

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin

Biochemie – Immuntechnologie

**Immuntechnologisches Verfahren zum Aufbau
homogener Immunoassays sowie zur Selektion
Antikörper produzierender Zellen**

Dipl.-Biochem. Frank Sellrie

geb. am 14.4.1969 in Berlin

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Potsdam

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1598/>
[urn:nbn:de:kobv:517-opus-15982](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-15982)
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-15982>]

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Abkürzungsverzeichnis	6
3. Grundlagen	8
3.1. Homogene Immunoassays	8
3.1.1. Agglutination von Partikeln	9
3.1.2. Fluoreszenz – Markierungen	11
3.1.2.1. Fluoreszenz Polarisations Immunoassay (FPIA)	11
3.1.2.2. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)	13
3.1.2.3. Fluoreszenz – Löschung	14
3.1.3. Enzyme – Immunoassays	16
3.1.3.1. Modulation der Enzymaktivität mittels Antikörperbindung <i>Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)</i>	16
3.1.3.2. <i>Enzyme Channeling</i>	18
3.1.3.3. Modulation der Enzymaktivität durch Effektormoleküle	19
3.1.4. Elektroaktive Markierungen	22
3.1.5. <i>Oxygen Channeling Immunoassay</i>	23
3.2. Produktion und immundiagnostischer Einsatz von Antikörpern	25
3.2.1. Monoklonale Antikörper	26
3.2.2. Bispezifische Antikörper	28
3.2.3. Rekombinante Antikörper	30
3.3.4. Rekombinante bispezifische Antikörper	33
4. Zielstellung	36
4.1. Klonierung bispezifischer rekombinanter Antikörper	36
4.2. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels <i>Substrate Channeling</i>	38
4.2.1. <i>Substrate Channeling</i> mittels etablierter Immunoassay-Techniken	40
4.2.2. <i>Substrate Channeling</i> mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper	42
4.3. Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels <i>Fluorescence Quenching</i>	44
4.4. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten	46

5. Material und Methoden	48
5.1. Klonierung rekombinanter Antikörperfragmente (scFv) aus Hybridomen	50
5.2. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels <i>Substrate Channeling</i>	55
5.2.1. <i>Substrate Channeling</i> mittels etablierter Immunoassay-Techniken	55
5.2.2. <i>Substrate Channeling</i> mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper	57
5.3. Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein	58
5.4. Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels <i>Fluorescence Quenching</i>	59
5.5. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten	60
6. Ergebnisse	64
6.1 Klonierung bispezifischer rekombinanter Antikörper	64
6.2. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels <i>Substrate Channeling</i>	67
6.2.1. <i>Substrate Channeling</i> mittels etablierter Immunoassay-Techniken	67
6.2.1.1. <i>Substrate Channeling Immunoassay</i> zur Konzentrationsbestimmung des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1	67
6.2.1.2. <i>Substrate Channeling Immunoassay</i> zur Konzentrationsbestimmung des Haptens Fluorescein	68
6.2.1.3. Versuche zur Optimierung des Substrate Channeling Systems	69
6.2.2. <i>Substrate Channeling</i> mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper	71
6.2.3. Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein	72
6.3. Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels <i>Fluorescence Quenching</i>	74
6.4. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten	76
7. Diskussion	81
7.1. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels <i>Substrate Channeling</i>	81
7.1.1. <i>Substrate Channeling</i> mittels bispezifischer rekombinanter Antikörperfragmente	81
7.1.2. <i>Substrate Channeling</i> mittels etablierter Immunoassay-Techniken	83
7.1.3. <i>Substrate Channeling</i> mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper	86
7.1.4. Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein	87
7.2. Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels <i>Fluorescence Quenching</i>	88
7.3. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten	91
8. Literaturverzeichnis	96

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich in ihren ersten beiden Teilen mit dem Aufbau homogener Immunoassays. Im dritten und abschließenden Teil wird ein Verfahren zur Selektion Antikörper produzierender Zellen vorgestellt.

Homogene Immunoassays sind immunologische Testverfahren, zu deren Durchführung keine Separations bzw. Waschschriffe notwendig sind. Es werden lediglich die den Analyten enthaltende Meßprobe und das Meßsystem miteinander vereint. Die Messung, eines sich in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten ändernden physikalischen Parameters, erfolgt im Anschluß.

Die Entwicklung der beiden hier beschriebenen homogenen Immunoassays erfolgte unter Ausnutzung zweier grundsätzlich unterschiedlicher Testprinzipien.

Der *Substrate Channeling* Immunoassay beruht auf der Weitergabe eines Substrats in einem immunologischen Komplex aus zwei Enzymen. Das Produkt des ersten Enzyms dient dem zweiten Enzym als Substrat zur Generierung eines photometrisch nachweisbaren Produkts. Voraussetzung für diese Weitergabe ist die enge räumliche Nähe beider Enzyme. Diese Nähe wird durch eine Bindung zwischen Analyt und anti-Analyt Antikörper vermittelt.

Ein solcher *Substrate Channeling* Immunoassay wurde unter Verwendung der Enzyme Glucoseoxidase und Peroxidase aufgebaut. Ziel der Arbeiten war es, die für das *Substrate Channeling* notwendige räumliche Nähe durch rekombinante bispezifische Antikörper herzustellen. Hierzu wurden rekombinante, beide Enzyme bindende Antikörperfragmente (scFv) kloniert und erfolgreich exprimiert. Die erste Überprüfung des Systems auf seine Eignung als homogener Assay erfolgte jedoch nicht unter Verwendung eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers. Vielmehr wurde hierfür auf etablierte Immunoassay Techniken zurückgegriffen. Das so etablierte System war funktionstüchtig, jedoch blieb seine Sensitivität weit hinter der normaler, heterogener Immunoassays zurück. Eine Überführung des Systems in eine praxisnahe, diagnostische Anwendung war damit ausgeschlossen. Auch die Vermittlung der räumlichen Nähe im Immunkomplex durch einen monoklonalen bispezifischen Antikörper führte zu keiner Verbesserung der Sensitivität. Die Ergebnisse dieser Experimente begründeten die Aufgabe dieses Ansatzes.

