

**Rekombinante Antikörper
gegen die Mykotoxine
Fumonisin B1 und Ochratoxin A**

Der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Hannover
zum Erlangen des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl. Biol. Björn Lauer
geboren am 29.06.1973
in Surèsnes (Frankreich)

2005

Referent : Prof. Dr. H.-J. Jacobsen
Korreferent: : HD. Dr. B. Huchzermeyer
Tag der Promotion : 16.12.2005

ABSTRACT

The objective of the present thesis was the production of recombinant antibodies (scFvs) against two of the most common mycotoxins, fumonisin B1 and ochratoxin A.

Instead of producing the antibodies through immunisation of animals, it was decided to do an *in vitro* selection, called “panning”. The source of antibodies was a human, half synthetic scFv library, the ETH-2 library. In order to perform the selection procedure the antigen had to be coupled to a matrix. Most haptens are coupled to a carrier protein (e.g. BSA) often resulting in low affinity antibodies towards the free antigen. In order to avoid such problems two different approaches were applied. A biotin linker and “magnetic beads” were chosen as coupling agents. The selected antibodies were analysed by surface plasmon resonance regarding their affinity. By applying the *in vitro* selection procedure the first recombinant antibody against fumonisin B1 was selected from an scFv library ever.

In regard of enhancing the avidity of the selected antibody *in vitro* evolution was carried out, by point mutation and random mutagenesis.

Keywords: scFv, fumonisin B1, ochratoxin A, recombinant antibodies, hapten

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten rekombinante Antikörper (scFvs) gegen zwei der am weitesten verbreiteten Mykotoxine, Fumonisin B1 und Ochratoxin A, hergestellt werden.

Anstatt die Antikörper im klassischen Verfahren über die Immunisierung von Tieren zu gewinnen, wurde ein „Panning“ durchgeführt. Diese Form der Selektion erfolgte *in vitro* unter Zuhilfenahme der ETH-2 „Library“, einer humanen, halbsynthetischen Einzelkettenantikörper (scFv)–Bibliothek. Als Voraussetzung dafür mussten die Mykotoxine an eine Matrix gebunden werden. Anstatt sie wie üblich an ein Trägerprotein zu binden, wurden zwei Alternativmethoden ausprobiert. Zum einen wurde ein Biotinlinker und zum anderen „magnetic Beads“ eingesetzt. Dieses sollte dem häufig auftretenden Problem geringer Affinität gegenüber dem freien Antigen entgegen wirken. Die isolierten Antikörperfragmente wurden unter Zuhilfenahme von Oberflächenplasmonresonanz auf ihre Affinität hin analysiert. Damit gelang es einen Antikörper zu identifizieren, der spezifisch das Mykotoxin Fumonisin B1 erkannte. Hiermit handelt es sich um den ersten Einzelkettenantikörper gegen Fumonisin B1, der aus einer scFv-Bibliothek selektiert wurde.

In einem weiteren Verfahren wurde versucht die Avidität dieses Antikörpers durch Punktmutation und Zufallsmutagenese zu erhöhen.

Schlagwörter: scFv, Fumonisin B1, Ochratoxin A, rekombinante Antikörper, Hapten

1. EINLEITUNG	1
1.1 Antikörper.....	1
1.1.1 Allgemein	1
1.1.2 Poly- und monoklonale Antikörper	2
1.1.3 Rekombinante Antikörper	3
1.1.4 „Phage Display“	4
1.1.5 Antikörper-Genbibliotheken	6
1.1.6 Das Selektionsverfahren („Panning“).....	7
1.2 Mykotoxine.....	9
1.2.1 Fumonisine	10
1.2.3 Ochratoxine	10
1.3 Aufgabenstellung.....	11
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Material	12
2.1.1 Medien	12
2.1.2 Antibiotika.....	12
2.1.3 Bakterienstämme.....	13
2.1.4 ETH-2 „Library“	13
2.1.5 Helferphage	14
2.1.6 Oligonukleotide.....	15
2.1.7 Restriktionsendonukleasen.....	15
2.1.8 Molekulargewichtsmarker.....	16
2.1.9 „Kits“	16
2.1.10 Antikörper	16
2.1.11 Protein A-Sepharose	17
2.1.12 Mykotoxine	17
2.1.13 Biotinlinker	17
2.1.13.1 Kopplung von Fumonisin B1	17
2.1.13.2 Kopplung von Ochratoxin A	18
2.1.14 „Magnetic Beads“	18
2.1.15 Streptavidin-beschichtete ELISA-Platten	19
2.1.16 Oberflächenplasmonresonanz	19
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1.1 Isolation von Plasmiden aus Bakterienkulturen.....	19
2.2.1.2 Anlegen von Glycerinstocks	20
2.2.1.3 Bestimmung der optischen Dichte (O.D.) einer Bakterienkultur	20
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	20
2.2.1.5 Sequenzierung	21
2.2.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	21
2.2.1.7 Kolonie-PCR.....	21
2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.2.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	22
2.2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionsansätzen.....	23
2.2.1.10 Herstellung kompetenter E. coli	23
2.2.1.11 Transformation von kompetenten E. coli durch Hitzeschock.....	23
2.2.1.12 Transformation von kompetenten E. coli durch Elektroporation	24
2.2.1.13 „Panning“ gegen FB1	24
2.2.1.13.1 Kopplung von Fumonisin B1 (FB1) an EZ-Link™ NHS-LC-Biotin	24
2.2.1.13.2 Kopplung von Fumonisin B1 an „magnetic Beads“	25

2.2.1.13.3 „Panning“ in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen	25
2.2.1.13.4 „Panning“ mit „magnetic Beads“	26
2.2.1.13.5 Amplifikation der Phagen	26
2.2.1.13.6 Fällung der amplifizierten Phagen aus dem Kulturüberstand	27
2.2.1.13.7 Titerbestimmung der selektierten bzw. amplifizierten Phagen	27
2.2.1.13.8 Analyse von single-chain-Fragmenten mit unterbrochenen Leserastern mit Hilfe des „Immunostains“	28
2.2.1.13.9 Analyse von single-chain-Fragmenten mit unterbrochenen Leserastern mit Hilfe der Deoxycholat-Methode.....	28
2.2.1.14 „Panning“ gegen Ochratoxin A (OTA)	29
2.2.1.14.1 Kopplung von OTA an den Linker EZ-Link™ Biotin-LC-PEO-Amin	29
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.2.1 Aufreinigung von scFv aus dem Kulturüberstand	29
2.2.2.2 Überprüfung der Reinheit und Konzentrationsbestimmung	30
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.2.2.4 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Blum et al., 1987).....	30
2.2.2.5 Westernblot	31
2.2.2.6 Ponceaufärbung und Blotabsättigung.....	31
2.2.2.7 Immunfärbungen.....	31
2.2.2.8 „Size Exclusion Chromatography“	31
2.2.3 Herstellung einer zufallsmutagenisierten Bibliothek aus dem scFv BFB1-02	32
2.2.3.1 Zufallsmutagenese des BFB1-02	32
2.2.3.2 Restriktionsverdau des aufgereinigten PCR-Fragments und des Zielvektors.....	33
2.2.3.3 Ligation des mutagenisierten scFvs in den Zielvektor und Aufreinigung	33
2.2.4 Gerichtete Mutagenese des BFB1-02	34
2.2.5 Bestimmung der Affinität von Antikörperfragmenten	34
2.2.5.1 Grundlagen der Biacoretechnologie	34
2.2.5.2 Kopplung des SA-Chips.....	36
2.2.5.3 Affinitätsmessungen	36
2.3.1 Analyse von DNA-Sequenzen	37
2.3.2 Modellierung der Antikörperfragmente	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1 Die scFv-Bank	38
3.2 „Panning“ und Analyse der „Pannings“	39
3.2.1 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen das Biotin-Fumonisin B1-Konjugat (BFB1)	39
3.2.2 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen „magnetic Beads“-Fumonisin B1- Konjugat (MFB1)	40
3.2.3 Molekularbiologische Analyse der isolierten Klone	41
3.2.4 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen Biotin-Ochratoxin A-Konjugat (BOTA)	42
3.3 Modellierung der scFvs BFB1-02 und MFB1-08	44
3.4 Analyse der scFvs BFB1-02 und MFB1-08	46
3.4.1 Expression und Aufreinigung der scFvs	46
3.4.2 Bestimmung des Dimeranteils in der scFv-Präparation	47
3.4.3 Affinitätsbestimmung der scFvs	48
3.4.3.1 Affinitätsbestimmung des scFvs BFB1-02	48
3.4.3.1 Affinitätsbestimmung des scFvs MFB1-08	51
3.5.1 Punktmutagenese des scFv BFB1-02	52
3.5.2 Affinitätsbestimmung des scFv BFB1-02Y	55
3.5.3 „Error prone“-Mutagenese des scFvs BFB1-02	55
3.5.3.1 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen Biotin-Fumonisin B1-Konjugat	56

4. DISKUSSION	57
4.1 Kopplung der Mykotoxine.....	58
4.2 Die ETH-2 „Library“	60
4.3 Selektion gegen Mykotoxinkonjugate	62
4.4 Analyse BFB1	66
4.5 Mutagenese des scFv BFB1-02.....	69
4.6. Ausblick	71
5. LITERATURVERZEICHNIS	73
ANHANG	88

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Amp	Ampicillin
AP	alkaline Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	bovine Serumalbumine
°C	Grad Celsius
cfu	kolonienformende Einheiten
cm	Zentimeter
CDR	„complementarity determining region“
DBU	Deutsche Bundesstiftung Umwelt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsFv	„disulfide stabilized fragment variable“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin-N-,N-,N-,N-tetraacetat
„ep“	„error prone“
Fab	„fragment antigen binding“
FAO	Food and Agricultural Organization
FB 1	Fumonisin B1
FB 2	Fumonisin B2
Fv	„fragment variable“
Glc	Glukose
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N2 Hydroxyethylpiperazine N' 2' ethanesulfonic Acid
HBS-EP	HEPES gepufferte Salzlösung mit EDTA und P20
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase

kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilovolt
MES	N-Morpholinoethan Sulfonsäure
min	Minute
mM	Millimolar
μ l	Mikroliter
ng	Nanogramm
O.D.	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
OTA	Ochratoxin A
P20	Tween20
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,05% (v/v) Tween 20
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pel B	Pektatlyase B
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheiten
scFv	„single chain variable Fragment“, Einzelkettenantikörper
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	„Size exclusion chromatography“
s	Sekunden
SPR	Oberflächenplasmonresonanz („surface plasmon resonance“)
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u	Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜNK	über-Nacht-Kultur
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
v/v	Volumenanteil / Volumen
w/v	Gewichtsanteil / Volumen
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Antikörper

1.1.1 Allgemein

Die Entdeckung und Beschreibung der Funktion von Antikörpern erfolgte durch Paul Ehrlich vor mehr als 100 Jahren. 1908 erhielten er und E. Metchnikoff zusammen den Nobelpreis für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der Immunologie (Ehrlich P, 1908). Immunglobuline (Igs) sind Bestandteil des humoralen Immunsystems, welches nur

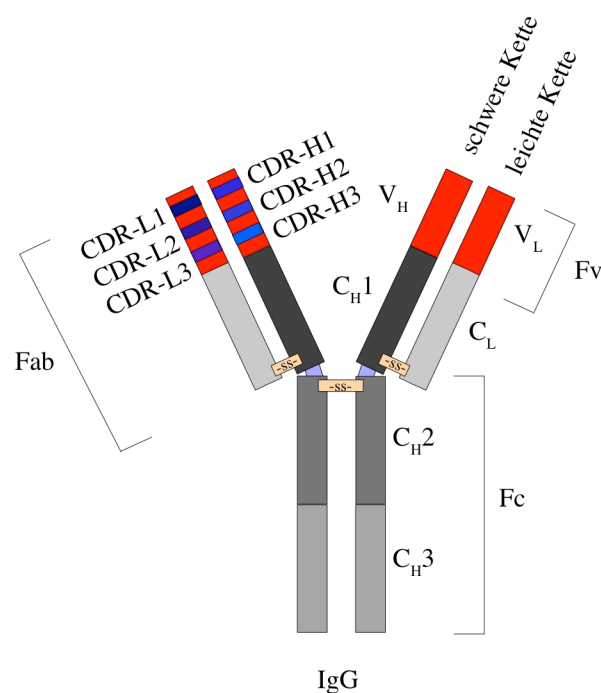


Abb. 1.1 Immunglobulin G (IgG) C_H: konstante Regionen schwere Kette, C_L: konstante Regionen leichte Kette, V_H: variable Regionen schwere Kette, V_L: variable Regionen leichte Kette, CDR_H: „complementary determining regions“ schwere Kette, CDR_L: „complementary determining regions“ leichte Kette

die höheren Wirbeltiere besitzen. Neben den Immunglobulinen der Klasse G (IgG), welche die am häufigsten vorkommende Gruppe der Igs darstellen, gibt es noch weitere Arten von Antikörperklassen (IgA, IgM, IgD und IgE), wobei den IgGs die größte Bedeutung zukommt. Ihre Grundstruktur ist die Y-Form (Abb. 1.1) (Stryer, 1995). Diese besteht aus zwei identischen Antigenbindungsstellen, wovon jede aus einer schweren und einer leichten Kette besteht. Untereinander verbunden sind sie durch eine Disulfidbrückenbindung die das Tetramer stabilisiert. Innerhalb eines IgGs lassen sich die konstante und variable Region voneinander unterscheiden. Die

konstanten Regionen machen einen Großteil des Antikörpers aus und tragen in erheblichem Maße zur Stabilität des Tetramers bei. Ihnen fällt die Aufgabe der Aktivierung des Immunsystems zu. Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette hingegen sind diejenigen, die für die Antigenbindung verantwortlich sind. Innerhalb der variablen Regionen gibt es drei Bereiche, die hochvariable Sequenzabschnitte enthalten. Diese auch als hypervariablen Regionen oder CDRs („complementary determining regions“) bezeichneten Sequenzen bilden die Kontaktstelle zum Antigen.

Der menschliche Organismus weist mehr als 10 Milliarden Antikörper mit verschiedenen CDRs auf. Diese Diversität wird durch somatische Rekombination erreicht, bei dem verschiedene Bestandteile von Antikörpern während der Differenzierung der B-Lymphozyten neu miteinander kombiniert werden.

1.1.2 Poly- und monoklonale Antikörper

Um Antikörper gegen ein vorhandenes Antigen herzustellen, müssen Wirbeltiere mit demselbigen mehrmals immunisiert werden. Dazu werden in der Regel Mäuse, Kaninchen oder Ziegen verwendet, aber auch Hühner (Kerrm *et al.*, 2003). Die dadurch erhaltenen Antikörper stellen ein Gemisch verschiedener Antikörper dar. Man bezeichnet sie daher als polyklonale Antiseren. Sie sind unkompliziert und günstig herzustellen, haben aber den Nachteil der Kreuzreaktivität (Deschamp *et al.*, 1990). Da sie ein Gemisch von Antikörpern darstellen, sind sie gegen verschiedene Epitope des Antigens spezifisch. Das kann dazu führen, dass Antigene mit ähnlichen Epitopen erkannt werden. Weiterhin sind solche Seren nur in begrenzten Mengen verfügbar.

Demgegenüber stehen monoklonale Antikörper, die gegen ein spezifisches Epitop des Antigens gerichtet sind. Monoklonale Antikörper wurden erstmals 1975 (Köhler und Milstein, 1975) mit Hilfe der Hybridomtechnologie produziert. Dem Vorteil eines einzigen spezifischen Antikörpers stehen dabei die Nachteile der komplizierten Herstellung und der hohen Kosten der Erhaltung einer Hybridomzelllinie gegenüber (Bruce *et al.*, 2002).

1.1.3 Rekombinante Antikörper

Eine dritte Möglichkeit der Antikörperherstellung ist die Produktion rekombinanter Antikörper. Dabei werden die Moleküle außerhalb des Ursprungsorganismus (Mensch oder Tier) *in vitro* erzeugt. Zwei Argumente sprechen besonders für diese Technologie (Schmiedl A and Dübel S, 2004):

- Umgehung des Immunisierungsverfahrens
- Erzeugung von Antikörpern mit neuen Eigenschaften

Da die Herstellung eines kompletten IgGs rekombinant aus verschiedenen Gründen nicht einfach ist, ist man dazu übergegangen, nur noch mit den antigenbindenden Fragmenten zu arbeiten. Zu diesen Fragmenten gehören u.a. die Fabs („antigen binding Fragments“) und die Fvs („variable Fragments“).

Bei Fabs handelt es sich um die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette, die durch ihre jeweiligen konstanten Regionen zusammengehalten werden (Kang *et al.*, 1991). Sie weisen ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa auf. Diese wurden früher durch den Verdau von Antikörpern mit der Protease Papain erzeugt. Inzwischen können sie auch rekombinant hergestellt werden. Fvs sind hingegen nur halb so groß wie Fabs und bestehen lediglich aus der V_H und V_L Domäne. Ihr Vorteil liegt in ihrer geringen Größe, die sie für medizinische Anwendungen interessant machen. Ihr Nachteil liegt in ihrer geringen Stabilität. Fabs haben den Vorteil einer höheren Stabilität und der nicht vorhandenen Dimerisierung. Gleichwohl wirkt sich nachteilig aus, dass die Assoziation der leichten und schweren Kette auf intermolekularer Basis abläuft und die Synthetisierung schwieriger ist (Bradbury *et al.*, 2003).

„single-chain variable Fragments“ (scFvs)

Bei den scFvs handelt es sich um die Weiterentwicklung der Fv-Fragmente. Um dieser mehr Stabilität zu verleihen wurden V_H und V_L Domäne über einen Peptidlinker miteinander verbunden (Huston *et al.*, 1988, Bird *et al.*, 1988) (Abb. 1.2). Dieser Linker ist in der Regel zwischen 14-24 Aminosäuren lang. Er verleiht ihnen Stabilität, die die Fv-Fragmente aufgrund nicht vorhandener Disulfidbindungen nicht haben. Die Größe der Fragmente liegt bei ca. 26 kDa. Damit wurde die Möglichkeit der freien Kombination von V_H and V_L geschaffen und neue Anwendungen ermöglicht (Marks *et al.*, 1991; Winter und Milstein 1991). Die Expression von scFvs gegenüber anderen

rekombinanten Antikörperformaten ist einfacher, da beide Domänen in einem Gen vorliegen. Bei dem exprimierten Polypeptid muss lediglich eine intramolekulare Umlagerung stattfinden, damit die beiden Domänen miteinander assoziieren können (Schmiedl A and Dübel S, 2004). Ein klarer Nachteil von scFvs ist deren Neigung zur Bildung von Dimeren und Oligomeren, wenn sie in hoher Konzentration vorkommen (Wörn and Plückthun, 2001). Dieses Verhalten ist u.a. von der Art der verwendeten Keimbahn-Gene abhängig (Ewert *et al.*, 2003). ScFvs können vergleichsweise unkompliziert hergestellt werden, was für eine Reihe von Expressionssystemen bereits gezeigt werden konnte (Plückthun *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 1999). Eine Weiterentwicklung der scFvs sind die dsFvs (disulfidstabilisiert). Dabei wird auf einen Peptidlinker verzichtet und stattdessen ein Aminosäureaustausch mit Cystein vorgenommen, der zur Ausbildung einer Disulfidbrücke führt. Damit einher geht eine höhere Stabilität, geringere Neigung zur Aggregation und damit höhere Ausbeute (Reiter *et al.*, 1994).

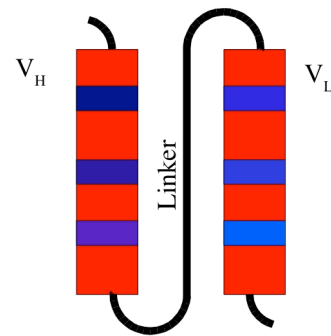


Abb. 1.2 single chain fragment variable (scFv) variable Bereiche der leichten und schweren Kette sind über einen Peptidlinker miteinander verbunden (aus Hust Doktorarbeit)

1.1.4 „Phage Display“

Beim „Phage Display“ handelt es sich um eine Methode zur Selektion, bei der Peptide oder Proteine auf der Oberfläche von Phagen exprimiert werden (Smith, 1985). Sie hat der Hybridomatechnologie gegenüber mehrere Vorteile:

- es muss nicht mit Tieren gearbeitet werden
- es können verschiedene Antikörperformate bearbeitet werden
- es können humane Antikörper selektiert werden
- die Vermehrung der Phagen erfolgt wesentlich schneller als die von Hybridomzellen (Clackson *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991; Winter und Milstein, 1991; Griffith *et al.*, 1993; Sawyer *et al.*, 1997)
- das Antikörpergen und dessen Produkt sind physisch gekoppelt

Der Großteil der beschriebenen Arbeiten in diesem Bereich verwendet die filamentösen Phagen M13 (siehe Abb. 1.3) (Hoogenboom *et al.*, 1992), fd und f1 (Smith and

Petrenko, 1997), die nicht lytisch sind. Sie sind für ihren Wirt nicht letal, sondern verlangsamen lediglich dessen Wachstum. Im Laufe ihres Lebenszyklus kann eine Bakterienzelle zwischen 100 und 200 Phagenpartikeln produzieren. Diese sind von ca. 1 μm Länge und 10 nm Durchmesser und bestehen aus neun verschiedenen Proteinen, von denen drei für das „Phage Display“ bisher verwendet worden sind.

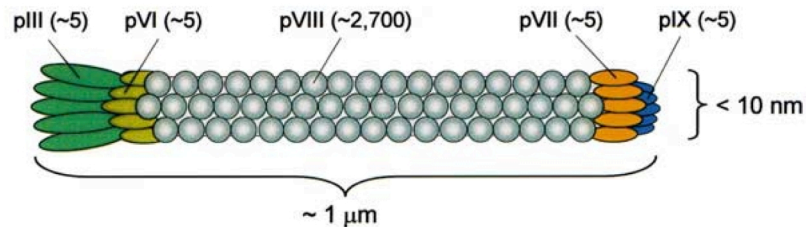


Abb. 1.3 Schematische Darstellung eines M13 Phagens (aus Willats, 2002) Dargestellt sind die verschiedenen Hüllproteine und die Anzahl ihrer Kopien (in Klammern)

Das Hüllprotein *pVIII* macht den Großteil des Phagenproteins aus (~2700 Moleküle) (Marvin *et al.*, 1994). Am proximalen Ende des Phagens befindet sich das Hüllprotein *pIII*, welches in drei bis fünf Kopien vorkommt. Dieses Protein ist für die Erkennung und Penetration des F-Pilus erforderlich ist (Sambrook *et al.*, 1989). Am gleichen Ende befindet sich das Protein *pVI* (3-5 Kopien).

Um diese für die Expression auf der Phagenoberfläche zu nutzen, gibt es drei verschiedene Ansätze (Willats, 2002). Zum einen kann in das Phagen genom das zu fusionierende Protein als Gen im Anschluss an *pIII*, *pVI* oder *pVIII* eingebracht werden. In diesem Fall würden alle Kopien des Phagenhüllproteins als Fusion mit dem scFv gebildet werden. Die zweite Möglichkeit ist das Hinzufügen der fusionierten Gene (Hüllprotein und Fremdprotein) zum Phagen genom. Daraus folgend würden Phagenpartikel sowohl das Wildtypgen, als auch das Fusionsprodukt aufweisen. Die dritte Möglichkeit ist ein System, das auf einem Phagemid (Mead DA and Kemper B, 1988) basiert. Dabei handelt es sich um ein Plasmid, das den Replikationsursprung für eine Amplifikation in Bakterien und eine Antibiotikaresistenz enthält. Zusätzlich weist es einen Replikationsursprung aus Phagen auf und die Fusion von Hüllproteinen mit Fremdproteinen. Im Gegensatz zum ursprünglichen Phagen genom sind fast alle Gene nicht mehr vorhanden, deren Produkte aber von einem zweiten Phagen, dem Helferphagen (Breitling *et al.*, 1991; Barbas III *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991), zur Verfügung gestellt werden. Es entstehen dabei zwei Sorten von Virionen: die einen enthalten das Phagemid und die anderen die DNA des Helferphagen. Um für die Produktion löslicher Antikörper das Gen nicht in einen Expressionsvektor umklonier-

ren zu müssen, befindet sich zwischen Fremdproteingen und Hüllproteingen ein *amber* Stopcodon (TAG). Durch Transformation eines Wirtsstammes, der dieses Stopcodon als solches erkennt, mit dem Phagemid, ist die Produktion löslicher Antikörper möglich. Als zusätzliche Elemente sind auf dem Phagemid häufig noch eine pel B Signalsequenz und Markierungen („Tags“) enthalten. Die pel B Signalsequenz dient dem Export der transkribierten und translatierten Genprodukte in den periplasmatischen Raum (Skerra und Plückthun, 1988). Die „Tags“ können einerseits der Aufreinigung, andererseits dem Nachweis der Antikörper dienen. Der Vorteil eines Phagemids gegenüber einem herkömmlichen Phagenvektor ist seine geringe Größe, weswegen es leichter zu bearbeiten ist (McCafferty, 1996; MacKenzie and To, 1998) und eine höhere Transformationseffizienz aufweist. Dieses kann zu einer höheren Diversität in „Libraries“ führen (Tout *et al.*, 2001). Dadurch, dass die Fusionsproteine zusammen mit den Wildtypproteinen vorkommen, findet eine Selektion eher auf Basis von Affinität denn Avidität statt (Kerrm *et al.*, 2003). Ein Nachteil liegt in dem Vorhandensein von Wildtyp-Phagen, die während der Selektion durch unspezifische Bindung zu einem hohen Hintergrund an nicht spezifischen Bindern führen können (Kerrm *et al.*, 2003).

1.1.5 Antikörper-Genbibliotheken

Bei der Herstellung von Antikörper-Genbibliotheken gibt es drei verschiedenen Möglichkeiten.

