

Mutagenesestrategien zur Affinitätsreifung
Hapten-spezifischer rekombinanter Antikörper

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Katharina Klee MSc

geboren am 25.07.1979 in Lehrte

Referent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Tag der Promotion: 26.08.2009

Abstract

A hapten is defined as a low molecular weight compound that is not immunogenic by itself. Included in this category are several ubiquitous found substances: dyes, hormones, vitamins, pesticides, antibiotics and food contaminants like mycotoxins. Antibodies, on the other hand, are proteins that can act as binders for any molecule and can be applied in immunoassays for the efficient and inexpensive detection of haptens. Advances made in recombinant antibody technology have allowed for the development of *in vitro* antibody libraries and selection methodologies that can be used to derive antibodies and antibody fragments without the need of direct immunization of animals. However universal antibody libraries often yield antibodies with low affinities that consecutively have to be improved by mutagenesis of the antibody gene and optimization of the panning process. During the work described below different mutagenesis strategies were developed for the production of hapten-specific antibody libraries on the basis of a single-chain antibody (scFv) against the mycotoxin fumonisin B1. „Splicing by Overlapped Extension“-PCR was used to induce diversity in the „Complementary Determining Region“ (CDR) 1 of the heavy and light chain separately and in combination. The resulting libraries were compared to an antibody library established with error-prone-PCR. ScFvs with an improved affinity were successfully isolated by means of an optimized selection method with elevated stringency.

Keywords: scFv, hapten, affinity maturation, mutagenesis, antibody libraries, panning

Zusammenfassung

Haptene sind niedermolekulare chemische Verbindungen, die selbst nicht immunogen sind. Dazu gehören viele Substanzen, die ubiquitär zu finden sind: Farbstoffe, Hormone, Vitamine, Pestizide, Antibiotika und Nahrungsmittelkontaminanten, wie Mykotoxine. Antikörper sind Proteine, die in der Lage sind jedes beliebige Molekül zu binden, und können in Immunoassays effizient und kostengünstig zur Detektion von Haptenen eingesetzt werden. Dank den Fortschritten in der rekombinanten Antikörpertechnologie, konnten *in vitro* Antikörperbibliotheken und Selektionsmethoden entwickelt werden, die ohne den Bedarf der direkten Immunisierung von Tieren zur Herstellung von Antikörpern und Antikörperfragmenten dienen. Universelle Antikörperbibliotheken liefern oft jedoch Antikörper mit einer zu niedrigen Affinität, die nachfolgend erst eine weitere Verbesserung durch Mutagenese des Antikörpergens und Optimierung des Panningprozesses notwendig machen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mutagenese-strategien zur Herstellung Hapten-spezifischer Antikörperbibliotheken anhand eines „single chain“ Antikörpers (scFv) gegen das Mykotoxin Fumonisin B1 entwickelt. Eine „Splicing by Overlapped Extension“-PCR wurde benutzt für die Einführung von Diversität in die „Complementary Determining Region“ (CDR) 1 der schweren und leichten Kette einzeln und in Kombination. Die resultierenden Antikörperbibliotheken wurden mit einer durch Error-Prone-PCR erstellten Antikörperbibliothek verglichen. Mit Hilfe eines optimierten Selektionsverfahrens, bei dem die Stringenz stark erhöht wurde, konnten erfolgreich scFvs mit höherer Affinität isoliert werden.

Schlagwörter: scFv, Hapten, Affinitätsreifung, Mutagenese, Antikörperbibliotheken, Panning

Inhaltsverzeichnis

Abstract	2
Zusammenfassung	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Antikörper	12
1.2 Rekombinante Antikörper	13
1.3 Antikörperbibliotheken	15
1.4 Phage Display und „Panning“	17
1.5 Hapten-spezifische Antikörper	19
1.6 Mutagenese zur in vitro Affinitätsreifung	20
1.7 Mykotoxine	23
1.8 Aufgabenstellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.2 Puffer	26
2.1.3 Antikörper und Enzyme	27
2.1.4 Vektoren	27
2.1.5 Oligonukleotide	29
2.1.6 Molekulargewichtsmarker	29
2.1.7 Kits	30
2.1.8 Material für SPR-Analysen	30
2.2 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.1 Stämme und Kulturmedien	30
2.2.2 Kultivierung und Bestimmung der optischen Dichte	31
2.2.3 Anlegen von Stammkulturen	31
2.2.4 Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.2.5 Transformation mittels Hitzeschock	32

2.2.6	Expression löslicher scFvs in Kultur.....	33
2.2.7	Expression von scFvs in Mikrotiterplatten.....	33
2.3	<i>Arbeiten mit Bakteriophagen</i>	34
2.3.1	Helferphagen.....	34
2.3.2	Amplifikation von Phagen.....	34
2.3.3	PEG-Fällung von Phagen aus dem Kulturüberstand.....	34
2.3.4	Titerbestimmung von Phagensuspensionen.....	35
2.4	<i>Isolierung und Analytik von Nukleinsäuren</i>	35
2.4.1	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	35
2.4.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	36
2.4.3	Isolierung von DNA aus PCR-Ansätzen.....	37
2.4.4	Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation.....	37
2.4.5	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	37
2.4.6	Agarosegelelektrophorese.....	38
2.5	<i>Modifikation und Amplifikation von Nukleinsäuren</i>	39
2.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.5.2	Kolonie-PCR.....	40
2.5.3	Restriktionsverdau.....	40
2.5.4	Dephosphorylierung von linearer DNA.....	41
2.5.5	Ligation.....	41
2.6	<i>Mutagenesemethoden zum Erstellen von Antikörpergenbanken</i>	41
2.6.1	SOE-PCR Mutagenese.....	41
2.6.2	Error-Prone-Mutagenese.....	43
2.7	<i>Isolierung und Analytik von Proteinen</i>	45
2.7.1	Aufreinigung von scFvs über Protein A-Affinitätschromatographie.....	45
2.7.2	Einengen und Umpuffern von aufgereinigten scFvs.....	45
2.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	45
2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
2.7.5	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	46
2.7.6	Western Blot.....	47
2.7.7	Ponceaufärbung und Immunfärbungen.....	47
2.7.8	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA).....	47
2.8	<i>„Panning“ gegen Fumonisin B1 (FB1)</i>	48
2.8.1	Kopplung von FB1 an Biotin.....	48
2.8.2	„Panning“ in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen.....	49
2.8.3	Analyse von selektierten scFv-Klonen über die Deoxycholatmethode.....	49

2.9	<i>Analyse der Bindeeigenschaften von Antikörperfragmenten</i>	50
2.9.1	Grundlagen der „Surface Plasmon Resonance“ (SPR)-Technologie	50
2.9.2	Kopplung der Sensordiscs.....	51
2.9.3	Affinitätsmessungen	52
2.10	<i>Computergestützte Auswertung von Daten</i>	53
2.10.1	DNA-Konzentration.....	53
2.10.2	DNA-Sequenzen	53
2.10.3	SPR-Daten.....	53
3	Ergebnisse	54
3.1	<i>Erstellung der Antikörperbibliotheken</i>	54
3.1.1	Die scFv-Antikörperbibliothek BFB1-2-H1, -L1 und -M	54
3.1.2	Die scFv-Antikörperbibliothek BFB1-2-E.....	56
3.2	<i>Panning der Antikörperbibliotheken gegen FBI</i>	57
3.3	<i>Analyse der selektierten scFvs</i>	61
3.3.1	PCR-Analyse	61
3.3.2	Expressionsanalyse	61
3.3.3	Vergleichende Analyse der Affinitäten im ELISA	62
3.3.4	Sequenzanalyse.....	63
3.4	<i>Charakterisierung einzelner selektierter scFvs</i>	66
3.4.1	Expression und Aufreinigung	66
3.4.2	Affinitätsbestimmung.....	68
3.4.2.1	Kopplung des Fumonisin B1 an die verschiedenen Sensordiscs	68
3.4.2.2	Affinitätsbestimmung selektierter scFvs	69
3.4.2.3	Exaktere Affinitätsbestimmung des scFv BFB1-2-H78	76
3.4.3	Sequenzanalyse.....	78
4	Diskussion	80
4.1	<i>Mutagenesestrategien</i>	81
4.1.1	Error Prone PCR	81
4.1.2	SOE-PCR.....	84
4.2	<i>Die Antikörperbibliotheken</i>	85
4.3	<i>Panning der Antikörperbibliotheken gegen FBI</i>	87
4.4	<i>Analyse selektierter scFvs</i>	89
4.5	<i>Charakterisierung einzelner scFvs</i>	92

4.5.1	Expression und Aufreinigung.....	92
4.5.2	Affinitätsbestimmung und Sequenzanalyse	92
4.6	<i>Fazit und Ausblick</i>	98
5	Literatur	100
	Anhang	110

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	„Bovine Serum Albumin“
CDR	„Complementary Determining Region“
CDR _L	„Complementary Determining Region“ der leichten Kette
CDR _H	„Complementary Determining Region“ der schweren Kette
cfu	“colony forming units”
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEA	Diethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid”
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOC	Deoxycholat
dsDNA	“double strand DNA”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl]-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EP-PCR	„Error-Prone“-PCR
Fab	„Fragment antigen binding“
FAO	„Food and Agriculture Organization of the United Nations“
FB1	Fumonisin B1
Fc	„Fragment cristallizable“
Fv	„Fragment variable“
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
h	Stunde

6xHis	6x Histidin
HPLC	„High performance liquid chromatography“
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
k_a	Assoziationsrate
K_D	Dissoziationskonstante
k_d	Dissoziationsrate
kDa	kilo Dalton
Ig	Immunglobulin
LC	„Liquid Chromatography“
M	Molar
11-MUA	11-Mercaptoundecansäure
m°	Milligrad
min	Minuten
mM	Millimolar
mRNA	“messenger RNA”
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
μ l	Mikroliter
NHS	N-Hydroxysuccinimide
OD	Optische Dichte
ORF	“Open reading frame”
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PBST	PBS-Tween 20
PCR	„Polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
Ppm	„parts per million“
RT	Raumtemperatur
PVDF	Polivinyldifluorid
scFv	„Single chain Fragment variable“
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfat“
SOB	„Super Optimal Broth“
SOC	„Super Optimal Broth with Catabolite repression“

SOE-PCR	„Splicing by Overlapped Extension“-PCR
SPR	„Surface Plasmon Resonance“
ssDNA	“single strand DNA”
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	„Terrific Broth“
TYE	„Tryptone Yeast Extract“
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V _H	Variable Domäne der schweren Kette
V _L	Variable Domäne der leichten Kette
v/v	Volumenanteile/Volumen
w/v	Gewichtsanteile/Volumen

körpermoleküle gehören der Immunglobulin G-Klasse an (Abb. 1.1). Ihre Grundstruktur ist die Y-Form mit zwei identischen Antigen-Bindestellen. Sie bestehen aus vier Polypeptidketten: Zwei identischen leichten (L-) Ketten (~ 25 kDa) und zwei identischen schweren (H-) Ketten (~50 kDa), die durch Disulfidbrücken sowie nicht-kovalente Interaktionen, wie Salzbrücken, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen, zu einem Heterodimer verbunden sind (Paul, 2003). Ein Immunglobulin lässt sich in konstante und variable Region unterteilen. Die C_{H2} und C_{H3} Regionen bilden den „fragment crystallizable“ (Fc)-Teil, der wesentlich zur Stabilität beiträgt und über den die Aktivierung des Immunsystems erfolgt. Die variablen Regionen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette dagegen sind für die Antigenbindung verantwortlich. Innerhalb der variablen Regionen gibt es drei hochvariable Sequenzabschnitte aus 5 bis 15 Aminosäuren, die als hypervariablen Regionen oder „complementary determining regions“ (CDRs) bezeichnet werden und die Kontaktstelle zum Antigen bilden. Damit stellen sie das sog. Paratop dar, das komplementär zum Epitop, der entsprechenden Oberflächenstruktur des Antigens, ist und mit diesem in Wechselwirkung tritt.

In Säugern gibt es eine Vielfalt von mindestens 10^{12} Antikörpern verschiedener Spezifität, die dadurch selbst synthetische Moleküle erkennen können. Diese Diversität wird durch somatische Rekombination während der Differenzierung der B-Lymphozyten im Knochenmark erreicht, bei der die verschiedenen Gensegmente der Antikörperketten frei kombiniert werden. Als weitere Feinabstimmung der Antikörper-Antwort erfolgt eine Antigen-selektierte, somatische Hypermutation, die zur Affinitätsreifung der Antikörper dient. Dabei handelt es sich um gehäufte Punktmutationen in den V_H- und V_L-Regionen, die eine Million Mal häufiger auftreten als Spontanmutationen und zu einer Affinitätsreifung der Antikörper führen.

1.2 Rekombinante Antikörper

Am Anfang der Herstellung von Antikörpern gegen ein spezielles Antigen für den Gebrauch in der Immunoanalyse und -therapie, wurden diese durch die Immunisierung von Versuchstieren, wie Ziege, Kaninchen und Maus gewonnen. Dadurch entstehen polyklonale Seren mit einer heterogenen Population an Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet sind. Obwohl diese hoch sensitiv sein können,

und relativ billig herzustellen sind, ist doch die Reproduzierbarkeit in den aufeinander folgenden Immunisierungen nicht gegeben und es besteht die Neigung zur Kreuzreaktivität (Daly *et. al.*, 2001).

Das Problem der Gewinnung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers wurde 1975 durch die Entwicklung der Hybridoma-Technologie gelöst (Köhler und Milstein, 1975). Diese beruht auf der Fusion von einem Antikörper-sezernierenden B-Lymphozyten mit einer Myelomzelle. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Generierung von Hybridomazellen aufwändig ist und diese nur schwierig und mit hohem Kostenaufwand in Zellkultur zu halten sind.

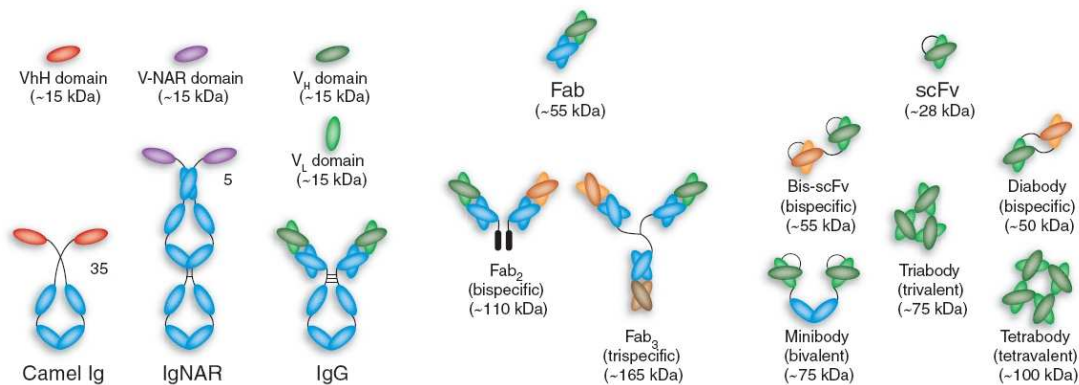


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von verschiedenen Antikörperformaten (Holliger und Hudson, 2005). Gezeigt wird das klassische IgG-Molekül, das Kamelid VhH- Ig und das Hai Ig-NAR. Letztere sind Immunglobulin-ähnliche Strukturen, bestehend aus einem Homodimer aus zwei Ketten V-ähnlichen und C-ähnlichen Domänen (leichte Ketten existieren nicht), in denen allein die V-Domänen das Antigen binden. Hai Ig-NARs bestehen aus einem Homodimer aus einer variablen Domäne (V-NAR) und fünf C-ähnlichen konstanten Domänen (C-NAR). Eine Auswahl an Antikörperfragmenten ist exemplarisch dargestellt: Fab, scFv, „single domain“ VH, VhH und V-NAR, außerdem Multimer-Formate, wie Minibody, bis-scFv, Diabody, Tetrabody und chemisch konjugierte Fab'-Multimere.

Hybridomazellen lieferten das Startmaterial für die ersten rekombinanten Antikörpermoleküle, die als ganze Immunglobuline, „Fragment antigen binding“ (Fab)- oder „Fragment variable“ (Fv)-Fragmente exprimiert wurden (Neubauer *et. al.*, 1985; Riechmann *et. al.*, 1988; Feys *et. al.*, 1988). Die Entwicklung setzte sich dahingehend fort, Fab-Fragmente und Fv-Fragmente in Bakterien herzustellen. Erstere bestehen aus den variablen und ersten konstanten Domänen eines Antikörpers und letztere lediglich aus den variablen Domänen. Aufgrund der fehlenden Disulphidbrücken-Bildung im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas waren diese jedoch sehr instabil. Deswegen wurden Vektoren entwickelt, um einen Transport in das oxidierende Milieu des

periplasmatischen Raumes zu erreichen (Dübel und Kontermann, 2001). Durch das Verbinden der beiden variablen Domänen V_H und V_L der Fv-Fragmente über einen flexiblen Peptidlinker von ca. 15 bis 20 Aminosäuren zu „single chain Fragment variables“ (scFv), konnte auch hier die fehlende Stabilität erzeugt werden (Huston *et. al.*, 1988; Bird *et. al.*, 1988). Mittlerweile steigt die Anzahl der unterschiedlichen Antikörperformate immer weiter an und auch die Zahl der möglichen Expressionssysteme nimmt zu (Holliger und Hudson, 2005, Abb. 1.2). Dadurch können komplexe Anwendungsmöglichkeiten in der Therapie von Infektions- und Entzündungs-Krankheiten und Krebs, in der Biotechnologie und in der medizinischen und wissenschaftlichen Diagnostik erschlossen werden.

Die scFvs mit einer Größe von ca. 26 kDa sind ein populäres Format, das weite Verbreitung gefunden hat und deren Herstellung in *E. coli* gut etabliert ist (Hust *et. al.*, 2002). Sie werden über ein zusammenhängendes Gen exprimiert und durch eine intramolekulare Umlagerung der Polypeptidkette können die beiden Domänen assoziieren. Der Nachteil dieses Formats ist, dass bei hohen Konzentrationen eine u. a. von den verwendeten Keimbahngenen abhängige Neigung zur Bildung von Dimeren und Oligomeren besteht (Wörn und Plückthun, 2001).

1.3 Antikörperbibliotheken

Um einen spezifischen rekombinanten Antikörper oder ein Antikörperfragment gegen ein spezielles Antigen *in vitro* selektieren zu können, stehen Antikörpergenbibliotheken zur Verfügung, die aus bis zu 10^{14} unabhängigen Antikörpergen-Klonen bestehen. Die verschiedenen Bibliotheken lassen sich je nach ihrer Herstellung in universelle Antikörperbibliotheken, fokussierte und post-Immunisierungs-Bibliotheken unterscheiden. Letztere werden aus den Genen der variablen Regionen konstruiert, die aus den Immunglobulin-sekretierenden Plasmazellen von immunisierten Spendern stammen (Hust und Dübel, 2004). Universelle Antikörperbibliotheken werden aus den Antikörpergenen von nicht immunisierten Spendern hergestellt. Sie liefern dadurch die Möglichkeit, Antikörper auch gegen letale Pathogene, hoch konservierte Antigene und Haptene, kleine Moleküle die allein keine Immunantwort auslösen können, zu selektieren. Hier werden naive, semisynthetische und synthetische Bibliotheken unterschieden:

Naive werden aus den bereits rekombinierten V-Genen von IgM-produzierenden B-Zellen konstruiert (de Haard *et. al.*, 1999); semisynthetische aus nicht-rekombinierten V-Genen von prä-B-Zellen (Keimzellen) oder einem einzigen Antikörper-„framework“ plus mindestens einer genetisch randomisierten CDR (meistens CDR3) und synthetische bestehen aus einem humanen „framework“ mit vollständig randomisierten CDRs (Knappik *et. al.*, 2000). Der Ansatz der synthetischen Antikörperbibliotheken ermöglicht die Anwendung auf Probleme die weit ab der konventionellen Methoden liegen. Die Möglichkeit präzise die Diversität zu kontrollieren und „framework“-Regionen mit bevorzugten Eigenschaften auszuwählen, erlaubt die Entwicklung von Antikörpern mit auf spezielle Anwendungen zugeschnittenen Charakteristika. Dies können z. B. therapeutische Antikörper mit Spezies-Kreuzreaktivität (Lee *et. al.*, 2006a), „Intrabodies“, die auch im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas stabil sind (Desiderio *et. al.*, 2001) oder Antikörper gegen posttranslationale Modifikationen (Kehoe *et. al.*, 2006) sein. Die Feststellung, dass die Topographie der Antigen-Bindestelle mit der Größe und Art des Antigens korreliert (Almagro, 2004; Lee *et. al.*, 2006b; MacCallum *et. al.*, 1996), führte zu der Entwicklung fokussierter Antikörperbibliotheken, die dafür angepasst sind mit speziellen Antigen-Klassen zu interagieren, wie etwa die Klasse der Proteine und Peptide (Almagro *et. al.*, 2006) oder die der Haptene (Persson *et. al.*, 2006).

Bei der ETH-2 Antikörperbibliothek (Pini *et. al.*, 1998; Viti *et al.*, 2000) handelt es sich um eine humane, semisynthetische Bibliothek im scFv-Format. Diese diente im Vorfeld dieser Arbeit zur Selektion des scFvs BFB1-2 (Lauer *et. al.*, 2005, Kapitel 1.5), welches dieser Arbeit zur Entwicklung von Mutagenesestrategien zur Affinitätsreifung zugrunde liegt. Das V-Gen Repertoire der ETH-2 basiert bezüglich der schweren Kette lediglich auf dem Keimbahnsegment DP-47, bezüglich der leichten Ketten auf den Segmenten DPK-22 und DPL-16 des λ - bzw. κ -Typs. Durch Randomisierung der CDR3-Regionen der jeweiligen Segmente mittels PCR, erhielt die Bank eine Diversität von mindestens 5×10^8 unabhängigen Klonen. Bibliotheken mit einem einzelnen Antikörper „framework“ haben den Vorteil, dass diese Gene auf Stabilität und Expressionsverhalten optimiert ausgewählt werden können. Sie haben jedoch den Nachteil, dass die Variabilität eingeschränkt ist, da diese hier nur durch die CDR3 zustande kommt (Hust *et. al.*, 2007).

1.4 Phage Display und „Panning“

Alle molekularen Display Methoden haben folgende drei Charakteristika gemeinsam: erstens machen sie die Antikörpergen-Diversität einer ganzen Bibliothek der Selektion zugänglich, zweitens verknüpfen sie den Antikörper Genotyp mit dem exprimierten Antikörper Phänotyp und drittens dienen sie der Isolierung einiger weniger Antigen-bindender Antikörper und ihrer Gene aus der Mehrheit nicht bindender Antikörper (Marks, 2004). Die Art und Weise der Verknüpfung von Genotyp (DNA) mit dem Phänotyp (Protein) unterscheidet die verschiedenen Display-Technologien. Eine direkte physikalische Verknüpfung liegt beim Ribosom-Display (Hanes *et al.*, 2000) und mRNA-Display (Lipovsek und Plückthun, 2004) vor und eine indirekte beim Phage-Display (Hoogenboom, 2002) und bei Zell-basierten Verfahren, wie Bacterial- (Daugerty *et al.*, 1999) und Yeast-Display (Pepper *et al.*, 2008). Weitere Möglichkeiten sind die Kompartimentalisierung über Liposomen, wie beim DNA-Display (Yonezawa *et al.*, 2003) und die definierte räumliche Separation bei Assays in Mikrotiterplatten (Lin und Cornish, 2002).

Das Phage-Display ist die älteste dieser Methoden (Smith, 1985), sie ist am besten entwickelt und wird am häufigsten zur Selektion antigenspezifischer Antikörperfragmente angewendet (Hoogenboom, 2005). Antikörper werden als Fusionsprotein auf der Oberfläche des Phagen präsentiert, indem das entsprechende Gen in das Phagengenom integriert wird. Allgemein werden filamentöse ssDNA Phagen, wie M13, f1, Fd und ft oder dsDNA Phagen, wie T7 und λ verwendet. Alle können gram-negative Bakterien infizieren, die das F-Epikum zur bakteriellen Konjugation besitzen (Arap, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Derivat des nicht-lytischen M13-Phagen verwendet. Sie besitzen ein ca. 6,5 Kb großes zirkuläres ssDNA-Genom, welches sie bei der Infektion von *E. coli* in das bakterielle Cytoplasma translozieren. Dort wird es repliziert und in neue Phagenpartikel von 6 nm Durchmesser und 900 nm Länge verpackt (Viti *et al.*, 2000). Die Hülle besteht hauptsächlich aus ca. 3000 Kopien des Major Coat Protein pVIII. Jedes Ende des Phagen ist bedeckt mit zwei verschiedenen Minor Coat Proteinen: Drei bis fünf Kopien jeweils von pVII und pIX bilden das eine Ende, während das andere aus jeweils drei bis fünf Kopien von pIII und pIV besteht (Kehoe und Kay, 2005). Um das Antikörperfragment auf der Oberfläche des Phagen zu exprimieren, wird das codierende

Gen im Leseraster an eines der Oberflächenproteine fusioniert und in einen Vektor kloniert, der in einen Phagenpartikel verpackt werden kann (Conrad und Scheller, 2005). Je nach Ankerprotein, das dafür gewählt wird, kann ein monovalentes bis multivalentes Display erreicht werden. In den meisten Fällen, wie auch bei dieser Arbeit, wird ein multivalentes Display gewählt, das geeigneter für die Selektion von Antikörperfragmenten mit hoher Affinität ist (Hoogenboom, 2005), wobei das Gen als Fusionsprotein mit pIII in ein Phagemid kloniert wurde. Dabei handelt es sich um ein Plasmid, das den Replikationsursprung von Bakterien und den von Phagen und eine Antibiotikaresistenz enthält. Die meisten ursprünglichen Gene des Phagen-genoms sind nicht mehr vorhanden, sie werden aber von einem zweiten Phagen, dem Helferphagen, zur Verfügung gestellt (2.1.4. und 2.3.1).

Die *in vitro* Selektion von Antikörperfragmenten anhand ihrer Bindungseigenschaften wird „Panning“ genannt, nach dem Arbeitsvorgang des Siebschwenkens der Goldwäscher (Parmley und Smith, 1988). Zunächst wird dafür das Antigen auf einer festen Oberfläche immobilisiert, wozu Nitrocellulose, „Magnetic Beads“ (Moghaddam *et. al.*, 2003), eine Säulenmatrix (Breitling *et. al.*, 1991) oder Plastikoberflächen wie Polystyrolröhrchen (Hust *et. al.*, 2002) oder 96-Well-Mikrotiterplatten (Barbas *et. al.*, 1991) geeignet sind. Die Phagensuspension wird mit dem Oberflächen-gebundenen Antigen inkubiert, um eine spezifische Anlagerung der antikörperpräsentierenden Phagen zu ermöglichen. Danach wird gründlich gewaschen um den großen Überschuss der nicht-bindenden Phagen zu entfernen. Alle spezifisch bindenden Phagen werden eluiert und dann für die Reamplifizierung zur Infektion von *E. coli* verwendet (Hust *et. al.*, 2007). Dabei kann die Art und Weise des Waschens und Eluierens stark variieren, je nach den physikochemischen Eigenschaften der Antigen-Antikörper-Interaktion und der gewünschten Stringenz. Der Selektionszyklus kann zur Anreicherung antigenspezifischer Phagen wiederholt werden, indem die Phagemid-tragenden *E. coli* Kolonien mit Helferphagen infiziert werden, um neue antikörpertragende Phagen zu produzieren. Die Anzahl antigenspezifischer Phagen sollte sukzessive mit jeder Panningrunde, von denen gewöhnlich zwei bis sechs durchgeführt werden, steigen (Coomber, 2002). Aufgrund einer Wachstumskonkurrenz zwischen den in der Population vorliegenden verschiedenen Antikörper-exprimierenden *E. coli*-Klonen wird mit zunehmender Anzahl an Selektionsrunden jedoch nicht nur auf antigenspezifische Phagen selektiert, sondern auch auf

solche, die höhere Wachstumsraten aufweisen. Diese sind häufig Klone, die unvollständige oder vollständig deletierte Antikörperfragment-Gene tragen (de Bruin *et al.*, 1999). Für optimale Selektionsbedingungen ist daher die Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen entscheidend. Je spezifischer die Selektion verläuft, desto weniger Selektionsrunden werden zur Anreicherung antigenspezifischer Phagen benötigt und desto geringer sind somit die Probleme, die aus der Wachstumskonkurrenz resultieren.

1.5 Hapten-spezifische Antikörper

Haptene sind niedermolekulare chemische Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da, die selbst nicht immunogen sind. Dazu gehören viele Substanzen, die ubiquitär in unserem täglichen Leben zu finden sind: Farbstoffe, Hormone, Vitamine, Pestizide, Antibiotika und Nahrungsmittelkontaminanten wie Mykotoxine (Mogaddham *et al.*, 2001). Sie sind jedoch aufgrund ihrer geringen Größe nur schwer und arbeitssaufwendig nachzuweisen und in der Umwelt nur kostspielig auffindig zu machen.

Antikörper sind Proteine, die in der Lage sind jedes beliebige Molekül zu binden, auch Haptene, wenn diese durch die Bindung an einen Carrier, z. B. „Bovine Serum Albumin“ (BSA), Ovalbumin oder Biotin, Immunogenizität gewonnen haben. Solche Antikörper können in „Enzyme linked Immunsorbent Assays“ (ELISAs) effizient und kostengünstig zur Detektion von Haptenen eingesetzt werden (Sheedy *et al.*, 2007). Die meisten Immunoassays benutzen polyklonale Antikörper, die von immunisierten Tieren stammen und die relativ günstig zu entwickeln, sensitiv und spezifisch sind. Allerdings sind manche Haptene trotz Kopplung an einen Carrier nicht immunogen (Moghaddam, 2001). Auch ist eine Immunisierung mit toxischen Haptenen in der Regel nicht möglich und es besteht keine hinreichende Reproduzierbarkeit bei polyklonalen Seren. Daher bietet sich hier die *in vitro* Selektion von rekombinanten Antikörpern aus Antikörperbibliotheken z.B. mittels Phage Display an. Diese können dann zur Produktion in z.B. Bakterien, Hefen oder Pflanzen exprimiert werden. Häufig ist aber nach der Selektion erst eine weitere Verbesserung der Antikörper durch Mutagenese und Optimierung des Panningprozesses nötig, da diese eine zu niedrige Affinität besitzen oder Kreuzreaktivitäten zeigen (Marks *et al.*, 1991). Zudem besteht die Gefahr der Selektion von Antikörpern, die bevorzugt die an den Carrier konjugierte Form des Haptens erkennen während

das unkonjugierte Hapten nicht oder mit geringerer Affinität erkannt wird (Charlton *et. al.*, 2001).

Bei dem rekombinanten Antikörper scFv-BFB1-2, der dieser Arbeit zugrunde liegt, handelt es sich um ein scFv gegen das Hapten Fumonisin B1 (FB1), ein Mykotoxin. Es wurde aus der semi-synthetischen Antikörpergenbibliothek ETH-2 isoliert und besitzt eine Affinität von $K_D = 4,08 \times 10^{-7}$ M (Lauer *et. al.*, 2005). Die Spezifität für freies, nicht an einen Linker gekoppeltes FB1 wurde gezeigt. Außerdem besteht keine Kreuzreaktivität mit dem strukturell ähnlichen *N*-Acetyl-D-sphingosine. Allerdings ist die Affinität für die Verwendung des Antikörpers in Immunoassays oder für spezifische Aufreinigungsverfahren noch zu gering, weshalb im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Mutagenesestrategien zur Affinitätsreifung entwickelt werden sollen.

1.6 Mutagenese zur *in vitro* Affinitätsreifung

Das Immunsystem erreicht mit Hilfe der somatischen Hypermutation eine Diversifizierung in den variablen Regionen eines Antikörpers. Mit der sich anschließenden antigen-gesteuerten Selektion führt dieses zur Affinitätsreifung, d.h. zur Verbesserung der Antigenbindungs-Affinität (Allen *et. al.*, 1987). Dieser Prozess kann *in vitro* mit den Methoden des „Protein Engineering“ nachgeahmt werden. Dabei können zwei Hauptstrategien unterschieden werden: Zum einen das rationale Design (Voigt *et. al.*, 2000), bei dem detailliertes Wissen über die Antikörper-Struktur und die Funktion einzelner Domänen dafür benutzt wird ortsgerichtete Änderungen vorzunehmen, zum anderen die gerichtete Evolution, die durch zufällige Mutagenese und Chain- (Marks *et. al.*, 1992) oder DNA-Shuffling (Cramer *et. al.*, 1996) genetische Diversität im Antikörpergen erzeugt. Durch mehrere Runden von Mutagenese und Selektion wird der natürliche Prozess der Evolution nachgeahmt. Das DNA-Shuffling vermischt und paart Teilstücke von Genvarianten, um eine Erhöhung der Affinität hervorzurufen und imitiert damit die somatische Rekombination. Da im Rahmen dieser Arbeit die zufällige Mutagenese zur gerichteten Evolution des scFv BFB1-02 gewählt wurde, soll diese im Folgenden näher betrachtet werden.

Das Prinzip der gerichteten Evolution wurde erstmals 1967 von Mills *et. al.* für Nukleinsäuren vorgestellt. 1978 legte Michael Smith den Grundstein für die Entwicklung

diverser Mutagenesemethoden durch die erstmalige Beschreibung der gezielten Mutagenese mit Hilfe von Oligonukleotiden (Hutschison *et. al.*, 1978), wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Methoden zur Affinitätsreifung von Antikörpern etabliert, von denen hier beispielhaft einige beschrieben werden sollen, um einen Überblick zu schaffen.