Der zweite bearbeitete homogene Immunoassay beruhte auf Fluoreszenz-Löschung. Grundlage eines solchen *Fluorescence Quenching* Immunoassays ist der gegenseitige Ausschluß zweier Antikörper bei der Bindung eines Dihapten-Konjugats. Das Konjugat besteht dabei aus dem Analyten und einem Fluorophor. Die beiden um die Konjugatbindung konkurrierenden Antikörper sind ein anti-Analyt Antikörper und ein anti-Fluorophor Antikörper, der zudem über die Eigenschaft verfügt, bei Bindung des Fluorophors dessen Fluoreszenz zu löschen. Im System stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein, dessen Lage von außen leicht spektroskopisch bestimmt werden kann. Externe Gaben des freien Analyten verschieben dieses Gleichgewicht in Richtung Fluorophor-Bindung und damit Fluoreszenz-Löschung. Die Änderung der Fluoreszenz ist direkt an die Konzentration des freien Analyten gekoppelt und dient zu dessen Bestimmung.

Ein solcher *Fluorescence Quenching* Immunoassays wurde für die Konzentrationsbestimmung des Herbizides Diuron etabliert. Mit diesen Experimenten konnte erstmalig gezeigt werden, daß unter Verwendung geeigneter, hochaffiner, monoklonaler Antikörper Sensitivitäten wie von etablierten heterogenen Immunoassays (ELISA) zu erreichen sind. Damit wird eine diagnostische Anwendung des Systems möglich.

Der dritte und abschließende Teil der Arbeit diente der Entwicklung eines Verfahrens zur Selektion Antikörper produzierender Zellen. Die Generierung Antikörper produzierender Zellen ist gegenwärtig auf aufwendige *Screening* Methoden angewiesen. Das Auffinden des gewünschten Zellklons ist daher mit einem erheblichen Arbeits-, Zeit- und Materialaufwand verbunden und deshalb sehr kostenintensiv. Der Ersatz dieser Verfahren durch eine einfache Selektion ist somit von erheblicher fachlicher wie ökonomischer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solches gänzlich neuartiges Selektionsverfahren entwickelt. Die Selektion der Antikörper produzierenden Zellen erfolgt hierbei unter Verwendung eines Toxinkonjugats. Dieses Konjugat besteht aus einem Liganden und einem Toxin. Die Antikörperbindung des Liganden behindert sterisch die Wechselwirkung der Toxinkomponente im Konjugat mit deren Zielstruktur in oder auf der Zelle. Nur Zellen die einen geeigneten Antikörper sezernieren, überleben die Selektion und reichern sich somit in der Kultur an.

Das Selektionsverfahren wurde erfolgreich für die Selektion von *E.coli* Zellen eingesetzt, die einen rekombinanten, Fluorescein bindenden Antikörper produzierten. Das hierfür synthetisierte Toxinkonjugat bestand aus Fluorescein (Ligand) und Ampicillin (Toxinkomponente). Die Anreicherung erfolgte aus einem Gemisch in dem der gesuchte Klon nur in einem Mischungsverhältnis von 1:1000 enthalten war.

2. Abkürzungsverzeichnis

ARIS	<i>apoenzyme reactivation immunoassay system</i>
Biotinillin	Toxinkonjugat aus Biotin und Ampicillin
BSA	Rinderserumalbumin – <i>bovine serum albumine</i>
CEA	carcinoembryonales Antigen
CEDIA	<i>cloned enzyme donor immunoassay</i>
CDR	<i>complementary determining region</i>
Diuron	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
ECL	Elektrochemilumineszenz Immunoassays
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbant assay</i>
EMIT	<i>Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FETI	Fluoreszenz Energie Transfer Immunoassay
FITCillin	Toxinkonjugat aus Fluorescein (FITC) und Ampicillin
FR	<i>framework</i> Region in Antigenbindungsstelle eines Antikörpers
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FPIA	Fluoreszenz Polarisations Immunoassay
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GOD	Glucoseoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
hPL	<i>humane placental lactogen</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid
KÜ	Kulturüberstand einer Zellkultur
<i>lacP</i>	Promotor des <i>lac</i> -Operons
LOCI	<i>Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay</i>
Monuron	3-(4-Chlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
OD	optische Dichte

OS	osmotische Schock Fraktion der scFv Fermentation
OPD	Ortho-Phenyldiamin
PBP	Penicillin bindende Proteine
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
POD	Peroxidase
PP	periplasmatische Fraktion der scFv Fermentation
TRF	<i>time-resolved fluorescence</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
scFv	Einketten-Antikörper-Fragment
SLFIA	<i>Substrate-linked Fluorescence Immunoassays</i>
V _L	variable Domäne der schweren Kette des Antikörpers
V _H	variable Domäne der leichten Kette des Antikörpers

3. Grundlagen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in seinen ersten beiden Teilen mit dem Aufbau homogener Immunoassays. Eine Vielzahl derartiger Systeme wurde bereits entwickelt. Die Grundprinzipien der wichtigsten Vertreter werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Im dritten und abschließenden Teil wird ein gänzlich neuartiges Verfahren zur Selektion Antikörper produzierender Zellen vorgestellt. Im einleitenden Abschnitt wird hierzu auf die grundlegenden Prinzipien zur Produktion sowie zum immundiagnostischen Einsatz von Antikörpern eingegangen.

