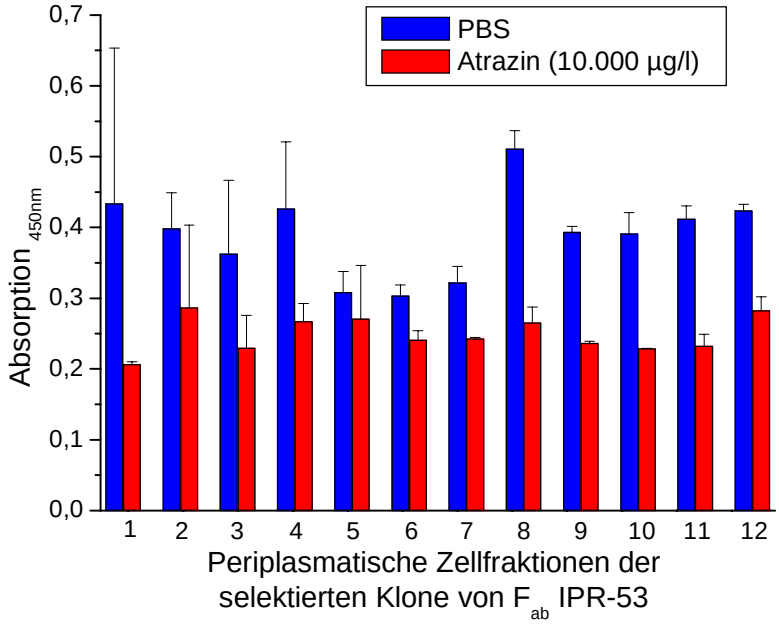


Abbildung 48 Verdrängung der selektierten F_{ab} IPR-53 Klone aus den periplasmatischen Zellfraktionen von IPR-OVA durch Atrazin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA

Eindeutige Verdrängungsreaktionen wurden bei den Klonen 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, und 12 von F_{ab} IPR-53 gemessen mit Absorptionen von ca. 0,23-0,26 bei Verdrängung mit Atrazin und ca. 0,3-0,5 bei Einsatz von PBS. Klon IPR-53/8 wies die beste Verdrängung auf und wurde für weitere Analysen in einem größeren Maßstab exprimiert. Sowohl bei F_{ab} IPR-7 als auch bei IPR-23 zeigten 3 Klone eine Verdrängung, wobei jeweils der mit der spezifischsten Reaktion (F_{ab} IPR-7/8 und F_{ab} IPR-23/2) ausgewählt wurde.
Parallel zur nachfolgenden Expression für Aufreinigung und Kinetikmessungen erfolgte die Plasmidisolation der ausgewählten F_{ab}-Varianten zur Kontrolle der Klonierung durch RV und zur Sequenzierung der F_{ab}-Gene. Abbildung 49 (S. 131) zeigt die Gelanalyse (0,8 % Agarosegel) des RV der einzelnen Plasmide mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III. Diese Enzyme trennten die F_{ab}-Fragmente an den entsprechenden Restriktionsstellen aus dem pASK99-Vektor. Sowohl F_{ab} IPR-7 [Abb. 49, Gelspur (1)] als auch F_{ab} IPR-53 [Abb. 49, Gelspur (2)] und F_{ab} IPR-23 [Abb. 49, Gelspur (3)] wiesen eine Länge von ca. 1700 bp auf. Die Bande des 2-fach geschnittenen Vektors pASK99 bei allen drei Präparationen war ca. 3000 bp lang.

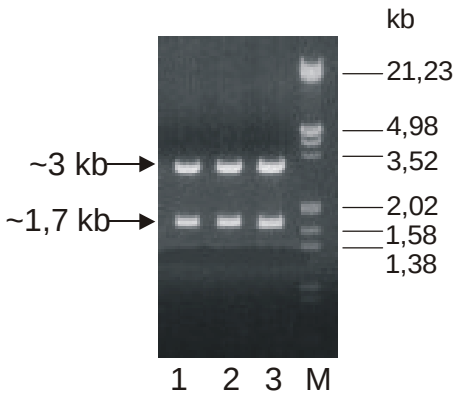


Abbildung 49 F_{ab} IPR-7 (1),F_{ab} IPR-53 (2), F_{ab} IPR-23 (3) nach RV mit den RE *Xba*I und *Hind*III. (M) Marker

Die Sequenzierung der F_{ab}-Klone wurde von der Firma SequiServe (Vaterstetten) mit den Primern SEQU1, SEQU2, SEQU3 und SEQU4 (s. I, 1.7, Tab.3, S. 20) durchgeführt. Die Sequenzen von F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23 sind in VII, S. 217ff wiedergegeben.

2.5 F_{ab}-Enzymimmunoassay

Die Klone F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23 wurden in einem direkten, kompetitiven ELISA (vgl. II, 2.2.4, S. 69f) auf Bindung und Verdrängung getestet. Die periplasmatischen Zellfraktionen der einzelnen Klone mit den löslichen F_{ab}-Fragmenten wurden in folgenden PBS-Verdünnungen eingesetzt:

F_{ab} IPR-7/8	1:500
F_{ab} IPR-53/11	1:900
F_{ab} IPR-23/2	1:900

Die F_{ab}-Fragmente wurden über Ziege-anti-Maus-IgG an die Mikrotiterplatte gebunden. Die Verdrängung des Enzymtracers von den Antikörperfragmenten erfolgte mit Atrazin-Standards in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach Zugabe des Lumineszenz-Substrats wurden sofort im Anschluß die Lumineszenzwerte des POD-Enzyms in RLU (= *relative luminescence units*) gemessen. Abbildung 50 (S. 132) zeigt die normierten, sigmoiden Kalibrationskurven der drei Klone. Die Werte sind in $\%B/B_0$ angegeben, die nach II, 2.2.4.1, S. 71f umgerechnet wurden.

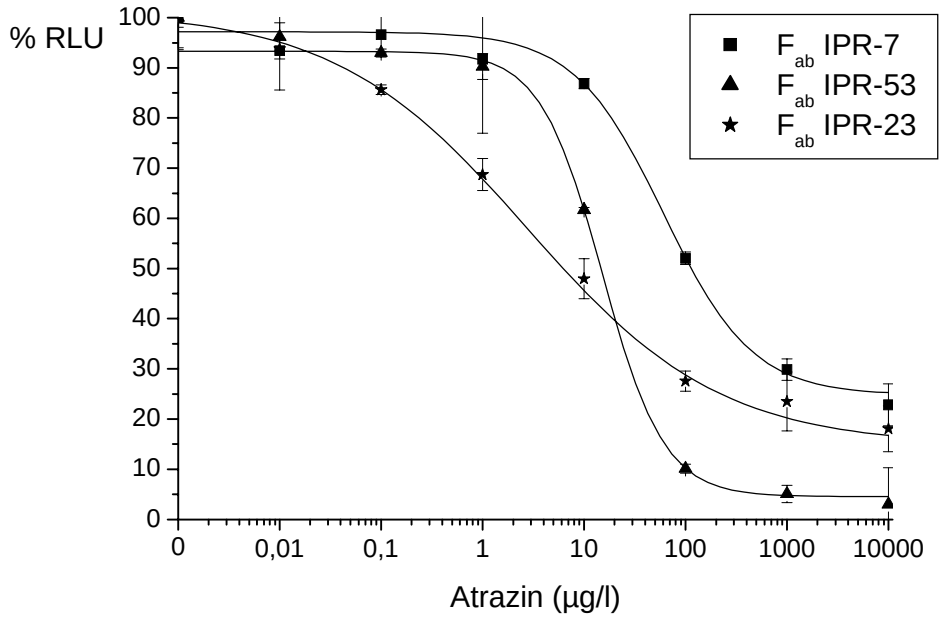


Abbildung 50 Kalibrationskurven von F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23 bei Verdrängung durch Atrazin im direkten, kompetitiven ELISA

Die errechneten Werte der Testmittelpunkte und der Nachweisgrenzen der einzelnen F_{ab}-Fragmente sind in Tabelle 31 aufgelistet.

Tabelle 31 Nachweisgrenze (80 % B/B_0) und Testmittelpunkt (50 % B/B_0) in µg/l Atrazin der F_{ab}-Antikörperfragmente der Klone F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23

Klon	**50 % B/B_0 [µg/l]**	**80 % B/B_0 [µg/l]**
IPR-7	60,5	14,9
IPR-53	15,2	5,7
IPR-23	2,7	0,13

Die ermittelten Testmittelpunkte und Nachweisgrenzen der einzelnen F_{ab}-Klone spiegelten die Verbesserung der Affinitäten über evolutionäre Mutation der entsprechenden scFv-Fragmente (Kramer, 2001b) wieder.

2.6 Reinigung und Konzentrierung der exprimierten F_{ab}-Fragmente

Die Klone F_{ab} IPR-7/8, F_{ab} IPR-53/8 und F_{ab} IPR-23/2 wurden in einem größeren Volumen exprimiert (vgl. II., 2.2.2, S. 67). Dazu erfolgte die Kultur der einzelnen Klone in je 2 l LB-Amp-Medium. Nach 4-stündiger Induktion mit Anhydrotetracyclin wurden je 20 ml periplasmatische Zellfraktion über Zelllyse gewonnen, gegen den Laufpuffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) der nachfolgenden Affinitätschromatographie dialysiert und sterilfiltriert.

Die Aufreinigung der exprimierten F_{ab}-Fragmente aus den Periplasmaextrakten erfolgte über Streptavidin-Affinitätschromatographie (vgl. II, 2.2.5.1, S. 73). Dabei wurden die Extrakte mit einer Flußrate von 20 ml/h über die Streptavidin-gekoppelte Säule gegeben und die gebundenen F_{ab}-Antikörperfragmente mit 2,5 mM Desthiobiotin in 2 ml Fraktionen eluiert. Die ungebundenen Zellkomponenten wurden durch Waschen mit Laufpuffer von der Säule entfernt. Die Analyse der eluierten Fraktionen je Klon erfolgte im ELISA und über SDS-PAGE.

Der F_{ab}-Gehalt sowohl der eluierten Fraktionen als auch des Durchlaufs wurde im indirekten, kompetitiven ELISA (vgl. II, 2.2.3, S. 68f) überprüft. Die Kavitäten der Mikrotiterplatten waren mit dem IPR-OVA-Konjugat beschichtet, an das die F_{ab}-Fragmente banden. Die Verdrängung erfolgte mit Zugabe von Atrazin im Überschuß (10.000 µg/l) bzw. PBS. Der POD-konjugierte Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper wurde zur Markierung der gebundenen, nicht verdrängten F_{ab}-Fragmente eingesetzt. Nach Zugabe des POD-Substrats wurde die Absorption der enzymatischen Reaktion bei 450 nm gemessen. In Abbildung 51 (S. 134) sind die Absorptionen der aufgereinigten Fraktionen und des Säulendurchlaufs des Klons F_{ab} IPR-53/8 dargestellt. Die Verdrängung der F_{ab}-Fragmente von IPR-OVA durch Atrazin war deutlich erkennbar. Der geringe Hintergrund bei der Verdrängung durch Atrazin im Vergleich zu PBS und die geringere Absorption des Durchlaufs wies auf eine vollständige Reinigung der F_{ab}-Fragmente hin. Die Absorption bei Einsatz von PBS nahm mit jeder zusätzlich eluierten Fraktion ab, wohingegen ein gleiches Absorptionsniveau bei Atrazin zu sehen war. Dies deutete darauf hin, daß die F_{ab}-Konzentration mit zunehmender Fraktionszahl abnahm.

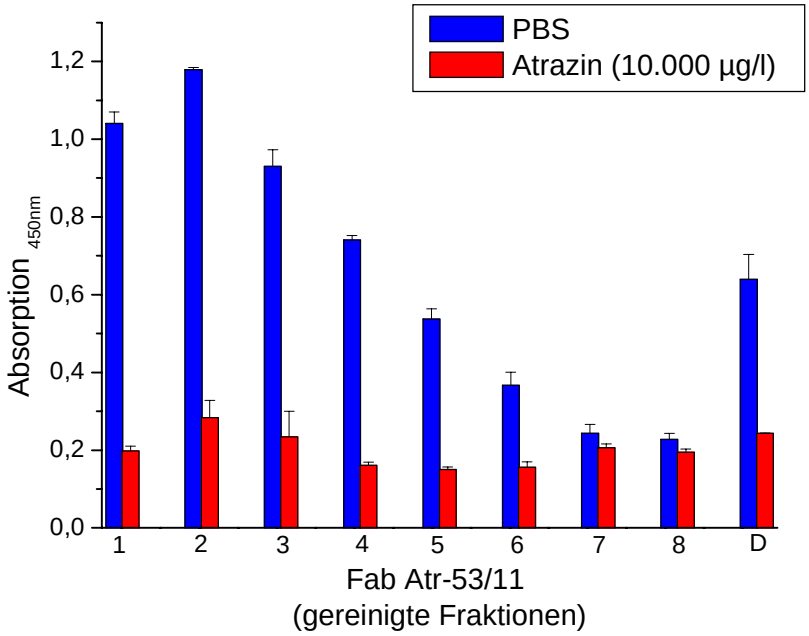


Abbildung 51 Verdrängung des affinitätsgereinigten Klons F_{ab} IPR-53/8 in den eluierten Fraktionen 1-8 und im Durchlauf (D) von IPR-OVA durch Atrazin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA

Diese Ergebnisse ließen sich auch im SDS-PAGE bestätigen. Die F_{ab} enthaltenden Fraktionen und der Durchlauf wurden unverdünnt in einem 10,5 %igem Polyacrylamidgel auf den Reinheitsgrad überprüft. Zum Vergleich wurde jeweils der ungereinigte Periplasmaextrakt (1:10 in Aqua dest. verdünnt) auf das Gel aufgetragen. Die Auswertung des Gels erfolgte über Silberfärbung (vgl. II, 2.1.4.2, S. 57). Als Beispiel wurde das SDS-Gel des Klons F_{ab} IPR-53/11 (Abb. 52, S. 135) gewählt. Die periplasmatische Fraktion und der Säulendurchlauf [Abb. 52, (PP), (D)] waren als Vergleich zu den gereinigten Fraktionen [Abb. 52, (1)-(6)] zu sehen. Der Reinigungseffekt war deutlich anhand der Proteinbanden zu erkennen. Die F_{ab}-Fragmente waren unter reduzierenden Bedingungen in die Banden der Schwer- und Leichtketten dissoziiert. Die Stärke der Banden, d. h. die Konzentration der F_{ab}-Fragmente in den Fraktionen nahm mit zunehmender Elution ab.
Die ersten drei Fraktionen wurden vereinigt und gegen 10 mM PBS dialysiert. Die 20-fache Aufkonzentrierung der F_{ab}-Lösungen erfolgte in einer Rührzelle über eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa (vgl. II, 2.2.5.3, S. 73).

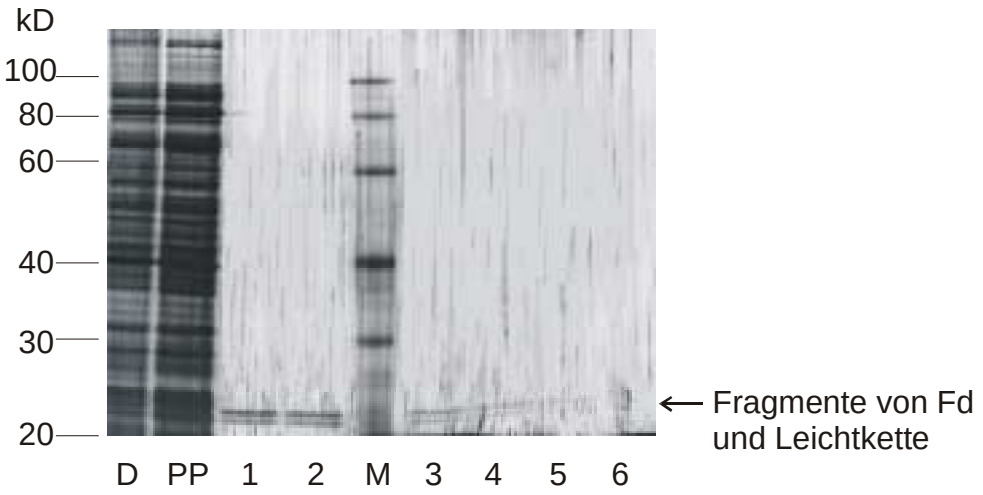


Abbildung 52 SDS-Gel der eluierten Fraktionen (1-6) nach Streptavidin-Affinitätschromatographie von F_{ab} IPR 53/8. (D) Durchlauf; (PP) Periplasmaextrakt; (M) Marker

Die Bestimmung der F_{ab}-Antikörper Konzentrationen wurde mit Hilfe des Bicinchinonsäure-Tests (BCA) durchgeführt (vgl. II, 2.2.5.4, S. 74f). Hierbei wurden die Proteinkonzentrationen der Lösungen mit BSA-Proteinstandards verglichen. Eine Kupfer-BCA-Lösung verursachte einen Farbumschlag proportional zum Proteingehalt, der bei 560 nm gemessen wurde. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der entsprechenden Software ermittelt und in µg/ml umgerechnet. Sie sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32 Konzentrationen der gereinigten F_{ab}-Antikörperfragmente der Klone F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23

Klon	**Konzentration [µg/ml]**
IPR-7	6,4
IPR-53	13,6
IPR-23	8,4

Eine weitere SDS-PAGE Analyse (Abb. 53, S. 136) zeigt die Proteinbanden des gereinigten F_{ab}-Fragments IPR-23/2 nach reduzierenden [Abb. 53, Gelspur (1)] und nicht-reduzierenden Bedingungen [Abb. 53, Gelspur (2)]. Die dissoziierten Ketten des F_{ab}-Fragments hatten eine Größe von ca. 20-25 kDa. Das nicht-reduzierte F_{ab}-Fragment lag im 50 kDa-Bereich des Proteinmarkers. Im Vergleich dazu war die ungereinigte,

periplasmatische Fraktion (1:10 verdünnt) [Abb. 53, (PP)] neben den 1:20-Verdünnungen der vereinigten und aufkonzentrierten Fraktionen aufgetragen.

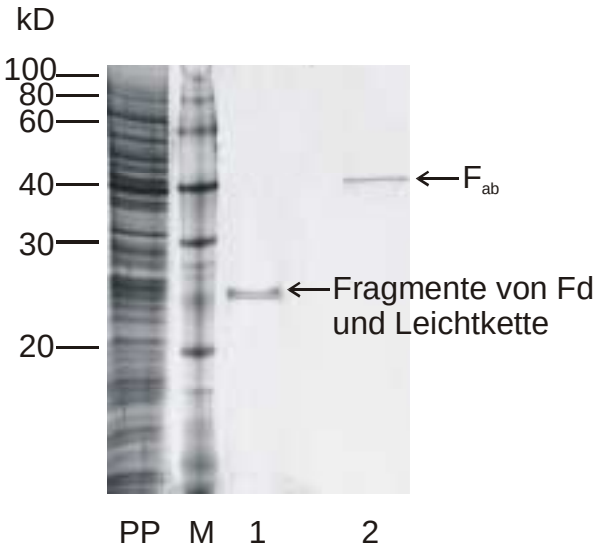


Abbildung 53 SDS-Gel des affinitätsgereinigten F_{ab} 53/11 nach reduzierenden (1) und nicht-reduzierenden (2) Bedingungen. (PP) Periplasmaextrakt; M: Marker

2.7 Charakterisierung der F_{ab}-Kinetik im BIAcore Biosensor

Die F_{ab}-Antikörperfragmente wurden im Hinblick auf ihre Bindung zum Liganden mittels des optischen BIAcore 2000^{TM} Biosensors charakterisiert. Das BIAcore ermöglichte, die Bildung von Antikörper-Ligand-Komplexen in Realzeit zu verfolgen. Dazu wurde das Ligand-Protein-Konjugat IPR-OVA an den Sensorchip CM5 kovalent gekoppelt (vgl. II, 2.2.6.1, S. 74). Es wurde eine spezifische Oberfläche mit 4125 RU in einem Meßkanal des Chips präpariert. Als Immobilisierungsmethode wurde die Aminkopplung verwendet. Ein zweiter Meßkanal, beschichtet mit OVA, diente als Referenzkanal. Die Messung erfolgte mit je 4 Konzentrationen (100 %, 75 %, 50 % und 25 %) der verschiedenen F_{ab} IPR-Klone. Die 100 % Werte der eingesetzten Konzentrationen betrugen 25 nmol, 55 nmol bzw.
34 nmol für F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 bzw. F_{ab} IPR-23. Hundertdreißig µl je F_{ab} Konzentration wurden injiziert, und die vier entstandenen Sensorgramme eines jeden Klons zur Kalkulation der Affinitätsdaten verwendet. Die Bindungen der Klone zu dem Liganden waren durch eine hohe Selektivität und ein geringes Hintergrundsignal aufgrund unspezifischer Bindung zu OVA charakterisiert. Diese unspezifischen Bindungen wurden während der Messungen im Kontrollkanal beobachtet. Zur Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsraten der F_{ab}-Varianten wurden von den F_{ab}-Sensorgrammen die

entsprechenden Kontrollsensorgramme mit OVA subtrahiert, um die Effekte der unspezifischen Bindung und Injektionsartefakte, die durch einen Dichteunterschied zwischen Laufpuffer und Injektionslösung entstanden, zu eliminieren. Als Beispiel eines resultierenden Sensorgramms wurde das Sensorgramm der 55 nmol F_{ab}-Lösung des Klons F_{ab} IPR-53/8 ausgewählt (Abb. 54). In dem Sensorgramm sind die Assoziations- und Dissoziationsphase des Antikörperfragments markiert.

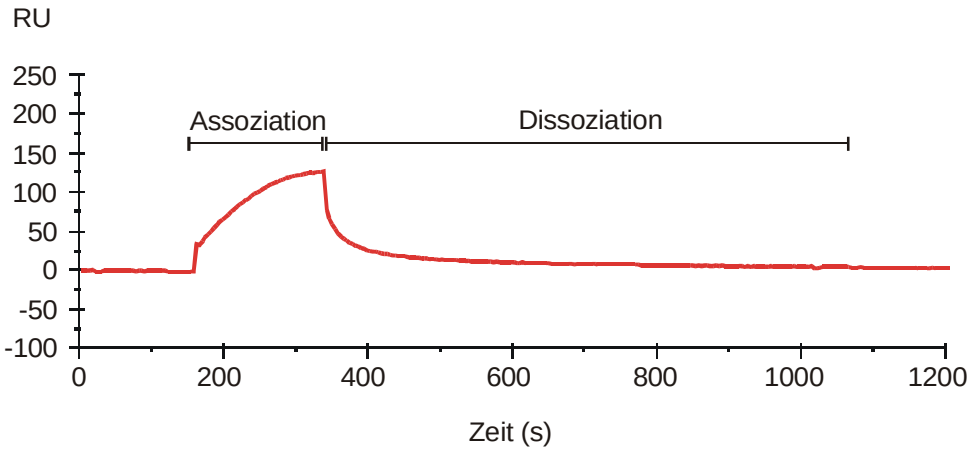


Abbildung 54 Sensorgramm für die Affinitätsbestimmung von F_{ab} IPR-53/8 (55 nmol) nach Korrektur des Hintergrunds.

Die berechnete Assoziationsrate k_a, Dissoziationsrate k_d und Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D der drei F_{ab}-Varianten sind in Tabelle 33 aufgeführt. Die ermittelten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der F_{ab}-Varianten im Bereich von 1,5 x 10^{-8}-1,1 x 10^{-9} M stimmten gut mit dem typischen K_D-Wert 10^{-8} M eines *in vivo* Affinititäts-gereiften IgG-Antikörpers (Winter et al., 1994) überein.

Tabelle 33 Assoziationsrate k_a, Dissoziationsrate k_d und Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D der drei F_{ab}-Varianten IPR-7, IPR-53 und IPR-23

F_{ab}-Klon	**k_a [$M^{-1}s^{-1}$]**	**k_d [s^{-1}]**	**$K_D=k_d/k_a$ [M]**
IPR-7	9,72 x 10^{4}	2,65 x 10^{-3}	2,73 x 10^{-8}
IPR-53	1,85 x 10^{5}	2,83 x 10^{-3}	1,53 x 10^{-8}
IPR-23	5,49 x 10^{5}	6,17 x 10^{-4}	1,12 x 10^{-9}

3 Konstruktion des scFv(K47H)-aP Fusionsproteins

3.1 Klonierungsstrategie

Der Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994b) wurde modifiziert, um Fusionsproteine aus einem scFv-Antikörperfragment und der alkalischen Phosphatase (aP) zu produzieren. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionsgen, welches sowohl das Atrazin-spezifische Bindungsprotein scFv(K47H) (Kramer und Hock, 1996a) als auch das Enzym aP (Schmidt-Dannert, nicht veröffentlicht) codiert, in den Vektor inseriert. Abbildung 55 gibt einen Überblick über den Klonierungsvorgang.

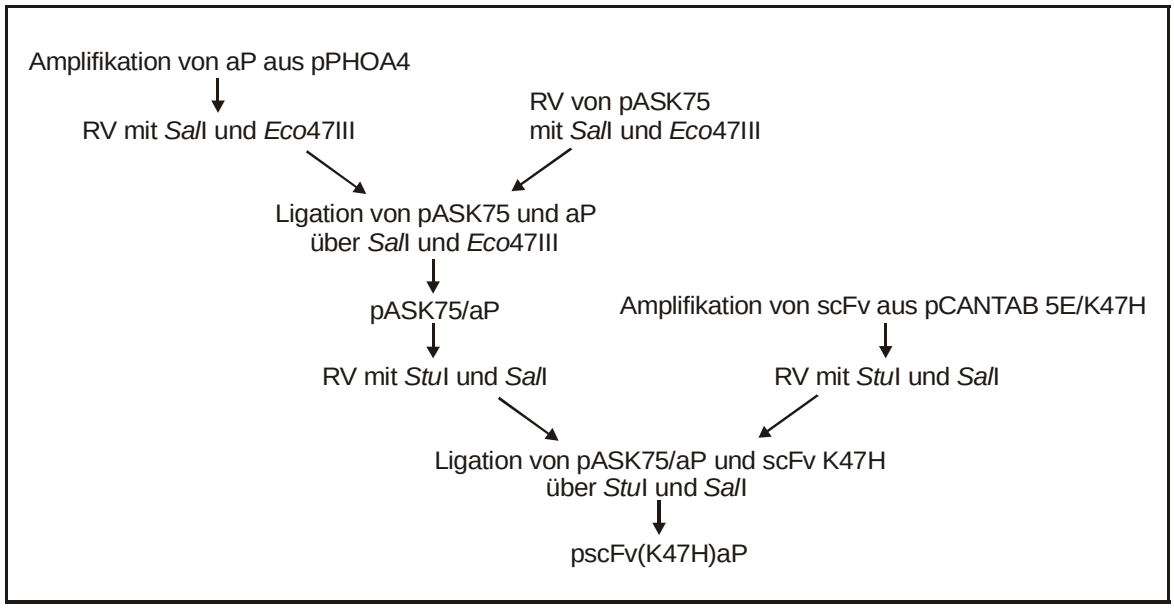


Abbildung 55 Überblick über die Klonierungsstrategie von pscFv(K47H)aP

Das Gen der aP aus *E. coli* wurde aus dem Klonierungsvektor pPHOA4 über PCR isoliert und unter Verwendung der Restriktionsstellen *Eco*47III und *Sal*I in den Vektor pASK75 kloniert. Die Restriktionsstellen sind in der MCS des Expressionsvektors konserviert und wurden mit Hilfe der PCR-Primer PHOABACK und PHOAFOR an das 5'- und 3'-Ende des aP-Gens angefügt. Das Amplifikationsprodukt aP wurde im Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit dem ebenso präparierten Vektor zu dem Plasmid pASK75/aP zusammengefügt.

Zur Isolierung und PCR-Amplifikation des scFv(K47H)-Gens diente die Phagemid-DNA pCANTAB 5E/K47H als Template. Um das scFv-Fragment in pASK75/aP zu klonieren, wurden die Restriktionsstellen *Sal*I und *Stu*I über die PCR-Primer scFvBACK und scFvFOR an das Antikörpergen angeknüpft. Die Restriktionsstelle *Stu*I ist auch Bestandteil

der MCS von pASK75. Das amplifizierte scFv-Fragment und das rekombinante Plasmid pASK75/aP aus transformierten Bakterien wurden mit den Enzymen *Sal*I und *Stu*I geschnitten. Anschließend erfolgte die Insertion des scFv-Gens an das 5'-Ende der aP-codierenden Region in den linearisierten pASK75/aP. Durch Einfügen des scFv-Gens wurden die Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I in den Vektor eingebaut. Abbildung 56 zeigt den modifizierten Vektor pASK75 mit dem eingefügten Fusionsgen (pscFvaP). Weiterhin sind die Klonierungsstellen *Stu*I, *Sal*I und *Eco*47III und die Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I zum Klonieren von scFv-Fragmenten aus kompatiblen Antikörperbibliotheken abgebildet.

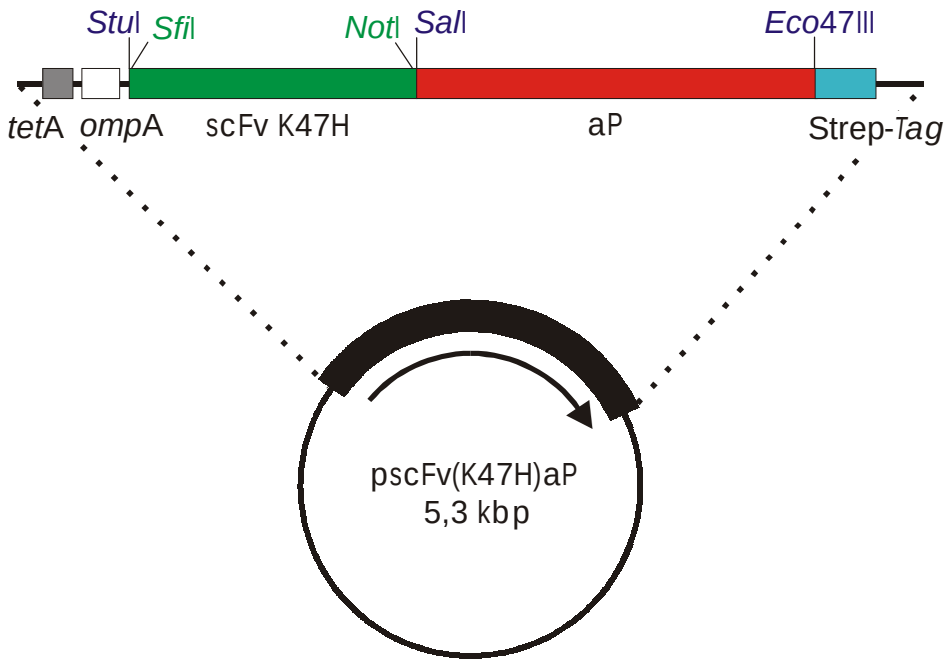


Abbildung 56 pscFvaP mit dem eingefügten Fusionsgen scFv-aP

3.2 Aufbereitung des Vektors pASK75

Die Transformation von kompetenten Zellen des *E. coli* Stamms K12-JM83 (Yanisch-Perron et al., 1985) mit dem Vektor pASK75 wurde mit der $CaCl_2$-Methode durchgeführt. Zur Transformation wurden 1,5 ng DNA auf 50 µl Bakterien verwendet. Nach Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Amp-Agar und Inkubation für 14 h bei 30 °C wurde eine isoliert gewachsene Einzelkolonie in LB-Amp-Medium für 16 h bei 30 °C und 250 rpm kultiviert. Die Plasmidisolierung erfolgte mit Qiagen Plasmid Purification

Mini Kit. Die DNA wurde in 20 µl H_2O* aufgenommen. Die Messung bei 260 nm ergab eine Konzentration von 0,81 µg/µl.