- post-Immunisierungs-Genbibliotheken
- universelle Genbibliotheken
- semi-synthetische Genbibliotheken
- synthetische Genbibliotheken

Bei post-Immunisierungs-Genbibliotheken wird gegen das Antigen immunisierten Tieren die Milz entnommen und aus den darin enthaltenen antikörpersezernierenden Plasmazellen die V-Gene isoliert, die die variablen Bereiche enthalten. Vorteil dieser Methode ist, dass Selektion und Affinitätsreifung der Antikörper bereits *in vivo* stattgefunden hat (Willats, 2003). Schwerer wiegt jedoch, dass für jedes Antigen eine neue Bibliothek erstellt werden muss. Zudem muss das Antigen auch immunogene

Eigenschaften besitzen, ohne die es nicht zu einer Selektion und Affinitätsreifung im verwendeten Organismus kommen kann.

Diese Nachteile lassen sich mit universellen und synthetischen Genbibliotheken umgehen.

Universelle Genbibliotheken (de Haardt *et al.*, 1999) bestehen aus den V-Genen der B-Lymphozyten (IgM). Dabei macht man sich zunutze, dass es *in vivo* bereits zur Rekombination gekommen ist. Der Vorteil einer solchen Bank liegt in ihrer Größe, dass sie auf verschiedenste Antigene anwendbar ist und dass die Immunogenität des Antigens nicht gegeben sein muss (Willats, 2003).

Semisynthetische Genbibliotheken (Pini *et al.*, 1998) bestehen aus nicht rekombinierten Keimbahn-Genen oder einem „single framework“, denen zufallsmutierte CDR3s der schweren und leichten Kette hinzugefügt wurden (Hust and Dübel, 2004). Vorteil solcher Bibliotheken ist die mögliche Verwendung von Keimbahn-Genen, die in Bezug auf Stabilität und Expressionsverhalten optimal sind. Der Nachteil ist die reduzierte Variabilität, die nur in den CDR3s zu finden ist.

Ein rein humanes „framework“, dem zufällig CDRs eingesetzt werden (Knappik *et al.*, 2000), ist die Basis für synthetische Genbibliotheken.

1.1.6 Das Selektionsverfahren („Panning“)

Das Selektionsverfahren zur Gewinnung spezifischer rekombinanter Antikörper aus einer Phagen-Genbibliothek wird als „Panning“ bezeichnet (Breitling und Dübel, 1997). Dazu wird das Antigen mit der Phagensuspension inkubiert. Das Antigen kann dabei an eine feste Oberfläche (Nitrozellulose, Immunoröhrchen, ELISA-Vertiefungen) gebunden sein (Hawlich *et al.*, 2001; Marks *et al.*, 1991; Hust *et al.*, 2001; Lauer *et al.*, 2005) oder aber sich frei beweglich in Lösung befinden („magnetic Beads“) (McConnell *et al.*, 1999). Nach der Inkubationszeit, die der spezifischen Anlagerung von antikörpertragenden Phagen dient, werden unspezifisch bindende Phagen durch Waschen entfernt. Die verbleibenden, spezifisch bindenden Phagen werden eluiert und für die Infektion von *E.coli* verwendet. Die so infizierten Bakterien werden einerseits für die Bestimmung der Anzahl der eluierten Phagen verwendet, andererseits für deren Amplifikation. Bei Verwendung von Phagemiden müssen diese dazu mit einem Helferphagen infiziert werden. Nach der Amplifikation erfolgt die Auf-

reinigung der neu produzierten Phagen. In der erhaltenen Suspension sollte sich dann ein Phagengemisch befinden, in dem es bereits zu einer Anreicherung von antigenspezifischen Antikörpern gekommen ist. Dieses Gemisch wird dann erneut in ein „Panning“ eingesetzt. Mit jeder zusätzlichen Runde sollte es zu einer zunehmenden Anreicherung von spezifischen Antikörpern kommen (Abb. 1.4).

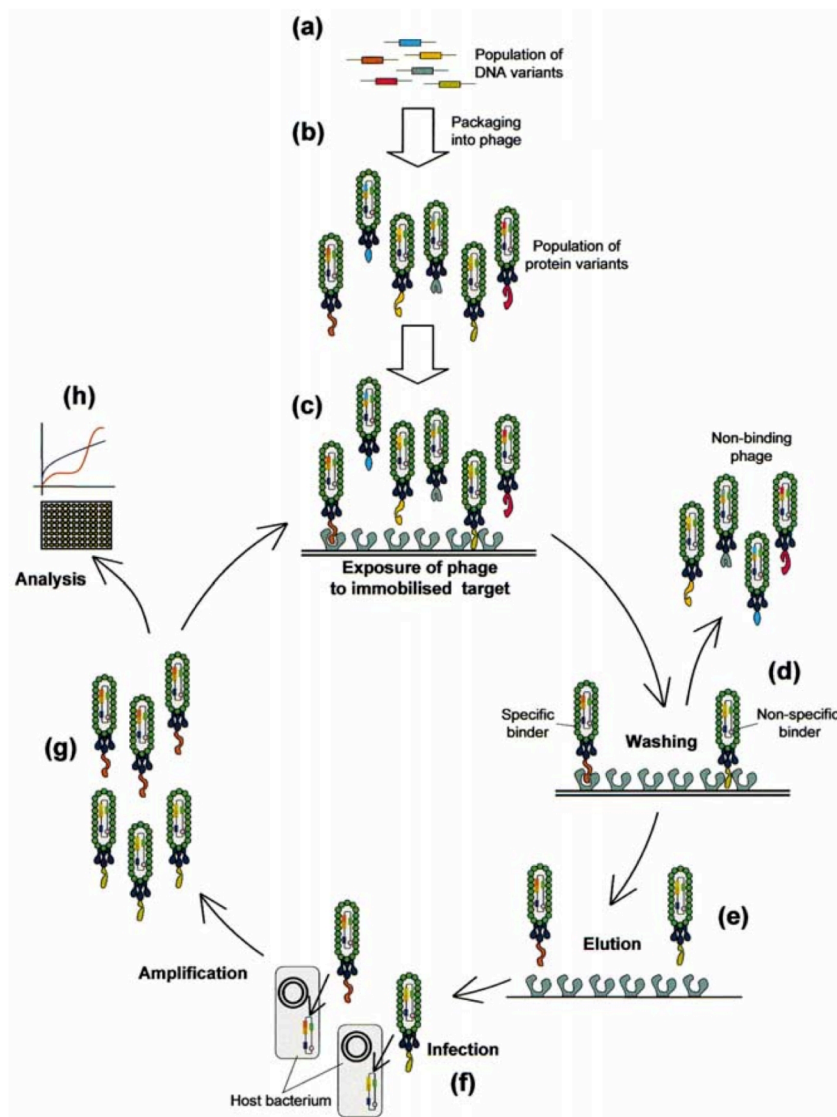


Abb. 1.4 Prinzip des „Pannings“ (aus Willats, 2003) a) Isolation der scFv Gene b) Verpacken der Gene in Phagen c) Selektion der Phagen d) Waschprozedur e) Elution f) Reinfektion von *E. coli* g) Amplifikation h) nach mehreren Wiederholungen Analyse der angereicherten Phagen

1.2 Mykotoxine

Mykotoxine stellen relativ hitzebeständige, hochgiftige Stoffwechselprodukte niedrigen Molekulargewichts (in der Regel 300-500 Da) bestimmter Schimmelpilze dar. Die bisher bekannten 300 Mykotoxine werden etwa 25 Strukturtypen zugeordnet und zeigen aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen verschiedene toxische Wirkungen. Je nach Typ können Mykotoxine (vor allem bei chronischer Exposition) cancerogen, mutagen und/oder teratogen wirken. Da sie als so genannte Feld- oder Lagertoxine in Lebens- und Futtermitteln vorkommen, stellen sie eine ernste Gesundheitsgefährdung für Mensch und Tier dar. Bereits in geringen Mengen können sie irreparable Schädigungen verursachen. Generell aber gilt, dass Mykotoxine ihre Wirkung aufgrund der geringen Konzentrationen erst über einen längeren Zeitraum entfalten. Akute Vergiftungen sind eher selten. Erfolgt die Kontamination bereits auf dem Feld (z.B. durch *Fusarium*) spricht man von Feldtoxinen, nach der Ernte durch unsachgemäße Lagerung (z.B. durch *Aspergillus* oder *Penicillium*) von Lagertoxinen. Bei dem Nachweis von Mykotoxinen kann man zwischen physikalisch/chemischen und immunbiochemischen Nachweismethoden wählen, wobei nicht jede Methode für jedes Mykotoxin als Nachweis geeignet ist. Zu den physikalisch/chemischen Methoden werden Flüssigkeits- und Dünnschichtchromatographie gezählt (Solfrizzo *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 2004). Erstere wird wie auch Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie eingesetzt (Berthiller *et al.*, 2005; Jestoi *et al.*, 2004). Der Vorteil dieser Methoden liegt in ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit. Der mit ihnen verbundene hohe Aufwand und die hohen Kosten sind jedoch ein eindeutiger Nachteil. Billiger und schneller durchzuführen sind immunbiochemische Methoden, wie ELISA (Lee *et al.*, 2004; Yoshizawa *et al.*, 2004) und „Flow through“ Immunotests (Sibanda *et al.*, 2001).

1.2.1 Fumonisine

Bei Fumonisininen handelt es sich um Mykotoxine, die von *Fusarium verticilloides* produziert werden. Dieser Pilz ist weltweit verbreitet und befällt vor allem Maispflanzen (Meredith *et al.*, 1999). Aber auch in Hirse, Spargel und Gerste konnten Fumonisine nachgewiesen werden (da Silva *et al.*, 2000; Walburga *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002). Als Folge von

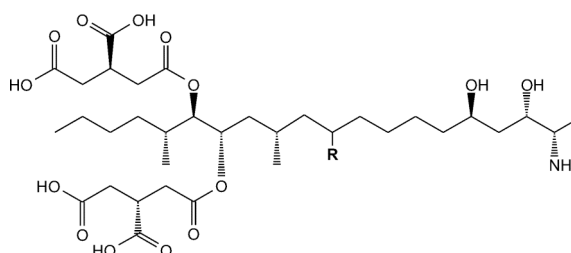


Abb. 1.5 Molekülstruktur von Fumonisin B1/2
Fumonisin B1 und B2 unterscheiden sich lediglich durch das Vorhandensein einer OH-Gruppe (B1) an Position R.

„carry over“ Effekten lassen sie sich auch in nicht mit dem Pilz kontaminierten Produkten finden, wie Milch und Bier (Spotti *et al.*, 2001; Hlwyka and Bullerman, 1999). Der Pilz produziert die Mykotoxine Fumonisin A1, A2, B1 und B2. Von diesen genannten sind aber nur die zwei letzteren auf Grund ihrer Verbreitung toxikologisch von Bedeutung. Fumonisine sind als wahrscheinlich krebserregend eingestuft worden (IARC) und sollen u.a. Speiseröhrenkrebs auslösen (Dragan *et al.*, 2001). Die Wirkungsweise von Fumonisin B1 (FB1) ist noch nicht endgültig geklärt. Es wird aber davon ausgegangen, daß durch das Mykotoxin der Lipidmetabolismus gestört wird (Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives).

1.2.3 Ochratoxine

Bei Ochratoxinen handelt es sich um Stoffwechselprodukte des Sekundärstoffwechsels, die von Pilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* produziert werden. Man findet sie vorzugsweise in Getreideprodukten, Kaffee, Brot und Lebensmitteln tierischer Herkunft (Speijers and Van Egmond, 1993; Otteneder and Majerus, 2001; Park *et al.*, 2002), aber auch in Wein (Otteneder and Majerus, 2000). Ochratoxin A (OTA) ist das am weitesten verbreitete und auch toxischste der Ochratoxine. In Tierversuchen wirkte es

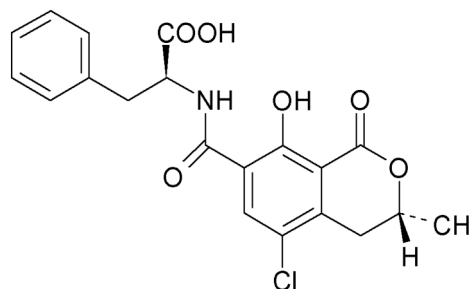


Abb. 1.6 Molekülstruktur von Ochratoxin A

nephrotoxisch, immunsuppressiv, carcinogen und teratogen (World Health Organization, 1990). OTA steht im Verdacht Auslöser der endemischen Nephropathie zu sein (Krogh, 1974), an der in den Balkanstaaten bis zu 20.000 Menschen leiden sollen.

1.3 Aufgabenstellung

Diese Arbeit ist Teil des Förderprojekts „Detektion von Mykotoxinen durch Plantibodies“ der Deutschen Bundesstiftung Umwelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen in Zusammenarbeit mit der Firma r-biopharm gegen die Mykotoxine Fumonisin B1 (FB1) und Ochratoxin A (OTA) Einzelkettenantikörper (scFvs) unter Zuhilfenahme des „Phage Displays“ gewonnen werden.

Bei der zur Selektion („Panning“) verwendeten Bank handelt es sich um die ETH-2 „Library“ (Viti *et al.*, 2000). Diese besteht aus einem „single framework“, in dem nur die CDR3 der leichten und schweren Kette mutiert wurden. Im Gegensatz zu vielen bisherigen Selektionen gegen Haptene, sollen die Mykotoxine nicht an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Stattdessen soll die Kopplung an „magnetic Beads“ bzw. einen Biotinlinker erfolgen.

Die erhaltenen Antikörper sollen in Pflanzen produziert werden, um dann in Detektionskits der Firma r-biopharm zur Anwendung zu kommen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien

Angaben in w/v bzw. v/v

TYE: 0,8 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe, 0,8 % (w/v) NaCl, pH 7,5

TYE_{amp,Glukose}-Agar: TYE, Ampicillin, 1% Glukose (w/v), 12 g Agar

TB: 1,2 % (w/v) Trypton, 2,4 % (w/v) Hefeextrakt, 0,4 % (v/v)Glycerin,

KPO₄-Puffer: 21,1 g KH₂PO₄/ 125,4 g K₂HPO₄

2xTY: 1,6 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,5

SOC: 10 mM NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 2,5mM KCl, pH

7,0; 12,5 µl 2M MgCl₂, 50 µl 1M Glucose frisch

2.1.2 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Firma
Ampicillin	100 µg/ml	Duchefa
Kanamycin	25 µg/ml	Duchefa

2.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Herkunft	Genotyp
<i>E.coli</i> TB1	Novagen	<i>F</i> ⁻ , <i>ara</i> , <i>D(lac-proAB)</i> , <i>rpsL</i> , <i>F80lacZD M15</i> , <i>hsdR17(rK-,mK-)</i>
<i>E.coli</i> TG1	Philotec	<i>supE</i> , <i>thi-1</i> , <i>D(lac-proAB)</i> , <i>D(mcrB-hsdSM)5</i> , (<i>rK-mK-</i>), [<i>F'</i> <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIq D M15</i>]
<i>E. coli</i> TOP10 F'	Invitrogen	[<i>F'</i> [<i>lacIq</i> , <i>Tn10(TetR)</i>], <i>mcrA</i> , <i>D(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> , <i>f80lacZDM15</i> , <i>DlacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139 D(ara-leu)7697</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL(StrR)</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>]
<i>E.coli</i> XL-1 Blue	Stratagene	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17(rK-,mK+)</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>l-</i> , <i>lac-</i> , [<i>F'</i> <i>proAB</i> , <i>lacIqZD M15</i> , <i>Tn10(Tetr)</i>]
<i>E.coli</i> XL-1 Blue MRF'	Stratagene	<i>D(mcrA)183</i> , <i>D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>l-</i> , <i>lac-</i> , [<i>F'</i> <i>proAB</i> , <i>lacIqZD M15</i> , <i>Tn10(Tetr)</i>]

Tab. 2.1 Auflistung der verwendeten Bakterienstämme

2.1.4 ETH-2 „Library“

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Antikörper diente die ETH-2 Antikörperbibliothek (Viti *et al.*, 2000). Diese Bibliothek enthält synthetische Antikörper im „single-chain“ Fragment-Format humaner Herkunft. Als Vektor wurde das Phagemid pDNEK (Abb 2.1) gewählt, welches eine modifizierte Version des pDN322 (Pini *et al.*, 1998) ist.

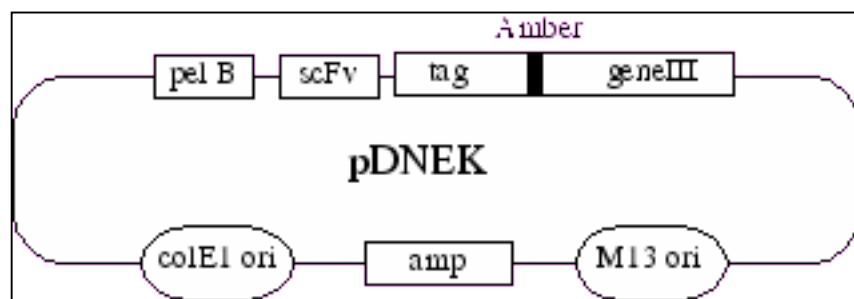


Abb. 2.1 Struktur des Phagemids pDNEK: enthalten sind Replikationsursprünge für *E. coli* (*colE1 ori*) und den Phagen M13 (*M13 ori*). Der *scFv* wird von einer Signalsequenz (*pel B*) am N-Terminus und Markierungen am C-Terminus flankiert. Zwischen den Markierungen und dem für das Phagenhüllprotein III kodierenden Gen liegt ein *amber*-stop Codon. Dieses ermöglicht die Expression des *scFvs* als löslichen Antikörper oder als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein III.

Die Besonderheit dieser Bank besteht darin, dass für die schwere Kette nur die Linie DP47, und bei den leichten Ketten die Linien DPK-22 bzw. DPL-16 verwendet wurden. Die erforderliche Variabilität wurde durch die Randomisierung der jeweiligen CDR3s mittels PCR erreicht. Die Bibliothek weist eine Diversität von mehr als 5×10^8 individuellen Klonen auf.

Die Expression der scFvs steht unter der Kontrolle eines lacZ Promotors. Vor dem scFv befindet sich eine Signalsequenz (pel B). Dabei handelt es sich um die Signalsequenz der Pektatlyase B aus *Erwinia amylophora*, die eine Sekretion des Antikörpers in den periplasmatischen Raum ermöglicht. Am C-Terminus des scFv-Gens befinden sich nach einer Phosphorylierungsstelle eine FLAG- (Einhauer *et al.*, 2001) bzw. His-Markierung („Tags“), die eine Aufreinigung und Detektion ermöglichen (Abb. 2.2). An die „Tags“ schliesst sich ein *amber-stop* Codon an.

Not I	Phosphorylation site						FLAG-tag									
R	A	A	D	D	D	S	D	D	<u>D</u>	Y	K	D	D	D	D	K
5'-GCG GCC GCA GAT GAC GAT TCC GAC GAT GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG																
His-tag																
H	H	H	H	H	H	H	<i>amber</i>									
CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAG-3'																

Abb. 2.2 C-Terminus des scFv-Gens. Dargestellt sind die Nukleotidsequenz, Aminosäuresequenz („one letter code“) sowie Restriktionsschnittstellen, „Tags“ und Phosphorylierungsstelle.

Dieses ermöglicht die Produktion der Antikörperfragmente sowohl als löslichen Antikörper (unter der Verwendung eines *E. coli supE* Stammes), als auch in Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII.

Aufgereinigt werden können die scFvs über die C-terminalen Markierungssequenzen oder über Protein A. Diese Art der Aufreinigung wird durch die Verwendung des Keimbahn-Gens DP47 als Grundgerüst der schweren Kette ermöglicht (Hoogenboom *et al.*, 1992).

2.1.5 Helferphage

Als Helferphage für die Produktion von Phagen wurde der „Hyperphage“ (Rondot *et al.*, 2001) der Firma Progen (Heidelberg) verwendet.

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bzw. biomers.net (Ulm) bezogen.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
ETHXbalrev	taa tct aga cta ctt gtc atc gtc gtc c	Amplifikation des scFvs aus dem Vektor; setzt am FLAG-Tag an
fdseq1	gaa ttt tct gta tga gg	Sequenzierung; setzt am gIII an
fdseqMH_r2	gaa ttt tct gta tga ggt ttt gc	Amplifikation des scFvs aus dem Vektor; setzt am gIII an
F-Y-t119for	ctc ctc cgt atc agt atg act act ggg gcc ag	Mutagenese des BFB1-02; setzt im CDRH3 an
F-Y-t119rev	ctg gcc cca gta gtc ata ctg ata cgg agg ag	Mutagenese des BFB1-02; setzt im CDRH3 an
LMB3	cag gaa aca gct atg ac	Sequenzierung; setzt vor der pelB an
LMB3MH_f2	cag gaa aca gct atg acc atg att acg cc	Amplifikation des scFvs aus dem Vektor; setzt vor der pelB an
LMB1bis	gcg gcc cag ccg gcc atg gcc gag	Amplifikation des scFvs aus dem Vektor; setzt am Startcodon an

Tab. 2.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide

2.1.7 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen.

2.1.8 Molekulargewichtsmarker

DNA-Marker:

Der DNA-Marker wurde von der Firma MBI Fermentas bezogen. Dabei handelte es sich um den 100bp Ladder plus mit den folgenden Fragmentgrößen: 100-900, 1031, 1200, 1500, 2000 und 3000.

Proteinmarker:

Als Proteinmarker wurde der niedermolekulare, ungefärbte SDS-Standard der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Dieser besteht aus den Proteinen Phosphorylase b (97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (31 kDa) und Lysozym (14,4 kDa).

2.1.9 „Kits“

„Kit“	Firma
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences
NucleoSpin Extract II	Macherey & Nagel
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
GeneMorph II Random Mutagenesis Kit	Stratagene

2.1.10 Antikörper

Für die Detektion der scFvs durch Immunfärbung wurde der „ANTI-FLAG® M2 Monoclonal Antibody“ des Herstellers Sigma-Aldrich (Taufkirchen) verwendet. Dieser Antikörper ist in der Lage Proteine zu detektieren, bei denen die FLAG-Markierung am N-, Met-N- oder C-Terminus sitzt. Als zweiter Antikörper wurde Ziege-anti-Maus-IgG, alkaline Phosphatase gekoppelt der gleichen Firma verwendet.

2.1.11 Protein A-Sepharose

Für die Aufreinigung der Antikörperfragmente wurde die r-Protein A-Sepharose™ 4 Fast Flow Matrix (r-PRA36-4FF) der Firma Affiland, Lüttich Belgien (www.affiland.com) eingesetzt.

2.1.12 Mykotoxine

Die Mykotoxine Fumonisin B1, B2 und Ochratoxin A wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.13 Biotinlinker

Bei Biotin handelt es sich um ein Vitamin (244 Da), das mit hoher Affinität ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) an Avidin bzw. Streptavidin bindet. Die Bindung kann durch extreme pH-Werte (1,5) oder durch autoklavieren gelöst werden.

2.1.13.1 Kopplung von Fumonisin B1

Für die Kopplung von Fumonisin B1 an Biotin wurde ein Biotinlinker der Firma Pierce (Rockford, IL.) verwendet. Dafür standen am Mykotoxin FB1 mehrere Carboxylgruppen und eine Aminogruppe (primäres Amin) zur Verfügung. Durch die Kopplung an die Aminogruppe

konnten die Carboxylgruppen für das spätere „Panning“ (Polarität) ausgenutzt

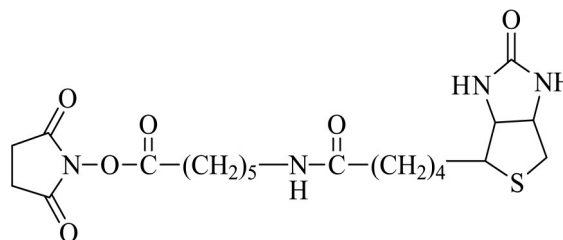


Abb. 2.3 Molekülstruktur des EZ-Link™ NHS-LC-Biotin. Der Abstandhalter weist eine Länge von 22, 4 Å auf. Auf der rechten Seite des Abstandhalters befindet sich die Biotin-, an der linken die reaktive Gruppe des *N*-hydroxysulfosuccinimid-Esters.

werden. Aus diesem Grund wurde der Linker EZ-Link™ NHS-LC-Biotin (Succinimidyl-6-(biotinamido) hexanoat) ausgewählt (Abb. 2.3). Dieser weist zwischen Biotin- und Succinimidgruppe eine Molekülkette aus sechs Kohlenstoffatomen auf und hat eine Länge von 22,4 Å.

2.1.13.2 Kopplung von Ochratoxin A

Für die Kopplung des Ochratoxins A wurde ebenfalls ein Biotinlinker der Firma Pierce (Rockford, IL.)

verwendet. Im Gegensatz zur Kopplung von Fumonisin B1 wurde die Kopplung aber über die Carboxylgruppe durchgeführt. Der Grund lag in der Reaktivität der zur Verfügung

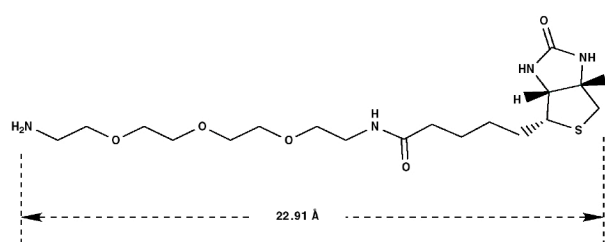


Abb. 2.4 Molekülstruktur des EZ-Link™ Biotin-LC-PEO-Amin. Das Molekül weist eine Länge von 22,91 Å auf. Auf der rechten Seite befindet sich die Biotin-, an der linken die primäre Aminogruppe.

stehenden Aminogruppe, bei der es sich um ein sekundäres Amin handelte. Der EZ-Link™ NHS-LC-Biotin wird für die Kopplung von primären Aminen empfohlen. Deswegen wurde auf den Linker EZ-Link™ Biotin-LC-PEO-Amin ((+)-Biotinyl-3-6,9,-trioxaundecanediamine) zurückgegriffen (Abb. 2.4). Dieser weist terminal ein primäres Amin als reaktive Gruppe auf. Zwischen reaktiver Gruppe und Biotin befindet sich ein „Spacer“ aus Polyethylenoxid, der dem Molekül eine Länge von 22,91 Å gibt.