3.1 Homogene Immunoassays

Immunoassays zur Konzentrationsbestimmung von Antigenen werden nach Art ihres Aufbaus in zwei Gruppen eingeteilt. Die bisher für praktische Anwendungen bedeutsamere der beiden Gruppen ist die der heterogenen Immunoassays. Für diese sind Separationsschritte (Waschschritte) im Anschluß an die Antigenbindung charakteristisch. Ein homogener Immunoassay erfordert keine derartigen Separationsschritte. Es werden lediglich Probe und immunchemische Komponenten vereinigt. Der immunchemische Bindungsprozeß führt zu einem physikalisch nachweisbaren Signal, das eine Separation überflüssig macht.

Homogene Immunoassays besitzen im Vergleich zum heterogenen System einige Vorteile. Die Bindungsreaktion, in deren Folge das Meßsignal generiert wird, erfolgt in Lösung und ist nicht, wie in heterogenen Systemen, abhängig von relativ langsamen Diffusionsvorgängen an einer Oberfläche. Dies führt zu einer Reduktion der notwendigen Inkubationszeiten. In der Regel sind nur wenige Sekunden bis Minuten notwendig. Zudem erleichtern die separationsfreien Protokolle homogener Immunoassays deren Automatisierung, was insbesondere für *high throughput screening*-Anwendungen (HTS) von großem Interesse ist. Zumindest theoretisch sollten homogene Systeme auch sensitiver sein. Die im heterogenen System notwendigen Separationsschritte führen zur Auflösung von schwachen Bindungen zwischen Antigen und Antikörper. Die Folge sind Sensitivitätsverluste. Zudem macht die Vielzahl der notwendigen Separationsschritte das heterogene System prinzipiell anfälliger für Störungen und Handhabungsfehler.

Alle aufgeführten Vorteile der homogenen Immunoassays werden jedoch in der Praxis überlagert von einem gravierenden Nachteil. Da Separationsschritte unterbleiben, verbleiben alle Reaktionsteilnehmer im Ansatz, was zu Wechselwirkungen von Bestandteilen der Probe mit den immunchemischen Komponenten und damit zu Sensitivitätsverlusten führt. Die auftretenden Sensitivitätsverluste sind die direkte Folge der Zusammensetzung jeder

individuellen Meßprobe, unabhängig vom eigentlich nachzuweisenden Analyten. Sie sind somit im Routineeinsatz kaum oder nur schwer zu handhaben. Erst in den letzten Jahren ist es gelungen Methoden zu entwickeln, die diese Matrixeffekte verringern und die damit Sensitivitäten vergleichbar denen heterogener Immunoassays erreichen.

Eine Vielzahl der unterschiedlichsten Prinzipien wurden zum Aufbau homogener Immunoassays herangezogen. Die gebräuchlichste Art der Zusammenstellung dieser Tests ist die Unterscheidung nach Art der für die Generierung des Meßsignals herangezogenen Markierungen bzw. Komponenten. In der folgenden Zusammenstellung sollen nur die hochsensitiven homogenen Immunoassays erwähnt werden.

3.1.1 Agglutination von Partikeln

Einer der ersten hochsensitiven Antigennachweise überhaupt war zugleich auch ein homogenes System. Meyer (1922) verwendete Schafererythrozyten, die mit humanen Antikörpern markiert waren sowie als Analyten Antikörper aus dem Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die aus dem Patientenserum stammenden Antikörper banden ihr Antigen, die humanen Antikörper, auf der Oberfläche der Erythrozyten. Die Mischung beider Komponenten resultierte in einem sichtbaren Verklumpen der Zellen. Diese Methode wurde als Hämagglutinationstest beschrieben. In der weiteren Entwicklung wurden die Erythrozyten durch die leichter zu handhabenden Latexpartikel ersetzt (Singer und Plotz, 1956). Diese visuellen Methoden sind von durchschnittlicher Sensitivität. Quantitative Messungen in den auf Agglutination beruhenden Immunoassays erfolgen mittels Turbidimetrie oder Nephelometrie. Turbidimetrie bestimmt dabei die Intensität eines Lichtstrahles nach Passage durch die Probe. Nephelometrie mißt das in einem bestimmten Winkel vom Meßstrahl gestreute Licht. Die Nephelometrie ist sensitiver jedoch auch anfälliger für partikuläre Substanzen in der Meßprobe. Diese Schwierigkeiten können teilweise durch verbesserte Meßmethoden (Masson et al., 1981) bzw. durch den Einsatz der Laser-Nephelometry (Von Schulthess et al., 1976) überwunden werden. Neben Latexpartikeln werden auch kolloidale Goldpartikel in Agglutinationstests eingesetzt. Derartige Komplexe ändern mit der Größe ihre Farbe, was eine photometrische Messung ermöglicht. Mit einem Assay dieser Art war es möglich eine Konzentration von 5,4 pmol/L (108 pg/ml) hPL (*human placental lactogen*) nachzuweisen (Leuverring et al., 1980).