Die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion „Error-Prone PCR“ (EP-PCR) ist der am häufigsten verwendete Ansatz zu Beginn einer gerichteten Evolution (Daugherty *et. al.*, 2000; Hawkins *et. al.*, 2000; Johnson und Hawkins, 1996) und wurde auch in Rahmen dieser Arbeit angewendet. Hierbei wird die natürliche Fehlerrate der *Taq*-DNA-Polymerase, die keine Korrekturlesefunktion besitzt, während der Amplifikation des Zielgens durch Zugabe von $MnCl_2$ oder unphysiologisch hohen Konzentrationen an $MgCl_2$ erhöht (Tindall und Kunkel, 1988). Damit werden Punktmutationen mit einer geringen Frequenz über das gesamte Gen eingeführt. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung einer genetisch veränderten, zu höherer Fehlerrate neigenden, DNA-Polymerase. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode profunde Effekte auf die Affinität und Spezifität Hapten-bindender Antikörper haben kann (Gram *et. al.*, 1992; Miyazaki *et. al.*, 1999). Dabei liegen die Mutationen auch außerhalb der Antigenbindestelle oder der CDRs in der Grundstruktur des Antikörpers. Ebenso können selektierte Mutanten eines Antikörpers mit höherer Affinität stark in der Lokalisation der Punktmutationen differieren, (Gram *et. al.*, 1992). Die Methode der EP-PCR besitzt jedoch Einschränkungen: Einige Aminosäureaustausche sind aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unwahrscheinlich, da mehrere durch die Polymerase verursachte Basenaustausche innerhalb eines Codons selten sind. Hinzu kommt die Bevorzugung bestimmter Basenaustausche (Eggert *et. al.*, 2004). Durch z. B. die Verwendung speziell angepasster Polymerasen, wie „Mutazym I“ (Vanhercke *et. al.*, 2005) oder des in dieser Arbeit verwendeten Enzymmixes „Mutazym II“ des kommerziellen Kits „GeneMorph® II EZClone Domain Mutagenesis“ Kit (Stratagene, La Jolla, Kanada), können diese Nachteile deutlich verringert werden.

Eine weitere klassische Methode zur Affinitätsreifung von Antikörpern stellt die Mutagenese durch bakterielle Mutatorstämme dar (Miller, 1998). Dieser Ansatz besteht aus der Selektion von Antikörpern aus einer Antikörperbibliothek und der anschließenden Mutagenese durch die Amplifizierung in *E. coli*-Stämmen wie MutD5, die einzelne Ba-

sen austausche (Transversionen oder Transitionen) mit einer 10^5 Mal höheren Rate produzieren verglichen mit normalen *E. coli*-Zellen (Coia *et. al.*, 1997). Auf diese Weise kann eine große Anzahl von mutierten Antikörpern erzeugt werden, es sind jedoch vier bis zehn Runden von Mutagenese und Selektion nötig, um Mutanten mit hoher Affinität zu erzeugen (Coia *et. al.*, 2001; Irving *et. al.*, 1996). Die Affinität eines Haptenspezifischen Antikörpers konnte durch vier sequentiell eingeführte Mutationen um das hundertfache verbessert werden (Low *et. al.* 1996), was neben der Effizienz dieser Methode auch die Potenz der zufälligen Mutagenese verdeutlicht.

Neben der Mutagenese des ganzen Gens, besteht als Alternative die fokussierte gerichtete Evolution, bei der nur Fragmente des Gens randomisiert werden, während die das Grundgerüst des Antikörpers codierenden Bereiche unverändert bleiben. Dabei zeigen sich PCR-basierte Methoden aufgrund ihrer relativen technischen Einfachheit als besonders praktikabel. Hierbei können zwei Ansätze unterschieden werden: Zum einen Methoden mit inverser PCR (Chiu *et. al.*, 2008; Follo *et. al.*, 2008; Hidalgo *et. al.*, 2008; Weiner *et. al.*, 1994.), die keine Subklonierung der gewünschten Sequenz erfordern und zum anderen Methoden, die multiple PCR-Fragmente erzeugen, wie der Megaprimer-Ansatz und die „Splicing by Overlapped Extension“-PCR (SOE-PCR) (Horton *et. al.*, 1990). Allen gemeinsam ist die Verwendung von degenerierten Primern, die die gewünschte Sequenzvielfalt erzeugen. Bei Methoden, die sich der inversen PCR bedienen, befinden sich die randomisierten Bereiche als „mismatches“ innerhalb der Primer oder werden an das 5'-Ende der Primers angehängt, wobei je nach Ansatz zwei oder vier Primer verwendet werden. Es entstehen ein (Stemmer und Morris, 1992) bzw. zwei PCR-Produkte (Baymiev, 2007), die direkt mit einer DNA-Ligase ligiert und anschließend transformiert werden können. Die Megaprimer-Methode (Brons-Poulsen *et. al.*, 2002; Marini *et. al.*, 1993; Sarkar und Sommer, 1990) ist ein Zwei-Schritt-Prozess: Im ersten Schritt wird der Megaprimer mit einem degenerierten im Zielbereich liegenden Primer und einem das Gen flankierenden Primer synthetisiert. Im zweiten Schritt dienen der aufgereinigte Megaprimer und der zweite flankierende Primer zur Synthese des vollständigen Gens, das zur Klonierung eingesetzt wird. Zur Mutagenese bestimmter Genabschnitte mithilfe der SOE-PCR (Desiderio *et. al.*, 2001; Dong *et. al.*, 2002; Dubreuil *et. al.*, 2005; Horten, 1993; Nielsen und Marks, 2001; Pavoni *et. al.*, 2006), wird zuerst in einer PCR mit einem Gen-flankierenden Primer und einem in der Mitte

degenerierten Primer, der den Genabschnitt überspannt, ein mutagenisiertes Fragment hergestellt. Die 5' und die 3' gelegenen Bereiche des Primers sorgen für eine ausreichende Hybridisierung mit dem Template. Es wird ein zweites Fragment benötigt, welches das Gen komplettiert, das in einer zweiten PCR synthetisiert wird und mit dem ersten Produkt überlappt. Dieser Umstand ermöglicht es, in einer dritten PCR, der so genannten „Assembly-PCR“, die beiden Fragmente zu fusionieren und das entstandene mutagenisierte Gen zu amplifizieren (Abb. 1.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz auf die CDR_L1 und CDR_H1 des scFv BFB1-2 zur fokussierten Mutagenese gewählt.

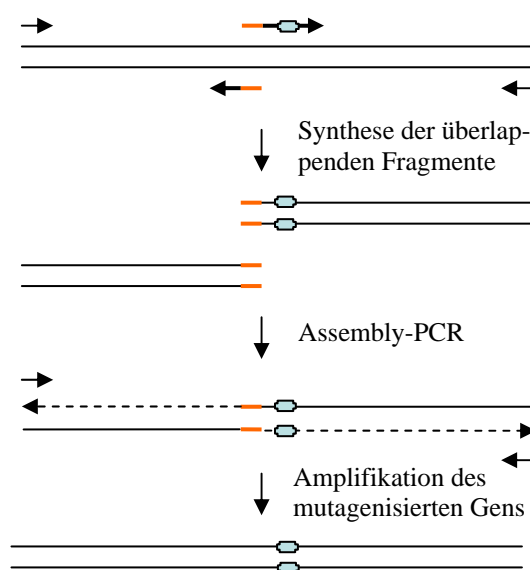


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der SOE-PCR. Die überlappenden Bereiche der Primer und PCR-Fragmente sind orange und die mutagenisierte Region hellblau dargestellt.

1.7 Mykotoxine

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte aus Schimmelpilzen niedrigen Molekulargewichts (ca. 300-500 Da), die eine große Auswahl an Anbaupflanzen und Früchten vor und nach der Ernte kontaminieren. Im Unterschied dazu werden die toxischen Inhaltsstoffe von Großpilzen als Pilzgifte bezeichnet. Mykotoxine zeichnen sich durch eine hohe chemische Stabilität und Hitzebeständigkeit aus. Es sind derzeit etwa 300 verschiedene Mykotoxine bekannt, die 25 Strukturtypen zugeordnet werden können. Sie zeigen bei Wirbeltieren besonders bei chronischer Exposition bereits in geringsten Mengen vielgestaltige schädliche Wirkungen. Sie können karzinogen, neurotoxisch,

immunsuppressiv, mutagen, teratogen, hepato- und nephrotoxisch sein, bei Berührung Hautschäden hervorrufen, Stoffwechselprozesse hemmen und allergische Reaktionen auslösen (Hof, 2008; Peraica *et. al.*, 2008). Die Bildung von Mykotoxinen unterliegt einer ausgeprägten regionalen wie saisonalen Schwankungsbreite und ist abhängig vom Substratangebot, dessen Wassergehalt, der Luftfeuchtigkeit, der Temperatur und der Interaktionen mit anderen Pilzen (Thalmann, 1989). Mykotoxin-Kontamination wird als unvermeidbares Risiko angesehen, da diese von den Umweltbedingungen abhängig und eine effektive Prävention kaum möglich ist. Die „Food and Agriculture Organization of the United Nations“ (FAO) schätzt, dass bis zu 25% der Weltproduktion von Nahrungsmitteln mit Mykotoxinen kontaminiert sind. Daher ist die Überprüfung der Nahrungs- und Futtermittel als Rohmaterial und in der Form der Endprodukte unabdingbar, um die Sicherheit der Konsumenten zu gewährleisten. Zu den Nachweismethoden von Mykotoxinen gehören zum einen physikalisch-chemische, wie Dünnschichtchromatographie (DC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschromatographie (GC) und die Kopplungen von HPLC und GC mit Massenspektrometrie (Sforza *et. al.*, 2004; Krska *et. al.*, 2008). Zum anderen immunbiochemische Methoden, wie ELISA, der aufgrund der relativ geringen Kosten und der einfachen Anwendung sehr populär ist. Aber auch „flow-through“-Tests und „dipsticks“ (Goryacheva *et. al.*, 2007; Krska *et. al.*, 2009) werden eingesetzt. Der Vorteil der physikalisch-chemischen Methoden liegt in ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit und der Reproduzierbarkeit, jedoch sind sie sehr arbeitsaufwändig und kostenintensiv.

Dieser Arbeit liegt der scFv BFB1-2 zugrunde, der in Pflanzen produziert als kostengünstiger Bestandteil für kommerzielle Immunoassay-Kits entwickelt wurde (Lauer *et. al.*, 2005). Er bindet spezifisch das Mykotoxin Fumonisin B1 (FB1). FB1 wird als sekundäres Stoffwechselprodukt von dem Pilz *Fusarium verticillioides* synthetisiert, welcher weltweit vor allem Mais kontaminiert, aber auch in Reis, Hirse, Sojabohnenmehl und Geflügelfutter und ebenso in Gebäuden mit Wasserschäden gefunden wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Roth (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Genecraft (Lüdinghausen), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim).

Die Antibiotika Ampicillin, Carbenicillin und Tetracyclin als Selektionszusätze zu Kulturmedien stammten von der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande). Ampicillin und Carbenicillin wurden in einer Konzentration von 100 mg/ml in Wasser als Stammlösung angesetzt, bei -20°C gelagert und in einer Konzentration von 100 µg/ml Medium eingesetzt. Die Stammkonzentration von Tetracyclin war 50 mg/ml in 70% (v/v) Ethanol, die Lagerung fand ebenfalls bei -20°C statt und die Gebrauchskonzentration im Medium betrug 50 µg/ml.

Das Mykotoxin Fumonisin B1 wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Der Biotinlinker „EZ-Link™ NHS-LC Biotin“ der Firma Thermo Scientific (Rockford, USA) diente zur Kopplung von Fumonisin B1.

Die Protein A-Säule „Pierce Chromatography Cartridges Protein A“ von Thermo Scientific (Rockford, USA) wurde zur Aufreinigung der scFvs benutzt.

2.1.2 Puffer

50 x TAE: 242g Tris/Acetat (pH 7,5), 57,1 ml Essigsäure, 0,5 M EDTA, H₂O ad 1 L,
pH 8,3

10 x Tris-Puffer: 250 mM TrisBase, 1,92 M Glycin

10 x M9: 60 g Na₂HPO₄, 30 g KH₂PO₄, 10 g NH₄Cl, 5 g NaCl

10 x PBS: 2,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 14,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 87,66 g NaCl, pH 7,4

PBST: 1 x PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20

Phosphatpuffer für TB-Medium: 23,1 g KH_2PO_4 , 125,4 g KH_2PO_4

2.1.3 Antikörper und Enzyme

Restriktionsendonukleasen stammten von Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main).

Für die Detektion von scFvs durch Immunfärbung wurden die Antikörper „Anti-FLAG M2 Monoclonal Antibody“ und „Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate“ des Herstellers Sigma-Aldrich (Steinheim) als Primär- bzw. Sekundärantikörper verwendet.

2.1.4 Vektoren

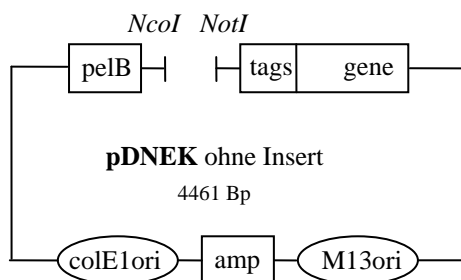


Abb. 2.1: Vektorkarte des Phagemids pDNEK ohne Insert.

Bei dem Phagemid-Vektor pDNEK handelt es sich um ein Derivat des Phagemids pDN322 (Pini *et al.*, 1998). Die scFv-Gene werden über *NotI* und *NcoI* Restriktionschnittstellen in diesen einkloniert, womit er eine Größe von 5196 Bp erreicht. Er enthält den M13-Ori als Replikationsursprung von Phagen, was das Verpacken des Genoms in Phagenpartikel ermöglicht, und den *E. coli* Replikationsursprung, *colE1*, was das Replizieren des Phagemids in *E. coli* Wirtszellen erlaubt. Außerdem codiert er für eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion Phagemid-enthaltener Kolonien. pDNEK besitzt den induzierbaren *lacZ* Promotor zur Regulation der Expression (induzierbar durch IPTG und inhibierbar durch Glucose) und eine *pel B* Signalsequenz, wobei es sich um die Signalsequenz der Pektatlyase B aus *Pectobacterium carotovorum*, die eine Sekretion der Antikörperfragmente in den periplasmatischen Raum des Wirtsbakteriums er-

möglichst. Am 3'-Ende der scFv Sequenz liegen die codierenden Sequenzen für eine Phosphorylierungsstelle sowie für eine FLAG- (Einhauer und Jungbauer, 2001) und eine 6 x His-Markierung, welche die Aufreinigung und Detektion der Antikörperfragmente ermöglichen. Das sich anschließende *amber*-Stopcodon ermöglicht die Expression der Antikörperfragmente in löslicher Form, oder durch „Überlesen“ (Einbau von Glutamin) des *amber*-Stopcodons in einem *E. coli* Supressor-Stamm, als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein pIII. In Anwesenheit eines Helferphagen werden scFv-Phagen gebildet.

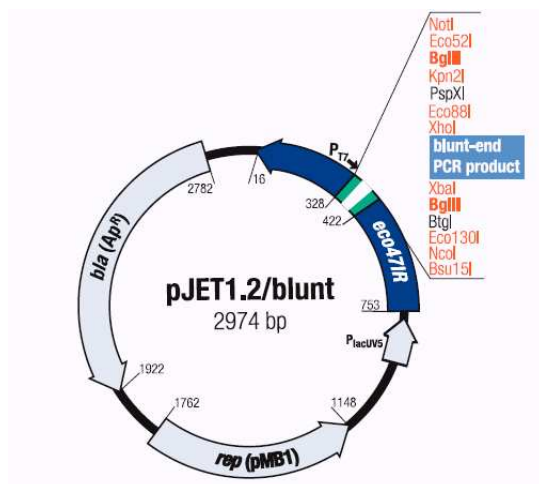


Abb. 2.2: Vektorkarte des pJET1.2/blunt
 (“Clone Jet™ PCR Cloning Kit“ (Fermentas))

Der Vektor pJET1.2/blunt ist Teil des “Clone Jet™ PCR Cloning Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot). Bei diesem handelt es sich um ein positives Selektionssystem zur Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten mit „sticky“- oder „blunt-ends“. Ein DNA Blunting Enzym ist enthalten, um dA-Überhänge von PCR-Produkten zu entfernen. Der Vektor pJET1.2/blunt codiert für ein letales Restriktionsenzym-Gen, welches durch die Ligation eines DNA-Inserts in die Klonierungsstelle unterbrochen wird. So können sich nach der Transformation nur Bakterienzellen vermehren, die das rekombinante Plasmid enthalten. Für die *in vitro* Transkription des Inserts ist der T7-Promotor enthalten und als zusätzliche Selektion dient die Ampicillin-Resistenz.

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Verwendungszweck	Sequenz (5'-3')
270	LMB3MH_f2	Sequenzierung und Amplifikation des scFv in pDNEK	CAGGAAACAGCTATGACCATGAT-TACGCC
686	A_ext-prim1_rev	SOE-PCR und EP-PCR	GCTAAACAACACTTTCAACAGTC-TATGCGGCC
687	B_ext-prim1_forw	SOE-PCR und EP-PCR	CTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
688	C_ext-prim2_forw	SOE-PCR und EP-PCR	GCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
689	C_ext-prim2_rev	SOE-PCR und EP-PCR	CCATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAG
690	HC-miss-sequ_rev	SOE-PCR	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGG
691	LC-miss-sequ_for	SOE-PCR	GGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGG
692	A-CDRH1-deg-prim_for	SOE-PCR: Mutagenese der CDR _{H1}	CTGTGCAGCCTCT(X) ₃₀ GGGTCCGCCA
693	CDRL1-deg-prim_rev	SOE-PCR: Mutagenese der CDR _{L1}	GCTTCTGCTGGTAC-CA(X) ₃₃ GCATGTGATCC
741	fdseq-2_rev	Sequenzierung und Amplifikation des scFv in pDNEK	CGTTAGTAAATGAATTTTCTGTAT-GAGGT

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

Die verwendeten DNA-Marker wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Dabei handelte es sich zum einen um die O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus mit den Fragmentgrößen: 100-900, 1031, 1200, 1500, 2000 und 3000 Bp. Zum anderen wurde die O'Ruler™ 1kb DNA-Ladder mit den Fragmentgrößen: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000-6000, 8000 und 10000 Bp verwendet.

Als Proteinmarker wurde der „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Dieser besteht aus den Proteinen β -Galaktosidase (116 kDa), Bovine Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat Dehydrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), β -Lactoglobulin (18,4 kDa) und Lysozyme (14,4 kDa).

2.1.7 Kits

Folgende Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

„GFXTM PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)

„Nucleo-Spin[®] Extract II“ Kits (Macherey-Nagel, Düren)

QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Kanada)

GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Kanada)

GeneMorphII EZClone Domain Mutagenesis (Statagene, La Jolla, Kanada)

Clone JetTM PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.1.8 Material für SPR-Analysen

Für die Analyse der Bindungseigenschaften der Antikörperfragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz wurde die Autolab SPR Esprit der Firma ECO CHEMIE B.V. (Utrecht, Niederlande) verwendet. Außerdem wurden von der Firma Xantec (Düsseldorf) „Bare-Gold“-Sensordiscs und Streptavidin-beschichtete Sensordiscs für die Kopplung des Fumonisin bzw. des Fumonisin-Konjugats bezogen.

2.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.2.1 Stämme und Kulturmedien

Für die Arbeiten mit *E. coli* wurden die folgenden Stämme verwendet:

E. coli XL1-Blue: supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'⁺[proAB⁺ lacI^q Z Δ M15 TN10(tet^r)]

E. coli XL1-Blue superkompetente Zellen (Stratagene, La Jolla, Kanada): recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

E. coli TB1 (Novagen, Merck, San Diego, USA): F⁻ ara D(lac-proAB) rpsL F80lacZΔM15 hsdR17(rK⁻ mK⁻)

Die Kulturmedien wurden nach folgenden Rezepten (Angaben in w/v bzw. v/v) angesetzt und zur Sterilisation autoklaviert (20 min, 121°C, 1 bar):

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 (1 L): 10 mM NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 2,5mM KCl, pH 7,0; 12,5 ml 2M MgCl₂, 50 ml 1M Glucose

2.2.2 Kultivierung und Bestimmung der optischen Dichte

E. coli-Zellen wurden in Flüssigmedien unter Selektion mit den jeweiligen Antibiotika bei 37 °C unter Schütteln bei ca. 200 Upm für ca. 16 h angezogen. Dazu wurden 5 ml Kulturmedium mit einer *E. coli*-Kolonie (Einzelklone von Agarplatten) angeimpft. Alternativ wurden Bakterien aus dem Bakterien-Glycerinstock verwendet, der bei -80°C gelagert wurde, indem mit einer Pipettenspitze in das noch gefrorene Medium gestochen und mit der daraus gewonnenen Menge an Bakterien eine 5 ml-Kultur angeimpft wurde.

Die optische Dichte (OD₆₀₀) der Bakterienkulturen wurde bei 600 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000 UV/visible Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.2.3 Anlegen von Stammkulturen

Um Bakterienkulturen langfristig bei -80 °C zu lagern, wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden einem Aliquot von 850 µl der Kultur 150 µl steriles Glycerin zugegeben.

Anschließend wurde sorgfältig gemischt und die Kultur in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.4 Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen, z. B. XL1-Blue, wurde zunächst eine Kultur aus 5 ml 2xTY mit 50 µg/ml Tetrazyclin aus dem entsprechenden Glycerinstock angeimpft und bei 200 Upm über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen der Hauptkultur wurde 1 ml der Übernachtskultur in 50 ml 2xTY gegeben und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 bei 37°C und 200 Upm angezogen. Die Bakterien wurden dann bei 5400xg, bei 4°C 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) aufgenommen und durch vortexen resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 20 min und ein erneutes Pelletieren der Bakterien wie oben angegeben. Das Pellet wurde erneut in eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM), 5 ml, aufgenommen und vorsichtig durch Vortexen resuspendiert. Die anschließende Inkubation erfolgte für 1 h auf Eis. Der nun aus kompetenten Zellen bestehenden Bakterien-suspension wurde Glycerin zugegeben zu einer finalen Konzentration von 15% (v/v), wobei vorsichtig durch Invertieren gemischt wurde. Die Bakterien wurden in 100 µl-Aliquots in Eppendorfreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

2.2.5 Transformation mittels Hitzeschock

Zu 100 µl kompetenten Zellen wurden 1 µl Plasmid oder 2 bis 5 µl Ligationsansatz gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Hitzeschock bei 42°C für 45 s vorgenommen und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden in 900 µl SOC aufgenommen und bei 37°C bei 200 Upm für 0,5 bis 1 h inkubiert. Anschließend wurde auf TYE-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Wurde eine Antikörpergenbank transformiert, wurden die Klone aller Platten anschließend gezählt um die Größe der Bank zu dokumentieren und dann durch Abspülen mit Medium von den Platten vereint. Diese Bakterien-suspension wurde dann zentrifugiert bei 3000xg für 15 min und das Pellet in Medium mit final 15% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Lagerung fand in 1,5 ml-Aliquots bei -80°C statt.

2.2.6 Expression löslicher scFvs in Kultur

Die Expression löslicher scFv-Fragmente in Bakterien erfolgte direkt mit dem Phagemid pDNEK. Als bakterielles Expressionssystem wurde der *E. coli* Stamm TB1 verwendet, für den TB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin oder Ampicillin zur Kultivierung benutzt wurde. Zunächst wurden Übernachtskulturen mit 1% (w/v) Glukose hergestellt, mit denen die Expressionskultur von 200 ml TB-Medium inklusive 0,04% (w/v) Glukose 1:200 angeimpft wurde. Die Anzucht erfolgte bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9. Der *lacZ*-Promotor wurde mit final 1 mM IPTG induziert. Die weitere Induktion erfolgte im Schüttelinkubator bei 150 Upm für 16 bis 20 h und bei 28°C.

2.2.7 Expression von scFvs in Mikrotiterplatten

Um die zuvor als Volllängklone charakterisierten durch Panning selektierten scFvs auf deren Bindungseigenschaften zu testen, wurden ELISAs durchgeführt. Die dafür benötigten scFvs wurden direkt aus dem Kulturüberstand der einzelnen Vertiefungen von Mikrotiterplatten (Polypropylen Mikrotiterplatten U96 PP 0,5 ml (Nunc)) genommen.

Die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 200 µl 2xTY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose gefüllt. Die scFv-Bakterienklone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der TYE_{amp,Glucose}-Agarplatte, die als Masterplatte zur Lagerung der selektierten Klone diente, gepickt und das Medium damit angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 1000 Upm (Plattenschüttler Incutec IH-S, Incutec, Mössingen) und 37°C. Eine neue 96 Well-Mikrotiterplatte mit 200 µl 2xTY mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose je Vertiefung wurde mit 10 µl dieser Übernachtskultur je Vertiefung inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h bei 1000 Upm. Anschließend wurden die Bakterien bei 3220xg für 10 min pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 200 µl 2xTY mit 100 µg/ml Ampicillin und 500 µM IPTG aufgenommen. Die Expression der scFvs erfolgte über Nacht bei 30°C und 1000 Upm. Zuletzt wurden die Bakterien bei 3220xg für 10 min pelletiert und der Überstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Dieser konnte nun direkt für den ELISA verwendet werden.

2.3 Arbeiten mit Bakteriophagen

2.3.1 Helferphagen

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

2.3.2 Amplifikation von Phagen

Die Anzucht und Amplifikation von scFv-Phagen fand nach der Klonierung der verschiedenen Antikörpergenbanken vor dem ersten Panning oder zwischen verschiedenen Panning-Stufen statt. Dazu wurde eine 50 ml-Kultur (2xTY mit 100 µg/ml Carbenicillin oder Ampicillin und 1% (w/v) Glucose) mit 400 µl der von den Agarplatten vereinten Bakterien, bzw. nach dem ersten Panning mit XL1-Blue aus einem Glycerinstock angeimpft. Diese wurde bei 37°C und 200 Upm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,32 bis 0,34 angezogen und dann, um eine effiziente F-Pili-Ausbildung für eine erfolgreiche Infektion mit Phagen zu gewährleisten, weiter bei einer reduzierten Umdrehungszahl von 40 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Ein Aliquot von 10 ml dieser Kultur wurde mit 10¹¹ Phagen Hyperphage oder einem Panning-Eluat für 30 min bei 37°C im Wasserbad infiziert. Danach wurde auf zweierlei Weise weiter verfahren:

1. Nach der Infektion mit Hyperphage, wurde für 10 min bei 3300xg abzentrifugiert und das Pellet in 100 ml Medium (2xTY mit Kanamycin 50 µg/ml und Ampicillin 100 µg/ml) aufgenommen. Die Bakterien wurden zur Produktion von scFv-Phagen bei 30°C und 200 Upm ca. 16 bis 20 h kultiviert.
2. Nach der Infektion mit einem Panning-Eluat, wurde für 10 min bei 3300xg abzentrifugiert, das Pellet in 500 µl Medium (2xTY) resuspendiert, auf TYE_{amp,Glukose}-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde wie oben beschrieben verfahren und mit Hyperphage zur scFv-Phagenproduktion infiziert.

2.3.3 PEG-Fällung von Phagen aus dem Kulturüberstand

Die amplifizierten scFv-Phagen wurden mittels PEG-Fällung aus dem Kulturüberstand aufkonzentriert. Dazu wurden die Bakterien für 10 min bei 10800 x g und 4°C abzentri-

fugiert. Dem phagenhaltigen Überstand wurde 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung (20 % (w/v) PEG 6000, 2,5 M NaCl) zugegeben und es wurden 1,5 h auf Eis und unter Bewegung (Taumeltisch WT12, Biometra, Göttingen) inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 10800 x g und 4°C. Das Pellet wurde in 20 ml sterilem Wasser aufgenommen. Erneut wurde 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung zugegeben und es wurde für 30 min auf Eis unter Bewegung inkubiert. Die präzipitierten scFv-Phagen wurden durch erneute Zentrifugation (30 min bei 10800xg und 4°C) pelletiert. Anschließend wurden die Phagen in 500 µl PBS aufgenommen und es wurde eine Titerbestimmung durchgeführt. Die Lagerung der Phagen erfolgte bei 4°C.

2.3.4 Titerbestimmung von Phagensuspensionen

Für die Titerbestimmung wurde zunächst eine Übernachtskultur (5 ml 2xTY, 50 µg/ml Tetrazyclin) von *E. coli* XL1-Blue angezogen. 50 bis 100 µl dieser dienten zur Inokulation der Hauptkultur von 50 ml 2xTY, die bis zu einer OD₆₀₀ von 0,32 bis 0,34 bei 37°C und 200 Upm inkubiert wurde. Danach erfolgte die weitere Kultivierung zur besseren Ausbildung der F-Pili bei 40 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5. 10 µl verschiedener Verdünnungsstufen der Phagensuspension (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶) wurden zur Infektion bei 37°C für 30 min im Wasserbad von je 50 µl der Hauptkultur verwendet. Die infizierten Zellen wurden auf TYE_{amp,Glukose}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die vorhandenen Kolonien wurden ausgezählt und der Titer der Phagensuspension in cfu/ml bestimmt.

2.4 Isolierung und Analytik von Nukleinsäuren

2.4.1 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Es wurde von einer 5 ml-Kultur ausgegangen, die bei 200 Upm und 37°C mind. 16 h inkubiert wurde. Um die Zellen zu pelletieren wurden 2 ml der Kultur in ein Eppendorf Gefäß überführt und in einer Mikrozentrifuge bei 13000 g für 1 min zentrifugiert. Das wurde mit weiteren 2 ml der Kultur in dem gleichen Eppendorf Gefäß nach dem Abnehmen des Überstandes wiederholt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 µl Lösung I (25 mM Tris (pH 8), 10 mM EDTA, 50 mM Glukose) mit 5 µl RNase I (10 mg/ml) vollständig resuspendiert durch Vortexen. Dann wurden 200 µl Lösung

II (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben und durch sechsmaliges invertieren gemischt. Als nächstes wurden 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, 11,5% (v/v) Essigsäure) zugegeben, das Eppendorf Gefäß einige Male invertiert bis ein flockiges Präzipitat sichtbar wurde. Jeweils nach der Zugabe der entsprechenden Lösung wurde 1 min auf Eis inkubiert. Um die Zellbestandteile zu fällen wurde nun bei 13000xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Um die DNA zu Fällern wurden 1 ml 96% (v/v) Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8, zugegeben und mind. 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte Zentrifugation bei 13000xg bei 4°C für mind. 15 min. Der Überstand wurde abgenommen, auf das DNA-Pellet 1 ml 70% Ethanol zum Waschen gegeben und erneut für 1 min zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes, wurde das Pellet bei 37°C für 15 min getrocknet und zum Schluss in 40 µl Wasser aufgenommen.

Alternativ wurden die Bakterienzellen einer 5 ml-Kultur wie oben angegeben pelletiert und dann zur Isolierung der Plasmid-DNA das „GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um eine DNA-Bande aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde diese zunächst nach dem Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht möglichst genau ausgeschnitten, wobei der Anteil an Agarose minimal gehalten wurde. Dann wurde diese in ein Eppendorf Gefäß gegeben und für 5 min bei -20°C eingefroren. Aus Parafilm wurde ein Trichter mit einer kleinen Öffnung an der Spitze geformt, in den das gefrorene Agarosegelstück gelegt wurde. Nun wurde durch vorsichtiges Auftauen beim Zusammendrücken mit zwei Fingern, der Puffer mit der enthaltenen DNA aus dem Agarosegelstück gedrückt und in einem Eppendorf Gefäß aufgefangen.

Je nach Versuch, wurde auch das „GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4.3 Isolierung von DNA aus PCR-Ansätzen

Zur Isolierung von DNA aus PCR-Ansätzen wurde ebenfalls das „GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences) verwendet.

2.4.4 Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation

Als weitere Aufreinigung diente die Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, um restliche Proteinanteile aus einer wässrigen DNA-Lösung zu entfernen. Dazu wurde zu der DNA-Lösung das gleiche Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1) gegeben, dann 30 s gevortext und 5 min in einer Tischzentrifuge bei höchster Umdrehungszahl zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein Eppendorf Gefäß gegeben, wobei möglichst kein Phenol mit übertragen wurde. Dessen Volumen wurde geschätzt und das dreifache Volumen an -20°C -kaltem Ethanol (absolut) zugegeben. Die Fällung erfolgte bei -20°C für mindestens 1 h. Danach wurde 30 min bei $13.000\times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation abgenommen und das Pellet wurde für ca. 15 min bei 37°C getrocknet. Schließlich wurde es in Wasser gelöst, wobei das Volumen je nach eingesetzter Ausgangsmenge an DNA abgeschätzt wurde. War das Pellet nicht sichtbar, wurden ca. $10\ \mu\text{l}$ Puffer verwendet.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

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

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

$$\text{Qualität} = A_{260}/A_{280}$$

Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd $50\ \mu\text{g}$ DNA bzw. $35\ \mu\text{g}$ RNA in 1 ml Volumen. Die optische Dichte ist hierbei abhängig vom GC-Gehalt der DNA-Lösung. Bei einer Konzentration von $50\ \mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA mit einem 72%igem GC-Anteil beträgt die OD 1,04, während bei einem 30%igem GC-Anteil die OD 0,94 beträgt. Das Verhältnis der bei 260 nm und

280 nm gemessenen Extinktion sollte für eine sorgfältig präparierte und proteinfreie Nukleinsäure bei 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) liegen.