2.1.14 „Magnetic Beads“

Die „magnetic Beads“ mit Carboxyl-Gruppen (SiMAG TCL/S) sowie mit Amino-Gruppen (SiMAG NH) als reaktiven Gruppen wurden von der Firma Chemicell (Berlin) bezogen.

2.1.15 Streptavidin-beschichtete ELISA-Platten

Für die Panningprozedur mit Biotinlinker-Konjugat wurden ELISA-Platten (Art.-Nr. 236004) der Firma Nunc (Wiesbaden) benutzt, die mit Streptavidin beschichtet waren.

2.1.16 Oberflächenplasmonresonanz

Für die Affinitätsbestimmungen mittels Oberflächenplasmonresonanz wurde eine Biacore3000-Anlage der Firma Biacore (Uppsala, Schweden) verwendet. Ausserdem wurden von der gleichen Firma Streptavidin-beschichtete Chips für die Kopplung des Konjugats bezogen (SA-Chip), sowie der für die Messungen notwendig Puffer (HBS-EP-Puffer).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolation von Plasmiden aus Bakterienkulturen

Für die Isolation von Plasmiden wurde die Methode der alkalischen Lyse (Sambrock *et al.*, 1989; mit Modifikationen) verwendet. Dazu wurden 5 ml 2xTY-Medium mit dem nötigen Antibiotikum versehen, aus dem Glycerinstock inokuliert und über Nacht bei 150-200 Upm, 37°C inkubiert.

Nachdem die Kultur für 10 min. auf Eis gestanden hatte, wurden 2 ml abgenommen und bei RT, 12.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA, pH 8, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Nach der Resuspendierung des Pellets, wurden 300 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) hinzugegeben und für 3 min. inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 4°C, 15.000xg für 15

Minuten an. Dem Überstand wurde 1 ml Isopropanol zugegeben, vorsichtig gemischt und 15 Minuten bei 4°C, 15.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt wie vorher beschrieben an. Erneut wurde der Überstand verworfen, das Pellet bei 37°C für 5 Minuten getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.2 Anlegen von Glycerinstocks

Um Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden Glycerinstocks angelegt. Dafür wurden 850 µl Bakterienkultur mit 150 µl 86 % Glycerin in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.1.3 Bestimmung der optischen Dichte (O.D.) einer Bakterienkultur

Die optische Dichte einer Bakterienkultur wurde bei 600 nm im Photometer (Ultrospec 3000 UV/Visible Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) gegen Medium bestimmt.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Quantität und Qualität einer DNA-Lösung wurden bei 260/280 nm im Photometer (Ultrospec 3000 UV/Visible Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt und wie folgt berechnet:

$$\mu\text{g DNA/ml} = A_{260} \times 50$$

$$\text{Qualität} = A_{260}/A_{280}$$

Der Quotient A_{260}/A_{280} einer reinen DNA-Lösung beträgt 1,8.

2.2.1.5 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Biotech (Ansbach) durchgeführt. Dazu wurden für jede Sequenzierungsreaktion 2 μg luftgetrocknetes Plasmid und die Primer LMB3 bzw. fdseq verwendet.

2.2.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten (Mullis *et al.*, 1986) wurde die BioThermRed™ DNA Polymerase (5 u/ μl) der Firma Genecraft verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen im TRIO-Thermoblock der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt.

2.2.1.7 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der aus der Selektion erhaltenen Bakterienkolonien auf vollständige Antikörpergene, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden 25 μl Reaktionsansätze zusammengegeben und mit einer Pipettenspitze Koloniematerial aufgenommen. Anschließend wurde erst eine selektive Nährbodenplatte beimpft und dann der Reaktionsansatz. Die Reaktionsansätze hatten ein finales Volumen von 25 μl und setzten sich wie folgt zusammen.

10x Puffer	2,5 μl
dNTPs (10 mM jedes)	0,5 μl
Primer vorwärts	0,5 μl
Primer rückwärts	0,5 μl
„Taq“-Polymerase (5 u/ μl)	0,3 μl
H ₂ O	20,7 μl

Für die Durchführung wurde folgendes Programm verwendet:

94°C	1 min	
64°C	1 min	
72°C	1 min	30 Zyklen
94°C	1 min	
72°C	10 min	

2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

PCRs, Kolonie-PCRs und Restriktionsverdau wurden elektrophoretisch auf 1 % Agarose-Gele (1 % Agarose in 1 x TAE (40 mM Tris/HCl, pH 8 , 0,115 % Essigsäure und 10 mM EDTA)) aufgetrennt. Die zu analysierenden Proben wurden mit Ladepuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas) versehen und aufgetragen. Bei 90 -100 V wurde die DNA für 45 Minuten aufgetrennt, mit Ethidiumbromid für 15 Minuten gefärbt und anschließend auf einem UV-Leuchttisch dokumentiert.

2.2.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Das aufzureinigende DNA-Fragment wurde aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten, gewogen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerkleinert. Anschließend wurde mit gleichem Volumen Phenol überschichtet, gemischt und in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Es schloss sich eine Zentrifugationsschritt (15 min, max. Geschwindigkeit) bei Raumtemperatur an. Die obere Phase wurde abpipettiert und mit dem gleichen Volumen eines Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versetzt und gemischt. Nach kurzer Zentrifugation wurde erneut die obere Phase abpipettiert. Es wurden $\frac{1}{2}$ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat, 2 μ l Glycogen (5 mg/ml) sowie das 2,5 – 3x Volumen Ethanol_{abs} hinzugegeben, gemischt und bei -80°C für mindestens eine Stunde inkubiert. An diesen Inkubationsschritt schloss sich eine Zentrifugation (15.000x g, 30 min, 4°C). Es folgten zwei Waschschrte mit 70 % Ethanol und zwei weitere Zentrifugationen (15.000x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 μ l H₂O aufgenommen

2.2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionsansätzen

Die aufzureinigenden Fragmente wurden mit dem NucleoSpin Extract II der Firma Macherey & Nagel nach Anleitung aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 25 μ l H₂O.

2.2.1.10 Herstellung kompetenter E. coli

Die Wirtsbakterien wurden nach Tang *et al.* (1994) und Nakata *et al.* (1997) (mit Modifikationen) kompetent gemacht. Dafür wurden 50 ml 2x TY (mit Antibiotikum) 1:1000 mit einer ÜNK der zu kompetent machenden Bakterien angeimpft und bei 37°C und 150 upm bis zu einer O.D.₆₀₀=0,4 angezogen. 25 ml der Kultur wurden bei 4°C, 2800 xg für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut zentrifugiert (siehe vorherige Zentrifugation). Das erhaltene Pellet wurde wieder in eiskaltem 50 mM CaCl₂ (2 ml) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde mit 40 % Glycerin (v/v) in 50 mM CaCl₂ gemischt und aliquotiert.

2.2.1.11 Transformation von kompetenten E. coli durch Hitzeschock

Die Wirtsbakterien wurden nach Tang *et al.* (1994) und Nakata *et al.* (1997) mit Modifikationen transformiert. Zu 50 μ l kompetenten Zellen wurden 1 μ l Plasmid gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 42°C für 45 s der Hitzeschock vorgenommen und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden in 950 μ l SOC aufgenommen und bei 37°C unter Schütteln für 1 h inkubiert. Anschließend wurde auf 2x TY-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.12 Transformation von kompetenten *E. coli* durch Elektroporation

Für die Transformation wurden 25 μl elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' mit den 35 μl des Ligationsansatzes gemischt und bei 1,6 kV/0,1 cm elektroporiert. Die Zellen wurde in SOC aufgenommen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des Titers wurden Verdünnungen in den Größenordnungen 1×10^{-4} , 1×10^{-5} und 1×10^{-6} ausplattiert.

2.2.1.13 „Panning“ gegen FB1

2.2.1.13.1 Kopplung von Fumonisin B1 (FB1) an EZ-Link™ NHS-LC-Biotin

Bei der Reaktion von Fumonisin B1 mit EZ-Link™ NHS-LC-Biotin handelt es sich um eine Reaktion eines primären Amins (Fumonisin) mit einem *N*-hydroxysulfosuccinimid (NHS) -Ester. Diese chemische Reaktion läuft am besten bei neutralem bis alkalischem pH-Wert ab. In einem nukleophilen Angriff spaltet die deprotonierte Form des primären Amins die NHS-Esterbindung, geht eine Bindung mit einem NHS ein und entlässt ein *N*-hydroxysulfosuccinimid.

Das molare Verhältnis Hapten:Linker in der Reaktion betrug 10:1. Eine FB1-Lösung mit der Konzentration von 1 mg/ml lag vor. 250 μl dieser Lösung enthielten 325 nmol FB1. Für die Reaktion gebraucht wurden noch 32,5 nmol Biotinlinker. Dazu wurden 1 mg des Linkers in 1 ml DMSO gelöst, was 2,18 μmol entspricht. 15 μl dieser Lösungen enthielten 32,5 nmol. Der Reaktionsansatz (250 μl FB1 + 15 μl Biotinlinker, mit 1x PBS, pH 7,4 auf 500 μl aufgefüllt) wurde bei Raumtemperatur unter Rotation 2 h inkubiert.

2.2.1.13.2 Kopplung von Fumonisin B1 an „magnetic Beads“

Die Kopplung von Fumonisin B1 wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde die reaktive Aminogruppe an den „Beads“ mit EDC aktiviert und anschließend der zu koppelnde Ligand, der über eine reaktive Carboxylgruppe verfügte, hinzugegeben.

1×10^{10} „Beads“ wurden in einem MES-Puffer, pH 4 zweimal gewaschen und anschließend in 300 μ l des gleichen Puffers aufgenommen. Zur Aktivierung der Aminogruppe wurden 40 mg EDC in 600 μ l MES-Puffer, pH 4 aufgenommen und der gelösten Matrix hinzugegeben. Nach einer Aktivierungszeit von 10 Minuten wurde dem Gemisch 500 μ l gelösten Fumonisins B1 hinzugegeben. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 3h unter Rotation durchgeführt. Anschließend wurden 3 Waschgänge mit einem Waschpuffer (0,5 M NaCl/100mM Tris-HCl, pH 8) vorgenommen und die „Beads“ in 1 ml des gleichen Puffers gelagert.

2.2.1.13.3 „Panning“ in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen

Das „Panning“ wurde in Mikrotiterplattenvertiefungen durchgeführt, an die Streptavidin gebunden war. In eine Vertiefung wurde nur Linkerlösung (100 μ l) gegeben. Dieses sollte der Deselektion von Phagen dienen, die den Linker bzw. Streptavidin binden. Eine weitere Vertiefung wurde mit 100 μ l der Konjugatlösung versehen. Sie sollte der Selektion von Phagen dienen, die spezifisch das Antigen Fumonisin B1 erkennen. Es wurde für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Daran schloss sich dreimaliges Waschen mit PBST an. Zur Deselektion wurden 1×10^{12} Phagen der amplifizierte Antikörperbank in die erste Vertiefung gegeben und für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand aus der ersten Vertiefung in die zweite Vertiefung überführt und erneut wie zuvor beschrieben inkubiert. Der Überstand wurde danach verworfen und mit PBST 15x gewaschen (200 μ l). Daran schloss sich die saure Elution mit Glycin-HCl (0,1 M), pH 2,8 für 15 Minuten an. Es wurde mit 1 M PBS (100 μ l) neutralisiert.

2.2.1.13.4 „Panning“ mit „magnetic Beads“

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 1×10^9 der gekoppelten Beads dreimal mit 1x PBS, pH 7,4 gewaschen. Danach wurden sie in 1 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Zu der Suspension wurden 1×10^{12} Phagen der amplifizierten scFv-Bank hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei RT auf einem Überkopfrotor (Elmi Rotamix RMI, Riga) für eine Stunde. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Beads gewaschen. Es folgten zehn Waschschrte mit PBST, pH 5, dann 10 Waschschrte mit PBST, pH 7,4 und 20 Waschschrte mit PBS, pH 7,4. Es wurde mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,8, eluiert und die Eluate sofort mit 1 M PBS neutralisiert.

2.2.1.13.5 Amplifikation der Phagen

E.coli XL-1 Blue wurden in einer 50 ml Kultur (2x TY, 37°C, 250 Upm) bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,4 - 0,5 angezogen. 10 ml dieser Kultur wurden mit den eluierten Phagen versetzt und bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (3300x g, 4°C, 10 min) und das Pellet in 1 ml Medium (2x TY) resuspendiert. Je 500 µl wurden auf TYE_{amp,Glukose}-Agar Platten (ø 14 cm) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Morgen wurden die erhaltenen Kolonien mit einem Spatel und Medium (2x TY, 15% Glycerin) abgekratzt. Mit den gelösten Kolonien wurden 50 ml Medium (2x TY, Amp, 1% Glukose) bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,09 inokuliert. Diese Kultur wurde bis zu einer O.D.₆₀₀ 0,4 – 0,5 herangezogen und 10 ml mit 10^{11} Helferphagen versetzt. Es wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und daraufhin zentrifugiert (3300x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in Medium (2x TY) aufgenommen und damit eine 100 ml Kultur (2x TY, Amp, Kan) angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 30°C und starkem Schütteln inkubiert.

2.2.1.13.6 Fällung der amplifizierten Phagen aus dem Kulturüberstand

Der Kulturüberstand wurde zentrifugiert (10.800x g, 15 min, 4°C) um das Zellpellet von den Phagen zu trennen. Zum erhaltenen Überstand wurde $\frac{1}{4}$ Volumen Fällungslösung (20% (w/v) PEG6000 / 2,5 M NaCl) hinzugegeben und nach Durchmischen bei 4°C für 1 h Stunde inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 10.800x g für 30 min an. Das erhaltene Pellet wurde in 20 ml H₂O resuspendiert und erneut mit $\frac{1}{4}$ Volumen Fällungslösung versetzt. Nach dem Mischen und der Inkubation (4°C, 20 min) wurde wieder zentrifugiert (wie zuvor). Die pelletierten Phagen wurden resuspendiert (1 ml 1x PBS / 15% (v/v) Glycerin) und bei -80°C verwahrt.

2.2.1.13.7 Titerbestimmung der selektierten bzw. amplifizierten Phagen

Für die Titerbestimmung wurden 50 ml 2x TY Medium mit 50 μ l einer ÜNK *E.coli* XL-1 Blue angeimpft und zu einer O.D.₆₀₀ 0,5 angezogen (37°C, 200 Upm). Je 50 μ l Bakteriensuspension wurden mit den Verdünnungsstufen der amplifizierten Phagen von 1×10^{-10} , 1×10^{-11} und 1×10^{-12} versetzt und ohne Schütteln inkubiert (30 min, 37°C). Die infizierten Bakterien wurden auf TYE_{amp,Glukose}-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach konnten dann die vorhandenen Kolonien gezählt und der Titer (cfu/ml) bestimmt werden. Zur Bestimmung des Titers der eluierten Phagen nach der Selektion wurden anfangs Verdünnungen von 1×10^{-3} , 1×10^{-4} und 1×10^{-5} ausplattiert. Im Verlauf der Selektion wurden mit steigenden Titern die Verdünnungsstufen angepasst.

2.2.1.13.8 Analyse von single-chain-Fragmenten mit unterbrochenen Leserastern mit Hilfe des „Immunostains“

Bei der Selektion von exprimierbaren single-chain-Fragmenten macht man sich die vorhandenen Markierungen am Antikörper zunutze. Dazu wurden die Phagemide aus Klonen mit vollständiger Kette isoliert und in einen Expressionsstamm (*E.coli* TB1) transformiert. Von diesen wurden ÜNK-Kulturen hergestellt mit denen 5 ml TB Medium inokuliert wurden. Diese ließ man so weit wachsen bis eine deutliche Trübung erkennbar war und induzierte sie dann mit IPTG (0,5 mM) über Nacht (37°C, 250 Upm). Am folgenden Morgen wurden 1,5 ml der Kultur abzentrifugiert (13.000x g, 2 min) und 30 µl des Überstandes für eine SDS-PAGE mit anschließendem Blotten und Immunfärbung verwendet. Als erster Antikörper wurde der „ANTI-FLAG® M2 Monoclonal Antibody“ benutzt. Konnte eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa detektiert werden, wurde dieser Klon als expressionsfähig eingestuft.

2.2.1.13.9 Analyse von single-chain-Fragmenten mit unterbrochenen Leserastern mit Hilfe der Deoxycholat-Methode

Bei der Deoxycholat-Methode (Li *et al.*, 2002) macht man sich die Sensitivität der Wirtsbakterien gegenüber diesem Detergenz zunutze, die bei der Expression des Phagenhüllproteins pIII auftritt. Dazu werden die zu untersuchenden Kolonien zuerst auf Nährbodenplatten (TYE_{amp}) ohne Glukose hochgezogen. Anschließend werden sie auf Platten übertragen, die Deoxycholat (1,5% w/v) enthalten und über Nacht bei 37°C inkubiert. Kolonien, die Phagemide mit unterbrochenen Leserastern enthalten, sollten normales Wachstum zeigen. Sind sie hingegen zur Expression des Phagenhüllproteins pIII fähig, zeigen sie nur geringes Wachstum.

2.2.1.14 „Panning“ gegen Ochratoxin A (OTA)

2.2.1.14.1 Kopplung von OTA an den Linker EZ-Link™ Biotin-LC-PEO-Amin

Bei der Kopplung der Carboxylgruppe des Mykotoxins an das primäre Amin des Linkers reagiert EDC (Abb. 2.5) zuerst mit der Carboxylgruppe. Es entsteht ein aminreaktives Derivat, das in wässriger Lösung nicht stabil ist. Dieses reagiert mit

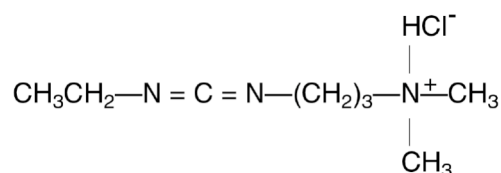


Abb. 2.5 Molekülstruktur von EDC

dem primären Amin des Linkers unter Abspaltung von N-substituiertem Harnstoff. Das molare Verhältnis Hapten:Linker betrug 10:1. Das Mykotoxin lag in einer Stammlösung von 1 mg/ml vor. 147 μl dieser Lösung enthielten 325 nmol OTA. Dieses wurde mit 62,5 μl EDC (1 mg/ml MES, pH 5,5), 12,5 μl Linker (1 mg/ml MES, pH 5,5) versetzt und mit 278 μl MES (0,1 M, pH 5,5) auf 500 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei RT unter Rotation inkubiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Aufreinigung von scFv aus dem Kulturüberstand

Eine 100 ml Kultur wurde bei $\text{O.D.}_{600} = 0,5$ mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 24°C bei 200 Upm wurde bei 4°C und 10.800x g für 30 min abzentrifugiert, um Medium und Bakterien voneinander zu trennen. Der Überstand wurde dekantiert, der pH-Wert auf 8 eingestellt und kühl gelagert. Ein Säulenkörper wurde mit Protein A-Sepharose (Affiland) beladen (1 ml Säulenvolumen) und für die Chromatographie mit 50% Ethanol equilibriert und anschließend mit 50 ml $\text{PBS}_{\text{autokl}}$ gewaschen. Das Säulenmaterial wurde nun mit dem 10x Volumen (10 ml) 20 mM Tris-HCl, pH 8 equilibriert. Der Kulturüberstand wurde aufgetragen und die Säule mit dem 6 fachen Säulenvolumen (6 ml) 20 mM Tris-HCl, pH 8 gewaschen. Ein weiterer Waschschrift wurde mit 20 mM Glycin-HCl, pH 5 (10 ml)

durchgeführt. Die Elution des gebundenen scFvs erfolgte mittels 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5 in acht 1,5 ml Gefäße, in denen je 100 μ l 1 M Tris-HCl, pH 8 vorgelegt wurde. Die Regeneration der Protein A-Säule erfolgte mittels 10 ml 0,1 M Natriumacetat/0,5 M Natriumchlorid Puffers.

2.2.2.2 Überprüfung der Reinheit und Konzentrationsbestimmung

Die bei der Aufreinigung aus dem Kulturüberstand erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Silberfärbung auf ihre Reinheit hin überprüft. Reine Fraktionen wurden gepoolt und gegen HBS-EP Puffer der Firma Biacore dialysiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 280 nm. Dazu wurde eine 1:10 Verdünnung des dialysierten Antikörperfragments mit 1x PBS hergestellt und gegen selbigen Puffer als „Blank“ gemessen. Um von der OD₂₈₀ auf mg/ml zu konvertieren, wurde folgende Rechnung durchgeführt: (OD₂₈₀ x Verdünnungsfaktor)/1,37.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit Modifikationen wie bei Hust (2002) durchgeführt.

2.2.2.4 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Blum et al., 1987)

Das Polyacrylamidgel wurde für mindestens 1 h in Fixierer (50 % (v/v) Methanol + 12% (v/v) Eisessig + 0,5% (v/v) Formaldehyd (37%), mit H₂O auf 1 l auffüllen) inkubiert. Es schloss sich ein Waschvorgang (3x 20 min) in 50% Ethanol in H₂O an. Anschließend wurde für 1 min in einer Vorbehandlungslösung (0,2 g Na₂S₂O₃ in 1 l H₂O) inkubiert, wonach 3x 20 s mit H₂O gewaschen wurde. Es folgte eine Behandlung in Imprägnierlösung (2 g AgNO₃ + 0,75 ml Formaldehyd (37%), in 1 l H₂O lösen) für 20 min. Nach der Imprägnierung wurde mit H₂O 2x 20 s waschen. Anschließend wurde für 10 min in der Entwicklungslösung (60 g Na₂CO₃ + 0,5 ml

Formaldehyd (37%) + 4 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, in 1 l H_2O lösen) inkubiert und mit H_2O 2x 2 min ausgewaschen. Um die Silberimprägnierung zu beenden, wurde für 10 min in der Stopplösung (50 % (v/v) Methanol + 12% (v/v) Eisessig, mit H_2O auf 1 l auffüllen) inkubiert. Für mindestens weitere 20 min wurde in der Waschlösung gewaschen.

2.2.2.5 Westernblot

Westernblots wurden durchgeführt wie bei Hust (2002) beschrieben. Geblottet wurde auf Nitrozellulose (Protran, Porengröße 0,45 μm ; Schleicher & Schuell).

2.2.2.6 Ponceaufärbung und Blotabsättigung

Färbung und Absättigung wurden durchgeführt wie bei Hust (2002) beschrieben.

2.2.2.7 Immunfärbungen

Immunfärbungen wurden durchgeführt wie bei Hust (2002) beschrieben. Der „ANTI-FLAG[®] M2 Monoclonal Antibody“ wurde in einer Verdünnung von 1:2000, der Ziege-anti-Maus 1:5000 eingesetzt.

2.2.2.8 „Size Exclusion Chromatography“

Bei der für die Chromatographie verwendeten Säule handelte es sich um eine Bio-Rad SEC 250-5, deren Matrix auf Kieselerde (Silica) basiert. Die Kalibrierung wurde mit BSA auf 65 kDa durchgeführt. Über Protein A aufgereinigter scFv wurde mit 1 ml/min (Gesamtvolumen 500 μl) aufgetragen und bei gleicher Flußrate analysiert. Als Laufpuffer diente 20 mM Tris, pH 7,5.

2.2.3 Herstellung einer zufallsmutagenisierten Bibliothek aus dem scFv BFB1-02

2.2.3.1 Zufallsmutagenese des BFB1-02

Bei dieser Technik wurde mithilfe der Polymerasenkettenreaktion zufällig Mutationen in die zu amplifizierende Sequenz eingebaut. Dabei kann es zu Transitionen (A <-> G, C <-> T) bzw. Transversionen (Purin <-> Pyrimidin) kommen. Durchgeführt wurde die Mutagenese mit dem „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene mit dem bis zu 16 Mutationen pro Kilobase (kb) DNA eingeführt werden können. Die Anzahl der Mutationen pro kb wird entweder über die Anzahl der Zyklen oder über die Konzentration der Zielsequenz eingestellt. Erreicht werden sollte eine niedrige Mutationsrate von 0 – 4,5 Mutationen / kb. Als Ausgangsmaterial wurde das Phagemid mit dem zu verändernden scFv (BFB1-02) eingesetzt. Dabei entsprach die Menge der Zielsequenz 500 ng. Die verwendeten Primer waren LMB1bis und ETHXbaIrev (Tabelle). Es wurden vier 50 μ l Ansätze für die PCR wie folgt zusammengestellt:

Phagemid BFB1-02	2,1 μ l
MutazymeII Reaktionspuffer (10x)	5 μ l
dNTP-Mix (40 mM)	1 μ l
Primer-Mix(250 ng jeder)	0,5 μ l
MutazymeII DNA Polymerase	1 μ l
H ₂ O	40,4 μ l

Folgendes Programm wurde für die PCR benutzt:

95°C 2 min

95°C 30 sec

64°C 30 sec x30

72°C 1 min

72°C 10 min

04°C unendlich

Die Aufreinigung der Reaktionsansätze erfolgte wie beschrieben. Die Konzentration des Fragmentes wurde im Photometer mit $A_{280/260}$ bestimmt.

2.2.3.2 Restriktionsverdau des aufgereinigten PCR-Fragments und des Zielvektors

Sowohl PCR-Fragment als auch Zielvektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* bzw. *NotI* in Puffer O+ bei 37°C für 3 h oder über Nacht geschnitten.

Das PCR-Fragment wurde aus dem Gel aufgereinigt. Der Vektor wurde mit dem GFX Amersham Kit aus einem Agarose-Gel aufgereinigt und mit 50 μl H₂O eluiert.

2.2.3.3 Ligation des mutagenisierten scFvs in den Zielvektor und Aufreinigung

Vektor	47,8 μl	(670 ng)
scFv	4,6 μl	(300 ng)
10x Ligase Puffer	10 μl	
Promega Ligase	1 μl	(3 u)
H ₂ O	36,6 μl	

16°C, über Nacht

Nach der Ligation über Nacht wurde eine Fällung durchgeführt. Dazu wurden dem Ligationsansatz 10 μl 3 M Natriumacetat und 250 μl Ethanol_{abs} zugegeben und bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert. Es schlossen sich drei Zentrifugationsschritte an (4°C, 5 min, max. Geschwindigkeit), die im Wechsel mit Waschschritten (700 μl Ethanol 70%) stattfanden. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Pellet für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 35 μl H₂O aufgenommen.