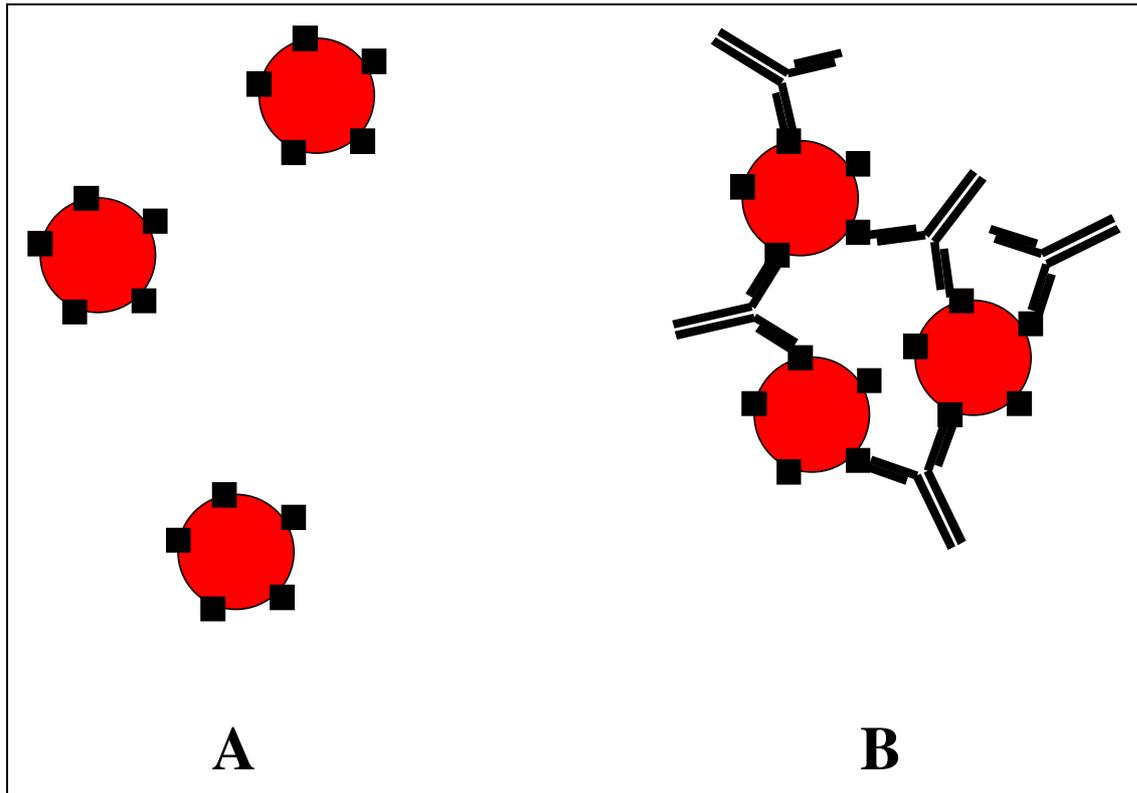


Abb. 3-1: Schematische Darstellung eines auf Agglutination von Partikeln beruhenden **homogenen Immunoassays**. Zur Durchführung des Assays werden mit Antigen beschichtete Partikel (Erythrozyten, Latex-Partikel) eingesetzt (**A**). Diese Partikel agglutinieren nach Bindung des Antikörpers an das Antigen (**B**). Die Agglutination wird meßtechnisch verfolgt und zur Konzentrationsbestimmung des Antikörpers herangezogen.

Anmerkung: Der dargestellte Agglutinationstest dient dem Nachweis eines Antikörpers. In Umkehrung dieses Prinzips ist es ebenso möglich das Antigen mit Hilfe Antikörper beschichteter Partikel nachzuweisen.

3.1.2 Fluoreszenz – Markierungen

3.1.2.1 Fluoreszenz Polarisations Immunoassay (FPIA)

Der Effekt der Fluoreszenzpolarisation wurde zum Aufbau homogener Immunoassays eingesetzt. Moleküle absorbieren Licht als eine Funktion ihrer Orientierung relativ zur Richtung und Polarisation des anregenden Lichtes. Das Licht, das als Fluoreszenz vom angeregten Molekül emittiert wird, ist gewöhnlich polarisiert. Die Rotation des Moleküls zwischen Anregung und Emission reduziert die Polarisation des Lichtes (Dandliker et al., 1961, 1973).

Im Assay kommt ein niedermolekulares Konjugat aus Analyt und Fluorophor zum Einsatz. Die Bindung des anti-Analyt Antikörpers (Makromolekül) resultiert in einer verringerten Rotation des Komplexes. Damit einhergehend reduziert sich auch die Rotation des Fluorophors. Somit wird der Anteil des polarisierten Lichtes im Vergleich zur Emission des freien Analyt-Fluorophor Konjugats erhöht. Externe Gaben des Analyten, die als Meßprobe zugesetzt werden, reduzieren den Anteil gebundenen Konjugats, was wiederum die Emission polarisierten Lichtes verringert. Die gemessene Veränderung der Fluoreszenzpolarisation ist letztendlich ein Maß für die Masse des fluoreszierenden Moleküls oder Komplexes. Ein immunologischer Komplex großer Masse rotiert relativ langsam, was den Anteil polarisierten Lichtes erhöht.

Die Methode ist nur für niedermolekulare Analyten geeignet. Zum Einen hat das Molekulargewicht des Analyten einen direkten Einfluß auf dessen Rotation und die daraus resultierende Polarisationsabnahme, zum Anderen ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Fluorophors mit 10^{-9} bis 10^{-7} Sekunden zu kurz für die Rotation eines Makromoleküls. Für *Fluorescence Polarization Immunoassays* sind Nachweisgrenzen von bis zu 100 pmol/L beschrieben worden.