Der Vektor wurde in einem Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Sal*I und *Eco*47III für die nachfolgende Ligation linearisiert (vgl. II, 2.3.1.1, Tab. 18, S. 79). Abbildung 57 zeigt die Auswertung des RV auf einem präparativen Gel (0,7 % Agarose).

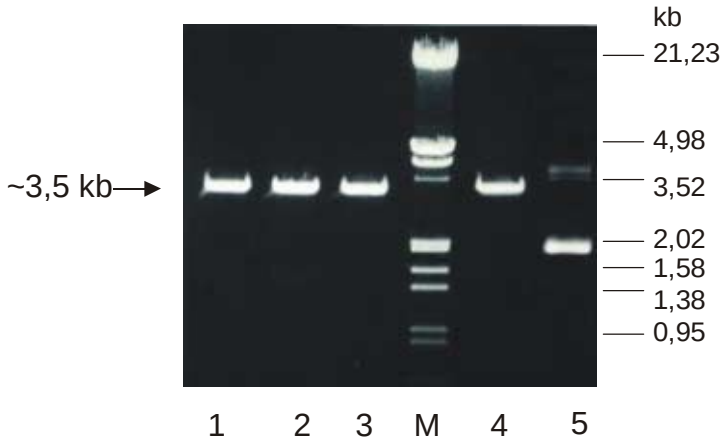


Abbildung 57 pASK75 nach RV mit RE *Sal*I und *Eco*47III. pASK75 2-fach geschnitten nach 2 h (1), 3 h (2), 4 h (3), (4) pASK75 1-fach geschnitten, (5) pASK75 zirkulär, (M) Marker

Die DNA-Banden der geschnittenen Vektoren [Abb. 57, Gelspuren (1), (2), (3) und (4)] sind unterhalb der 3,53 kb-Bande des Markers lokalisiert und befinden sich im Bereich von 3,2 kb, der Basenpaarlänge von pASK75. der linearisierte, 1-fach geschnittene Vektor [Abb. 57, Gelspur (4)] liegt in etwa auf der gleichen Höhe wie die Banden des 2-fach geschnittenen Vektors [Abb. 57, Gelspur (1-3)]. Die im RV abgetrennten 14 Basenpaare wirken sich nicht sichtbar auf die Längenunterschiede beider Plasmide aus. Der im Vergleich dazu aufgetragene zirkuläre Vektor [Abb. 57, Gelspur (5)] beweist die unterschiedliche, schnellere Laufgeschwindigkeit gegenüber dem linearisierten Vektor. Die drei Banden der RV-Zeitreihe weisen keine Längenunterschiede auf.

Die DNA-Mengen der Banden entsprachen ca. 450-500 ng je Bande, gemessen an den aufgetragenen 1,5 µg des Markers. Die Banden des 2-fach geschnittenen Vektors wurden aus dem Gel getrennt und die DNA mit QiaEXII aus der Agarose isoliert. Unter Einbezug von 20 % Verlust bei der Aufreinigung stand eine DNA-Menge von ca. 60 ng/µl für die Ligation zur Verfügung.

3.3 Amplifikation der aP

Kompetente Bakterienzellen des *E. coli* Stamms DH5α^+ wurden mit dem Plasmid pPHOA4, der das aP-codierende Gen enthält, transformiert. Der Vektor lag in einer Konzentration von 20 ng/µl vor, wovon 1 ng DNA auf 50 µl Bakterien zur Transformation verwendet wurden. Nach Inkubation des Transformationsansatzes auf LB-Amp-Agar erfolgte die Plasmidisolierung der Übernachtkultur einer Einzelkolonie mit Qiagen Plasmid Purification Mini Kit. Die DNA wurde in 20 µl H_2O* gelöst und die Konzentration der Lösung im Photometer bei 260 nm mit 0,72 µg/µl bestimmt.
Zur Amplifikation des aP-Gens aus pPHOA4 wurde eine PCR (s. II, 2.3.1.2, S. 79f) mit den entsprechenden Primern zum Anfügen der Klonierungsstellen *Sal*I und *Eco*47III an das Gen durchgeführt. Die PCR-Produkte von 1 ng Template-DNA sind in Abbildung 58 nach elektrophoretischer Auftrennung (0,8 % Agarose-Gel) wiedergegeben. Eine Kontrolle (K) ohne DNA wurde mitgeführt. Je Geltasche waren 20 µl Probe mit 4 µl Ladungspuffer aP aufgetragen.

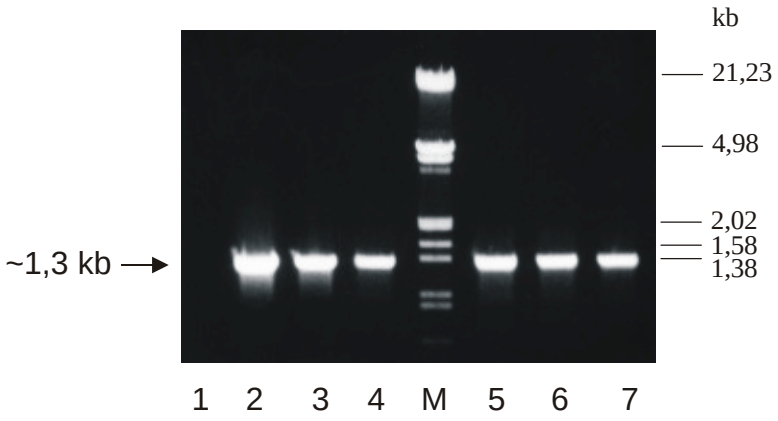


Abbildung 58 PCR-Produkte von aP. (2)-(6) Amplifkationsprodukt, (1) Kontrolle, (M) Marker

Die Banden wiesen die richtige Länge, gemessen an der 1,3 kb-Bande des Markers auf. Die amplifizierte DNA-Menge pro Bande wurde auf 400 ng geschätzt. Die DNA-Isolierung aus dem Gel erfolgte mit QiaEXII. Als Eluat ergab sich eine DNA-Lösung von ca. 96 ng/µl, unter Berücksichtigung von 20 % Verlust bei der Aufreinigung aus dem Gel. Das amplifizierte aP-Gen wurde in einem Doppel-RV mit den RE *Sal*I und *Eco*47III geschnitten (vgl. II, 2.3.1.2., S. 79ff), um kompatible Enden für die Ligation mit dem präparierten Vektor pASK75 zu erhalten. Abbildung 58 zeigt die Gelanalyse des RV.

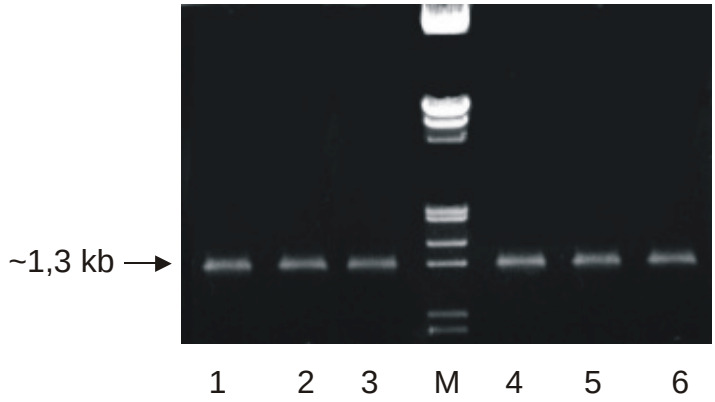


Abbildung 59 Das amplifizierte aP-Gen nach Doppel-RV mit RE *Sal*I und *Eco*47III. (1)-(6) aP 2-fach geschnitten, (M) Marker

Die DNA-Banden sind deutlich schwächer als nach der Amplifikation (vgl. Abb. 58, S. 141), aber mit ca. 200 ng/Bande ausreichend für die Ligation. Ein vollständiger Verdau an den Enden des Gens ist über die Gelauswertung nicht nachweisbar, da nur wenig Sequenzen von dem aP-Fragment abgetrennt wurden und keine sichtbaren Längenunterschiede zu den Amplifikaten zu erkennen sind. Nach Aufreinigung der DNA aus dem Gel mit QiaEXII stand eine Lösung mit ca. 50 ng/µl zur Verfügung.

3.4 Ligation der aP mit pASK75

Die Ligation wurde im Verhältnis Vektor:Insert von 1:3 angesetzt. Das Volumen des Ansatzes wurde auf 12 µl erweitert, indem 7,5 µl aP-DNA und 1,3 µl Vektor-DNA mit H_2O* auf 10,2 µl aufgestockt und mit 1,2 µl Puffer und 0,6 µl T4 DNA Ligase inkubiert wurden. Eine Kontrolle ohne aP-Insert wurde mitgeführt. Nach erfolgter Ligation wurden sowohl der Ligationsansatz [$Trafo_{(L)}$] als auch die Kontrolle [$Trafo_{(K)}$] in einer PCI-Extraktion von Puffern und Enzymen gereinigt und mit einer anschließenden EtOH-Präzipitation auf 6 µl eingeengt. Die Transformation von je 100 µl kompetente JM83-Bakterien mit 1 µl DNA wurde über Elektroporation ausgeführt. Ein Ansatz ohne DNA wurde mitgeführt (KT). Die Auswertung der Transformation ist in Tabelle 34 (S. 143) wiedergegeben. Die Transforamtionsrate berechnete sich auf 1,8 x 10^6 transformierte Zellen/µg DNA. Bei der Kontrolle der Transformation (KT) waren keine Kolonien gewachsen, jedoch bei der Kontrolle der Ligation. Dies weist auf einen hohen Hintergrund hin, d.h. daß sich der 2-fach geschnittene Vektor entweder religiert hat oder nicht vollständig geschnitten war.

Tabelle 34 Anzahl der Bakterienkolonien nach der Transformation von *E. coli* K12-JM83 mit pASK75/aP [$Trafo_{(L)}$]. $Trafo_{(K)}$: Ligationskontrolle ohne Insert, KT: Transformations-kontrolle ohne DNA

Verdünnung	**Anzahl der gewachsenen Kolonien**		
	KT	$Trafo_{(K)}$	$Trafo_{(L)}$
unverdünnt	-	484	1148
10^{-1}	-		116
10^{-2}	-		9
10^{-3}	-		1
10^{-4}	-		-

Die Plasmide von 3 Kolonien der Platten $Trafo_{(L)}$ und 1 Kolonie des $Trafo_{(K)}$-Ansatzes wurden isoliert und elektrophoretisch (Abb. 60) ausgewertet.

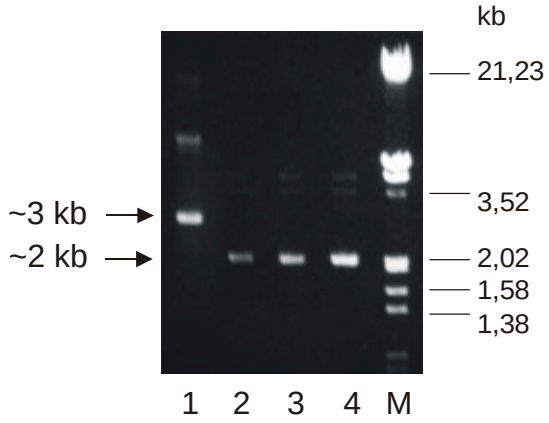


Abbildung 60 Vergleich von zirkulären pASK75/aP-Plasmiden (1-3) mit Kontrollplasmid pASK75 (4). (M) Marker

Zwei der drei isolierten Plasmide [Abb. 60, Gelspur (2)-(3)] wanderten auf dem Gel bis zu dem Basenpaar-Bereich von 2 kb, in dem sich der zirkuläre pASK75-Vektor befand (vgl. III, 3.2, Abb. 57, Gelspur (5), S. 140). Auch das Plasmid von $Trafo_{(K)}$ [Abb. 60, Gelspur (4)] ist auf dieser Höhe angesiedelt. Die Plasmidlänge eines Klons war größer und bewegte sich um den Bereich von 3 kb [Abb. 60, Gelspur (1)]. Um festzustellen, ob es sich bei diesem Plasmid um den Vektor pASK75 mit dem umklonierten aP-Gen handelte, wurden ein RV mit den Enzymen *Sal*I und *Eco*47III zum Nachweis des Inserts und ein RV mit

dem Enzym *Sal*I zur Überprüfung der Länge im linearisierten Zustand nach II, 2.3.1.1, Tabelle 18, S. 79 angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden die Proben auf ein analytisches 0,8 % Agarosegel (Abb. 61) aufgetragen.

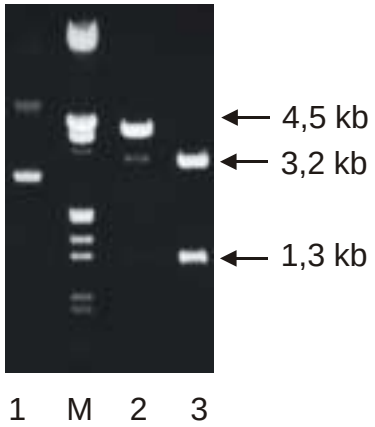


Abbildung 61 RV zum Nachweis von pASK75/aP mit RE *Sal*I und *Eco*47III. (1) pASK75/aP zirkulär, (2) pASK75/aP 1-fach geschnitten, (3) pASK75/aP 2-fach geschnitten, (M) Marker

In der Laufspur des 2-fach geschnittenen Plasmids [Abb. 61, Gelspur (3)] waren die DNA-Bande des aP-Enzyms mit der Länge von 1,3 kb und die Bande des 2-fach geschnittenen pASK75-Vektors mit der Länge von 3,2 kb zu erkennen. Die Bande des linearisierten Plasmids [Abb. 61, Gelspur (2)] befand sich im Bereich zwischen der 4,27 kb- und der 4,98 kb-Bande des Markers und war somit dem pASK75/aP-Plasmid mit der Länge von ca. 4,5 kb gleichzusetzen.

3.5 Amplifikation des scFv-Fragments

Das scFv(K47H)-Fragment wurde aus dem Vektor pCANTAB 5E über PCR isoliert. Das Plasmid lag nach Isolation aus TG1 Bakterien in einer Konzentration von 0,37 µg/µl (gemessen im Photometer bei 260 nm) vor. Über die Primer scFvBACK und scFvFOR wurden die Klonierungsstellen *Stu*I und *Sal*I an das scFv-Gen angefügt. Weiterhin waren die Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I Bestandteil der Primer und wurden mit dem scFv-Gen amplifiziert. Abbildung 62 (S. 145) zeigt die präparative Gelanalyse der PCR in einem 1%igen Agarosegel.

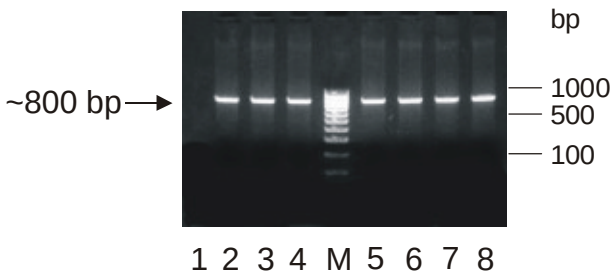


Abbildung 62 PCR-Produkte von scFv aus pCANTAB 5E. (1)-(8) scFv-Gen, (M) Marker

Die scFv-Amplifikate waren neben 0,5 µg des 100 bp-Markers aufgetragen und lagen im Bereich der 800 und 900 bp-Bande des Markers. Die amplifizierte DNA-Menge pro Bande wurde auf 120 ng geschätzt. Nach Isolierung aus dem Gel mit QiaEXII stand eine DNA-Lösung von ca. 34 ng/µl zur Verfügung. Dabei wurden 20 % Verlust bei der Aufreinigung aus dem Gel einberechnet.

Das isolierte, amplifizierte DNA-Material wurde in einem sequentiellen RV (s. II, 2.3.2.1, Tab. 20, S. 83) an den Erkennungssequenzen der RE *Stu*I und *Sal*I geschnitten und in einem 1% Agarosegel (Abb. 63) aufgetrennt.

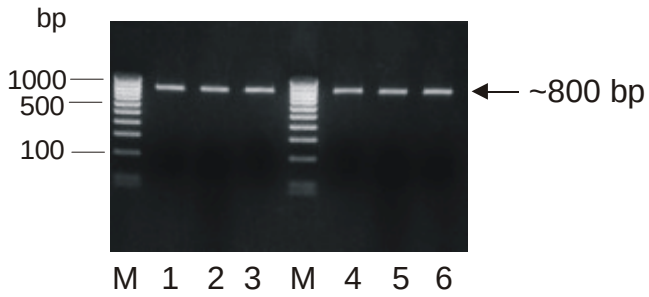


Abbildung 63 Das amplifizierte scFv-Gen nach Doppel-RV mit den RE *Stu*I und *Sal*I. (1)-(6) scFv-Gen 2-fach geschnitten, (M) Marker

Aufgrund der geringen Basenanzahl, die in dem RV von den scFv-Amplifikaten abgetrennt wurde, waren keine wesentlichen Längenunterschiede gegenüber den ungeschnittenen Amplifikaten (vgl. Abb. 62) zu erkennen. Die Banden wurden anhand des 100 bp-Markers auf ca. 90 ng geschätzt und aus dem Gel getrennt. Nach Isolierung der DNA aus dem Gel ergab sich eine Konzentration von ca. 25 ng/µl.

3.6 Präparation des Vektors pASK75/aP

Das Plasmid des Klons aus III, 3.4, Abb. 60, Gelspur (1), S. 143 wurde zur Vektorpräparation verwendet. Dafür erfolgte die Kultivierung des pASK75/aP-Klons in LB-Amp-Medium und die Isolierung des Plasmids aus den JM83-Bakterienzellen. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde bei 260 nm auf 0,8 µg/µl bestimmt. Für den sequentiellen RV mit den RE *Stu*I und *Sal*I wurden 1,5 µl der DNA-Lösung eingesetzt. Die Auswertung des RV über Gelelektrophorese (0,7 % Agarose) ist in Abbildung 64 dargestellt.

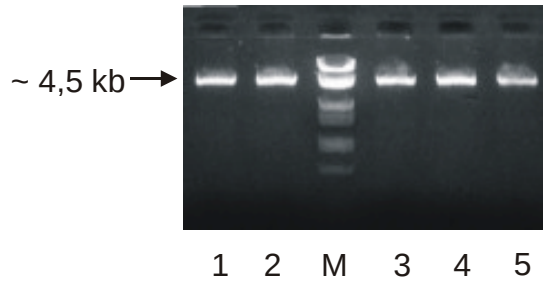


Abbildung 64 pASK75/aP nach sequentiellem RV mit den RE *Stu*I und *Sal*I. (M) Marker

Die Banden des 2-fach geschnitten pASK75/aP lagen im Bereich von 4,5 kb. Der Marker wurde zur Bestimmung der Bandengröße herangezogen. Die DNA-Menge an linearisiertem Vektor betrug ca. 220 ng pro Bande. Die einzelnen Banden wurden mit QiaEXII aus dem Gel isoliert und die daraus resultierende DNA-Konzentration auf 44 ng/µl eingestellt.

3.7 Ligation von scFv(K47H) mit pASK75/aP

Der 2-fach geschnittene Vektor pASK75/aP und das 2-fach geschnittene scFv-Fragment wurden in einer Ligationsreaktion zu pscFv(K47H)aP aneinandergefügt. Der Ligationsansatz erfolgte in einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 (siehe II, 2.1.1.6, S. 41). Aufgrund der vorliegenden Konzentrationen der beiden Reaktionspartner wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes auf 23 µl erweitert, um das gewünschte Verhältnis zwischen Vektor und Insert zu erreichen. Für die Reaktion wurden 3 µl Vektor-DNA und 15 µl Insert mit 1,25 µl H_2O* versehen und 1,25 µl Ligase, gepuffert mit 2,5 µl Ligase-Puffer, zu dem Gemisch gegeben. Ein Kontrollansatz mit 7 µl Vektor-DNA ohne Insert wurde mitgeführt. Nach Übernachtinkubation wurden die Ansätze mit PCI-Extraktion und EtOH-

Präzipitation (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41f) aufbereitet und auf das Volumen von jeweils 8 µl eingeengt. In der nachfolgenden Elektroporation (vgl. II, 2.1.1.7, S. 41ff) wurden je 100 µl kompetente *E. coli* JM83-Zellen (Yanisch-Perron et al., 1985) mit 1,5 µl des Ligationsansatzes [$Trafo_{(L)}$] x und 2 µl der Kontrolle [$Trafo_{(K)}$] transformiert. Eine Transformationskontrolle (KT) ohne DNA wurde mitgeführt. Die Auswertung der Elektroporation nach Inkubation von seriellen 10-fach Verdünnungen auf LB-Amp-Agar ist in Tabelle 35 wiedergegeben. Die Transformationsrate berechnete sich auf 4,8 x 10^6 transformierte Zellen/µg DNA. Auf den Agarplatten der beiden Kontrollansätze KT und $Trafo_{(K)}$ waren keine Bakterienkolonien gewachsen.

Tabelle 35 Auswertung der Transformation von pscFv(K47H)aP in K12-JM83 [$Trafo_{(L)}$]. $Trafo_{(K)}$: Ligationskontrolle ohne Insert, KT: Transformationskontrolle ohne DNA

Verdünnung	**Anzahl der gewachsenen Kolonien**		
	KT	$Trafo_{(K)}$	$Trafo_{(L)}$
unverdünnt	-	-	∞*
10^{-1}	-		387
10^{-2}	-		50
10^{-3}	-		2
10^{-4}	-		-

*entspricht einer großen Anzahl an Kolonien, die nicht gezählt wurden

3.8 Expression und *Screening* von scFv(K47H)-aP

Sechzehn Einzelkolonien der transformierten JM83 Bakterien wurden in LB-Amp-Medium kultiviert und anschließend durch Zugabe von 0,4 µM Anhydrotetracyclin (vgl. II, 2.2.2, S. 67) induziert, um das Fusionsprotein scFv-aP zu exprimieren. Nach Lyse der abzentrifugierten Bakterienzellen mit je 2 ml Saccharosepuffer wurde die periplasmatische Zellfraktion jedes Klons mit dem darin enthaltenen Fusionsprotein gewonnen. Durch Dialyse gegen 100 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA wurden die Periplasmaextrakte für weitere Analysen umgepuffert.

Das *Screening* der einzelnen Klone erfolgte in einem indirekten, kompetitiven ELISA (s. II, 2.3.3, S. 84f) mit dem Beschichtungskonjugat IPR-OVA. Der Periplasmaextrakt wurde unverdünnt und in den Verdünnungen (mit 50 mM TBS) 1:10 und 1:100 in je 2

Wiederholungen eingesetzt. Die Verdrängung erfolgte mit Atrazin im Überschuß (10.000 µg/l) bzw. TBS. Nach einstündiger Inkubation mit dem aP-Substrat wurde der Test im ELISA Reader bei 405 nm ausgewertet. Bei allen 16 Klonen war eine Verdrängungsreaktion zu erkennen. Es wurden Absorptionsunterschiede zwischen TBS und Atrazin von 0,2-0,3 bei den unverdünnten Proben gemessen. Die Absorptionen nahmen bei den Verdünnungen ab, wobei bei der größten Verdünnung keine Absorptionsunterschiede zu sehen waren. In Abbildung 65 ist die Verdrängung des scFv-aP aus 4 Klonen dargestellt. Diese Klone hatten die größte Absorption und Verdrängungsreaktion, und wurden deshalb für die Sequenzierung, Aufreinigung und weitere Analyse im ELISA verwendet.

Die Plasmide der ausgewählten Klone wurden isoliert und in einem sequentiellen RV mit den RE *Stu*I und *Eco*47III auf die Länge der einzelnen Bestandteile von pscFvaP überprüft. Die Erkennungssequenzen der beiden Enzyme befanden sich an dem 5'- bzw. 3'-Ende des scFv-aP Fusionsgens und trennten dieses aus pASK75 heraus. Als Kontrolle wurde ein Einfachverdau mit dem Enzym *Stu*I eines Klons mitgeführt.

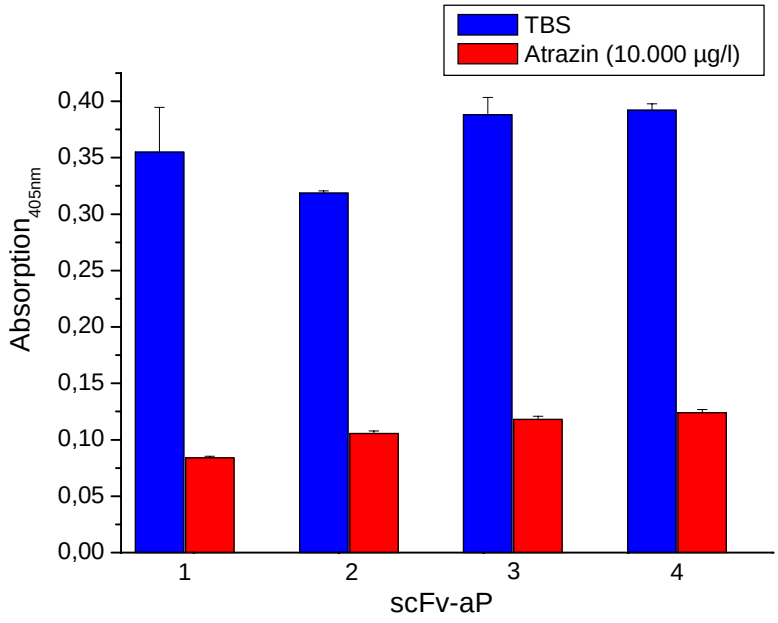


Abbildung 65 Verdrängung der vier scFv(K47H)-aP Klone von IPR-OVA durch Atrazin (10.000 µg/l) im indirekten, kompetitiven ELISA

Abbildung 66 zeigt die Gelanalyse des RV der einzelnen Plasmide. Die 2-fach geschnittenen Plasmide in den Gelspuren (1)-(4) wurden in zwei DNA-Banden geteilt. Die langsamer gewanderte und somit größere Bande kann dem 2-fach geschnittenen Vektor pASK75 [Abb. 66, Gelspur (5)] mit einer Länge von ca. 3,2 kb zugeordnet werden. Die Bande mit der geringeren Länge entspricht dem scFv-aP Fusionsgen mit ca. 2 kb. Das 1-fach geschnittene Plasmid in der Gelspur (5) weist eine Länge von ca. 4,5 kb auf und kann dem linearisierten Vektor pASK75/aP ohne scFv-Insert [(vgl. III, 3.4, Abb. 61, Gelspur (2), S. 144] zugeordnet werden.

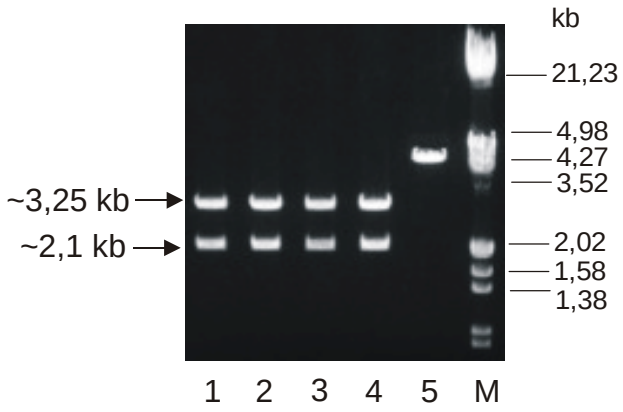


Abbildung 66 Vier scFv-aP Klone (1-4) nach sequentieller RV mit den RE *Stu*I und *Eco*47III. (5) pscFv(K47H)aP linearisiert, (M) Marker

Die Sequenzierung der vier Klone übernahm die Firma SequiServe (Vaterstetten) unter Verwendung der entsprechenden Sequenzierprimer (s. II, 1.7, Tab. 1, S. 19). Die Analyse der Sequenzen zeigte auf, daß sie identisch waren, und bestätigte die korrekte Klonierung im Leserahmen. Die gemeinsame Sequenz ist mit Kennzeichnung der fusionierten Gene und der relevanten Restriktionsstellen im Anhang aufgeführt.

3.9 Aufreinigung von scFv(K47H)-aP

Zur Aufreinigung des Fusionsproteins wurden 20 ml Periplasmaextrakt aus 2 l Kulturvolumen gewonnen (s. II, 2.2.2, S. 67). Über Dialyse erfolgte das Umpuffern der Lösung mit dem Chromatographie-Laufpuffer. Vor Verwendung in der Chromatographie wurde der Extrakt sterilfiltriert (0,2 µm Filter).