2.2.4 Gerichtete Mutagenese des BFB1-02

Bei der gerichteten Mutagenese des BFB1-02 sollte im CDR3 der schweren Kette die Aminosäure Phenylalanin (Basenabfolge: ttt) gegen Tyrosin (Basenabfolge: tat) ausgetauscht werden. Dieses erfolgte mit Hilfe des „QuikChange Site-directed Mutagenesis Kits“ der Firma Stratagene.

Die Umwandlung der Aminosäure Phenylalanin zu Tyrosin erfordert den Austausch einer Base. Dafür wurden die Primer F-Y-t119for und F-Y-t119rev verwendet. Die PCR wurde wie folgt zusammengestellt:

30 ng Phagemid des BFB1-02 wurden in eine PCR mit je 125 ng der Primer F-R-t119for/ F-R-t119rev eingesetzt. Als Polymerase diente die dem Kit beiliegende *PfuTurbo* (2,5 U/ μ l). Das Gesamtvolumen der Reaktion lag bei 50 μ l. Das Anlagern der Primer erfolgte bei 78,5°C, die Amplifikation bei 68°C mit 12 Zyklen.

2.2.5 Bestimmung der Affinität von Antikörperfragmenten

2.2.5.1 Grundlagen der Biacoretechnologie

Bei der Biacore3000 handelt es sich um einen optischen Biosensor mit dessen Hilfe sich Molekülinteraktionen markierungsfrei und in Echtzeit detektieren lassen. Grundlage dieser Technologie ist die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) (Jonsson *et al.*, 1991). Mit ihrer Hilfe werden Veränderungen im Refraktionsindex nahe der Sensoroberfläche gemessen (Jonsson *et al.*, 1991). Für Proteine gilt: Änderungen im

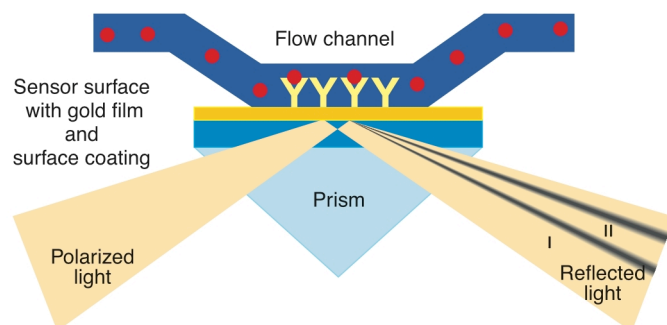
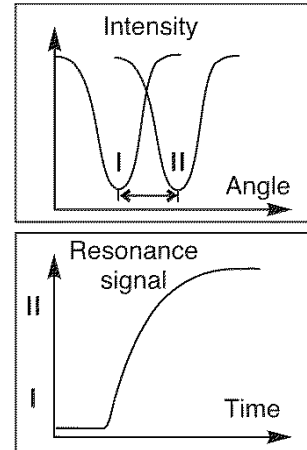


Abb. 2.6 Prinzip der Biacoretechnologie.

Polarisiertes Licht wird durch ein Prisma auf die goldbeschichtete Oberfläche eines gestrahlt. Dessen andere Seite („Probenseite“) ist mit einem Liganden beschichtet, an den der Analyt bindet. Diese Massenzunahme bewirkt eine Veränderung des Refraktionsindex und damit des Reflektionswinkels. Quelle: Biacore

Für Proteine gilt: Änderungen im

Refraktionsindex sind proportional zur Massenzunahme (Stenberg *et al.*, 1991). Oberflächenplasmonresonanz entsteht unter bestimmten Bedingungen bei der Reflexion von Licht von einer leitenden Schicht im Grenzbereich zweier Medien mit unterschiedlichem Refraktionsindex. Im vorliegenden Fall stellen die zu untersuchende Probe und die Glasschicht des Chips die zwei verschiedenen Medien dar. Eine Seite des gläsernen Chips ist mit Gold als leitender Beschichtung versehen, die andere Seite mit einer Dextran-Matrix. Tritt das Phänomen der SPR auf, dann kommt es zu einer Reduktion in der Intensität des reflektierten Lichts bei einem bestimmten Reflektionswinkel. Dieser Reflektionswinkel ist abhängig vom Refraktionsindex auf der anderen Seite (der „Probenseite“) des Chips. Der Refraktionsindex wiederum ist abhängig von der Zusammensetzung des Mediums und damit von der Konzentration des Analyten. Die Differenz der Reflektionswinkel ist proportional zur Änderung der Masse auf der anderen Seite des Chips (Abb. 2.6).



Sensorgram

Abb. 2.7 Entstehung eines Sensorgramms. Durch die Bindung eines Moleküls an die Sensoroberfläche kommt es zu einer Veränderung des Refraktionsindexes wodurch sich der Reflektionswinkel ändert (obere Abb.). Wird die Veränderung des Reflektionswinkels über einen Zeitraum geplottet, so erhält man ein Sensorgramm (untere Abb.)
Quelle: Biacore

Bindet im Verlauf einer Messung ein Molekül an die Sensoroberfläche, kommt es zu einer Veränderung des Refraktionsindexes wodurch sich als Folge der SPR, der Reflektionswinkel des Lichtintensitätsminimums verändert. Plottet man diese Veränderung im Verlauf einer Messung gegen die Zeit, so entsteht ein Sensorgramm (Abb. 2.7). Die Maßeinheit für die Veränderung wird in Resonanzeinheiten (RU) angegeben. Eine Resonanzeinheit entspricht einer Veränderung der Proteinkonzentration von 1 pg/mm^2 .

2.2.5.2 Kopplung des SA-Chips

An der Biacore 3000 stehen pro Chip vier Flusszellen zur Verfügung, von denen jeweils zwei in Reihe geschaltet werden können. An die Flusszelle 1 wurde lediglich der Linker gekoppelt. Diese sollte in späteren Versuchen als Negativkontrolle dienen. An die Flusszelle 2 wurde das Mykotoxin-Biotin-Konjugat gebunden. Das Signal der Flusszelle 1 abgezogen von dem der Flusszelle 2 ergab einen Wert von 160 RU.

2.2.5.3 Affinitätsmessungen

Zur Bestimmung der Affinität wurden die Antikörperfragmente in HBS-EP Puffer dialysiert. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung mit A_{280} und eine anschließende Verdünnung in die folgenden Konzentrationen [nM]: 500, 250, 200, 125, 100, 50 und 0. Die Verdünnungen wurden in Doppelansätzen (bis auf den 0 nM Ansatz) für drei Minuten mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei einer Temperatur von 25°C injiziert. Es schloss sich eine Dissoziationsphase von 10 Minuten an. Nach jedem Messzyklus wurde die Chipoberfläche mit einem 30 s Puls Regenerationslösung (100 mM NaOH, 0,1% SDS) gereinigt. Für die Kompetition mit freiem Fumonisin B1 wurden jeweils 500 nM scFv mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 5 μM) an Mykotoxin für eine halbe Stunde bei RT inkubiert und anschließend injiziert. Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch DMSO zu verhindern, wurde der Probe mit 0 nM Mykotoxin DMSO in der gleichen Menge hinzugegeben, wie es auch in der Probe mit 5 μM Fumonisin B1 vorhanden war. Die Injektionsdauer betrug für die Kompetition nur zwei Minuten bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Für vergleichende Kompetitionsexperimente mit Fumonisin B1 und Fumonisin B2 galten die gleichen Bedingungen. Hier wurden lediglich 500 nM Mykotoxin mit der entsprechenden Menge an scFv inkubiert. Die Sensorgrammkurven wurden durch Subtraktion des Signals der Flusszelle 1 von dem der Flusszelle 2 erzeugt. Die Auswertung wurde mit der dazugehörigen Software BIA-Evaluation 3.2 RC1 unter Verwendung des 1:1 Langmuir Bindungsmodells vorgenommen. Dissoziationskonstanten wurden nach den allgemeinen Programmstandards berechnet.

2.3 Software

2.3.1 Analyse von DNA-Sequenzen

Für die Analyse von DNA-Sequenzen wurden das Programm „SequenceAnalysis 1.3“ (MacOSX, Informagen), „4Peaks“ (MacOSX, MekenTosj.com) sowie die Programmsammlung „Lasergene“ (Windows2000, DNAStar) verwendet.

2.3.2 Modellierung der Antikörperfragmente

Die Modellierung der Antikörperfragmente wurde mit dem WAM-Algorithmus (Whitelegg and Rees, 2000; Whitelegg and Rees, 2004) durchgeführt. Folgende Parameter wurden verwendet: für die Seitenkettenmodellierung wurde die „dead-end elimination“ Methode verwendet, während die RMS-Ableitung für die Suche nach dem endgültigen Modell genutzt wurde.

Für die Visualisierung und Bearbeitung der pdb-Dateien wurde das Programm „UCSF Chimera“ (Pettersen *et al.*, 2004) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Die scFv-Bank

Vor der Präparation der Phagen wurde jedes Aliquot auf das Vorhandensein vollständiger Antikörperfragmente überprüft. Dazu wurden Verdünnungsausstriche der einzelnen Ansätze angefertigt und Einzelkolonien mittels Kolonie-PCR kontrolliert (jeweils 10 pro Aliquot). Bei Vorhandensein eines vollständigen scFv-Gens ergibt sich eine Bande bei ca. 935 bp. Die einzelnen PCR-Ansätze aufgetrennt

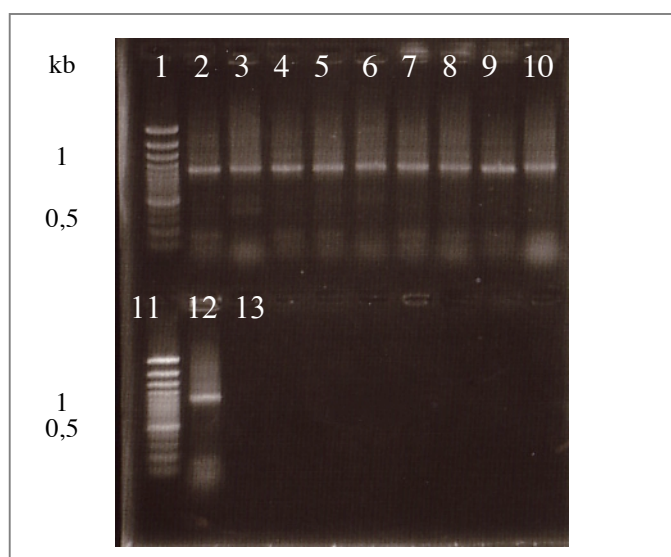


Abb. 3.1 Kontrolle der ETH2 „Library“ auf vollständige Antikörperfragmente. 1% Agarose-Gel, 90 V, 45 min; Bahn1: Marker, Bahn 2-10: Kolonie-PCR 1-9. Bahn 11: Marker, Bahn 12: Kolonie PCR 10, Bahn13: Negativkontrolle. Von jedem Aliquot mittels Kolonie-PCR Einzelkolonien auf das Vorhandensein der scFv-Gene überprüft. Ist dieses vollständig erhält man ein PCR-Produkt von 935 bp. Insgesamt wurden 40 Einzelkolonien überprüft, von denen alle ein PCR-Produkt bei 935 bp aufwiesen.

auf einem Agarose-Gel wiesen alle diese Bande auf. Nach der Amplifikation ergab sich ein Titer von $3,9 \times 10^{13}$ cfu/ml.

3.2 „Panning“ und Analyse der „Pannings“

3.2.1 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen das Biotin-Fumonisin B1-Konjugat (BFB1)

In der ersten Panningrunde gegen die Fumonisin B1-Konjugate wurden jeweils 1×10^{12}

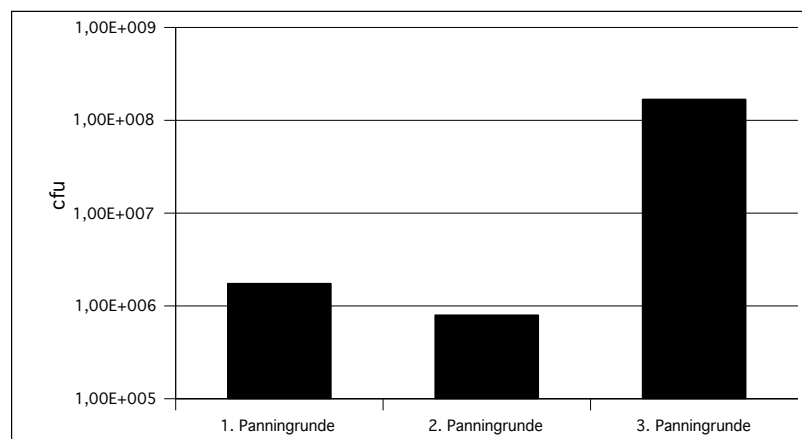


Abb. 3.2 Entwicklung der Titer beim Panning gegen Biotin-gekoppeltes Fumonisin B1. In der ersten Panningrunde wurden 1×10^{12} Phagen eingesetzt. In den folgenden zwei Runden jeweils 2×10^{10} Phagen.

Phagen eingesetzt. Die Anzahl der eluierten Phagen betrug nach der ersten Selektionsrunde gegen das Biotin-Konjugat $1,75 \times 10^6$ kolonienbildende Einheiten (Abb. 3.2). Für die zweite Panningrunde wurden lediglich 2×10^{10} Phagen verwendet. Die Ursache dafür lag in der geringen Anzahl produzierter Phagenpartikel während der Amplifikation. Aus der zweiten Selektion wurden 8×10^5 Partikel erhalten. Für die dritte Runde der Selektion wurden aufgrund des geringen Titors produzierter Phagen nur 2×10^{10} Einheiten eingesetzt. Die Anzahl der eluierten Phagen betrug $1,69 \times 10^8$. 100 Kolonien aus der Elution der dritten Panningrunde wurden über Kolonie-PCR auf die Vollständigkeit ihrer Antikörpergene überprüft. 66 dieser Kolonien wiesen auf dem Agarose-Gel die Banden richtiger Größe auf. Um zu testen, ob diese scFvs exprimierbar waren, wurden sie in einen Expressionsstamm umklontiert (*E.coli* TB1). Die Expression wurde in 5 ml Kulturen über Nacht durchgeführt. Nach Extraktion aus dem Medium wurden die Überstände über Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Western Blot und „Immunostain“ (Abb. 3.3) auf das Vorhandensein von Antikörperfragmenten überprüft. Von den 66 überprüften

Klonen ließen sich 14 exprimieren. Von diesen 14 waren 13 sequenzidentisch. Für

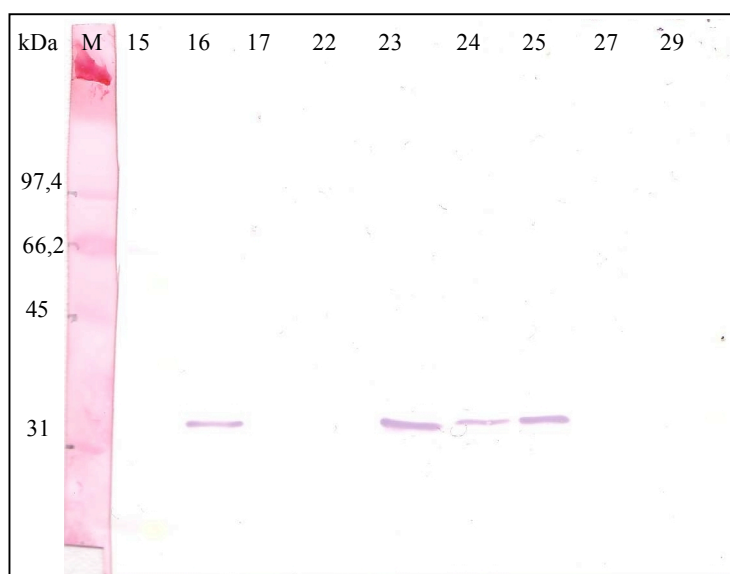


Abb. 3.3 Immunostain des Expressionstests der vollständigen BFB1-scFvs. Je 15 μ l Überstand wurden mit einem 12% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und geblottet. Der Marker wurde mit Ponceau S angefärbt. Die scFvs wurden mit Maus-anti-FLAG 1:1000 (1. Antikörper) und Ziege-anti-Maus-AP 1:5000 (2. Antikörper) detektiert.

die weiteren Arbeiten wurde von diesen 13 der BFB1-02 verwendet.

3.2.2 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen „magnetic Beads“-Fumonisin B1-Konjugat (MFB1)

Von den 1×10^{12} eingesetzten Phagen in der ersten Panningrunde wurden $6,5 \times 10^4$ eluiert (Abb. 3.4). Für die zweite Selektionsrunde wurden 10^{11} Phagenpartikel

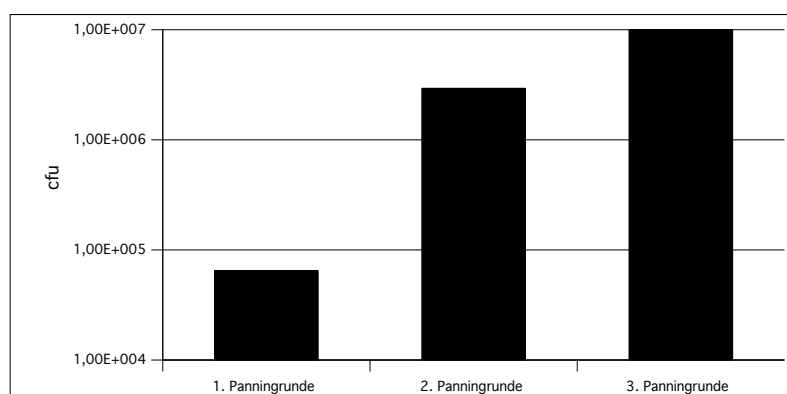


Abb. 3.4 Entwicklung der Titer beim Panning gegen „magnetic Beads“ gekoppeltes Fumonisin B1. In der ersten Panningrunde wurden 1×10^{12} Phagen eingesetzt, in den darauffolgenden zwei jeweils 10^{11} Phagen.

verwendet, da die vorherige Amplifikation nur einen Titer von $9,8 \times 10^{11}$ ergab. Der Titer der eluierten Phagen lag bei $2,94 \times 10^6$. Die Vermehrung ergab $6,2 \times 10^{11}$ Partikel, weswegen in der dritten Panningrunde wie zuvor 1×10^{11} Phagen eingesetzt wurden. Eluiert wurden 1×10^7 Phagenpartikel.

Mit der Deoxycholat-Methode wurden vier Kolonien (08, 13, 57, 83) von 100 getesteten mit einem durchgehenden Leseraster identifiziert. Die Sequenzierung zeigte, dass von diesen vier Klonen drei sequenzidentisch waren (08, 13, 83).

	Anzahl der untersuchten Klone	Klone mit vollständigem scFv	Klone mit ORF	sequenzidentische Klone
„Panning“ mit Biotinkonjugat	100	61	14	13
„Panning“ mit „magnetic beads“	100	-	4	3

Tab. 3.1 Übersicht über die erhaltenen Klone aus den „Pannings“ gegen Fumonsin B1. Im Vergleich zum „Panning“ gegen das Biotinkonjugat konnten durch die „Beads“-Methode lediglich vier Klone identifiziert werden, die über einen offenen Leserahmen verfügen. Von diesen vier Klonen wiesen drei identische Sequenzen auf.

3.2.3 Molekularbiologische Analyse der isolierten Klone

Klone aus der verwendeten scFv-Bank können sich im CDRH-3, der leichten Kette (*kappa* oder *lambda*) und dem CDRL-3 unterscheiden. Die isolierten Klone wiesen beide leichte Ketten des Typs *lambda* auf. Der angereicherte Klon unterschied sich nicht nur in der Aminosäuresequenz der Komplementaritäts-vermittelnden Bereiche, sondern auch in deren Länge. So hatten CDRH-3 und CDRL-3 des BFB1-02 eine Länge von acht bzw. neun Aminosäuren. Der BFB1-23 hingegen wies Längen von neun bzw. elf Aminosäuren auf (Abb. 3.5). Das Verhältnis der polaren zu den unpolaren Aminosäuren bei Klon 02 liegt in beiden CDR3s bei 2:1. Klon 23 weist hingegen Verhältnisse von 1:1 auf.

Aus der Selektion gegen „magnetic Beads“ gekoppeltes FB1 wurden zwei

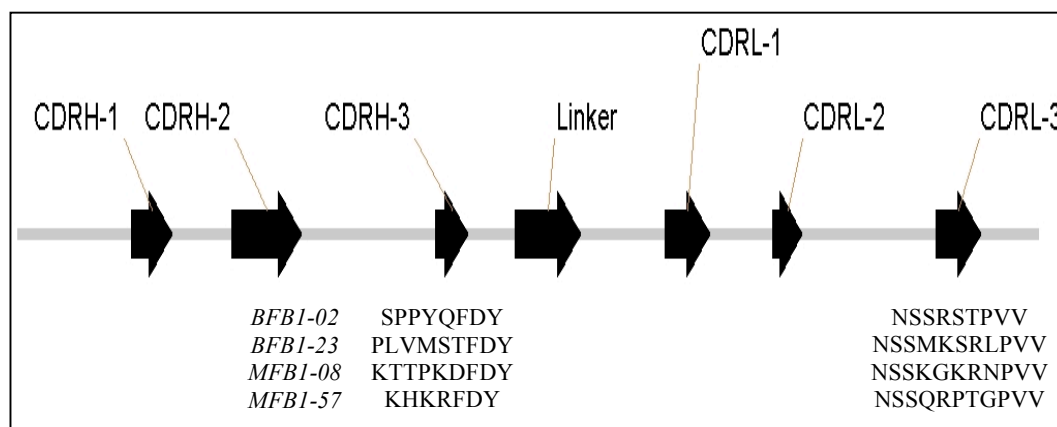


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der scFvs aus dem Panning mit Biotinlinker (BFB1) und „magnetic Beads“ (MFB1). Dargestellt sind die Komplementarität bestimmender Regionen der schweren (CDRH) und der leichten Kette (CDRL) sowie der Linker. Da sich die scFvs nur in den CDR3 unterscheiden, sind deren Aminosäuresequenzen gesondert dargestellt.

verschiedene scFvs gewonnen, von denen einer angereichert war. Die leichte Kette beider Klone ist dem *lambda*-Typ zuzuordnen. In der Länge der CDR3 unterscheiden sich die beiden Klone nur in der schweren Kette. Der MFB1-08 weist dort neun Aminosäuren auf, der MFB1-57 lediglich sieben. Bei beiden Klonen überwiegen im CDRH-3 die polaren Aminosäuren. Dieses trifft auch auf den CDRL-3 des Klons 08 zu. Bei Klon 57 hingegen besteht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen polaren und unpolaren Aminosäuren. Für alle weiteren Arbeiten wurde der MFB1-08 verwendet.

3.2.4 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen Biotin-Ochratoxin A-Konjugat (BOTA)

In der ersten Panningrunde gegen das Biotin-Ochratoxin-Konjugat (BOTA) wurden jeweils 1×10^{12} Phagen eingesetzt. Die Anzahl der eluierten Phagen betrug nach der ersten Selektionsrunde gegen das Biotin-Konjugat $3,82 \times 10^5$ Phagen (Abb. 3.6). Für die zweite Panningrunde wurden lediglich 1×10^{10} Phagen verwendet. Der Grund war die geringe Anzahl produzierter Phagenpartikel während der Amplifikation. Aus der zweiten Selektion wurden 3×10^3 Partikel erhalten. Für die dritte Runde der Selektion konnten aufgrund des geringen Titers nach der Amplifikation nur 2×10^{11} Einheiten eingesetzt werden. Die Elution nach der dritten Runde wurde zuerst in Form einer

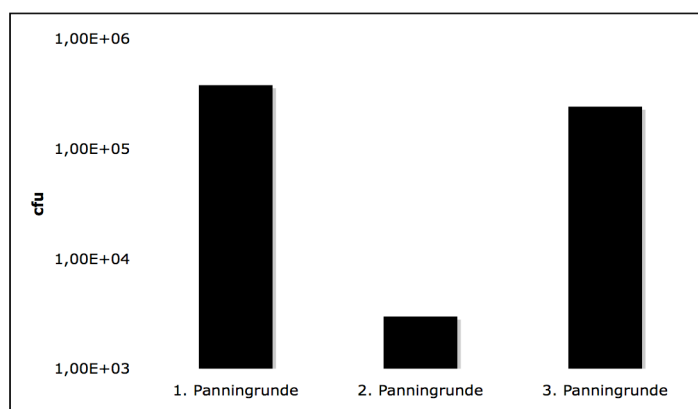


Abb. 3.6 Entwicklung der Titer beim Panning gegen Biotin gekoppeltes Ochratoxin A (BOTA). In der ersten Panningrunde wurden 1×10^{12} Phagen eingesetzt. In den folgenden zwei Runden 1×10^{10} bzw. 2×10^{11} Phagen. Die Menge der eluierten Phagen aus Runde 3 ergibt sich aus der Summe der kompetitiv und sauer eluierten Phagen.

kompetitiven Elution durchgeführt. Der daraus erhaltene Titer betrug $2,18 \times 10^5$. Die sich daran anschließende sauren Elution führte zur Isolierung von $2,45 \times 10^4$ Phagen. Aus der kompetitiven Elution der dritten Panningrunde wurden 100 Kolonien auf das Vorhandensein vollständiger scFv-Gene mit Hilfe der Kolonie-PCR überprüft. Von den überprüften Kolonien wiesen 78 auf dem Agarose-Gel die Banden richtiger Größe auf. Diese 78 wurden auf ihre Fähigkeit der Expression löslicher Antikörper überprüft. Dazu wurde der Überstand von Übernachtskulturen in einer PAGE aufgetrennt, geblottet und mittels „Immunostain“ auf das Vorhandensein von Proteinen getestet, die einen FLAG-Tag besitzen. 11 der untersuchten Klone erwiesen sich dabei als expressionsfähig. Sequenzidentität konnte bei keinem dieser erhaltenen Klone festgestellt werden. Die erhaltenen Klone aus der sauren Elution der dritten Panningrunde wurden mittels der DOC-Methode (2.2.1.13.9) auf ihre Expressionsfähigkeit untersucht. Von 100 untersuchten Kolonien konnten 10 positiv auf ihre Expressionsfähigkeit getestet werden. Bei der Analyse auf Sequenzidentität durch Sequenzierung wurde jedoch keine Übereinstimmung zwischen den 10 Klonen gefunden.