Als weitere Methode wurde die elektrophoretische Konzentrationsbestimmung genutzt. Dafür wurde die DNA auf einem Agarosegel zusammen mit DNA bekannter Konzentration als Referenz aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt (2.4.6). Nun konnte durch visuellen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten unter UV-Licht (254-366 nm) die unbekannte Menge DNA abgeschätzt werden, da die Intensität der Fluoreszenz der Nukleinsäuren bei gleicher Länge ihrer Menge direkt proportional ist. Die Nachweisgrenze der Ethidiumbromid-Färbung liegt bei DNA-Mengen von 1-10 ng pro Fragment. Zur genaueren Bestimmung auf diese Art und Weise wurde das Programm „Image J“ (2.10.1) verwendet.

2.4.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose (1-1,2% (w/v)) wurde je nach benötigter Gelgröße in 20 - 50 ml 0,5 x TAE-Laufpuffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde der Ansatz in eine Gelkammer gegossen. Um die Gel-taschen zu formen, wurde ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Hier wurde das Gelsystem „MyRun Intelligent Electrophoresis Unit“ (CosmoBio, Tokyo, Japan) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{6}$ Volumen der „6 x Loading Dye Solution“ (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Für die Zuordnung der Größe eines Fragmentes wurde ein Größenstandard parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V 20 min bis 45 min durchgeführt und das Gel anschließend in der Färbelösung (10 µg/ml Ethidiumbromid (10 mg/ml, Roth) in 1 x TAE) inkubiert. Zum Schluss wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (360 nm) fotografiert (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Softwareversion 3.0)

2.5 Modifikation und Amplifikation von Nukleinsäuren

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten für Analyse von Plasmid-DNA oder zu Klonierungszwecken erfolgte mit Hilfe der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR). Als Polymerase wurde die GoTaq DNA Polymerase der Firma Promega (Madison, USA) oder die *Taq* DNA Polymerase von Roche (Mannheim). Es wurden jeweils 1,5-2,5 Einheiten der Polymerasen pro PCR-Reaktion eingesetzt. Die Stammkonzentration der Primer betrug 10 mM und die des dNTP-Gemisches 10 mM. Es wurde der jeweils vom Hersteller mitgelieferte Reaktionspuffer nach den entsprechenden Angaben verwendet. Die PCRs wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in dem Thermocycler Mastercycler personal von Eppendorf (Hamburg), dem Labcycler von SensoQuest (Göttingen) oder dem T3-Thermocycler von Biometra (Göttingen) durchgeführt. Die Standardzusammensetzung eines PCR-Ansatzes für 25 µl enthielt 1 µl dNTP-Gemisch, jeweils 1 µl Primer, 1 µl Plasmid-DNA und 0,25 µl DNA-Polymerase mit der vom Hersteller angegebenen Menge an Reaktionspuffer.

Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde häufig verwendet, wobei Schritt 2 bis 4 bis zu 30 Mal wiederholt wurden:

- | | | |
|---------|--------|-------------------------------------|
| 1. 95°C | 1 min | initiale Denaturierung |
| 2. 95°C | 1 min | Denaturierung |
| 3. X°C | 1 min | Annealing |
| 4. 72°C | 1 min | Primer-Extension |
| 5. 72°C | 10 min | finale Extension von Einzelsträngen |
| 6. 4°C | | Pause |

Je nach Ziel der PCR und den verschiedenen Versuchsbedingungen wurde dieses Protokoll nach Bedarf angepasst. Die Annealingtemperatur (X°C) wurde je nach Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaares variiert. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.4.6) überprüft.

2.5.2 Kolonie-PCR

Die Analyse der Plasmide bakterieller Klone aus Transformationen erfolgte mittels Kolonie-PCR. Diese unterschied sich von der Standard-PCR in der Größe des Ansatzes, die hier auf 8 µl reduziert wurde, sowie durch eine auf 5 min verlängerte initiale Denaturierungszeit am Beginn der PCR. Teile einzelner Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze in den in einem 0,2 µl Eppendorf Gefäß vorgelegten Reaktionsansatz überführt und lieferten damit die DNA, die als Vorlage für die Reaktion diente.

2.5.3 Restriktionsverdau

Für die enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die von den Herstellern der einzelnen Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen angewendet. Die Restriktionspuffer (zehnfach konzentrierte Stammlösungen), deren genaue Zusammensetzung den Beipackzetteln der jeweiligen Enzyme zu entnehmen war, wurden bei -20°C gelagert. Die Aktivität der Restriktionsenzyme wurde durch Zugabe von $\frac{1}{6}$ Volumen „6 x Loading Dye Solution“ sowie durch 10 minütiges Erhitzen auf 65 bis 80°C gestoppt. Für eine analytische Spaltung wurden 0,2 - 1,0 µg DNA (Plasmid-DNA oder DNA-Fragment) in einem 10 – 20 µl Ansatz gespalten. Das Ansatzvolumen präparativer Spaltungen ist von der Konzentration der zu spaltenden DNA abhängig. Zur Spaltung der Plasmid-DNA wurden für 1 µg Plasmid die ein- bis vierfache Menge an Enzymeinheiten (Units) eingesetzt

Zur Spaltung wurde der Reaktionsansatz 1 - 4 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde das Ergebnis durch Auftragen der Probe auf ein Agarosegel und anschließender Elektrophorese kontrolliert. Bei Spaltungen mit mehreren Enzymen war zu beachten, dass die Enzyme unter gleichen Bedingungen aktiv waren und dass der Abstand zwischen den Spaltstellen eine gleichzeitige Spaltung zuließ. Waren die benötigten Salzkonzentrationen im Puffer sehr unterschiedlich, so wurde zuerst im Niedrigsalzpuffer gespalten. Anschließend wurde die Salzkonzentration erhöht und die zweite Spaltung durchgeführt. In einigen Fällen war es günstiger, die DNA erst aufzureinigen, um dann die nächste Spaltung durchzuführen.

2.5.4 Dephosphorylierung von linearer DNA

Für 5'-Dephosphorylierungen restriktionsverdauter DNA wurde die „Shrimp Alkaline Phosphatase (1 Unit/ μ l)“ oder die „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“ (1 Unit/ μ l) der Firma Fermentas verwendet. Die Reaktionen wurden in 10 bis 25 μ l Ansätzen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.5 Ligation

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden wurden in einem 10 bis 20 μ l Ansatz Vektor und Insert in einem Verhältnis, abhängig vom Versuch, von 1: 10 bis 1:100 eingesetzt. Es wurde 1 μ l der „T4-DNA-Ligase (5 Weiss Units/ μ l)“ der Firma Fermentas im entsprechenden Puffersystem verwendet. Inkubiert wurde 16 h bei 16°C oder über Nacht bei Raumtemperatur.

2.6 Mutagenesemethoden zum Erstellen von Antikörpergenbanken

2.6.1 SOE-PCR Mutagenese

Das Prinzip dieser Mutagenesestrategie liegt darin, anhand der Original-Sequenz mit Hilfe von partiell degenerierten Primern durch eine PCR in der CDR1 mutierte Fragmente zu synthetisieren. 10% der Basen der ursprünglichen Sequenz der CDR_L1 bzw. CDR_H1 sind durch zufällige Nukleotide ausgetauscht (Abb. 2.3).

CDR_H1-deg-primer_forw

CTGTGCAGCCTCT441223133222143143212433124143TGGGTCCGCCAG

CDR_L1-deg-primer_rev

GCTTCTGCTGGTACCA432243121121432232414432423233224GCATGTGATCC

Code: 1: A 90% + Rest je 3,3% (T 3,3%, C 3,3%, G 3,3%)
 2: T 90% + Rest je 3,3% (A 3,3%, C 3,3%, G 3,3%)
 3: C 90% + Rest je 3,3% (A 3,3%, T 3,3%, G 3,3%)
 4: G 90% + Rest je 3,3% (A 3,3%, T 3,3%, C 3,3%)

Abb. 2.3: Aufbau der partiell degenerierten Primer. In der mit Ziffern angegebenen Sequenz der Primer liegt ein Basenaustausch mit einer Frequenz von 10% vor, erzeugt nach dem darunter angebenen Verhältnis der bei der Synthese eingesetzten dNTPs.

Dieser Umstand ermöglicht es, in einer dritten PCR, der Assembly-PCR, die beiden Fragmente zu fusionieren. Damit erhält man ein vollständiges BFB1-2-Gen mit randomisierter CDR_L1. Da in der Praxis die Fusion der Fragmente allein zu keiner ausreichenden DNA-Ausbeute führt, wird eine vierte PCR zu Amplifikation des Gens angesetzt. In dieser kommt ein weiteres Primer-Paar zum Einsatz (687 und 689), das etwas innerhalb des Fusionsproduktes liegt. Die Mutagenese der CDR_H1 wird auf die gleiche Art vorgenommen, wobei sich Fragmente ergeben, die 723 Bp und 132 Bp lang sind und der überlappende Bereich 13 Bp umfasst.

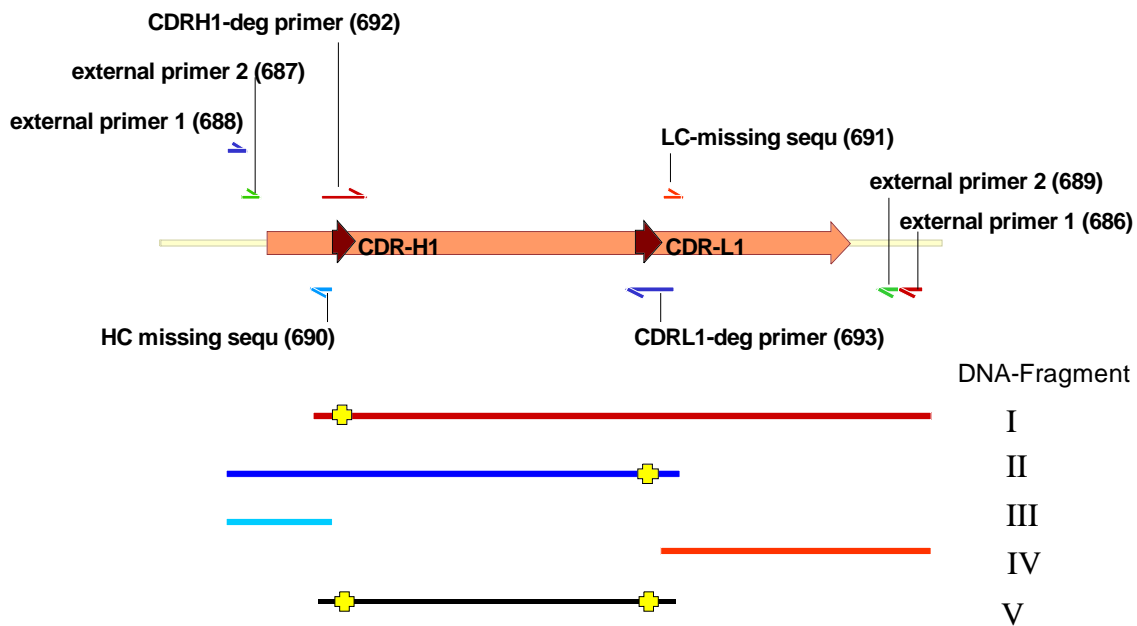


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des BFB1-2-Gens mit den für die Mutagenese-PCR eingesetzten Primern und den resultierenden DNA-Produkten I-V. Die DNA-Fragmente (I bis V) werden durch folgende Primer gebildet: I (rot) durch CDR_H1-deg primer und external primer1 rev; II (blau) durch external primer1 forw und CDR_L1-deg primer, III (hellblau) durch external primer1 forw und HC missing sequ, IV (orange) durch LC missing sequ und external primer1 rev und V (schwarz) durch CDR_H1-deg primer und CDR_L1-deg primer. Die in den resultierenden DNA-Fragmenten entstehenden mutierten Bereiche der CDR_H1 oder der CDR_L1 sind als gelbe Kreuze hervorgehoben.

Es ist außerdem möglich, ein in beiden CDR1 mutiertes BFB1-2-Gen herzustellen. Dazu müssen drei Fragmente synthetisiert werden. Das erste Fragment (445 Bp) beinhaltet die beiden mutierten Regionen und wird mit dem CDR_L1-deg und dem CDR_H1-deg Primer synthetisiert. Um das Gen zu komplettieren, werden die 5'- und 3'-Enden benötigt, die durch die Fragmente III und IV bereitgestellt werden (Abb. 2.4).

Tab. 2.1: Übersicht über die zur Herstellung der in der SOE-PCR Mutagenese scFv-Genfragmente benötigten Primer und die in der PCR verwendeten Annealingtemperaturen.

Fragment	Primer	Annealingtemperatur
I	692, 686	70°C
II	693, 687	73°C
III	690, 687	73°C
IV	691, 686	70°C
V	692, 693	73°C

In der ersten PCR werden die einzelnen Mutationen tragenden Fragmente und die zu einem vollständigen scFv ergänzenden Fragmente wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben synthetisiert. Eine Übersicht über die einzelnen Primer und Annealingtemperaturen gibt Tab. 2.1. Die sich anschließende Assembly-PCR unterteilt sich in zwei einzelne PCR-Schritte. Der erste Schritt dient zur Fusion der einzelnen Fragmente, bei dem in einem 10 µl-Ansatz jeweils 20 ng der zusammengehörenden Fragmente eingesetzt werden. Das PCR-Protokoll sieht dabei wie folgt aus, wobei Schritt 2 und 3 in einer Schleife 20 Mal wiederholt werden:

1. 95°C 1 min
2. 95°C 1 min
3. 65°C 1 min
4. 4°C Pause

Der zweite PCR-Schritt dient zur Amplifikation des Fusionsproduktes, bei dem in einem 50 µl PCR-Ansatz 1 µl des ersten Ansatzes als Template eingesetzt werden. Das Amplifikationsprotokoll ist wie in Kapitel 2.5.1 angegeben, die Zyklenzahl dabei ist 25 und die Annealingtemperatur beträgt 64°C.

2.6.2 Error-Prone-Mutagenese

Diese Mutagenesestrategie beruht auf der Methode der „Error Prone PCR“ (EP-PCR), die zufällige Mutationen mit einer Frequenz von 1- 16 Mutationen pro Kb in ein Gen einführen kann. Dazu wird das „GeneMorphII EZClone Domain Mutagenesis Kit“ von Stratagene verwendet. Im Unterschied zu dem im Kit angegebenen Protokoll werden

hier nicht nur eine PCR, sondern möglichst viele hintereinander, zur Mutagenese auf das Gen angewendet, um eine möglichst hohe Variabilität zu erreichen. Dafür wird das aus einer Mutageneserunde gewonnene mutierte Gen als Plasmid aufgereinigt und als Template für die folgende PCR eingesetzt. Diese Methode wird in zwei Schritte unterteilt: Zum einen die Synthese des Megaprimers durch die Amplifikation des *scFv*-Gens mit der Mutazym II DNA Polymerase, wobei Mutationen eingefügt werden und zum anderen die Klonierungsreaktion, in der das aufgereinigte mutierte PCR-Produkt aus der ersten PCR als Megaprimer dient, der sich an das Ursprungsplasmid anlagert und in einer zweiten PCR verlängert wird. Das Ursprungsplasmid wird vor der Transformation durch *DpnI*-Verdau entfernt. Die Methode wurde nach den Angaben des Herstellers des Kits durchgeführt, doch die einzelnen Reaktionsbedingungen sollen hier kurz zusammengefasst werden. Die Synthese des Megaprimers fand in einem 50 µl PCR-Ansatz statt, in dem 1 ng des Plasmids pDNEK-BFB1-2 als Template und je 125 ng der Primer eingesetzt wurden. Die PCR wurde wie in Kapitel 2.5.1 angegeben durchgeführt, die Annealingtemperatur lag bei 64°C und die Zyklenzahl betrug 30. Für die anschließende Klonierungsreaktion wurden 50 ng Ursprungsplasmid, bzw. des mutierten Plasmids aus einer davor durchgeführten EP-PCR-Mutageneserunde, und 250 ng Megaprimer eingesetzt. Das Amplifikationsprotokoll sah wie folgt aus, die Schritte 2 bis 4 wurden 25 Mal wiederholt:

1. 95 °C 2 min
2. 95°C 1 min
3. 60°C 1 min
4. 68°C 10,4 min
5. 4°C Pause

Es folgte die Transformation in die im Kit enthaltenen Zellen *E. coli* XL10-Gold. Die erhaltenen Klone wurden von den Agarplatten in 2 x TY-Medium aufgenommen, wobei ein Teil zur Präparation von Plasmid-DNA diente, das für die nächste Runde der Mutagenese als Template zur Verfügung stand.

2.7 Isolierung und Analytik von Proteinen

2.7.1 Aufreinigung von scFvs über Protein A-Affinitätschromatographie

Da alle scFv-Klone, die aus der ETH-2 Bank hervorgingen, ein VH DP-47 Keimbahn-Segment aus der humanen VH3 Familie enthalten, konnten sie über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden

Die Bakterien einer 200 ml Expressionskultur wurden zunächst bei 3000xg für 10 min abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand erneut bei 24.400xg – 48.300xg (im Festwinkelrotor abhängig vom Abstand zur Rotationsachse) zentrifugiert, um möglichst alle größeren Verunreinigungen daraus zu entfernen und ein Zusetzen der Chromatographie-Säule zu vermeiden. Hier wurde die Säule „Pierce Chromatography Cartridges Protein A“ (Thermo Scientific) im 1 ml-Format nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der Chromatographie-Anlage Äkta prime plus von GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Schweden) bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Die Elution der an der Säule gebundenen Antikörperfragmente erfolgte mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,8 in 0,25 ml oder 0,5 ml Fraktionen, deren pH-Wert durch 38 µl 1 M Tris, pH 9 neutralisiert wurde. Die scFv-Eluate wurden wie unter 2.7.2 weiterbehandelt.

2.7.2 Einengen und Umpuffern von aufgereinigten scFvs

Nach Aufreinigung der scFvs wurden die Eluate aufkonzentriert und in PBS für Bindungsanalysen an der Autolab Esprit umgepuffert. Dieses erfolgte mit Hilfe von „Amicon[®] Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 10.000 MWCO“ (Millipore Corporation). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Umpufferung wurde 2 Mal mit 10 ml und einmal mit 5 ml PBS gewaschen.

2.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der „Bradford Protein Assay“ ist eine einfache Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen, die auf der Änderung der Absorption von Coomassie Blue 250 nach der Bindung an Proteine beruht.

Um geringere Mengen an Proteinlösung zur Konzentrationsbestimmung verwenden zu können, wurde mit Mikrotiterplatten gearbeitet und die Messung der Absorption wurde

bei 595 nm in dem Spektrophotometer Ultrospec 3000 von Pharmacia Biotech (Cambbridge, England) vorgenommen. Da die scFvs in PBS gelöst vorlagen, wurde auch die Proteinstandardreihe mit den folgenden Konzentrationen an BSA ($\mu\text{g/ml}$) in PBS angesetzt: 5, 10, 25, 50, 75, 100. Für den Blank und den Wert 0 $\mu\text{g/ml}$ wurde PBS verwendet. Zuerst wurden 40 μl der Standardlösung und 5 bis 20 μl der scFv-Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Dann wurden jeweils 120 μl Wasser dazugegeben und 40 μl des Bradfordreagenzes. Es wurde 3 min, höchstens 5 min, bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bestimmt. Anhand der so gewonnenen Werte konnte mit Microsoft Excel eine Standardgerade erstellt und die Konzentration der scFv-Proben berechnet werden.

2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode wurde angepasst auf die individuellen Versuchsbedingungen nach Hust (2002) durchgeführt.

2.7.5 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde nach Blum *et. al.* (1987) angewendet. Die Inkubationsschritte des Gels in den verschiedenen Lösungen erfolgten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf einer Wippe. Nachdem das Gel in eine geeignete Schale gelegt wurde, wurden zunächst die Proteine im Gel für mindestens 1 h oder über Nacht in 50 ml Stopplösung (50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Eisessig in Wasser) mit 25 μl 37% (v/v) Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 min mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation in Na-Thiosulfatlösung (10 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ in 50 ml H_2O) für 1 min, worauf dreimal für 20 s mit Wasser gewaschen wurde. Anschließend wurde das Gel für 20 min in einer AgNO_3 -Lösung (0,5 ml 20% (w/v) AgNO_3 , 37,5 μl 37% (v/v) Formaldehyd in 50 ml H_2O) inkubiert. Dann wurde erneut zweimal für 20 s mit H_2O gewaschen und anschließend für 1 bis 10 min in Entwickler-Lösung (1 ml Thiosulfatlg., 3 g Na_2CO_3 , 25 μl 37% (v/v) Formaldehyd in 50 ml Wasser) die Färbung der Proteine entwickelt. Bei Sichtbarwerden erster Protein-Banden wurde die Färbung durch zweimal 2 min Waschen mit Wasser und 10 min Inkubation in der Stopplösung abgebrochen, da die

Banden durch diese Prozedur noch stark an Kontrast gewannen. Die kurzfristige Lagerung der so gefärbten Gele erfolgte in Wasser.

2.7.6 Western Blot

Elektroporetisch aufgetrennte Proteine konnten mit Hilfe des Western Blots auf die PVDF-Membranen „PVDF Western Blotting Membranes“ von Roche Diagnostics (Mannheim) übertragen und dort fixiert werden. Dies erfolgte ebenfalls nach Hust (2002).

2.7.7 Ponceaufärbung und Immunfärbungen

Die Färbung und Fixierung der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe der Ponceaufärbung. Dabei wurde teilweise der Bereich der Markerbanden von der restlichen Membran abgetrennt, um diese in gefärbter Form bewahren zu können für den späteren Vergleich mit den durch die Immunfärbung sichtbar gemachten scFv-Banden. Die Blotabsättigung erfolgte mit 10 ml Blocking-Lösung (Roti-Block 10 x Konzentrat von Roth (Karlsruhe), 1:10 in PBS verdünnt). Für die Immunfärbung wurden die Antikörper (2.1.3) 1:2000 oder 1:1000 verdünnt eingesetzt. Ansonsten wurde verfahren wie bei Hust (2002) angegeben.

2.7.8 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Um die zuvor als Vollängenklone charakterisierten durch Panning selektierten scFvs auf deren Bindungseigenschaften zu testen, wurden ELISAs durchgeführt. Die dafür benötigten scFvs wurden direkt aus dem Kulturüberstand genommen, der wie in 2.2.7 beschrieben vorbereitet wurde. Alle hier beschriebenen Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf einer Wippe für 1 h statt. Der ELISA wurde in Maxi-Sorp Mikrotiterplatten von Nunc (Roskilde, Dänemark) durchgeführt, deren einzelne Vertiefungen zunächst mit Streptavidin beschichtet werden mussten. Dafür wurde in jede Vertiefung 100 µl Streptavidin-Lsg. (50 µg/ml PBS) gegeben und inkubiert. Diese wurde anschließend verworfen und die restliche Bindekapazität durch Zugabe von 100 µl Blocking-Lösung (Roti-Block von Roth (Karlsruhe) 1:10 in PBS) und Inkubation abgedeckt. Dann wurde drei Mal mit je 200 µl PBST im ELISA Washer Biotrak II plate washer von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) gewa-

schen. Zur Kopplung des Biotin-FB1-Konjugates (2.8.1) wurden 100 μ l einer Biotin-FB1-Lösung (2,6 mM in PBS) pro Vertiefung inkubiert und dann erneut wie oben angegeben gewaschen. Für den ELISA wurden 50 μ l scFv-Kulturüberstand und 50 μ l Blocking-Lösung pro Vertiefung zugegeben und inkubiert. An die Bindung der scFvs schloss sich Waschen und dann die Bindung der Antikörper „Anti-FLAG M2 Monoclonal Antibody“ und „Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate“ (Sigma Aldrich) an. 100 μ l einer Lösung der beiden Antikörper 1:1000 in PBS verdünnt, wurde davon pro Vertiefung inkubiert. Nach dem Waschschrift wurde 100 μ l Substratlösung (0,2% (w/v) di-Natrium-p-Nitrophenylphosphat in 1M DEA, 1mM MgCl₂) zugegeben und je nach Versuch nach 30 bis 50 min die Absorption im ELISA-Reader Biotrak II plate reader von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) bei 405 nm gemessen.

2.8 „Panning“ gegen Fumonisin B1 (FB1)

2.8.1 Kopplung von FB1 an Biotin

Das reaktive Linkermolekül EZ-Link™ NHS-LC-Biotin von Pierce (bei Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) wurde für die Kopplung von Fumonisin B1 an Biotin verwendet. 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 autoklavieren gelöst werden. So ist es möglich, Fumonisin stabil an Streptavidin-beschichtete Oberflächen zu koppeln. Biotin ist über eine Alkylkette aus sechs Kohlenstoffatomen (Länge von 22,4 Å) mit dem N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester verbunden. Diese reagieren in neutralem bis alkalischem pH Bereich (pH 7-9) sehr effizient mit primären Aminogruppen und bilden stabile Amid-Bindungen aus, wobei N-Hydroxysuccinimid als Abgangsgruppe fungiert. Die einzelne in Fumonisin B1 enthaltene primäre Aminogruppe wurde dafür genutzt.

Die Reaktion wurde in einem molaren Verhältnis Hapten zu Linker von 10 zu 1 angesetzt. Eine FB1-Lösung mit der Konzentration von 1 mg/ml lag vor. 250 μ l dieser Lösung enthielten 325 nmol FB1, daher wurden für die Reaktion 32,5 nmol Biotinlinker benötigt. Dazu wurden 1mg des Linkers in 1 ml DMSO gelöst, was 2,18 μ mol entspricht. 15 μ l dieser Lösungen enthielten 32,5 nmol. Der Reaktionsansatz (250 μ l FB1 +

15 µl Biotinlinker, mit PBS, pH 7,4 auf 500 µl aufgefüllt) wurde bei Raumtemperatur unter Rotation oder auf einer Wippe 2 h inkubiert.

2.8.2 „Panning“ in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen

Das „Panning“ wurde in Vertiefungen der Mikrotiterplatte „Strepta Well“ (Roche) durchgeführt, die mit Streptavidin beschichtet waren. In eine Vertiefung wurde 100 µl Linkerlösung (EZ-Link™ NHS-LC-Biotin (1 mg/ml)) gegeben. Dieses sollte der Deselektion von Phagen dienen, die Linker bzw. Streptavidin binden. Eine weitere Vertiefung wurde mit 100 µl der Lösung des Biotin-FB1-Konjugats (650 mM) versehen. Diese sollte der Selektion von Phagen dienen, die spezifisch das Antigen Fumonisin B1 erkennen. Es wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Daran schloss sich dreimaliges Waschen mit PBST an. Zur Deselektion wurden 100 µl Phagen der jeweiligen amplifizierten Antikörperbank in die erste Vertiefung gegeben und für eine 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 je 200 µl PBST 15 Mal gewaschen, wobei die letzten 200 µl Waschlösung für eine weitere Analyse aufbewahrt wurden. Anschließend folgte eine Waschphase mit erhöhter Stringenz durch ansteigende Salzkonzentrationen (0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M), wobei 10 Mal mit je 100 µl je Salzkonzentration und Inkubation für ca. 15 s bei Raumtemperatur gewaschen wurde. Daran schloss sich die Elution von bindenden Phagen in 2 Phasen an. Als erste Elutionsphase diente die kompetitive Elution mit steigenden Konzentrationen an Fumonisin B1 (10^{-8} M, 10^{-7} M beim 1. Panning und zusätzlich 10^{-9} M FB1 beim 2. Panning). Hier wurde je Verdünnungsstufe einmal mit je 100 µl eluiert und jeweils 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als letzte Elutionsphase diente zum Eluieren aller noch gebundenen Phagen die saure Elution mit Glycin-HCl (0,1 M), pH 2,8 für 15 min bei Raumtemperatur. Dieses Eluat wurde mit 100 µl 1 M PBS neutralisiert.

2.8.3 Analyse von selektierten scFv-Klonen über die Deoxycholatmethode

Die Deoxycholatmethode nach Li *et. al.* (2002) diente dazu die Expression des scFv-Gens zu überprüfen. Die Methode beruht auf der Veränderung der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien durch das Bakteriophagen f1 Gen III Protein (pIII, „minor

coat protein“). Die Expression des pIII (Fusions-) Proteins führt zu einer Empfindlichkeit der Wirtsbakterien unter anderem gegenüber dem Detergenz Deoxycholat (DOC), was zu einem reduzierten Wachstum auf DOC-haltigem Medium führt. Die Durchführung erfolgte wie bei Li *et. al.* (2002) beschrieben.

2.9 Analyse der Bindeeigenschaften von Antikörperfragmenten

2.9.1 Grundlagen der „Surface Plasmon Resonance“ (SPR)-Technologie

Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ist eine oberflächensensitive Technik, die dazu genutzt werden kann nanometerdünne organische Schichten auf Edelmetallfilmen zu untersuchen. Sie beruht auf der Messung der Änderung des refraktorischen Indexes aufgrund von Bindung einer organischen Schicht auf einer Goldoberfläche.

Der Effekt der SPR tritt auf zwischen elektromagnetischen Wellen einfallenden Lichtes und den Elektronen des Goldes. Wenn Licht an einer Grenzfläche zwischen zwei nicht leitenden Medien reflektiert wird, kommt es über dem so genannten kritischen Winkel zu totaler Reflektion dessen, wobei gleichzeitig ein abklingendes Feld erzeugt wird. Dieses elektrische Feld wird durch die vorhandene Goldschicht verstärkt und bei den äußeren freien Elektronen (auch „surface plasmons“ genannt) kommt es zu einer Resonanz, die Oberflächenplasmonresonanz genannt wird. Dabei wird Energie des einfallenden Lichtes auf die Oberflächenenergie übertragen und die Intensität an reflektiertem Licht nimmt ab. Der Winkel, bei dem dieser Abfall der Intensität das Minimum erreicht, wird Resonanzwinkel genannt. Im Autolab SPR Instrument wird der Resonanzwinkel bestimmt, indem die Reflektion als eine Funktion des einfallenden Lichtes gemessen wird, dessen Winkel durch einen vibrierenden Spiegel verändert wird. Der SPR-Effekt führt dazu, dass jede Änderung im refraktorischen Index in einer Änderung im Resonanzwinkel resultiert. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge der an der Goldoberfläche gebundenen Substanz und der damit einhergehenden Änderung des refraktorischen Indexes und der Änderung des SPR-Winkels, der gemessen in Milligrad als Antwort-Einheit zur Quantifizierung benutzt wird. Eine Änderung um 120 m° repräsentiert eine Zunahme von gebundenem Protein von 1 ng/mm^2 auf der Oberfläche oder der Änderung des refraktorischen Indexes der angrenzenden Lösung um 10^{-3} .

2.9.2 Kopplung der Sensordiscs

Für Analysen an der Autolab SPR Esprit (Eco Chemie B. V., Utrecht, Niederlande) standen zwei Küvetten zur Installation auf der Chipoberfläche zur Verfügung, die individuell beschickt werden konnten und simultan gemessen wurden. Eine wurde zur Messung der Bindeeigenschaften der scFvs genutzt, die andere diente als Referenz. Grundsätzlich musste bei beiden verwendeten Chips nach deren Installation im Gerät die Oberfläche mit dem Bindepuffer PBS, pH 7,4 oder Natrium-Acetat-Puffer (10 mM) stabilisiert werden, wozu eine eigene Sequenz im Steuerungsprogramm „Data Acquisition“ (Autolab SPR Software, Eco Chemie B. V., Utrecht, Niederlande) zur Verfügung stand.

Der Chip „Sensordisc Bare Gold“ wurde zunächst über Nacht bei Raumtemperatur in 11-Mercaptoundecansäure (11-MUA)-Lösung (1 mM in 98 % (v/v) Ethanol) inkubiert, um eine Thiolschicht auf der Oberfläche zu assemblieren. Nach Waschen mit Ethanol (98 % (v/v)) und Wasser, wurde der Chip getrocknet und dann in der Autolab SPR Esprit installiert.

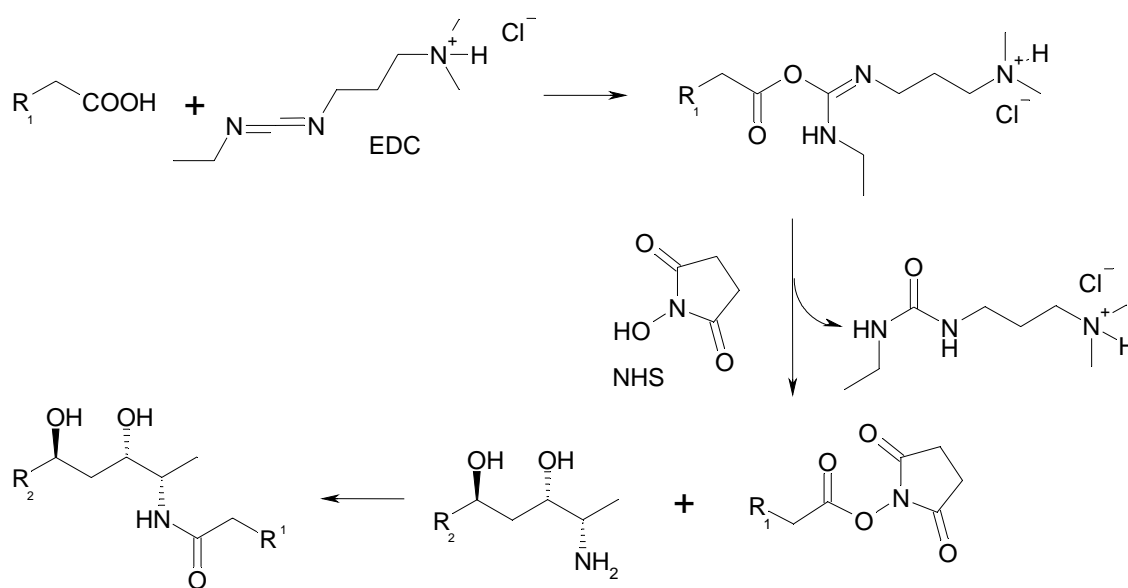


Abb. 2.5: Reaktion der 11-MUA mit FBI zur kovalenten Immobilisierung auf der Oberfläche der Sensordisc. EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimide Hydrochlorid) reagiert mit der Carboxylgruppe des 11-MUA (R_1 =nicht dargestellter Rest) und es entsteht ein Amin-reaktives Intermediat, das mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) zu einem Amin-reaktiven NHS-Ester reagiert, der in wässrigen Lösungen stabil ist. Die so aktivierte Carboxygruppe reagiert unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung mit dem primären Amin des FBI (R_2 =nichtdargestellter Rest).