3.9.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung über Streptavidin beruht auf der Bindungsaffinität des Strep-*Tag*s zu Streptavidin. Die Sequenz, die das Peptid Strep-*Tag* codiert, ist Bestandteil des Vektors pASK75 (s. II, 2.3, Abb. 14, S. 76) und am 3'-Ende des scFv-aP lokalisiert. Zehn ml der periplasmatischen Zellfraktion mit dem exprimierten Fusionsprotein wurden über die Streptavidin gekoppelte Sepharose gepumpt, und anschließend das gebundene scFv-aP-Strep-*Tag* Fusionsprodukt mit dem Elutionspuffer von den Bindungsstellen gelöst. Die Eluate wurden in 2 ml-Fraktionen aufgefangen und zusammen mit dem Säulendurchlauf im ELISA (s. II, 2.3.3, S. 84f) und über SDS-PAGE (s. II, 2.1.5.2, S. 57) überprüft. Die Auswertung des ELISA ergab keine Reaktion der einzelnen Fraktionen, nur der aufgetragene Durchlauf reagierte mit dem Beschichtungskonjugat und wurde durch Atrazin verdrängt. Dies ließ die Folgerung zu, daß keine Bindung des Fusionsproteins an die Streptavidin-Säule über das Strep-*Tag* stattgefunden hat.
Die Analyse über SDS-PAGE bestätigte diese Annahme, da keine Proteinbanden in den Laufspuren der Fraktionen sichtbar waren. Der Periplasmaextrakt hingegen war in seine einzelnen Banden aufgetrennt.

3.9.2 Atrazin-Affinitätschromatographie

Eine weitere Aufreinigungsmöglichkeit war die Affinitätschromatographie mit Atrazin. Das Atrazin-Derivat IPR (vgl. II, 2.2.3, Abb.11, S. 68) wurde hierzu an EAH-Sepharose (s. II, 2.3.4.2, S. 86) gekoppelt. Das Antikörperfragment scFv bindet aufgrund seiner Affinität zu Atrazin an das Derivat. Die restlichen 10 ml des aufbereiten Periplasmaextraktes wurden über die Säule gegeben, und die gebundenen scFv(K47H)-aP-Moleküle wurden mit 1,5 M Glycin/HCl, pH 2,5 eluiert. Der nachfolgende ELISA (s. II, 2.3.3, S. 84f) mit den gesammelten Fraktionen und dem Durchlauf zeigte, daß auch hier keine Aufreinigung bzw. Bindung erfolgt war. Denn nur im Durchlauf waren Fusionsproteine aufgrund der Farbreaktion zu detektieren.

3.10 Charakterisierung von scFv-aP

3.10.1 Westernblot mit scFv-aP

Der Westernblot wurde zur Proteincharakterisierung und zum funktionellen Nachweis des Strep-*Tag*s durchgeführt. Die im SDS-PAGE aufgetrennten Banden der periplasmatischen Zellfraktion wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und immunchemisch angefärbt (s. II, 2.3.5, S. 86f). Hierbei wurde die Affinität des Strep-*Tag*s zu Streptavidin benutzt und das Streptavidin-POD-Konjugat zur Enzymmarkierung eingesetzt. In Abbildung 67 ist das SDS-Gel neben der angefärbten Membran aus dem Westernblot dargestellt. Die angefärbte Bande [Abb. 67, (b), (1)] auf der Höhe von 75 kDa entspricht dem Fusionsprotein scFv-aP, dessen Bestandteile scFv, aP-Strep-*Tag* über die Sequenz mit Hilfe der Computersoftware (DNA-Star, Wisconsin, USA) auf ca. 27 kDa bzw. 48 kDa ermittelt worden waren. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß das scFv-aP Fusionsprotein mit dem Strep-*Tag* als exprimiertes Protein im Periplasma vorhanden ist und das Strep-*Tag* nach reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel die Bindungsaffinität gegenüber Streptavidin behalten hat.

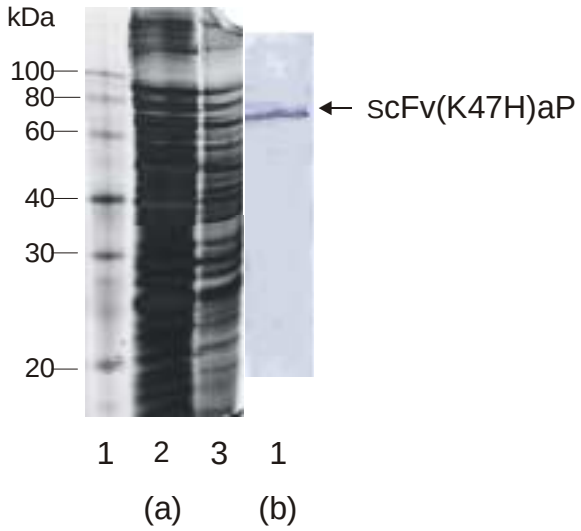


Abbildung 67 SDS-Gel und Westernblot von scFv-aP. (a) SDS-PAGE: (1) Marker, (2) Periplasmaextrakt, (3) Periplasmaextrakt 1:10 verdünnt; (b) Westernblot: (1) scFv(K47H)aP im Periplasmaextrakt

3.10.2 ScFv(K47H)-aP-Enzymimmunoassay

Zum Nachweis der Funktionalität des rekombinanten Proteins wurde der indirekte, kompetitive ELISA (s. II, 2.3.3, S. 84f) verwendet. Die periplasmatische Zellfraktion, über Ultrafiltration aufkonzentriert und von kleineren Proteinen gereinigt, wurde in einer 1:100-Verdünnung im ELISA eingesetzt. Unterschiedliche Atrazin-Konzentrationen verdrängten den Periplasmaextrakt von dem IPR-OVA-Konjugat. Die Enzymreaktion erfolgte durch Zugabe des aP-spezifischen Substrats. Die OD-Messungen bei 405 nm wurden in stündlichen Intervallen ausgeführt. Abbildung 68 zeigt die sigmoiden Kalibrationskurven der einzelnen Messungen.

Der Mittelwert der Nachweisgrenze, basierend auf den verschiedenen Kurven, errechnete sich auf 30 µg/l Atrazin, der 50 % B/B_0-Wert lag bei 56 µg/l Atrazin. Die Absorption der aP stieg mit steigender Inkubationszeit. Dennoch variierten die Nachweisgrenzen und Testmittelpunkte der einzelnen Kalibrationskurven nur in einem sehr kleinen Bereich, nämlich 29-31 µg/l bzw. 54-60 µg/l Atrazin.

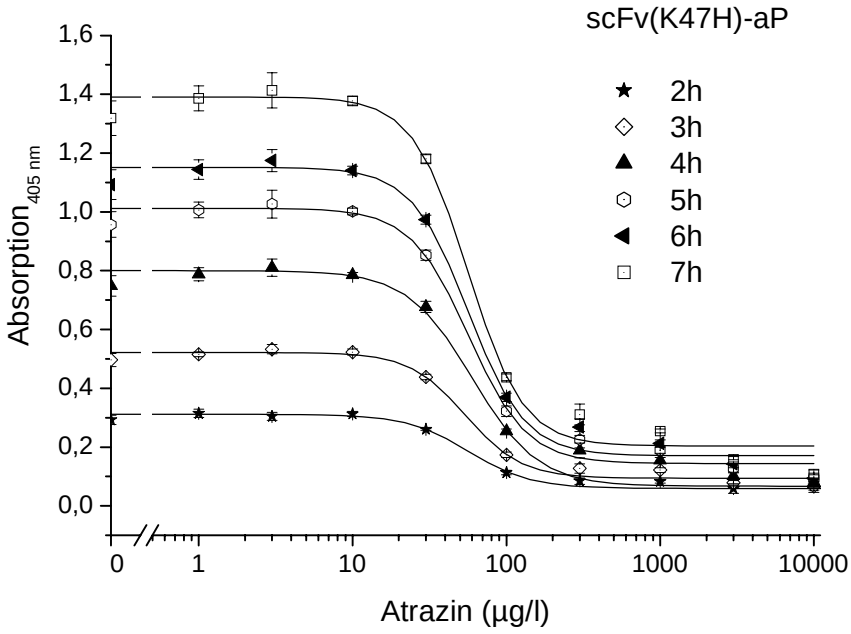


Abbildung 68 Kalibrationskurven von scFv(K47H)aP nach stündlichen Zeitintervallen bei Verdrängung durch Atrazin

3.10.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität von scFv-aP

Unter Kreuzreaktivität versteht man die Querempfindlichkeit eines Antikörpers zu anderen Analyten. Bei der Bestimmung der Kreuzreaktivität von scFv-aP wurde das Bindungsvermögen des Fusionsproteins zu kreuzreagierenden *s*-Triazinen im Vergleich zum Zielanalyten Atrazin untersucht. Standardreihen mit Konzentrationen von 0 µg/l-10.000 µg/l der verschiedenen Analyten wurden eingesetzt. Der Test verlief nach II, 2.3.3, S. 84f. Die Substratreaktion wurde nach 3 h gestoppt. In Tabelle 36 sind die am Testmittelpunkt (50 % B/B_0) ermittelten Kreuzreaktivitäten des scFv-aP zu den einzelnen Substanzen aufgeführt. Nur Propazin wurde mit 103 % stärker erkannt als Atrazin. Die Kreuzreaktivität zu Terbuthylazin lag bei 19 %, wohingegen Amethryn nicht erkannt wurde. Die übrigen Substanzen zeigten Werte unter 10 %.

Tabelle 36 Kreuzreaktivität des scFv-aP Fusionsproteins im indirekten, kompetitiven ELISA

Analyt	**Kreuzreaktivität [%]**
Atrazin	100
Deethylatrazin	7
Dichloratrazin	5
Desisopropylatrazin	6
Simazin	1
Dichlorsimazin	3
Propazin	103
Terbuthylazin	19
Ametryn	-

IV Diskussion

1 Konstruktion von Pyrethroid-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten

Pyrethroid-spezifische scFv-Antikörperfragmente wurden unter Verwendung der mRNA der Hybridomzellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1/F8 (Pullen und Hock, 1995a), die monoklonale Antikörper gegen Bioallethrin bzw. S-Bioallethrin sezernieren, als Matrize der Haptenbindungsregionen generiert. Die über PCR amplifizierten variablen Regionen der Schwer (V_H)- und Leichtketten (V_L) wurden zur Expression in den Phagemidvektor pCANTAB 5E (Amersham; Malone, 1994; s. II, 2.1, Abb. 5, S. 32) inseriert, um die Selektion der Hapten-spezifischen scFv-Antikörper aus der rekombinanten Antikörperbibliothek zu ermöglichen. Die scFv-tragenden Phagen wurden im *Panning* über das Hapten-Konjugat t-PMA-OVA selektiert und die löslichen scFv-Fragmente auf Bindung und Verdrängung analysiert.

Das Phagen-Display

Das Phagen-*Display* (Marks et al., 1992; Bradbury et al., 1995) imitiert die Strategie des Immunsystems. Im Immunsystem werden Antikörper an der Außenseite der B-Lymphoztyen exprimiert, um auf das spezifische Antigen zu treffen und es zu binden (Roitt et al., 1995). Viren können diese B-Zellen ersetzen, indem ein Antikörpergen in ein Gen des viralen Hüllproteins inseriert wird. Das resultierende Virus trägt das Antikörpergen und präsentiert den an das Hüllprotein fusionierten Antikörper an seiner Oberfläche. Smith (1985) verwendete filamentöse Bakteriophagen, um kleine Peptide an der Oberfäche zu präsentieren. Diese Strategie wurde auch auf filamentöse, Antikörper (AK)-assoziierte Phagen übertragen. ScFv-Fragmente wurden an der Oberfläche der Phagen verankert (McCafferty et al., 1990), wobei hierbei offensichtlich die infizierten Bakterien durch die entstehenden Phagenpartikel vergiftet wurden. Das scFv-Fragment bedeutete einen schwerwiegenden Selektionsnachteil für die entsprechenden Phagenpartikel, da durch die AK-p*III*-Fusionsproteine die Reproduktion des Phagen-Genoms beeinträchtigt wurde (Breitling und Dübel, 1997). Den Durchbruch brachte die Verwendung von Phagemidvektoren, die diesen Selektionsnachteil stark abmilderten (Breitling et al., 1991; Barbas et al., 1991; Hoogenboom et al., 1991). Phagemide sind Plasmide, die zusätzlich ein Verpackungssignal der filamentösen Phagen besitzen. In Anwesenheit eines Helferphagen wird die Phagemid-DNA in Phagenpartikel eingebaut. Wird dabei gleichzeitig das Fusionsprotein scFv-pIII induziert, entstehen Phagenpartikel,

die ein AK-Fragment auf der Oberfläche verankern. Im Phagemid wird dieses Fusionsprotein jedoch nicht konstitutiv exprimiert, sondern von außen regulierbar unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters. Somit kann der Bau und die Vervielfältigung einer AK-Bibliothek ohne Expression des AK-Fragments erfolgen und der Selektionsnachteil umgangen werden. Erst nach Induktion und Zugabe von Helferphagen entstehen Phagenpartikel mit einem scFv-Fragment, dessen Gen nun aufgrund der Bindung dieses Partikels an das Antigen selektiert werden kann. Die Oberflächenexpression ermöglicht die „klonale Selektion" von AK-Genen durch Abtrennung der bindenden von nicht bindenden Phagen mit Hilfe des entsprechenden Antigens. Diese Methode des Expressions-*Screening*s hat bereits in vielen Labors ihre Tauglichkeit zur Isolation neuer Antikörper bewiesen. Die größten bisher beschriebenen AK-Bibliotheken haben mittlerweile eine Komplexität von ca. 10^{10} unabhängigen AK-Genen (Nissim et al., 1994). Beispiele für Phagen-*Display*-Systeme sind pHEN-1 (Hoogenboom et al., 1991), pCOCK (Engelhardt et al., 1994), pComb8 (Barbas et al., 1991) und pCANTAB 5E (Amersham; Malone, 1994) und dessen Derivate (McCafferty et al., 1994). Das in dieser Arbeit verwendete Phagemid pCANTAB 5E (s. II, 2.1, Abb. 5, S. 32) repräsentiert die kommerzielle Variante des scFv-Systems, das von Winter et al. (1994) für die Produktion von scFv-Fragmenten entwickelt wurde. Das Phagemid trägt den *origin of replication* für die M13-Phage. Bei Transformation von *E. coli* repliziert sich das Phagemid als Plasmid. Für die Produktion von AK-exprimierenden M13 mußte die Infektion von transformierten *E. coli* mit M13KO7-Helferphagen erfolgen. Diese Helferphagen codieren alle nötigen Phagenproteine, haben allerdings einen defekten *origin of replication* und packen deshalb vorzugsweise Phagemid-DNA (Griffiths und Hoogenboom, 1993). Helferpagen-DNA enthält zusätzlich den Antibiotika-Resistenzmarker Kanamycin, der die Selektion von infizierten *E. coli* ermöglicht. Nach bakterieller Replikation werden funktionelle Phagen produziert, die AK-Fusionsproteine exprimieren. Bakterienzellen können 100-fach effektiver mit Phagemidvektoren als mit Phagenvektoren transformiert werden (Brown, 1990). Das ist bei der Generation von großen, verschiedenartigen Bibliotheken mit vielen unterschiedlichen AK-Genen bedeutsam.

Das genetische Material zur **Konstruktion der scFv-Fragmente** wurde aus den Pyrethroid-spezifischen Hybridom-Zellinien 1/A5-7/C10 und 3/B4-1F/8 (Pullen und Hock, 1995a) gewonnen. Weiterhin ist die Generation einer AK-Genbibliothek sowohl aus immunisierten humanen Spendern (Williamson et al., 1993; Welschof et al., 1997) als auch

aus immunisierten Tieren, z.B. Mäusen (Ørum et al., 1993), Kaninchen (Ridder et al., 1995) und Hühnern (Yamanaka et al., 1996), über B-Lymphozyten, Milzgewebe (Cummings et al., 1998) oder Plasmazellen möglich. Die Isolation spezifischer AK-mRNA von monoklonalen Hybridomzellen ist relativ einfach, da sie mRNA in großen Mengen produzieren (Hall et al., 1997). Die extrahierte mRNA wurde anschließend in komplementäre DNA (cDNA) über reverse Transkriptase umgewandelt (Jackson et al., 1992).

Die Gewinnung der beiden AK-Genfragmente für die leichten Ketten erfolgte über PCR unter Verwendung AK-spezifischer Oligonukleotidprimer (Clackson et al., 1991). Für die Synthese der Primer wurden existierende AK-Sequenzen in Datenbanken (Kabat et al., 1991) herangezogen. Bei der PCR-Vervielfältigung von AK-Genen müssen die Reaktionsbedingungen auf die geringe Spezifität der eingesetzten Primer abgestimmt und optimiert werden. Die zu vervielfältigenden AK-Gene stimmen in aller Regel nicht perfekt mit den Sequenzen der Oligonukleotidprimer überein. Dies liegt an der genetischen Vielfalt der rearrangierten AK-Gene. Alleine für die V-Regionen der AK enthält das Mausgenom weit über 100 verschiedene Sequenzen, die dazu noch zusätzlich somatisch mutiert sein können (Breitling und Dübel, 1997). Umfangreiche Primersätze wurden zur Vervielfältigung humaner (Orlandi et al., 1989; Marks et al., 1991; Jones und Bending, 1991;) und muriner AK-V-Regionen (Ørum et al., 1993; Dübel et al., 1994, Zhou et al., 1994) konstruiert. Aufgrund der weitgehend konservierten Enden der Schwer- und Leichtketten-V-Gene können bestimmte Primer für die Amplifikation synthetisiert werden (Sastry et al., 1989; Marks et al., 1991). Krebber et al. (1997) verwendeten Primersätze, in denen alle murinen VH, V_λ und V_κ Sequenzen aus der Kabat Datenbank (Kabat et al., 1991) mit verbesserten Primersets (z.B. Kettleborough et al., 1993) kombiniert waren. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Dr. Kramer (Lehrstuhl für Botanik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München) unter den oben erwähnten Gesichtspunkten optimiert und zur Verfügung gestellt. Li et al. (1999) streichen die Vorzüge der Verwendung der Immunglobulin-Keimbahngene des Kaninchens heraus. Die Vielfalt der AK-Sequenzen entsteht bei diesen Tieren aufgrund von Hypermutation und somatischer Genkonversion, wodurch die für die Primerhybridisierung wichtigen Enden der Fv-Region-DNA nicht verändert werden (Ridder et al., 1995). Somit wären weniger Primer zur Amplifikation der Immunoglobulingene nötig als bei der Erstellung von murinen rekombinanten AK-Bibliotheken. Die separaten Amplifikationen der variablen

Regionen der Pyrethroid-spezifischen, monoklonalen AK ergaben unterschiedliche Mengen an DNA (vgl. III, 1.1.2, Tab. 21, S. 93. Auch Kramer und Hock (1996a), Kramer (1998), Zhou et al. (1994) und Schlebusch et al. (1997) wiesen auf geringere V_L-Mengen hin. Zhou et al. (1994) umgingen dieses Problem mittels eines optimierten Primers für die Leichtkette, wohingegen Kramer und Hock (1996a) eine größere Anzahl an PCR-Zyklen gegenüber der V_H-Region einsetzten. Die unterschiedlichen Amplifikationsmengen bedingten bei dem anschließenden Assembling der V-Regionen und des Linkersegments ein exaktes äquimolares Verhältnis der DNA-Stücke, um ein erfolgreiches Zusammenfügen zu ermöglichen (Schlebusch et al., 1997). Die Schätzung kann neben der Gelelektrophorese auch über eine photometrische Analyse oder Titration erfolgen (Kramer und Hock, 1996a).

Die beiden V-Regionen wurden mittels eines flexiblen Peptidlinkers $(Gly_4Ser)_3$ (Huston et al., 1988; Bird et al., 1988) miteinander verbunden. Diese kovalente Bindung verhindert die Dissoziation der gepaarten V_H- und V_L-Domänen durch die variierende Stabilität des Heterodimers aufgrund der strukturabhängigen Unterschiede der Bindungsenergie zwischen den Schwer- und Leichtketten-Teilen in einzelnen Antikörpern (Kramer und Hock, 1996a). NMR-Untersuchungen bei einem scFv im Vergleich zu dem entsprechenden Fv-Fragment ergaben, daß die Faltung der variablen Domänen durch den Linker nicht gestört wird (Freund et al., 1993). Das scFv wurde aus den drei DNA-Fragmenten V_H, V_L und Linker konstruiert (Clackson et al., 1991; Kramer und Hock, 1996a; Schlebusch et al., 1997; Garrett et al., 1997;). Eine andere Methode, das Antikörperfragment zu verbinden, wendeten z.B. Vaughan et al. (1996), Krebber et al. (1997) und Alcocer et al. (2000) an. Während der Amplifikation der variablen Regionen wurden über die Primer die Linkersequenzen an die entsprechenden Enden der Domänen angefügt. In einer weiteren Reaktion, SOE-PCR (*splicing by overlap extension*; Horton et al, 1989) wurden die variablen Domänen zusammengefügt. Dadurch fällt eine PCR-Reaktion im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit weg, allerdings erhöht sich die Gefahr eines verkürzten Linkers aufgrund der Anfälligkeit für PCR-Artefakte (Breitling und Dübel, 1997). Um die Dimerisierung oder die Tendenz zur Aggregation der scFv-Fragmente (Desplancq et al., 1994; Huston et al., 1995) zu reduzieren, wählten Krebber et al. (1997) einen Linker mit einer Länge von 20 Aminosäuren anstelle der 15 Aminosäure langen Variante.

An die PCR zum Zusammenfügen der variablen Regionen über das Linkerfragment (vgl. III, 1.1.3, S. 94ff) schloß sich eine weitere PCR-Reaktion zur Amplifikation der entstandenen scFv-Fragmente. Dabei erfolgte das Anfügen der Klonierungsstellen *Sfi*I und *Not*I mit den Primern VH1BACKSfiI und JK1NotI-Mix. Da es sich bei dem Forward-Primer um einen Primer-Mix handelte, bedingt durch die alternierenden Sequenzen am 3'-Endes der V_L-Region im murinen Antikörperrepertoire, entstanden neben der scFv-Bande zusätzliche Banden (vgl. III, 1.1.3, Abb. 23, S. 95), die Primer-bedingten Nebenprodukten zuzuordnen sind.
Mit Hilfe der angefügten Klonierungsstellen *Sfi*I und *Not*I wurde das scFv-Fragment in das Phagemid pCANTAB 5E inseriert. Diese Restriktionsenzyme werden häufig in der rekombinanten AK-Technologie eingesetzt (Hoogenboom et al., 1991; Ørum et al., 1993; Vaughan et al., 1996), daß sie nicht in den V-Regionen schneiden. In anderen Systemen wurden vier verschiedene Enzyme für die sequentielle Klonierung von V_H und V_L eingesetzt (Orlandi et al., 1989; Barbas et al., 1991; Johansen et al., 1995; Yamanaka et al., 1996). Krebber et al. (1997) hingegen verwendeten nur das asymmetrische Restriktionsenzym *Sfi*I, um das Risiko des Schneidens in Antikörpergenen zu umgehen.

Die Insertion des scFv in pCANTAB 5E erfolgte an das 5'-Ende des Gen*III*, welches das Phagenoberflächenprotein (g3p) codiert. Kompetente *E. coli* TG1 wurden mit dem rekombinanten Plasmid transformiert. Das entstandene **scFv-g3p Fusionsgen** wurde anschließend über Zugabe von M13KO7 Helferphagen gerettet. Aufgrund des Suppressor Stamms *E. coli* TG1 wurde das Amber Stop-Codon zwischen dem scFv-Gen und der g3p-Sequenz überlesen und scFv-g3p Fusionsproteine während der Expression an der Phagenoberfläche präsentiert. Der IPTG-induzierbare *lac* Promoter und der *lac* Repressor kontrollieren die Expression des scFv-g3p Fusionsgens. Die Anwesenheit des *lac* Repressors ist wesentlich, um die toxischen Wirkungen der g3p-Expression vor der Phagen-Infektion zu verringern (Hall et al., 1997). Neben der Toxizitätswirkung für den Wirt kann eine unregulierte Expression auch den Verlust oder die Unterrepräsentation von gewünschten Klonen in der Antikörperbibliothek verursachen (Georgiou et al., 1997; Bradbury, 1998). Daugherty et. al. (1999) entwickelten Phagen-*Display*-Systeme mit den *tet* und *araBAD* Promotoren, um optimale Induktionsbedingungen und die Produktion von lebensfähigen Zellen zu gewährleisten.
Da der *lac* Repressor eine geringe Expression zuläßt, konnte eine weitere Repression über katabolische Repression durch Glucose bei 30 °C erreicht werden. Nach Infektion mit den

Helferphagen wurde die Glucose entfernt und die Temperatur gesteigert, um die Repression zu schmälern und die Produktion von Antikörperfragmenten an der Phagenoberfläche zu ermöglichen. Die Funktion des g3p während der Infektion ist die Anheftung der Phagen an den Pilus von *E. coli* (Crissman und Smith, 1984). Bei Involvierung des g3p in den Prozess der bakteriellen Infektion kann die Phageninfektion verhindert oder beeinträchtigt werden, wenn alle oder die meisten g3p an Antikörper fusioniert sind (Markland et al., 1991). Mit Helferphagen codiert das Phagensystem beides, das Fusionsprotein und das Wildtyp-Protein (Winter et al., 1994). So kann die Expression mit g3p so beeinflußt werden, daß ungefähr ein monovalentes Fragment pro Phage präsentiert wird (Griffiths et al., 1993), im Gegensatz zu dem größeren Hüllprotein g8p mit multivalenter Präsentation. Das umgeht die Infektionsprobleme, die mit Phagenvektoren verbunden sind, und ermöglicht die Selektion von hochaffinen Antikörpern (Hall et al., 1997). Die Initiation der Expression resultierte in der Synthese von kompletten Phagenpartikeln, die aufgrund der langen Expressionszeit vom bakteriellen Periplasma in den Kulturüberstand transportiert wurden. Die Phagen enthalten ein einzelsträngiges Phagemid mit dem scFv-Gen, welches als scFv-Antikörper exprimiert und auf der Phagenoberfläche präsentiert wird.

Die **Affinitätsanreicherung der Phagenpartikel über das Antigen** ist mit der „klonalen Selektion“ *in vivo* gleichzusetzen. Im Selektionsvorgang, dem *Panning (*Marks et al., 1991), wurden die scFv-tragenden Phagen mittels des an einer Mikrotiterplatte immobilisierten Hapten-Konjugats t-PMS-OVA von den nicht bindenden Phagen selektiert und in einem zur Affinitätschromatographie analogen Schritt angereichert (vgl. III, 1.1.5.1, S. 99). Für das *Panning* können auch Polystyrol-Gefäße eingesetzt werden. (Schlebusch et al., 1997, Krebber et al., 1997). Weitere Beispiele für die Selektion sind die Bindung an biotinyliertes Antigen in Lösung, gefolgt von dem „Herausfischen“ mittels Streptavidin-beschichteten magnetischen Kugeln (Chester et al., 1994), die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS; Daugherty et al., 1999) oder die Affinitätschromatographie mit Antigen-beschichteten Säulen (McCafferty et al., 1990; Clackson et al., 1991). Ein Nachteil des *Panning*s ist die Anwesenheit von unspezifischen Klonen in der positiven Fraktion. Um diesen Anteil an unerwünschten Klonen zu reduzieren, wählten Kramer und Hock (1996a) die immunmagnetische Separation. Hierbei wurden der Kulturüberstand mit Hapten-beschichteten paramagnetischen Partikeln inkubiert und die Hapten-spezifischen Phagen über Magnetismus aus der Lösung entfernt. Durch Reinfektion von TG1 Bakterien

(vgl. III, 1.1.5.2, S. 100) mit den scFv-assoziierten Phagen wurden die t-PMS-OVA-spezifischen scFv-Gene isoliert. Eine andere Methode, die spezifischen Gene zu isolieren, ist die Elution mit dem Analyten. Yuan et al. (1997) setzten das freie Mycotoxin Zearalenon ein, um die gebundenen Phagen zu eluieren.
Von 1 x 10^{10} eingesetzten Phagen wurden 3,6 x 10^5 scFv(1/A5)-tragende bzw. 1,6 x 10^5 scFv(3/B4)-tragende Phagen nach einer Runde *Panning* gewonnen. Diese Werte lagen um das 10-fache höher als bei Schlebusch et al. (1997) mit ca. 10^4 eluierten Phagen nach der 1. Selektionsrunde. Die Prozedur des *Panning*s kann mehrere Male wiederholt werden, evtl. auch unter Einsatz von geringeren Antigenmengen (Hall et al., 1997), um möglichst hochaffine Phagen zu isolieren.

Die mit selektierten Phagen infizierten TG1 Bakterien wurden zur **Expression von löslichen scFv** kultiviert. Die Induktion des *lac* Pomoters erfolgte mit IPTG unter Abwesenheit von Glucose. Das Amber Stop-Codon in pCANTAB 5E zwischen dem 3'-Ende des scFv-Fragments und dem 5'-Ende des p*III*-Gens ermöglicht die Produktion von löslichen scFv. Da *E. coli* TG1, ein Amber Suppressor Stamm (*sup*E), in ausreichendem Maße das Stop-Codon erkennen kann, ist die Synthese von löslichen scFv parallel zu phagen-gebundenen scFv möglich. Somit war die Infektion eines Nicht-Suppressor-Stammes mit den rekombinanten Phagen nicht zwingend nötig (Kramer, 1998). Yuan et al. (1997), Schlebusch et al. (1997) und Cummings et al. (1998) verwendeten den *E. coli* Nicht-Suppressor-Stamm HB2151 zur Produktion von löslichen scFv.

Das ***Screening* der exprimierten scFv-Fragmente** erfolgte sowohl nach Bindung als auch nach Verdrängung über das Hapten-Konjugat t-PMS-OVA bzw. das Pyrethroid Bioallethrin als Analyten (vgl. III, 1.1.6, S. 101f). Bioallethrin wurde gewählt, da beide eingesetzten Hybridom-Zellinien mit Bioallethrin reagieren (Pullen und Hock, 1995a). Dreißig Klone zeigten Verdrängungs-spezifische Absorptionsunterschiede zwischen PBS und Bioallethrin. Im nachfolgenden ELISA mit einer erweiterten Bioallethrin-Standardreihe konnte die Bindung und Verdrängung von 6 Klonen (vgl. III, 1.1.6, Abb. 26, S. 103) bestätigt werden, wobei zwei Klone der Zellinie 1/A5-7/C10 und vier der Zellinie 3/B4-1/F8 zuzuordnen waren.