3.3 Modellierung der scFvs BFB1-02 und MFB1-08

Die erhaltenen Sequenzen wurden wie beschrieben modelliert, um ein dreidimensionales Modell der scFvs und ihrer Antigenbindungsstelle zu erhalten. Nach der Modellierung stellte sich heraus, dass die CDR3 der leichten und schweren Kette eine schmale Kavität bilden (Abb. 3.7). Diese hat eine Tiefe von ca. 18 Å und

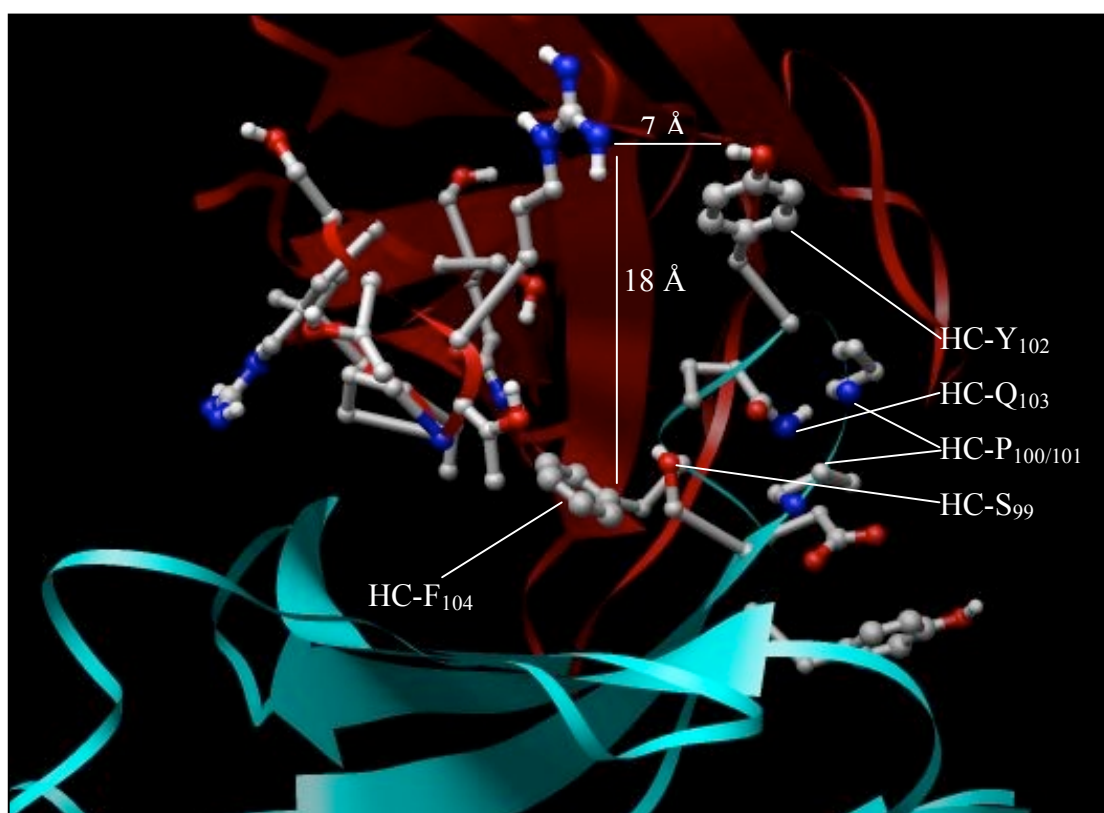


Abb. 3.7 Modellierung des scFv BFB1-02. Die Antigenbindungsstelle der schweren und der leichten Kette wurde in „ball and stick“ dargestellt. Für die Bereiche außerhalb der Bindungsstelle wurde die „cartoon“-Darstellungsweise gewählt. Die schwere Kette wurde in blau und die leichte Kette in rot dargestellt.

eine Breite von ca. 7 Å. Das Mykotoxin Fumonisin B1 weist eine Länge von 21 Å bei einer Breite von 6 Å auf. FB1 ist ein sehr polares Molekül, das bei neutralem pH-Wert negativ geladen ist.

Der scFv MFB1-08 weist eine lang gestreckte Antigenbindungsstelle auf (Abb. 3.8).

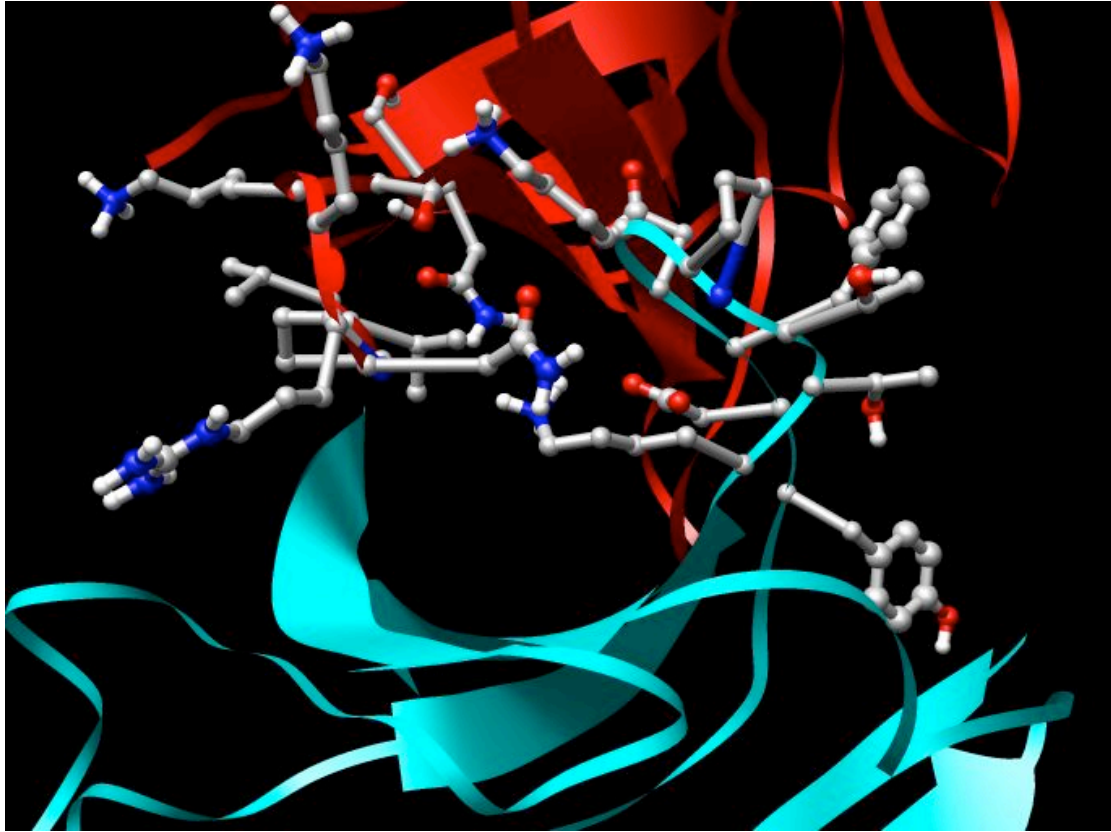


Abb. 3.8 Modellierung des MFB1-08. Für die schwere und leichte Kette des scFv wurde die „cartoon“-Darstellungsweise ausgewählt. Dabei wurde die schwere Kette in blau und die leichte in rot dargestellt. Für die antigenbindenden Bereiche beider Ketten wurde die „ball and stick“-Darstellungsweise verwendet.

3.4 Analyse der scFvs BFB1-02 und MFB1-08

3.4.1 Expression und Aufreinigung der scFvs

Der scFv wurde in einer 100 ml ÜNK exprimiert, über eine Protein A-Säule aufgereinigt und die erhaltenen Fraktionen zur Überprüfung der Reinheit auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt und mittels Silberfärbung angefärbt (Abb. 3.9). Die Fraktionen größter Reinheit wurden gepoolt und gegen den später zu

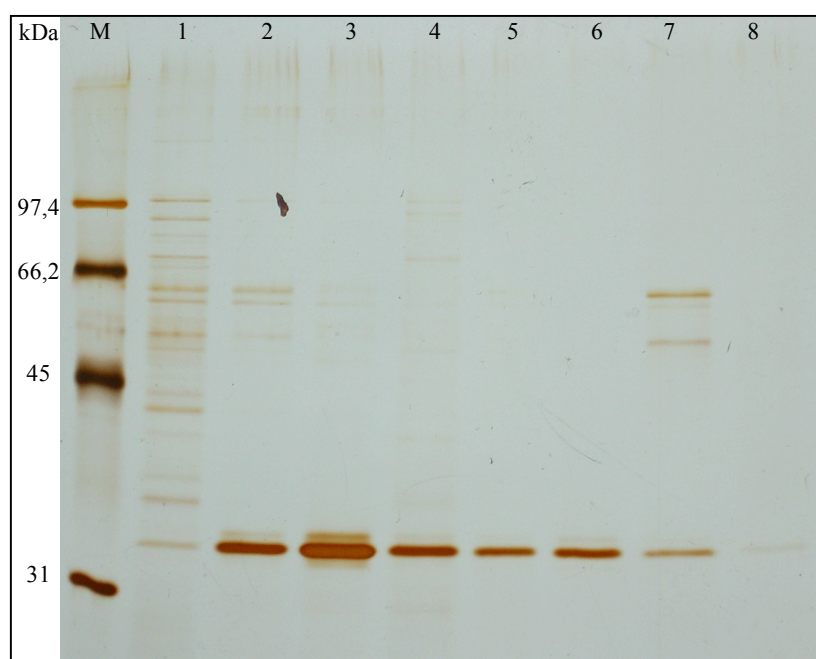


Abb. 3.9 Aufreinigung des scFv BFB1-02, aufgetrennt auf einem Polyacrylamidgel (12%) und mit Silber angefärbt. Aufgetragen wurden je 15 μ l der eluierten Fraktion (Bahn 1 – 8). Von dem Marker (M) wurden 10 μ l einer 1:100 Verdünnung aufgetragen.

verwendenden HBS-EP Puffer dialysiert. Nach der Dialyse schloss sich eine Konzentrationsbestimmung an. Dazu wurden 50 μ l des Dialysats mit 1x PBS 1:10 verdünnt und die Absorption bei 280 nm bestimmt und aus diesem Wert die in der Verdünnung enthaltene Proteinkonzentration berechnet. Von dem scFv wurden anschließend die für die Plasmonresonanzanalyse notwendigen Verdünnungen (500 nM, 250 nM, 200 nM, 125 nM, 100 nM und 50 nM) hergestellt.

3.4.2 Bestimmung des Dimeranteils in der scFv-Präparation

Vor der Durchführung der Plasmonresonanzanalyse wurden die dialysierten scFvs über eine „Size Exclusion Chromatography“ (SEC) auf das Vorhandensein von Dimeren überprüft, die zu fehlerhaften Messergebnissen in der späteren Affinitätsanalyse hätten führen können. Mit Hilfe der Chromatographie konnte gezeigt werden, dass der aufgereinigte scFv BFB1-02 zu über 90% in der Form eines Monomers vorlag (Abb. 3.10).

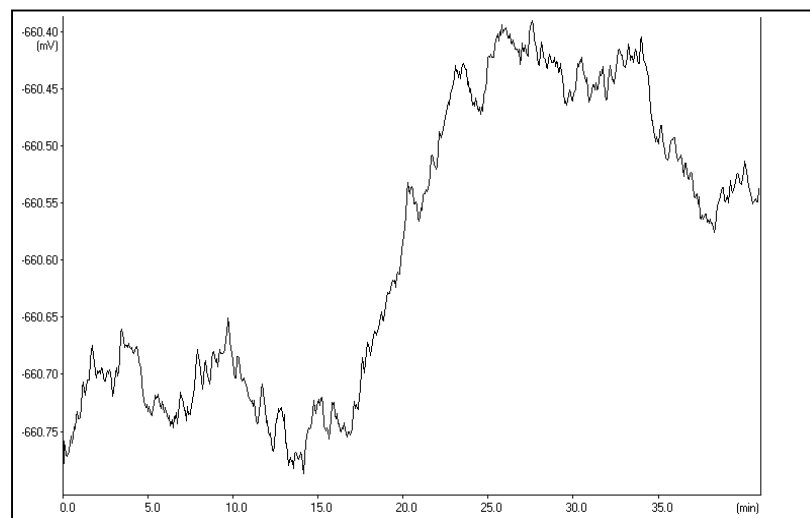


Abb. 3.10 Kontrolle der scFv Präparation auf Dimere. Die verwendete „Silica“-Säule (Bio-Rad SEC 250-5) wurde mit BSA auf 65 kDa kalibriert. Aufgereinigter scFv (über Protein A) wurde mit 1 ml/min aufgetragen (Gesamtvolumen 500 μ l) und bei gleicher Flussrate analysiert.

3.4.3 Affinitätsbestimmung der scFvs

3.4.3.1 Affinitätsbestimmung des scFvs BFB1-02

Die Affinität des aufgereinigten und überprüften BFB1-02 wurde mittels Plasmonresonanzanalyse auf einer Biacore 3000-Anlage untersucht. Dazu wurde eine Flusszelle eines Streptavidin-beschichteten Chips zuvor mit dem Biotin-Fumonsin B1-Konjugat beladen (Flusszelle 2) und eine weitere Flusszelle (Flusszelle 1) mit dem Linker. Der scFv wurde daraufhin erst über die Flusszelle 1 (Negativkontrolle) und danach über die Flusszelle 2 geleitet (Abb. 3.11). Der aus der Flusszelle 1 erhaltene Messwert wurde von dem Wert der zweiten Zelle abgezogen, um unspezifische Bindungen aus dem Ergebnis zu eliminieren. Die Messung mit einer Konzentration von 500 nM scFv zeigt zu Beginn der Injektion eine von 0 auf fast 40 RU ansteigende Kurve (Bindung des Antikörperfragments an das Antigen). Die Zunahme der Resonanzeinheiten weist auf eine Massenveränderung auf der antigenbeschichteten Seite des Chips hin. Nach dem Anstieg geht die Kurve in einen

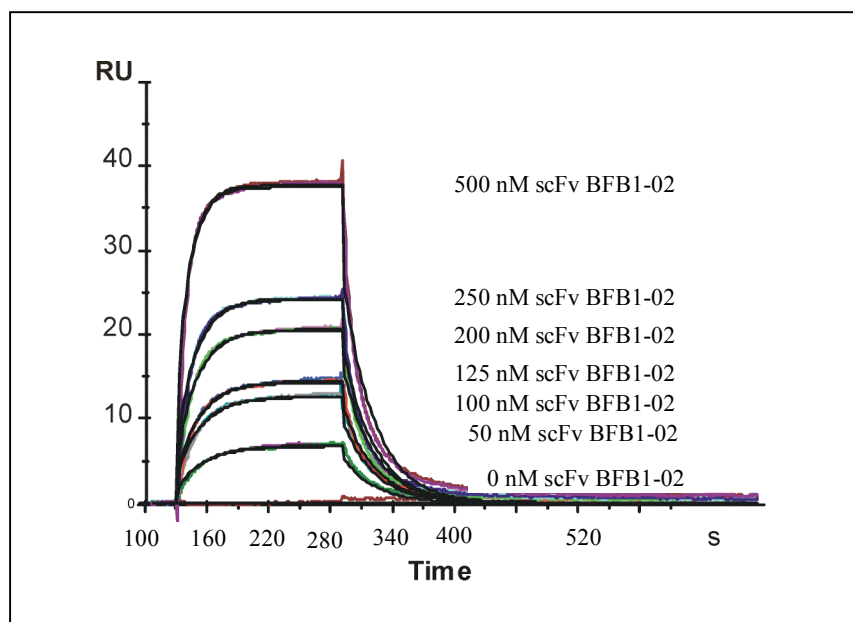


Abb. 3.11 Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-02 zum Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörpers über einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet.

Gleichgewichtszustand (die Anzahl der bindenden Fragmente ist gleich der Anzahl der dissoziierenden Fragmente) über. Mit Ende der Injektion liegt nur noch eine

Dissoziation vor, die mit einem Massenverlust einher geht und zur Verringerung der Resonanzeinheiten führt. Je affiner der Antikörper, desto flacher verläuft die Kurve. Diese Messung wurde mit sieben verschiedenen Konzentrationen (0 – 500 nM) scFv BFB1-02 durchgeführt. Die erhaltenen Messwerte wurden unter Zuhilfenahme der Software BIA-Evaluation 3.2 RC1 und unter der Annahme eines Bindungsverhältnisses von Antigen zu Antikörper von 1:1 (Langmuir 1:1 Bindungsmodells) analysiert. Die Bindungskonstante (K_D) wurde mit den Programmstandards berechnet und ergab einen Wert von $4,08 \times 10^{-7}$ M. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Massentransfer (dabei kommt es nach der Dissoziation u.a. zu einer erneuten Bindung) zu überprüfen, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dazu wurde eine bestimmte Konzentration an scFv mit verschiedenen Flussgeschwindigkeiten über die Flusszellen injiziert. Die erhaltenen Bindungskurven sollten sich kaum voneinander unterscheiden, da die Affinität nicht abhängig von der Flussgeschwindigkeit ist. Die erhaltenen Messkurven zeigten keinen Hinweis auf den Einfluss von Massentransfer auf die zuvor durchgeführten Messungen.

In weiteren Messreihen wurde der scFv BFB1-02 näher charakterisiert. Dazu wurde er u.a. hinsichtlich seiner Affinität zum nicht gekoppelten Antigen überprüft. In einer Konkurrenz sollte freies Antigen mit dem auf dem Chip gebundenen Antigen um die Bindungsstellen des scFvs konkurrieren. Sollte der scFv freies Mykotoxin binden

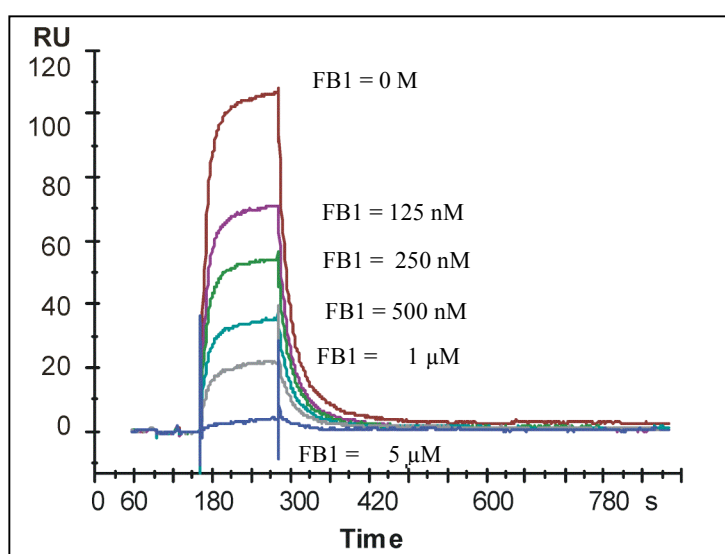


Abb. 3.12 Konkurrenz zwischen freiem Mykotoxin und Konjugat. Dazu wurden 500 nM scFv mit den angezeigten Mengen Fumonisin B1 für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Injektion der inkubierten Antikörper über den gekoppelten Chip.

können, würden mit zunehmender Konzentration weniger Antikörperfragmente an den Chip binden. Dazu wurden 500 nM des scFvs mit Konzentrationen an gelösten Fumonisin B1 von 0 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM und 1 μ M für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie schon zuvor beschrieben injiziert und über die Chipoberfläche geleitet. Bei der Probe, die kein freies Antigen enthielt, konnte die Bindung der meisten scFvs beobachtet werden. (Abb. 3.12). Mit zunehmendem Anstieg der Mykotoxinkonzentration banden immer weniger Antikörperfragmente an den Chip. Dieses äußerte sich durch immer flacher verlaufende Kurven. Bei einer verwendeten Konzentration von 5 μ M an freiem Fumonisin B1 verlief die Messkurve nur flach über dem Nullpunkt.

Um eine mögliche Kreuzreaktion mit ähnlichen Strukturen zu untersuchen, wurde eine Kompetitionsmessung mit Fumonisin B2 durchgeführt. Als Vergleich wurde außerdem eine Konkurrenz mit Fumonisin B1 vorgenommen. Wie schon zuvor beschrieben wurden 500 nM des scFvs mit 500 nM des entsprechenden Mykotoxins für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Antikörperfragment in einer Konzentration von 500 nM ohne den Zusatz von Mykotoxin analysiert. Die anschließende Messung führte zu folgendem Ergebnis. Die

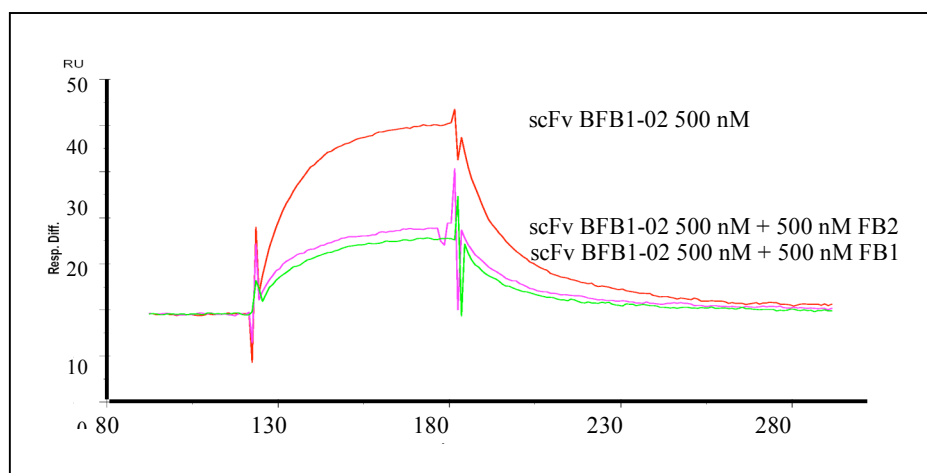


Abb. 3.13 Analyse der möglichen Kreuzreaktionen mit Fumonisin B2. Dazu wurden 500 nM scFv BFB1-02 mit 500 nM Fumonisin B2 für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Zum Vergleich wurde die gleiche Menge an scFv BFB1-02 mit 500 nM FB1 inkubiert. Als Negativkontrolle dienten 500 nM des Antikörpers ohne Mykotoxinzugabe.

Positivkontrolle ohne freies Mykotoxin erreichte den höchsten RU-Wert, was mit der stärksten Massenveränderung gleichzusetzen ist (Abb. 3.13). Die Kurve wies eine Höhe von ca. 45 RU auf. Bei den nachfolgenden Messungen, die den scFv (500 nM)

mit 500 nM an freiem Antigen (FB1 oder FB2) enthielten, verliefen die Kurven wesentlich flacher. Sie erreichten einen Wert von ca. 16 RU und verliefen fast deckungsgleich.

3.4.3.1 Affinitätsbestimmung des scFvs MFB1-08

Wie zuvor der BFB1-02 wurde auch der MFB1-08 vermessen (Abb. 3.14). Es wurde der gleiche Chip benutzt, nachdem eine Regeneration stattgefunden hatte, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch noch gebundene scFvs zu verhindern. Der MFB1-08 wurde in den Konzentrationen 500, 250, 200, 125, 100 und 50 und 0 nM über die Flusszellen injiziert. Bei keiner der Injektionen, unabhängig von den verwendeten Konzentrationen, wurde eine Massenänderung auf dem Chip beobachtet. Eine Dissoziationskonstante konnte somit nicht ermittelt werden. Die deutlich erkennbaren Ausschläge zu Beginn und zum Ende der Injektion sind auf

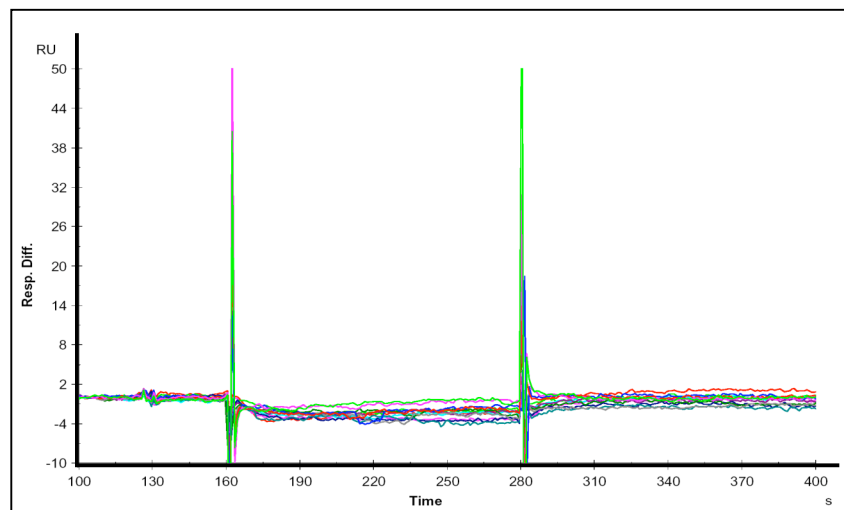


Abb. 3.14 Bindungsstudie des scFv MFB1-08 an das Fumonisin-Biotin-Konjugat. Dazu wurde der Antikörper in den Konzentrationen 500, 250, 200, 125, 100, 50 und 0 nM über den zuvor verwendeten Chip gegeben.

Veränderungen der Pufferzusammensetzung zurückzuführen. Diese beeinflussen den Refraktionsindex, stehen aber nicht mit einer Massenveränderung in Verbindung.

3.5 Mutagenese des scFv BFB1-02

Durch zwei Mutageneseansätze sollte die Avidität zum Antigen erhöht werden. Im ersten Ansatz erfolgte durch die Veränderung einer Base (Punktmutation) der Austausch einer Aminosäure. Parallel dazu wurde eine zufällige Mutation des gesamten scFvs mittels „error prone“-PCR durchgeführt.