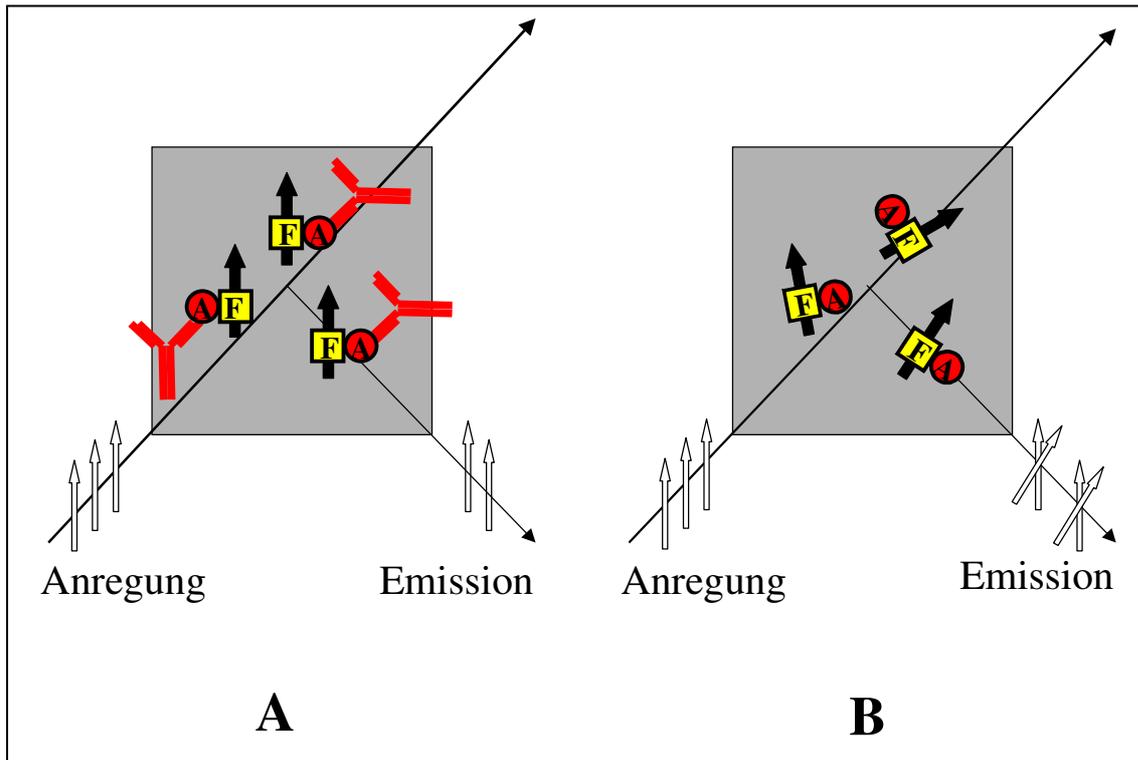


Abb. 3-2: Schematische Darstellung eines Fluoreszenz Polarisations Immunoassays (FPIA)
 Im Assay kommt ein Konjugat aus Fluorophor (F) und Antigen (A) zum Einsatz. Die Anregung des Fluorophors führt zu einer selektiven Absorption des Lichtes durch geeignet ausgerichtete Moleküle. Die Emission polarisierten Lichtes durch das Konjugat erfolgt, wenn die Rate der Rotation des Moleküls gering ist relativ zur Rate der Fluoreszenz-Emission. Die Bindung eines Antikörpers an sein Hapten-Antigen reduziert die Rotation des Moleküls und verstärkt damit die Emission polarisierten Lichtes (A). Unterbleibt die Bindung, so ist die Rotation verstärkt und somit die Emission polarisierten Lichtes reduziert (B).

3.1.2.2 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer beruht auf der Übertragung der Energie eines angeregten Donormoleküls auf ein in der Nähe befindliches Akzeptormolekül. Das Akzeptormolekül verfügt dabei über einen zur Emission des Donormoleküls energetisch kompatiblen Anregungszustand. Die Energie des angeregten Zustands eines oder beider Moleküle kann dabei als Fluoreszenz Emission abgegeben werden. Der Energietransfer ist dabei abhängig von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor sowie von der spektralen Überlappung der Donor-Emission und der Akzeptor-Absorption. Auf diesem Prinzip beruhende Immunoassays werden als Fluoreszenz Energie Transfer Immunoassays (FETI) bezeichnet (Ullman et al., 1976; Ullman und Khanna, 1981). Schwierigkeiten in diesen Systemen werden durch die Eigenfluoreszenz von Verunreinigungen der Probe sowie von direkt angeregten Akzeptormolekülen verursacht. Diese Probleme wurden durch den Einsatz fluoreszierender Chelate seltener Erden beseitigt, welche eine längere Fluoreszenzdauer in der Größenordnung von Millisekunden aufweisen. Deren Einsatz als Donormolekül ermöglichte die Einführung der zeitaufgelösten Messung (TRF *time-resolved fluorescence*) in die Fluorometry (Hemmila und Mikkala, 2001). Die Messungen erfolgen hierbei zeitaufgelöst in Anschluß an die Anregung des Donormoleküls mittels eines kurzen Laser-Pulses. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen kurzlebiger Hintergrund-Fluoreszenz und der auf Energietransfer beruhenden Fluoreszenz. Der Nachteil dieser Methode ist deren komplexe Meß- und Auswertetechnik. In Fluoreszenz Energie Transfer Immunoassays war es möglich, 10 pmol/L (300 pg/ml) hCG (*human chorionic gonadotropin*) in Serumproben nachzuweisen (Blomberg et al., 1999).