Dann wurde mit der Sequenz „Ligand Immobilization“ auf der Oberfläche des Chips in beiden Küvetten Fumonisin B1 (40 mM in Natrium-Acetat-Puffer) gekoppelt. Als Bindepuffer diente hierbei Natrium-Acetat-Puffer (10mM) und als Regenerationslösung 0,1 M Salzsäure. Folgende Zeiten wurden bei dieser Sequenz für die einzelnen Schritte verwendet: 120 s „Baseline“, 300 s „EDC/NHS Activation“ mit 0,4 M EDC und 0,1 M NHS, 900 s „Ligand Coupling“ mit FB1, 600 s „Deactivation“ mit 1M Ethanolamin, pH 8,5, 120 s „Regeneration“. Auf diese Weise konnte auch hier die primäre Aminogruppe des FB1 erfolgreich für eine Kopplung durch die Reaktion mit einer aktivierten Carboxygruppe eingesetzt werden (Abb. 2.5).

Für den Chip „SPR Sensor disc SAD50d“ (Xantec, Düsseldorf) wurde die Kopplung mit der Sequenz „full kinetic plot 50 μ l“ vorgenommen und die Oberflächen des Streptavidin-beschichteten Goldchips beider Küvetten wurden mit FB1-Biotin-Konjugat (22mM in PBS) gekoppelt. Dafür wurden folgende Zeiten für die verschiedenen Schritte eingegeben: 600 s „Baseline“ mit PBS, 900 s „Assoziation“ mit FB1-Biotin-Konjugat, 400 s „Dissoziation“ mit PBS. Danach wurden eventuell noch unbesetzte Bindestellen mit Biotin-Lösung (50 μ g/ml in PBS) bei folgenden Zeiten mit der gleichen Sequenz geblockt: 120 s „Baseline“ mit PBS, 180 s „Assoziation“ mit Biotin-Lösung, 400 s „Dissoziation“ mit PBS.

2.9.3 Affinitätsmessungen

Nach der Kopplung des Antigens an die Chipoberfläche wurde diese erneut mit dem Bindepuffer PBS, pH 7,4 stabilisiert, wozu die Sequenz „Stabilize Surface“ aus dem Programm „Data Acquisition“ der Autolab SPR Software verwendet wurde.

Für die Bindungsanalyse der scFv wurde die erste Küvette gegen die zweite gemessen, die mit Bindepuffer ohne scFv beschickt wurde. Es wurde die Sequenz „full kinetic plot“ mit folgenden Schritten verwendet: 120 s „Baseline“, 500 s „Assoziation“ zum Binden des scFvs an FB1, 600 s „Dissoziation“ und 200 s „Regeneration“ mit 1 M Salzsäure, um alle gebundenen scFvs möglichst vollständig wieder abzulösen. Zum Testen einer größeren Anzahl von verschiedenen scFvs wurden diese 1:100 und 1:10 verdünnt und dann je zwei Mal pro Verdünnungsstufe und zwei Mal unverdünnt gemessen. Für genauere Bestimmungen der Affinität der scFvs wurden einzelne in den folgenden Konzentrationen gemessen: 0 μ M, 0,125 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M; 2 μ M,

5 μM und 10 μM (angepasst je nach Versuch). Die computergestützte Bearbeitung und Auswertung von Daten erfolgte mit dem Programm Scrubber 2.0c (Biologic Software Pty. Ltd., Campbell, Australia).

2.10 Computergestützte Auswertung von Daten

2.10.1 DNA-Konzentration

Für die optische Ermittlung von DNA-Konzentrationen aus Bildern von Agarosegelen wurde das Programm Image J (Open Source, National Institutes of Health, USA: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) verwendet.

2.10.2 DNA-Sequenzen

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm Vector NTI Advance 9 (InforMax, Invitrogen life science software) bearbeitet und analysiert.

2.10.3 SPR-Daten

Die Auswertung der SPR-Daten erfolgte durch die Programme Scrubber2, Version 2.0c, 2008 (Biologic Software Pty. Ltd., Campbell, Australia) und Kinetic Evaluation (Autolab Esprit, Eco Chemie B. V.) unter Verwendung des 1:1 Langmuir-Bindungsmodells. Dissoziationskonstanten wurden nach den allgemeinen Programmstandards berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung der Antikörperbibliotheken

Mit Hilfe der Mutagenesemethode der SOE-PCR konnten drei verschiedene Antikörperbibliotheken des scFv BFB1-2 erstellt werden: Eine Bibliothek mit in der CDR_H1 mutagenisiertem Bereich (BFB1-2-H1), eine mit in der CDR_L1 mutagenisiertem Bereich (BFB1-2-L1) und eine mit in beiden CDR1 eingeführten Mutationen (BFB1-2-M). Die Mutagenesemethode der EP-PCR führte zu einer Antikörperbibliothek mit über den gesamten Bereich des Gens zufällig eingeführten Mutationen (BFB1-2-E).

3.1.1 Die scFv-Antikörperbibliothek BFB1-2-H1, -L1 und -M

Die erste PCR diente mit Hilfe partiell degenerierten Primer zur Herstellung der mutagenisierten Fragmente (I und II, bzw. V) und der Fragmente, die diese zu einem ganzen scFv-Gen ergänzten (III und IV) (2.6.1). Sie wurden in einer PCR mit dem Plasmid pDNEK-BFB1-2 als Template hergestellt (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Übersicht über die PCR-Bedingungen zur Synthese der mutagenisierten scFv-Teilfragmente und der zu einem vollständigem scFv ergänzenden Fragmente

Fragment	Primer	Annealingtemperatur	Länge [Bp]
I	692, 686	70°C	723
II	693, 687	73°C	565
III	690, 687	73°C	132
IV	691, 686	70°C	292
V	692, 693	73°C	445

Der PCR-Ansatz wurde über ein Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden zur Aufreinigung aus dem Gel ausgeschnitten, mit der „Freeze and Squeeze“-Methode aus dem Gel isoliert und die Konzentration der DNA-Fragmente im Agarosegel bestimmt.

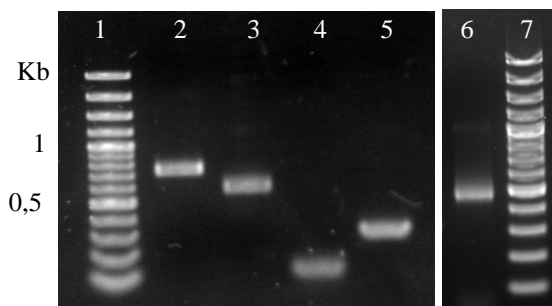


Abb. 3.1: PCR mit partiell degenerierten Primern zur Synthese der mutagenisierten *scFv-BFB1-2*-Fragmente. Die Elektrophorese wurde mit einem 1% (w/v) Agarosegel bei 135 V für 25 min. durchgeführt. Es wurden jeweils 4 μ l der aufgereinigten Fragmente aufgetragen. In Bahn 2 befindet sich Fragment I (mutagenisiert im Bereich CDRH1), in Bahn 3 Fragment II (mutagenisiert im Bereich CDRL1), in Bahn 4 Fragment III (ergänzt Fragment I zu einem vollständigen *scFv*), in Bahn 5 Fragment IV (ergänzt Fragment II zu einem vollständigen *scFv*) und in Bahn 6 Fragment V. 5 μ l des 100 Bp DNA Ladder plus (Fermentas) dienten als Größenstandard (Bahn 1, 7.)

Alle Fragmente konnten, wie in Abb. 3.1 zu erkennen, sauber in den erwarteten Längen synthetisiert werden. Damit standen sie dem nachfolgendem Schritt, der Assembly-PCR, zur Verfügung. Diese diente dazu die zusammengehörenden Fragmente zu einem vollständigen *scFv*-Gen zusammenzufügen (Produkt mit 842 BP Länge) und zu amplifizieren (Produkt mit 806 Bp Länge) (2.6.1). Dafür wurden pro Fragment und Assembly-PCR-Ansatz 20 ng eingesetzt, wobei insgesamt die ganze Ausbeute aus dem ersten Schritt verwendet wurde. Die Assembly-PCR führte in den folgenden Kombinationen zu einem Pool an *scFvBFB1-2*-Genen, der zur Klonierung in pDNEK zur Verfügung stand: I und III zu *BFB1-2-H1*, II und IV zu *BFB1-2-L1* und V, III und IV zu *BFB1-2-M*.

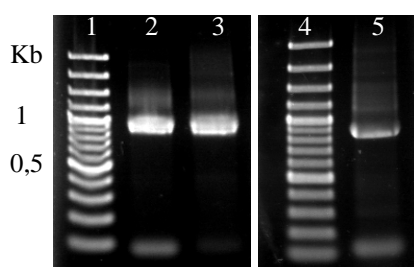


Abb. 3.2: Fusionsprodukte der Assembly-PCR. Die Elektrophorese wurde mit einem 1% (w/v) Agarosegel bei 135 V für 25 min. durchgeführt. Zu sehen ist die Bande des amplifizierten *BFB1-02*-Gens (806 Bp), das in den entsprechenden CDR1-Bereichen mutagenisiert wurde. Als DNA-Größenstandard diente der 100Bp-DNA Ladder plus (Fermentas) (Bahn 1,4). Bahn 2) *BFB1-2-H1*, Bahn 3) *BFB1-2-L1*, Bahn 4) *BFB1-2-M*.

Die einzelnen gleichen Assembly-PCR-Ansätze wurden vereint, über das „GFXTM PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences) aufgereinigt und die Konzentration der DNA-Fragmente im Agarosegel bestimmt.

Zur Klonierung in den Phagemid-Vektor pDNEK dienten die Schnittstellen *NcoI* und *NotI*. Die mutagenisierten *scFv*-Gene *BFB1-2-H1*, *BFB1-2-L1* und *BFB1-2-M* wurden mit diesen Enzymen geschnitten und mit dem geschnittenen und aufgereinigten pDNEK-Vektor ligiert. Dabei wurde die aus der SOE-PCR hervorgegangene gesamte Ausbeute verwendet. Es folgte die Transformation in superkompetente *E. coli* XL1-Blue und die Bestimmung der Größe der resultierenden Antikörperbibliotheken anhand der Anzahl der Klone. Damit hat die BFB1-2-H1 einen Umfang von 8×10^4 Klonen, die BFB1-2-L1 einen von $4,2 \times 10^4$ und BFB1-2-M besteht aus $4,5 \times 10^4$ Klonen.

3.1.2 Die *scFv*-Antikörperbibliothek BFB1-2-E

Für das Erstellen dieser Antikörperbibliothek wurde das „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ von Stratagene verwendet, wobei insgesamt 7 PCRs hintereinander, zur Mutagenese auf das *scFv*-Gen angewendet wurden, um eine möglichst hohe Variabilität zu erreichen. Diese Methode wird in zwei Schritte unterteilt: Zum einen die Synthese des Megaprimers durch die Amplifikation des *scFv*-Gens mit der Mutazyme II DNA Polymerase und zum anderen die Klonierungsreaktion, in der das über das „GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences) aufgereinigte mutierte PCR-Produkt aus der ersten PCR als Megaprimers diente, der sich an das Ursprungsplasmid anlagerte und in einer zweiten PCR verlängert wurde (2.6.2). Die PCR-Bedingungen zum Erstellen der Megaprimers (Abb. 3.3) und die resultierende Länge der PCR-Produkte sind in Tab. 3.2 dargestellt.

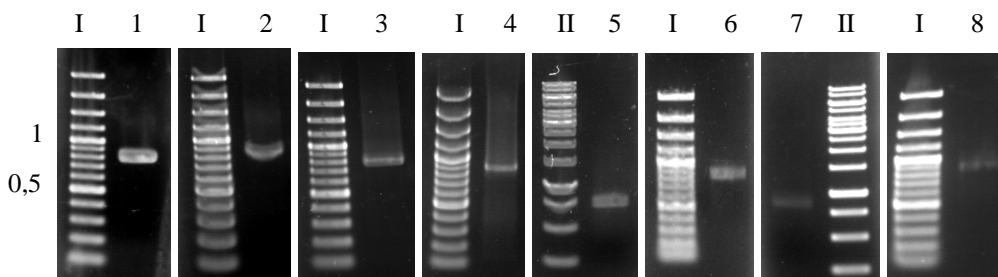


Abb. 3.3: Visualisierung und Quantifizierung des aus der EP-PCR erhaltenen mutierten BFB1-2-Gens (Megaprimers). Es wurden jeweils $1 \mu\text{l}$ des aufgereinigten Megaprimers auf ein Agarosegel (1% (w/v)) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 135 V für 25 min. durchgeführt. Als DNA-Größenstandard diente der 100Bp-DNA Ladder plus (Fermentas), gekennzeichnet als I, und der 1Kb-DNA Ladder (Fermentas), gekennzeichnet als II. In Bahn 1 bis 7 ist je $1 \mu\text{l}$ der Megaprimers aus den ersten 7 Runden der EP-PCR aufgetragen. Bahn 8 enthält $1 \mu\text{l}$ des Megaprimers aus der Wiederholung der 7. EP-PCR zur Synthese einer ausreichenden Menge des Megaprimers.

Tab. 3.2: Übersicht über die PCR-Bedingungen zur Synthese der Megaprimer

Megaprimer	Primer	Annealingtemperatur	Länge [Bp]
1 - 3	688, 689	64°C	806
4 - 7	687, 686	65°C	842

Auf die Klonierungs-PCR folgte ein Verdau des unmutierten Ursprungsplasmids mit *DpnI* und die Transformation in die im Kit enthaltenen *E. coli* XL10-Gold. Die erhaltenen Klone wurden von den Agarplatten in 2 x TY-Medium aufgenommen, wobei ein Teil zur Präparation von Plasmid-DNA (Abb. 3.4) diente, das für die nächste Runde der Mutagenese als Template eingesetzt wurde.

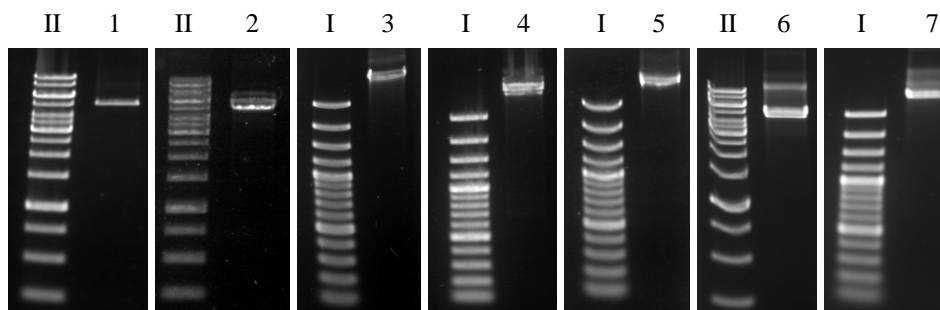


Abb. 3.4: Quantifizierung des in der EP-PCR einzusetzenden Templates *pDNEK-BFB1-2*. Dafür wurden 2 μ l des Vektors (5196 Bp) mit *NcoI* (Fermentas) in einem 10 μ l-Ansatz für 1 h bei 37 °C verdaut und 5 μ l davon auf das Agarosegel (1% (w/v)) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit bei 135 V für 25 min. durchgeführt. Als DNA-Größenstandard diente der 100Bp-DNA Ladder plus (Fermentas), gekennzeichnet als I und der 1Kb-DNA Ladder (Fermentas), gekennzeichnet als II. In Bahn 1 – 7 befindet sich die jeweils für die EP-PCR 1 – 7 eingestezte Plasmid-DNA.

Insgesamt konnten auf diese Weise sieben aufeinander folgende EP-PCRs zu Mutagenese auf das *BFB1-2*-Gen angewendet werden, bevor die PCR des nächsten Megaprimer zu keinem spezifischen Produkt mehr führte. Die resultierende Antikörperbibliothek hatte einen Umfang von $1,6 \times 10^4$ Klonen.

3.2 Panning der Antikörperbibliotheken gegen FB1

Zur Selektion von scFvs mit höherer Affinität als BFB1-2, wurde jede Antikörperbibliothek in zwei Panningrunden gegen immobilisiertes Biotin-FB1-Konjugat eingesetzt (2.8.2). In der ersten Panningrunde wurden 4×10^{10} cfu/ml Phagen der Antikörperbibliothek BFB1-2-E, $3,4 \times 10^{10}$ cfu/ml der BFB1-2-M, $5,3 \times 10^{10}$ cfu/ml der BFB1-2-H und $1,6 \times 10^{11}$ cfu/ml der BFB1-2-L eingesetzt und in der zweiten Panningrunde

$9,8 \times 10^9$ cfu/ml der BFB1-2-E, $2,3 \times 10^{10}$ cfu/ml der BFB1-2-M, 2×10^{10} cfu/ml der BFB1-2-H und 6×10^9 cfu/ml der BFB1-2-L. Die Elution der Phagen folgte nach dem Waschen mit PBST und ansteigenden NaCl-Konzentrationen in zwei Phasen, wobei in den Diagrammen der Phagentiter des letzten Waschschrattes, der Eluate der ersten Elutionsphase (10^{-7} M FB1, 10^{-8} M FB1, dazu im 2. Panning 10^{-9} M FB1) und der Titer des Eluats der letzten Elutionsphase (Glycin-HCl (0,1 M), pH 2,8) dargestellt sind. Die absoluten Werte der Anzahl der Phagen sind in Tab. 3.3 angegeben. Bei allen Diagrammen wird zur besseren Vergleichbarkeit mit den „parts per million“-Werten (ppm) gearbeitet. Das heißt die ermittelten Phagenkonzentrationen der einzelnen Fraktionen in cfu/ml werden auf die jeweilige im Panning eingesetzte anfängliche Phagenkonzentration in cfu/ml bezogen.

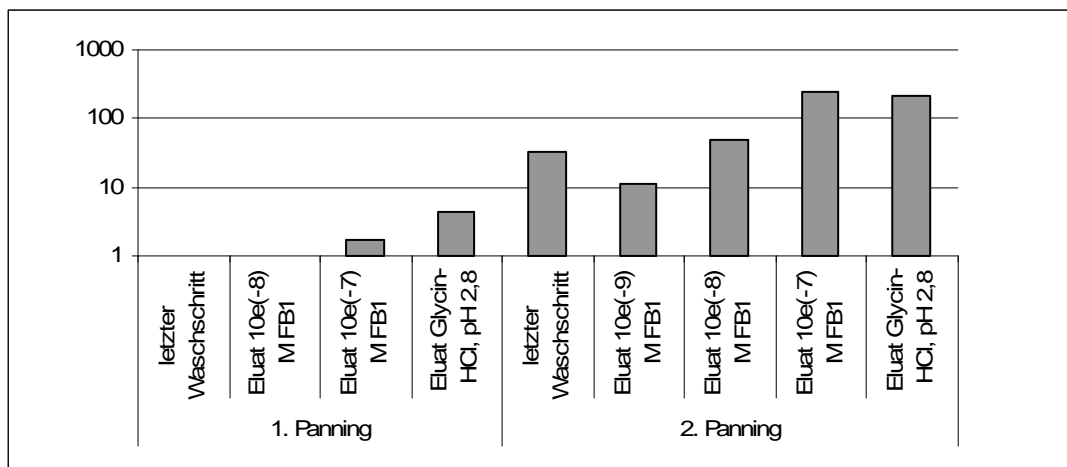


Abb. 3.5: Phagentiter von Fraktionen der zwei Panningrunden von BFB1-2-E gegen Biotin gekoppeltes FB1. Dargestellt sind die Anzahl der Phagen in cfu/ml der verschiedenen Fraktionen in ppm bezogen auf die zum Panning eingesetzte Anzahl von Phagen in cfu/ml. Die Y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Beim Panning der BFB1-2-E gegen Biotin-gekoppeltes FB1 (Abb. 3.5) ist ein deutlicher Anstieg des Phagentiters der Fraktionen der zweiten Panningrunde im Vergleich zum Phagentiter der ersten zu erkennen. Hier liegen die Unterschiede im Bereich des 50fachen für die Eluate „ 10^{-8} M FB1“ und „Glycin-HCl“ bis zum 140fachen für das Eluat „ 10^{-7} M FB1“. Auch der Titer der Waschfraktion steigt an.

Das Panning de BFB1-2-M (Abb. 3.6) zeigt ebenfalls einen Anstieg der Phagentiter, jedoch fällt dieser für den letzten Waschschratt und das Eluat „ 10^{-7} M FB1“ am stärksten aus. Der Titer der letzten Eluatfraktion „Glycin-HCl“ steigt ungefähr um das Vierfache und der Titer des Eluats „ 10^{-8} M FB1“ um den Faktor 7.

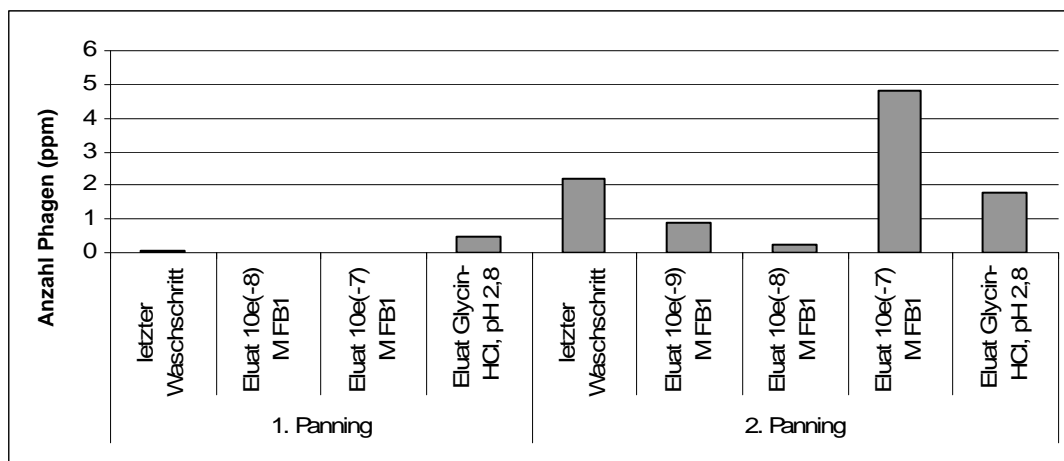


Abb. 3.6: Phagentiter von Fraktionen der zwei Panningrunden von BFB1-2-M gegen Biotin gekoppeltes FB1. Dargestellt sind die Anzahl der Phagen in cfu/ml der verschiedenen Fraktionen in ppm bezogen auf die zum Panning eingesetzte Anzahl von Phagen in cfu/ml.

Wie bei der BFB1-2-M ist auch bei der BFB1-2-H nach dem Panning (Abb. 3.7) der stärkste Anstieg des Phagentiters bei dem Eluat „ 10^{-7} M FB1“ um den Faktor 18 zu verzeichnen. Hier steigt die Anzahl der Phagen im Eluat „ 10^{-8} M FB1“ um den Faktor 6 und für die letzte Eluatfraktion „Glycin-HCl“ um den Faktor 5.

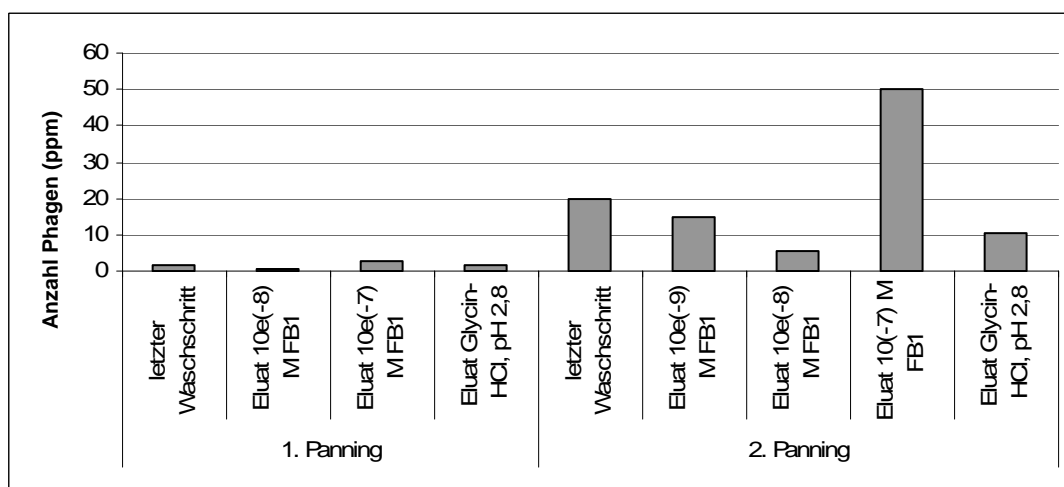


Abb. 3.7: Phagentiter von Fraktionen der zwei Panningrunden von BFB1-2-H gegen Biotin gekoppeltes FB1. Dargestellt sind die Anzahl der Phagen in cfu/ml der verschiedenen Fraktionen in ppm bezogen auf die zum Panning eingesetzte Anzahl von Phagen in cfu/ml.

Der Vergleich der Phagentiter der einzelnen Fraktionen beim Panning der BFB1-2-L gegen Biotin-gekoppeltes FB1 (Abb. 3.8) zeigt einen besonders großen Unterschied der Phagenanzahl in den Eluaten „ 10^{-7} M FB1“ und „Glycin-HCl“. Sie steigt um das Fünffache, wobei die Anzahl im Eluat „ 10^{-8} M FB1“ ungefähr gleich bleibt. Der Titer der

letzten Waschfraktion änderte sich dagegen weniger stark als bei den Panningrunden der anderen Antikörperbanken.

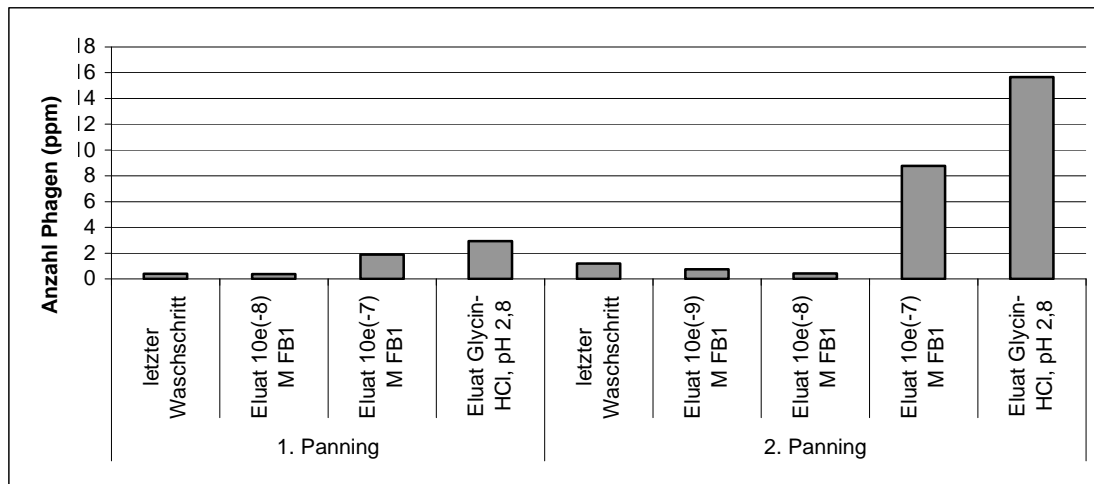


Abb. 3.8: Phagentiter von Fraktionen der zwei Panningrunden von BFB1-2-L gegen Biotin gekoppeltes FB1. Dargestellt sind die Anzahl der Phagen in cfu/ml der verschiedenen Fraktionen in ppm bezogen auf die zum Panning eingesetzte Anzahl von Phagen in cfu/ml.

Eine Übersicht über die absoluten Werte der Anzahl der für das Panning eingesetzten und eluierten Phagen sind in Tab. 3.3 angegeben.

Tab. 3.3: Absolute Werte der Phagentiterbestimmungen. Anzahl der Phagen angegeben in cfu/ml. In der 3. Zeile ist die Anzahl der Phagen angegeben, die zum Panning eingesetzt wurden. Dann folgt der letzte Waschschrift (WS), der Elutionsschritt mit 10^{-9} M FB1 (Eluat 1), der Elutionsschritt mit 10^{-8} M FB1 (Eluat 2), der Elutionsschritt mit 10^{-7} M FB1 (Eluat 3) und der letzte Elutionsschritt mit Glycin-HCl (0,1 M), pH 2,8 (Eluat 4).

	BFB1-2-E		BFB1-2-M		BFB1-2-H		BFB1-2-L	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Phagen	4×10^{10}	$9,8 \times 10^9$	$3,4 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^{10}$	2×10^{10}	$1,6 \times 10^{11}$	6×10^9
WS	4×10^4	$3,1 \times 10^5$	2×10^3	5×10^4	$9,5 \times 10^4$	4×10^5	$6,3 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$
Eluat 1	-	$1,1 \times 10^5$	-	2×10^4	-	3×10^5	-	$4,5 \times 10^4$
Eluat 2	8×10^3	$4,78 \times 10^5$	1×10^3	5×10^3	$4,3 \times 10^4$	$1,05 \times 10^5$	$6,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Eluat 3	$6,9 \times 10^4$	$2,37 \times 10^6$	1×10^4	$1,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	1×10^6	$3,01 \times 10^5$	$5,26 \times 10^5$
Eluat 4	$1,74 \times 10^5$	$2,15 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$1,02 \times 10^5$	$2,04 \times 10^5$	$4,68 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$

3.3 Analyse der selektierten scFvs

3.3.1 PCR-Analyse

Im Anschluss an die Selektion antigenspezifischer scFv-Phagen wurden die resultierenden Klone mittels Kolonie-PCR (2.5.2) auf Vorhandensein vollständiger *scFv*-Gene untersucht. Dazu wurden 200 Kolonien pro Antikörperbibliothek aus der Elution der letzten Selektionsrunde in einer Kolonie-PCR mit den Primern 270 und 741 eingesetzt. Ein vollständiges *scFv*-Gen ergibt dabei ein PCR-Fragment von 980 Bp. PCR-Fragmente geringerer Größe entstehen, wenn das Gen nur noch partiell vorhanden ist. In Abb. 3.9 ist beispielhaft das Ergebnis einer Kolonie-PCR aus der Selektion der BFB1-2-M gegen FB1 abgebildet.

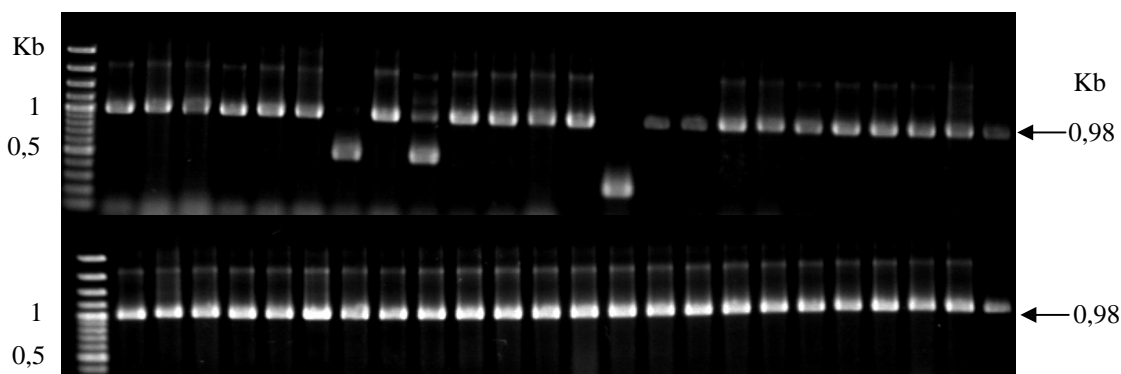


Abb. 3.9: Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der selektierten Antikörperklone auf Vollständigkeit des *scFv*-Gens. 5 μ l des Kolonie-PCR-Ansatzes wurden auf das Agarosegel (1% (w/v)) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 135 V für 25 min. durchgeführt. Als DNA-Größenstandard diente der 100Bp-DNA Ladder plus (Fermentas).

Die BFB1-2-E hatte einen Anteil an Klonen mit einem vollständigen *scFv*-Gen von 97,5%, die BFB1-2-M einen von 96,5%, die BFB1-2-H einen von 98,5% und die BFB1-2-L einen von 97,5%.

3.3.2 Expressionsanalyse

Hundert *scFv*-Klone je Antikörperbibliothek mit vollständigem *scFv*-Gen wurden anschließend einer Expressions-Analyse unterworfen, in der untersucht wurde, ob die entsprechenden Gene exprimierbar waren. Dies sollte einen Hinweis darauf geben, ob ein durchgehendes Leseraster vorhanden war. Hier wurde die Deoxycholol (DOC)-Methode (2.8.3) angewendet. Als positiv befunden wurden Klone, die bei diesem Test gar kein

oder kaum erkennbares Wachstum auf DOC-haltigem Medium im Vergleich zum Wachstum auf TYE_{amp}-Medium zeigten. Das waren bei den aus der BFB1-2-E selektierten Klonen 24%, bei der BFB1-2-M 20%, bei der BFB1-2-H 35% und bei der BFB1-2-L 20%. Nimmt man bei der Auswertung auch Klone hinzu, die auf DOC-haltigem Medium ein geringeres Wachstum zeigten als die Vergleichskolonie, ergibt sich ein Prozentsatz von durchschnittlich 70%. Bei diesem Test wurden die Suppressor-Stämme XL1 Blue bzw. XL10 Gold verwendet, bei denen ein *amber*-Stopcodon zu Glutamin translatiert wird. Daher sollten Klone, die im nachfolgenden ELISA für weitere Analysen ausgewählt wurden, durch Sequenzierung überprüft und ein eventuell vorhandenes Stopcodon durch Punktmutagenese in ein reguläres Glutaminocodon überführt werden.