3.5.1 Punktmutagenese des scFv BFB1-02

Mithilfe der PCR wurde der Austausch einer Base im CDRH-3 des scFv BFB1-02 vorgenommen. Dadurch wurde aus der Aminosäure Phenylalanin (HC-F₁₀₄) die Aminosäure Tyrosin (HC-Y₁₀₄). Durch das Ersetzen einer unpolaren Aminosäure mit einer polaren sollte die Bindung zwischen Antikörperfragment und Mykotoxin

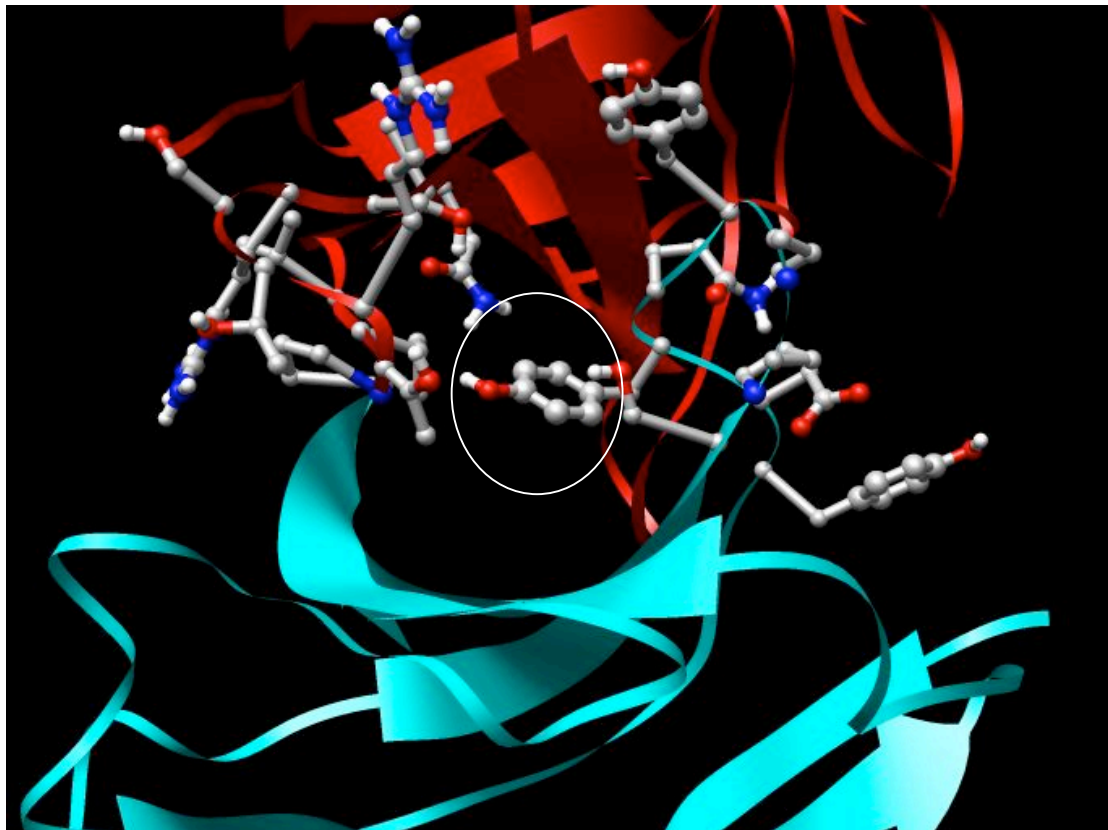


Abb. 3.15 Räumliches Modell des scFvs BFB1-02Y. Das Antikörperfragment entspricht in seiner Aminosäurezusammensetzung weitestgehend dem scFv BFB1-02 (Abb. 3.7). Lediglich HC-F₁₀₄ wurde gegen HC-Y₁₀₄ (Kreis) über eine Punktmutation ausgetauscht.

verstärkt werden und eine Erhöhung der Avidität bewirken. Der gelungene Austausch der Base konnte durch eine Sequenzierung (Anlage 3) belegt werden. Die Modellierung ließ auf den ersten Blick keine Unterschiede gegenüber dem unveränderten BFB1-02 erkennen (Abb. 3.15). Aus diesem Grund wurden die Modelle übereinander gelagert und auf mögliche Unterschiede hin begutachtet (Abb. 3.16). Durch die Überlagerung lässt sich erkennen, dass es im Bereich der Bindungsstelle nur zu geringen Veränderungen gekommen ist. Dabei handelt es sich um Positionsveränderungen von Wasserstoffatomen. Bis auf diese Veränderungen, scheint es zwischen beiden Antikörperfragmenten keine Unterschiede zu geben. Betrachtet man sich die Polarisierung der Antigenbindungsstellen (siehe Abb. 3.17), so lässt sich erkennen, dass es beim BFB1-02Y zu einer Polarisierung des Bodens der Tasche gekommen ist. Weitere Veränderungen lassen sich nicht ausmachen.

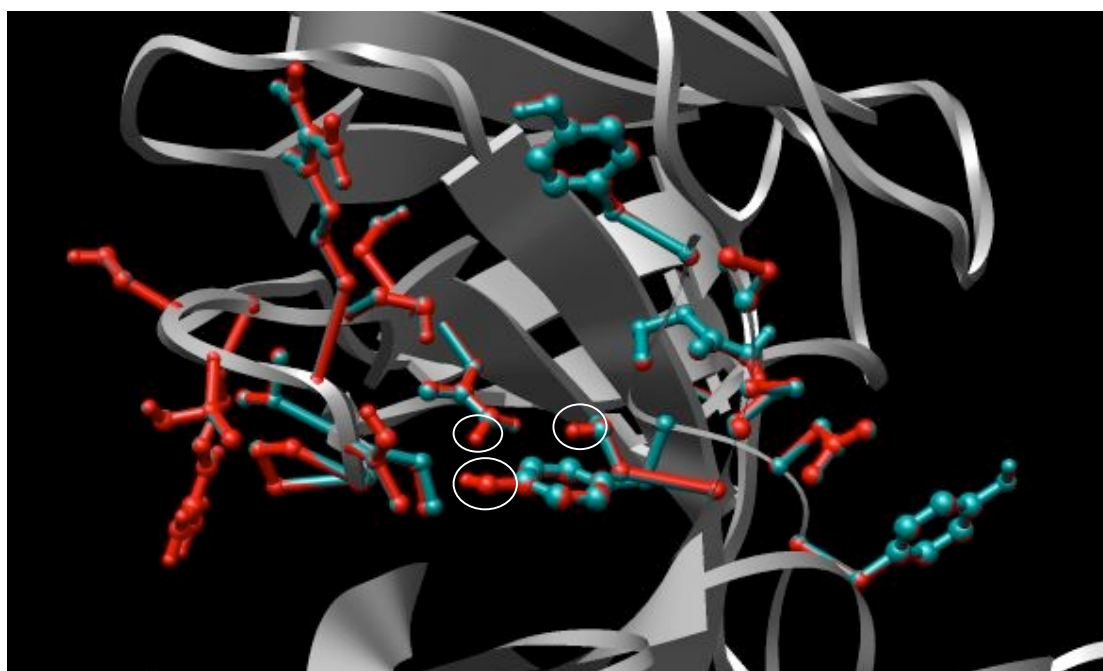


Abb. 3.16 Vergleich von scFv BFB1-02 mit BFB1-02Y. Dargestellt sind die antigenbindenden Bereiche beider scFvs in blau (BFB1-02) bzw. in rot (BFB1-02Y). Die restlichen Bereiche der schweren und der leichten Kette sind grau. Unterschiede zwischen beiden scFvs sind mit Kreisen markiert.

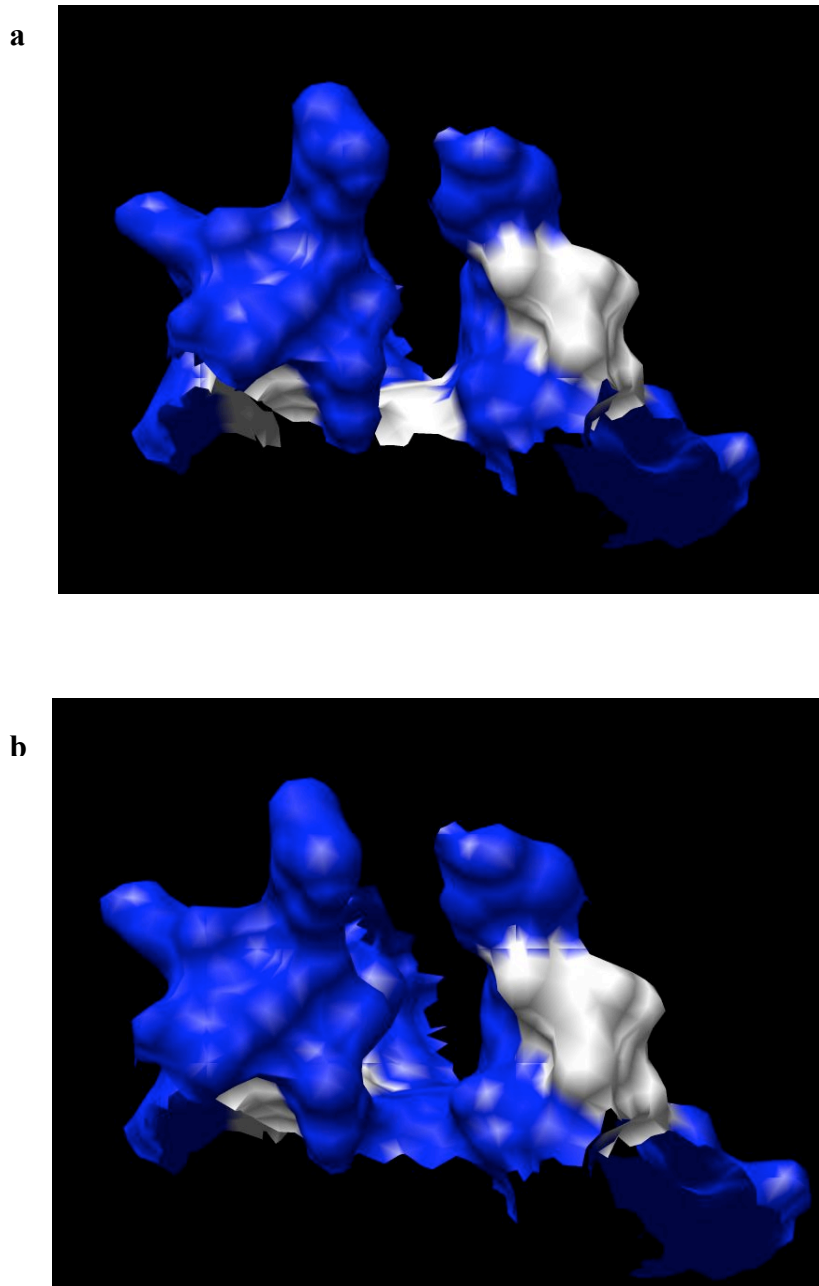


Abb. 3.17 Polarisierung der Antigenbindungsstelle vor und nach Austausch der Aminosäure Phenylalanin gegen Tyrosin. Dargestellt sind die Bindungsstellen der scFvs BFB1-02 (a) und BFB1-02Y (b). Die polaren Bereiche der Bindungstaschen sind blau eingefärbt.

3.5.2 Affinitätsbestimmung des scFv BFB1-02Y

Um die Affinität des mutagenisierten Antikörperfragments zu bestimmen, wurde wie zuvor eine Bindungsstudie mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Es wurden Injektionen von 0 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM und 1 μ M durchgeführt und

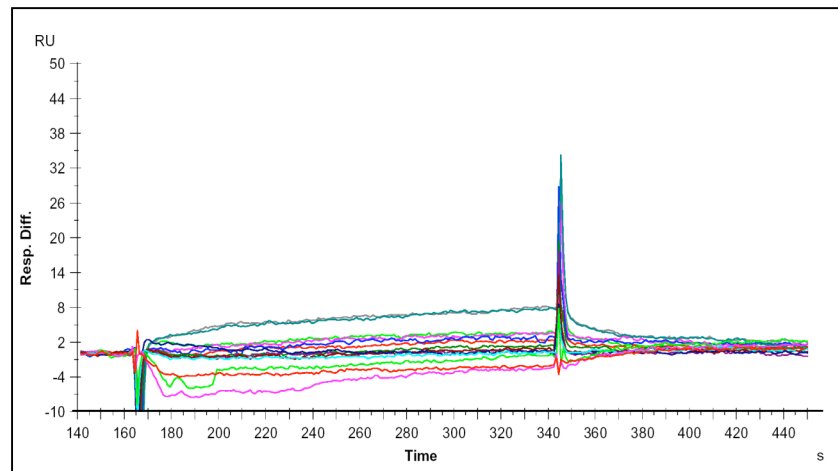


Abb. 3.18 Bindungsstudie des scFv BFB1-02Y an das Fumonisin-Biotin-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an Antikörper über den mit Fumonisin B1 gekoppelten Chip gegeben.

die Bindung an den mit FB1 gekoppelten Chip aufgezeichnet (siehe Abb. 3.18). Dabei zeigte sich eine geringe Bindung bei einer Konzentration von 1 μ M. Sie überstieg die Anzahl von acht Resonanzeinheiten nicht. Für die darunter liegenden Konzentrationen von 500 nM abwärts konnten keine Bindung beobachtet werden. Damit konnte durch den Austausch der Aminosäure keine Erhöhung der Avidität erreicht werden.

3.5.3 „Error prone“-Mutagenese des scFvs BFB1-02

Der Umfang der mutagenisierten BFB1-02.x-Bank wurde über den Titer nach der Transformation bestimmt. Demnach hatte die Bank eine Größe von $7,4 \times 10^5$ unabhängigen Klonen. Desweiteren wurde die Effizienz der Ligation überprüft. Dies geschah mittels Kolonie-PCR. Von 100 kontrollierten Klonen wiesen zwei keinen scFv auf. Da es mit der Methode der „ep“-PCR durchaus auch zum Entstehen von Stop-Codons kommen kann, wurde der Anteil der Kolonien mit offenem Leseraster

überprüft. Von 100 Kolonien, die mit Hilfe der Deoxycholat-Methode überprüft worden waren, zeigten 20 stärkeres Wachstum. Damit hätten 80% der überprüften Klone über einen offenen Leserahmen verfügt. Um mehr Informationen über die Mutageneserate zu bekommen, wurde von 10 Kolonien eine Plasmidpräparation und Sequenzierung durchgeführt. Zwei der überprüften Klone wiesen keinerlei Mutationen auf. Alle anderen wiesen zwischen 1 und 5 Mutationen auf. Diese waren über die gesamte Sequenz verteilt. Die durchschnittliche Anzahl der Mutationen der untersuchten Klone betrug 2,7. Ziel der „ep“-PCR waren 0 - 4,5 Mutationen/kb.

3.5.3.1 „Panning“ und Analyse der selektierten Klone gegen Biotin-Fumonisin B1-Konjugat

Für die erste Panningrunde gegen das Biotin-Fumonisin-Konjugat wurden 1×10^{10} Phagen eingesetzt, da der Titer nach der Amplifikation der Ausgangsbank bei $1,3 \times 10^{11}$ lag. Das Resultat der ersten Selektion war ein Titer von $3,45 \times 10^3$ Phagen (Abb. 3.19). Deren Amplifikation ergab die Anzahl von $4,35 \times 10^{13}$ cfu. Für die zweite Panningrunde wurden 1×10^{12} Phagen eingesetzt. Am Ende dieser Runde war ein

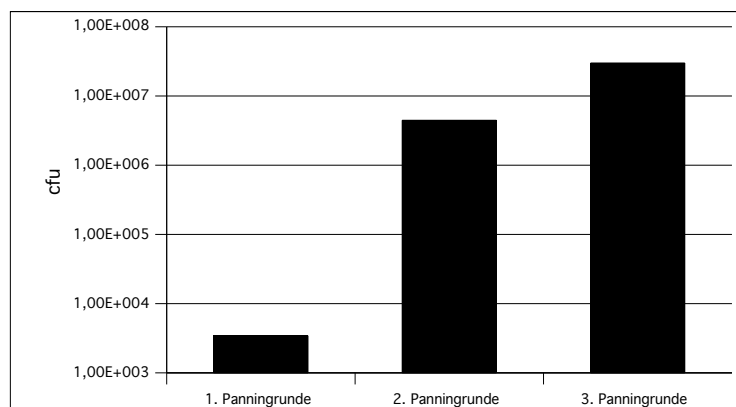


Abb. 3.19 Entwicklung der Titer beim Panning mit dem mittels „ep“-PCR mutagenisierten scFvs BFB1-02 gegen Biotin-gekoppeltes Fumonisin B1. Für die erste Panningrunde wurden 1×10^{10} Phagen eingesetzt. Für die weiteren Selektionen jeweils 1×10^{12} .

Titeranstieg zu verzeichnen ($4,47 \times 10^6$). Die Amplifikation ergab $2,76 \times 10^{13}$ Phagen. Für die Durchführung der dritten Runde wurden 1×10^{12} Phagen der vorherigen Vermehrung eingesetzt. Ein Titer von 3×10^7 war das Ergebnis. Die Sequenzierung der eluierten Phagen wies keine Anreicherung eines spezifischen Mutationsmusters auf. Alle sequenzierten Klone unterschieden sich in der Art und Position der Mutation.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung rekombinanter Antikörper (scFv) gegen die Mykotoxine Fumonisin B1 (FB1) und Ochratoxin A (OTA).

Ein gängiges Verfahren zu Herstellung von Antikörpern gegen Schimmelpilzgifte ist die Immunisierung von Tieren. Über diese klassische Methode konnten eine Reihe von Antikörpern gegen Mykotoxine hergestellt werden, u.a. gegen Fumonisin B1 (Yu *et al.*, 1999), Aflatoxin B1 (Gathumbi *et al.*, 2001), Diacetylnivalenol (Abouzied *et al.*, 1993) und Nivalenoltetraacetat (Wang CR *et al.*, 1991). Der überwiegende Teil dieser Antikörper liegt in Form von IgGs vor. Viele dieser Antikörper können das Mykotoxin nur in Form eines Konjugats erkennen und sind daher für eine Anwendung nicht geeignet. Ein Bruchteil liegt in anderen Antikörperformaten wie scFvs vor. So werden scFvs gegen Deoxynivalenol (Choi *et al.*, 2004), Aflatoxin B1 (Moghaddam *et al.*, 2001), Zearalenon (Yuan *et al.*, 1997) und Fumonisin B1 (Zhou *et al.*, 1996) beschrieben. Von diesen beschriebenen Antikörperfragmenten entstammt lediglich der anti-Aflatoxin B1 einer naiven scFv-Bank. Alle anderen beschriebenen Fragmente wurden aus existierenden IgGs subkloniert. Dazu wird die genetische Information über den Antikörper benötigt. Diese muss mühsam über DNA-Extraktion und PCR aus der bestehenden Zellkultur gewonnen werden. Um diesen Nachteil und den der Toxizität zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein anderes Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern angewandt. Anstatt durch Immunisierung von Tieren, wurden die Antikörper *in vitro* generiert. Dieses geschah durch Verwendung von Antikörperbanken in Verbindung mit „Phage Display“.

Die Gewinnung von Antikörpern gegen Mykotoxine wird einerseits durch ihre Toxizität, andererseits durch ihre geringe Größe erschwert. Sie lösen im Organismus keine Immunantwort aus. Solche Moleküle werden auch als Haptene bezeichnet. Dieses Hindernis wird in der Regel durch die Kopplung an Trägermoleküle umgangen. Dabei handelt es sich meistens um ein Trägerprotein wie BSA (Wilkinson *et al.*, 2003; Burmester *et al.*, 2001). Die Kopplung an Trägerproteine kann aber auch einen gravierenden Nachteil haben. Die gegen ein solches Konjugat selektierten Antikörper sind oft nur gegen die Kombination aus Protein und Hapten spezifisch. Das ungekoppelte Molekül wird hingegen nicht oder nicht mit der gleichen Affinität detektiert (Charlton *et al.*, 2001; Moghaddam *et al.*, 2001). Um dieses Problem bei der *in vitro* Selektion von

Antikörpern zu vermeiden, wurden für die Kopplungsreaktion „magnetic Beads“ bzw. Biotin mit einem Linker eingesetzt. Für die Selektion rekombinanter Antikörper wurde das gekoppelte Antigen mit den Phagen inkubiert, die auf ihrer Oberfläche Einzelkettenantikörper aufwiesen. Diese würden bei vorhandener Affinität zum Mykotoxin an dieses binden. Nach Ablauf der Inkubation schloss sich eine Waschprozedur an, in der unspezifisch bindende und nicht bindende Phagen entfernt wurden. Der spezifisch bindende Anteil wurde eluiert und für die Infektion von Bakterien genutzt. Mit Hilfe des Wirts fand die Amplifikation der selektierten Phagen statt, die aufgereinigt und erneut in den Selektionsprozess eingesetzt wurden. Mit jeder Selektionsrunde sollte der Anteil spezifisch bindender Phagen an der Gesamtpopulation steigen.

4.1 Kopplung der Mykotoxine

Die Kopplung der Mykotoxine wurde sowohl bei den „Beads“ als auch dem Biotinlinker über die Carbodiimidmethode (2.2.1.13.1) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Reaktion, die standardmäßig für die Kopplung von Haptenen an Trägermoleküle verwendet wird (Got *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2002; Albers *et al.*, 2002). Die Kopplung von Haptenen direkt an einen auf den „magnetic Beads“ befindlichen Linker in Verwendung mit „Phage Display“ Bibliotheken für die Selektion von rekombinanten Antikörpern, wurde in der Form in der Literatur noch nicht beschrieben. Das Hapten wird zumeist erst an ein Trägermolekül (wie z.B. BSA) gekoppelt und dieses dann biotinyliert. Auf diese Weise lässt sich das Hapten an streptavidin-beschichtete „Beads“ binden (Tsuruta *et al.*, 2003). Vorteil dieser Trägermatrix sind u.a. größere Oberfläche für die Bindung, Vereinfachung der Waschprozedur und gezielte Ausrichtung der Bindedomänen (McConnel *et al.*, 1999). Eine Alternative ist die direkte Kopplung des Haptens an einen Biotinlinker (Brockmann *et al.*, 2005).

Der Einsatz von Biotinlinkern wurde bereits zuvor für die Selektion von Fab gegen Testosteron beschrieben (Valjakka *et al.*, 2002). Es standen jedoch keine Kopplungsprotokolle zur Verfügung, da die verwendeten Linker bisher zur Markierung bzw. Immobilisierung von Proteinen eingesetzt wurden. Aus diesem Grund musste zunächst ein Protokoll erarbeitet werden. Grundsätzlich wäre es möglich gewesen, das Konjugat käuflich zu erwerben, wie z.B. beschrieben bei der Selektion gegen Monoacetylmorphin (Moggadham *et al.*, 2003). Diese Möglichkeit

cetylmorphin (Moggadham *et al.*, 2003). Diese Möglichkeit wurde aber verworfen, da es sich um eine Standardkopplungsreaktion handelte.

Bei den verwendeten Biotinlinkern gab es verschiedene Linkerlängen zur Auswahl. Sie wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- der Abstand zwischen Hapten und Matrix sollte groß genug sein, um dem scFv einen freien Zugang zu ermöglichen
- der Linker durfte andererseits nicht zu lang sein, da er mit zunehmender Länge unlöslicher wird

Ein genereller Vorteil der Biotinlinker gegenüber den „Beads“ war, dass das entstehende Konjugat sowohl für den Selektionsprozess, als auch für die spätere Bindungsanalyse mittels Oberflächenplasmonresonanz zu verwenden war.

Kopplung von Fumonisin B1

Fumonisin B1 stellt ein Hapten von ca. 720 Da mit reaktiven Amino- und Carboxylgruppen dar (Abb. 1.5). Für die Kopplungsreaktionen wurde das primäre Amin ausgewählt, um die Carboxylgruppen an den Seitenketten für den späteren Selektionsprozess auszunutzen.

Die Kopplung an die „magnetic Beads“ wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Als Nachteil stellte sich heraus, dass der Nachweis der erfolgreichen Bindung mit herkömmlichen Methoden nicht möglich war. Der Hersteller selber überprüft seine Kopplungsprotokolle mit Hilfe von fluoreszierenden Molekülen, die an die „Beads“ gekoppelt werden. Dieses ließ sich mit dem Antigen aber nicht durchführen. Auch der Versuch, eine Verringerung der Mykotoxinkonzentration mit einem Detektionskit der Firma r-biopharm (ELISA) nachzuweisen, scheiterte.

Fumonisin B1 wurde für die Kopplung im Überschuss eingesetzt. Die Menge, die durch die Beads gebunden werden konnte, entsprach hingegen nur einem Bruchteil der eingesetzten. Um eine Veränderung zu messen, hätte man mit dem Detektionskit wesentlich geringere Konzentrationsunterschiede detektieren müssen. Es besteht aber kein Grund zur Annahme, dass die Kopplung nicht funktioniert hat, da es sich dabei um eine etablierte und häufig verwendete Methode handelt.

Die Kopplung an den Biotinlinker wurde mit der gleichen Methode durchgeführt. Ein weiterer Vorteil der Verwendung des Biotinlinkers ist die geringe Größe des damit verwendeten Kopplungspartners. So hatte der für die Kopplung von FB1 eingesetzte

Linker ein Molekulargewicht von lediglich 454,4 Da, und war damit kleiner als das zu koppelnde Hapten. Seine vereinfachte Struktur im Vergleich zu Trägerproteinen ließ zudem vermuten, dass es nicht zur Selektion von Antikörpern gegen den Linker selber kommt. Der verwendete Biotinlinker hatte eine Länge von 22,4 Å. Um zu gewährleisten, dass der Großteil des eingesetzten Linkers mit dem Hapten reagiert, wurden die Mykotoxine im zehnfachen Überschuss eingesetzt. Der Erfolg der Kopplungsreaktionen konnte indirekt über Oberflächenplasmonresonanz nachgewiesen werden. Dazu wurde das Konjugat an einen Streptavidin-beschichteten Chip gebunden und über die Anlagerung eines monoklonalen Antikörpers gegen Fumonisin B1 an das Konjugat nachgewiesen.