Charakterisierung der positiven Klone

Die **DNA-Analyse** der positiven Klone sowohl im Restriktionsverdau (vgl. III, 1.2, Abb. 27, S. 104) als auch über Sequenzierung der scFv-Inserts zeigten Unterschiede in den Sequenzen auf. Diese Gegebenheit bedingte die Konstruktion des scFv-Fragments der Myelom-Zellinie PAI-B_3Ag81 (vgl. III, 1.2.1, S. 104ff), die bei der Fusion der Pyrethroid-spezifischen Hybridomzellen eingesetzt worden war (Pullen und Hock, 1995a). Die Intention war ein Sequenzvergleich mit den generierten Pyrethroid-spezifischen scFv, um etwaige variable Regionen, die durch Amplifikation mit der PAI-mRNA bzw. umgewandelten cDNA aus der Hybridomlinie entstanden sein könnten, zu identifizieren. Die Sequenzanalyse ergab, daß vier der sechs Klone entweder die V_H oder die V_L Region des Myeloma-scFv enthielten. Auch Alcocer et al. (2000) machten eine derartige Entdeckung bei der Konstruktion eines scFv-Fragments gegen das Pestizid Chlorpyrifos. Die unfunktionellen Fragmente wiesen Leichtketten-Pseudogene aus der Myelom-Zellinie P3-X63-Ag8.653 auf.
Bei dem Vergleich der Sequenzen mit dem Atrazin-spezifischen scFv K411B, dessen Linkerfragment und Phagemidvektor pCANTAB 5E zur Konstruktion des Pyrethroid-spezifischen scFv-Fragments verwendet wurden, stellte sich heraus, daß V_L von zwei Klonen mit dem Leichtkettenfragment von scFv K411B identisch war. Dies kann in einem unvollständigen Restriktonsverdau bei der Vektorpräparation begründet sein. Die Kontamination von Antikörperbibliotheken mit unpräparierten oder nicht vollständig geschnittenen Vektoren wurde des öfteren beobachtet (Courtney, et al., 1995; Johansen et al., 1995). Krebber et al. (1997) konstruierten den Phagemidvektor pAK100 mit dem Insert der Tetracyclin-Resistenz zwischen den Klonierungsstellen des scFv. Die erfolgreiche Insertion des scFv-Fragments kann mittels der verlorenen Tetracyclin-Resistenz des Vektors überprüft und der komplette Verdau des Phagemids zur Ligation gesichert werden.

Die **Analyse** der zwei verbleibenden positiven Klone 4H und 5F **auf Proteinebene** zeigte, daß die beiden scFv-Fragmente aufgrund von PCR verursachten Opal Stop-Codons in den V_L Regionen nicht als vollständige Proteine gelesen werden konnten. Dies betrifft auch die Transkription des zur Detektion im ELISA eingesetzten Peptid-*Tag*s E-*Tag* (Malone, 1994; s. II, 2.1, Abb. 5, S. 32) am 3'-Ende des scFv. Damit müssen rückwirkend die ELISA-Ergebnisse, die auf Verdrängung und Bindung hindeuteten, angezweifelt werden.

Die strukturelle Charakterisierung der beiden Klone 4H und 5F per **Datenbankanalyse** (IMGT, the international ImMunoGeneTics database http://imgt.cines.fr:8104 ; Lefranc, 1999; Ruiz et al., 2000) zeigte auf, daß die V_H-Region von 4H murinen Keimbahngenen zugeordnet werden kann (vgl. III, 1.2.3, Abb. 30, S. 108). 4H-V_L hingegen beinhaltete nur eine der konservierten Aminosäuren in den FR-Regionen des scFv. Der Klon 5F zeigte keinerlei murine IgG-Strukturen.
Durch Entfernen der Base Adenin, die für die Verschiebung des Leserahmens in 4H-V_L verantwortlich war, konnte mittels der IMGT Datenbank eine mit Maus-IgG vergleichbare variable Region im korrekten Leserahmen mit den konservierten Aminosäuren bestätigt werden.

In der Praxis wurde die Base Adenin über zielgerichtete Mutation, ***oligonucleotide site-directed* Mutagenese** (Kunkel, 1985; Kunkel et al., 1987), entfernt (vgl. III, 1.3, S. 110ff). Die anschließende Datenbankanalyse mittels Vergleich von murinen Keimbahngenen der IMGT Datenbank (Lefranc, 1999; Ruiz et al., 2000) ergab, daß die V_H-Region des mutierten, Pyrethroid-spezifischen scFv-Klons 4H/31 der IMGT eigenen IGHV1 Untergruppe, gebunden an das J_H2 Segment, zuzuordnen war. V_L war mit der Familie Vκ5S, verbunden mit dem Jκ1 Segment, gleichgesetzt worden.
Der Test des mutierten scFv 4H/31 auf Bindung und Verdrängung im ELISA zeigte eindeutig eine Bindungsreaktion der Fragmente an das Hapten-Konjugat t-PMS-OVA. Die Absorptionen gegenüber der Kontrolle mit OVA waren um das 2,5-4 Fache höher (vgl. III, 1.4.1, Abb., S.). Cummings et al. (1998) und Schlebusch et al. (1997) definierten Bindungsreaktionen von rekombinanten scFv-Fragmenten bereits bei Absorptionsunterschieden mit Faktoren von mindestens 1,5 bzw. 2. Die Verdrängung des Pyrethroid-spezifischen Klons mit den Pyrethroid-Substanzen Allethrin und Bioallethrin war nicht eindeutig. Die gemessenen Absorptionen zwischen den Analyten und PBS als Kontrolle lagen zu dicht beieinander, um eine eindeutige Verdrängung zu erkennen. Auch die hohen Standardabweichungen bestärkten diese Erkenntnis. Das eingesetzte S-Bioallethrin konnte die Phagen-konjugierten scFv nicht von dem Hapten-Konjugat verdrängen. Kramer und Hock (1996a) hatten bei der Konstruktion des Atrazin-spezifischen scFv-Fragments mit pCANTAB 5E ähnliche Beobachtungen gemacht. Sie setzten die geringe Verdrängung durch den freien Analyt mit der Haftungseigenschaft von Phagenpartikeln an der Mikrotiterplatte in Zusammenhang. Dies veranlasste die Verwendung des Nicht-Suppressor-Stammes HB2151 zur Produktion von löslichen scFv.

Lee et al. (1995) machten Erfahrungen mit hohen Hintergrund-Bindungen und Schwierigkeiten bei Erkennung von hoch-affinen Hapten-spezifischen Antikörpern während der Arbeit mit der Phagen-*Display*-Technik.
Einen weiteren Unsicherheitsfaktor in der Bestimmung der Verdrängung stellte der POD-konjugierte Anti-E-*Tag*-Antikörper im ELISA dar. Wie die Kontrolle mit PBS im indirekten, kompetitiven ELISA (vgl. III, 1.4.1, Abb. 37, S. 116) zeigte, war ohne Applikation des scFv-enthaltenden Kulturüberstands, aber mit Einsatz des Anti-E-*Tag*-Antikörpers, eine positive, mit der Bindung gleichzusetzende Reaktion zu erkennen. Dies deutete auf eine unspezifische Reaktion des Anti-E-*Tag*-Antikörpers hin. In einem anderen Assay-Format, sollte unter Einsatz des Anti-E-*Tag* Primärantikörpers gekoppelt mit einem POD-markierten Anti-Maus-IgG diese Möglichkeit umgangen werden. Jedoch waren auch hier keine Verdrängungsreaktionen zu beobachten.
Die Funktionalität der primären und sekundären Antikörper wurde während der Proteincharakterisierung im Westernblot (vgl. III, 1.4.2, Abb. 38, S. 117) bestätigt. Unter Einsatz des Anti-E-*Tag*-IgG zusammen mit Anti-Maus-IgG-POD konnte das scFv-Protein sowohl im Überstand als auch im Periplasmaextrakt mit einer Größe von ca. 30 kDa eindeutig identifiziert werden. Diese Größe stand im Einklang mit den ermittelten Werten bei Yuan et al (1997) und Garrett et al. (1997). Dies ließ Rückschlüsse auf die korrekte Transkription und Expression des scFv-E-*Tag*-Fusionsproteins und die Translokation des Proteins aus dem Cytoplama über das Periplasma in den Kulturüberstand zu.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aus der Hybridomlinie 1/A5-7/C10 unter Einsatz des Phagen *Display* Systems pCANTAB 5E ein scFv-Antikörperfragment mit Pyrethroid-spezifischen Bindungseigenschaften generiert wurde. Die Verdrängung des scFv 4H/31 von dem Hapten-Konjugat t-PMS-OVA durch spezielle Analyten blieb jedoch aus.
Als ein wichtiger Aspekt in der Selektion von rekombinanten Antikörpern aus Hapten-spezifischen *E. coli* Antikörperbibliotheken muß das im *Panning* und *Screening* eingesetzte Hapten-Konjugat gesehen werden. Jung et al. (1989) und Manclús et al. (1996) wiesen auf die Schwierigkeiten in der Synthese von geeigneten Haptenen und deren Auslösen einer ausreichenden Immunantwort bei der Synthese von monoklonalen Antikörpern hin. Das ist auch auf rekombinante Antikörper, die aus Hybridomlinien generiert werden, zu übertragen. Aufgrund der äußerst feinen Toleranz in der Affinität eines Antikörpers zu seinem kleinen Target ist es wichtig, rekombinante Antikörper zu produzieren, die möglichst genau die originalen Antikörper imitieren (Ward et al., 1993).

2 Konstruktion von s-Triazin-spezifischen F_{ab}-Antikörperfragmenten

Zur Konstruktion von drei *s*-Triazin-spezifischen F_{ab}-Antikörpern wurden die variablen Regionen der Schwer (V_H)- und Leichtkette (V_L) der *s*-Triazin-spezifischen scFv-Fragmente IPR-7, IPR-53 und IPR-23 (Kramer, 2001b) an die murinen, konstanten Regionen von Maus-IgG im Expressionsvektor pASK99 (Skerra, nicht veröffentlicht) angefügt. Die scFv-Antikörper stammten aus einer *s*-Triazin-selektiven Antikörperbibliothek, wobei die Klone IPR-53 und IPR-23 über evolutionäre Mutation aus dem Antikörper IPR-7 gewonnen wurden (Kramer, 2001b). Die Modifizierung des Antikörpergens erfolgte über sequentielles *Chain Shuffling*. Zusätzlich wurden einzelne Punktmutationen über *Error Prone* PCR eingefügt (Kramer, 2001b). Die variablen Regionen wurden in separaten PCR-Reaktionen aus dem rekombinanten Phagemid pCANTAB 5E (Malone, 1994) isoliert und in pASK99 inseriert. Die entstandenen F_{ab}-Fragmente wurden in *E. coli* exprimiert und über ELISA und Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) mittels eines BIAcore Biosensors charakterisiert.

Der **Expressionsvektor pASK99** (Skerra, nicht veröffentlicht) wurde für die bakterielle Sekretion von F_{ab}-Fragmenten konstruiert und enthält die konstanten Regionen der Schwer ($C_H1\gamma1$)- und Leichtkette ($C\kappa$) von Maus IgG (s. II, 2.2, Abb. 8, S. 59). Durch Insertion der V_H- und V_L-Regionen der *s*-Triazin-spezifischen scFv an die 5'-Enden der entsprechenden konstanten Regionen im Vektor wurden zwei Cistrons mit den Signalsequenzen der Leadersequenzen *omp*A und *Pho*A gebildet. Das erste Cistron codierte für die Schwerkette des F_{ab}-Fragments. Die V_H Region wurde an den C-Terminus des *omp*A Signalpeptids und an den N-Terminus der $C_H1\gamma1$ Domäne fusioniert. Das zweite Cistron codierte die Leichtkette mit der V_L-Region, die zwischen das *Pho*A Leader-Peptid und die murine $C\kappa$ Domäne plaziert war. Am Ende der Schwerkette war das Cystein-codierende Basentriplett integriert, das die Verbindung mit dem C-terminalen Cystein der Leichtkette bildete. Die beiden Ketten des F_{ab}-Fragments wurden simultan in das Periplasma von *E. coli* sekretiert, wo die Bildung der Disulfidbrücke und das Ketten-*Assembling* aufgrund der oxidierenden Bedingungen (Plückthun und Skerra, 1989; Wülfing und Plückthun, 1994) stattfand. Durch das Enzym Disulfid-Isomerase im Periplasma wird die Bildung und die Anordnung der Disulfidbrücken gefördert (Bardwell et al., 1991) und die korrekte Proteinfaltung unterstützt. Die Transkription des AK-Fragments lag unter der Kontrolle des *tet*A Promoter-Systems. Die Produktion von rekombinanten AK-Fragmenten profitiert von

einigen Merkmalen des Anhydrotetracyclin-induzierbaren *tet* Promoters. Die *tet*A-gesteuerte Expression von heterologen Genkonstrukten in *E. coli* ist eine günstige Alternative zu IPTG-induzierbaren Promoterkonstruktionen, wie z.B. der *lac* Promoter und dessen Derivate (Reznikoff und Gold, 1986). Der Ersatz des pCANTAB 5E Vektors, der das *lac* Promoter-Gen beinhaltet, durch pASK99 ermöglicht die ökonomische Massenproduktion von rekombinanten F_{ab}-Fragmenten, da die Kosten für den Induktor Anhydrotetracyclin um etwa den Faktor 20 niedriger liegen als für IPTG. Außerdem ist das *tet* Promoter-System weitgehend unabhängig vom *E. coli* Stamm, der für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt wird (Skerra, 1994b). Dies ermöglicht, den Wirtsstamm nach optimalen Wachstumsbedingungen auszuwählen, z.B. für die Fermentation mit hoher Zelldichte (Schiweck und Skerra, 1995). Addierend kommt hinzu, daß das *tet* Promoter-System auch induzierbar ist, wenn die Zellen in Minimalmedium kultiviert werden. Aufgrund der streng regulierten Expression lassen sich Toxizitätsprobleme, verursacht durch Expression von Antikörperfragmenten während der bakteriellen Wachstumsphase, vermeiden (Skerra, 1994b). Der Zelltod vor der Induktion wird verhindert, da das *tet* Repressor Gen getrennt von der *tet* Kontrollregion in pASK99 inseriert ist. Durch die transkriptionelle Fusion des *tet*R Gens an das 3'-Ende des ß-Lactamase-Gens (*bla*, s. II, 2.2, Abb. 8, S. 59) kann die ununterbrochene Expression des Repressorgens erfolgen.
Direkt an das Cistron der Schwerkette schließt das Peptid-codierende Gen Strep-*Tag* II (Schmidt et al., 1996) an, welches bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Streptavidin-Affinitätschromatographie (Schmidt und Skerra, 1994a) aufgrund der Affinität zu Streptavidin eingesetzt werden kann. Weiterhin beinhaltete der Vektor pASK99 die bei der Klonierung eingesetzten Restriktionsstellen *Pst*I, *Bst*EII, *Sst*I, *Xho*I, *Nco*I, *Hind*III und *Xba*I (vgl. II, 2.2.1, S. 60ff).

Die **Klonierung der variablen Regionen** der *s*-Triazin-spezifischen scFv-Fragmente IPR-7, IPR-53 und IPR-23 (Kramer, 2001b) in pASK99 (Skerra, nicht veröffentlicht) beinhaltete die separate Amplifikation der variablen Regionen aus dem pCANTAB 5E Phagemid (Malone, 1994), die voneinander getrennte Insertion der amplifizierten Regionen über die jeweiligen Restriktionsstellen in pASK99 und das Zusammenfügen der entsprechenden Schwer- und Leichtkettenfragmente.

Amplifikation von V_H und V_L

Die V_H- und V_L-Regionen wurden über PCR aus den scFv/pCANTAB 5E Klonen IPR-7, IPR-53 und IPR-23 (Kramer, 2001b) isoliert. Die eingesetzten spezifischen Primer (Kramer et al., 2001a) wiesen Degenerationen auf, um die Hybridisierung mit dem murinen Antikörperrepertoire zu ermöglichen. Über die PCR-Reaktion des V_L-Gens wurde die zur Klonierung nötige Restriktionsstelle *Xho*I an V_L mittels Primer angefügt. Die anderen Restriktionsstellen *Pst*I und *Bst*EII bzw. *Sst*I für die Klonierung waren bereits Bestandteil der variablen Regionen V_H bzw. V_L. Die Restriktionsstellen lagen somit in den Rahmen-Regionen 1 und 4 von V_H und V_L. Aufgrund der Beschaffenheit der Primer kann die Anlagerung innerhalb der flankierenden Regionen einer Vielzahl von murinen variablen Genen erfolgen und ermöglicht die Anwendung der beschriebenen Subklonierung auf andere Phagen-*Display*-Systeme, wie z.B. pHEN-1 (Hoogenboom et al., 1991) und pCOCK (Engelhardt et al., 1994).

Die unterschiedlichen Annealingtemperaturen der Primerpaare veranlassten den Einsatz eines Temperaturgradienten (von 50-65 °C) in der Hybridisierungsphase. Jedoch zeigten die Amplifikationsprodukte (vgl. III, 2.1, Abb. 40, S. 119) der verschiedenen Template-Mengen (1 und 10 ng) nur geringfügige Unterschiede bei den unterschiedlichen Temperaturen (50,4 °C, 60,2 °C, 65,2 °C). Die Längen der DNA-Banden entsprachen ca. 350 bp für V_L und ca. 300-330 bp für V_H.

Ligation der variablen Regionen mit pASK99

Die amplifizierten variablen Regionen der scFv-Klone IPR-7, IPR-53 und IPR-23 wurden in den Expressionsvektor pASK99 inseriert. Dazu erfolgte die Präparation der variablen Regionen und des Plasmids mit den entsprechenden Restriktionsenzymen im RV. Die variablen Schwerkettenregionen sowie pASK99 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Bst*EII geschnitten, wohingegen die variablen Leichtkettenregionen und der Vektor mit *Sst*I und *Xho*I bearbeitet wurden. Die Enzyme *Pst*I und *Bst*EII benötigten die gleiche Pufferbedingungen und ermöglichten somit eine Reaktion mit beiden Enzymen in einem Doppel-RV. *Sst*I und *Xho*I allerdings reagierten nur optimal mit voneinander verschiedenen Salzen, was einen sequentiellen RV, d.h. nacheinander auszuführende Inkubationen mit den einzelnen Enzymen und deren abgestimmten Puffersalzen, erforderte. Um die optimalen Pufferkonzentrationen der Enzyme einzustellen, wurden die Salze in der zweiten Inkubation des Enzyms zum

höherkonzentrierten Pufferoptimum aufgestockt. Diese Methode wurde dem sequentiellen RV mit P/C-Extraktion vorgezogen, um große DNA-Verluste bei Extraktions- und Waschschritten zu vermeiden. Die amplifizierten variablen Regionen und der Vektor pASK99 wurden im RV unterschiedlich behandelt. Ein RV von PCR-Fragmenten gestaltet sich schwieriger als bei Plasmiden, da sich die Restriktionsenzyme aufgrund der geringen Basenpaarzahl an den Fragmentenden weniger leicht an die Erkennungssequenzen anlagern können. Zur Vermeidung dieses Problems wurden die Verdauzeiten gegenüber dem Plasmidverdau verlängert.

Die 2-fach geschnittenen und elektrophoretisch aufgereinigten Fragmente der variablen Regionen wurden mit den entsprechend präparierten Vektorfragmenten ligiert. Die anschließenden Transformationen von *E. coli* K12-JM83 Bakterien (Yanisch-Perron, et al., 1985) mit den ligierten Schwer- bzw. Leichtketten-Plasmiden verliefen ohne Hintergrund, d.h. weder Religation des 2-fach geschnittenen Vektors noch Fremdplasmide waren aufgetreten. Die resultierenden Transformationsraten (vgl. III, 2.2, Tab. 27, S. 124) lagen nicht weit unter dem Elektroporationsoptimum von 10^9-10^{10} Zellen/µg zirkulärer Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989). Die Differenz ist auf die Eigenpräparation der elektro-kompetenten Bakterien zurückzuführen, bei der immer Verluste gegenüber kommerziell erwerbbaren Zellen zuberücksichtigen sind.

Ligation der Schwer- und Leichtketten-Fragmente mit pASK99

Die Schwer (Fd)- bzw. Leichtketten-Plasmide der drei AK-Varianten IPR-7, IPR-53 und IPR-23 wurden für die Klonierung in pASK99 mit dem entsprechenden Ketten-Gegenstück über einen RV präpariert. Die Restriktionsenzyme *Nco*I und *Hind*III kamen bei dem Verdau der V_L tragenden Plasmide der Varianten IPR-53 und IPR-23 zum Einsatz. Die herausgetrennten Leichtketten-Fragmente wurden mit den *Nco*I/*Hind*III-linearsisierten pASK99-Fd Plasmiden ligiert. Bei der Variante IPR-7 hingegen mußten die Restriktionsstellen *Xba*I und *Sst*I für die Klonierung der Fd-Fragmente in pASK99-Leichtketten Plasmide herangezogen werden, da die Erkennungssequenz von *Nco*I im V_H-Gen von IPR-7 enthalten war. Die elektrophoretischen Auftrennungen der einzelnen RV-Ansätze belegten die richtigen Größen der einzelnen DNA-Fragmente (vgl. III, 2.3, Abb. 44-47, S. 125ff). Die Elektroporation von JM83-Zellen (Yanisch-Perron et al., 1985) mit den ligierten Schwer- und Leichtketten-Fragmenten in pASK99 zeigte keine Hintergrundreaktionen mit Fremdplasmiden oder religiertem Vektor (vgl. III, 2.3, Tab. 30, S. 128). Die Transformationsraten der einzelnen IPR-Varianten lagen eng beieinander,

allerdings um einen Faktor 100 unter dem Elektroporationsoptimum von 10^9-10^{10} Zellen/µg zirkulärer Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989). Der Verdacht auf eine nicht vollzogene Ligation konnte aber über Plasmidisolation und *Xba*I/*Hind*III-RV (vgl. III, 2.4, Abb. 49, S. 131) ausgeräumt werden. Ein weiterer Beleg für die geglückte Klonierung von F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-53 war das Sequenzierungsergebnis (vgl. VII, Anhang, S. 217ff). Die Klonierung der variablen Regionen der IPR-Varianten in pASK99 konnte nur nacheinander erfolgen, da die Erkennungssequenzen von *Pst*I und *Sst*I auf den V_H- bzw. V_L-Regionen der IPR-Varianten lagen.

Die **Charakterisierung der konstruierten *s*-Triazin-spezifischen F_{ab}-Varianten** erfolgte nach Expression ausgewählter Klone über *Screening* und ELISA und über SDS-PAGE und BIAcore Biosensor unter Einsatz von Streptavidin-affinitätsgereinigten F_{ab}-Fragmenten.

Bakterielle Expression und Screening

Die Expression von 12 transformierten und Ampicillin-selektierten Bakterienkolonien je F_{ab}-Variante wurde wie bei Skerra (1994a) durchgeführt. Aufgrund des *tet*A Promoters in pASK99 war die Induktion mit Anhydrotetracyclin erforderlich. Die Expressionsdauer von 3-4 h richtete sich nach den ermittelten Werten von Skerra (1994a) und Schiweck und Skerra (1995). Die niedrige Temperatur bei Induktion ist ein essentieller Faktor für die Expression von löslichen rekombinanten Antikörpern, da hierbei Expression und Transport der exprimierten Proteine in den perplasmatischen Raum langsamer geschieht (Schein und Noteborn, 1988; Tagaki et al., 1988). Die Überexpression von rekombinanten Antikörpern kann die Bildung von unlöslichen Aggregaten hervorrufen. Auch ist die korrekte Faltung des Antikörpers eher bei geringeren Temperaturen gewährleistet (Lee et al., 1998a). Für die Translokation der Schwer- und Leichtketten-Fragmente in das Periplasma von *E. coli* waren die Signalsequenzen der *omp*A und *pho*A Leader, die den Kettenfragmenten direkt vorgeschaltet waren, verantwortlich. Im Cytoplasma werden die Vorläufer-Proteine der beiden Ketten, die je an eine bakterielle Signalsequenz fusioniert sind, in reduzierter Form synthetisiert. Nach dem Transport durch die innere Membran in das Periplasma werden die Signalsequenzen abgespalten, die Domänen gefaltet und angeordnet und die Disulfidbrücken gebildet (Plückthun und Skerra, 1989). Die Präparation des periplasmatischen Lysats zur Gewinnung der exprimierten Proteine erleichtert die Aufreinigung der rekombinanten Proteine aufgrund der geringeren Anzahl an Proteinen im Periplasma gegenüber dem Cytoplasma.

Das *Screening* selektierter Klone der IPR-Varianten erfolgte in einem indirekten, kompetitiven ELISA. Der starke Hintergrund, d.h. die Absorption bei Zugabe von Atrazin-Überschuß (vgl. III, 2.4, Abb. 48, S. 130), war auf den ungereinigten Zustand des Periplasmaextrakts und das nicht-optimierte Testformat zurückzuführen. Trotz der relativ hohen Hintergrundreaktionen waren Verdrängungen durch den Analyten zu erkennen, wobei die Klone der einzelnen IPR-Varianten mit der besten Bindungs- und Verdrängungsreaktion für die Protein-Charakterisierung ausgewählt wurden.

F_{ab}-Enzymimmunoassay

Die Applikation der periplasmatischen Zellfraktionen der F_{ab}-Varianten IPR-7/8, IPR-53/11 und IPR-23/2 in einem direkten, kompetitiven ELISA zeigte eine konzentrationsabhängige Reaktion (vgl. III, 2.5, Abb. 50, S. 132). Je Klon wurde ein sigmoider Kurvenverlauf unter Auftragen der Lumineszenzwerte gegen die logarithmierten Atrazinkonzentrationen bestimmt. Die Verwendung des Lumineszenzsubstrats ermöglichte eine Optimierung der Kurven durch Steigerung der Sensitivität des Tests. Mittels der Chemilumineszenz als Detektionsprinzip können für ELISA-Testsysteme teilweise deutliche, d.h. bis 100-fache Sensitivitätsverbesserungen erzielt werden (Hage, 1999; Samsonova et al., 1999). Die entsprechenden scFv-Antikörper wurden im gleichen ELISA-Format untersucht (Kramer, 2001b). Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte allerdings mit dem Anti-E-*Tag*-IgG, das eine Affinität zu dem Peptid E-*Tag* am scFv-Fragment aufweist. Ein weiterer Unterschied bestand in der Applikation von affintitätsgereinigten scFv im Gegensatz zu den Periplasmaextrakten, in denen die löslichen F_{ab}-Fragmente neben weiteren Proteinen enthalten waren. Die ermittelten Werte der Testmittelpunkte (50 % B/B_0) und der Nachweisgrenzen (20 % B/B_0) der einzelnen F_{ab}-Antikörperfragmente (vgl. III, 2.5, Tab. 31, S. 131) lagen über den Werten der entsprechenden scFv-Fragmente, spiegelten jedoch die evolutionäre Mutation der IPR-Varianten wider. Wie Kramer (2001b) beschrieb, wurde der aus der *s*-Triazin-selektiven Antikörperbibliothek stammende scFv-Klon IPR-7 (mit einer Kreuzreaktivität von 78 % zu Atrazin) über sequentielles *Chain Shuffling* modifiziert, um eine Mutante mit der höchsten Affinität (100 % Kreuzreaktivität zu Atrazin) zu erhalten. Die Mutation resultierte in den optimierten Mutanten IPR-53 und IPR-23 mit den verbesserten Testmittelpunkten von 9,5 bzw. 0,9 µg/l Atrazin und den Nachweisgrenzen von 3,4 bzw. 0,2 µg/l Atrazin gegenüber den 50 % B/B_0 (13,6 µg/l Atrazin)- und 20 % B/B_0-Werten (5,1 µg/l Atrazin) von IPR-7. Die konstruierten F_{ab}-Fragmente der IPR-Varianten zeigten eine 22,4-fache

Reduktion des Testmittelpunkts gegenüber des Faktors von 15 der scFv-Varianten, wohingegen die Nachweisgrenze um das 114,6-fache verbessert wurde im Vergleich zu der 25-fachen Verringerung bei den scFv-Mutanten.

Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die affinitätschromatographische Aufreinigung der F_{ab}-Fragmente aus der periplasmatischen Zellfraktion war aufgrund der Peptid-codierenden Sequenz des Strep-*Tag*s II im Expressionsvektor pASK99 möglich. Das Strep-*Tag* II ist ein Peptid aus neun Aminosäuren (SNWSHPQFEK; Voss und Skerra, 1997) und eine Mutante des Strep-*Tag*s, das aus einer Peptid-Bibliothek als künstlicher Ligand für Streptavidin selektiert wurde (Schmidt und Skerra, 1993). Das Strep-*Tag* wurde entwickelt, um eine Proteinreinigung, basierend auf der Affinität zu Streptavidin, zu ermöglichen. Der natürliche Streptavidin-Ligand Biotin bzw. dessen Derivate (z.B. hier Desthiobiotin) können für die spezifische Elution der Strep-*Tag*-Fusionsproteine von Streptavidin-Affinitätssäulen eingesetzt werden (Schmidt und Skerra, 1993). Im Vergleich zu anderen Aufreinigungsmethoden, z.B Antigen- oder Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) über das His-*Tag*, kann die Reinigung von IgG-Fragmenten über das Strep-*Tag* unter physiologischeren Bedingungen erfolgen (Skerra et al., 1994). Gegenüber dem pCANTAB 5E Vektor (Malone, 1994) spielt neben dem milderen Milieu während der Aufreinigung auch der Kostenfaktor eine wichtige Rolle. Die Aufreinigung über das E-*Tag* Peptid (s. II, 2.1, Abb. 5, S. 32) ist an kostspielig erwerbbare Anti-E-*Tag*-Antikörper gebunden, was die Anwendung der hier beschriebenen Produktionsmethode für rekombinante Antikörper im Industriemaßstab begünstigt. Unter Entwicklung eines optimierten und standardisierten Protokolls der Streptavidin-Affinitätschromatographie gelang Schmidt und Skerra (1994a) die schnelle und einfach auszuführende Aufreinigung von verschiedenen Proteinen, u.a. ein funktionelles F_v Antikörperfragment (Kleymann et al., 1995). Zusätzlich erwies sich das Strep-*Tag* nützlich für die Detektion von rekombinanten Proteinen im Westernblot (Schmidt und Skerra, 1993; vgl. auch III, 3.10.1, Abb. 66, S. 149). Die Interaktionen zwischen Streptavidin und dem Strep-*Tag*-Peptid wurden von Schmidt et al. (1996) untersucht. Unterschiedliche Bindungsstärken veranlassten die Generierung einer besseren Peptidsequenz, wobei das Strep-*Tag* II entdeckt wurde. Aufgrund der veränderten Aminosäurezusammensetzung (Schmidt et al., 1996) im Vergleich zum Peptid Strep-*Tag* (SAWRHPQFGG) ist die Anwendung des Strep-*Tag* II nicht ausschließlich auf die Fusion am C-Terminus von Proteinen beschränkt. Das Strep-*Tag* II ist sogar affin gegenüber

Streptavidin, wenn es in der Mitte einer Polypeptidsequenz inseriert ist. In Verbindung mit Streptavidin-Mutanten, die an Chromatographiesäulen immobilisiert waren, verbesserte der Einsatz des Strep-*Tag*s II die Ausführung der Proteinreinigung (Voss und Skerra, 1997).