3.3.3 Vergleichende Analyse der Affinitäten im ELISA

Parallel zu der Expressionsanalyse wurden dieselben hundert scFv-Klone je Antikörperbibliothek im ELISA auf ihre Bindungsstärke von FB1 hin geprüft (2.7.8). Jeder scFv-Klon wurde insgesamt vier Mal im ELISA getestet.

Dafür wurden die einzelnen Klone zunächst in Mikrotiterplatten angezogen und die Expression der Antikörper induziert (2.2.7). Für den ELISA wurde der Überstand der Bakterienkulturen eingesetzt. Die Bindungsstärke der scFvs wurde schließlich in einer quantifizierbaren Farbreaktion messbar gemacht. Die Intensität der Farbe gemessen als Absorption ist dabei proportional zur Konzentration des gebundenen scFvs in der Probe. Um die gewonnenen Absorptionswerte untereinander vergleichbar zu machen, wurde jeder Kulturüberstand ebenfalls in Mikrotiterplatten einer Bestimmung der Proteinkonzentration unterzogen (2.7.3). Die Absorptionswerte wurden durch die Division der Proteinkonzentration normalisiert, womit es möglich wurde, auf die Stärke der Bindung der verschiedenen scFv-Klone zu schließen. Von den Werten wurde der einer nicht angeimpften Kultur als Leerwert abgezogen. Da die resultierenden Werte sehr klein waren, wurde schließlich der negative dekadische Logarithmus als Vergleichswert benutzt, wobei folglich die kleinsten Werte auf die höchste Affinität hindeuteten. In Abb. 3.10 ist exemplarisch das Ergebnis eines ELISAs der Klone 46 bis 83 der BFB1-2-H dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
B	55	56	57	58	59	-	60	61	62	63	64	-
C	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
D	77	78	79	80	81	82	83	PK	LW	-	-	-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.5	2.7	2.8	2.7	2.9	3.0	3.0	3.0	2.9	3.1	3.1	2.7
B	3.0	3.1	3.0	3.0	2.5	3.1	3.2	2.9	2.8	2.9	3.2	2.9
C	3.0	2.9	3.0	3.2	2.9	3.3	3.3	3.0	3.0	3.3	3.3	3.1
D	2.9	2.5	3.0	-	-	3.0	3.0	3.1	LW	-	-	3.1
E	2.9	3.1	3.2	3.3	3.0	3.2	3.3	3.1	3.0	3.1	2.9	3.2
F	3.1	3.9	2.9	3.2	3.0	3.1	2.8	3.1	3.0	3.1	3.1	2.7
G	3.0	2.8	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	3.1
H	3.2	2.4	-	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	5.1	-	-	2.9

Abb. 3.10: Darstellung der Ergebnisse des ELISAs der Klone 46 bis 83 aus der BFB1-2-H in Anordnung der 96-Well-Mikrotiterplatte. Im oberen Teil ist die Belegung der Platten mit den einzelnen Klonen angegeben. Es wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen, daher ist die Belegung der Platte im unteren Abschnitt (E1-H12) der ELISA-Ergebnisse dieselbe wie oben angegeben. Als Positivkontrolle (PK) diente der BFB1-2 und eine nicht angeimpfte Kultur diente als Leerwert (LW). Der Klon mit der höchsten Affinität ist in fett-gedruckt hervorgehoben. Die Klone wurden in Mikrotiterplatten angezogen und die Expression induziert. Das Biotin-FB1-Konjugat wurde an Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt und der Überstand der Bakterienkulturen wurde im ELISA eingesetzt. Es wurde mit dem „Anti-FLAG M2 Monoclonal Antibody“ und dem „Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate“ (Sigma Aldrich) und di-Natrium-p-Nitrophenylphosphat als Substrat für die Farbreaktion detektiert. Absorptionswerte wurden durch Division durch die Proteinkonzentration normalisiert und das Ergebnis ist dargestellt als der negative dekadische Logarithmus.

Es wurden insgesamt pro Antikörperbibliothek 2 Klone herausgesucht, bei denen die Ergebnisse auf die höchste Affinität zu FB1 hindeuteten. Dies waren für die BFB1-2-E Klon E37 und E54, für die BFB1-2-M Klon M7 und M69, für die BFB1-2-H Klon H27 und H78 und für die BFB1-2-L Klon L4 und L64. Keiner dieser Klone wies ein *amber*-Stopcodon auf, daher konnten alle direkt für die Expression in dem *E. coli* Stamm TB1 verwendet werden.

3.3.4 Sequenzanalyse

Um den Erfolg der Mutagenese, die Herstellung der Antikörperbibliothek und die Panningrunden zu überprüfen, wurden exemplarisch einzelne Fragmente aus der Mutagenese und die *scFv*-Gene zufällig ausgewählter Klone sequenziert. Die aus der Mutagenese mittels der partiell degenerierten Primer (2.6.1) hervorgegangenen Fragmente wurden zur Kontrolle entweder direkt sequenziert oder vorher in den Vektor pJet (2.1.4) kloniert. Dabei zeigte sich, dass die Fragmente, die das *scFv*-Gen vervollständigten (II und IV), sequenzidentisch zum BFB1-2 waren und dass die Mutationen-tragenden Fragmente I und II je eine bzw. drei oder vier Mutationen in der CDR_H1 bzw. CDR_L1 hatten.

Das Ergebnis der Sequenzierung von zufällig aus den erstellten Antikörpergenbanken ausgewählten Klonen ist in Tab. 3.4 zusammengefasst. Die gesamte Anzahl der Mutationen in den Bereichen der CDR_{H1} und der CDR_{L1} der elf analysierten Klone betrug 7 bis 13%. Die mittlere Austauschfrequenz lag bei 10%.

Tab. 3.4: Anzahl der Mutationen in der DNA-Sequenz in den Bereichen der CDR_{H1} (bei den H-Klonen und den M-Klonen) und der CDR_{L1} (bei den L-Klonen und den M-Klonen). Die Anzahl der Mutationen insgesamt ist aufgeführt und der Anteil der Substitutionen und Deletionen.

Klon	H1	H2	H3	H4	H5	L1	L2	L3	M1	M2	M3
Mutationen	2	2	4	3	3	3	4	4	7	7	5
Substitutionen		2	4	3	3	3	4	2	5	7	5
Deletionen	2							2	2		

Aus der BFB1-2-E Antikörperbibliothek wurden direkt im Anschluss an das Panning 3×10^3 Bp verschiedener Klone sequenzanalysiert. Es konnte eine durchschnittliche Mutationsrate von 12,3 Basenaustauschen pro Kilobase festgestellt werden, wobei es sich bei 19 um Transversionen und bei 18 um Transitionen handelte. Drei dieser Klone besaßen ein *amber*-Stopcodon statt Glutamin₁₃, das durch einen Basenaustausch von Cytidin zu Thymin zustande kam und in dem verwendeten *E. coli* Supressor-Stamm ebenfalls zu einem Glutamin translatiert wird. Darüber hinaus gab es keine gleichen Sequenzen.

Nach den beiden Panningrunden und der sich anschließenden PCR-Analyse (3.3.1) wurden exemplarisch aus der Antikörperbibliothek BFB1-2-M neun Klone zufällig ausgewählt und sequenziert, um zu eruieren, ob an dieser Stelle schon eine Anreicherung sequenzidentischer Klone zu erkennen war. Hier wurde die Aminosäuresequenz verglichen. Zwei Paare von neun Klonen hatten die gleiche Sequenz (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Sequenzierung von scFv-Klonen aus der BFB1-2-M. Nach der Untersuchung mittels der PCR-Analyse und der Expressionsanalyse wurden ausgewählte Klone sequenziert. Die Tabelle führt die gesamte Anzahl der jeweils sequenzierten Klone und den Anzahl derer mit derselben Aminosäuresequenz auf.

Auswahl der Klone aus	Anzahl sequenzierte Klone	Anzahl jeweils identischer Klone
PCR-Analyse	9	2 + 2
Expressionsanalyse	15	2 + 2 + 4

Als nächstes wurden ebenfalls aus der BFB1-2-M 15 Klone untersucht, die in der Expressionsanalyse (3.3.2) auf DOC-haltigem Medium gar kein oder kaum erkennbares Wachstum zeigten, die also anscheinend einen vollständigen scFv exprimierten. Hier ergaben sich drei Gruppen, zwei mit je zwei Klonen mit identischer Proteinsequenz und eine Gruppe mit vier sequenzidentischen scFvs. Eine Übersicht gibt die Tab. 3.5. In Tab. 3.6 sind die Ergebnisse des Alignments aus beiden Sequenzierungen zusammengefasst, dabei wurden die Art und die Lage der Mutationen berücksichtigt. Hier fällt auf, dass eine Veränderung der Position 32 als Substitution des Tyrosin₃₂ zu Glutamin (*amber*-Stopcodon) in drei von fünf Sequenzgruppen und als Substitution zu Serin in einer weiteren Sequenzgruppe auftritt. Die Veränderung dieser Position fand also bei neun von 24 untersuchten Klonen statt. Insgesamt wiesen damit 11 von 24 Klonen *amber*-Stopcodons bzw. die Substitution gegen Glutamin auf. Die Substitution von Threonin₂₈ zu Prolin oder Serin tritt in zwei von fünf Gruppen auf, also bei fünf der 24 Klone.

Tab. 3.6: Mutationen in der Aminosäuresequenz der insgesamt 24 analysierten scFv-Klone aus der BFB1-2-M in den Bereichen der CDR_{H1} (Position 27 bis 35) und der CDR_{L1} (Position 154 bis 164). Die Anzahl der Mutationen insgesamt ist aufgeführt und der Anteil der Substitutionen und Deletionen. In Klammern: sequenzierte Klone aus der PCR-Analyse.

Klon	M15/M58	(M1/M141)	(M3/M70)	M12/M33/(M2)	M29/M32/M45/M95
Mutationen	1	5	3	7	2
Substitutionen		D ₁₅₆ : P S ₁₆₀ : T	T ₂₈ : P Y ₃₂ : S	T ₂₈ : S Q ₁₅₄ : K R ₁₅₉ : T Y ₁₆₁ : H	
<i>amber</i> -Stopcodon	Y ₃₂	Y ₃₂		Y ₃₂	
Mutationen außerhalb der CDR1-Bereiche		Y ₁₀₆ : H (CDR _{H3}) A ₂₁₁ : V	Q ₃₉ : R	S ₂₁ : F R ₁₅₀ : G	Q ₃ : <i>amber</i> -Stopcodon A ₂₁₀ : V

3.4 Charakterisierung einzelner selektierter scFvs

Anhand der Analyse der Affinitäten der scFvs durch ELISA (3.3.3) wurden insgesamt 8 Klone ausgewählt, deren Affinitäten mit SPR-Analyse näher bestimmt werden sollten. Dies waren BFB1-2-E37 und -E54, BFB1-2-M7 und -M69, BFB1-2-H27 und -H78 und BFB1-2-L4 und -L64. Insgesamt sollten sie durch die Bestimmung der Affinität, die Sequenzanalyse und die Modellierung der 3D-Struktur charakterisiert werden.

3.4.1 Expression und Aufreinigung

Die Expression von scFvs fand in 200ml-Expressionskulturen über mind. 16 h statt (2.2.6) und die Aufreinigung wurde über Protein A-Affinitätschromatographie aus dem Kulturüberstand durchgeführt (2.7.1). Abb. 3.11 zeigt exemplarisch den Verlauf der Elution der Affinitätschromatographie.

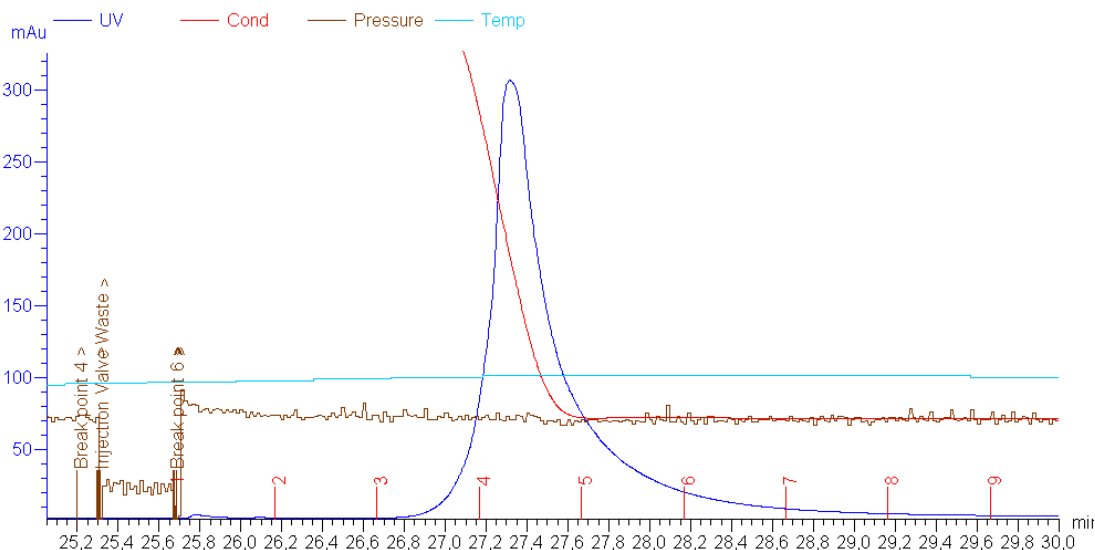


Abb. 3.11: Protein A-Affinitätschromatographie von BFB1-2. Es wurde die Säule „Pierce Chromatography Cartridges Protein A“ (Thermo Scientific) im 1 ml-Format bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Dargestellt ist die Elution der an der Säule gebundenen Antikörperfragmente, die mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,8 in 0,5 ml Fraktionen erfolgte. Der pH-Wert wurde durch 1 M Tris, pH 9 neutralisiert.

Die erhaltenen Chromatographie-Eluatfraktionen wurden zur Überprüfung der Reinheit über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 2.7.4) aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 3.12).

Zusätzlich wurde ein Western Blot mit anschließender Immunfärbung durchgeführt (Abb. 3.13), um die scFvs spezifisch nachzuweisen.

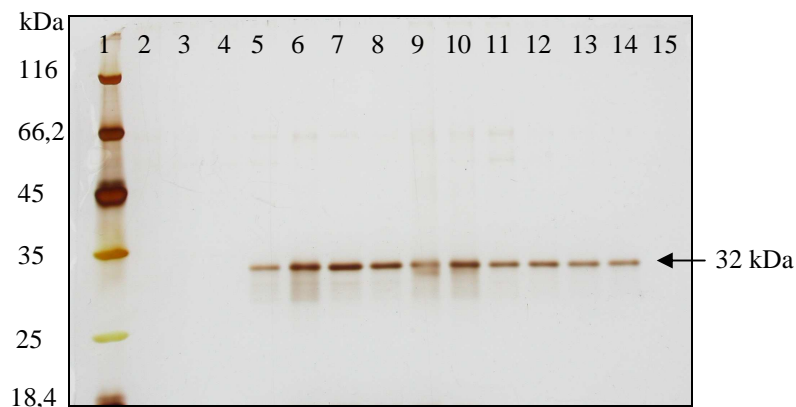


Abb. 3.12: SDS-PAGE der Eluate der Affinitätschromatographie zur Isolation von scFvs aus dem Kulturüberstand einer *E. coli* TB1 Expressionskultur und Silberfärbung des Gels. Es wurden 200 ml Kulturüberstand über Protein A Affinitätschromatographie aufgereinigt und Eluate in 250 μ l-Aliquots produziert. Von diesen wurden 100 μ l mit TCA gefällt und das Pellet in 30 μ l 1 x SSB aufgenommen. Davon wurden 15 μ l auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Bahn 2 – 15) Eluate 3-16, Bahn 1) 10 μ l „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ (Fermentas). Die markierte Bande von ca. 32 kDa entspricht dem rekombinanten scFv.

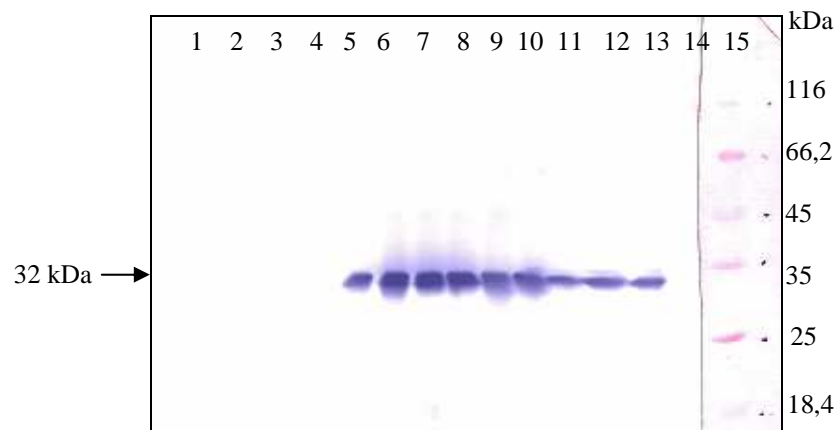


Abb. 3.13: Western Blot und Immunfärbung der Eluate der Affinitätschromatographie zur Isolation von scFvs aus dem Kulturüberstand einer *E. coli* TB1 Expressionskultur. Es wurden 200 ml Kulturüberstand über Protein A Affinitätschromatographie aufgereinigt und Eluate in 250 μ l-Aliquots produziert. Nach der SDS-PAGE (Abb. 3.12) wurde geblottet. Der Marker wurde mit Ponceau S angefärbt. Zur scFv-Detektion wurden der „Anti-FLAG M2 Monoclonal Antibody“ und der „Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate“ (Sigma-Aldrich) als Primär- bzw. Sekundärantikörper verwendet. Die Entwicklung der Immunfärbung erfolgte in einem NBT/BCIP Substratsystem. Bahn 1 – 14) Eluate 3-16, Bahn 15) 10 μ l „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ (Fermentas). Die markierte Bande von ca. 32 kDa entspricht dem rekombinanten scFv.

Die Eluate sechs bis 15 (Abb. 3.12), die den scFv enthielten, wurden vereinigt, aufkonzentriert und mit PBS umgepuffert (2.7.2). Es wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.7.3) und die für die SPR-Analyse benötigten Verdünnungen in PBS hergestellt. Die Ausbeute einer 500 ml-Kultur lag zwischen 0,2 mg/ml und 1,2 mg/ml.

3.4.2 Affinitätsbestimmung

3.4.2.1 Kopplung des Fumonisin B1 an die verschiedenen Sensordiscs

Die Grundlage für Bindungsstudien über die SPR-Analyse ist eine geeignete Immobilisierung des Liganden, also hier des Haptens FB1, an die Oberfläche des Sensorchips (2.9.2). Dies geschah in Form der Streptavidin-Biotin-Bindung bzw. kovalent über die Reaktion der Aminogruppe des Fumonisin B1 mit der aktivierten Carboxygruppe des Thiolmoleküls (11-MUA) an der Chipoberfläche. Abb. 3.14 zeigt das Sensorgramm der Kopplung von Biotin-FB1 an den Streptavidin-beschichteten Chip „SPR Sensordisc SAD50d“. Nicht dargestellt ist die Absättigung eventuell noch unbesetzter Bindestellen mit der Biotin-Lösung, die in einer eigenen Sequenz vorgenommen wurde.

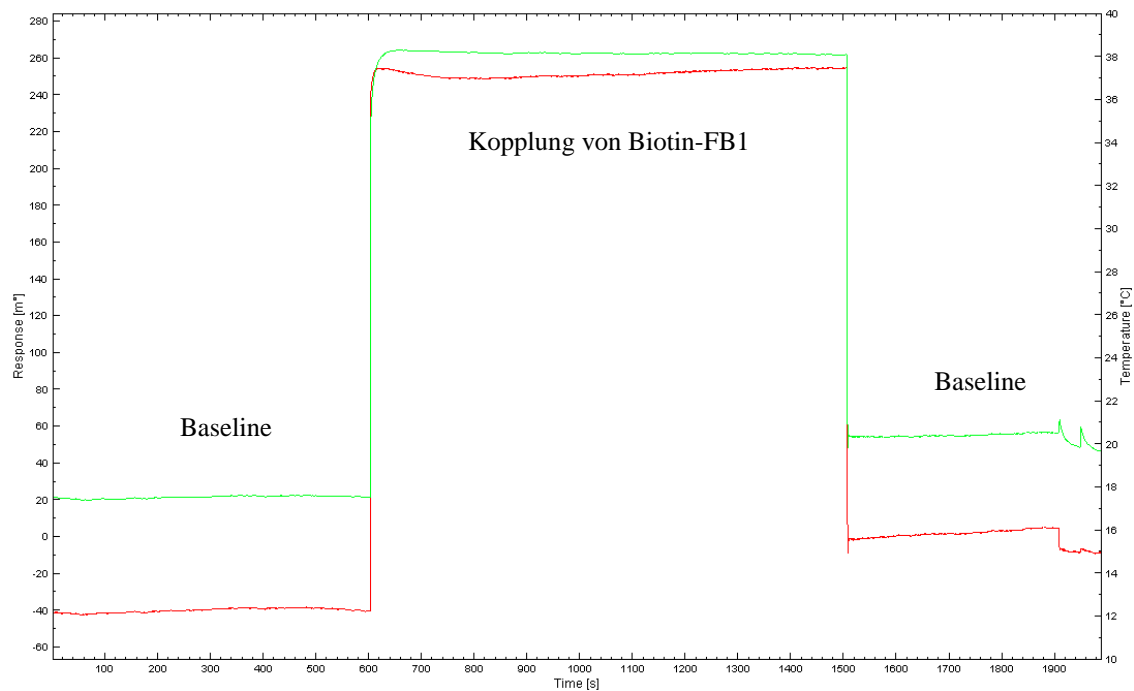


Abb. 3.14: Kopplung von Biotin-FB1 an der Sensordisc SAD50d über Streptavidin-Biotin-Bindung. Dargestellt ist der Verlauf eines Sensorgramms der entsprechenden Kopplungssequenz: 600 s Baseline (PBS), 900 s Liganden-Kopplung (Biotin-FB1), 400 s Equilibrieren (PBS). Die rote Linie steht für den Verlauf in der 1. Küvette und die grüne Linie für den Verlauf in der 2. Küvette. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Eine erfolgreiche Kopplung zeichnet sich durch einen Anstieg der Baseline aus, denn es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge der an der Goldoberfläche gebundenen Substanz und der Änderung des SPR-Winkels. Hier ändert sich der Winkel

in der ersten Küvette um 32 m° von ca. -40 m° auf ca. -8 m° und in der zweiten Küvette ebenfalls um 32 m° von ca. 18 m° auf ca. 50 m°.

Abb. 3.15 zeigt das Sensorgramm der kovalenten Kopplung von FB1 an die mit 11-MUA beschichtete Sensordisc Bare Gold. Auch bei dieser Kopplungsmethode ist ein deutlicher Anstieg der Baseline zu verzeichnen. Dabei werden die Baseline zwischen der Aktivierung und der Kopplung von FB1 und die Baseline nach der Kopplung von FB1 verglichen. Insgesamt gibt es einen Anstieg in beiden Küvetten um 26 m°.

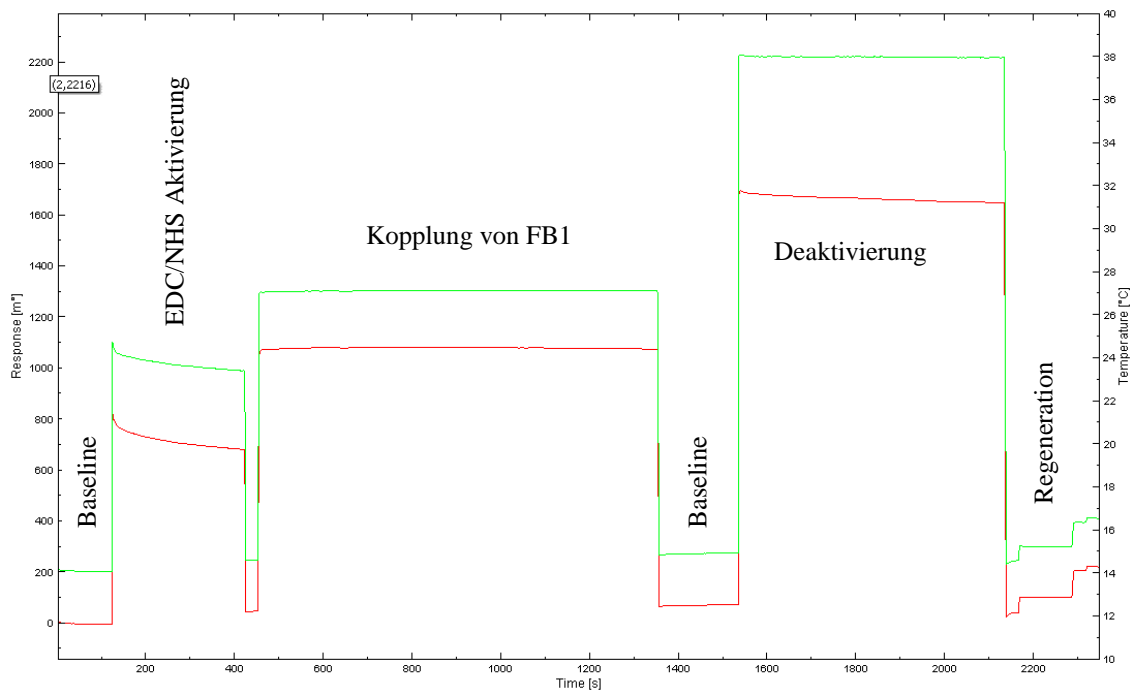


Abb. 3.15: Kopplung von FB1 an die Sensordisc Bare Gold kovalente Bindung. Dargestellt ist der Verlauf eines Sensorgramms der entsprechenden Kopplungssequenz: 120 s Baseline (PBS), 300 s EDC/NHS Aktivierung, 900 s Kopplung (FB1), 600 s Deaktivierung (Ethanolamin), 120 s Regeneration (0,1 M HCl). Die rote Linie steht für den Verlauf in der 1. Küvette und die grüne Linie für den Verlauf in der 2. Küvette. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

3.4.2.2 Affinitätsbestimmung selektierter scFvs

Die Charakterisierung der scFvs, deren Ergebnisse im ELISA auf die höchste Affinität zu FB1 hindeuteten, erfolgte mit der SPR-Analyse (2.9.3). Die gleichfalls nach den Ergebnissen im ELISA ausgewählten Klone BFB1-2-L4 und -M7 konnten aus technischen Gründen keiner Affinitätsbestimmung unterzogen werden. Mit der Autolab SPR Esprit (Eco Chemie) wurde die Affinität der scFvs BFB1-2, BFB1-2-E37 und -E54, BFB1-2-M69, BFB1-2-H27 und -H78 und BFB1-2-L64 unter Verwendung des Streptavidin-

beschichteten Chips „SPR Sensor disc SAD50d“ (Xantec) ermittelt. An die Oberfläche des Chips wurde in beiden Küvetten das Biotin-FB1-Konjugat gekoppelt. Für die Bindungsanalyse der scFvs wurde die erste Küvette gegen die zweite gemessen, die mit Bindepuffer ohne scFv beschickt wurde. Die scFv-Lösungen wurden 1:100 und 1:10 verdünnt und dann je zwei Mal pro Verdünnungsstufe und zwei Mal unverdünnt gemessen. Um noch an FB1 gebundene scFvs vollständig zu entfernen, fand eine Regeneration der Chipoberfläche mit 1 M Salzsäure statt, die durch die hohe chemische Stabilität von FB1 ermöglicht wurde. So konnten die in diesem Kapitel aufgeführten Bindungsanalysen mit den verschiedenen scFv-Klonen hintereinander mit demselben Chip durchgeführt werden. Für die Auswertung der erhaltenen Bindungsdaten wurde das Programm Scrubber2 (Biologic Software Pty. Ltd., Campbell, Australia; 2.10.3) verwendet. Das Signal der zweiten Küvette wurde als Referenz von dem der ersten subtrahiert und die Zeit- und die Signal-Achse wurden normalisiert. Die erhaltenen Messwerte wurden unter Annahme eines Bindungsverhältnisses von Antigen zu Antikörper von 1:1 (Langmuir 1:1 Bindungsmodell) analysiert. Als Maß für die Affinität wurde die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

Zunächst wurde der scFv BFB1-2 in den Konzentrationen 21,5 μM , 2,15 μM und 0,215 μM gemessen, um dessen Affinität als Vergleichswert für die mutierten scFv-Klone zu erhalten (Abb. 3.16).

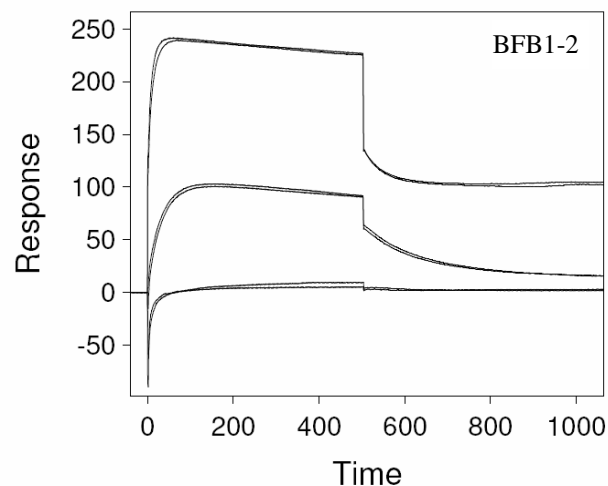


Abb. 3.16: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2 zum Biotin-FB1-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Zu Beginn der Messung mit der Probenaufnahme auf den Chip steigt die Kurve bei der höchsten Konzentration des scFv von 0 auf 240 steil an und fällt dann wieder leicht auf 230 ab, scheinbar ohne in einen Gleichgewichtszustand (Anzahl der assoziierenden scFvs ist gleich der Anzahl der dissoziierenden scFvs) zu gelangen. Für die Konzentration von $2,15 \mu\text{M}$ verhält es sich ähnlich, wobei der Anstieg etwas flacher verläuft. Bei einer Konzentration von $0,215 \mu\text{M}$ ist kaum noch eine Bindungskurve auszumachen. Die Dissoziationsphase startet mit dem Austausch der scFv-Lösung auf dem Chip mit der Pufferlösung. Hier fällt die Bindungskurve am Anfang fast senkrecht ab und geht dann einen flachen negativen Verlauf über, der bei der höchsten Konzentration nach ca. 150 s eine Steigung von null erreicht. Für den scFv BFB1-2 wurde eine Bindungskonstante (K_D) von $4,12 \mu\text{M}$ errechnet.

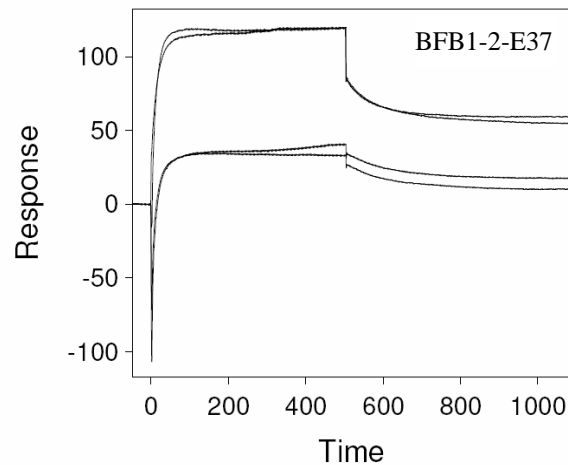


Abb. 3.17: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2-E37 zum Biotin-FBI-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Als nächstes wurde der scFv BFB1-2-E37 (Abb. 3.17) in den Konzentrationen $8,48 \mu\text{M}$, $0,848 \mu\text{M}$ und $84,8 \text{ nM}$ gemessen. Aus technischen Gründen konnten jedoch die Daten der letzten Verdünnungsstufe nicht zur Bestimmung der Affinität verwendet werden. Wie bei dem scFv BFB1-2 gibt es am Anfang der Messung während der Assoziation einen steilen Anstieg der Bindungskurve. Bei der höchsten Konzentration auf den Maximalwert von $120 m^\circ$, jedoch gelangt die Kurve hier schnell in einen Gleichgewichtszustand. Während der Dissoziationsphase fällt erneut auf, dass die Kurven nahezu in eine Steigung von null übergehen. Mit Hilfe des Analyse-Software Scrubber 2.0c konnte die Affinität für dieses Antikörperfragment mit $4,2 \mu\text{M}$ berechnet werden.