Kopplung des Ochratoxins A

Beim Ochratoxin A musste ein anderer Linker (EZ-Link™ Biotin-LC-PEO-Amine, 22,91 Å) verwendet werden. Dieser war nur geringfügig länger, als derjenige der für die Kopplung von Fumonisin B1 eingesetzt wurde. Ochratoxin A wies zwar auch eine Aminogruppe auf (Abb. 1.6), dabei handelte es sich aber nicht um eine primäre, die für die erfolgreiche Kopplung an den EZ-Link™ NHS-LC-Biotin erforderlich ist. Stattdessen wurde die Carboxylgruppe für die Kopplungsreaktion genutzt.

4.2 Die ETH-2 „Library“

Bei der verwendeten Antikörperbank handelte es sich um die ETH-2 „Library“, die nur aus drei verschiedenen Keimbahn-Genen besteht. Dabei ist das Keimbahn-Gen der schweren Kette immer gleich (DP47), während die leichte Kette das Gen DPK22 oder DPL16 aufweist. Die Variabilität dieser Bank wurde über die Mutagenese der CDR-3s erzeugt. Der CDR3 der leichten und der schweren Kette ist der variabelste Bereich eines Antikörpers, wobei der CDRH-3 die größte Variabilität hat, aus 3-25 Aminosäuren besteht (Wu *et al.*, 1993; Shirai *et al.*, 1996; Shirai *et al.*, 1999) und die zentrale Funktion bei der initialen Bindung vom Antikörper an das Antigen hat (Padlan *et al.*, 1994). Die Größenordnung der Bank liegt bei 3×10^8 unabhängigen Klonen. Damit wies sie im Vergleich zu anderen Antikörperbanken eine durchschnittliche Größe auf (Hust *et al.*, 2004). Ihr Nachteil liegt darin, dass es sich um eine „single

framework“ Konstruktion handelte. Dadurch wurde die Diversität der Bindungsmöglichkeiten stark reduziert, denn die Bereiche außerhalb der CDR3 trugen in hohem Maße zur Affinität und Diversität bei (Honegger *et al.*, 2001). Mit Verwendung der Keimbahn-Gene DP47 bzw. DPK22 hatte man die Gene verwendet, die das funktionale Repertoire der menschlichen Antikörper dominieren (Kirkham *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 1994). Eine Vielzahl von spezifisch bindenden scFvs, die aus synthetischen Banken isoliert wurden, sind aus den verwendeten Keimbahn-Genen zusammengesetzt (Griffiths *et al.*, 1994). Auch von ihren biophysikalischen Eigenschaften her boten die scFvs dieser Bank einen Vorteil. So lassen sich V_{H3} -Domänen (DP47) ohne das Entstehen von „inclusion bodies“ und Dimeren in *E.coli* exprimieren und die Kombination aus V_{H3} und V_{λ} stellte die stabilsten der untersuchten scFv-Kombinationen dar (Ewert *et al.*, 2003). Insgesamt überwiegen damit die Vorteile der Bank.

Mit zunehmender Anzahl von Amplifikationen nimmt die Menge der Klone zu, die nur eine unvollständige oder kein scFv-Gen tragen. Fehlende scFv-Gene sind auf einen unvollständigen Verdau oder Selbstligation des Phagemids bei der Herstellung der Bank zurückzuführen und wurden schon mehrfach beschrieben (Seehaus *et al.*, 1992; Courtney *et al.*, 1995; Krebber *et al.*, 1997; Berdichevsky *et al.*, 1999). Diese werden bei Amplifikationen bevorzugt amplifiziert, was ein Problem darstellt. Aus diesem Grund wurde die erste Amplifikation der ETH-2 „Library“ auf unvollständige Phagemide untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass alle der untersuchten Klone Vektoren mit kompletten Inserts trugen (Abb. 3.1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Bank zum ersten Mal für die Selektion gegen Haptene eingesetzt.

4.3 Selektion gegen Mykotoxinkonjugate

Selektion gegen das Biotin-FB1- Konjugat (BFB1)

„Panning“ gegen das Biotin-FB1- Konjugat (BFB1)

Bei dem „Panning“ gegen das Biotin-FB1- Konjugat fällt die Abnahme der Anzahl eluierter Phagen in der zweiten Panningrunde auf (Abb. 3.2). Die Erwartung eines Titeranstiegs durch die Selektion spezifischer bindender Phagen und deren Amplifikation in der ersten Runde wurde nicht erfüllt. Die Ursache ist in der nur geringen Amplifikationsrate der ersten Panningrunde zu suchen. Aus diesem Grund konnten nur 2×10^{10} Phagen in der zweiten Runde eingesetzt werden. Das Problem der geringen Partikelanzahl nach der Amplifikation ist auf die Verwendung des Helferphagen „Hyperphage“ zurückzuführen. Bei diesem handelt es sich um das Derivat M13KO7 Δ pIII (Rondot *et al.*, 2000), welchem der ORF für *pIII* fehlt. Dieser kann somit nur in einem Wirt produziert werden, der das Gen für dieses Protein aufweist. Das bedeutet, dass bei Verpackung des späteren Phagen das *pIII* nur in Form eines Fusionsproteins zur Verfügung steht. Beim Wildtyp des Helferphagen liegt hingegen ein intaktes *pIII* vor, weswegen bei der Verpackung der Phagen in der Mehrzahl kein Fusionsprotein eingesetzt wird. Als Folge daraus weist die Mehrzahl der mit herkömmlichen Helferphagen produzierten Phagen kein Fusionsprotein und damit keinen Antikörper auf (Rondot *et al.*, 2000). Der Nachteil einer geringeren Produktion an Phagen wird durch eine höhere Rate an scFv-tragenden Phagen ausgeglichen. In einem anderen Ansatz wurde innerhalb des *pIII* Proteins eine Schneidesequenz für Trypsin integriert, die aber im Fusionsprotein fehlt (Goletz *et al.*, 2002). Inkubiert man nach der Selektion die eluierten Phagen mit der Protease, verlieren alle Virionen ohne Fusionsprotein ihre Infektiosität.

Eine weitere Ursache für den Abfall des Titers in der zweiten Runde war die Anreicherung von Phagen mit unvollständigem oder nicht vorhandenem scFv. Auch wenn die Kontrolle der Bank vor dem „Panning“ keinen Hinweis auf solche Phagen gegeben hatte, war es dennoch nicht ausgeschlossen, dass diese vorhanden waren. Diese werden bevorzugt amplifiziert und reichern sich mit jeder Runde an, wie sich später zeigen sollte.

Mit der dritten Panningrunde kam es hingegen zu einem starken Anstieg der eluierten Phagen, um mehr als den Faktor 100. Obwohl die Amplifikationsraten der zweiten Runde nicht viel höher als die der vorhergehenden waren und somit wiederum weni-

ger Virionen als zu Beginn eingesetzt wurden, konnte ein Titeranstieg verzeichnet werden. Ursächlich hierfür war die weitere Anreicherung spezifisch bindender Phagen aus der zweiten Panningrunde, wie sich während der nachfolgenden Analyse zeigte. Hervorzuheben ist, dass nach Etablierung des Systems eine Selektion innerhalb von 14 Tagen durchgeführt werden konnte und dabei auf die Verwendung von Tieren gänzlich verzichtet werden konnte.

Analyse der Selektion gegen das Biotin-FB1- Konjugat (BFB1)

Nach der dritten Panningrunde wurde auf das Vorhandensein des scFv-Gens, die Expressionsfähigkeit und die Nukleotidsequenz hin untersucht. Die Vollständigkeit des scFvs wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Dieses war erforderlich, da es bei jeder Amplifikationsrunde zu einer Anreicherung von Phagen kommt, die entweder kein scFv-Gen (Tur *et al.*, 2001) oder nur ein unvollständiges besitzen. Diese haben während der Amplifikation einen Vorteil. So zeigte sich, dass der Anteil an Phagen ohne Insert innerhalb von zwei Panningrunden von anfangs 1% auf 60% ansteigen kann (de Bruin *et al.*, 1999). Um diese Phagen auszusortieren wurden 100 Klone der Elution zuerst mittels PCR auf die Vollständigkeit ihrer scFv-Gene überprüft. Für das „Panning“ gegen FB1 konnten 66 von 100 als scFv tragend erkannt werden. Dieses sprach für die Qualität der verwendeten Bank, da es nicht zu einer übermäßigen Anreicherung unvollständiger Phagemide gekommen war. Anschließend mussten die positiv erkannten Klone auf ihre Expressionsfähigkeit hin überprüft werden. Dazu wurde der Überstand aus Kulturen elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Antikörper im „Immunostain“ nachgewiesen. Für 14 der untersuchten Klone konnte ein positiver Nachweis erbracht werden (3.2.1). Die Ursache dafür ist darin zu suchen, dass es zur Anreicherung von Phagen kommen kann, deren scFv keinen ORF aufweist. Dieser kann durch Stopcodons, Leserasterverschiebungen oder beides unterbrochen sein (Cárcamo *et al.*, 1998). Die exprimierbaren Klone wurden sequenziert, um herauszufinden, ob eine Anreicherung stattgefunden hatte. Dabei stellte sich heraus, dass von den 14 exprimierbaren Klonen aus dem „Panning“ gegen BFB1 13 gleicher Sequenz waren (Tab. 3.1), was deutlich für eine erfolgreiche Anreicherung gegen das Biotin-Konjugat spricht. Von diesen wurde Klon Nummer 2 (BFB1-02) für die weiteren Analysen verwendet.

Selektion gegen das „magnetic Beads“-FB1-Konjugat (MFB1)

„Panning“ gegen das „magnetic Beads“-FB1-Konjugat (MFB1)

Das „Panning“ gegen Fumonisin B1 mit Hilfe der „magnetic Beads“ wurde mit 1×10^{12} Phagen begonnen. In allen „Pannings“ wurden 1×10^9 „Beads“ eingesetzt. Wie erwartet, wurde nach der ersten Runde nur eine geringe Anzahl von Phagen eluiert (Abb. 3.4). Diese war aber um den Faktor 25 geringer als im „Panning“ gegen das Biotinkonjugat. Dieses sollte sich aber mit der zweiten Runde ins Gegenteil verkehren. Die Anzahl der eluierten Phagen stieg um mehr als das 100fache an. Die Ursache hierfür lag einerseits in der größeren Menge an eingesetzten Phagen (Faktor fünf) im Vergleich zum „Panning“ gegen das Biotin-FB1-Konjugat, da die Amplifikation besser ausgefallen war. Andererseits kann die höhere Zahl eluierter Phagen auch mit der unspezifischen Bindung an das Reaktionsgefäß begründet werden, dessen Oberfläche im Vergleich zu den im BFB1-„Panning“ verwendeten Mikrotiterplatten erheblich größer war.

Bereits während der ersten Panningrunde wurden die Nachteile der „Beads“-Methode deutlich. Das Verfahren zog sich über mehrere Stunden hin, da das Anlagern der Kugeln an den Magneten längere Zeit in Anspruch nahm. Im Vergleich dazu konnte bei der Biotinlinkervariante der Wasch und Elutionsvorgang innerhalb einer halben Stunde abgeschlossen werden. In Versuchen zeigte sich, dass es mit steigender Anzahl an „Beads“ zunehmend schwieriger wurde, diese in ihrer Gesamtheit zu binden. Trotz der langen Wartezeiten konnte ein Verlust nicht verhindert werden. Wie bei der Selektion gegen BFB1 muss aber auch hier die Schnelligkeit des Verfahrens gegenüber der herkömmlichen Immunisierung betont werden.

Analyse der Selektion gegen das „magnetic Beads“-FB1-Konjugat (MFB1)

Zu Beginn der Arbeiten wurden die erhaltenen Klone mit einer Kombination aus Kolonie-PCR (2.2.1.7), Expression (2.2.2.1) und „Immunostain“ (2.2.2.7) analysiert. Dies erwies sich als material- und zeitaufwendig. Aus diesem Grund wurde später eine andere Methode eingesetzt, die auf der Veränderung der bakteriellen Membran durch das *pIII* der Phagen basiert (Boeker *et al.*, 1982). Bei erfolgreicher Expression des *pIII* zeigt der Wirt eine Empfindlichkeit gegenüber dem Detergenz Deoxycholat, was sich in reduziertem Wachstum äußert (Li *et al.*, 2002). Klone, die einen vollständigen scFv mit ORF besitzen, bilden nur sehr kleine Kolonien aus. Auf diese Weise

war es möglich, 100 Kolonien innerhalb von drei Tagen zu analysieren (2.2.1.13.9). Die Klone reduzierten Wachstums mussten dann nur noch auf ihre Sequenz hin überprüft. Insgesamt zeigten nur vier von 100 Kolonien auf dem mit Deoxycholat versetzten Nährboden reduziertes Wachstum. Bei der Sequenzierung stellte sich heraus, dass von diesen vier Klonen drei gleicher Sequenz waren (Tab. 3.1) Von diesen drei Klonen wurde der Klon MFB1-08 für weitere Analysen eingesetzt. Die Ursache kann, wie bereits vorher beschrieben, in dem großen Volumen der verwendeten Reaktionsgefäße gesehen werden, deren Oberfläche viele Möglichkeiten zur unspezifischen Bindung bot.

Selektion gegen das Biotin-OTA-Konjugat (BOTA)

„Panning“ gegen das Biotin-OTA-Konjugat (BOTA)

Aufgrund der erfolgreichen Selektion gegen das Biotin-FB1-Konjugat wurde die Selektion gegen Ochratoxin A nur mit dem Biotin-Konjugat durchgeführt. Im Vergleich zu ersten Panningrunde gegen das FB1-Biotin-Konjugat wurde nur ein Sechstel der Phagenmenge eluiert (Abb. 3.6). In Verbindung mit der niedrigen Amplifikationsrate, der geringen Menge an eingesetzten Phagen für die zweite Panningrunde ist darin der Grund zu sehen, dass die Anzahl der eluierten Phagen in der zweiten Runde sehr niedrig war. Wie schon zuvor bei dem „Panning“ gegen Biotin-FB1 beobachtet, stieg die Anzahl der eluierten Phagen in der dritten Selektionsrunde stark an. Dies ist einerseits mit einer größeren Phagenmenge, die für die dritte Selektionsrunde eingesetzt wurde, andererseits mit einer möglichen Anreicherung zu erklären. Im Gegensatz zum vergleichbaren „Panning“ mit FB1 wurden hier zwei verschiedene Elutionsmethoden angewandt. Zuerst wurde eine kompetitive Elution durchgeführt. Dazu wurde dem Puffer ungebundenes Ochratoxin A zugesetzt. Dieses sollte in Konkurrenz mit dem Konjugat treten und die Elution affiner scFvs gegen freies OTA ermöglichen. Diese Methode hatte sich bei der Selektion gegen Aflatoxine bewährt (Moggadham *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde eine saure Elution durchgeführt. Im Vergleich mit kompetitiver Elution, gelingt es dadurch auch die hochaffinen Antikörper zu erhalten (de Bruin *et al.*, 1999). Durch die Konkurrenz wurde die fast zehnfache Menge an Phagen gewonnen.

Analyse der Selektion gegen das Biotin-OTA-Konjugat (BOTA)

Sowohl aus der kompetitiven als auch der sauren Elution wurden jeweils 100 Kolonien überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass der Anteil der exprimierbaren Klone in beiden Ansätzen fast gleich hoch war (10 bzw. 11). Aus dem „Panning“ gegen BOTA konnten jedoch keine angereicherten Klone identifiziert werden. Trotzdem wurden einzelne Klone exprimiert und mittels Oberflächenplasmonresonanz auf ihre Bindungsfähigkeit an das Konjugat überprüft. Es konnte jedoch für keinen der untersuchten scFvs eine Affinität gegen BOTA festgestellt werden. Die Ursache hierfür kann in der Art der Kopplung gesehen werden. Durch Kopplung des Biotinlinkers an die Carboxylgruppe des Ochratoxins A wurde eine für eine mögliche Bindungen wichtige Gruppe eliminiert. Die Bindung von Antigen an Antikörper erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Kräfte, van-der-Waals Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Dabei handelt es sich um reversible, schwache Bindungen, die durch die hohe Anzahl an Bindungsstellen sehr stark werden kann. Im Fall von Ochratoxin A handelt es sich jedoch um ein Molekül von lediglich 403 Da. Die Anzahl der möglichen Bindungen ist somit begrenzt. Die Eliminierung der Carboxylgruppe kann daher die Ursache für die nicht erfolgte Anreicherung von scFvs sein. Fumonisin B1 war mit über 700 Da fast doppelt so groß und wies zudem vier Carboxylgruppen auf, die es sehr polar machten.

4.4 Analyse BFB1

Bestimmung der Affinitäten der scFvs BFB1-02 und MFB1-08

Es wurde mit den Klonen BFB1-02 und MFB1-08 weitergearbeitet. Vorteil der vorliegenden Bank war die Möglichkeit der Aufreinigung über Protein A, da die schwere Kette immer aus dem Keimbahn-Gen DP47 besteht (Hogenboom *et al.*, 1992). Dieses ermöglichte eine sehr spezifische Aufreinigung (Abb. 3.9). Durch „Size Exclusion Chromatography“ konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Teil des scFvs als Monomer vorlag (Abb. 3.10).

Nach Aufreinigung und Umpufferung wurden der BFB1-02 und MFB1-08 in einer Biacore 3000-Anlage analysiert. Diese enthielt einen mit Streptavidin beschichteten Chip, an den das Biotin-Mykotoxin-Konjugat gekoppelt wurde. Die Umpufferung war erforderlich, um den Antikörper in den gleichen Puffer zu überführen, der auch als

Laufpuffer für die Biacore-Anlage diene. Dieses sollte „Puffersprünge“ während der Messung verhindern, die durch Veränderungen in der Zusammensetzung des flüssigen Mediums entstehen. Sie hätten die spätere Auswertung der Messungen erschwert. In einem ersten Versuch sollte festgestellt werden, ob die scFvs das Konjugat aus Biotin und Fumonisin B1 detektieren können und wie hoch ihre Affinität ist. Dazu wurden in Doppelansätzen verschiedene Konzentrationen an Einzelkettenantikörper injiziert. Um auszuschließen, dass eine mögliche Bindungsreaktion nur auf die Affinität gegen Streptavidin oder den Linker zurückzuführen ist, wurden zwei Flusszellen verwendet. Eine davon diene als Negativkontrolle und wurde lediglich mit Biotinlinker beschickt. Sollte die beobachtete Bindung auf Streptavidin bzw. den Linker zurückzuführen sein, wäre sie in beiden Zellen aufgetreten. Zur Berechnung wurde das Signal der Negativkontrolle von dem der Testzelle abgezogen.

Bestimmung der Affinität des scFv BFB1-02 zum Konjugat

Die durchgeführten Messungen ließen deutlich eine Affinität zum gekoppelten Konjugat erkennen (Abb. 3.11). Nach Abschluss der Messungen wurde die K_D mit $4,08 \times 10^{-7}$ M bestimmt. Damit lag der scFv BFB1-02 in einem Bereich, der für scFvs gegen andere Haptene bekannt ist (Moggadham *et al.*, 2003). Aus den Messwerten ließ sich zudem erkennen, dass der scFv nicht in der Lage ist, über einen längeren Zeitraum an das Konjugat zu binden. Sobald die Injektion und damit die Zufuhr an Antikörper abgebrochen wurde, fielen die Kurven rapide ab. Die Dissoziation des scFvs erfolgte innerhalb kürzester Zeit. Ursache dafür sind die nicht mutagenisierten Bereiche des scFvs, die für die Avidität des Antikörpers verantwortlich sind (Harlow and Lane, 1988). Dabei handelt es sich um die CDR1 und 2 der leichten und schweren Kette. Durch nachträglich eingeführte Mutationen in diesen Bereichen des scFvs BFB1-02, in Verbindung mit einer erneuten Selektion erhält man scFvs deren Bindung an das Mykotoxin wesentlich stabiler ist.

Bestimmung der Affinität des scFv BFB1-02 zum freien Hapten

Bei Protein-gekoppelten Haptenen ist bekannt, dass oft das Konjugat erkannt wird, nicht jedoch das freie Hapten (Charlton *et al.*, 1998; Moghaddam *et al.*, 2001). In einem weiteren Versuch wurde deswegen überprüft, ob das freie Hapten erkannt wird. Dazu wurde der Antikörper mit verschiedenen Konzentrationen an freiem Fumonisin

B1 inkubiert, bevor er erneut vermessen wurde. Mit zunehmender Konzentration an ungekoppeltem FB1 sollte die Anzahl der scFvs sinken, die an das Konjugat auf dem Chip binden. In der Messung sollte sich dies in Kurven mit geringerer Steigung bemerkbar machen, was zu beobachten war (Abb. 3.11). Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung des Antikörperfragments unabhängig davon war, ob das Hapten als Konjugat vorlag oder nicht.

Kreuzreaktionen des scFv BFB1-02

In der dritten Messreihe, die zur Analyse des BFB1-02 durchgeführt wurde, ging es um die mögliche Kreuzreaktion mit Fumonisin B2 (Abb. 1.5). Dieses unterschied sich von FB1 durch eine OH-Gruppe. Mit diesem Versuch ließ sich gleichzeitig feststellen, ob diese OH-Gruppe essentiell für die Bindung des selektierten scFv an Fumonisin B1 an ist. Wie schon zuvor wurde das Antikörperfragment mit den Mykotoxinen inkubiert, bevor es vermessen wurde. Als Kontrolle diente unbehandelter scFv. Der Verlauf der Messkurven (Abb. 3.12) zeigte deutlich, dass sowohl FB1 als auch FB2 gleichermaßen gut gebunden wurden. Außerdem wurde deutlich, dass die OH-Gruppe nicht essentiell für die Bindung des Mykotoxins durch den Antikörper ist. Eine weitere Messung wurde mit dem inaktivem FB1-Analogon N-Acetyl-D-Sphingosin durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dieses ist dem Fumonisin B1 ähnlich, weist aber keine Carboxylgruppen auf und hat auch keinerlei Mykotoxinwirkung. Eine Kreuzreaktion konnte damit nicht nachgewiesen werden, was darauf schließen ließ, dass die Bindung des Fumonisins B1 durch den scFv BFB1-02 spezifisch für Fumonisin B ist. Ebenfalls wird dadurch die Bedeutung der Carboxylgruppen für die Bindung deutlich.

Bestimmung der Affinität des scFv MFB1-08 zum Konjugat

Wie schon zuvor der BFB1-02 wurde auch der angereicherte MFB1-08 einer Messreihe unterzogen. Im Gegensatz zum scFv BFB1-02 konnte hier jedoch keinerlei Bindung an das Konjugat detektiert werden (Abb. 3.13). Da der scFv MFB1-08 keinerlei nachweisbare Affinität zum Fumonisin B1 aufwies, wurden keine weitergehenden Arbeiten mit ihm durchgeführt.

Modellierung der scFvs BFB1-02 und MFB1-08

Die Modellierung der angereicherten scFvs gegen Fumonisin B1 zeigte zwei gegensätzliche Strukturen. Die CDR3 der leichten und der schweren Kette des scFv BFB1-02 bilden eine schmale, hohe Kavität aus (Abb. 3.7). Diese wird durch das Phenylalanin der schweren Kette (HC-F₁₀₄) nach unten begrenzt. Wie sich später zeigen sollte, war dieses von entscheidender Bedeutung für die Bindung des Fumonisins B1. Die Tiefe der Bindungstasche beträgt ca. 18 Å und ist ca. 7 Å breit. Das Fumonisin B1 (Abb. 1.5) passt mit seinen Maßen von 21 Å (Höhe) und 6 Å (Breite) in diese Tasche hinein. Damit hatte sich ein weiterer Hinweis ergeben (neben der gezeigten Anreicherung), dass es sich bei dem isolierten Einkettenantikörper aus dem „Panning“ gegen das Biotin-Fumonisin B1-Konjugat um einen gegen Fumonisin B1 spezifischen Antikörper handelt. Die Bindungsregion des MFB1-23 hingegen wies eine völlig andere Struktur auf. Anstatt der hohen und schmalen Bindungskavität des BFB1 bildeten die CDR3 der schweren und leichten Kette eine lang gestreckte Kavität aus (Abb. 3.8).

4.5 Mutagenese des scFv BFB1-02

Wie schon zuvor beschrieben, konnte der scFv BFB1-02 sowohl die Mykotoxine FB1 als auch FB2 spezifisch erkennen. Seine Fähigkeit, die Mykotoxine über einen längeren Zeitraum zu binden, waren jedoch sehr begrenzt. Aus diesem Grund sollte durch *in vitro*-Evolution diese Avidität verbessert werden, wie auch schon bei anderen Antikörpern geschehen (Low *et al.*, 1996; Hoogenboom *et al.*, 1998). Dieses erfolgte mit zwei Strategien:

Mutagenese durch Punktmutation

Die erste Strategie sah vor, die Polarität der Bindungsstelle durch den Austausch der Aminosäure Phenylalanin (F) gegen Tyrosin (Y) zu erhöhen. Durch das Einfügen einer polaren Aminosäure im unteren Bereich der Bindungstasche, die in Kontakt mit den Carboxylgruppen des FB1 stehen könnte, sollte die Anzahl der einwirkenden Bindungskräfte erhöht werden. Vergleicht man die Modelle der Bindungsstellen des scFv BFB1-02 und des scFv BFB1-02Y (Abb. 3.15) miteinander kann man erkennen, dass der Boden der Bindungstasche polar geworden ist. An der räumlichen Struktur

des scFvs scheint sich nichts verändert zu haben. Dies wird deutlich wenn man die Strukturen zum Vergleich übereinander legt (Abb. 3.16). Es hatte nur eine Neuausrichtung zweier Wasserstoffatome benachbarter Aminosäurereste stattgefunden.