Fluoreszenz Energie Transfer Immunoassays gekoppelt mit TRF (*time-resolved fluorescence*) sind von wirtschaftlicher Bedeutung. Auf dieser Technik beruhende kommerzielle Nachweissysteme existieren von Wallac (DELFI-Produktlinie), CyberFluor (FiaGen, EALL-Assay) sowie CisBio (Brahms). Von besonderem Interesse sind sie für ein Hochdurchsatz-Screening (HTS, *highthroughput screening*) auf pharmakologisch wirksame Verbindungen. Entsprechende Produkte stellen das LANCE System von Wallac sowie die Cis Bio Kryptor Technologie von Brahms dar.

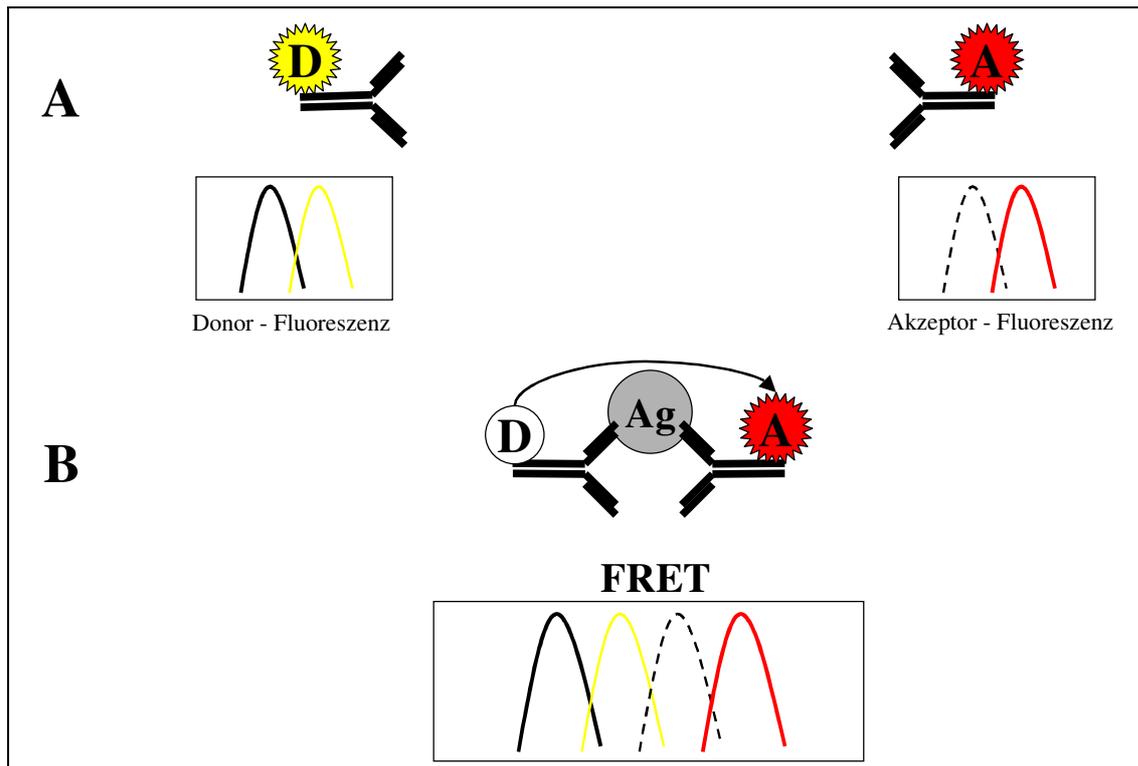


Abb. 3-3: Schematische Darstellung eines Fluoreszenz Energie Transfer Immunoassays (FETI). Es kommen zwei Fluoreszenz-Markierungen zum Einsatz, deren spektrale Bereiche der Emission (D - Donor-Molekül) und Anregung (A - Akzeptor-Molekül) überlappen (A). Ein Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) erfolgt bei räumlicher Nähe dieser Fluoreszenz-Markierungen. Dieser wird z.B. vermittelt durch Antikörperbindung an ein Antigen (Ag). Der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer resultiert in einer Abnahme der Donor-Fluoreszenz und Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz im Immunkomplex (B).

3.1.2.3 Fluoreszenz - Löschung

Eine weitere Möglichkeit, die Fluoreszenz eines Systems für analytische Zwecke zu modulieren, stellt die Löschung der Fluoreszenz (*fluorescence quenching*) durch Antikörperbindung des Fluorophors dar. Diese Systeme wurden als *Fluorescence Protection Immunoassay* oder *Fluorescence Quenching Assay* (Nargessi et al., 1979; Zuk et al., 1979; Ullman, 1981) beschrieben. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der sterischen Behinderung der gleichzeitigen Bindung zweier Antikörper an ein Konjugat, bestehend aus Fluorophor und Analyt. Sowohl der den Analyten bindende Antikörper als auch der das Fluorophor bindende

Antikörper konkurrieren dabei um die Bindung an das Konjugat. Die Lage des sich einstellenden Gleichgewichtes wird durch externe Gaben des freien Analyten gestört, welches einfach und direkt über die Fluoreszenz des Fluorophors bzw. dessen Löschung, infolge der Antikörperbindung, meßtechnisch verfolgt werden kann. Quenching Assays sind vorrangig für niedermolekulare Analyten geeignet. Assays zum Nachweis makromolekularer Analyten bedürfen bisher der Einführung weiterer sterischer Interaktionen, zumeist durch weitere Antikörper. Das System unterliegt im gleichen Maße Matrixeffekten wie für den Fluoreszenz Energie Transfer Immunoassay beschrieben, d.h. Bestandteile der Meßprobe verfälschen das Meßergebnis durch ihre Eigenfluoreszenz oder durch unspezifische Bindung und damit einhergehende Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors. Versuche zum Einsatz der Fluoreszenzlöschung in kommerziellen Anwendungen sind bisher nicht beschrieben. Dies überrascht insbesondere im Vergleich zum Fluoreszenz Energie Transfer Immunoassay, der einen viel größeren gerätetechnischen Aufwand bei vergleichbaren, systembedingten Schwierigkeiten benötigt. Die einzige beschriebene Anwendung betrifft eine nichtimmunologische Nutzung. Das System wurde dabei zum Screening auf Binder zellulärer Rezeptoren eingesetzt (Skar et al., 1982).