Die Effektivität der Reinigung wurde sowohl im ELISA als auch im SDS-PAGE überprüft (vgl. III, 2.6, Abb. 51+52, S. 134f). Die Applikation der eluierten Fraktionen im ELISA bestätigte die erfolgreiche Reinigung der F_{ab}-Fragmente aus dem Periplasmaextrakt und zusätzlich deren Funktionalität. Die Präzision der Affinitätschromatographie wurde durch die elektrophoretische Auftrennung der Proteine belegt. Neben den Proteinbanden der F_{ab}-Fragmente waren keine weiteren Proteinbanden zu sehen. Die Leicht- und Schwerketten der eluierten F_{ab}-Fragmente erschienen unter reduzierenden Bedingungen als zwei verschiedene Proteinbanden in äquimolaren Mengen, wie bei Plückthun und Skerra (1989). Nicht-reduzierende Verhältnisse ergaben eine Proteinbande mit der Größe eines F_{ab}-Fragments von ca. 50 kDa (vgl. III, 2.6, Abb. 53, S. 136). Diese Ergebnisse stimmten überein mit den Beobachtungen von Kramer et al. (2001b), die in ihrer Arbeit im Fermenter produzierte F_{ab}-Fragmente über IMAC aufreinigten und ein vergleichbares Ergebnis in der SDS-PAGE Analyse erhielten.

Da die Affinitätsberechnungen in den nachfolgenden BIAcore-Messungen auf Antikörperkonzentrationen basieren, erfolgte die Konzentrationsbestimmung der gereinigten F_{ab}-Fragmente im BCA-Test. Hierfür waren die ersten drei eluierten Fraktionen zusammengefasst und über Ultrafiltration in einer Rührzelle aufkonzentriert worden. Grundsätzlich wird mit diesem Test die Gesamtproteinmenge in einer Lösung bestimmt. Da hier aber die aufgereinigten Fraktionen verwendet wurden, konnte davon ausgegangen werden, daß nur die F_{ab}-Fragmente in der Messung erfaßt wurden. Allerdings ist die Gewißheit über die Funktionalität der Antikörperfragmente nicht unbedingt gegeben. Eine Möglichkeit, die Prozentzahl der funktionellen rekombinanten Antikörper in einer Lösung zu bestimmen, beschrieben Kazemier et al. (1996) und Hock et al. (2001). Hierbei wurden die affinitätsgereinigten rekombinanten Antikörper mit dem entsprechenden an Sepharose gekoppelten Antigen bzw. Hapten inkubiert und die affinitätsgebundenen Proteine über Zentrifigation entfernt. Über spektroskopische Messungen konnten die Proteinkonzentrationen des Überstands, der die inaktiven Antikörperfragmente enthielt,

und der ursprünglichen affinitätsgereinigten Fragmente miteinander verglichen werden. Daraus ergab sich der Prozentsatz der funktionellen Antikörperfragmente in den Lösungen. Die ermittelten Konzentrationen der F_{ab}-Fragmente lagen im Bereich von 6-14 µg/ml nach 20-facher Aufkonzentrierung (vgl. III, 2.6, Tab. 32, S. 134) bei einem Kulturvolumen von 2 l. Die bei Kramer et al. (2001b) und Schiweck und Skerra (1995) über *E. coli* Fermentation erzielten F_{ab}-Konzentrationen waren vergleichbar mit den Konzentrationen in dieser Arbeit. Aus einer 4 l-Fermentation wurden ca. 3 µg/ml gewonnen (Kramer et al., 2001b). Demgegenüber standen 0,2-1 µg/ml aus einer 10 l-Fermentation je nach F_{ab}-Fragment (Schiweck und Skerra, 1995).

Charakterisierung der F_{ab}-Kinetik im BIAcore Biosensor

Die Bindungseigenschaften der F_{ab}-Fragmente zu dem *s*-Triazin Derivat IPR wurden über Oberflächen-Plasmon-Resonanz 8SPR) mittels des BIAcore 2000^{TM} Biosensors untersucht. Da mit diesem Instrument biomolekulare Interaktionen in Realzeit beobachtet werden, kann die Quantifizierung von kinetischen Parametern erfolgen (Karlsson et al., 1991; Malmborg et al., 1992). Folgendes Prinzip wird verfolgt: das Antigen oder ein Antigen-Protein-Komplex wird an der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert; danach fließt der Antikörper kontinuierlich über die Oberfläche (Löfås und Jöhnsson, 1990; Nieba et al., 1996). Die Interaktion wird dann über SPR bestimmt (Liedberg et al., 1983) und als Sensorgramm (vgl. III, 2.7, Abb. 54, S. 137) dargestellt. Das bietet die Möglichkeit, die Kinetik-Parameter für Interaktionen, d.h. die Konstanten der Assoziations (k_a)- und Dissoziationsrate (k_d) und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante ($K_D=k_d/k_a$), zu berechnen.

Die Messung der Interaktionen des immobilisierten IPR-OVA-Konjugats mit den *s*-Triazin-selektiven F_{ab} Varianten ermöglichte die Ermittlung der Affinitätsdaten der F_{ab}-Fragmente zum Beschichtungskonjugat (vgl. III, 2.7, Tab. 33, S. 136). So wurden Dissoziationskonstanten (K_D) von 1,5 x 10^{-8}–1,1 x 10^{-9} M errechnet. Diese Werte liegen in der Größenordnung des K_D-Wertes von 10^{-8} M eines *in vivo* Affinitäts-gereiften IgG-Antikörpers (Winter et al., 1994). Auch Strachan et al. (1998) verwendeten ein immobilisiertes Atrazinderivat zur Ermittlung der Affinitätsdaten von Atrazin-spezifischen rekombinanten Antikörpern (scAb), die sowohl in *E. coli* als auch in transgenen Tabakpflanzen produziert worden waren. Mit den ermittelten Raten der Assoziations (ka)- und Dissoziationsraten (kd) ergaben sich K_D-Werte zwischen 8,8 x 10^{-7}-7,4 x 10^{-8} M. Für weitere Antikörperfragmente (scFv) wurden K_D-Werte von 4,7–7,4 x 10^{-6} M (Mersmann et

al., 1998) und 3,38-8,01 x 10^{-8} M (Hock et al., 2001) mittels eines BIAcore Biosensors gemessen.

Die K_D-Werte der einzelnen IPR F_{ab}-Varianten spiegelten die über evolutionäre Mutation verbesserten Atrazin-Affinitäten der ausgehenden IPR scFv-Fragmente wider. Die 1,8-fache Verbesserung der K_D–Werte von F_{ab} IPR-7 zu F_{ab} IPR-53 befindet sich in etwa in der Größenordnung des 1,4-fach verringerten Testmittelpunkts und der 1,5-fach gesenkten Nachweisgrenze von scFv IPR-53 (Kramer, 2001a). Die nachfolgende molekulare Evolution von IPR-53 zu IPR-23 ergab eine 13,7-fache Reduzierung der K_D, was auch mit der 10,6-fachen bzw. 17-fachen Verringerung der Atrazin-Konzentration in der Bestimmung des Testmittelpunkts und der Nachweisgrenze von IPR-23 angezeigt wurde (Kramer, 2001a). Zusammenfassend kann die 24-fache Verbesserung des K_D-Werts von F_{ab} IPR-7 zu F_{ab} IPR-23 mit der 25-fach verringerten Atrazin-Konzentration der Nachweisgrenze von scFv IPR-23 gleichgesetzt werden. Auch der 15-fach verminderte Testmittelpunkt von scFv IPR-23 liegt weitgehend in diesem Rahmen. Zusätzlich wird dieses Ergebnis von den im Atrazin-ELISA ermittelten Werte der F_{ab}-Varianten (vgl. III, 2.5, Tab. 31, S. 131) bekräftigt. Der 24-fachen Reduzierung des K_D-Wertes von F_{ab} IPR-7 zu F_{ab} IPR-23 steht die 22,4-fache Verbesserung des Testmittelpunkts gegenüber. Die Nachweisgrenze verringerte sich sogar um den Faktor 114,6 im Zusammenhang mit der evolutionären Mutagenese.

Die geringe Veränderung der Dissoziationskonstante von F_{ab} IPR-7 zu F_{ab} IPR-53 ist hauptsächlich auf den gestiegenen k_a-Wert zurückzuführen (vgl. III, 2.7, Tab. 33, S. 136). Im Gegensatz dazu können in der Erhöhung der k_a und die begleitende Verminderung der k_d als Ursachen für die signifikante Verschiebung von K_D des F_{ab}-Klons IPR-53 zu F_{ab} IPR-23 gesehen werden. Das Ergebnis mag auf den ersten Blick verwundern, da verbesserte Antikörperaffinitäten oft mit einer verminderten Dissoziationsrate k_d zusammenhängen. Dennoch ist die Veränderung der ermittelten F_{ab}-Kinetikwerte eine Konsequenz der angewandten Selektionsstrategie in der Mutagenese der scFv-Varianten (Kramer, 2001b). Die Isolation der verbesserten Klone aus den veränderten Antikörpervarianten erfolgte nach den Gesichtspunkten der schnelleren Assoziation und langsameren Dissoziation der Antikörperfragmente zu dem IPR-Derivat.

Die beschriebene **Subklonierung** ermöglicht die Konstruktion von F_{ab}-AK-Fragmenten über Insertion von scFv-variablen Regionen aus dem pCANTAB 5E Phagemid in ein anderes Expressionssystem, pASK99 (Skerra, nicht veröffentlicht). Aufgrund der verwendeten Primer kann diese Klonierungsstrategie auf andere Phagen-*Display*-Systeme übertragen werden. Bereits Kramer et al. (2001b) vollzogen die Umklonierung der variablen Regionen des scFv-Fragments K47H aus pCANTAB 5E in den Vektor pASK85, ein Derivat des Expressionsvektors pASK84 (Skerra, 1994a). Beide Vektoren sind Vorreiter des Expressionssystems pASK99 mit unterschiedlichen Promoter-Sequenzen (*lac* Promoter im pASK84) und Aufreinigungs-*Tag*s (His-*Tag*). Schon Kramer et al. (2001b) nutzten den wirtschaftlichen Vorteil, der mit dem *tet*A Promoter in pASK85 verbunden war. Neben der Kosteneffektivität bezüglich des Induktors Anhydrotetracyclin wies das Expressions- und Reinigungssystem pASK99 mit dem Strep-*Tag* II einen zusätzlichen Vorteil gegenüber pASK85 auf, der das His-*Tag* beinhaltete. Die Streptavidin-Affinitätschromatographie über das Strep-*Tag*-Peptid erfolgt unter physiologischeren Bedingungen im Vergleich zu der His-*Tag* gebundenen IMAC. Weiterhin kann das Strep-*Tag* II zur Detektion im ELISA oder Westernblot ohne Einsatz eines Strep-*Tag*-spezifischen Antikörpers dienen. Darüber hinaus ermöglicht diese Umklonierung der variablen Regionen in pASK99 die Applikation der produzierten Strep-*Tag*-F_{ab}-Fusionsproteine in der Sol-Gel Technologie (Brinker und Scherer, 1990; Turniansky et al., 1996; Bronshtein et al., 1997). Die Affinität zu Streptavidin kann zur Bildung von tetrameren Antikörperkomplexen („*Tetrabodies*“) aus den F_{ab}-Fragmenten und dem vierbindigen Streptavidin genutzt werden (Abb. 69 S. 175). Aufgrund der Größe der *Tetrabodies* könnte das Problem des Auswaschens von Antikörperfragmenten beim Einschluß von rekombinanten Antikörpern im Sol-Gel (Altstein, nicht veröffentlicht) umgangen werden.

Die Charakterisierung der *s*-Triazin selektiven F_{ab}-Fragmente im ELISA und BIAcore bestätigte die korrekte Klonierung und Expression von funktionellen F_{ab}-Antikörperfragmenten in *E. coli*. Neben den verbesserten Bedingungen bei der Produktion wird durch die Umwandlung des scFv- in das F_{ab}-Format die Neigung der scFv-Antikörper zur Dimerisierung, abhängig von pH, Ionenstärke und Antigen-Präsenz (Arndt et al., 1998), umgangen und die Expression von monovalenten F_{ab} ermöglicht.

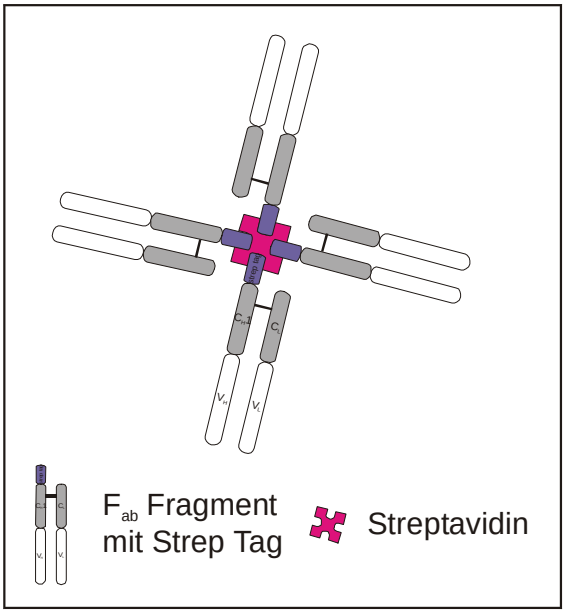


Abbildung 69„Tetrabodies“aus Strep-*Tag*-F_{ab}-Fusionsproteinen und Streptavidin

3 scFv(K47H)-aP Fusionsprotein

Zur Produktion von scFv-aP Fusionsproteinen in *E. coli* wurde ein Vektorsystem konstruiert. Hierzu erfolgte die Verknüpfung des *E. coli* aP-Enzym-codierenden Gens (Schmidt-Dannert, nicht veröffentlicht) mit dem Atrazin-spezifischen scFv(K47H)-Fragment (Kramer und Hock, 1996a) und die Insertion dieses Fusionsgens in den Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994b). Aufgrund der eingesetzten Klonierungsstellen *Sfi*I und *Not*I, die häufig in der rekombinanten AK-Technologie angewendet werden, ist dieses System kompatibel für scFv aus entsprechenden AK-Bibliotheken, bei denen das Phagen-*Display* mit den Restriktionsstellen *Sfi*I/*Not*I verwendet wird. Durch Ein-Schritt-Klonierung der scFv-Fragmente in den modifizierten pASK75 können Fusionsproteine mit einem Markerenzym bereitgestellt werden, das dem Nachweis der Hybrid-Proteine in immunchemischen Verfahren dient. Aufgrund der Umsetzung des Substrats 4-Nitrophenylphosphat durch die aP erfolgt eine Farbreaktion, deren Intensität als Maß für die Enzymaktivität mit Absorptionsmessungen bestimmt wird. Der Einsatz der scFv-aP Konjugate in Immunoassays ermöglicht den Ersatz von konventionell präparierten aP-markierten Antikörpern und beschleunigt den Detektionsprozeß von Analyten durch Ausschluß der Inkubation mit enzymmarkierten Sekundärantikörpern.

Der **Vektor pASK75** wurde als Expressionsvektor gewählt, da er, zusätzlich zu der Signalsequenz des *omp*A-Leaders, den *tet*A-promoter und das Strep-*Tag* besitzt. Sequenzen für die Ampicillin-Resistenz (ß-Lactamase-Gen *bla*) und den Lipoprotein-Transkriptions- terminator t_{lpp}, sowie die Regionen der Einzelstrang-Bakteriophage f1 (f1-IG) und des Replikationsbeginns *ori* sind weitere wichtige Bestandteile des Vektors (s. II, 2.3, Abb. 14, S. 76).

Die *omp*A-Signal-Sequenz ist für die Translokation des rekombinanten Antikörper-Fusionsproteins aus dem Cytoplasma in das Periplasma von *E. coli* zuständig. Die Leader-Sequenz transferiert das Protein durch die innere Bakterienmembran und wird anschließend abgespalten. Durch den Export der Proteine in das Periplasma werden die korrekte Proteinfaltung und die Bildung der Disulfidbrücke von rekombinanten Antikörpern erleichtert und lösliche, funktionelle Antikörper gebildet (Schmidt und Skerra, 1993). Weiterhin ist der Transfer der scFv-aP Fusionsproteine in das *E. coli* Periplasma von Bedeutung, da sich die native alkalische Phosphatase gewöhnlich im Periplasma von *E. coli* unter Bedingung von Phosphat-Armut befindet und enzymatisch inaktiv ist, wenn sie im Cytoplasma zurückbleibt (Derman und Beckwith, 1995). Die Extraktion von funktionellen Fusionsproteinen aus dem periplasmatischen Kompartiment kann über Zell-Lyse durchgeführt werden.

Die Expression von rekombinanten Proteinen in pASK75 wird von dem *tet*A Promoter-System gesteuert, dessen Eigenschaften und Vorteile gegenüber anderen Promoter-Systemen bereits in IV, 2 (S. 164f).

Im Hinblick auf Reinigungstechniken für rekombinante Proteine wurde das Strep-*Tag*, ein Peptid mit neun Aminosäuren, in den Vektor eingebaut (Schmidt und Skerra, 1993, Schmidt und Skerra, 1994a). Aufgrund der spezifischen Bindungsaffinität zu Streptavidin ermöglicht das Strep-*Tag* eine Aufreinigung von bakteriell produzierten, bifunktionellen Proteinen im Ein-Schritt-Verfahren (Skerra et al., 1994; vgl. IV, 2, S. 170f). Auch der Nachweis von C-terminal fusionierten Proteinen kann mit Hilfe eines Streptavidin-Enzym-Konjugats im Westernblot und im ELISA erfolgen (Skerra et al., 1994).

Die **Konstruktion des scFv-aP Fusionsproteins** gliederte sich in zwei Schritte, die Klonierung des aP codierenden Gens in den Expressionsvektors pASK75 und die Insertion von scFv(K47H) an das 5'-Ende der aP in den Vektor. Die Arbeit mit dem rekombinanten Fusionsprotein beinhaltete die Expression, die Aufreinigung über Affinitätschromatographie und die Analyse sowohl im ELISA als auch im Westernblot.

Die **Aufbereitung von pASK75** für die Klonierung umfasste die Konservierung und Vermehrung des Plasmids durch Transformation in den *E. coli* Stamm K12-JM83 (Yanisch-Perron et al., 1985), die anschließende Plasmidisolation und den RV des Plamids an den für die Klonierung bestimmten Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Sal*I und *Eco*47III.

RV des Expressionsvektors pASK75

Die gleichen Pufferbedingungen der Enzyme *Sal*I und *Eco*47III für einen optimalen RV ermöglichten die Durchführung eines Doppel-RV, was nicht nur eine zeitliche Verkürzung der Reaktion bedingte, sondern auch mögliche DNA-Verluste bei einem sequentiellen Verdau mit PCI-Extraktion (d.h. Entfernung der Puffersalze aus dem Reaktionsgemisch des ersten Enzyms für exakte RV-Bedingungen des zweiten Enzyms) verhinderte.
Die Optimierung des RV durch verschiedene Inkubationszeiten diente der Absicherung des vollständig durchgeführten Verdaus, um inkompatible Enden bei der Ligation zu vermeiden. Allerdings zeigte die Auswertung des RV (vgl. III, 3.2, Abb. 57, S. 140) keine Differenzen bei den unterschiedlichen Inkubationszeiten. Der RV brachte DNA-Mengen von 450-500 ng pro Bande hervor, die für den Ligationsansatz mit ca. 60 ng/µl nach Abzug von ca. 20 % Aufreinigungsverlust ausreichten.

Für die **Klonierung des aP-Gens** wurde der aP-tragende Klonierungsvektor pPHOA4 (Schmidt-Dannert, nicht veröffentlicht) im *E. coli* Stamm DH5α^+ vermehrt, das aP-Gen über PCR isoliert und nach dem RV mit *Sal*I und *Eco*47III in den Expressionsvektor pASK75 inseriert. Das rekombinante Plasmid wurde über Elektroporation in den *E. coli* Stamm K12-JM83 (Yanisch-Perron et al., 1985) eingeschleust. Der an die Transformation anschließende RV des isolierten Plasmids diente zur Überprüfung der Ligation und der Länge des entstandenen Vektors pASK75/aP.

PCR des aP-Gens

Die beiden Primer für die PCR des aP-Gens boten mit ihrer identischen Länge von 33 Basen, den kaum unterschiedlichen GC-Gehalten um 50 % und den Annealingtemperaturen mit einem Unterschied von 2 ºC optimale Ausgangsbedingungen für eine Amplifikation.

Die gewählte Annealingtemperatur von 61 °C unterstützte die spezifische Bindungsfähigkeit beider Primer an die DNA und bot dadurch keine Möglichkeit für das Entstehen von Amplifikaten anderer Sequenzabschnitte. Die eingesetzte DNA-Menge von 1 ng erwies sich als ausreichend für die Amplifikation des aP-Gens mit 1,3 kb. In der PCR-Kontrolle ohne DNA war kein Amplifikationsprodukt entstanden (vgl. III. 3.3, Abb. 58 Gelspur (1), S. 141), was auf eine Amplifikation des aP-Gens hindeutete. Die unter optimalen Reaktionsbedingungen ausgeführte PCR erbrachte ein Amplifikat mit richtiger Länge und ausreichender Menge (vgl. III, 3.3, Abb. 58 S. 141), so daß nach Isolation aus dem Gel, dem RV mit den beiden Enzymen und erneuter Isolation noch genügend Material zur Ligation zur Verfügung stand.

RV des amplifizierten aP-Fragments

Wie zuvor bei pASK75 wurde auch bei dem amplifizierten aP-Fragment ein Doppel-RV mit den Enzymen *Sal*I und *Eco*47III vollzogen. Grundsätzlich gestaltet sich ein RV bei PCR-Fragmenten schwieriger als bei Plasmiden, da die Anlagerung der Restriktionsenzyme an ihre Erkennungssequenzen durch die geringe Anzahl der Basenpaare an den Enden des Fragments erschwert ist. Möglichkeiten, dieses Problem zu reduzieren, sind die Verlängerung der Verdauzeiten oder die Erhöhung der Enzymkonzentrationen (Sambrook et al., 1989). Allerdings ergibt sich hierbei die Gefahr eines Überverdaus verursacht durch “star activity” der Enzyme. “Star activity” ist die veränderte Spezifität der Restriktionsenzyme gegenüber ihren Erkennungssequenzen aufgrund von extrem veränderten Reaktionsbedingungen. Die Enzyme können dann Sequenzen spalten, die ihren definierten Schnittstellen ähnlich aber nicht identisch sind (New England Biolabs, 1997). Die Inkubationszeit des Doppel-RV wurde um 3 h auf 6 h gegenüber des Plasmidverdaus erhöht.

Da in dem RV des aP-Amplifikats nur ca. 8 Basenpaare pro Seite abgetrennt wurden, war eine exakte Längenüberprüfung des Fragments per Agarose-Gel schwierig durchzuführen. Es war nur eine Abschätzung anhand des ungeschnittenen Amplifikats möglich (vgl. III, 3.3, Abb. 58+59, S. 141f).

Ligation von aP und pASK75

Bei der Ligation des 2-fach geschnittenen aP-Fragments mit dem ebenso präparierten pASK75-Vektor waren erschwerte Bedingungen gegeben, da zwei unterschiedlich gestaltete Termini vorlagen. Das Enzym *Sal*I hinterläßt "sticky ends", *Eco*47III schneidet gerade und produziert "blunt ends". In diesem Fall sind eine hohe Konzentration an "blunt end"-Termini und eine Erhöhung der Ligasemenge erforderlich (Sambrook et al., 1989). Das Auftreten eines großen Hintergrunds von nicht-rekombinanten Klonen nach der Transformation oder das Abspalten der Restriktionsstellen an den Verbindungen zwischen Vektor-und Insert-DNA waren bei dieser Ligation zu erwarten.
Die Ligation wurde mit der erhöhten Ligasemenge von 5 Weiss-Units und einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 bei der exakten Temperatur von 16 °C durchgeführt. Zusammen mit den optimalen RV-Bedingungen bei den einzelnen DNA-Fragmenten waren die möglichen Ursachen für eine nicht funktionierende Ligation weitgehend ausgeschlossen. Allerdings stehen Ligation und Transformation bezüglich des positiven Klonierungsergebnisses in enger Verbindung. Denn Ursachen für eine nicht funktionierende Transformation sind neben inkompetenten Bakterien und nicht exakt eingehaltenen Bedingungen der jeweiligen Transformationsmethode auch nicht ligierte, lineare Plasmide. Diese Möglichkeit sollte mit der mitgeführten Ligationskontrolle ohne Insert ausgeschlossen werden.

Transformation von pASK75/aP

Über Elektroporation wurden kompetente K12-JM83 (Yanisch-Perron et al., 1985) Bakterien mit dem rekombinanten Plasmid pASK75/aP transformiert. Die Transformationsrate (10^6 transformierte Zellen/µg DNA) lag unter der maximalen Transformationsrate [10^9-10^{10} Zellen/µg zirkuläre Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989)]. Dies ist möglicherweise auf die selbst präparierten Bakterien als Wirtszellen für die Transformation zurückzuführen, die im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Bakterien weniger kompetent sein können. Zusätzlich war die Transformation von einem großen Hintergrund begleitet (vgl. III, 3.4, Tab. 34, S. 142), dessen Ursache in der Religation des 2-fach geschnittenen Vektors lag. Die Wahrscheinlichkeit einer Religation war aufgrund der beiden Termini "sticky end" und "blunt end" recht hoch, da sich der DNA-Strang mit dem hervorstehenden Ende der *Sal*I-Schnittstelle an das stumpfe Ende der *Eco*47III-Stelle binden und der andere Strang komplementär dazu synthetisiert werden könnte. Nach

Plasmidanalyse von einigen Klonen konnte das richtige Ergebnis bei einem Klon mittels RV nachgewiesen werden (vgl. III, 3.4, Abb. 61, S. 144). Die Gelanalyse des RV von pASK75/aP zum Nachweis des aP-Inserts gab Aufschluß über die Längen der einzelnen DNA-Stücke, die mit den errechneten Fragmentgrößen des linearisierten pASK75/aP-Vektors von 4589 bp, des aP-Gens von 1332 bp und des 2-fach geschnittenen pASK75-Vektors von 3257 bp übereinstimmen. Die erfolgreiche Klonierung des aP-Gens in pASK75 wurde durch die Sequenzanalyse von pASK75/aP bestätigt.
Bereits Hengsakul und Cass (1997) klonierten eine *E. coli* alkalische Phosphatase in den Vektor pASK75, um ein Fusionsprotein aus der aP und dem im Vektor integrierten Peptid Strep-*Tag* (s. II, 2.3., Abb. 14, S. 76) zu erhalten. Aufgrund der *in frame* Klonierung konnte in dieser Arbeit auf eine andere Methode zum Nachweis des Klonierungserfolges zurückgegriffen werden. Sie verwendeten für den Nachweis des rekombinanten Plasmids mit dem aP-Gen das Chromogen BCIP (5-bromo-4-chloroindolyl-Phosphat) im LB-Amp-Agar, das durch Umsetzung der aP eine Blaufärbung der gesuchten Kolonien hervorrief. Dies bewies, daß das aP-Fragment im Leserahmen eingefügt und in der aktiven Form exprimiert worden war.

Die Intention dieser Arbeit war die Klonierung von scFv-aP-Strep-*Tag* im korrekten Leserahmen. Bei diesem Zwischenschritt, der Insertion des aP-Gens in pASK75, war keine *in frame*-Klonierung vorgesehen. Somit war die Expression des Fusionsproteins aP-Strep-*Tag* nicht möglich. Durch Einfügen des aP-Gens in pASK75 über die Restriktionsstellen *Sal*I und *Eco*47III, die in der MCS des Vektors lokalisiert sind, wurden die acht Basen zwischen den Erkennungssequenzen von *Sal*I und *Eco*47III in der MCS entfernt. Vom Ende der *omp*A-Sequenz bis zum Beginn des aP-Gens verblieben 44 Basen (siehe Abb. 70, S. 181). Dies bedeutete, daß das aP-Enzym bei der Triplett-Abtastung der m-RNA nicht in codierender Triplettfolge gelesen werden konnte und somit keine Expression des Enzyms möglich war. Das Stop-Codon TGA am Ende der *omp*A-Signal-Sequenz ist ein weiterer Grund, weshalb die Expression der funktionellen aP nicht erfolgen konnte.
Durch die Fusion eines Proteins an den N-Terminus der aP in den Vektor pASK75 können mit Hilfe von zusätzlich eingefügten Basenpaaren und geeigneten Restriktionsstellen der Leserahmen des Fusionsproteins hergestellt und das Stop-Codon in ein Aminosäure-codierendes Triplett umgewandelt werden. Somit ist die exakte Triplett-Abtastung und die daraus folgernde Expression des funktionellen Enzyms möglich.

*Stu*I *Bsa*I *EcoR*I *Sst*I *Kpn*I *Sma*I *BamH*I *Xho*I

CTACCGTAGCGCAGGCCTGAGACCAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCTCGAG

ompA End

*Sal*I ***aP 1332 bp*** *Eco47*III

GTCGAC- - - - - - - - - - - - >**AGCGCT**TGGCGTCACCCGCAGTTCGGTGGTTAATAAGCTT

Strep-*Tag*:SerAlaTrpArgHisProGlnPheGlyGlyEnd

Abbildung 70 MCS von pASK75 mit klonierter aP-Sequenz

Unter diesen Gesichtspunkten (Einfügen zusätzlicher Basenpaare, Verwendung der geeigneten Restriktionsstellen) erfolgte die Klonierung des scFv-Fragments in den modifizierten Vektor pASK75/aP. Das scFv-Gen K47H wurde über PCR mit *Stu*I/*Sal*I enthaltenden Primern amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem *Stu*I/*Sal*I linearisierten pASK75/aP ligiert. *E. coli* K12-JM83 (Yanisch-Perron et al., 1985) wurden mit dem resultierenden Vektor pscFv-aP transformiert und die isolierten Plasmide auf Insertion des scFv-aP Fusionsproteins untersucht.