Bestimmung der Affinität des scFv BFB1-02Y zum Konjugat

Wie zuvor beschrieben, wurde die Affinität des scFv zum Konjugat über Oberflächenplasmonresonanzanalyse überprüft. Die erwartete stärkere Bindung an das Konjugat konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die beim scFv BFB1-02 vorhandene Affinität war beim BFB1-02Y stark reduziert bzw. nicht mehr vorhanden (Abb. 3.18). Die Ursache dafür kann in der Expression und Aufreinigung des Antikörpers gelegen haben. Da diese aber nach Standardprotokoll erfolgten, erscheint dies eher unwahrscheinlich. Demnach muss durch den Austausch des Phenylalanins eine Veränderung in den Bindungskräften stattgefunden haben, denn eine Veränderung in der räumlichen Struktur ließ sich aus den erstellten Modellen nicht erkennen.

Mutagenese durch „error-prone“-PCR

Nachdem es sich bei dem vorher beschriebenen Ansatz um eine zielgerichtete Mutagenese der Bindungsstelle gehandelt hat, wurde mit dem zweiten das Zufallsprinzip angewandt. Dazu wurden mit Hilfe einer „error-prone“-PCR (Leung *et al.*, 1989; Cadwell *et al.*, 1992) über die gesamte DNA-Sequenz Basenaustausche vorgenommen. Dabei war vor allem beabsichtigt die Bereiche außerhalb der CDR3 zu verändern, um darüber eine erhöhte Avidität des scFvs zu erreichen. Die Gefahr, die dabei bestand war, dass man durch die Basenaustausche Stopcodons einfügt, die die Expriemierbarkeit der scFv stark eingeschränkt hätte. Diese Strategie zur Verbesserung der Bindungseigenschaften wurde bei anderen scFvs mit Erfolg eingesetzt (Daugherty *et al.*, 2000; Zahnd *et al.*, 2004). Für die Einführung der Basenaustausche wurden Bedingungen gewählt, die 0-4,5 Mutationen pro Kilobase zum Ziel hatten. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in den Ursprungsvektor ligiert und transformiert.

Analyse der BFB1-02.x Bank

Von der erhaltenen Bank mit einer Größe von $7,4 \times 10^5$ unabhängigen Klonen, wurden 100 Klone via Kolonie-PCR und Deoxycholatomethode analysiert. Zwei der untersuchten Klone wiesen keinen scFv auf, was bei späteren „Pannings“ eine Anreicherung derselbigen zur Folge hätte haben können. Mittels der DOC-Methode wurde festgestellt, dass von 100 untersuchten Kolonien 80 über einen offenen Leserahmen verfügten. Dieses entsprach der Rate der Ausgangsbank. Um mehr Informationen über die Mutationsrate zu erhalten, wurde das scFv-Gen von zehn Kolonien sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass eine durchschnittliche Mutationsrate von 2,7 Basen erreicht worden war. Das darauf folgende „Panning“ mit der BFB1-02.x-Bank verlief anders als bei den vorherigen Selektionen gegen die Biotinkonjugate. In der zweiten Runde gab es bereits einen Anstieg des Titers auf über 1×10^6 eluierte Phagen, der in der dritten Runde auf über 1×10^7 anstieg (Abb. 3.19). Dieser Titeranstieg wies auf eine Anreicherung hin. Wie zuvor bei dem „Panning“ gegen BOTA gesehen, muss ein Titeranstieg nicht mit einer Anreicherung korrespondieren. Dieses stellte sich auch bei diesem „Panning“ heraus. Es hatte keine Anreicherung eines mutagenisierten Klons gegeben. Wahrscheinlich war die Anzahl der eingeführten Mutationen zu gering, um die (bereits vorher gegebene) Bindung an das Mykotoxin positiv zu beeinflussen. In anderen Arbeiten werden Mutationsraten zwischen 4 und 22 Mutationen pro Kilobase als am aussichtsreichsten vorgeschlagen (Daugherty *et al.*, 2000)

4.6. Ausblick

Im Rahmen des DBU Förderprojekts „Detektion von Mykotoxinen durch Plantibodies“ wurde der erste scFv gegen Fumonisin B1 aus einer synthetischen scFv-Bibliothek selektiert (Lauer *et al.*, 2005). Der rekombinante Antikörper scFv BFB1-02 sollte in Zukunft von dem Projektpartner r-biopharm u.a. für die Detektion von Fumonisin B1 mittels ELISA eingesetzt werden. Aufgrund seiner für diese Anwendung zu geringen Avidität ist dieses jedoch bislang nicht möglich. In Zukunft wird die Verbesserung der Bindungseigenschaften dieses scFvs im Vordergrund stehen. Wie bereits von anderen Gruppen gezeigt ist es möglich, durch *in vitro*-Evolution diese Eigenschaften zu verbessern (Hemminki *et al.*, 1998; Moghaddam *et al.*, 2001). Mit den bisher angewandten Methoden ist dies bisher noch nicht gelungen,

aber es wird am Lehrgebiet Molekulargenetik versucht mittels SOE-PCR die Bereiche ausserhalb des CDR3 der leichten und schweren Kette zu mutagenisieren. Desweiteren wird die Erstellung einer weiteren „error-prone“-Bibliothek in Betracht gezogen, bei der diesmal wesentlich höhere Mutageneseraten als zuvor erreicht werden sollen.

Für Ochratoxin A soll eine erneute Selektion stattfinden. Diese soll mit einem Konjugat erfolgen, dessen Kopplung nicht über die wahrscheinlich für die Selektion wichtige Carboxylgruppe erfolgen soll. Das Konjugat soll voraussichtlich nicht in Eigenproduktion hergestellt werden.

5. Literaturverzeichnis

Abouzied MM, Azcona-Olivera J I, Yoshizawa T and Pestka JJ (1993) Production of polyclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin 4,15-diacetylvalenol with the carrier-adjutant cholera toxin. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 1264-1268

Albers C, Lehr M, Beike J, Köhler H and Brinkmann B (2002) Synthesis of a psilocin hapten and a protein-hapten conjugate. *J Pharm Pharmacol*, **54**, 1265-1270

Barbas III CF, Kang AS, Lerner RA and Benkovic SJ (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phages surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 7987-7982

Berdichevsky YE, Ben-Zeev E, Lamed R and Benhar, I. (1999). Phage display of cellulose binding domain from clostridium thermocellum and its application as a tool for antibody engineering. *J Immunol Methods*, **228**, 151-162

Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G and Krska R (2005) Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1062**, 209-216

Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS and Whitlow M (1988) Single chain antigen binding protein. *Science*, **242**, 423-426

Blum M, Beier H und Gross HJ (1987) Verbesserte Silberfärbung von Pflanzenproteinen, RNA und DNA in Polyacrylamidgelen. *Elektrophoresis*, **8**, 93-99

Boeke JD, Model P and Zinder ND (1982) Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane. *Mol Gen Genet*, **186**, 185-192

Bradbury A, Velappan N, Verzillo V, Ovecká M, Chasteen L, Sblattero D, Marzari R, Lou J, Siegel R and Pavlik P (2003) Antibodies in proteomics I: generating antibodies. *Trends Biotechnol*, **21**, 275-281

Breitling F, Dübel S, Seehaus T, Kleewinghaus I and Little M (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, **104**, 1047-153

Breitling F und Dübel S (1997). Rekombinante Antikörper. Spektrum Akademischer Verlag

Brockmann EC, Cooper M, Strömsten N, Vehniäinen M and Saviranta P (2005) Selecting for antibody scFv fragments with improved stability using phage display with denaturation under reducing conditions. *J Immunol Methods*, **296**, 159-170

Bruce MP, Boyd V, Duch C and White JR (2002) Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies—alternatives to ascites production in mice. *J Immunol Methods*, **264**, 59–68

Burmester J, Spinelli S, Pugliese L, Krebber A, Honegger A, Jung S, Schimmele B, Cambillau C and Plückthun A (2001) Selection, characterization and x-ray structure of anti-ampicillin single-chain Fv fragments from phage-displayed murine antibody libraries. *J Mol Biol*, **309**, 671-85

Cadwell RC and Joyce GF (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Method Applic*, **2**, 28–33

Carcamo J, Ravera MW, Brissette R, Dedova O, Beasley JR, Alam-Moghe A, Wan C, Blume A and Mandecki W (1998) Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11146-11151

Chan ECY and Ho P (2002) Preparation and characterization of immunogens for antibody production against metanephrine and normetanephrine. *J Immunol Methods*, **266**, 143-54

Charlton K, Harris WJ and Porter AJ (2001) The isolation of supersensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *Biosens Bioelectron*, **16**, 639-646

Choi G, Lee D, Min W, Cho Y, Kweon D, Son D, Park K and Seo J (2004) Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, **35**, 84-92

Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, **352**, 624–628

Courtney BC, Williams KC and Schlager JJ (1995) A phage display vector with improved stability, applicability and ease of manipulation. *Gene*, **165**, 139-140

Cox JP, Tomlinson IM and Winter G (1994) A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage. *Eur J Immunol*, **24**, 827-836

Daugherty PS, Chen G, Iverson BL and Georgiou G (2000) Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2029-2034

De Bruin R, Speelt K, Mol J, Koes R and Quattrocchio F (1999) Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotech*, **17**, 397-399

de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, de Bruine AP, Arends JW and Hoogenboom HR (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem*, **274**, 18218-18230

Deschamps RJA, Hall JC and McDermott MR (1990) Polyclonal and monoclonal enzyme-linked immunoassays for picloram detection in water, soil, plants and urine. *J Agric Food Chem*, **38**, 1881-1886

Dragan YP, Bidlack WR, Cohen SM, Goldsworthy TL, Hard GC, Howard PC, Riley RT and Voss KA (2001) Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk assessment: fumonisin B(1) as an example. *Toxicol Sci*, **61**, 6-17

Ehrlich Paul (1908) Partial cell functions, *Nobel Prize Lecture*

Einhauer A and Jungbauer A (2001) The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods*, **49**, 455-465

Ewert S, Huber T, Honegger A and Plückthun A (2003) Biophysical properties of human antibody variable domains. *J Mol Biol*, **325**, 531-553

Fischer R, Drossard J, Emans N, Commandeur U and Hellwig S (1999) Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments. *Biotechnol Appl Biochem*, **30**, 117-120

Gathumbi J K, Usleber E and Märklbauer E (2001) Production of ultrasensitive antibodies against aflatoxin B1. *Lett Appl Microbiol*, **32**, 349-351.

Goletz S, Christensen PA, Kristensen P, Blohm D, Tomlinson I, Winter G and Karsten U (2002) Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol*, **315**, 1087- 1097.

Got P, Raimbaud E, Bussey C, Caron G, Carrupt P, Walther B, Bensussan A and Scherrmann J (1999) Production and characterization of 22 monoclonal antibodies directed against S 20499, a new potent 5-HT_{1A} chiral agonist: influence of the hapten structure on specificity and stereorecognition. *Pharm Res*, **16**, 725-35

Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes-Jones NC, Hoogenboom HR and Winter G (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display library. *EMBO J*, **12**, 725-734

Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, Prospero TD, Hoogenboom HR, Nissim A, Cox JPL, Harrison JL, Zaccolo M, Gherardi E and Winter G (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J*, **13**, 3245–3260

Harlow E and Lane D (1988) *Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Hawlich H, Müller M, Frank R, Bautsch W, Klos A and Köhl J (2001). Site specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets. *Analytical Biochemistry*, **293**, 142-145

Hemminki A, Niemi S, Hautoniemi, L, Soderlund H and Takkinen K (1998) Fine tuning of an anti-testosterone antibody binding site by stepwise optimisation of the CDRs. *Immunotechnology*, **4**, 59-69

Hlywka JJ and Bullerman LB (1999) Occurrence of fumonisin B1 and B2 in beer. *Food Addit Contam*, **35**, 319-324

Honegger A and Plückthun A. (2001) Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool. *J Mol Biol*, **309**, 657-670

Hoogenboom, HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P and 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

Hoogenboom HR, Marks JD, Griffiths AD and Winter G. (1992) Building antibodies from their genes. *Immunol Rev*, **130**, 41-68

Hoogenboom HR and Winter G (1992) By-passing immunization - human-antibodies from synthetic repertoire of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol*, **227**, 381-388

Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW and Roovers RC (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, **4**, 1-20

Hust M (2002) Rekombinante Antikörper gegen die Nia-Protease des *Plum pox virus*. Doktorarbeit am Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover.

Hust M, Maiss E, Jacobsen HJ and Reinard T. (2002) The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *J Virol Methods*, **106**, 225-233

Hust M and Dübel S (2004) Mating antibody phage display with proteomics. *TRENDS in Biotechnology*, **22**, 8-14

Huston JS, Levinson D, Mudgett HM, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R and Oppermann H (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad Sci USA*, **85**, 5879-5883

International Agency for Research on Cancer (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Report of an IARC Expert Committee. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **Supplement 7**

Janeway CA und Travers, P. (1997) Immunologie, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag

Jestoi M, Ritieni A and Rizzo A (2004) Analysis of the Fusarium mycotoxins fusaproliferin and trichothecenes in grains using gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, **52**, 1464-1469

Johnsson B, Löfås S and Lindquist G (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry*, **198**, 268-277

Jonsson U, Fagerstam L, Ivarsson B, Johnsson B, Karlsson R, Lundh K, Löfås S, Persson B, Roos H, Rönnberg I, Sjölander S, Stenberg E, Stahlberg R, Urbasniczky C, Ostlin H and Malmqvist M (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques*, **11**, 620-627

Kang AS, Barbas CF, Janda KD, Benkovic SJ and Lerner RA (1991) Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4363-4366

Kerrm YFY, Hung L, and Hall JC (2003) Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies. *Biotechnology Advances*, **21**, 599-637

Kirkham, PM, Mortari, F, Newton JA and Schroeder HW Jr (1992) Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J*, **11**, 603–609

Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, Hoess A, Wolle J, Pluckthun A and Virnekas B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus framework and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol*, **296**, 57–86

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

Krebber AS, Bornhause S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR and Plückthun A (1997) Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods*, **201**, 35-55

Krogh P (1974) Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. In: Puchlev E, ed. *Endemic nephropathy. Proceedings of the Second International Symposium on Endemic Nephropathy, Sofia, 9-11 November 1972*. Sofia, Publishing House of Bulgarian Academy of Sciences, 1974: 266-270

Lauer B, Otteleben I, Jacobsen HJ and Reinard T (2005) Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. *J Agric Food Chem*, **53**, 899-904

Lee NA, Wang S, Allan RD, Kennedy IR (2004) A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and Soybeans. *J Agric Food Chem*, **52**, 2746-2755

Leung DW, Chen E and Goeddel, DV (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, **1**, 11–15.

Li B, Zhao Q, Liu Q, Murali R, Greene MI and Zhang H (2002) Deoxycholate-Based Method to Screen Phage Display Clones for Uninterrupted Open Reading Frames. *Biotechniques*, **33**, 294-296

Low NM, Holliger PH and Winter G (1996) Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol Biol*, **260**, 359-368

MacKenzie CR and To R (1998) The role of valency in the selection of anti-carbohydrate single-chain Fvs from phage display libraries. *J Immunol Methods*, **220**, 39–49

Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD and Winter G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*, **222**, 581-597

Marvin DA, Hale RD, Nave C, and Helmer-Citterich M (1994) Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), If1 and IKE. *J Mol Biol*, **235**, 260-286

Mead DA and Kemper B. In *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*; Rodriquez, R. L., Denhardt, D. T., Eds.; Butterworths: Boston, 1988

McCafferty J. Phage display: factors affecting panning efficiency. In: Kay BK, Winter J, McCafferty J, editors. *Phage display of peptides and proteins*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 261–276

McConnell SJ, Dinh T, Le MH and Spinella DG (1999) Biopanning phage display libraries using magnetic beads vs. polystyrene plates. *Biotechniques*, **26**, 208-210

Meredith FI, Torres OR, Saenz de Tejada S, Riley RT and Merrill AH (1999) Fumonisin B1 and hydrolyzed fumonisin B1 (AP1) in tortillas and nixtamalized corn (*Zea mays* L.) from two different geographic locations in Guatemala. *J Food Prot*, **62**, 3200-3203

Moghaddam A, Loberli I, Gebhardt K, Braunagel M and Marvik O.J (2001) Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries. *J Immunol Methods*, **254**, 169-181

Moghaddam A, Borgen T, Stacy J, Kausmally L, Simonsen B, Marvik OJ, Brekke OH, Braunagel M (2003) Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *J Immunol Methods*, **280**, 139-155

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Ehrlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, **51**, 263-273

Nakata Y, Tang X und Yokoyama KK (1997) Preparation of competent cells for high-efficiency plasmid transformation of *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*, **69**, 129-137

Ottener H and Majerus P (2000) Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit Contam*, **17**, 793-798

Ottener H and Majerus P (2001) Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. *Food Addit Contam*, **18**, 431-435

- Padlan, E. A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol.* **31**, 169–217
- Park JW, Kim EK, Shon DH and Kim YB (2002) Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Addit Contam.* **19**, 1073-1080
- Peraica M., Radic B, Lucic A and Pavlovic M (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ.* **77**, 754-766
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC and Ferrin TE (2004) UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry.* **25**, 1605-1612
- Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P and Neri D (1998) Design and Use of a phage display library. *J. Biol. Chem.*, **273**, 21769-21776
- Plückthun A, Krebber A, Horn U, Knüpfer U, Wenderoth R, Nieba L, Proba K and Riesenberger D (1996) Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation. In *Antibody Engineering, A Practical Approach* (McCafferty J, Hoogenboom HR and Chiswell DJ, eds.), pp. 203-252, IRL Press, Oxford University Press, New York
- Reiter Y, Brinkmann U, Kreitmann RJ, Jung SH, Lee B and Pastan I (1994) Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry.* **33**, 5451-5459
- Rizzo I, Vedoya G, Maurutto S, Haidukowski M, Varsavsky E. (2004) Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiol Res.* **159**, 113-120
- Rondot S, Koch J, Breitling F, Dübel S (2001) A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology.* **19**, 75-78

Sambrook J, Fritsch EF, und Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Schmiedl A and Dübel S (2004) Rekombinante Antikörper & Phagen-Display. In: Molekulare Biotechnologie, Ed.: Wink, M. Wiley-VCH, p. 511-554

Seefeldler W, Gossmann M and Humpf HU (2002) Analysis of fumonisin B(1) in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Agric Food Chem*, **50**, 2778-2781

Seehaus T, Breitling F, Dübel S, Klewinghaus I and Little M (1992) A vector for the removal of deletion mutants from antibody libraries. *Gene*, **114**, 235-237

Shimada N, Suzuki Y, Nakajima M, Conrad U, Murofushi N and Yamaguchi I (1999) Expression of a functional single-chain antibody against GA(24/19) in transgenic tobacco. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 779-783

Shirai H, Nakajima N, Higo J, Kidera A and Nakamura H (1996) Conformational sampling of CDR-H3 in antibodies by multicanonical molecular dynamics simulation. *J Mol Biol*, **278**, 481-496

Shirai H, Kidera A and Nakamura H (1999) H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Letters*, **455**, 188-197

Sibanda L, De Saeger S, Bauters TG, Nelis HJ and Van Peteghem C (2001) Development of a flow-through enzyme immunoassay and application in screening green coffee samples for ochratoxin A with confirmation by high-performance liquid chromatography. *J Food Prot*, **64**, 1597-1602

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

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

Smith GP and Petrenko VA (1997) Phage display. *Chem Rev*, **97**, 391-410

Solfrizzo M, De Girolamo A, Vitti C, Visconti A and van den Bulk R (2004) Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *J AOAC Int*, **87**, 101-106

Speijers GJA and Van Egmond HP. Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds. In: Creppy EE *et al.*, eds. *Human ochratoxicosis and its pathologies*. Montrouge, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 1993, **231**, 85-100

Spotti M, Caloni F, Fracchiolla L, Pompa G, Vigo D and Maffeo G (2001) Fumonisin B1 carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder. *Vet Hum Toxicol*, **43**, 109-111

Stenberg E, Persson B, Roos H, and Urbaniczky C (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal Colloid Interface Sci*, **143**, 513-526

Tang X, Nakata Y, Li H-O, Zhang M, Gao H, Fujita A, Sakatsume O, Ohta T und Yokoyama K (1994) The optimization of preparation of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, **22**, 2857-2858

Tout NL, Yau KYF, Trevors JT, Lee H and Hall JC (2001) Synthesis of ligand-specific phage-display scFv against the herbicide picloram by direct cloning from hyperimmunized mouse. *J Agric Food Chem*, **49**, 3628– 3637

Tsuruta LR, Tomioka Y, Hishinuma T, Kato Y, Itoh K, Suzuki T, Oguri H, Hirama M, Goto J and Mizugaki M (2003) Characterization of 11-dehydro-thromboxane B2 recombinant antibody obtained by phage display technology. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids*, **68**, 273-284

Tur MK, Huhn M, Sasse S, Engert A and Barth S (2001) Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to significant loss of insert-free phages. *BioTechniques*, **30**, 404-413

Valjakka J, Hemminki A, Niemi S, Söderlund H, Takkinen K and Rouvinen J (2002) Crystal structure of an in vitro affinity- and specificity-matured anti-testosterone Fab in complex with testosterone. *JBC*, **277**, 44021–44027

Viti F, Nilsson F, Demartis S, Huber A, Neri D (2000) Design and use of phage display libraries for the selection of antibodies and enzymes. *Methods in Enzymology*, **326**, 480-505

Wang CR and Chu FS (1991) Production and characterization of antibodies against Nivalenol Tetraacetate. *Appl Environ Microbiol*, **57**, 1026-1030

Whitelegg NR and Rees AR (2000) WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Engineering*, **13**, 819-824

Whitelegg NR and Rees AR (2004) Antibody variable regions: toward a unified modeling method. *Methods in Molecular Biology*, **248**, 51-91

World Health Organization, Geneva (1990) Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. Report of an expert committee. *Environmental Health Criteria*, **105**

Wilkinson J, Rood D, Minior D, Guillard K, Darre M and Silbart, L (2003) Immune response to a mucosally administered aflatoxin B1 vaccine. *Poult Sci*, **82**, 1565-1572

- Willats WGT (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol*, **50**, 837-854
- Winter G and Milstein C. (1991) Man-made antibodies. *Nature*, **349**, 293– 299
- Wörn A and Plückthun A (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol*, **305**, 989-1010
- Wu TT, Johnson G and Kabat EA (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins*, **16**, 1-7
- Yoshizawa T, Kohno H, Ikeda K, Shinoda T, Yokohama H, Morita K, Kusada O and Kobayashi Y (2004) A practical method for measuring deoxynivalenol, nivalenol, and T-2 + HT-2 toxin in foods by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 2076-2085
- Yu FY and Chu FS (1999) Production and characterization of monoclonal antibodies against fumonisin B1. *Food Agric Immunol*. **11**, 297-306
- Yuan Q, Clarke JR, Zhou HR, Linz JE, Pestka JJ and Hart L P (1997) Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 263-269
- Zahnd C, Spinelli S, Luginbühl B, Amstutz P, Cambillau C and Plückthun A (2004) Directed in Vitro Evolution and Crystallographic Analysis of a Peptide-binding Single Chain Antibody Fragment (scFv) with Low Picomolar Affinity. *JBC*, **279**, 1870-1877
- Zhou HR, Pestka, JJ and Hart LP (1996) Molecular cloning and expression of recombinant phage antibody against fumonisin B1. *J Food Prot*, **59**, 1208-1212

Anhang**scFv BFB1-02**

ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA
CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA
TTC ACC TTT AGC AGC TAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT
CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT AGT
GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC
ACC ATT TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA
ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT
GCG AAA TCT CCT CCG TAT CAG TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA
ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA
GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC
CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA
TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC
CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT
AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC
TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT
CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC TCT CGT
TCT ACG AGG ACG CCC GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG
ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA

scFv MFB1-08

ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA
CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA
TTC ACT TTT AGC AGC TAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT
CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT AGT
GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC
ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA
ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT
GCG AAA AAG ACT ACG CCG AAG GAT TTT GAC TAC TGG GGC CAG
GGA ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA GGT GGA GGC GGT TCA GGC
GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCT GAG CTG ACT CAG
GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC
ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG
TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT
GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT
GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG
GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC TCT
AAG GGT AAG CGT AAT CCC GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG
CTG ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA

scFv BFB1-02Y

ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA
CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA
TTC ACC TTT AGC AGC TAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT
CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT AGT
GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC
ACC ATT TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA
ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT
GCG AAA TCT CCT CCG TAT CAG TAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA
ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA
GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC
CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA
TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC
CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT
AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC
TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT
CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC TCT CGT
TCT ACG AGG ACG CCC GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG
ACC GTC CTA GGC GCG GCC

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit, die guten Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn H.D. Dr. B. Huchzermeyer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. T. Reinard möchte ich für die Betreuung der Arbeit, seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und seinen schier unerschöpflichen Ideenreichtum danken. Seine Betreuung reichte über mein Ausscheiden aus dem Lehrgebiet Molekulargenetik hinaus.

Der Arbeitsgruppe Biochemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich für die Möglichkeit der Nutzung ihrer Biacore3000-Anlage.

Der Arbeitsgruppe Biotechnologie des Instituts Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig, hier insbesondere Herrn Dr. M. Hust, danke ich für die Unterstützung zur Herstellung der mutagenisierten Bibliothek.

Ich danke allen Mitarbeitern des LGM, insbesondere André, Iris, Ursula und Beate für die gute Atmosphäre und die Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau E. Heetpas, die mich in meiner Zeit in Hannover und danach immer unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützt und gefördert haben.

Lebenslauf

Lebensdaten

Name	Björn Lauer
Geburtsdatum	29.06.1973
Geburtstort	Surèsnes (Frankreich)

Schulischer Werdegang

1979-1983	Grundschule Albrechtstraße, Wilhelmshaven
1990-1993	Werner-Heisenberg Gymnasium Neuwied, Allgemeine Hochschulreife
1993-1995	Zeitsoldat bei der Deutschen Bundesmarine

Studium

1995-1998	Justus-Liebig-Universität Gießen, Grundstudium der Biologie und Vordiplom
1998-2000	Universität Hannover, Hauptstudium der Biologie und Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Biochemie (Lehrgebiet Molekulargenetik)
2000-2001	Auslandsstudium am Department of Botany & Plant Pathology der Purdue University, USA
2001-heute	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Jacobsen
2004-heute	Master's in European Business Studium an der ESCP-EAP <i>European School of Management</i>

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, Quellen und die zur Hilfsleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Hannover, den 18.05.2005

(Björn Lauer)