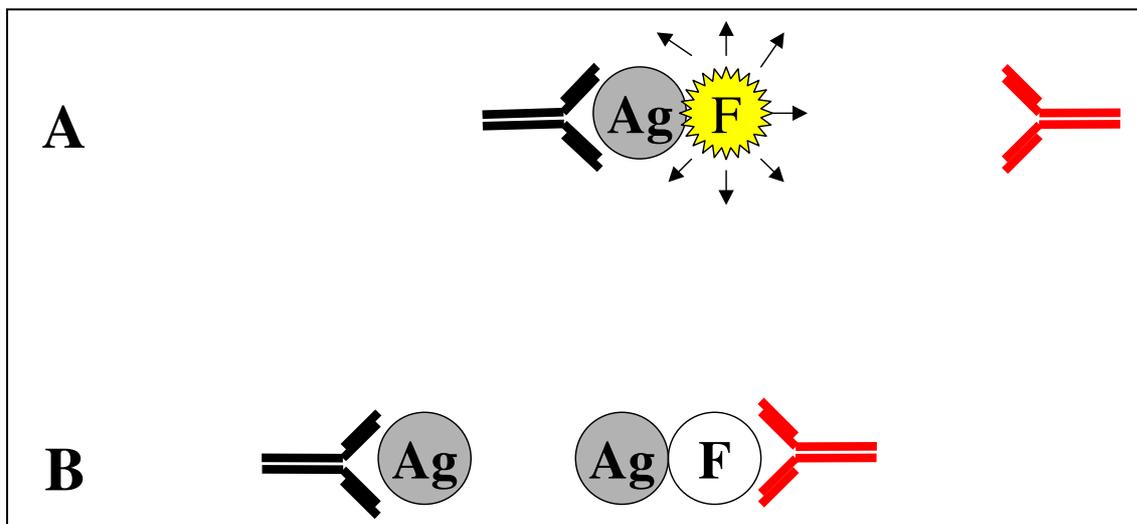


Abb. 3-4: Schematische Darstellung eines *Fluorescence Quenching Immunoassays*. Die Antigen-Bindung des anti-Analyt Antikörpers verhindert die Bindung des anti-Fluorophor Antikörpers an das Fluorophor im Antigen-Fluorophor-Konjugat und unterbindet somit eine Löschung der Fluoreszenz (A). Externe Gaben des freien Antigens (Ag) konkurrieren um die Bindung des anti-Analyt Antikörpers. Die Bindung des Fluorophors durch den anti-Fluorophor Antikörper wird dadurch möglich und dessen Fluoreszenz somit gelöscht (B).

3.1.3 Enzyme – Immunoassays

3.1.3.1 Modulation der Enzymaktivität mittels Antikörperbindung – *Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)*

Diese Methode basiert auf einer Verringerung der Enzymaktivität vermittelt durch Antikörperbindung an einen an die Enzymoberfläche gekoppelten Analyten. Die Verringerung der Enzymaktivität wird hierbei durch zwei Effekte verursacht. Die Bindung des Antikörpers kann zum Einen zur Blockierung des aktiven Zentrums des Enzyms führen, was sterisch dessen Zugänglichkeit für sein Substrat verringert. Ebenso kann eine Änderung der Konformation des Enzymmoleküls durch die Antikörperbindung verursacht werden, was zu dessen herabgesetzter Aktivität führt. Beide Prinzipien wurden für den Aufbau von Immunoassays herangezogen. Die sterische Behinderung des aktiven Zentrums ist am wahrscheinlichsten für Enzyme, die große Substratmoleküle umsetzen. Dieser Überlegung folgend wurde ein Immunoassay unter Verwendung von Lysozym aufgebaut (Rubenstein et al., 1972). Lysozym wird über die Antikörperbindung des an seine Oberfläche gekoppelten Analyten inhibiert. Externe Gaben des freien Analyten verdrängen den Antikörper aus seiner Bindung an den gekoppelten Analyten und führen zur schrittweisen Aktivierung des Lysozyms. Das nunmehr enzymatisch aktive Lysozym bewirkt die Lyse von Bakterienzellen im Meßansatz. Dies kann visuell über die Klärung der Trübung der Bakteriensuspension verfolgt werden. Der Assay ist nicht sehr sensitiv und zudem durch den Einsatz lebender Zellen ziemlich umständlich. Er ist ungeeignet für Serumproben, da diese durch in ihnen vorhandene, gegen Oberflächenantigene von Bakterien gerichtete, Antikörper eine Agglutination der Bakterienzellen verursachen bzw. da das im Serum vorhandene Komplement bereits eine Lyse der Bakterienzellen unabhängig vom Lysozym-Effekt bewirken kann.