Amplifikation und RV von scFv

Das Atrazin-spezifische scFv(K47H)-Fragment (Kramer und Hock, 1996a) wurde zur Insertion in pASK75/aP verwendet, um das Fusionsprotein scFv-aP zu konstruieren. Die Synthese des scFv-Antikörpers wurde im Rahmen der Umweltanalytik von *s*-Triazin-Herbiziden mit Hilfe des Phagemidvektors pCANTAB 5E (s. II, 2.1, Abb. 5, S. 32) von Amersham durchgeführt (Kramer und Hock, 1996a).

In der vorliegenden Arbeit wurde das scFv-Fragment über PCR mit den speziell synthetisierten Primern aus dem scFv(K47H)-tragenden Phagemid pCANTAB 5E isoliert. Die Primer enthielten die Klonierungs-relevanten Restriktionsstellen *Stu*I und *Sal*I. Während der PCR-Reaktion wurden neben des scFv-Gens auch die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Sfi*I und *Not*I am 5'- bzw. 3'-Ende amplifiziert. Diese Schnittstellen sind Bestandteil von pCANTAB 5E (s. II, 2.1, Abb. 5, S. 32) und liegen weder in der scFv-codierenden Sequenz noch auf dem aP-Gen. Zusätzlich zu den Restriktionsstellen trugen die eingesetzten Primer jeweils die Base T. Damit konnten die

Basentripletts vervollständigt und der Leserahmen des Fusionsproteins hergestellt werden. Für die beiden Primer errechnete sich eine Annealingtemperatur von 61 °C, allerdings ergaben sich erst bei einer Temperatur von 50 °C scFv-Amplifikationsprodukte (vgl. III, 3.5, Abb. 62, S. 145). Eine mögliche Ursache dafür könnte der unterschiedliche GC-Gehalt von 60 % für den Forward-Primer und 71 % für den Backward-Primer sein, der die Hybridisierung der Primer an die DNA beeinflußt. Die Amplifikationsprodukte wiesen die korrekte Länge des scFv-Gens im Bereich von 800 bp auf.

Das amplifizierte scFv-Gen K47H wurde an den angefügten Restriktionsstellen *Stu*I und *Sal*I geschnitten. Da die beiden Enzyme unterschiedliche Pufferbedingungen für 100 % Funktionstüchtigkeit benötigen, wurde ein sequentieller Verdau mit Aufstockung der Puffersubstanzen durchgeführt. Im Vergleich zur *Stu*I/*Sal*I-Präparation des Vektors pASK75/aP wurden beim scFv-Fragment die Inkubationszeiten bei beiden Enzymen von 3 h auf 6 h erhöht, da die Restriktionsenzyme an den kurzen DNA-Stücken weniger leicht greifen können. Es ergaben sich nach Isolation der aufgetrennten und geschnittenen scFv-Fragmente 25 ng DNA/µl, was zusammen mit den 44 ng/µl DNA des *Stu*I/*Sal*I-präparierten pASK75/aP zur Ligation ausreichte.

Ligation von scFv und pASK75/aP und Transformation von pscFvap

Die *Stu*I/*Sal*I-präparierten DNA-Fragmente wurde in einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 zu dem Plasmid pscFv(K47H)aP ligiert. Die Elektroporation von K12-JM83 Bakterien (Yanisch-Perron et al., 1985) mit der PCI- und EtOH-gereinigten DNA des rekombinanten Plasmids pscFv(K47H)aP ergab ein eindeutiges Transformationsergebnis ohne Hintergrund, da weder Religation noch Fremdplasmide auftraten. Dies wurde durch die Ligationskontrolle ohne Insert bzw. die Transformationskontrolle ohne DNA überprüft. Die Transformationsrate von 4,8 x 10^6 Zellen/µg DNA lag nicht im Transformationsoptimum der Elektroporation von 10^9-10^{10} Zellen/µg DNA, was sowohl auf die Länge des zu transformierenden Plasmids (ca. 5,2 kb) als auch auf die selbst präparierten elektro-kompetenten Bakterienzellen zurückzuführen wäre.

An die Konstruktion des Plasmids pscFvaP folgte die **Analyse des rekombinanten Fusionsproteins scFv(K47H)-aP** mit Expression und *Screening*, Aufreinigung und Funktionalitätsanalyse im ELISA und Westernblot. Die Sequenzierung des rekombinanten scFv-aP-Gens stellte die abschließende Kontrolle des Klonierungsproduktes dar.

Expression und *Screening*

Das Fusionsprotein scFv(K47H)-aP wurde in dem *E. coli* Bakterienstamm K12-JM83 (Yanisch-Perron et al., 1985) exprimiert. In pASK75 steht die Expressionskassette unter der transkriptionellen Kontrolle des *tet*A Promoters. Der Promoter wird durch Zugabe des Induktors Anhydrotetracyclin aktiviert. Aufgrund der streng regulierten Expression durch den Repressor *tet*R können Toxizitätsprobleme, die durch zusätzliche nicht-induzierte Expression von Antikörperfragmenten während der bakteriellen Wachstumsphase verursacht werden, in der Zelle vermieden werden. Der Zelltod vor der eigentlichen Induktion wird durch die Anordnung des *tet*R codierenden Gens im Vektor umgangen. Das *tet* Repressor-Gen ist am 3'-Ende des kontinuierlich exprimierten Gens der ß-Lactamase (bla) lokalisiert (s. II, 2.3, Abb. 14, S. 76) und somit von der *tet* Kontrollregion in pASK75 entkoppelt. Diese Konstruktion resultiert in einer transkriptionellen Fusion (Skerra, 1994b) und bewirkt die Repression des Promoters, die erst durch Zugabe des Induktors gelöst wird. Die Toxizität von sekretierten Antikörperfragmente in *E. coli* bewertet den Grad der Repression eines Promotersystems, basierend auf der Lebensfähigkeit und das Wachstumsverhalten der transformierten Bakterien. Skerra (1994) untersuchte deshalb verschiedene *E. coli* Stämme auf die Eignung als Expressionswirt. Es zeigte sich, daß das *tet*A Promoter-System weitgehend unabhänging vom Bakterienstamm eingesetzt werden kann. Dies ermöglicht die Wahl des Bakterienstammes hinsichtlich der optimierten Wachstumscharakteristika in der Fermentation mit hoher Zelldichte.

Das Zellwachstum von sechzehn selektierten Klonen für die Expression des rekombinanten scFv(K47H)-aP Fusionsproteins erfolgte in LB-Amp-Medium. Durch Zugabe von Anhydrotetracyclin wurde die Induktion ausgelöst. Aufgrund des *omp*A Leaders in pASK75 (s. II, 2.3, Abb. 14, S. 76) wurde das Fusionsprotein in das Periplasma des Bakteriums translokiert. Der Transport des Antikörperfragments in das Periplasma von *E. coli* ist funktionell äquivalent mit dem Transport eines Proteins in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) einer eukaryotischen Zelle. Die oxidierenden Bedingungen im Periplasma ermöglichen die korrekte Proteinfaltung und die Ausbildung der Disulfidbrücken der Antikörper. Zusätzlich sind die Proteine im Periplasma geringeren Abbauprozessen ausgesetzt, da weniger Proteasen als im Cytoplasma vorhanden sind (Plückthun und Skerra, 1989). Die Isolation der löslichen Fusionsproteine aus dem Periplasma erfolgte über Zell-Lyse.

Die periplasmatischen Zellfraktionen der einzelnen Klone wurden auf ihren Gehalt an scFv(K47H)-aP mittels eines indirekten, kompetitiven Atrazin-ELISA getestet. Alle

ausgewählten Klone banden an das Beschichtungskonjugat IPR-OVA und ließen sich durch Atrazin verdrängen, wobei die vier Klone 4/1, 4/2, 5/1 und 5/2 mit den größten Absorptionsunterschieden (vgl. III, 3.8, Abb. 65, S. 148) für genauere Analysen verwendet wurden. Die niedrigen Maximalabsorptionen sind auf den geringen und ungereinigten Gehalt an Fusionsproteinen in den Periplasmaextrakten zurückzuführen, was wiederum in den kleinen Kulturvolumina für die Expression begründet war. Die abnehmenden Absorptionen bei den höheren Verdünnungen der Periplasmaextrakte spiegelten den niedrigen Anteil an scFv(K47H)-aP wider.

Eine Plasmidanalyse der vier Klone gab Aufschluß über die Länge des rekombinanten Vektors pscFvaP. Der durchgeführte RV mit den Restriktionsenzymen *Stu*I und *Eco*47III teilte das Plasmid in das 2-fach geschnittene Vektorfragment mit ca. 3,2 kb und in das Insert scFv(K47H)-aP mit ca. 2 kb (vgl. III, 3.8, Abb. 66, S. 149), was sich aus 750-800 bp des scFv-Fragments und 1,3 kb des aP-Gens zusammensetzte. Die Sequenzierung der vier Klone ergab eine Identität der Sequenzen und bestätigte die korrekte Klonierung des scFv(K47H)-aP Fusionsproteins in pASK75 (vgl. VII, S. 217). Aufgrund der gewählten Schnittstellen und der zusätzlich eingefügten Basen T und A lag nun das Fusionsprotein im Leserahmen (Abb. 71) und konnte somit funktionell exprimiert werden.

Abbildung 71 MCS von pASK75 mit scFv und aP

Aufreinigung von scFv(K47H)-aP über Affinitätschromatographie

Zur Isolierung des exprimierten Fusionsproteins scFv(K47H)-aP aus der periplasmatischen Zellfraktion wurden zwei unterschiedliche Methoden der Affinitätschromatographie eingesetzt. Aufgrund des Streptavidin-bindenden Peptids Strep-*Tag*, das am 3'-Ende des scFv-aP Fusionsgens im Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994b) gekoppelt war, konnte die Aufreinigung über **Streptavidinaffinitätschromatographie** (Schmidt und Skerra, 1994a) erfolgen. Das aus neun Aminosäuren (AWRHPQFGG) bestehende Peptid weist eine spezifische Bindung zu Streptavidin auf, und wurde aufgrund dieser Eigenschaft über Selektion aus einer rekombinanten Fusionspeptid-Bibliothek gewonnen (Schmidt und Skerra, 1993). Der Einsatz von derartigen kurzen Affinitäts-*Tag*s in der rekombinanten Produktion und Reinigung von Proteinen bietet eine umfangreiche Anwendung in der Biotechnologie (Nygren et al., 1994). An den C-Terminus von bakteriell produzierten Proteinen gekoppelt ermöglicht das Strep-*Tag* nicht nur die Detektion dieser Proteine durch Streptavidin-Enzym-Konjugate sondern auch die Affinitätsreinigung im Ein-Schritt-Verfahren mittels Streptavidin-immobilisierten Säulen (Schmidt und Skerra, 1994a). Diese Art der Reinigung erlaubt im Vergleich zu anderen Affinitätschromatographien [z.B. Antigen/Hapten-Affinitätschromatographie, Metall-Affinitätschromatographie (IMAC)] eine Isolation von Antikörperfragmenten unter physiologischeren Pufferbedingungen (Skerra et al., 1994). Das biochemische Reagenz Streptavidin ist sowohl in einer Vielzahl von Konjugaten als auch immobilisiert an Agarose kommerziell erhältlich. Die Bindung zum Peptid Strep-*Tag* verhält sich kompetitiv mit natürlichen Liganden von Streptavidin, wie z.B. Biotin oder verwandte Verbindungen. Röntgenstrahl-kristallographische Analysen und Bindungsmessungen mit dem Strep-*Tag* (Schmidt et al., 1996) bestätigten, daß das Peptid an dieselbe Oberflächentasche von Streptavidin bindet, an der Biotin komplexiert wird. Auch zeigte sich, daß die Anwendung des Strep-*Tag*s in Fusion mit rekombinanten Proteinen auf das Carboxylende dieser Proteine begrenzt ist. Der erfolgreiche Einsatz dieser Aufreinigungsmethode wurde für verschiedene rekombinante Proteine demonstriert, einschließlich Fv-Antikörperfragmente (Schmidt und Skerra, 1993; Ostermeier et al., 1995), das Bilin-bindende Protein (Schmidt und Skerra, 1994b), das Retinol-bindende Protein (Müller und Skerra, 1994) als auch Cystatin, Cytochrom b_{562} und Azurin (Schmidt und Skerra, 1994a). Die Aufreinigung erfolgte mit Sepharose-Säulen, an die das rekombinante core Streptavidin gekoppelt war. Aufgrund der schwankenden Eignung von verschiedenen kommerziellen Streptavidin-Agarose-Präparaten wurde ein Verfahren zur Produktion des rekombinanten Core-Streptavidins in *E. coli* entwickelt. Die verkürzte

Form des Streptavidins erwies sich als geeignetster Kopplungspartner mit Sepharose in der Affinitätschromatographie von Strep-*Tag*-Fusionsproteinen (Schmidt und Skerra, 1994a).
Der Periplasmaextrakt wurde über die Säulen gepumpt und das gebundene scFv(K47H)-aP Fusionsprotein nach gründlichem Waschen mit Laufpuffer mittels 2,5 mM Desthiobiotin von den Streptavidin-Bindungsplätzen eluiert. Aufgrund der irreversiblen Belegung der Streptavidin-Bindungsstellen durch Biotin oder Diaminobiotin wurde an deren Stelle Desthiobiotin zur Elution eingesetzt (Schmidt und Skerra, 1994a), um die Regeneration der Säule mit der HABA-Lösung zu erwirken. Die aufgefangenen, eluierten Fraktionen wurden zusammen mit dem Säulendurchlauf im ELISA und über SDS-PAGE auf ihren Gehalt an scFv-aP überprüft. Weder im ELISA noch im Proteingel konnten Fusionsproteine in den Fraktionen detektiert werden. Lediglich der Säulendurchlauf wies positive Ergebnisse in Form von Proteinbanden des Periplasmaextraktes in der Gelanalyse und Verdrängungsreaktion im ELISA auf. Daraus wurde gefolgert, daß keine Bindung des Strep-*Tag*s an Streptavidin stattgefunden hat. Die Möglichkeit der fehlenden Strep-*Tag*-Sequenz als Ursache für die nicht erfolgte Aufreinigung war wegen des korrekten Ergebnisses in der Sequenzanalyse auszuschließen. Auch ein nicht funktionelles Peptid konnte nicht als Erklärung herangezogen werden, da die Charakterisierung des Fusionsproteins im Westernblot (vgl. III, 3.10.1, Abb. 67, S. 151) über das Strep-*Tag* erfolgte. Hengsakul und Cass (1997) reinigten das Fusionsprotein aus einer aP von *E. coli* und dem Strep-*Tag* über Streptavidin-Affinitätschromatographie auf. Der Nachweis der gereinigten Proteine im SDS-PAGE verlief positiv.
Die Faltung der alkalischen Phosphatase bzw. die Struktur als Dimer könnte als Ursache für die nichterfolgte Aufreinigung des scFv-aP-Fusionsproteins gesehen werden. Die kristalline Struktur der dimeren alkalischen Phosphatase von *E. coli* mit Threonin und Lysin am N- bzw. C-Terminus (Abb. 72, S. 187) verdeutlicht die Position des scFv-Fragments am N-Terminus und des Strep-*Tag*s am C-Terminus der aP. Aufgrund der nahen Lage der Termini zueinander wäre eine Übereinanderlagerung der Strukturen von scFv und Strep-*Tag* sehr wahrscheinlich. Das kurze Peptid aus neun Aminosäuren könnte von dem Antikörperprotein mit der Folge eingeschlossen werden, nicht an exponierter Stelle für die Bindung an Streptavidin zu stehen.

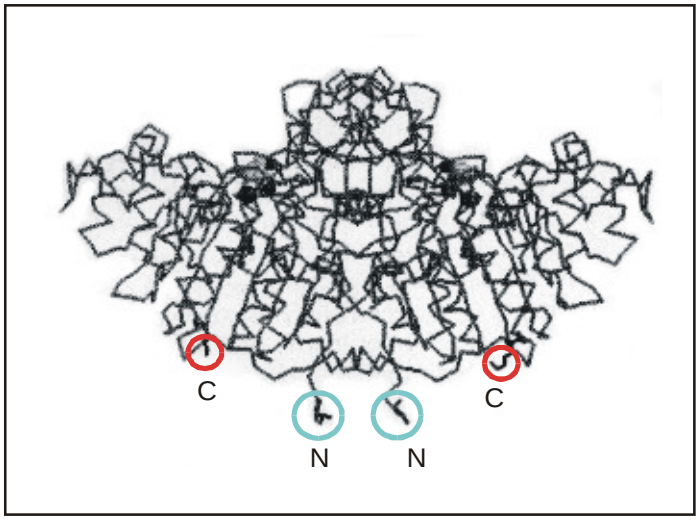


Abbildung 72 Kristalline Struktur der dimerischen alkalischen Phosphatase (Quelle: Kim und Wyckhoff, 1991)

Die andere Möglichkeit der Aufreinigung des scFv(K47H)-aP Proteins war die **Hapten-Affinitätschromatographie**. Hierbei wurde die Atrazin-Bindungseigenschaft des AK-Fragments scFv(K47H) genutzt. Der Periplasmaextrakt wurde über die mit dem Atrazin-Derivat IPR immobilisierte Sepharose-Säule gegeben, zur Bindung inkubiert und die filtrierten Fusionsproteine wurden anschließend in saurem Milieu eluiert. Auch hier war die Analyse der eluierten Fraktionen im ELISA bis auf den Säulendurchlauf negativ. Die Möglichkeit, daß das scFv-Fragment nicht funktionell sein könnte, war nicht gegeben, da über die Analyse im ELISA bereits die Bifunktionalität des Fusionsproteins nachgewiesen wurde. D.h., daß sowohl scFv als auch aP im Fusionsprotein ihre Funktionalität behalten hatten. Wie Skerra et al. (1994) beschrieben, herrschen in der Antigen-Affinitätschromatographie saure und sogar denaturierende Konditionen während der Elution. Vor allem bezüglich der Konformationsstabilität von Fv- und scFv-Fragmenten sind diese Bedingungen äußerst unerwünscht. Auch hier wurde ein saurer Elutionspuffer eingesetzt, unter dessen Einfluß die Konformation des scFv-Antikörpers und somit die Bindungseigenschaft verändert wurde. Auch wäre eine Abspaltung der aP vom scFv aufgrund der vorherrschenden Pufferbedingungen während der Aufreinigung denkbar, was die Detektion im anschließenden ELISA nicht mehr möglich macht.

Eine Umklonierung der Fusionspartner könnte möglicherweise das Problem bei der Aufreinigung lösen. Die Stelle des Strep-*Tag*s im Fusionsprodukt ist auf den C-Terminus (Schmidt et al., 1996) festgelegt. Somit verbleibt nur die Möglichkeit, das 3'-Ende des aP-

Gens mit dem 5'-Ende des scFv-Fragments zu fusionieren. Dies könnte die Strukturprobleme des Fusionsproteins umgehen, da der N-Terminus der aP nun ungekoppelt wäre. Allerdings ist auch bei dieser Anordnung der Fragmente ungewiß, ob eine sterische Hinderung durch die aP ausbleibt. Ein Polypeptid-Linker zwischen scFv und aP wäre als Alternative denkbar. Dadurch könnte eine bessere Faltung des Gesamtproteins bei der Expression bewirkt und die Überlagerung der Einzelproteine eventuell vermieden werden. Bei der Synthese eines Fusionsproteins aus F_{ab}-Antikörperfragmenten und der alkalischen Phosphatase erwies sich ein Linker aus 15 Aminosäuren zwischen der Fd- und der aP-Region als effizientes Hilfsmittel für die Anlagerung des Fd-Teils an das Leichtkettenfragment im Periplasma von *E. coli* (Weiss und Orfanoudakis, 1994). Zusätzlich soll dieses Peptid die molekulare Flexibilität eines bifunktionalen Komplexes unterstützen.

Aufreinigungen von scFv-aP-Fusionsproteinen über das Hexahistidin-Peptid His-*Tag* verliefen bei Kerschbaumer et al. (1997) und Suzuki et al. (1997) positiv, trotz identischer Fusionsanordnung der einzelnen Gene. Auch die optimale Abstimmung der Reaktionsbedingungen bei der Streptavidin-Affinitätschromatographie kann nicht angezweifelt werden, da mit dem Strep-*Tag* II eindeutige Ergebnisse in der Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* erzielt wurden (vgl. III, 2.6, Abb. 52+53, S. 135f). Die verwendeten Materialien waren identisch bei der Aufreinigung über das Strep-*Tag* (Schmidt und Skerra, 1994a) oder das Strep-*Tag* II (Voss und Skerra, 1997).

Proteincharakterisierung von scFv(K47H)-aP

Dennoch war die **Charakterisierung des Fusionsproteins mit Hilfe des Westernblots** ohne Aufreinigung erfolgreich (vgl. III, 3.10.1, Abb. 67, S. 151). In den unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden des Periplasmaextrakts konnte das scFv-aP-Strep-*Tag*-Fusionsprodukt über immunchemische Färbung mit einem Streptavidin-POD-Konjugat auf der Nitrozellulose-Membran detektiert werden. Die Größenbestimmung von 75 kDa entsprach dem Fusionsprotein scFv(K47H)-aP inklusive dem Peptid Strep-*Tag*.

Neben dem Funktionalitätsnachweis des Strep-*Tag*s im Westernblot konnte sowohl die Funktionalität der aP als auch des scFv-Fragments des Fusionsproteins bei der **Ermittlung der Nachweisgrenze und des Testmittelpunkts** im ELISA bestätigt werden (vgl. III, 3.10.2, Abb. 67, S. 152). Durch Ultrafiltration war eine Aufkonzentrierung und Trennung

des Fusionsproteins von kleineren Proteinen aus dem Periplasmaextrakt möglich, was sich in der Durchführung des ELISA im eingesetzten Verdünnungsgrad des Extrakts und in den verbesserten OD-Werten gegenüber dem *Screening* (vgl. III, 3.8, S. 147f) wiederspiegelte. Die OD-Messungen im Stundenintervall verdeutlichten, daß die Absorption der aP über die gemessenen 7 h anstieg und sich dabei weder die Nachweisgrenze noch der 50 % B/B_0-Wert des scFv-Antikörpers entscheidend veränderten (vgl. III, 3.10.2, Abb. 68, S. 152). Die Testmittelpunkte der einzelnen Kalibrationskurven lagen zwischen 54-60 µg/l Atrazin, die Nachweisgrenzen bei 29-31 µg/l Atrazin. Die entsprechenden Werte des unfusionierten scFv K47H waren bei 0,25 µg/l und 29 µg/l Atrazin für die Nachweisgrenze bzw. den Testmittelpunkt bestimmt worden (Kramer et al., 2001a). Die Unterschiede in der Sensitivität lassen sich durch die Applikation des ungereinigten Periplasmaextrakts im ELISA erklären.

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität von scFv(K47H)-aP unterstreicht die beibehaltene Funktionalität von scFv K47H im Fusionskonstrukt. Die Kreuzreaktivitäten von scFv(K47H)-aP gegenüber acht *s*-Triazinen (vgl. III, 3.10.3, Tab. 36, S. 152) zeigten keine signifikante Abweichung zu der Affinität von scFv K47H zu den gewählten Substanzen (Kramer und Hock, 1996a).

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Konstruktion eines Vektorsystems zur Produktion von scFv-Antikörper-aP Fusionsproteinen in *E. coli* als schnelles Detektionsmittel im ELISA. Bereits Kerschbaumer et al. (1996) entwickelten ein derartiges System unter Verwendung eines anderen Expressionsvektors, pDAP2. Als zu analysierende Proteine wurden scFv-Antikörper-Fragmente an den N-Terminus des Enzyms gehängt. Die Expression wurde durch den *lac* Promoter gesteuert. Der *pel*B Leader war zuständig für die Sekretion des Produkts in den periplasmatischen Raum von *E. coli*. An dem C-Terminus der alkalischen Phosphatase befand sich das His-*Tag*, das der Aufreinigung des Fusionsproteins im Ein-Schritt-Verfahren mit der Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) diente. Es entstanden bifunktionelle Fusionsproteine, die erfolgreich im ELISA auf Enzymaktivität und spezifische Antigen-Bindungsaffinität getestet wurden. Im Gegensatz dazu verwendeten Gandecha et al. (1994) einen Vektor mit dem T7 Q10 Promoter und dem *omp*A Leader für die Expression von scFv-aP-Fusionsproteinen ohne Peptid-codierende Region für die Aufreinigung.

Das generierte Vektorsystem pscFvaP ist aufgrund der inserierten Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I, die in der rekombinanten Antikörpertechnologie weit verbreitet sind, kompatibel mit entsprechenden Phagen-*Display*-Vektoren wie z.B. die pCANTAB-Serie (McCafferty et al., 1994), pCOCK (Clackson et al., 1991) oder pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991). Durch Ein-Schritt-Klonierung ist ein einfacher Austausch von scFv-Fragmenten aus Phagen-*Display* abgeleiteten Antikörperbibliotheken und die Produktion von weiteren scFv-aP-Konjugaten mit diesem rekombinanten Kassettensystem in *E. coli* möglich. Die Fusionsproteine ersetzen konventionell präparierte aP-konjugierte Antikörper und ermöglichen die schnelle Detektion von Analyten ohne Zugabe von Enzym-konjugierten Sekundärantikörpern im ELISA.
Die Vorteile rekombinanter Fusionsenzyme gegenüber der chemischen Kopplung liegen im 1:1-Verhältnis der Gene und in der definierten Fusionstelle des aP-Gens, wodurch weniger Probleme bei der Funktionalität im Vergleich zum chemisch synthetisierten Enzymtracer auftreten.

Auch wäre eine Anwendung dieses Vektorsystem im Dipstick-Format nach Giersch (1993) denkbar. Die Teststreifen mit dem immobolisierten Hapten-OVA-Konjugat werden in die Analyten-Proben getaucht. Durch Zugabe des Fusionsproteins erfolgt die Bindung zwischen Antikörper und Analyt bzw. immobilisiertem Hapten, je nach Konzentration des Analyten in der zu testenden Probe. Nach kurzer Inkubation und einem Waschschritt werden die Teststreifen in die Substratlösung gegeben, um eine Farbreaktion zu bewirken. Hiermit wäre ein schneller und einfacher Nachweis von Atrazin in Gewässerproben auch außerhalb des Labors durchführbar.

Neben der Anwendung des Kassettensystems pscFvaP auf verschiedene Analyten kann auch die alkalische Phosphatase gegen andere Enzyme (z.B. ß-Galactosidase, Peroxidase) ausgetauscht werden. Einen interessanten Vertreter stellt das *Green Fluorescent Protein* (GFP) dar. Aoki et al. (1997) entwickelten ein Fluoreszenz-Immunoassay (FIA), indem sie das Fusionsprotein aus dem Antigen NSE (Neuron-spezifische Enolase) und dem Enzym GFP aus *Aequorea victoria* als Modell für ein GFP-konjugiertes Protein bzw. Antigen verwendeten. Aufgrund der Fluoreszenz von GFP unter Anregung mit langwelligem UV- oder blauem Licht waren für diesen Test keine weiteren Chemikalien nötig. Es wäre vorstellbar, dieses fluoreszierende Enzym auch an den scFv-Antikörper gegen Atrazin zu fusionieren.

Weitere Antikörper-Enzym-Konjugate wurden bereits entwickelt, die nach Expression in *E. coli* sowohl die Aktivität der aP als auch die Antigen-Bindungsaktivität behielten. Suzuki et al. (1997) berichteten von einem rekombinanten scFv(NP)-PhoA-Fusionsprotein, das Enzym-konjugierte Sekundärantikörper in biologischen Tests ersetzt, die auf dem Immun-Nachweis von NP (4-hydroy-3-nitrophenyl Acetyl) basieren. Das Expressionssystem beinhaltete den T7 Promoter, die *pel*B Leader-Sequenz für die Translokation und das His-*Tag* für die Reinigung der Proteine. Ein ähnliches Fusionsprotein aus dem scFv(FRP5)-Antikörper und der alkalischen Phosphatase unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers Mab FRP5 gegen den menschlichen erbB-2-Rezeptor konstruierten Wels et al. (1992). Durch Zugabe eines Substrats für die aP konnte dieses Hybrid direkt an Tumorzellen nachgewiesen werden. Ducancel et al. (1993) veröffentlichten die Präparation des Fusionsproteins [$F(ab)_2$-PhoA] aus der alkalische Phosphatase und dem F_{ab}-Fragment des spezifischen IgG2a monoklonalen Antikörpers Mα2-3 gegen Schlangengift. Die Klonierung erfolgte unter Trennung der Fd (V_H-C_{H1})- und der V_L-C_L-Domäne, indem der Fd-Bereich zwischen die Codons +6 und +7 des PhoA-Gens gesetzt und die Leichtkette hinten angehängt wurden. Weiss et al. (1994) produzierten das Fusionsprotein F_{ab}-PhoA aus dem F_{ab}-Fragment und der aP unter Verwendung des IgG1 monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen Tumor-Nekrose-Faktor α. Alle konstruierten Antikörper-Enzym-Konjugate behielten die Antigen-Bindungsfähigkeit und die enzymatische Aktivität.

In dieser Arbeit wurde über die Konstruktion des Expressionssystems pscFvaP für die Produktion von rekombinanten Antikörper-Enzym-Konjugaten berichtet. Der Einbau der Restriktionsstellen *Sfi*I und *Not*I in das System ermöglicht die Insertion über Ein-Schritt-Klonierung von scFv Fragmenten, die aus kompatiblen rekombinanten Antikörperbibliotheken abgeleitet wurden. Die exprimierten scFv(K47H)-aP Fusionsproteine waren bifunktionell, d.h. sie behielten sowohl die enzymatische Aktivität der aP als auch die Atrazin-spezifische Affinität des scFv K47H. Die Applikation von scFv(K47H)-aP im ELISA verdeutlichte die Vereinfachung des Immunoassays durch Ersatz von enzymmarkierten Sekundärantikörpern.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Arten von Antikörperfragmenten mit unterschiedlichen Zielsetzungen für die Umweltanalytik generiert. Die Intention war, die Vorteile der rekombinanten Antikörpertechnologie zu nutzen. Dies beinhaltete die Synthese von Antikörperfragmenten mit der kleinsten Erkennungseinheit und der geringsten Molekülgröße für kleine Zielmoleküle, die verbesserte Produktion von rekombinanten Antikörpern, auch in größerem Maßstab, und die Modifikation von Antikörperfragmenten zu bifunktionellen Antikörpern mittels Fusionspartnern.