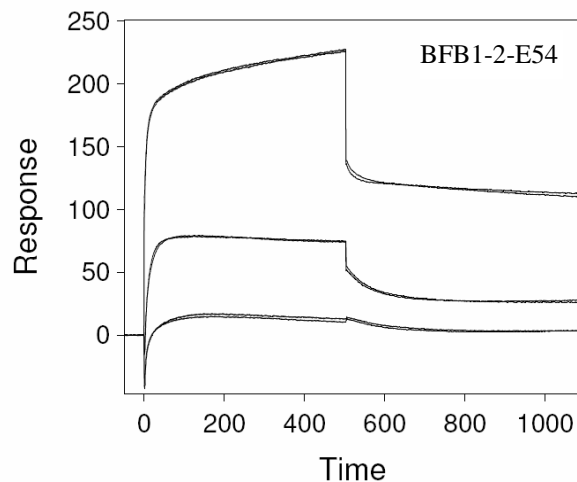


Abb. 3.18: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2-E54 zum Biotin-FB1-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Der scFv BFB1-2-E54 (Abb. 3.18) wurde in den Konzentrationen $41 \mu\text{M}$, $4,1 \mu\text{M}$ und $0,41 \mu\text{M}$ analysiert. In der höchsten Konzentration wird während der Assoziation des scFv an FB1 kein Gleichgewichtszustand erreicht, der maximale Messwert beträgt $228 m^\circ$. Bei der mittleren Konzentration entsteht wie bei dem BFB1-2 ein Quasi-Gleichgewichtszustand mit einem leichten Abfall der Kurve um $0,75 m^\circ/\text{min}$. Die Dissoziation verhält sich wie bei den anderen scFvs: Die Steigung der Kurve geht nach einem rapiden Abfall zu Beginn nach 150 bis 250 s gegen null. Die errechnete Affinität dieses Antikörperfragments beträgt $9,92 \mu\text{M}$.

Die Messung der Bindungskurven des scFv BFB1-2-H27 (Abb. 3.19) wurde in den Konzentrationen $73,6 \mu\text{M}$, $7,36 \mu\text{M}$ und $0,736 \mu\text{M}$ vorgenommen. Der maximal gemessene Wert beträgt $228 m^\circ$. In den unteren beiden Konzentrationen entsteht während der Assoziation der Gleichgewichtszustand, in dem die Anzahl der assoziierenden Antikörperfragmente gleich der Anzahl der dissoziierenden ist; in der höchsten Konzentration wird dieser nahezu ebenfalls erreicht. In der Dissoziationsphase weisen die Kurven der oberen Konzentrationen nach dem rapiden Abfall zu Beginn der Phase wieder eine leichte Steigung von ca. $1 m^\circ/\text{min}$ (bei $73,6 \mu\text{M}$) bzw. $0,68 m^\circ$ (bei $7,36 \mu\text{M}$) auf. Dagegen fällt diese bei $0,736 \mu\text{M}$ scFv stetig ab. Der scFv BFB1-2-H27 weist eine Affinität von $3,81 \mu\text{M}$ auf.

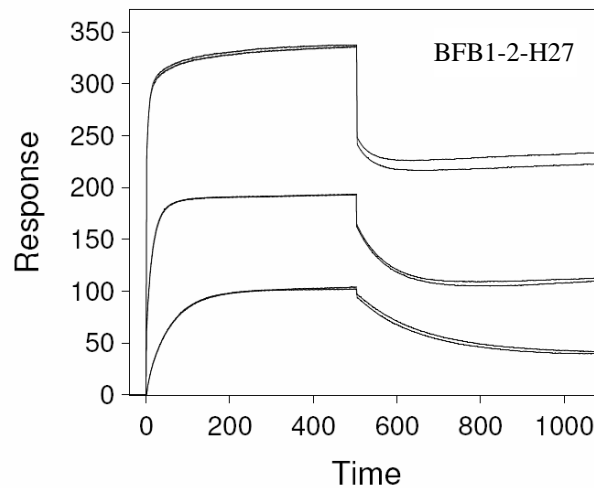


Abb. 3.19: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2-H27 zum Biotin-FB1-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Der scFv BFB1-2-H78 (Abb. 3.20) wurde in den Konzentrationen $22 \mu\text{M}$, $2,2 \mu\text{M}$ und $0,22 \mu\text{M}$ hinsichtlich seiner Bindung an das immobilisierte Biotin-FB1 analysiert. Während der Assoziation steigen die Bindungskurven rasch an auf einen Maximalwert in der höchsten Konzentration von $240 m^\circ$, während sich bei einer Konzentration von $2,2 \mu\text{M}$ ein Gleichgewichtszustand einstellen kann. Die Bindungskurven der niedrigsten Konzentration liegen im Gegensatz zu allen anderen doppelt gemessenen Bindungskurven relativ weit auseinander. Die Dissoziationsphase ähnelt der der übrigen scFvs: Die Kurve der oberen Konzentration weist nach dem steilen Abfall eine leicht positive Steigung von $0,55 m^\circ/\text{min}$ auf, die der mittleren Konzentration geht gegen null und die der untersten Konzentration fällt stetig ab. Die Affinität dieses scFv konnte auf $1,73 \mu\text{M}$ berechnet werden.

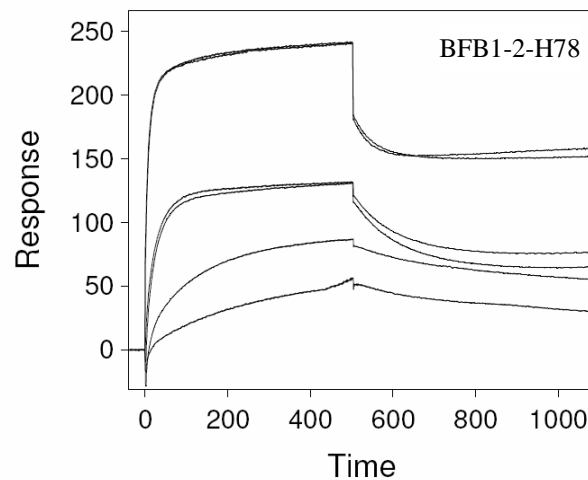


Abb. 3.20: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2-H78 zum Biotin-FBI-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Die Analyse des Bindungsverhaltens des scFv BFB1-2-L64 (Abb. 3.21) fand in den Konzentrationen $48,5 \mu\text{M}$, $4,85 \mu\text{M}$ und $0,485 \mu\text{M}$ statt. Die Assoziationsphase ist geprägt durch einen Anstieg des Antwort-Signals, wobei die Kurve je sich nach Konzentration mit leicht positiver oder negativer Steigung um die Einstellung des Gleichgewichtes (Steigung gleich null) bewegt. Der Maximalwert beträgt $313 m^\circ$. Die Dissoziation läuft bei allen Kurven ebenfalls nach einem starken Abfall zu Beginn in Richtung der Einstellung eines Gleichgewichtes ab. Die Affinität dieses scFv liegt bei $4,5 \mu\text{M}$.

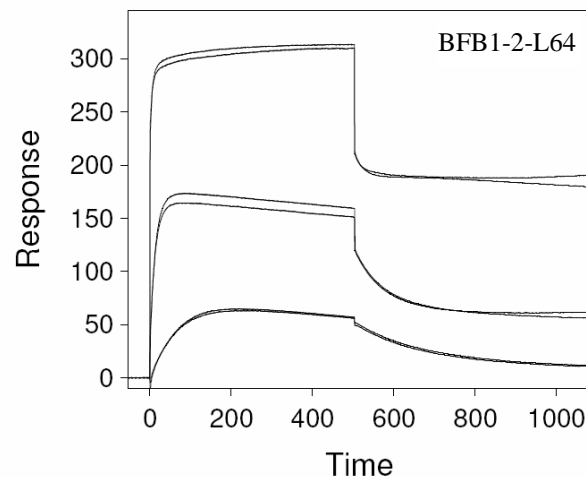


Abb. 3.21: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2-L64 zum Biotin-FBI-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

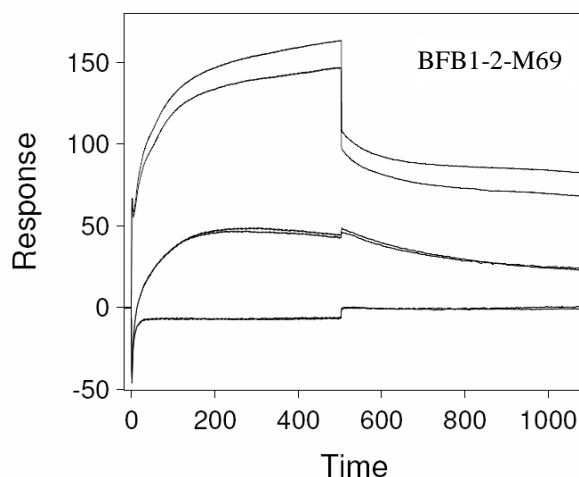


Abb. 3.22: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2-M69 zum Biotin-FB1-Konjugat. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf einen mit dem Konjugat gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Der scFv BFB1-2-M69 (Abb. 3.22) wurde in den Konzentrationen $8,76 \mu\text{M}$, $0,876 \mu\text{M}$ und $87,6 \text{ nM}$ zur Messung der Bindungskurven auf den mit Biotin-FB1 gekoppelten Chip gegeben. Der maximal in der Messung erreichte Wert betrug für die Konzentration von $8,76 \mu\text{M}$ $164 m^\circ$, wobei sich während der Assoziation kein Gleichgewichtszustand einstellte. Bei der mittleren Konzentration fällt wieder die leicht negative Steigung nach der anfänglichen stark positiven auf und die niedrigste Konzentration führte zu keiner charakteristischen Bindungskurve mehr. Die Dissoziation verläuft auf die gleiche Weise wie bei den anderen Antikörperfragmenten in Richtung eines Gleichgewichtszustandes. Zu bemerken ist noch der ungewöhnliche leichte Anstieg nach Beginn der Dissoziation für die beiden unteren Konzentrationen. Dieser ist wahrscheinlich systembedingt und ergibt sich aus dem Austausch des Puffers in der Küvette durch den Einfluss des Temperaturunterschiedes. Es konnte eine Affinität von $3,08 \mu\text{M}$ errechnet werden.

Für einen übersichtlicheren Vergleich werden die Ergebnisse in der Tab. 3.7 zusammengefasst. Insgesamt weisen drei scFvs, BFB1-2-H27, -H78, -M69 bessere Bindeeigenschaften zu FB1 auf als der ursprüngliche Klon, dessen Affinität verbessert werden sollte, zwei scFvs, BFB1-2-E37 und -L64 besitzen ungefähr die gleiche und der BFB1-2-E54 hat eine deutlich schlechtere Affinität. Die Affinität des scFv BFB1-2-H78 hat um sich um den Faktor 2,38 verbessert.

Tab. 3.7: Übersicht über die in der SPR-Analyse bestimmten Affinitäten der verschiedenen scFvs und der dafür eingesetzten Höchstkonzentration. Der Faktor gibt die Veränderung der Affinität der scFvs gegenüber der des BFB1-2, bei 1 gibt es keine, unter eins bedeutet eine Verschlechterung der Bindungseigenschaften und über 1 zeigt eine Verbesserung an.

scFv	BFB1-2	-E37	-E54	-H27	-H78	-L64	-M69
Konzentration [μM]	21,50	8,48	41,00	73,60	22,00	48,50	8,76
K_D [μM]	4,12	4,23	9,92	3,81	1,73	4,50	3,08
Faktor	1	0,97	0,42	1,08	2,38	0,93	1,34

Die in diesem Kapitel analysierten scFv-Klone wurden anhand der Ergebnisse im ELISA für eine nähere Charakterisierung über die SPR-Analyse ausgewählt. Durch die Messung in drei Verdünnungsstufen wurde die Bestimmung der Affinität als Annäherung an die tatsächliche Affinität ermöglicht. Im nächsten Schritt wurde der hier affinste scFv, BFB1-2-H78, durch die Messung in fünf Konzentrationen einer exakteren Affinitätsbestimmung auch im Vergleich zu BFB1-2 unterzogen.

3.4.2.3 Exaktere Affinitätsbestimmung des scFv BFB1-2-H78

Aus der in Kapitel 3.4.2.2 durchgeführten Messung ergab sich, dass der scFv BFB1-2-H78 die höchste Affinität hatte. Die Affinität dieses Klons wurde in einer weiteren Messung im Vergleich zu BFB1-2 in den Verdünnungen 0 μM , 0,125 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM (jeweils doppelt) genauer bestimmt. Die für BFB1-2 eingesetzten Konzentrationen waren 0 μM , 0,125 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM und 2 μM (jeweils doppelt). Es wurde der Chip „Sensordisc Bare Gold“ verwendet, an dessen Oberfläche in beiden Küvetten Fumonisin B1 direkt (2.9.2) gekoppelt wurde. Für die Bindungsanalyse der scFvs wurde die erste Küvette gegen die zweite gemessen, die mit Bindepuffer ohne scFv beschickt wurde. Die Regeneration der Chipoberfläche zwischen den einzelnen Messungen fand mit 1 M Salzsäure statt und für die Auswertung der erhaltenen Bindungsdaten wurde ebenfalls das Programm Scrubber2 (Biologic Software Pty. Ltd., Campbell, Australia; 2.10.3) verwendet. Das Signal der zweiten Küvette wurde als Referenz von dem der ersten subtrahiert und die Zeit- und die Signal-Achse wurden normalisiert. Die erhaltenen Messwerte wurden unter Annahme eines

Bindungsverhältnisses von Antigen zu Antikörper von 1:1 (Langmuir 1:1 Bindungsmodell) analysiert.

Die Assoziation des BFB1-2-H78 an FB1 zeichnet sich in den oberen Konzentrationen (10 μM und 5 μM) durch einen sehr raschen Anstieg der Kurve aus, wobei ein Gleichgewichtszustand, in dem die Anzahl assoziierender gleich der dissoziierender Antikörperfragmente ist, nicht erreicht wird (Abb. 3.23). Dies ist jedoch bei den Konzentrationen 1 μM und 0,5 μM der Fall. Die Bindungskurven der niedrigsten Konzentrationen verlaufen kaum über null und zeigen keinen charakteristischen Verlauf mehr. Der erreichte Maximalwert in der Messung lag bei 390 m° . Die Dissoziation verläuft wie schon bei den im vorigen Kapitel analysierten scFvs und strebt nach einem starken Abfall zu Beginn einem Gleichgewichtszustand zu. Der errechnete Wert der Affinität beträgt 5,5 μM .

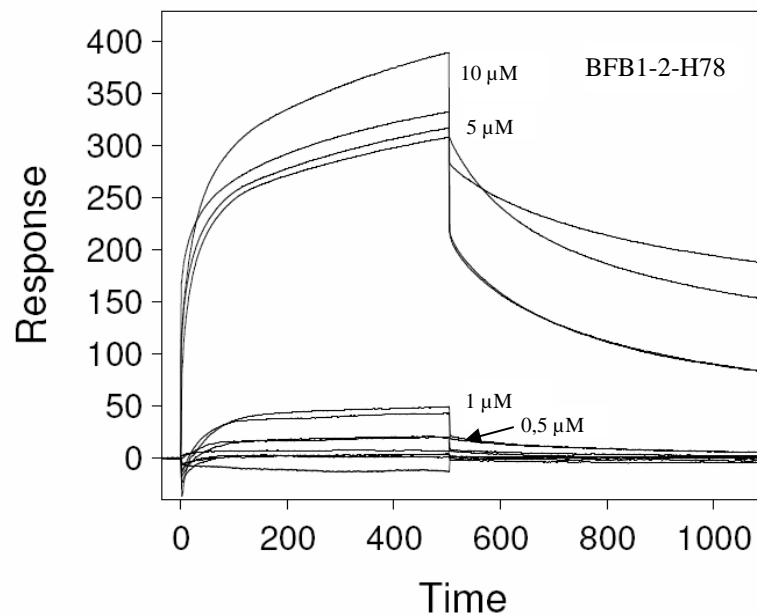


Abb. 3.23: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2-H78 zu Fumonisin B1. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments (0 μM , 0,125 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM) auf einen mit FB1 gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

Zum direkten Vergleich wurde auch die Affinität des BFB1-2 exakter, d.h. mit einer höheren Anzahl an Konzentrationen, bestimmt (Abb. 3.24). Hier sieht der Verlauf der Kurven ähnlich aus wie bei dem scFv BFB1-2-H78. Während der Assoziation wird in den höheren Konzentrationen (0,5 μM , 1 μM und 2 μM) kein Gleichgewichtszustand

erreicht, jedoch für die geringeren ($0,25 \mu\text{M}$, $0,125 \mu\text{M}$). Der gemessene Maximalwert beträgt 272 m° . Die Dissoziation zeichnet sich durch einen starken Kurvenabfall am Anfang und nachfolgend durch eine leicht negative Steigung aus, die gegen null strebt. Die Affinität wurde errechnet und beträgt $7,2 \mu\text{M}$.

Die unterschiedliche Bindungsaffinität des scFv, der einer Mutagenese im Bereich der CDR_{H1} durch die SOE-PCR unterzogen wurde, wird deutlich. Es gab eine Verbesserung der Bindung um den Faktor 1,3.

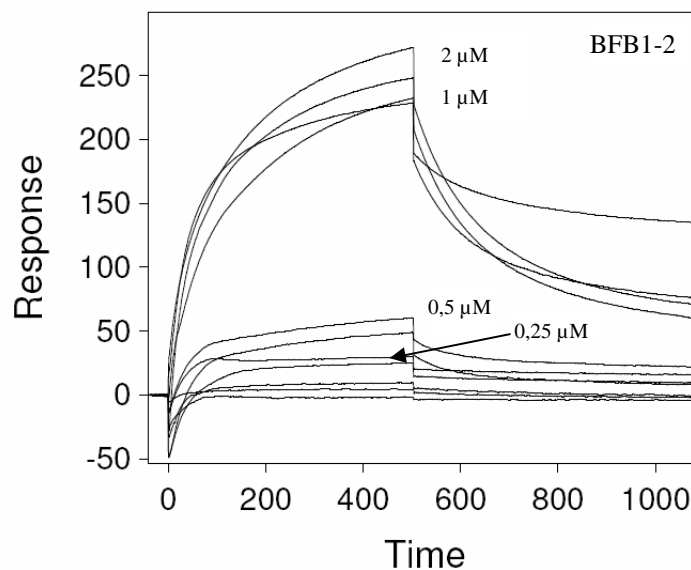


Abb. 3.24: Bestimmung der Affinität des scFvs BFB1-2 zu Fb1. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörperfragments ($0 \mu\text{M}$, $0,125 \mu\text{M}$, $0,25 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $2 \mu\text{M}$) auf einen mit Fb1 gekoppelten Chip gegeben und das Bindungsverhalten analysiert und ausgewertet. Das Antwort-Signal (Response) in m° ist über der Zeit (Time) in Sekunden aufgetragen.

3.4.3 Sequenzanalyse

ScFv-Antikörperklone, die im ELISA auf die höchste Affinität zu Fumonisin B1 hinwiesen, wurden durch die Bestimmung der Affinität durch SPR-Analyse näher charakterisiert. Ihre Aminosäuresequenzen wurden durch ein Alignment verglichen, die Ergebnisse sind in Tab. 3.8 zusammengefasst.

Bei den beiden der EP-PCR (BFB1-2-E37 und E54) unterzogenen Klonen fällt auf, dass einer sequenzidentisch zum BFB1-2 ist und der andere sequenzidentisch in allen CDRs und nur in den „framework“-Regionen drei Mutationen aufweist. Dieser Klon schneidet allerdings in Affinitäts-Bestimmung mit $9,92 \mu\text{M}$ am schlechtesten ab.

Die beiden in der CDR_{H1} durch SOE-PCR veränderten Klone haben in einer Position der CDR_{H3} dieselbe Substitution von der polaren, ungeladenen Aminosäure (AS) Glutamin gegen die stark basische, positiv geladene AS Arginin. Der BFB1-2-H78 weist zusätzlich zwei Substitutionen in der CDR_{L1} von der zweifach positiv geladenen AS Arginin zu der einfach positiv geladenen AS Lysin und von sehr ähnlichen polaren Aminosäuren Serin zu Threonin auf. Dieser ist der im Rahmen dieser Arbeit mit 5,5 μM (bzw. 1,73 μM) als der affinste scFv ermittelt worden.

Der BFB1-2-L64 weist in der CDR_{L1} eine Mutation von Glutamin, polar, gegen Histidin, einfach positiv geladen, auf und hat eine ähnliche Affinität wie der BFB1-2.

Der scFv BFB1-2-M96 besitzt im Bereich der CDR_{H1} zwei Substitutionen und eine in der „framework“-Region. Durch die Substitutionen wird die Polarität kaum verändert, jedoch hat die Änderung von Tyrosin zu Serin einen sterischen Einfluss, da Serin durch den fehlenden Benzol-Ring viel kleiner ist. Die Mutation im „framework“ befindet sich in direkter Nähe der CDR_{H1} und bewirkt in dieser Position eine Änderung in Richtung positiver Ladung. BFB1-2-M96 hat von allen auf die Affinität hin analysierten Klonen nach BFB1-2-H78 die zweitbeste Affinität.

Tab. 3.8: Vergleich der Aminosäuresequenz von verschiedenen scFv-Klonen mit der des scFv BFB1-2. Bei den Klonen handelt es sich um die schon hinsichtlich ihrer Affinität charakterisierten scFvs. Die Tabelle führt die Mutationen (alles Substitutionen) für die scFvs nach Region (CDR) auf. Als „Extra“ werden solche Mutationen bezeichnet, die außerhalb der CDRs liegen.

	CDR _{H1}	CDR _{H2}	CDR _{H3}	CDR _{L1}	CDR _{L2}	CDR _{L3}	Extra
E37							
E54							G ₁₂₉ : S L ₁₄₅ : M I ₁₈₈ : V
H27			Q ₁₀₃ : R				
H78			Q ₁₀₃ : R	R ₁₅₉ : K S ₁₆₀ : T			
L64				Q ₁₅₄ : H			
M69	T ₂₈ : P Y ₃₂ : S						Q ₃₉ : R

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Mutagenesestrategien für rekombinante Antikörper (scFvs) zu entwickeln und zur Konstruktion von Antikörperbibliotheken anzuwenden. Diese sollten mit Hilfe eines entsprechend angepassten Selektionsverfahrens zur Isolation von affinitätsgereiften Antikörperfragmenten führen.

Der scFv BFB1-2 wurde im Vorfeld dieser Arbeit (Lauer *et. al.*, 2005) aus der semisynthetischen Antikörperbibliothek ETH-2 isoliert. Er bindet spezifisch Fumonisin B1, ein weit verbreitetes für Mensch und Tier gesundheitsgefährdendes Mykotoxin, dessen Aufnahme in den Körper von der Europäischen Gemeinschaft mit einem Grenzwert belegt wurde. Immunaufreinigungs- und Assay-Verfahren, die zur Isolation und Quantifizierung eingesetzt werden können, benötigen einen spezifischen und hochaffinen Antikörperbestandteil. Diesen Anforderungen wurde der BFB1-2 nur bedingt gerecht, da seine Affinität mit $4,08 \times 10^{-7}$ M zu gering ausfiel. Im Rahmen dieser Arbeit diente er beispielhaft als Gegenstand zur Entwicklung und Gewichtung unterschiedlicher Mutagenesemethoden zur Affinitätsreifung rekombinanter scFv-Antikörperfragmente aus der ETH-2-Antikörperbibliothek. Diese basiert bezüglich der schweren Kette lediglich auf einem Keimbahnsegment und bezüglich der leichten Ketten auf zwei Segmenten, die Variabilität wurde durch Randomisierung der CDR3 eingeführt. Da dies als Grundlage für die Isolierung eines scFv mit relativ guter Affinität führte, wurde der CDR3-Bereich des Gens konstant gehalten und die Mutagenese der CDR1 diente zur Einführung der Diversität in die neu konstruierten Antikörperbibliotheken. Als Vergleich wurde eine Antikörperbibliothek erstellt, die sich der klassischen Methode der Error-Prone PCR bediente.

Als weitere Möglichkeit, die Affinität eines Antikörpers zu verbessern, gilt die Selektion im Phage Display unter sehr stringenten Bedingungen. Der Selektionsprozess an sich gliedert sich in verschiedene Etappen: Als Basis dient die Immobilisierung des Antigens oder Haptens an eine Trägeroberfläche, dann folgen die Inkubation von scFv-exponierenden Phagen zum Binden spezifischer scFv-Phagen und das durch Waschen erreichte Entfernen von nichtbindenden scFv-Phagen, zum Schluss erfolgt das Eluieren

und Amplifizieren der selektierten scFv-Phagen. Durch Wiederholen dieses Prozesses soll eine Anreicherung dieser stattfinden. Die Wahrscheinlichkeit der Isolation hochaffiner spezifischer Antikörper kann unter verschiedenen Bedingungen erhöht werden, wozu die hier zum Einsatz gekommene substraktive Selektion, die kompetitive Elution und der steigende Salzgehalt gehören. Die selektierten scFvs wurden hinsichtlich ihrer Affinität und der Mutationen charakterisiert und verglichen, um die Mutagenesestrategien zur Affinitätsreifung rekombinanter Antikörper zu beurteilen.

4.1 Mutagenesestrategien

Im humanen Immunsystem werden Antikörper mit hohen Affinitäten in zwei Etappen erzeugt: Das primäre Repertoire von Antikörperstrukturen wird durch das kombinatorische Rearrangieren der Keimbahnsegmente der V-Gene produziert und dient der Selektion der Antikörper durch die Bindung an das Antigen. Die Affinität der Antikörper wird im Folgenden durch die somatische Hypermutation und weitere Runden der Antigen-gesteuerten Selektion verbessert (Paul, 2003). Die Hauptentscheidung für die *in vitro* Antikörper-Affinitätsreifung ist, wo und wie in die die V-Gene der Antikörper, bzw. das Gen eines rekombinanten Antikörperfragments, Mutationen eingebracht werden sollen.

4.1.1 Error Prone PCR

Der einfachste Ansatz ist, Mutationen zufällig in das Gen einzubringen und damit den *in vivo* Prozess der somatischen Hypermutation zu simulieren. Die Error-Prone PCR hat sich dafür als eine sehr effiziente Methode herausgestellt und wurde schon häufig erfolgreich zur Affinitätsreifung von rekombinanten Antikörpern angewendet (Dubreuil *et. al.*, 2005; Gram *et. al.*, 1992; Miyazaki *et. al.*, 1999; Short *et. al.*, 1995). Dafür wird meistens eine DNA-Polymerase ohne Exonuklease Korrekturlese-Aktivität unter Puffer-Konditionen niedriger Genauigkeit verwendet. Da die *Taq*-DNA-Polymerase abhängig von den Reaktionsbedingungen eine hohe intrinsische Fehlerrate zwischen 8×10^{-6} und 2×10^{-4} Fehler pro synthetisiertem Nukleotid aufweist (Eckert und Kunkel, 1990), ist sie die bevorzugte Wahl für die meisten EP-PCR Ansätze. Die Rate der einfachen Basen-Substitutionen während der Amplifikation kann durch Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration relativ zur gesamten dNTP-Konzentration, durch Zufügen von bis zu

5 mM Mn^{2+} oder durch das Ändern des Verhältnisses der verschiedenen dNTPs erhöht werden (Eckert und Kunkel, 1990). Niedrige Template-Konzentrationen und/oder eine höhere Anzahl an PCR-Zyklen erzeugen mehr Duplikationen und folglich eine höhere Mutationsrate in der amplifizierten DNA. Mittels dieser veränderten PCR-Bedingungen konnten Mutationsraten von 0,01 bis 10% erreicht werden (Fromant *et. al.*, 1995; Vartanian *et. al.*, 1996; Lin-Goerke *et. al.*, 1997). Obwohl der Gebrauch der *Taq*-Polymerase für die EP-PCR weit verbreitet ist, hat sie den großen Nachteil, dass bestimmte Basenaustausche bevorzugt werden. Die erzeugten Mutationen werden durch AT zu GC Transitionen und AT zu TA Transversionen dominiert. Das Ergebnis ist eine starke Tendenz zu dAMP- und dTMP-Substitutionen, was die Wahrscheinlichkeit zur Mutation dieser um das zwei- bis vierfache im Vergleich zu G- und C-Nukleotiden erhöht. Somit werden die Mutationen im Gen nicht gleich repräsentiert und bei einem hohen GC-Gehalt kann die durchschnittliche Mutationsrate und Variabilität zusätzlich reduziert werden (Moore und Maranas, 2000). Aufgrund dieser Nachteile und da das scFv BFB1-2-Gen einen GC-Gehalt von 58% besitzt, fand im Rahmen dieser Arbeit für die EP-PCR Mutagenese das „Gene Morph II EZ Clone Domain Mutagenesis“ Kit Verwendung. Dieses enthält neben einer *Taq*-Polymerase-Mutante mit erhöhter Fehlerate, die Mutazym I DNA-Polymerase, die zusammen ein Enzymgemisch ausmachen, welches „Mutazym II“ genannt wird.

Das Mutazym I hat eine hohe Fehlerrate von $3,3 \times 10^{-4}$ Fehlern pro synthetisiertem Nukleotid und eine generelle Prädisposition für das Erzeugen von Transitionen. Zusätzlich zu der starken Bevorzugung der GC zu AT Transitionen, werden auch GC zu TA Transversionen mit einer höheren Rate eingeführt, was insgesamt die bis zu dreifach erhöhte Tendenz zur Mutation von G und C-Nukleotiden ausmacht (Cline und Hogrefe, 2000). Das komplementäre Mutationsspektrum der *Taq*- und Mutazym I Polymerase ergänzen sich gut, um die Mutations-Befangenheiten der einzelnen Enzyme auszugleichen (Neylon, 2004). Insgesamt wird so ein Transitions- zu Transversions-Verhältnis von 0,9 erreicht. Da es acht mögliche Transversionen und vier mögliche Transitionen gibt, sollte eine komplett unpolarisierte Mutagenese ein Verhältnis von 0,5 aufweisen, des weiteren wäre das Verhältnis von AT zu GC und GC zu AT Transitionen gleich 1. Letzteres entspricht bei Mutazym II dem Wert 0,6.

Um eine möglichst hohe Mutationsrate zu erreichen, wurden für die EP-PCR 1 ng Plasmid-DNA eingesetzt (2.6.1), was der unteren empfohlenen Grenze entspricht. Bei zu niedrigen Konzentrationen wird keine ausreichende Produkt-Ausbeute bei der PCR erlangt. Auf diese Weise konnten 9 – 16 Mutationen pro Kilobase (Kb) erwartet werden. Eine Mutationsrate zwischen 4 und 22 Mutationen pro Kb wurde schon früher erfolgreich zur Affinitätsreifung von Hapten-spezifischen scFvs eingesetzt (Daugherty *et. al.*, 2000) und kann allgemein einen viel versprechenden Ansatz für die gerichtete Evolution von Proteinen darstellen (Drummond *et. al.*, 2005; Zaccolo *et. al.*, 1999). Anhand der Sequenzanalyse von Klonen, die direkt nach dem zweiten Panning zufällig ausgesucht wurden, wurde eine Mutationsrate von 12,3 Mutationen pro Kb errechnet (3.3.4). Dies liegt in der Mitte der erwarteten Mutationsrate. Das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen liegt bei 0,95, womit das Mutageneseergebnis ebenfalls wie erwartet ausfiel. Allerdings liegt bei den 10^3 hier analysierten Basenpaaren das Verhältnis von AT zu GC und GC zu AT Transitionen bei 0,3 und erreicht damit nur die Hälfte des mit dem Mutazym II möglichen Verhältnisses. Da die Sequenzen jedoch erst nach der Selektion gegen FB1 analysiert wurden, ist anzunehmen, dass eine Anreicherung von bindenden Klonen zu der beobachteten Häufung der GC zu AT Transitionen geführt hat. Ebenso wird durch den GC-Gehalt des *scFv*-Gens von 58% eine leichte Prädisposition für diesen Austausch entstanden sein. Bei der beobachteten *amber*-Stoppcodon-Anreicherung handelt es sich um eine in dem *E. coli*-Stamm XL10-Gold konservative Mutation des Codons CAG zu TAG, die aufgrund der Verwendung des Suppressor-Stammes zustande kommen konnte.

Mit der hier angewendeten EP-PCR konnte keine unpolarisierte Mutagenese (Verhältnis der Transitionen zu Transversionen gleich 0,5) erreicht werden. Es zeigte sich jedoch vor kurzem, dass eine unpolarisierte Mutagenese sich aufgrund der Redundanz des genetischen Codes eher negativ auswirken kann, da konservative Aminosäureaustausche stark bevorzugt werden und so wenig chemische Diversität erreicht wird. Die Aminosäure-Diversität ist für polarisierte Methoden und unpolarisierte ungefähr gleich: Sie liegt bei einer EP-Methode bei ca. 34% der möglichen Diversität und für ein unpolarisiertes Mutationsspektrum bei 37% (Wong *et. al.*, 2006a). Es ist also anzunehmen, dass EP-PCR-Mutagenese erfolgreich zur Affinitätsreifung von scFv eingesetzt werden kann.

4.1.2 SOE-PCR

Die SOE-PCR kann mithilfe degenerierter Primer Mutationen in bestimmte Teilbereiche eines Gens einbringen und fokussiert damit die Mutagenese auf die Regionen des Proteins, die als zielführend betrachtet werden. Das hat den Vorteil, dass die Größe der resultierenden Antikörperbibliothek in einem Rahmen bleibt, der produzierbar und mit den üblichen Display-Methoden selektierbar bleibt (Rajpal *et. al.*, 2005). Auch soll so die Grundstruktur des Antiköpers erhalten bleiben, was den Anteil der richtig gefalteten und potentiell aktiven Binder erhöht (Chames *et. al.*, 1998).