Zum Nachweis der niedermolekularen Pyrethroid-Insektizide wurde die Synthese von *single-chain* Fv (scFv)-Fragmenten aus den variablen Regionen etablierter Pyrethroid-spezifischer Hybridomzellinien durchgeführt. Das Phagen-*Display* wurde unter Anwendung des Phagemid-Vektors pCANTAB 5E für die Selektion spezifischer scFv-Fragmente eingesetzt. Isolierte scFv-Antikörper, die im *Screening* spezifisch an das Ovalbumin (OVA)-konjugierte Derivat des Pyrethroids Permethrin (t-PMS) banden, wurden sequenziert und mit der Sequenz des konstruierten scFv(PAI-B_3Ag81) der Myelom-Zellinie verglichen, die bei der Fusion zu o.g. Hybridomzellinien eingesetzt wurde. Die Sequenz des Binders 4H wurde einem Pyrethroid-spezifischen scFv-Fragment zugeordnet. Bei der Datenbankanalyse von 4H zeigte sich ein Opal Stop-Codon in der V_L-Region, welches über gerichtete Punktmutation entfernt werden konnte. Die nachfolgenden ELISA-Analysen ergaben, daß das mutierte scFv 4H/31 an das Beschichtungskonjugat t-PMS-OVA band, sich aber nicht durch die Pyrethroide Bioallethrin, Allethrin oder S-Bioalltehrin verdrängen lies.

Im Hinblick auf eine verbesserte Produktion wurden *s*-Triazin-selektive F_{ab}-Antikörperfragmente über Subklonierung der entsprechenden scFv-Antikörper in den Expressionsvektor pASK99 konstruiert. Die in der Klonierung eingesetzten scFv-Fragmente IPR-7, IPR-53 und IPR-23 stammten aus einer *s*-Triazin-selektiven Antikörperbibliothek, wobei die Klone IPR-53 und IPR-23 über evolutionäre Mutation aus dem Antikörper IPR-7 gewonnen wurden. Die F_{ab}-Fragmente wurden unter der Transkriptionskontrolle des *tet*A Promoter-Systems exprimiert, dessen Induzierbarkeit mit Anhydrotetracyclin und dessen exakte Regulierung eine kostengünstige Produktion von Antikörperfragmenten in *E. coli* in großem Maßstab ohne Toxizitätserscheinungen oder Zelltod ermöglicht. Die Streptavidin-Affinitätsreinigung über das Strep-*Tag* II erleichterte

die Isolation der sekretierten, rekombinanten Antikörper aus dem Periplasma von *E. coli*. Die generierten F_{ab} Fragmente wurden im ELISA und BIAcore 2000^{TM} Biosensor charakterisiert. Die ermittelten Assoziations- und Dissoziationskonstanten der verschiedenen F_{ab}-Fragmente spiegelten die Affinitäts- und Sensitivitätssteigerung der entsprechenden evolutionär modifizierten scFv-Fragmente wider. Die Dissoziationskonstante von F_{ab} IPR-23 (K_D = 1,12 x 10^{-9} M) war um den Faktor 24 gegenüber F_{ab} IPR-7 (K_D = 2,73 x 10^{-8} M) verbessert. Die Affinitätsveränderung zeigte sich auch in der 22-fachen Reduktion des Testmittelpunkts von F_{ab} IPR-7 (50 %B/B_0 = 60,5 µg/l) und F_{ab} IPR-23 (50 %B/B_0 = 2,7 µg/l) im entsprechenden Atrazin-ELISA.

Die Modifikation von rekombinanten Antikörpern zu bifunktionellen Molekülen wurde in der Konstruktion eines Fusionsproteins aus scFv und der alkalische Phosphatase (aP) aus *E. coli* beschrieben. Der hierfür eingesetzte Expressionsvektor pASK75 wurde durch aufeinanderfolgende Insertion der kodierenden Sequenzen der aP und des Atrazin-spezifischen scFv K47H modifiziert, um eine Produktion von aP-markierten scFv-Fragmenten zu ermöglichen. Die eingefügten Klonierungsstellen *Sfi*I und *Not*I gewährleisten die Ein-Schritt-Klonierung von scFv-Fragmenten aus kompatiblen Antikörperbibliotheken in den Expressionsvektor. Die Bifunktionalität des exprimierten Fusionsproteins scFv-aP wurde im ELISA bestätigt, da sowohl die Affinität zum Analyten als auch die Enzymaktivität gegeben war. Auch die gemessenen Kreuzreaktivitäten zu anderen *s*-Triazinen waren mit denen des ursprünglichen scFv K47H gleichzusetzen. So bietet das konstruierte System pscFvaP die Möglichkeit, scFv-aP-Konjugate in *E. coli* herzustellen und konventionell präparierte aP-markierte Antikörper in Immunoassays zu ersetzen. Durch den Einsatz der Fusionsproteine kann eine einfachere Detektion von Analyten erfolgen, da sich die Inkubation mit Enzym-markierten Sekundärantikörpern im Testverfahren erübrigt.

VI Literatur

ABERGEL, C., TIPPER, J.P., PADLAN, E.A. (1994) Structural significance of sequence variability in antibody complementary-determining regions. Res. Immunol. *145*, 49-53.

ALCOCER, M.J.C., DOYEN, C., LEE, H.A., MORGAN, M.R.A. (2000) Functional scFv antibody sequences against the organophosphorus pesticide chlorpyrifos. J. Agric. Food Chem. *48*, 335-337.

ALZARI, P.M., LASCOMBE, M.-B., POLJAK, R.J. (1988) Three-dimensional structure of antibodies. Ann. Rev. Immunol. *6*, 555-580.

AOKI, T., KANETA, M., ONAGI, H. (1997) A simple and rapid immunoassay system using green fluorescent protein tag. Journal of Immunoassay *18* (4), 321-333.

APPEL, K.E., GERICKE, S. (1993) Zur Neurotoxizität und Toxikokinetik von Pyrethroiden. Bundesgesundheitsblatt *6*, 219-228.

ARNDT, K.M., MÜLLER, K.M., PLÜCKTHUN, A. (1998) Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. Biochemistry *37*, 12918-12926.

BARBAS, III, C.F., KANG, A.S., LERNER, R.A., BENKOVIC, S.J. (1991) Assembly of combinatorila antibody libraries on phage surfaces.: the gene III site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *88*, 7978-7982.

BARDWELL; J.C.A., McGOVERN, K., BECKWITH, J. (1991) Identification of a protein required for disfuldide bond formation in vivo. Cell *67*, 581-589.

BELL, C.W., ROBERTS, V.A., SCHOLTHOF, K.-B.G., ZHANG, G., KARU, A.E. (1995) Recombinant antibodies to diuron. A model for the phenylurea combining site. In: Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technology. J.O. Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong (Eds.), ACS Symposium Series 586, Washington DC, 50-71.

BENITO, A., VALERO, F., LAFUENTE, J. (1993): Uses of ß-galactosidase tag in on-line monitoring production of fusion proteins and gene expression in Escherichia coli. Enzyme Microb. Technol. 15, 66-71.

BERSON, S.A., YALOW, R.S. (1959) Recent studies on insulin-binding antibodies. Ann. N.Y. Acad. Sci. *82*, 338-344.

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

BIRD, R., HARDMAN, K., JACOBSON, J., JOHNSON, S., KAUFMAN, B., LEE, S., LEE, T., POPE, S., RIORDAN, G., WHITLOW, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. Science 242, 423-426.

BLASS, W. (1990) Residues of pyrethroid insecticides and their analytical determination. In. Chemistry of Plant protection 3. Haug, G., Hoffmann, H. (Eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong.

BRADBURY, A. (1998) Diversity by design (The international Business Communications Second Display Technologies Congress) (Boston, Massachusetts, USA; August 4-5, 1997) Trends Biotechnol. *16*, 99-102.

BRADBURY; A., RUBERTI, F., WERGE, T., AMATI, V., DI LUZIO, A., GONFLONI, S., HOOGENBOOM, H., PICCIOLI, P., BIOCCA, S., CATTANEO, A. (1995) The cloning of hybridoma V regions for their ectopic expression in intracellular and intercellular immunization. In: Antibody engineering. 2. Edition. C.A.K. Borrebaeck (Ed.) Oxford University Press, New York, Oxford.

BRADSHAW, R.A., CANCEDDA, F., ERICSSON; L.H. (1981): Amino acid sequence of Escherichia coli alkaline phosphatase. Proc. Natl Acad. Sci. USA *78*, 3473-3477.

BRÉGÉGÈRE, F., BEDOUELLE, H. (1992): Expression, exportation et purification de fragments d`anticorps fusionnés à la proteine affine du maltose d`Escherichia coli. C.R. Acad. Sci. Paris, t. 314, Série III, 527-532.

BREITLING, F., DÜBEL, S., SEEHAUS, T., KLEWINGHAUS, I., LITTLE, M. (1991) A surface expresson vector for antibody screening. Gene *104*, 147-153.

BREITLING, F., DÜBEL, S. (1997) Rekombinante Antikörper. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin.

BRINKER, C.J., SCHERER, G.W. (1990) Sol-Gel Science: the Physics and chemistry of sol-gel processing. Academic Press: Boston, MA.

BRONSHTEIN, A., AHARONSON, N., AVNIR, D., TURNIANSKY, A., ALTSTEIN; M. (1997) Sol-Gel Matrixes Doped with atrazine antibidies: atrazine binding properties. Chem. Mater. *9*, 2632-2639.

BROWN, T.A. (1990) Gene cloning: an introduction. 2. Edition, Chapman und Hall, London, 4-26.

BURNET, F.M. (1959) The clonal selection theory of acquired immunity. The Abraham Flexner Lectures. Nashville, Vanderbilt University Press.

BYRNE, F.R., GRANT, S.D., PORTER, A.J., HARRIS, W.J. (1996) Cloning, expression and characterization of a single-chain antibody specific for the herbicide atrazine. Food Agric. Immunol. 8, 19-29.

CENTENO, E.R., JOHNSON, W.J., SEHON, A.H**.** (1970) Antibodies to two common pesticides, DDT and Malathion. Int. Arch. Allergy *37*, 1-13.

CHANG, C.N., KUANG, W.J., CHEN, E.Y. (1986): Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of Escherichia coli. Gene *44*, 121-125.

CHESTER, K.A., BEGENT, R.H.J., ROBSON, L., KEEP, P., PEDLEY, B-R., BODEN, J.A., BOXER, G., GRREN, A., WINTER, G., COCHET, O., HAWKINS, R.E. (1994) Phage libraries for generation of clinically useful antibodies. Lancet *343*, 455-456.

CHIU, Y.-W., CHEN, R., LI, O.X., KARU, A.E. (2000) Derivation and properties of recombinant Fab Ab to coplanar polychlorinated biphenyls. J. Agric. Food Chem. *48*, 2614-2624.

CLACKSON, T., HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. Nature *352*, 624-628.

COURTNEY, B.C., WILLIAMS, K.C., SCHLAGER, J.J. (1995) A phage display vector with improved stability, applicability and ease of manipulation. Gene 165, 139-140.

CRISSMAN, J.W., SMITH, G.P. (1984) GeneIII-protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. Virology 132, 445-455.

CUMMINGS, P.J., HOOPER, N.E., ROWLAND, S.S. (1998) Generation of recombinant bacteriophage antibody library to *Mycobacterium tuberculosis*. Hybridoma *17* (2) 151-156.

DANKWARDT, A., PULLEN, S., RAUCHALLES, S., KRAMER, K., JUST, F., HOCK, B., HOFMANN, R., SCHEWES, R. und MAIDL, F.X. (1995) Atrazine residues in soil two years after the atrazine ban – A comparison of enzyme immunoassay with HPLC. Anal. Lett. *28*, 621-634.

DANKWARDT, A., PULLEN, S., HOCK, B. (1997) Immunoassays: applications for the aquatic environment. In: Microscale testing in aquatic Toxicology. P.G. Wells, K. Lee und C. Blaise (Eds.). CRC Press, Washington DC, 13-29.

DAUGHERTY P.S., MARK, O.J., BRENT, I.L., GEORGIOU, G. (1999) Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. Prot. Eng. *12* (7), 613-621.

DERMAN, A.I., BECKWITH, J. (1995) *Escherichia coli* alkaline phophatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. J Bacteriol., 3764-3770.

DESPLANCQ, D., KING, D.J., LAWSON, A.D.G., MOUNTAIN, A. (1994) Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumor-binding antibody B72.3. Prot. Eng. *7*, 1027-1033.

DUCANCEL, F., GILLET, D., CARRIER, A. (1993) Recombinant colorimetric antibodies: construction and characterisation of a bifunctional F(ab)"/alkaline phosphatase conjugate produced in *Escherichia coli*. Bio/Technology *11*, 601-605.

DÜBEL, S., BREITLING, F., FUCHS, P., ZEWE, M., GOTTER, S., MOLDENHAUER, G., LITTLE, M. (1994) Isolation of IgG antibody Fv DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymetrase chain reaction with a simple set of primers. J. Imm. Methods *175*, 89-95.

DÜBEL, S., BREITLING, F., KONTERMANN, R. (1995): Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). J Imm. Methods 178 (2), 201-209.

EBEL, S., KAMM, K. (1983) Statistische Definition der Bestimmungsgrenze. Fresenius J. Anal. Chem. *316*, 382-385.

EDUARD, W.; HEEDERIK, D. (1998) Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments. Am. Indust. Hygiene Ass. J. *59* , 113-127.

ENGELHARDT, O., GRABHERR, R., HIMMLER, R., RÜKER, F. (1994) Two-step cloning of antibody variable domains in a phage display vector. BioTechniques *17,* 44-46

FISCHER-SCHERL, T., VEESER, A., HOFFMANN, R.W., KUHNHAUSER, C., NEGELE, R.D., EWRINGHAM, T. (1991) Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (Oncorynchus-mykiss.). Arch. Environm. Cont. Toxixol. *20*, 454-461.

FREUND, C., ROSS, A., GUTH, B., PLÜCKTHUN, A., HOLAK, T.A. (1993) Characterization of the linker peptide of the single chain Fv fragment of an antibody by NMR spectroscopy. FEBS Lett. *320*, 97-100.

GANDECHA, A., OWEN, M.R.L., COCKBURN, W. (1992) Production and secretion of a bifunctional staphylococcal protein A: antiphytochrome single-chain F_V fusion protein in *Escherichia coli*. Gene *122*, 361-365.

GANDECHA, A., OWEN, M.R.L., COCKBURN, W. (1994) Antigen detection using recombinant, bifunctional single-chain F_v fusion proteins synthesised in *Escherichia coli*. Prot. Expr. Purif. *5*, 385-390.

GARRETT, S.D., APPLEFORD, D.J.A., WYATT, G.M., LEE, H.A., MORGAN, M.R.A. (1997) Production of a recombinant anti-Parathion antibody (scFv); stability in methanolic food extracts and comparison to an anti-parathion monoclonal antibody. J. Agric. Food Chem. *45*, 4183-4189.

GEORGIOU, G., STATHOPOULOS, C., DAUGHERTY, P.S., NAYAK, A.R., IVERSON, B.L., CURTISS; R., III (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. Nature Biotechnol. *15*, 29-34.

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

GIERSCH, T., KRAMER, K., HOCK, B. (1993) Optimization of a monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of the herbicide terbuthylazine. Sci. Total Environ. *132* (2-3): 435-48.

GRAHAM, B., PORTER, A.J.R., HARRIS, W. (1995) Cloning, expression and characterization of a single-chain antibody fragment to the herbicide paraquat. J. Chem. Technol. Biotechnol. *63* (3), 279-289.

GRANT, S.D., PORTER, A.J., Harris, W.J. (1999) Comparative sensitivity of immunoassays for haptens using monomeric and dimeric antibody fragments. J. Agric. Food Chem. *47*, 340-345.

GRIFFITHS, A.D., HOOGENBOOM, H.R. (1993) Protein Engineering of antibody molecules for prophylactic and therapeutic applications in man. Clark, M. (Ed.) Academic Titles, Nottingham, U.K., 45-64.

GUZZELLA, L., DePAOLIS, A., BARTONE, C., POZZONI, F., GIULIANO, G. (1996) Migration of pesticide residues from agricultural soil to groundwater. Int. J. Environ. Anal. Chem. *65*, 261-275.

HAAS, G.J.; GUARDIA, E.J. (1968) Production of antibodies against insecticide-protein conjugates. Proc. Soc. Experim. Biol. Med. *129*, 546-551.

HAGE, D. (1999) Immunoassays. Anal. Chem. 71, 294-204.

HALL, C.J., O'BRIEN, G.M., WEBB, S.R.,(1997) Display technology for environmental analysis. American Chem. Soc., 22-37.

HARRIS; B. (1999) Exploiting antibody-based technologies to manage environmental pollution. TIBTECH *17*, 290-296.

HARRISON, R.O., GOODROW, M.H., HAMMOCK, B.D. (1991) Competitive inhibition ELISA for the s-triazine herbicides: assay optimization and antibody characterisation. J. Agric. Food Chem. *39*, 122-128.

HEEGAARD, N.H.H., KENNEDY, R.T. (1999) Identification, quantitation, and characterization of biomolecules by capillary electrophoretic analysis of binding interactions. Electrophoresis *20*, 3122-3133.

HENGSAKUL, M., CASS, A.E.G. (1997) Alkaline phosphatase-Strep tag fusion protein binding to streptavidin: resonant mirror studies. J. Mol. Biol. *266*, 621-632.

HENNION, M.C.; BARCELO, D. (1998) Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. Anal. Chim. Acta *362*, 3-34.

HILDEBRAND, R. (1992) Das Super-Gift. Vital *11*, 34-35.

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

HOCK, B., SEIFERT, M., KRAMER, K. (2001) Engineering receptors and antibodies for biosensors. Biosens. Bioelect. Im Druck.

HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D., JOHNSON, D.J., CHISWELL, P., HUDSON, P., WINTER, G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucl. Acid. Res. *19*, 4133-4137.

HORTON, R.M., HUNT, H.D., HO, S.N., PULLEN, J.K., PEASE, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene *77*, 61-68.

HUSTON, J.S., GEORGE, A.J.T., TAI, M.-S., McCARTNEY, J.E., JIN, D., SEGAL, D.M., KECK, P., OPPERMANN, H. (1995) Single-chain Fv design and production by preparative folding. Antibody Engineering, 2. Edition, Borrebaeck, C.A.K.; Oxford University Press, Oxford, 185.

HUSTON, J.S., LEVINSON, D., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M.S., NOVOTNY, J., MARGOLIES, M.N., RIDGE, R.J., BRUCCOLERI, R.E., HABER, E., CREA, R., OPPERMAN, H. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of a specific activity in an anti-digoxin single.chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *85*, 5879-5883.

JACKSON, R.H., McCAFFERTY, J., JOHNSON, K.S., POPE, A.R., ROBERTS, A.J., CHISWELL, D.J., CLACKSON, T.P., GRIFFITHS, A.D., HOOGENBOOM, H.R., WINTER, G. (1992) Protein engineering: a practicasl approach. Rees, A.R., Sternberg, M.J., Wetze, R. (Eds.). IRL Press, Oxford, U.K., 277-301.

JOHANSEN, L.K., ALBRECHTSEN, B., ANDERSON, H:W:, ENGBERG, J. (1995) pFab60: a new, efficient vector for expression of antibody Fab fragments displayed on phage. Prot. Eng. *8*, 1063-1067.

JONES, S.T, BENDING, M.M. (1991) Rapid PCR-cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions. Bio/Technology *9*, 88-89.

JUNG, F., GEE, S.J., HARRISON, R.O., GOODROW, M.H., KARU, A.E., BRAUN, A.L., LI, Q.X., HAMMOCK, B.D. (1989) Use of immunochemical techniques for the analysis of pesticides. Pestic. Sci. *26*, 303-317.

KABAT, E.A., WU, T.T., PERRY, H., GOTTESMAN, K.S., FOELLER, C. (1991) Sequences of proteins of immunology interest. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

KANG, A.S., BARBAS, C.F., JANDA, K.D., BENKOVIC, S.J., LERNER, R.A. (1991) Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *88*, 4363-4366.

KAPLAN, W., HÜSLER, P., KLUMP, H. (1997): Conformational stability of pGEX-expressed Schistosoma japonicum gluthadione S-transferase: a detoxification enzyme and fusion protein affinity tag. Prot. Sci. 6, 399-406.

KARLSSON, R., MICHAELSSON, A., MATSSON, L. (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. J. Immunol. Methods *145*, 229-240.

KARU, A.E., HARRISON, R.O., SCHMIDT, D.J., CLARKSON, C.E., GRASSMAN, J., GOODROW, M.H., LUCAS, A., HAMMOCK, B.D., VAN EMON, J.M., WHITE, R.J. (1991) Monoclonal immunoassay of triazine herbicides-development and implementation. Immunoassay for Trace Chemical Analysis, ACS Symposium Series *451*, 59-77.

KARU, A.E., SCHOLTHOF, K.-B.G., ZHANG, G., BELL, C.W. (1994) Recombinant antibodies to small analytes and prospects for deriving them from synthetic combinatorial libraries. Food Agric. Immunol. *6*, 277-286.

KAZEMIER, B., DE HAARD, H., BOENDER, P., VAN GEMEN, B., HOOGENBOOM, H. (1996) Determination of active single chain antibody concentrations in crude periplasmic fractions. J. Immunol. Methods *194*, 201-209.

KERSCHBAUMER, R.J., HIRSCHL, S., SCHWAGER, C. (1996) pDAP2: a vector for construction of alkaline phosphatase fusion proteins. Immunotechnology *2*, 145-150.

KERSCHBAUMER, R.J., HIRSCHL, S., KAUFMANN, A., IBL., M., KOENIG, R., HIMMLER, G. (1997) Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Anal. Biochem. *249*, 219-227.

KETTLEBOROUGH, C.A., ANSELL, K.H., ALLEN, R.W., BENDIG, M.M. (1993) Optimization of primers for cloning libraries of mouse immunoglobulin genes using the polymerase chain reaction. Eur. J. Immunol. *23*, 206-211.

KIM, E.E., WYCKHOFF, H.W. (1991) Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two metal ion catalysis. J. Mol. Biol. *218* (2), 449-464.

KLEYMANN, G., OSTERMEIER, C., LUDWIG, B., SKERRA, A., MICHEL, H. (1995) Engineered F_V fragments as a tool for one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes. Bio/Technology*13* (2), 155-160.

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

KNAPPIK, A., GE, L., HONEGGER, A., PACK, P., FISCHER, M., WELLNHOFER, G., HOESS, A., WÖLLE, J., PLÜCKTHUN, A. und VIRNEKÄS, B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J. Mol. Biol. *296*, 57-86.

KRAMER, K. (1998) Synthesis of pesticide-specific single-chain F_V utilizing the recombinant phage antibody system (RPAS, Pharmacia). A detailed protocol. Analytical Letters *31* (1), 67-92.

KRAMER, K. (2001a) Synthesis of a group-selective antibody library against haptens. J. of Immunol. Meth. Akzeptiert**.**

KRAMER, K. (2001b) Evolutionary affinity and selectivity optimization of a pesticide-selective antibody utilizing a hapten-selective immunoglobulin repertoire. Environ. Sci. Technol. Eingereicht.

KRAMER, K., HOCK, B. (1995) Rekombinante Antikörper in der Umweltanalytik. Lebensmittel- & Biotechnologie *2*, 49-55.

KRAMER, K., HOCK, B. (1996a) Recombinant Single-chain Antibodies against *s*-Triazines. Food Agricult. Immunol. *8*, 97-109.

KRAMER, K., HOCK, B. (1996b) Recombinant antibodies for pesticide immunoanalysis. American. Chem. Soc. *38*, 471-484.

KRAMER, K., FIEDLER, M., SKERRA, A., HOCK, B. (2001a) A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5E into pASK85 permits the economical production of F_{ab} fragments and effects improved recombinant protein stability. Biosen. Bioelect. Akzeptiert.

KRAMER, K., LEPSCHY, J., HOCK, B. (2001b) Long-term monitoring of atrazine contamination in soil by ELISA. J. of AOAC Int**.** *84*, 150-155.

KREBBER, A., BORNHAUSER, S., BURMESTER, J., HONEGGER, A., WILLUDA, J., BOSSHARD, H.R., PLÜCKTHUN, A. (1997) Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. J. Immunol. Meth. *201*, 35-55.

KROSS, B.C., SELIM, M.I., HALLBERG, G.R., BRUNER, D.R., CHERRYHOLMES, K. (1992) Pesticide contamination of private well water, a growing rural health concern. Environ. Internat. *18*, 231-241.

KUNKEL, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *82,* 488-492.

KUNKEL, T.A., ROBERTS, J.D., ZAKOUR, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Methods Enzymol. *154*, 367-382.

LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID, R.D. (2001) High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast Pichia pastoris. J. Immunol. Meth. In Druck.

LARRICK, J.W., DANIELSSON, L., BRENNER, C.A.M ABRAHAMSON, M., FRY, K.E., BORREBAECK, C.A.K. (1989) Rapid cloning of rearranged genes from hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. *160,* 1250-1256.

LEE, H.A., WYATT, G., GARRETT, S.D., YANGUELA, M.C., MPRGAN, M.R.A. (1995) Recombinant antibodies against haptenic mycotoxins. Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies. Nelson, J.O., Karu, A.E., Wong, R.B. (Eds.) ACS Symposium Series 586, American Chemical Society: Washington, DC, 22-30.

LEE, N., HOLTZAPPLE, C.K., STANKER, L.H. (1998a) Cloning, expression and characterization of recombinant Fab antibodies against dioxin. J. Agric. Food Chem. *46*, 3381-3388.

LEE, N., McADAM, P., SKERRIT, J.H. (1998b) Development of immunoassays for type II synthetic pyrethroids. 1. Hapten design and application to heterologous and homologous assays. J. Agric. Food Chem. *46*, 520-534.

LEFRANC, M.P., GIUDICELLI, V., GINESTOUX, C., BODMER, J., MULLER, W., BONTROP, R., LEMAITRE, M., MALIK, A., BARBIE, V., CHAUME, D. (1999) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucl. Acid. Res. *27*, 209-212.

LI, Y., COCKBURN, W., KILPATRICK, J., WHITELAM, G.C. (1999) Selection of rabbit single-chain Fv fragments against the herbicide atrazine using a new phage display system. Food and Agricult. Immunol. *11*, 5-17.

LIEDBERG, B., NYLANDER, C., LUNSTRÖM, I. (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensoring. Sensors Actuators *4*, 299-304.

LONGSTAFF, M., NEWELL, C.A., BOONSTRA, B., STRACHAN, G., LEARMONTH, D., HARRIS, W.J., PORTER, A.J., HAMILTON, W.D.O. (1998) Expression and characterisation of single-chain antibody fragments produced in transgenic plants against the organic herbicides atrazine and paraquat. Biochimica et Biophysica Acta *1381*, 147-160.

LOPEZ-AVILA, V., CHARAN, C., VAN EMON, J.M. (1996) Quick determination of pesticiedes in foods by SFE-ELISA. Food Test. Anal. *2*, 35-37.

LÖFÅS, S., JÖHNSSON, B. (1990) A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. J. Chem. Soc. Chem. Commun. *21*, 1526-1528

LYDY, M.J., CARTER, D.S., CRAWFORD, C.G. (1996) Comparison of gas chromatography/mass spectrometry and immunoassay techniques on concentrations of atrazine in storm runoff. Arch. Environ. Contam. Toxicol. *31*, 378-385.

MALMBORG, A.-C., MICHAELSSON, A., OHLIN, M., JANSSON, B., BORREBAECK, C.A.K. (1992) Real time analysis of antibody-antigen reaction kinetics. Scand. J. Immunol. *35*, 643-650.

MALONE, J.A. (1994) pCANTAB 5E: A vector designed for the expression of antibody F variable regions as phage-displayed or soluble single-chain proteins (scFv). Direct submission, Pharmacia Biotech Inc.

MANCLÚS, J.J., PRIMO, J., MONTOYA, A. (1996) Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 1. Monoclonal antibody production and immunoassay design. J. Agric. Food Chem. *44*, 4052-4062.

MARKLAND, W., ROBERTS, B.L., SAXENA; M.J., GUTERMAN, S.K., LADNER, R.C. (1991) Design, construction and function of a multicopy display vector using fusions to the major coat protein of bacteriophage M13. Gene *109*, 13-19.

MARKS, J.D., TRISTEM, M., KARPAS, A., WINTER, G. (1991) Ologonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family specific oligonucleotide probes. Eur. J. Immunol. *21*, 985-991.

MARKS, J.D., HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G. (1992) Molecular evolution of proteins on filamentous phage. J. Biol. Chem. *267* (23) 16007-16010.

McCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G., CHISWELL, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature *34*, 552-554.

McCAFFERTY, J., FITZGERALD, K.J., EARNSHAW, J., CHISWELL; D.J., LINK, J., SMITH, R., KENTEN, J. (1994) Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. Appl. Biochem. Biotechnol. *47*, 157-173.

MEISNER, L.F., ROLOFF, B.D., BELLUCK, D.A. (1993) In vitro effects of N-Nitrosoatrazine on chromosome breakage. Arch. Environm. Cont. Toxicol. *24*, 108-112.

MEISTER, R.T. (1996) Farm Chemicals handbook ’96. Meister Publishing, Willoughby, OH.

MERSMANN, M., SCHMIDT, A., TESAR, M., SCHÖNEBERG; A., WELSCHOF, M., KIPRIYANOV, S., TERNESS, P., LITTLE, M., PFIZENMAIER, K., MOOSMAYER, D. (1998) Monitoring of scFv selected by phage display using detection of scFv-pIII fusion proteins in a microtiter scale assay. J. Immun. Meth. *220*, 51-58.

MITCHELL; J.M., GRIFFITH, M.W., McEWEN, S.A., McNAB, W.B.; Yee, A.J. (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. J. Food Protect. *61*, 742-756.

MORSY, M.A., IBRAHIM, A.A. und HEWEDI, M.M. (1996) Detection of Dieldrin by enzyme-linked immunosorbent assay in some diary products. In: Immunoassays for Residue Analysis. R.C. Beier und L.H. Stanker (Hrsg.). ACS Symposium Series 621, American Chemical Society, Washington DC, S. 176-186.

MÜLLER, H.N., SKERRA, A. (1994) Grafting of a high-affinity Zn(II)-binding site on the ß-barrel of retinol-binding protein results in enhanced folding stability and enables simplified purification. Biochemistry *33*, 14126-14135.