Bei scFv-Antikörpern wurden häufig die CDR3-Bereiche mutagenisiert (Desiderio *et. al.*, 2001; Nielsen und Marks, 2001), da davon ausgegangen wird, dass der Hauptteil der Bindungsenergie durch diese beiden CDR-Schleifen beigesteuert wird (Schier *et. al.*, 1995). Aus diesem Grund dient dieser Bereich oft zur Einführung der primären Diversität einer Antikörperbibliothek (Pini *et. al.*, 1998; Philibert *et. al.*, 2007). Die CDR3-Bereiche dienen der Antigen-Erkennung, stellen den ersten Kontakt zum Antigen her und tragen die meisten Aminosäureinteraktionen zum Antigen bei (Kabat und Wu, 1991; Padlan, 1994). Darauf folgen zusätzliche Spezifität determinierende Aminosäurereste in der CDR1 und CDR2. Nach einer statistischen Analyse von 22 Hapten-Antikörperkomplexen mit bekannter dreidimensionaler Struktur (Almagro, 2004), werden wichtige Kontakte über Aminosäuren in der CDR_L1 hergestellt, jedoch kaum über die CDR_L2. Für die schwere Kette verhält es sich ähnlich: Die meisten Kontakte liegen in der CDR_H1 und ihrer Umgebung und nur sehr wenige in der CDR_H2. Das liegt daran, dass die Schleifen der CDR2-Bereiche in der Peripherie der Antigenbindestelle liegen und nur von großen Antigenen wie Proteinen und Peptiden erreicht werden, kaum aber von Haptenen (Almagro, 2004). Aus diesen Gründen haben wir uns dafür entschieden, zufällige Mutationen in die CDR_L1 und CDR_H1 des scFv BFB1-2 einzuführen, um nach der Selektion Antikörper mit einer stabileren und affineren Bindung zu erhalten. Diese Bereiche wurden auch in früheren Studien zur Erzeugung von Diversität in Antikörperbibliotheken zur Isolation affinitätsgereifter Hapten-spezifischer Antikörper eingesetzt (Davies und Riechmann, 1996; Short *et. al.*, 1995) oder wurden später als die für die positiven Effekte mitverantwortlichen Regionen identifiziert (Kramer, 2002; Murata *et. al.*, 2002; Valjakka *et. al.*, 2002).

Mit Hilfe der Mutagenesemethode der SOE-PCR wurden drei verschiedene Antikörperbibliotheken des scFv BFB1-2 erstellt: Eine mit in der CDR_H1 mutagenisiertem Bereich (BFB1-2-H1), eine mit in der CDR_L1 mutagenisiertem Bereich (BFB1-2-L1) und eine mit in beiden CDR1 eingeführten Mutationen (BFB1-2-M). Die degenerierten Primer wurden so konstruiert, dass eine moderate Mutationsrate von 10% in der CDR1 erreicht werden sollte, um den Anteil unfunktionaler Klone gering zu halten. Die Sequenzierung von drei bis fünf Klonen pro Antikörperbibliothek zeigte eine Spanne von 7 bis 13% und eine durchschnittliche Mutationsrate von 10%, was damit den Erwartungen entsprach. Die beobachteten Deletionen wurden wohl während der Amplifizierung durch die Polymerase verursacht (Cha und Thilly, 1993). Ein Problem bei der SOE-PCR stellt der erste Schritt zur Synthese der mutierten Fragmente dar, weil degenerierte Primer mit höherer Ähnlichkeit zur Ausgangssequenz effizienter annealen können. Zudem werden Primer mit Mutationen in der Nähe des 5'-Ende häufiger erfolgreich während der Amplifikation verlängert als solche mit Veränderungen in Richtung des 3'-Endes. Daher wurde bei der Konstruktion der Primer auf eine angemessene Länge von vollständig annealender Sequenz am 3'-Ende geachtet. Außerdem wurde die Mutationsrate in den Primern mit 10% (ca. drei Nukleotide pro CDR) relativ niedrig gehalten, womit die Bindungsenergie der Primer wenig beeinflusst wurde und sich weniger Selektionsunterschiede ergaben.

Die Mutagenesestrategie der SOE-PCR führte zu der geplanten Diversität in den Bereichen der CDR_L1 und CDR_H1. Sie stellt eine schon in der Vergangenheit erfolgreich durchgeführte Methode zur fokussierten Mutagenese dar (Desiderio *et. al.*, 2001; Dong *et. al.*, 2002; Dubreuil *et. al.*, 2005; Horten, 1993; Nielsen und Marks, 2001; Pavoni *et. al.*, 2006) und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Variation der CDR1-Bereiche speziell zur Affinitätsreifung von Hapten-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

4.2 Die Antikörperbibliotheken

Die kritische Größe im Bereich der gerichteten Evolution ist die Diversität der Antikörperbibliothek, d.h. wie wird eine Tendenz zu bestimmten Substitutionen vermieden und wie kann eine statistisch aussagkräftige Fraktion der Antikörperbibliothek selektiert werden. Die Diversität hängt dabei von der Größe der Antikörperbibliothek und der Mu-

tationsfrequenz ab. Das hypothetische Ziel einer optimalen Mutagenese zum Erstellen einer Bibliothek ist es, jede AS der Polypeptidkette statistisch gesehen durch jede mögliche der 19 AS auszutauschen. Eine optimale Methode erfüllt folgende Kriterien: Ein Mutationsspektrum ohne systematische Tendenz, eine kontrollierbare Mutationsfrequenz, fortlaufende Nukleotid-Substitutionen oder Codon-basierte Substitutionen, die Möglichkeit von Mutationen bestimmter Untergruppen (positive oder negative Ladung der AS), Unabhängigkeit von der Länge des Gens, technische Einfachheit und Reproduzierbarkeit und Wirtschaftlichkeit (Wong *et. al.*, 2006b).

Die Größe der BFB1-2-E wird dargestellt aus $1,6 \times 10^4$ Klonen bei einer Mutationsfrequenz von ca. 9 Nukleotid-Substitutionen pro Gen (3.1.2). Damit hat sie eine maximale Diversität, denn theoretisch sind alle Nukleinsäuresequenzen in der Bibliothek unterschiedlich (PEDEL („Program for Estimating Diversity in Error-prone PCR Libraries“), Patrick *et. al.*, 2003). Die Anzahl möglicher Varianten mit neun Mutationen beträgt allerdings $3,2 \times 10^{24}$, was deutlich macht, dass die Höhe der theoretisch möglichen Diversität enorm ist und weit ab von dem, was im Labor generiert und gescreent werden kann. Die größtmöglichen Protein-kodierende Bibliotheken umfassen 10^{12} bis 10^{15} Klone. Bezogen auf die verschiedenen Kriterien zur Bewertung einer Antikörperbibliothek, ist diese als positiv zu bewerten, denn die Tendenz zu bestimmten Mutationen wurde optimiert, die Mutationsrate ist kontrollierbar, die Genlänge ist nicht entscheidend, das Erstellen ist simpel, robust und wirtschaftlich (Wong *et. al.*, 2006b).

Die BFB1-2-H1 hat einen Umfang von 8×10^4 Klonen, die BFB1-2-L1 einen von $4,2 \times 10^4$ und BFB1-2-M besitzt $4,5 \times 10^4$ Klone (3.1.1) bei einer Mutationsrate von drei Substitutionen pro CDR_L1, drei Mutationen pro CDR_H1 und sechs Mutationen in der kombinierten Antikörperbibliothek. Die Anzahl der theoretisch möglichen Sequenzvarianten bei der gegebenen Mutationsrate beträgt ca. $1,5 \times 10^5$ für die in einer CDR Mutationen tragenden Bibliotheken und 1×10^6 für die kombinierte Bibliothek. Damit haben diese zwar eine hohe Diversität, bleiben aber hinter der möglichen Sequenzvielfalt zurück, obwohl diese in einem praktisch erreichbaren Rahmen liegt. Bezogen auf die oben angegebenen Bewertungskriterien schneidet die Antikörperbibliotheken dennoch ähnlich gut ab, denn hier wird der wichtigste Punkt, dass nämlich keine Tendenz zu bestimmten Mutationen besteht, erfüllt.

4.3 Panning der Antikörperbibliotheken gegen FB1

Zur Affinitätsreifung rekombinant hergestellter Antikörper besteht neben der Möglichkeit der gerichteten Evolution und der Erstellung von Antikörperbibliotheken die Optimierung des Selektionsprozesses. Modifizierte Panningstrategien zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einen hoch affinen Antikörper zu isolieren sind: die Konzentration des immobilisierten Antigen-Konjugates graduell für die fortlaufenden Panningrunden zu erniedrigen (Strachan *et. al.*, 2002; Friedman *et. al.*, 2008), das freie Antigen zur kompetitive Elution spezifischer Antikörper zu benutzen (Charlton *et. al.*, 2001) und stringendere Waschbedingungen vor der Elution anzuwenden. Ein substraktives Panning, bei dem die Antikörperbibliothek zuerst mit dem Immobilisations-Linker oder -Carrierprotein oder mit Analoga des Antigens inkubiert wird, kann zur Steigerung der Spezifität eingesetzt werden und vergrößert die Wahrscheinlichkeit, dass selektierte Antikörper das freie Antigen erkennen.

Für die Isolation von scFvs aus den vier Antikörperbibliotheken, die verbesserte Bindungseigenschaften zu Fumonisin B1 aufweisen sollten, wurden verschiedene Panningstrategien kombiniert (2.8). Zuerst wurde der substraktive Panningsschritt gegen den Biotinlinker durchgeführt, um Antikörper exprimierende Phagen, die diesen binden, zu entfernen. Dann wurde die Stringenz des Waschens stark erhöht, indem erst ausgiebig mit PBST und dann mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen gewaschen wurde. Die Elution spezifischer FB1-Antikörper-Phagen wurde schließlich kompetitiv vorgenommen, wobei in der zweiten Runde ein zusätzlicher Elutionsschritt mit der niedrigsten FB1-Konzentration von 10^{-9} M durchgeführt wurde. Die Anzahl der Panningrunden wurde auf zwei reduziert, da so einer Anreicherung von Phagen mit unvollständigem scFv-Gen, die in *E. coli* höhere Wachstumsraten aufweisen (Tur *et. al.*, 2001), entgegengewirkt werden sollte.

Der Verlauf des Pannings (3.2) zeigt bei allen vier Antikörperbibliotheken in der zweiten Runde einen Anstieg des Phagentiters für die untersuchten Wasch- bzw. Eluatfraktionen. Das spricht für eine Anreicherung von spezifisch bindenden Phagen je nach Eluatfraktion in einem unterschiedlichen Ausmaß. Dass die Anzahl der Phagen in der letzten NaCl-Waschfraktion relativ hoch ist und im zweiten Panning mit ansteigt, kann damit in Verbindung gebracht werden, dass nicht nur unspezifisch bindende Phagen ent-

fernt werden, wie durch das Waschen mit PBST, sondern auch Teile spezifisch bindender Phagen. Die Ionenstärke beeinflusst die elektrostatischen Interaktionen zwischen Antikörper und Antigen durch das Abschirmen von Ladungen (Dejaegere *et. al.*, 2005). Gerade schnell dissoziierenden Antikörpern wird dadurch eine erneute Assoziation erschwert. Damit findet eine Selektion auf Antikörper mit einer langsameren Dissoziation statt, womit die Affinität steigt. Am FB1 verbliebene scFvs sollten damit also affiner sein, als die im letzten NaCl-Waschschritt entfernten. In der ersten Panningrunde ist die Anzahl der durch Salz entfernten Phagen ähnlich der im Anschluss mit FB1 eluierten Phagen und in der zweiten Panningrunde steigt diese an, da es eine Anreicherung der spezifisch und affin bindenden Phagen gegeben hat, von denen ein geringerer Anteil eine langsamere Dissoziation zeigt (geringerer Titer des Eluates 10^{-9} M, bzw. 10^{-8} M FB1). Auffällig bei den Selektionen der unterschiedlichen Antikörperbibliotheken ist der mit am stärksten ansteigende Titer des Eluates „ 10^{-7} M FB1“. Das könnte auf die noch vorhandenen scFvs hindeuten die eine ähnliche Affinität besitzen wie der ursprüngliche Klon BFB1-2. Daher wurden diese für weitere Analysen nach dem zweiten Panning nicht berücksichtigt, sondern Klone der Eluate „ 10^{-9} M FB1“, „ 10^{-8} M FB1“ und Glycin-HCl untersucht. Die Klone der sauren Elution wurden miteinbezogen, da die Möglichkeit bestand, unter ihnen noch hochaffine Antikörper eluiert zu haben. So sind zwar durch die kompetitive Elution meistens mehr Phagen eluiert worden, nicht aber für die BFB1-2-H-Antikörperbibliothek (Abb. 3.7), was diese Annahme unterstützt.

Weiterhin bemerkenswert ist der Anstieg der Phagentiter beim Panning der BFB1-2-E-Antikörperbibliothek (Abb. 3.5), der von allen insgesamt am größten ausfällt. Bei dieser wurden Mutationen zufällig mit einer Rate von 12,3 Mutationen pro Kb über die gesamte Länge des *scFv*-Gens eingeführt. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass ein im Vergleich zu den anderen Antikörperbibliotheken größerer Anteil an unfunktionalen Antikörpern durch ungünstige Mutationen im „framework“ entstanden ist (Neylon, 2004; Wong *et. al.*, 2006a), welcher hauptsächlich durch das erste Panning entfernt wurde. Andersherum bedeutet dies, dass die fokussierte Mutagenese wie geplant einen höheren Anteil richtig gefalteter und potentiell aktiver Binder besaß.

4.4 Analyse selektierter scFvs

Nach dem Panning wurden je 200 Klone pro Antikörperbibliothek auf die Vollständigkeit des *scFv*-Gens überprüft (3.3.1), um Klone mit verkürztem oder nicht mehr vorhandenem Gen aus weiteren Analysen auszuschließen. Der Anteil der untersuchten Klone mit vollständigem Gen lag bei den Antikörperbibliotheken bei 96,5 bis 98,5%. Dabei konnten auch bei der BFB1-2-E nicht mehr unvollständige Gene festgestellt werden, obwohl diese mit durchschnittlich neun Mutationen pro Gen eine etwas erhöhte Wahrscheinlichkeit dafür aufweist als die anderen Antikörperbibliotheken mit durchschnittlich drei bis sechs Mutationen pro Gen. Insgesamt spricht dieses Ergebnis für eine gute Qualität der Bibliotheken, da dies auf einen hohen Anteil funktioneller Klone hinweist.

Anschließend wurden je 100 Klone mit vollständigem Gen einer Expressionsanalyse unterzogen (3.3.2). Im Verlauf des Pannings kann es zur Anreicherung solcher Phagen kommen, deren *scFv*-Gen durch Deletionen und Insertionen Leserasterverschiebungen aufweisen oder durch Stopcodone keinen „Open reading frame“ (ORF) mehr besitzen (Cárcamo *et al.* 1998; Barderas *et al.*, 2006). Die Wahrscheinlichkeit sinkt zwar bei der Verwendung des Hyperphage als Helferphagen, kann aber nicht ausgeschlossen werden (Hust *et al.*, 2006). Der Anteil exprimierender Klone lag zwischen 20 und 35%. Da die Expressionsanalyse mittels der DOC-Methode (Li *et al.*, 2002) jedoch sehr stark „im Auge des Betrachters“ liegt, stellt das Ergebnis nur einen Hinweis darauf dar, bei welchen Klonen die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, einen ORF zu finden. Nimmt man bei der Auswertung auch Klone hinzu, die auf DOC-haltigem Medium ein geringeres Wachstum zeigten als die Vergleichskolonie, ergibt sich ein Prozentsatz von durchschnittlich 70%. Bei der Sequenzierung von 24 BFB1-2-M-Klonen (Tab. 3.6) wiesen alle einen vollständigen ORF auf, jedoch kann der Stichprobenumfang nicht als repräsentativ angesehen werden. *Amber*-Stopcodone wurden nicht berücksichtigt, da sie wegen der Verwendung des XL1 Blue bzw. XL10 Gold (Suppressor-Stämme) zu Glutamin translatiert wurden. Das Vorhandensein solcher wurde aus praktischen Gründen an anderer Stelle überprüft.

Alle 100 Klone pro Antikörperbibliothek wurden im ELISA auf ihre Bindungsstärke von FB1 hin geprüft (3.3.3). Die Absorptionswerte wurden durch die Division der Pro-

teinkonzentration im Kulturüberstand normalisiert, wobei davon ausgegangen wurde, dass der Anteil der rekombinanten Proteine direkt mit dem Gesamtproteingehalt zusammenhängt und das Verhältnis bei allen Klonen ungefähr gleich ist. Die Kultivierung der *E. coli*-Zellen der verschiedenen Klone zur Expression der scFvs erfolgte in einer Mikrotiterplatte, wobei das Animpfen aus der Platte mit der Vorkultur gleichzeitig vorgenommen wurde. Die Normalisierung diente auch der Egalisierung von unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten, die in einer höheren Zelldichte und einer damit höheren Expression resultierten. Die ermittelten Vergleichswerte wurden zur Auswahl von Klonen benutzt, bei denen die höchste Affinität angenommen werden konnte. Dabei wurden pro Antikörperbibliothek zwei Klone ausgewählt, deren Werte am stärksten vom Mittelwert abwichen. Dies waren die Klone BFB1-2-E37 und -E54, BFB1-2-M7 und -M69, BFB1-2-H27 und -H78, BFB1-2-L4 und -L64. Die Affinitäten dieser scFvs wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz bestimmt. In der Expressionsanalyse waren diese bis auf einen (BFB1-2-E37) unter den ca. 70% der Klone mit ORF.

Um den Verlauf der Selektion der oben genannten Antikörper zu dokumentieren und um eine Anreicherung von Klonen festzustellen, wurden auf verschiedenen Stufen des Selektionsprozesses exemplarisch die *scFv*-Gene zufällig ausgewählter Klone sequenziert (3.3.4). Der Erfolg der Mutagenese wurde zum einen durch die Sequenzierung einzelner PCR-Fragmente belegt, die drei bis vier Mutationen aufwiesen und durch die Sequenzierung von Klonen aus den Antikörperbibliotheken, die eine Mutationsrate von 10% für die fokussierte Mutagenese bzw. 12,3 Basenaustausche pro Kilobase für die EP-PCR-Mutagenese zeigten (4.1). Nach den beiden Panningrunden und der sich anschließenden PCR-Analyse (3.3.1) wurden exemplarisch aus der Antikörperbibliothek BFB1-2-M neun Klone mit vollständigem *scFv*-Gen sequenziert und auf Aminosäureebene verglichen. An dieser Stelle war schon eine Anreicherung von Klonen zu erkennen, da es zwei Mal zwei sequenzidentische Klone gab. Als nächstes wurden ebenfalls aus der BFB1-2-M 15 Klone untersucht, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einen vollständigen scFv exprimierten. Hier ergaben sich drei Gruppen, zwei mit je zwei Klonen mit identischer Proteinsequenz und eine Gruppe mit vier sequenzidentischen scFvs, was eine noch deutlichere Anreicherung zeigt. Interessanterweise konnte der BFB1-2-M69, dessen Ergebnis im ELISA auf eine hohe Affinität hinwies, keiner dieser Gruppen zugeordnet werden. Bei diesem stellte sich später eine im Vergleich zu BFB1-2 etwas

erhöhte Affinität heraus. Der BFB1-2-M45, der der größten Gruppe sequenzidentischer Klone angehörte, zeigte auch im ELISA Werte, die auf eine gute Affinität hinwiesen, jedoch hatten die Klone BFB1-2-M7 und -M69 Werte, die auf die höchste Affinität hindeuteten, und wurden daher weiter analysiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anreicherung von Klonen gleicher Sequenz nicht notwendigerweise mit der Affinität der Fragmente korreliert, was anderswo ebenso festgestellt wurde (Wälchli *et al.* 2004).

Zwei Veränderungen der Aminosäuresequenz wurden während des Pannings der BFB1-2-M-Antikörperbibliothek angereicht: Zum einen der Austausch des Tyrosins in der CDR_H1 an der Position 32 und der Austausch des Threonins ebenfalls in der CDR_H1 an der Position 28. Die Substitution des Tyrosins bei sieben Klonen gegen Glutamin und bei zwei Klonen gegen Serin hat einen sterischen Einfluss, denn letztere sind viel kleiner und weniger raumgreifend. Die Polarität dagegen bleibt gleich. Es scheint, dass dadurch eine Strukturveränderung resultierte, die einen positiven Einfluss auf die Bindungsaffinität zeigte, sodass Klone mit dieser Mutation einen Selektionsvorteil hatten. Die ungeladene, polare AS Threonin ist bei zwei Klonen gegen die hydrophobe AS Prolin ausgetauscht, bei fünf Klonen allerdings gegen Serin, die sich nur durch eine fehlende Methyl-Gruppe von Threonin unterscheidet. Prolin kann sowohl in *cis*- als auch in *trans*-gebundener Konfiguration vorkommen, was erheblichen Einfluss auf die Faltung von Proteinen haben kann. Es kann aufgrund der *cis*-Amidbindung α -Helices unterbrechen, weshalb ein eher negativer Effekt angenommen werden kann (Wong *et al.*, 2006a). Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die Mutation zu Serin häufiger vorkam, welche als ineffektiv betrachtet werden kann. Daher scheint ein Vorkommen von Prolin an dieser Position keinen positiven Einfluss auf die Affinität hervorgerufen zu haben. Letztendlich ist die Anzahl der analysierten Klone (24) jedoch so gering, dass das Erkennen einer echten Anreicherung von Mutationen nicht gewährleistet werden kann. Folglich kann eine generelle Aussage über den Zusammenhang der Mutationen mit der Bindungsaffinität schwer getroffen werden.

4.5 Charakterisierung einzelner scFvs

4.5.1 Expression und Aufreinigung

Für die Charakterisierung einzelner scFvs bezüglich ihrer Affinität mittels SPR-Analyse, wurden diese in *E. coli* TB1 exprimiert und direkt aus dem Kulturüberstand aufgereinigt. Für die Sekretion von Proteinen in das Periplasma von gramnegativen Bakterien sind verschiedene Mechanismen und Pfade bekannt (Thanassi und Hultgren, 2000), wobei hier für das Targeting rekombinanten scFvs die N-terminal liegende pel B leader Sequenz der *Pectobacterium carotovorum* Pectatlyase B verwendet wurde. Diese sorgt nicht nur für die Lokalisierung von Proteinen, sondern kann auch einen stimulierenden Effekt auf das Expressionslevel insgesamt haben (Sletta *et. al.*, 2006). Aufgrund der partiellen Durchlässigkeit der äußeren Membran (Plückthun und Skerra, 1989) konnten die scFvs direkt aus dem Kulturüberstand von *E. coli* Expressionskulturen mittels Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Voraussetzung dafür war, dass das DP-47 Segment der schweren Ketten der scFvs zur Gruppe der V_H3-Domänen gehört (Hoogenboom *et al.* 1992), was hier erfüllt wurde. DP-47 gewährleistet eine gute Expression der scFvs und die korrekte Faltung des Proteins beim Phage Display und in Lösung (Viti *et al.*, 2000). Eine weitere vorteilhafte biophysikalische Eigenschaft ist die Exprimierbarkeit ohne das Entstehen von „inclusion bodies“ und Dimeren in *E. coli* (Ewert *et. al.* 2003). Durch „Size Exclusion Chromatography“ konnte auch im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden, dass der überwiegende Teil der scFvs als Monomer vorlag (Lauer, 2005). Die Expression und die Aufreinigung der scFvs wurden anhand von SDS-PAGE und Western Blot mit anschließender Immunfärbung (3.4.1) auf die Reinheit überprüft.

4.5.2 Affinitätsbestimmung und Sequenzanalyse

Die Charakterisierung einzelner scFvs hinsichtlich ihrer Affinität erfolgte mittels SPR-Analyse an einer Autolab SPR Esprit. Aufgrund des Messprinzips (2.9.1), das auf der Änderung des refraktorischen Indexes auf der Oberfläche der Sensordisc bzw. in der sich in der Messküvette befindlichen Lösung beruht, war es notwendig, dass sich alle für die Analyse benötigten Lösungen und Substanzen in dem selben Puffer (PBS) befanden. Aus diesem Grund wurden die aufgereinigten scFvs vor der SPR-Analyse in

PBS umgepuffert. Grundlage für die Messung ist die Immobilisierung einer der beiden Reaktionspartner an der Oberfläche der Sensordisc (Ligand), während sich der andere in Lösung befindet (Analyt). Wir hatten uns dafür entschieden, das Fumonisin B1 als Liganden einzusetzen, da sich dadurch die Möglichkeit ergab, mehrere scFvs an demselben Chip zu analysieren. Es wird so auch ein Problem umgangen, welches bei der Immobilisierung von Antikörpern entsteht, dass ein gewisser Anteil seine Funktionalität durch Konformationsänderung verliert oder so gebunden wird, dass das Paratop für das Antigen oder Hapten nicht mehr zugänglich ist. Schließlich wäre auch die Änderung des refraktorischen Indexes bei einer Bindung von dem kleinen Molekül FB1 als Analyt zu gering, um adäquat detektiert werden zu können. Für die erste Analyse der aus dem ELISA hervorgegangenen scFvs wurde die „SPR Sensordisc SAD50d“ für die Immobilisierung des FB1-Biotin-Konjugates (1176 g/mol) verwendet (3.4.2.1). Dabei handelt es sich um eine verzweigte Matrix bestehend aus einem 50 nm dicken Carboxymethyl-dextran-Hydrogel, die mit Streptavidin derivatisiert ist. Sie erlaubte die Immobilisierung des biotinylierten BF1 über die spezifische, nahezu irreversible Biotin-Streptavidin-Interaktion. Dextran ist ein Polymer von Glucose-Einheiten, welches ein sehr niedriges Ausmaß an unspezifischer Adsorption von Biomolekülen zeigt. Die Carboxymethylgruppen sorgen für eine erhöhte Hydrophilie und stehen als funktionelle Gruppen zur Verfügung. Die erfolgreiche Kopplung ist im Sensorgramm durch die Änderung des Resonanzwinkels um 32 m° zu erkennen. Für die exaktere Affinitätsbestimmung des scFv BFB1-2 und des BFB1-2-H78 wurde die „Sensordisc Bare Gold“ verwendet, welche die direkte Immobilisierung des FB1 über die kovalente Kopplung der primären Aminogruppe mit der 11-MUA-„Monolayerschicht“ auf der Chipoberfläche erlaubte (Abb. 2.5). Da so auf eine Hydrogelmatrix verzichtet werden konnte, sind die gemessenen Kinetiken eher vergleichbar mit denen von Interaktionen der Bindungspartner in einer Lösung (Huber *et. al.*, 1998). Der Resonanzwinkel änderte sich aufgrund der positiven Kopplung um 26 m° . Durch das kleinere Molekulargewicht von FB1 verglichen zu Biotin-FB1 ergibt sich die geringere Änderung im Resonanzwinkel bei dieser Kopplung.

Anhand der SPR-Analyse wurde die Affinität der scFvs BFB1-2, BFB1-2-E37 und -E54, BFB1-2-M69, BFB1-2-H27 und -H78 und BFB1-2-L64 unter Verwendung des Streptavidin-beschichteten Chips ermittelt (3.4.2). Die Antikörper wurden unverdünnt

und in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 in dem Zwei-Küvetten-System gegen den Bindepuffer als Negativkontrolle gemessen (2.9.3). Für alle scFvs wurden spezifisch verlaufende Bindungskurven (Änderung des Resonanzwinkels in m° als Funktion der Zeit) erhalten. Diese werden durch den linearen Zusammenhang zwischen der Menge der an dem immobilisierten Hapten gebundenen scFvs, der damit einhergehenden Änderung des refraktorischen Indexes, des refraktorischen Indexes der Lösung und der Änderung des SPR-Winkels bestimmt (Stenberg *et. al.*, 1991). Die Kurven zeigen bis auf einige Ausnahmen einen für das auf dem Küvetten-System beruhende Messprinzip der Autolab SPR Esprit typischen Verlauf. Dieser ist abweichend von mit Biacore-Geräten gemessenen Kurven, da dort das Messprinzip auf einem kontinuierlichen Pufferstrom beruht. Die Assoziationsphase startet mit der Aufgabe der scFv-Probe auf den Chip, wobei der erste senkrechte Anstieg der Kurve durch die Änderung des refraktorischen Indexes zustande kommt, welcher wiederum von der Konzentration der Proteinlösung abhängig ist. Die scFvs assoziieren an FB1 im Optimalfall bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist, in dem genauso viele scFvs assoziieren wie dissoziieren. Hier ist der Wert der Änderung des Resonanzwinkels eine Funktion der totalen Kapazität der Sensordisc, der Affinität K_D und der Antigenkonzentration. Der Verlauf der Assoziationsphase ist eine Funktion der Assoziationsrate k_a und der Dissoziationsrate k_d und der Analytkonzentration. Sobald der Puffer in der Küvette ausgetauscht wird, beginnt die Dissoziationsphase, in der solange scFvs dissoziieren bis sich ein neues Gleichgewicht eingestellt hat. Der anfängliche senkrechte Abfall der Kurve ist wiederum auf die Änderung des refraktorischen Indexes zurückzuführen und hat die gleiche Größenordnung wie zu Beginn der Assoziationsphase (Torreri *et. al.*, 2005).

Die Unterschiede bei den Bindungskurven der scFvs zeigen sich vor allem während der Assoziationsphase. Hier wird der Gleichgewichtszustand bei einigen scFvs erreicht (BFB1-2-E37) oder fast erreicht (BFB1-2-H27, -H78, -L64), d. h. mit einer noch minimalen positiven Steigung, und bei zweien kommt es zu keiner Gleichgewichtseinstellung (BFB1-2-E54 und M69), da hier die Kurven weiter ansteigen. Dieses Phänomen tritt vor allem in der höchsten Konzentration auf, wobei sich in den Verdünnungen 1:100 und 1:10 meistens ein Gleichgewicht einstellen kann. Dies könnte daran liegen, dass die Menge an immobilisierten Liganden so hoch ist, dass die Zeitspanne für eine Assoziation nicht ausreicht, um das Gleichgewicht zu erreichen. Eine andere Möglich-

keit wäre, dass sterische Hinderung die Bindung verzögert. Bei dem scFv BFB1-2 wird erst kurz ein Gleichgewichtszustand erreicht, dann jedoch fällt die Kurve wieder langsam ab. Da das SPR-Signal temperaturabhängig ist, könnte dies durch eine Temperaturänderung hervorgerufen worden sein. Das ist allerdings auszuschließen, da die Temperatur im System durch einen temperierten Wasserkreislauf über eine Pumpe konstant gehalten wurde. Eine andere Möglichkeit wäre ein rascher Zerfall oder die Fragmentierung des scFv-Moleküls, das damit seine Funktionalität einbüßt. Während der Dissoziationsphase kam es bei manchen Bindungskurven (BFB1-2-H27) vor, dass wieder ein leichter Anstieg der Kurve verzeichnet wurde, besonders bei den hohen Konzentrationen. Dies könnte durch wieder assoziierende scFvs zustande gekommen sein.

Für die Analyse der Bindungsdaten wurde das 1:1 Langmuir Bindungsmodell verwendet, da ein Bindungsverhältnis von Antigen zu Antikörper von 1:1 angenommen werden kann. Die Dissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität kann als Quotient aus der ermittelten Dissoziationsrate k_d und der Assoziationsrate k_a berechnet werden. Die Genauigkeit von K_D hängt damit von der Genauigkeit der Bestimmung der k_a und k_d -Werte ab (Alfthan, 1998). Alternativ kann zur Bestimmung der Affinität der Teilbereich der Messdaten, die die Einstellung des Gleichgewichtes zeigen, bei verschiedenen Konzentrationen des Analyten verwendet werden. Vorteile dieses Ansatzes sind, dass eine Modellierung der Bindungskinetiken nicht benötigt wird und dass dieser unabhängig von Limitierungen durch Massentransfer-Effekte ist (Huber *et. al.*, 1998). Da bei den Messungen an der Autolab SPR Esprit mit dem Küvettenystem gearbeitet wird, stellt sich bei der Dissoziation ein neuer Gleichgewichtszustand ein und die Dissoziationsrate kann nicht ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde zur Berechnung der Affinität auf den Ansatz des thermodynamischen Gleichgewichtes zurückgegriffen.

Die im Vorfeld über eine Biacore 3000 festgestellte Affinität (Lauer, 2005) des scFv BFB1-2 konnte nicht bestätigt werden. Die hier ermittelte Affinität ist mit $4,12 \times 10^{-6}$ M ungefähr um den Faktor 10 schlechter. Dies ist sicherlich systembedingt, weshalb für den Vergleich der Affinitäten, die im Rahmen dieser Arbeit errechnete herangezogen wird. Die aus den verschiedenen Antikörperbibliotheken selektierten scFvs weisen in ihrer Affinität nur relativ geringe Unterschiede zwischen einem Faktor von 0,4 bis 2,4 zum ursprünglichen scFv BFB1-2 auf. Die Spanne der durch die gerichtete Evolution von Antikörpern mögliche Affinitätsreifung ist sehr weit und anhängig von vielen Fak-

toren, wie der Display-Methode, der Mutagenese-strategie, der Größe und Diversität der Antikörperbibliothek, des Selektionsdruckes und der anfänglichen Affinität des Antikörpers. Es gibt Beispiele für den Erfolg einer Affinitätsreifung bei einer Verbesserung um einen Faktor im einstelligen Bereich (Chames *et. al.*, 1998; Hawkins *et. al.*, 1992; Irving *et. al.*, 1996; Schier *et. al.*, 1996; Short *et. al.*, 1995), im zweistelligen Bereich (Dong *et. al.*, 2004; Friedmann *et. al.*, 2008; Fukuda *et. al.*, 2006; Hanes *et. al.*, 2000; Lippow *et. al.*, 2007; Marks *et. al.*, 1992; Valjakka *et. al.*, 2002; Yuan *et. al.*, 2006) und im dreistelligen Bereich (Huang *et. al.* 2008; Low *et. al.*, 1996; Rajpal *et. al.*, 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit aus der BFB1-2-E selektierten Klone BFB1-2-E37 und -E54 besitzen Affinitäten von $4,23 \times 10^{-6}$ M bzw. $9,92 \times 10^{-6}$ M und haben dadurch ungefähr die gleiche bzw. eine verschlechterte Affinität zu FB1 verglichen mit BFB1-2 ($4,12 \times 10^{-6}$ M). Betrachtet man die Sequenz dieser beiden Klone, so ist dies im Fall von BFB1-2-E37 selbstverständlich, denn er ist sequenzidentisch zu BFB1-2, was auf eine unzureichende Anzahl an Selektionsrunden hindeutet. Der BFB1-2-E54 weist drei Mutationen in der „framework“-Region auf und hat von allen selektierten Klonen die schlechteste Affinität. Dadurch waren die für die Bindung relevanten Bereiche, vor allem die CDR3 und CDR1, noch intakt, wodurch noch eine Bindung stattfinden konnte, jedoch wurde die Bindungsstärke durch die Mutationen herabgesetzt. Das macht die Bedeutung des Antikörper-„framework“ für die richtige Ausrichtung und Faltung der Antigenbindestelle deutlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche fokussierte Antikörperbibliotheken erstellt und zur Isolation affinitätsgereifter Antikörper verwendet: die BFB1-2-H, BFB1-2-L und BFB1-2-M, die Diversität in der CDR_{H1}, der CDR_{L1} bzw. in beiden CDR1-Bereichen besitzen. Aus der ersten wurden die Klone BFB1-2-H27 und -H78 isoliert, welche beide eine verbesserte Affinität zu FB1 aufweisen. Der BFB1-2-H78 ($1,73 \times 10^{-6}$ M) ist mit einer Verbesserung um den Faktor 2,4 der affinste aller selektierten Klone. Der BFB1-2-H27 mit einer Affinität von $3,8 \times 10^{-6}$ M zeichnet sich nur durch eine zufällig in der CDR_{H3} durch die Polymerase eingeführte Mutation von Glutamin zu Arginin aus, die auch in dem -H78 vorkommt. Diese scheint durch die positive Ladung die Bindung des FB1, das vier Carboxygruppen trägt und negativ geladen ist, zu begünstigen. Der BFB1-2-H78 hat zusätzlich noch zwei Substitutionen in der CDR_{L1}, die ebenfalls zufällig eingeführt wurden: Durch den Austausch von Arginin zu Lysin wird die Basizität etwas erniedrigt und die Seitenkette leicht ver-

kürzt, der Austausch von Serin zu Threonin ändert nur die Lage der Hydroxygruppe. Insgesamt führte dies aber zu verbesserten Bindungsbedingungen, die die Affinität erhöhten. Der scFv BFB1-2-L64 besitzt eine nur sehr geringfügig schlechtere Affinität verglichen mit BFB1-2 und trägt in der CDR_{L1} eine Substitution von Glutamin zum positiv geladenen Histidin, was anscheinend nicht wie bei BFB1-2-H78 zu einer verbesserten Affinität führte, da diese Aminosäure wahrscheinlich nicht im direkten Kontakt zu einer Carboxygruppe steht. Der BFB1-2-M69 zeigt die beiden in der Antikörperbibliothek BFB1-2-M wahrscheinlich angereicherten Mutationen in der CDR_{H1}, die schon in Kapitel 4.4 diskutiert wurden. Zusätzlich besteht eine Substitution in der „framework“-Region in der Nähe der CDR_{H1} zu Arginin, wodurch wiederum eine eventuell die Bindung begünstigende positive Ladung eingeführt wird, denn dieser scFv hat eine verbesserte Affinität von $3,08 \times 10^{-6}$ M. Bio-informatische Strukturvergleiche der einzelnen scFvs ergaben, dass nur geringe Konformationsunterschiede zwischen den einzelnen Binderegionen bestehen (Hartwig, 2009), was ebenfalls darauf hindeutet, dass sich die Unterschiede in den Affinitäten hauptsächlich aus den Veränderungen der Polarität der Aminosäuren ergeben haben.

Um die Ergebnisse für den affinsten scFv im direkten Vergleich zu dem ursprünglichen scFv BFB1-2 zu validieren, wurde die Anzahl der Analytverdünnungen auf fünf bzw. sechs erhöht, um genauere Berechnungen der Affinität zu ermöglichen (3.4.2.3). Die während der SPR-Analyse erhaltenen Bindungskurven zeigten den typischen oben beschriebenen Verlauf mit der Ausnahme, dass in den höheren Konzentrationen kein Gleichgewichtszustand während der Assoziation erreicht wurde. Mögliche Gründe dafür sind, wie oben diskutiert, die sterische Hinderung und die zu kurze Assoziationszeit. Während der Dissoziation fielen die Kurven kontinuierlich in Richtung der Einstellung eines neuen Gleichgewichtszustandes ab. Für den BFB1-2 wurde eine Affinität von $7,2 \times 10^{-6}$ M errechnet und für den BFB1-2-H78 eine von $5,5 \times 10^{-6}$ M, was eine Verbesserung um den Faktor 1,3 darstellt. Dies belegt, dass eine Affinitätsreifung für den BFB1-2-H78 stattgefunden hat. Die von der ersten Messung abweichenden Ergebnisse liegen darin begründet, dass hier mit einer anderen Sensordisc („Bare Gold“) und einer anderen Kopplungsmethode (kovalente Kopplung) von FB1 gearbeitet wurde. Die vorher festgestellte verbesserte Affinität von BFB1-2-H78 konnte jedoch bestätigt werden.

4.6 Fazit und Ausblick

Aufgrund der über die SPR-Analyse ermittelten Affinität der einzelnen Antikörper, die Beispiele der jeweiligen verwendeten Antikörperbibliothek darstellen, kann festgestellt werden, dass über die EP-PCR-Mutagenese unter dem angewendeten Selektionsdruck und mit der relativ geringen Größe der Antikörperbibliothek, keine affinitätsgereiften Antikörper isoliert werden können. Daugherty *et. al.* (1999) zeigten, dass mit einer durch EP-PCR erstellten Antikörperbibliothek mit einer Mutationsrate von 4 bis 22 Mutationen pro Kb und einer Größe von 1×10^6 Klonen nach vier bis fünf Selektionsrunden ein um das 19fache verbesserter scFv isoliert werden konnte. Daher kann darauf geschlossen werden, dass scFvs mit einer höheren Affinität isoliert werden könnten, wenn man die Diversität der Antikörperbibliothek durch Vergrößern der Anzahl unabhängiger Klone steigert und die Anreicherung der Klone mit verbesserter Affinität durch mehr Panningrunden erhöht. Die Mutationsrate von 12,5 Austauschen pro Kb ist dafür passend.

Vergleicht man die aus der fokussierten Mutagenese hervorgegangenen scFvs, so konnten Mutationen in der CDR_L1 und CDR_H3 beim BFB1-2-H78 am meisten zu einer verbesserten Affinität beitragen. Jedoch ist es sehr schwierig, aufgrund der geringen Menge der getesteten scFvs eine der drei Antikörperbibliotheken als besonders erfolgreich hervorzuheben. Da unter den selektierten jedoch keine scFvs zu finden waren, die eine Kombination von Substitutionen in der CDR_H1 und CDR_L1 aufwiesen, kann angenommen werden, dass dies sich nicht begünstigend auf die Bindungseigenschaften der scFvs auswirkt. Auch bei der etwas eingehender analysierten BFB1-2-M zeigte sich bei einer Stichprobe, dass nur drei von 24 Klonen nach dem Panning diese Kombination besaßen. Pavoni *et. al.* (2006) wendeten eine ähnliche Strategie zur fokussierten Mutagenese zur Verbesserung der Bindungsaffinität eines aus der ETH2 isolierten scFv an, wobei sie sich allerdings auf die CDR3 konzentrierten. Sie erstellten eine Antikörperbibliothek mit 2×10^6 Klonen und isolierten nach drei Panningrunden einen affineren scFv. In diesem Fall würden ebenso wie bei der BFB1-2-E eine Vergrößerung der Antikörperbibliotheken und eine erhöhte Anzahl an Panningrunden zur Isolation von scFvs führen die mehr als um den Faktor 2,4 in ihrer Affinität verbessert sein sollten. Dabei ist die Stra-

tegie sich auf die CDR1-Bereiche zu konzentrieren auf die Anwendung für Haptene angepasst.

Insgesamt wurde damit das Ziel, die Affinität des scFv BFB1-2 zu verbessern, erreicht und aus den Ergebnissen ist zu schließen, dass eine fokussierte gerichtete Evolution der richtige Ansatz ist, Hapten-spezifische scFvs in ihrer Affinität zu verbessern. Des Weiteren hat sich das Erhöhen des Selektionsdruckes während des Pannings als positiv herausgestellt, denn es kann davon ausgegangen werden, dass dies in Kombination mit der Mutagenese-strategie zu der Affinitätsreifung geführt hat.

5 Literatur

- Alberts, B., Jaenicke, L., & Alberts-Johnson-Lewis-Raff-Roberts-Walter (2004). *Molekularbiologie der Zelle: [mit Cell biology interactive]* (4. Aufl.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Alfthan, K. (1998). Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering. *Biosensors & bioelectronics*, 13(6), 653–663.
- Allen, D., Cumano, A., Dildrop, R., Kocks, C., Rajewsky, K., & Rajewsky, N., et al. (1987). Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development. *Immunological reviews*, 96, 5–22.
- Almagro, J. C. (2004) Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires. *Journal of molecular recognition : JMR*, 17(2), 132–143.
- Almagro, J. Carlos, Quintero-Hernández, V., Ortiz-León, M., Velandia, A., Smith, S. L., & Becerril, B. (2006) Design and validation of a synthetic VH repertoire with tailored diversity for protein recognition. *Journal of molecular recognition : JMR*, 19(5), 413–422.
- Arap, M. Antonio (2005). Phage display technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1), 1–9.
- Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A., & Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7978–7982.
- Barderas, R., Shochat, S., Martínez-Torrecuadrada, J., Altschuh, D., Meloen, R., & Ignacio Casal, J. (2006). A fast mutagenesis procedure to recover soluble and functional scFvs containing amber stop codons from synthetic and semisynthetic antibody libraries. *Journal of immunological methods*, 312(1-2), 182–189.
- Baymiev, A. Kh, Gubaydullin, I. I., Baymiev, K. an, & Chemeris, A. V. (2007). Inverse PCR-Based Site-Directed Mutagenesis of Nucleotide Sequences Coding for Carbohydrate-Binding Fragments of Legume Lectins. *Applied molecular biology*, 857–859.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., & Lee, S. M., et al. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4877), 423–426.
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., & Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, 104(2), 147–153.
- Brons-Poulsen, J., Nohr, J., & Larsen, L. K. (2002). Megaprimer Method for Polymerase Chain Reaction-Mediated Generation of Specific Mutations in DNA. In J. Braman (Ed.), *Methods in molecular biology: Vol. 182. In vitro mutagenesis protocols* (2nd ed., pp. 71–76). Totowa, NJ: Humana Press.
- Bruin, R. de, Spelt, K., Mol, J., Koes, R., & Quattrocchio, F. (1999). Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature biotechnology*, 17(4), 397–399.

- Cárcamo, J., Ravera, M. W., Brissette, R., Dedova, O., Beasley, J. R., & Alam-Moghé, A., et al. (1998). Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(19), 11146–11151.
- Cha, R. S., & Thilly, W. G. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR methods and applications*, 3(3), S18-29.
- Chames, P., Coulon, S., & Baty, D. (1998). Improving the affinity and the fine specificity of an anti-cortisol antibody by parsimonious mutagenesis and phage display. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(10), 5421–5429.
- Charlton, K., Harris, W. J., & Porter, A. J. (2001). The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *Biosensors & bioelectronics*, 16(9-12), 639–646.
- Chiu, J., Tillett, D., Dawes, I. W., & March, P. E. (2008). Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM) for highly efficient mutagenesis of plasmids greater than 8kb. *Journal of microbiological methods*, 73(2), 195–198, from doi:10.1016/j.mimet.2008.02.013.
- Cline, J., & Hogrefe, H. H. (2000). Randomize gene sequences with new PCR mutagenesis kit. *Strategies*, 13, 157–162.
- Coia, G., Ayres, A., Lilley, G. G., Hudson, P. J., & Irving, R. A. (1997). Use of mutator cells as a means for increasing production levels of a recombinant antibody directed against Hepatitis B. *Gene*, 201(1-2), 203–209.
- Coia, G., Hudson, P. J., & Irving, R. A. (2001). Protein affinity maturation in vivo using *E. coli* mutator cells. *Journal of immunological methods*, 251(1-2), 187–193.
- Conrad, U., & Scheller, J. (2005). Considerations on antibody-phage display methodology. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 8(2), 117–126.
- Coomber, D. W. J. (2002). Panning of Antibody Phage Display Libraries. In P. M. O'Brien & R. Aitken (Eds.), *Methods in molecular biology: Vol. 178. Antibody phage display. Methods and protocols* (pp. 133–145). Totowa, NJ: Humana Press.
- Cramer, A., Cwirla, S., & Stemmer, W. P. (1996). Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nature medicine*, 2(1), 100–102.
- Daly, S. J., Dillon, P. P., & Brennan, J. (2001). Production and analytical applications of scFv antibody fragments. *Analytical Letters*, 34(11), 1799–1827.
- Daugherty, P. S., Chen, G., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (2000). Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2029–2034, from doi:10.1073/pnas.030527597.
- Daugherty, P. S., Olsen, M. J., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (1999). Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein engineering*, 12(7), 613–621.
- Davies, J., & Riechmann, L. (1996). Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding. *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering*, 2(3), 169–179.

- Dejaegere, A., Choulier, L., Lafont, V., Genst, E. de, & Altschuh, D. (2005). Variations in Antigen–Antibody Association Kinetics as a Function of pH and Salt Concentration: A QSAR and Molecular Modeling Study. *Biochemistry*, (44), 14409–14418.
- Desiderio, A., Franconi, R., Lopez, M., Villani, M. E., Viti, F., & Chiaraluce, R., et al. (2001). A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold. *Journal of molecular biology*, 310(3), 603–615
- Dong, L., Chen, S., Bartsch, U., & Schachner, M. (2003). Generation of affinity matured scFv antibodies against mouse neural cell adhesion molecule L1 by phage display. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(1), 60–70.
- Drummond, D. Allan, Iverson, B. L., Georgiou, G., & Arnold, F. H. (2005). Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *Journal of molecular biology*, 350(4), 806–816.
- Dubreuil, O., Bossus, M., Graille, M., Bilous, M., Savatier, A., & Jolivet, M., et al. (2005). Fine tuning of the specificity of an anti-progesterone antibody by first and second sphere residue engineering. *The Journal of biological chemistry*, 280(26), 24880–24887.
- Dübel, S., & Kontermann, R. (2001). Recombinant Antibodies. In R. Kontermann & S. Dübel (Eds.), *Springer lab manual: Antibody engineering*. Berlin: SPRINGER.
- Eckert, K. A., & Kunkel, T. A. (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic acids research*, 18(13), 3739–3744.
- Eggert, T., Reetz, M. T., & Jaeger, K. -E (2004). Directed Evolution by Random Mutagenesis: A Critical Evaluation. In A. Svenson (Ed.), *Enzyme Functionality - Design, Engineering, and Screening*. New York: Marcel Dekker.
- Einhauer, A., & Jungbauer, A. (2001). The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 455–465.
- Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., & Plückthun, A. (2003). Biophysical properties of human antibody variable domains. *Journal of molecular biology*, 325(3), 531–553.
- Feys, V., Waele, P. de, van de Voorde, A., Casneuf, P., & Fiers, W. (1988). Expression of functional mouse antibodies directed against the tumour marker human placental alkaline phosphatase in non-lymphoid cells. *International journal of cancer. Supplement = Journal international du cancer. Supplement*, 2, 26–27.
- Follo, C., & Isidoro, C. (2008). A fast and simple method for simultaneous mixed site-specific mutagenesis of a wide coding sequence. *Biotechnology and applied biochemistry*, 49(2), 175–183.
- Friedman, M., Orlova, A., Johansson, E., Eriksson, T. L. J., Höidén-Guthenberg, I., & Tolmachev, V., et al. (2008). Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding antibody molecule. *Journal of molecular biology*, 376(5), 1388–1402.
- Fromant, M., Blanquet, S., & Plateau, P. (1995). Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 224(1), 347–353.
- Fukuda, I., Kojoh, K., Tabata, N., Doi, N., Takashima, H., & Miyamoto-Sato, E., et al. (2006). In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. *Nucleic acids research*, 34(19), e127.

- Goryacheva, I. Y., Saeger, S. de, Eremin, S. A., & van Peteghem, C. (2007). Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: a review. *Food additives and contaminants*, 24(10), 1169–1183.
- Gram, H., Marconi, L. A., Barbas, C. F., Collet, T. A., Lerner, R. A., & Kang, A. S. (1992). In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3576–3580.
- Haard, H. J. de, van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., & Henderikx, P., et al. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *The Journal of biological chemistry*, 274(26), 18218–18230.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., & Plückthun, A. (2000). Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature biotechnology*, 18(12), 1287–1292.
- Hartwig, S. (2009). *Bioinformatischer Strukturvergleich verschiedener Mutanten des scFv BFBI-02*. Bachelorarbeit, Leibniz Universität Hannover, Hannover.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J., & Winter, G. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *Journal of molecular biology*, 226(3), 889–896.
- Hidalgo, A., Schliessmann, A., Molina, R., Hermoso, J., & Bornscheuer, U. T. (2008). A one-pot, simple methodology for cassette randomisation and recombination for focused directed evolution. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 21(9), 567–576.
- Hof, H. (2008). Medical relevance of mycotoxins. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 133(20), 1084–1088.
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology*, 23(9).
- Hoogenboom, H. R., & Winter, G. (1992). By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *Journal of molecular biology*, 227(2), 381–388.
- Hoogenboom, H. R. (2002). Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 178, 1–37.
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature biotechnology*, 23(9), 1105–1116.
- Horten, R. M. (1993). In Vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes. In B. A. White (Ed.), *Methods in molecular biology: Vol. 15. PCR protocols. Current methods and applications* (pp. 251–258). Totowa, NJ: Humana Press.
- Horton, R. M., Cai, Z. L., Ho, S. N., & Pease, L. R. (1990). Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 8(5), 528–535.
- Huang, J., Koide, A., Makabe, K., & Koide, S. (2008). Design of protein function leaps by directed domain interface evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18), 6578–6583.

- Huber, A., Demartis, S., & Neri, D. (1998). The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *Journal of molecular recognition : JMR*, 12(3), 198–216.
- Hust, M., & Dübel, S. (2004). Mating antibody phage display with proteomics. *Trends in biotechnology*, 22(1), 8–14.
- Hust, M., Dübel, S., & Schirrmann, T. (2007). Selection of Recombinant Antibodies From Antibody Gene Libraries. In M. F. Ochs (Ed.), *Methods in molecular biology: Vol. 408. Gene function analysis* (pp. 243–255). Totowa, NJ: Humana Press.
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J., & Reinard, T. (2002). The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *Journal of virological methods*, 106(2), 225–233.
- Hust, M., Meysing, M., Schirrmann, T., Selke, M., Meens, J., & Gerlach, G.-F., et al. (2006). Enrichment of open reading frames presented on bacteriophage M13 using hyperphage. *BioTechniques*, 41(3), 335–342.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotný, J., & Margolies, M. N., et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16), 5879–5883.
- Hutchison, C. A., Phillips, S., Edgell, M. H., Gillam, S., Jahnke, P., & Smith, M. (1978). Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *The Journal of biological chemistry*, 253(18), 6551–6560.
- Irving, R. A., Kortt, A. A., & Hudson, P. J. (1996). Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering*, 2(2), 127–143.
- Johnson, K. S., & Hawkins, R. E. (1996). Affinity maturation of antibodies using phage display. In J. MacCafferty (Ed.), *A Practical approach series: Vol. 169. Antibody engineering. A practical approach*. Oxford: IRL Press.
- Kabat, E. A., & Wu, T. T. (1991). Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *Journal of Immunology*, 147(5), 1709–1719.
- Kehoe, J. W., & Kay, B. K. (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chemical reviews*, 105(11), 4056–4072.
- Kehoe, J. W., Velappan, N., Walbolt, M., Rasmussen, J., King, D., & Lou, J., et al. (2006). Using phage display to select antibodies recognizing post-translational modifications independently of sequence context. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(12), 2350–2363.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., & Wellnhofer, G., et al. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of molecular biology*, 296(1), 57–86.
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495–497.

- Kramer, K. (2002). Evolutionary affinity and selectivity optimization of a pesticide-selective antibody utilizing a hapten-selective immunoglobulin repertoire. *Environmental science & technology*, 36(22), 4892–4898.
- Krska, R., & Molinelli, A. (2009). Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(1), 67–71.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: an update. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 25(2), 152–163.
- Lauer, B., Otteleben, I., Jacobsen, H.-J., & Reinard, T. (2005). Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 899–904.
- Lee, C. V., Hymowitz, S. G., Wallweber, H. J., Gordon, N. C., Billeci, K. L., & Tsai, S.-P., et al. (2006a). Synthetic anti-BR3 antibodies that mimic BAFF binding and target both human and murine B cells. *Blood*, 108(9), 3103–3111.
- Lee, M., Lloyd, P., Zhang, X., Schallhorn, J. M., Sugimoto, K., & Leach, A. G., et al. (2006b). Shapes of antibody binding sites: qualitative and quantitative analyses based on a geomorphic classification scheme. *The Journal of organic chemistry*, 71(14), 5082–5092.
- Li, B., Zhao, H., Liu, Q., Murali, R., Greene, M. I., & Zhang, H. (2002). Deoxycholate-based Method to screen phage display clones for uninterrupted open reading frames. *Biotechniques*, 33(2), 294–296.
- Lin, H., & Cornish, V. W. (2002). Screening and selection methods for large-scale analysis of protein function. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 41(23), 4402–4425.
- Lin-Goerke, J. L., Robbins, D. J., & Burczak, J. D. (1997). PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. *BioTechniques*, 23(3), 409–412.
- Lipovsek, D., & Plückthun, A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *Journal of immunological methods*, 290(1-2), 51–67.
- Lippow, S. M., Wittrup, K. Dane, & Tidor, B. (2007). Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation. *Nature biotechnology*, 25(10), 1171–1176.
- Low, N. M., Holliger, P. H., & Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *Journal of molecular biology*, 260(3), 359–368.
- MacCallum, R. M., Martin, A. C., & Thornton, J. M. (1996). Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *Journal of molecular biology*, 262(5), 732–745.
- Marini, F., Naeem, A., & Lapeyre, J. N. (1993). An efficient 1-tube PCR method for internal site-directed mutagenesis of large amplified molecules. *Nucleic acids research*, 21(9), 2277–2278.
- Marks, J. D. (2004). Monoclonal Antibodies from Display Libraries. In T. Honjo (Ed.), *Molecular biology of B cells* (pp. 511–531). Amsterdam: Elsevier.

- Marks, J. D., Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Clackson, T. P., Bye, J. M., & Winter, G. (1992). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 10(7), 779–783.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., & Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular biology*, 222(3), 581–597.
- Miller, J. H. (1998). Mutators in *Escherichia coli*. *Mutation research*, 409(3), 99–106.
- Mills, D. R., Peterson, R. L., & Spiegelman, S. (1967). An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(1), 217–224.
- Miyazaki, C., Iba, Y., Yamada, Y., Takahashi, H., Sawada, J., & Kurosawa, Y. (1999). Changes in the specificity of antibodies by site-specific mutagenesis followed by random mutagenesis. *Protein engineering*, 12(5), 407–415.
- Moghaddam, A., Løbersli, I., Gebhardt, K., Braunagel, M., & Marvik, O. J. (2001). Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries. *Journal of immunological methods*, 254(1-2), 169–181.
- Moghaddam, A., Borgen, T., Stacy, J., Kausmally, L., Simonsen, B., & Marvik, O. J., et al. (2003). Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *Journal of immunological methods*, 280(1-2), 139–155.
- Moore, G. L., & Maranas, C. D. (2000). Modeling DNA mutation and recombination for directed evolution experiments. *Journal of theoretical biology*, 205(3), 483–503.
- Murata, T., Fushinobu, S., Nakajima, M., Asami, O., Sassa, T., & Wakagi, T., et al. (2002). Crystal structure of the liganded anti-gibberellin A(4) antibody 4-B8(8)/E9 Fab fragment. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), 489–496.
- Neubauer, R. H., Goldstein, L., Rabin, H., & Stebbing, N. (1985). Stimulation of in vitro immunoglobulin production by interferon-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 134(1), 299–304.
- Neylon, C. (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic acids research*, 32(4), 1448–1459.
- Nielsen, U. B., & Marks, J. D. (2001). Affinity Maturation by chain shuffling and Site Directed Mutagenesis. In R. Kontermann & S. Dübel (Eds.), *Springer lab manual: . Antibody engineering* (pp. 515–539). Berlin: SPRINGER.
- Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol.*, 31(3), 169–217.
- Parmley, S. F., & Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 73(2), 305–318.
- Patrick, W. M., Firth, A. E., & Blackburn, J. M. (2003). User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein engineering*, 16(6), 451–457.
- Paul, W. E (2003). *Fundamental immunology* (5th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins.

- Pavoni, E., Flego, M., Dupuis, M. Luisa, Barca, S., Petronzelli, F., & Anastasi, A. Maria, et al. (2006). Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC cancer*, 6, 41.
- Pepper, L. R., Cho, Y. Ku, Boder, E. T., & Shusta, E. V. (2008). A decade of yeast surface display technology: where are we now? *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 11(2), 127–134.
- Peraica, M., Domijan, A.-M., & Sarić, M. (2008). Mycotoxic and aristolochic acid theories of the development of endemic nephropathy. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 59(1), 59–65, from doi:10.2478/10004-1254-59-2008-1865.
- Persson, H., Lantto, J., & Ohlin, M. (2006). A focused antibody library for improved hapten recognition. *Journal of molecular biology*, 357(2), 607–620.
- Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.-P., Bec, N., & Larroque, C., et al. (2007). A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC biotechnology*, 7, 81.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., & Neri, P., et al. (1998). Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), 21769–21776.
- Plückthun, A., & Skerra, A. (1989). Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*, 178, 497–515.
- Rajpal, A., Beyaz, N., Haber, L., Cappuccilli, G., Yee, H., & Bhatt, R. R., et al. (2005). A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8466–8471.
- Riechmann, L., Foote, J., & Winter, G. (1988). Expression of an antibody Fv fragment in myeloma cells. *Journal of molecular biology*, 203(3), 825–828.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., & Dübel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature biotechnology*, 19(1), 75–78.
- Sarkar, G., & Sommer, S. S. (1990). The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques*, 8(4), 404–407.
- Schier, R., Balint, R. F., McCall, A., Apell, G., Larrick, J. W., & Marks, J. D. (1996). Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene*, 169(2), 147–155.
- Sforza, S., Dall'asta, C., & Marchelli, R. (2004). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 25(1), 54–76.
- Sheedy, C., MacKenzie, C. Roger, & Hall, J. Christopher (2007). Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnology advances*, 25(4), 333–352.
- Short, M. K., Jeffrey, P. D., Kwong, R. F., & Margolies, M. N. (1995). Contribution of antibody heavy chain CDR1 to digoxin binding analyzed by random mutagenesis of phage-displayed Fab 26-10. *The Journal of biological chemistry*, 270(48), 28541–28550.
- Sletta, H., Tøndervik, A., Hakvåg, S., Aune, T. E. Vee, Nedal, A., & Aune, R., et al. (2007). The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimu-

- lation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 906–912.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–1317.
- Stemmer, W. P., & Morris, S. K. (1992). Enzymatic inverse PCR: a restriction site independent, single-fragment method for high-efficiency, site-directed mutagenesis. *BioTechniques*, 13(2), 214–220.
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., & Urbaniczky, C. (1991). Quantitative determination of surface concentration with surface plasmon resonance using radio-labelled proteins. *J. Coll. Interface Sci.*, 143, 513–526.
- Stockmann-Juvala, H., & Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & experimental toxicology*, 27(11), 799–809.
- Strachan, G., McElhiney, J., Drever, M. R., McIntosh, F., Lawton, L. A., & Porter, A. J. R. (2002). Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-synthetic antibody phage display libraries expressed in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 210(2), 257–261.
- Thalmann (1989). Bedingungen für die Bildung von Mykotoxinen in Futtermitteln. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, (96), 341–343.
- Thanassi, D. G., & Hultgren, S. J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current opinion in cell biology*, 12(4), 420–430.
- Tindall, K. R., & Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 27(16), 6008–6013.
- Torreri, P., Ceccarini, M., Macioce, P., & Petrucci, T. C. (2005). Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 41(4), 437–441.
- Tur, M. K., Huhn, M., Sasse, S., Engert, A., & Barth, S. (2001). Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *BioTechniques*, 30(2), 404–413.
- Valjakka, J., Hemminki, A., Niemi, S., Söderlund, H., Takkinen, K., & Rouvinen, J. (2002). Crystal structure of an in vitro affinity- and specificity-matured anti-testosterone Fab in complex with testosterone. Improved affinity results from small structural changes within the variable domains. *The Journal of biological chemistry*, 277(46), 44021–44027.
- Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L., & Denolf, P. (2005). Reducing mutational bias in random protein libraries. *Analytical biochemistry*, 339(1), 9–14.
- Vartanian, J. P., Henry, M., & Wain-Hobson, S. (1996). Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic acids research*, 24(14), 2627–2631.
- 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 Enzymol.*, (326), 480–505.

- Voigt, C. A., Kauffman, S., & Wang, Z. G. (2000). Rational evolutionary design: the theory of in vitro protein evolution. *Advances in protein chemistry*, 55, 79–160.
- Wälchli, S., Espanel, X., Harrenga, A., Rossi, M., Cesareni, G., & van Hooft Huijsduijnen, R. (2004). Probing protein-tyrosine phosphatase substrate specificity using a phosphotyrosine-containing phage library. *The Journal of biological chemistry*, 279(1), 311–318.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., & Bauer, J. C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151(1-2), 119–123.
- Wong, T. Seng, Roccatano, D., Zacharias, M., & Schwaneberg, U. (2006a). A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *Journal of molecular biology*, 355(4), 858–871.
- Wong, T. Seng, Zhurina, D., & Schwaneberg, U. (2006b). The diversity challenge in directed protein evolution. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 9(4), 271–288.
- Wörn, A., & Plückthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of molecular biology*, 305(5), 989–1010.
- Yonezawa, M., Doi, N., Kawahashi, Y., Higashinakagawa, T., & Yanagawa, H. (2003). DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries. *Nucleic acids research*, 31(19), e118.
- Yuan, B., Schulz, P., Liu, R., & Sierks, M. R. (2006). Improved affinity selection using phage display technology and off-rate based selection. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(2).
- Zaccolo, M., & Gherardi, E. (1999). The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *Journal of molecular biology*, 285(2), 775–783.

Anhang

Proteinsequenzen

scFv BFB1-2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYQFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVPLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTIITGAQAEDEADYYCNSSR
STRTPVVFVGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-E37

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYQFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVPLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTIITGAQAEDEADYYCNSSR
STRTPVVFVGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-E54

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYQFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVAMGQT
VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVPLVIYGKNNRPSGVPDRFSGSSSGNTASLTIITGAQAEDEADYYCNSSR
STRTPVVFVGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-H27

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYRFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVPLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTIITGAQAEDEADYYCNSSR
STRTPVVFVGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-H78

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYRFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDLSLTYASWYQQKPGQAPVPLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTIITGAQAEDEADYYCNSSR
STRTPVVFVGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-L4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKSAVSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYQFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQVEDEADYYCNSR
STRTPVVFGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-L64

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYQFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCHGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSR
STRTPVVFGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-M7

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYQFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQVEDEADYYCNSR
STRTPVVFGGGTKLTVLGAAA

scFv BFB1-2-M69

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSSAMSWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYQFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSR
STRTPVVFGGGTKLTVLGAAA

Danksagung

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Huchzermeyer für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. T. Reinard möchte ich für die Betreuung der Arbeit, seine immerwährende Hilfsbereitschaft und seinen schier unerschöpflichen Ideenreichtum danken.

Ich danke Frau Dr. Wiebke Rathje für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Allen Mitgliedern des Instituts für Pflanzengenetik danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung, insbesondere den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Biochemie: Sandra Schmakeit, Elisa Derboven, Judith Wienstroer, Phillip Wolff, Patrick Lamm, Kristin Nieger, Hauke Niekamp und Alex Proges.

Dr. André Frenzel danke ich für die zu jeder Zeit gegebenen Auskünfte, Maren Wichmann danke ich für ihren unerschütterlichen Optimismus und ihre Hilfsbereitschaft und Dr. Noel Ferro Diaz danke ich für seine Geduld und seine Hilfsbereitschaft bei allen Fragen, die SPR betreffend.

Zu guter letzt geht mein besonderer Dank an meinen Eltern Klaus-Dieter und Erika Klee, ohne die ich diese Arbeit niemals bis zu Ende hätte durchführen können und die mich immer bedingungslos unterstützt haben, an meine Geschwister Anna und Jan und an meine Freunde.

Lebenslauf

Lebensdaten

Name Katharina Klee

Geburtsdatum 25.07.1979

Geburtsort Lehrte

Schulausbildung

1986 bis 1990 Grundschule Burgdorf

1990 bis 1992 Orientierungsstufe Burgdorf

1992 bis 1999 Gymnasium Burgdorf

Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

1999 bis 2001 Studiengang Biologie an der Universität Hannover, vorläufiger Abschluss: Vordiplom

2001 bis 2002 Studiengang B.Sc. Life Science – Cells and Molecules der Universität Hannover, der auf einem Vordiplom in Biologie oder Chemie aufbaut, Abschluss: Bachelor of Science

2002 bis 2004 Studiengang M.Sc. Life Science – Cells and Molecules der Universität Hannover, Masterarbeit am Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover

Abschluss: Master of Science

2005 bis 12/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Pflanzenbiotechnologie, Universität Hannover

Seit 01/2006 Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Pflanzengenetik, Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Mutagenesestrategien zur Affinitätsreifung rekombinanter Hapten-spezifischer Antikörper“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den xx.xx.2009

(Katharina Klee)