MÜLLER-MOHNSSEN, H. (1993) Auf der Suche nach einer ärtzlichen Kunstregel für die Früherkennung anthropogener Krankheiten am Beispiel der Pyrethroid-Intoxikation. In: Kind und Umwelt 2. Böse, S., Krüger, E. (Eds.). Frankfurt/Main.

NAUMANN, K. (1990a) Synthetic pyrethroid insectizides: Structures and properties. In: Chemistry of Plant protection *4*. Haug, G., Hoffmann, H. (Eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong.

NAUMANN, K. (1990b) Synthetic pyrethroid insectizides: Chemistry and patents. In: Chemistry of Plant protection *5*. Haug, G., Hoffmann, H. (Eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong.

NIEBA; L., KREBBER, A., PLÜCKTHUN, A. (1996) Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. Anal. Biochem. *234*, 155-165.

NISSIM, A., HOOGENBOOM, H.R., TOMLINSON, I.M., FLYNN, G., MIDGLEY, C., LANE, D., WINTER, G. (1994) Antibody fragments from a ‘single pot’ phage display library as immunochemical reagents. EMBO J. *13*, 692-698.

NUNES, G.S., TOSCANA, I.A. und BARCELO, D. (1998) Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays. Trends Anal. Chem. *17*, 79-87.

NYGREN, P.Å., STÅHL, S., UHLÉN, M. (1994) Engineering proteins to facilitate bioprocessing. Trends Biotechnol. *12*, 184-188.

ORLANDI, R., GÜSSOW, D.H., JONES, P.T., WINTER, G. (1989) Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 3833-3837.

OSTERMEIER, C., ESSEN, L.O., MICHEL., H. (1995) Crystals of an antibody FV fragment against an integral membrane protein diffracting to 1.28 Å resolution. Proteins: Struct. Funct. Genet. *21*, 74-77.

ØRUM, H., ANDERSON, P.S., ØSTER, A., JOHANSEN, L.K., RIISE, E., Bjørnvad, M., SVENDSON, I., ENGBERG, J. (1993) Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. Nucl. Acid. Res. *21*, 4491-4498.

PADLAN, E.A. (1994) Anatomy of the Antibody Molecule. Mol. Immunol. *31*, 169-217.

PARMLEY, S.F., SMITH, G.P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target phages. Gene *73*, 305-318.

PLÜCKTHUN, A., SKERRA, A. (1989) Expression of functional antibody F_V and F_{ab} fragments in *Escherichia coli*. Met. Enzymol. *178*, 497-515.

PULLEN, S. (1994) Entwicklung von Enzymimmunoassays zum Nachweis von Pyrethroiden. Dissertationsschrift. Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU-München, Lehrstuhl für Botanik.

PULLEN, S., HOCK, B. (1995a) Development of Enzyme Immunoassays for the detection of pyrethroid insecticides. 1. Monoclonal antibodies for allethrin. Anal. Lett. *28* (5), 765-779.

PULLEN, S., HOCK, B. (1995b) Development of Enzyme Immunoassays for the detection of pyrethroid insecticides. 2. Polyclonal antibodies for pyrethroid insecticides. Anal. Lett. *28* (5), 781-795.

QUEFFELEC, A.L., NODET, P., HAELTERS; J.-P., THOUVENOT, D. CORBEL, B. (1998) Hapten synthesis for a monoclonal antibody based ELISA for deltamethrin. J. Agric. Food Chem. *46*, 1670-1676.

REZNIKOFF, W., GOLD, L. (1986) Maximizing gene expression. Butterworth: Stoneham, MA

RIDDER, R., SCHMITZ, R., LEGAY, F., GRAM, H. (1995) Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the Yeast *Pichia Pastoris*. Bio/Technology *13*, 255-260.

RODBARD, D. (1971) Statistical aspect of radioimmunoassay. In: Competitive Protein Binding Assays. W.D. Odell, Daughaday, W.H. (Eds.), Lipincott, J-B., Philadelphia, 204-259.

RODBARD, D., HUTT, D.M. (1974) Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric (labelled antibody) assay: A generalized weighted, interative, least-squares method for logistic curve fitting. In: Radio-immunoassay and related procedures in Medicine 1, International Atomic Agency, Wien, 165-192.

RODRIGUEZ, M.L., PRESTA, L.G., KOTTS, C.E. (1995): Development of a humanised disufide-stabilized anti-$p185^{HER2}$ Fv-ß-Lactamase fusion protein for activation of a cephalosporin doxorubicin prodrug. Cancer Res. *55*, 63-70.

ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. (1995) Kurzes Lehrbuch der Immunologie.3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

ROLOFF, B.D., BELLUCK, D.A., Meisner, L.F. (1992) Cytogenetic studies of herbicide interactions in vitro and in vivo using atrazine and linuron. Arch. Environm. Cont. Toxicol. *22*, 267-271.

RUIZ, M.; GIUDICELLI, V., GINESTOUX, C., STOEHR, P., ROBINSON J., BODMER, J., MARSH S.G., BONTROP, R., LEMAITRE, M., LEFRANC, G., CHAUME, D., LEFRANC, M.P. (2000) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucl. Acid. Res. *28*, 219-221.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

SAMSONOVA, J., RUBSTOVA; M., KISELEVA, A., EZHOV, A., EGOROV, A (1999) Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish peroxidase as a label. Biosens. Bioelectron. *14*, 273-281.

SARMAH, A.K., KOOKANA, R.S.; ALSTON, A.M. (1998) Fate and behaviour of triasulfuron, metsulfuron-methyl, and chlorsulfuron in the Australian soil environment: A review. Austr. J. Agricult. Res. *49*, 775-790.

SASTRY, L., ALTING, M.M., HUSE, W.D., SHORT, J.M., SORGE, J.A., HAY, B.N., JANDA, K.D., BENKOVIC, S.J., LERNER, R.A. (1989) Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 5728-5732.

SCHEIN, C.H., NOTEBORN, M.H.M. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favoured by lower growth temperature. Bio/Technology *6*, 291-294.

SCHIWECK, W., SKERRA, A. (1995) Fermenter production of an artificial F_{ab} fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. Proteins: Struct. Funct. Genet. *23*, 561-565.

SCHLEBUSCH, H., REINARZT, S., KAISER, R., GRÜNN; U., WAGNER, U. (1997) Production of a single-chain fragment of the murine anti-idiotypic antibody ACA125 as phage-displayed and soluble antibody by recombinant phage antibody technique. Hybridoma *16* (1), 47-52.

SCHMIDT, T.G.M., KOEPKE, J., FRANK, R., SKERRA, A. (1996) Molecular interaction between the strep-tag affinity peptide and its cognate traget, streptavidin. J. Mol. Biol. *255*, 753-766.

SCHMIDT, T.G.M., SKERRA, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a funcional Ig F_V fragment. Prot. Eng. *6* (1), 109-122.

SCHMIDT, T.G.M., SKERRA, A. (1994a) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the „strep tag“ and immobilized recombinant core streptavidin. J. Chromatogr. A *676*, 337-345.

SCHMIDT, T.G.M., SKERRA, A. (1994b) The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*-cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insert pigment protein. Eur. J. Biochem. *219*, 855-863.

SCHOLTHOF, K.-B.G., ZHANG, G., KARU, A.E. (1997) Derivation and properties of recombinant Fab Ab to the phenylurea herbicide diuron. J. Agric. Food Chem. *45*, 1509-1517.

SHERRY, J. (1992) Environmental chemistry: the immunoassay option. Crit. Rev. Anal. Chem. *23*, 217-300.

SIMIC, B., KNIEWALD, Z., DAVIES, J.E., KNIEWALD, J. (1991) Reveersibiliy of the inhibitory effect of atrazine and lindane on cytosol 5alpha-dihydro-testosterone receptor complex formation in rat prostrate. Bull. Environm. Cont. Toxicol. *46*, 92-99.

SKERRA, A. (1994a) A general vecotor, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. Gene *141*, 79-84.

SKERRA, A. (1994b) Use of the teracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. Gene *151*, 131-135.

SKERRA, A., ESSEN, L.O., SCHMIDT, T., WARDENBERG, C. (1994) Engineering of antibody fragments produced in bacteria: solutions to the purification problem. ECB6: Proceedings of the 6 th European Congress on Biotechnology, 167-170.

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

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

SMITH, G.P., SCOTT, J.K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods Enzymol. *217*, 228-257.

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

SMITH-GILL, S.J. (1994) Protein epitope: functional vs. structural definitions. Res. Immunol. *145*, 67-70.

SNODGRASS, H.L. (1992) Permethrin transfer from treated cloth to skin surface.: Potential for exposure in humans. J. Toxicol. Environm. Health *35*, 91-105.

STAHL, S., NYGREN, P.A. (1997): The use of gene fusions to protein A and protein G in immunology and biotechnology. Path. Biol. 45 (1), 66-76.

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

STRACHAN, G., WILLIAMS, S., MOYLE, S.P., HARRIS, W.J., PORTER, A.J.R. (1999) Reduced toxicity of expression, in *Escherichia coli*, of antipollutant antibody fragments and their use as sensitive diagnostic molecules. J. Appl. Microbiol. *87*, 410-417.

SUZUKI, C., UEDA, H., SUZUKI, E., NAGAMUNE, T. (1997) Construction, bacteriel expression and characterisation of hapten-specific single chain Fv and alkaline phosphatase fusion protein. J. Biochem. *122*, 322-329.

TAGAKI, H., MORIGANA, Y., TSUCHIYA, M., IKEMURA, H., INOUYE, M. (1988) Control of folding of protein secreted by a high expression secretion vector, pIN-III-*omp*A: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. Bio/Technology *6*, 948-950.

TAPLIN, D., MEINKING, T.L., CHEN, J.A., SANCHEZ, R. (1990) Comparison of crotamiton 10 % cream (Eurax) and permethrin 5 % cream (Elimite) for the tratment of scabies in children. Ped. Dermatol. *7*, 67-73.

THURMAN, E.M., MEYER, M.T. (1996) Herbicide metabolites in surface water and groundwater: Introduction and overview. In: Herbicide metabolites in surface water and groundwater. M.T. Meyer und E.M. Thurman (Eds.), ACS Symposium Series No. 630, American Chemical Society, Washington DC, 1-15.

TIETJEN, K.G., KLUTH, J.F., ANDREE, R., HAUG, M., LINDIG, M., MULLER, K.H., WROBLOWSKY, H.L., TREBST, A. (1991) The herbicide binding niche of photosystem II-A model. J. Pest. Sci. *31*, 65-72.

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

TURNIANSKY; A., AVNIR, D., BRONSHTEIN, A., AHARONSON, N., ALTSTEIN, M. (1996) Sol-gel entrapment of monoclonal anti-atrazine antibodies. J. Sol-Gel Sci. Technol. *7*, 135-143.

VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.F., ROSADO, A.S.; SMALLA, K. (1998) Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. J. Microbiol. Meth. *32*, 133-154.

VAN EMON, J.M., GERLACH, C.L. (1998) Environmental monitoring and human exposure assessment using immunochemical techniques. J. Microbiol. Meth. *32*, 121-131.

VAN OSS, C.J. (1992) Antibody-antigen intermolecular forces. In: Encyclopedia of Immunology. Roitt, I.M., Daves, P.J. (Eds.), Academic Press, London, 97-100.

VARGAS-MADRAZO, E., LARA-OCHOA, F., ALMAGRO, J.C. (1995) Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulins suggests strong geometrical restrictions associated to the mechanism of immune recognition. J. Mol. Biol. *254* (3), 497-504.

VAUGHAN, T.J., WILLIAMS, A.J., PRITCHARD, K., OSBURN, J.K., POPE, A.R., EARNSHAW, J.C., McCAFFERTY, J., HODITIS, R.A., WILTON, J., JOHNSON, K.S. (1996) Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nature Biotechnol. *14*, 309-314.

VELTHYS, B.R. (1981) Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding photosystem II. FEBS Letters *126*, 277-281.

VOSS; S., SKERRA, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. Prot. Eng. *10* (8), 975-982.

WARD, V.K., SCHNEIDER, P.G., KREISSIG, S.B., HAMMOCK, B.D., CHOUDARY, P.V. (1993) Cloning, sequencing and expression of the Fab fragment of a monoclonal antibody to the herbicide atrazine. Prot. Eng. *6* (8). 981-988.

WEBB, S.R., LEE, H., HALL, J.C. (1997) Cloning and expression in Escherichia coli of an anti-cyclohexanedione single-chain variable antibody fragment and comparison to the parent monoclonal antibody. J. Agric. Food Chem. *45*, 535-541.

WEBB, S.R., HALL, J.C. (2000a) Monoclnal-based ELISA for the identification ofherbicidal cyclohexanedione analogues that inhibit graminaceous acetyl coenzyme-A carboxylase. J. Agric. Food Chem. *48*, 1210-1218.

WEBB, S.R., HALL, J.C. (2000b) Development and evaluation of an immunological approach for the identification of novel acetyl coenzyme-A carboxylase inhibitors: assay optimization and pilot screen results. J. Agric. Food Chem. *48*, 1218-1228.

WEINHOLD, B.J., SADEGHI, A.M., GISH, T.J. (1993) Organic chemicals in the Environment. J. Environm. Quality *22*, 162-166.

WEISS, E., ORFANOUDAKIS, G. (1994) Application of an alkaline phosphatase fusion protein system suitable for efficient screening and production of Fab-enzyme conjugates in *Escherichia coli*. J. Biotechnol. *33*, 43-53.

WELLER, M. (1997) Immunoassays für die Umweltanalytik. Nachr. Chem. Tech. Lab. *45*, 1090-1096.

WELS, W., HARWERTH, I.M., ZWICKL, M. (1992) Construction, bacterial expression and charcterisation of a bifunctional single.chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human erbB-2 receptor. Biotechnology-N-Y *10* (10), 1128-1132.

WELSCHOF, M., TERNESS, P., KIPIRIYANOV, S., STANESCU, D., BREITLING, F., DORSAM, H., DÜBEL, S., LITTLE, M., OPELZ, G. (1997) The antigen binding domain of a human anti F(ab')2 autoantibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 1902-1907.

WESTERMEIER, R. (1990) Elektrophorese-Praktikum. VCH Verlag, Weinheim.

WEX, K., MANNS, A., SCHÄFER, G.; WENZEL, B.E. (1995) Immunchemische Schnelltests zur Detektion von monovalenten Umweltschadstoffen. Focus Mul. *12*, 22-28.

WILLIAMSON, R.A., BURIONI, R., SANNA, P.P., PARTRIDGE, L.J., BARABAS, C.F.3d., BURTON, D.R. (1993) Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 4141-4145.

WING, K.D., HAMMOCK, B.D. (1979) Stereoselectivity of a radioimmunoassay for the insectizide S-bioallethrin. Experentia *35*, 1619-1620.

WINTER, G., GRIFFITHS, A.D., HAWKINS, R.E., HOOGENBOOM, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. Annu. Rev. Immunol. *12*, 433-455.

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

WRAITH, M.J., HITCHINGS, E.J., COLE, E.R., COLE, D., WOODBRIDHE, A.P., ROBERTS, T.R. (1986) Development of immunoassay methods for pyrethroid insecticides. Sixth International Congress on Pesticide Chemistry, IUPAC, Ottawa, Canada, Abstract 5C-10.

WU, T.T.; KABAT, E.A. (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence-Jones proteins and myeloma light chains and their implication for antibody complementarity. J. Exp. Med. *132*, 211-249.

WÜLFING, C., PLÜCKTHUN, A. (1994) Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. *12* (5), 685-692.

YAMANAKA, H.I., INOUE, T., IKEDA TANAKA; O. (1996) Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. Immunology *157*, 1156-1162.

YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING; J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene *33*, 103-119.

YAU, K.Y.F., TOUT, N.L., TREVORS, J.T., LEE, H., HALL; J.C. (1998) Bacterial expression and characterization of a picloram-specific recombinant Fab for residues analysis. J. Agric. Food Chem. *46*, 4457-4463.

YUAN, Q., CLARKE, J.R., ZHOU, H.-R., LINZ, J.E., PESTKA, J.J., HART, P.L. (1997) Molecular cloning, expression and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone. Appl. Environm. Microbiol. *63* (1) 263-269.

ZHOU, H., FISHER, R.J., PAPAS, T.S. (1994) Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction. Nucl. Acid. Res. *22*, 888-889.

VII Anhang

Im Folgenden sind die Sequenzen der scFv(4H/31) und scFv(PAI-B_3Ag81)-Antikörperfragmente, der F_{ab}-Fragmente F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53, F_{ab} IPR-23 und des scFv(K47H)aP-Fusionsproteins angegeben. Die relevanten Antikörperdomänen, Restriktionsstellen und Sequenzabschnitte sind eingezeichnet. Im Vergleich der F_{ab}-Fragmente sind die Basenunterschiede gekennzeichnet.

Sequenz von scFv 4H/31

SfiI ►V_H
AATTCCTTTAGTTGTTCCTTTCTATGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTCAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCT

GAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCTGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACGTTCACCAGTTACTGGA

TGAACTGGGTTAAGCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGGAGGATTGATCCTTACGATAGTGAAAC

TCACTACAATCAAAGGTTCAAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACGGCCTACATGCAA

CTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGATGGTTACGACGGGGACTACTGGG

V_H◄ Linker
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATC

►V_L
GGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGAAACAGTCAGTCTTTCCTGTAAG

GCCAGCCAAAAATATTTACAAGAACCTACACTGGTATCAACAGAAATCACATCGGTCTCCAAAACTTCTCATC

AAATATGCTTCGGATTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTACACTC

TCAGTGTCAACAGTGTGAAGCCCGAAGATGAAGGAATATATTACTGTCTTCAAGGTTCCAGCACACCTTGGAC

V_L◄ NotI E-Tag
GTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGGCGGCCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTG

Stop
GAACCGCGTGCCGCATAGACTGTGAAAGTTGTTTAGCAAAA

Sequenz von scFv PAI-B_3Ag81

SfiI ►V_H
TTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCCTTTCTATGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCAAGCTGCAGGAGT

CTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAACTAG

CTATGGTGTACACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATATGGAGTGATGGA

AGCACAACCTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCT

TAAAAATGAACAGTCTCCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAGAGCCTCCCACGACGTACGT

V_H◄ Linker
TTGCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG

►V_L

```
CGGTGGCGGATCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC

ATCTCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATATTTATGGCAATAGTTTTATGCACTGGTATCAGCAGAAACCAG

GACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGAAACTGGGATCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAG

TGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTCACCATTAATCCTGTGGAGGCTGATGATGTTGCAACCTATTTCTGTCAG
                                                          VL◄  NotI
CAAAGTAAATCAGCTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCGGCCGCAGGTGCGC
              E-Tag                          Stop
CGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCATAGACTGTTGAAA
```

Vergleich der Sequenzen von F_{ab} IPR-7, F_{ab} IPR-53 und F_{ab} IPR-23

```
                    XbaI
Fab IPR 7    CAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAC
Fab IPR 53   CAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAC
Fab IPR 23   CAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAC
                                                  PstI  ►VH
Fab IPR 7    TGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCT
Fab IPR 53   TGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCT
Fab IPR 23   TGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCT

Fab IPR 7    GGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGC
Fab IPR 53   GGCCAAGCCTGGGACTTCAGTGAGGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCGCTAGC
Fab IPR 23   GGCCAAGCCTGGGACTTCAGTGAGGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCGCTAGC

Fab IPR 7    TACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTA
Fab IPR 53   TATGTTTTGCACTGGGTGAGGCAGAAACCTGGGCGGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTA
Fab IPR 23   TATGTTTTGCACTGGGTGAGGCAGAAACCTGGGCGGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTA

Fab IPR 7    ATCCTTACAATGGTGGTACTAGCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAACTGT
Fab IPR 53   ATCCTTACAATGATGGTTCTCAGTACAATGAGAAGTTTAAGGGCAGGGCCACGCTGACTTC
Fab IPR 23   ATCCTTACAATGATGGTTCTCAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACGCTGACTTC

Fab IPR 7    AGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCG
Fab IPR 53   AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCG
Fab IPR 23   AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCG

Fab IPR 7    GTCTATTTCTGTGCACGAGGGAACAACCCCTATTATTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAG
Fab IPR 53   GTCTATTTCTGTGCACGAGGGAACAACCCCTATTATTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAG
Fab IPR 23   GTCTATTTCTGTGCACGAGGGAACAACCCCTATTATTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAG
               VH◄  BstEII ►CH1
Fab IPR 7    GCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCAAAGACCACTCCTCCGTCTGTTTACCCTCTGGCTCC
Fab IPR 53   GGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCAAAGACCACTCCTCCGTCTGTTTACCCTCTGGCTCC
Fab IPR 23   GGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCAAAGACCACTCCTCCGTCTGTTTACCCTCTGGCTCC

Fab IPR 7    TGGTTCTGCGGCTCAGACTAACTCTATGGTGACTCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTC
Fab IPR 53   TGGTTCTGCGGCTCAGACTAACTCTATGGTGACTCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTC
Fab IPR 23   TGGTTCTGCGGCTCAGACTAACTCTATGGTGACTCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTC

Fab IPR 7    CCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCC
Fab IPR 53   CCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCC
Fab IPR 23   CCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCC
```

```
Fab IPR 7   CAGCTGTCCTGCAATCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCAC
Fab IPR 53  CAGCTGTCCTGCAATCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCAC
Fab IPR 23  CAGCTGTCCTGCAATCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCAC

Fab IPR 7   CTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCTTCTAGCACCAAAGTTGAC
Fab IPR 53  CTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCTTCTAGCACCAAAGTTGAC
Fab IPR 23  CTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCTTCTAGCACCAAAGTTGAC
                                  CH1◄          Strep-Tag II      Stop
Fab IPR 7   AAGAAAATCGTACCGCGCGATTGCAGCGCTTGGTCTCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAAC
Fab IPR 53  AAGAAAATCGTACCGCGCGATTGCAGCGCTTGGTCTCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAAC
Fab IPR 23  AAGAAAATCGTACCGCGCGATTGCAGCGCTTGGTCTCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAAC
            NcoI
Fab IPR 7   CATGGAGAAAATAAAGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTA
Fab IPR 53  CATGGAGAAAATAAAGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTA
Fab IPR 23  CATGGAGAAAATAAAGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTA
                                  SstI ►VL
Fab IPR 7   CCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT
Fab IPR 53  CCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT
Fab IPR 23  CCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT

Fab IPR 7   TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTCTACACAGTAGTGGTTAC
Fab IPR 53  TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTCTACACAGTAGTGGTTAC
Fab IPR 23  TGGAGATCAAGCCTCCTTCTCTTGCAGAGCTACTCAGAGCCTTCTTTATCGTAATGGAGAC

Fab IPR 7   ACCTTTTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACACAG
Fab IPR 53  ACCTTTTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCTAAAGCTCCTGATCTACACAG
Fab IPR 23  ACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG

Fab IPR 7   TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT
Fab IPR 53  TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT
Fab IPR 23  TTTCCTACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT

Fab IPR 7   CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGT
Fab IPR 53  CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGATGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGT
Fab IPR 23  CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGATGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGT
                                                  VL◄ XhoI  ►CL
Fab IPR 7   ACACATGTTCCTGCGCTCACGTTCGGTGCTGGCACCAAGCTCGAGCTGAAGCGCGCTGATG
Fab IPR 53  ACACATGTTCCT---CCCACATTCGGAGGGGGGACCAAGCTCGAGCTGAAGCGCGCTGATG
Fab IPR 23  ACACATGTTCCT---CCCACATTCGGAGGGGGACCAAGCTCGAGCTGAAGCGCGCTGATG

Fab IPR 7   CTGCACCGACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTC
Fab IPR 53  CTGCACCGACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTC
Fab IPR 23  CTGCACCGACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTC

Fab IPR 7   AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGAT
Fab IPR 53  AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGAT
Fab IPR 23  AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGAT

Fab IPR 7   GGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCA
Fab IPR 53  GGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCA
Fab IPR 23  GGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCA

Fab IPR 7   CCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTA
Fab IPR 53  CCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTA
Fab IPR 23  CCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTA

Fab IPR 7   TACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAAT
Fab IPR 53  TACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAAT
Fab IPR 23  TACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAAT
```

```
                  CL◄Stop                                        HindIII
Fab IPR 7    GAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGATGCTGCTGATAGCAGGTAAGCTTGACCTG
Fab IPR 53   GAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGATGCTGCTGATAGCAGGTAAGCTTGACCTG
Fab IPR 23   GAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGATGCTGCTGATAGCAGGTAAGCTTGACCTG
```

Sequenz von scFv(K47H)aP

```
                  StuI          SfiI          ►VH
ACCGTAGCGCAGGCCTTGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGAAGCTGCAGCAATCTGGGGGAGGCTTGGTGC

AACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACGTCTGGATGGACTGGGT

CCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGAAACAAAGCTAATAATCATGCAGCATAT

TATGCTGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACCGTTTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAATGTCTACCTGCACATGA

ATAGCTTAAGACCTGAAGACACTGGCATTTATTATTGTACCAGGCACAGCTATAGGTACGACGGGTTTGCTTA
                                  VH◄                          Linker
CTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGTC
                ►VL
GGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCT

GCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATATTTATGGCAATAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC

ACCCAAACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGAAACTGGGATCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT

AGGACAGACTTCACCCTCACCATTAATCCTGTGGAGGCTGATGATGTTGCAACCTATTTCTGTCAGCAAAGTA
                                                VL◄  NotI      SalI  ► aP
AATCAGCTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCAGTCGACCGGACACC

AGAAATGCCTGTTCTGGAAAACCGGGCTGCTCAGGGCGATATTACTGCACCCGGCGGTGCTCGCCGTTTAACG

GGTGATCAGACTGCCGCTCTGCGTGATTCTCTTAGCGATAAACCTGCAAAAAATATTATTTTGCTGATTGGCG

ATGGGATGGGGGACTCGGAAATTACTGCCGCACGTAATTATGCCGAAGGTGCGGGCGGCTTTTTTAAAGGTAT

AGATGCCTTACCGCTTACCGGGCAATACACTCACTATGCGCTGAATAAAAAAACCGGCAAACCGGACTACGTC

ACCGACTCGGCTGCATCAGCAACCGCCTGGTCAACCGGTGTCAAAACCTATAACGGCGCGCTGGGCGTCGATA

TTCACGAAAAAGATCACCCAACGATTCTGGAAATGGCAAAAGCCGCAGGTCTGGCGACCGGTAACGTTTCTAC

CGCAGAGTTGCAGGATGCCACGCCCGCTGCGCTGGTGGCACATGTGACCTCGCGCAAATGCTACGGTCCGAGC

GCGACCAGTGAAAAATGTCCGGGTAACGCTCTGGAAAAAGGCGGAAAAGGATCGATTACCGAACAGCTGCTTA

ACGCTCGTGCCGACGTTACGCTTGGCGGCGGCGCAAAAACCTTTGCTGAAACGGCAACCGCTGGTGAATGGCA

GGGAAAAACGCTGCGTGAACAGGCACAGGCGCGTGGTTATCAGTTGGTGAGCGATGCTGCCTCACTGAATTCG

GTGACGGAAGCGAATCAGCAAAAACCCCTGCTTGGCCTGTTTGCTGACGGCAATATGCCAGTGCGCTGGCTAG

GACCGAAAGCAACGTACCATGGCAATATCGATAAGCCCGCAGTCACCTGTACGCCAAATCCGCAACGTAATGA
```

CAGTGTACCAACCCTGGCGCAGATGACCGACAAAGCCATTGAATTGTTGAGTAAAAATGAGAAAGGCTTTTTC

CTGCAAGTTGAAGGTGCGTCAATCGATAAACAGGATCATGCTGCGAATCCTTGTGGGCAAATTGGCGAGACGG

TCGATCTCGATGAAGCCGTACAACGGGCGCTGGAATTCGCTAAAAAGGAGGGTAACACGCTGGTCAGATTGTT

GCGCCGGATACCAAAGCTCCGGGCCTCACCCAGGCGCTAAATACCAAAGATGGCTAGCCACCGCTGATCACGC

CCACGCCAGCCAGCAGTGATGGTGATGAGTTACGGGAACTCCGAAGAGGATTCACAAGAACATACCGGCAGTC

AGTTGCGTATTGCGGCGTATGGCCCGCATGCCGCCAATGTTGTTGGACTGACCGACCAGACCGATCTCTTCTA

aP◀Eco47III Strep-*Tag* Stop

CACCAT**G**AGCGCTTGGCGTCACCCGCAGTTCGGTGGTTAATAAGCTTGACCTG

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Hock sowohl für die Überlassung des Themas als auch für seine kompetenten Anmerkungen und seine wohlwollende Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herzlich möchte ich mich auch bei Dr. K. Kramer bedanken, der mir mit seinem enormen Erfahrungsschatz stets hilfreich auf dem Gebiet der rekombinanten Antikörper zur Seite gestanden hat. Seine Ratschläge haben zusammen mit den fachlichen Anregungen von Dr. J. Böhm wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.
Beiden möchte ich auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Ich danke Prof. Dr. A. Skerra, der mir bereitwillig die Expressionsvektoren pASK75 und pASK99 und das Säulenmaterial für die Streptavidin-Affinitätschromatographie zur Verfügung gestellt hat. Auch danke ich Dr. C. Schmidt-Dannert für die Überlassung des Gens der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Botanik für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich auch bei Frau I. Scholz für die jederzeit geduldige Unterstützung in allen Verwaltungsangelegenheiten bedanken.

Besonders danke ich Tim für seine Geduld und seine exzellente Unterstützung bei der Endfassung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern für ihre Unterstützung und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Doris Ingrid Rau
Geburtsdatum:	16. Mai 1972
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1978–1982	Grundschule in Unterhaching
1982–1991	Theodolindengymnasium, München (Abschluß: allgemeine Hochschulreife)

Studium

Nov. 1991–März 1998	Gartenbauwissenschaften, TU-München, Weihenstephan (Abschluß: Dipl.-Ing. agr.)

Praktische Tätigkeiten

Sept. 1991-Okt. 1991	Baumschule Olschewsky, München
Nov. 1993-Dez. 1993	Zierpflanzengärtnerei Beck, Taufkirchen bei München
Feb. 1994-April 1994	Van Lier's nurseries, Auckland, Neuseeland
Mai 1994-Okt. 1994	Zierpflanzengärtnerei Beck, Taufkirchen bei München
April-Juli 1997	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Botanik der TU-München in Weihenstephan
Mai 1998-Juni 2001	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Botanik der TU-München in Weihenstephan. Während dieser Zeit wurde die vorliegende Arbeit angefertigt.