Das zweite Prinzip der Antikörper induzierten Konformationsänderung wurde für das Enzym Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) aus dem Bakterium *Leuconostoc mesenteroides* demonstriert (Kimura et al., 2001). Die Dehydrogenase setzt dabei NAD zu NADH um. Diese Umsetzung kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden. Der Analyt wird für diese Assays über Lysin an die Enzymoberfläche gekoppelt. Nach Antikörperbindung an den Analyten, ist eine Reduktion der Enzymaktivität um bis zu achtzig Prozent zu beobachten. Je nach Art des Analyten und Bindungscharakteristik des eingesetzten Antikörpers unterscheidet sich der zur Erzielung des Effekts herangezogene Kopplungsort. Dies erfordert große Anstrengungen bei der Suche nach, für den speziellen Analyten, geeigneten Kopplungsmethoden sowie nach dem den

Effekt induzierenden Antikörper. Trotz dieser Schwierigkeiten sind Anwendungen dieser Technik für den Nachweis von Pharmaka in Serumproben sowie für den Nachweis von Drogen in Urinproben entwickelt worden. Die neueren Ansätze zum Einsatz von G6PDH in Assays betreffen die gentechnische Modifikation des Enzyms (Ullman, 1999). EMIT Assays unter Verwendung gentechnisch optimierter, rekombinanter G6PDH erreichen für den Nachweis für Substanzen wie Digoxin Nachweisgrenzen von 500 pmol/L (390 pg/ml).

Eine Reihe anderer Enzyme wie Phospholipase C, mitochondriale Malat Dehydrogenase und Dextrase wurden für den Aufbau ähnlicher Systeme verwendet. Aber die zum Aufbau dieser Assays verwendeten Komponenten waren entweder zu anfällig für Wechselwirkungen mit Serumkomponenten oder ungeeignet für Messungen in niedrigen Konzentrationsbereichen.

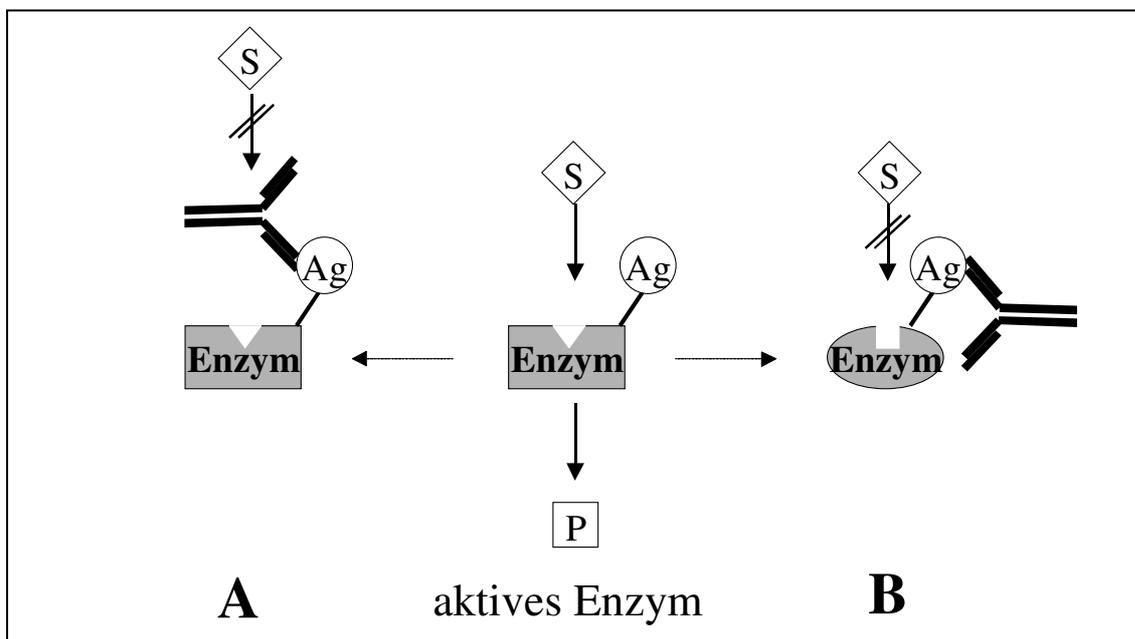


Abb. 3-5: Schematische Darstellung eines *Enzyme-Multiplied Immunoassay (EMIT)*

Die Darstellung zeigt im Zentrum das aktive Enzym, das sein Substrat (S) zum Produkt (P) umsetzt. Antikörper können die Aktivität eines Antigen (Ag) gekoppelten Enzyms inhibieren. Diese Inhibition erfolgt durch sterische Behinderung des Substratzuganges (A) oder durch Veränderung der Konformation des Enzyms in Folge der Antikörperbindung (B).

3.1.3.2 *Enzyme Channeling*

Für den Aufbau eines *Enzyme Channeling* bzw. *Substrate Channeling* Immunoassay wird die räumliche Nähe zweier Enzyme in einem Immunkomplex ausgenutzt. Im Ergebnis der vom ersten Enzym katalysierten Reaktion entsteht ein Produkt (Zwischensubstrat), welches zugleich Substrat des zweiten Enzyms ist. Dessen Umsetzung erfolgt zu einem spektrometrisch nachweisbaren Endprodukt. Diffundieren beide Enzyme frei in Lösung, so ist die Bildung des Endproduktes zunächst gering, beschleunigt sich jedoch mit zunehmender Konzentration des Zwischensubstrats. Sind beide Enzyme an einer Oberfläche immobilisiert, so ändern sich die kinetischen Verhältnisse (Mosbach und Mattiasson, 1970). Die lokale Konzentration des Zwischensubstrats ist abhängig von dessen Entstehungs- als auch Diffusionsrate. Die erreichte lokale Konzentration ist damit höher und wird schneller erreicht, als es für frei diffundierende Enzyme der Fall wäre. Die Lokalisation mehrere Enzymmoleküle (Produzenten des Zwischensubstrats) an einem Ort erhöht zudem die Konzentration des Zwischensubstrats, ohne gleichzeitig Einfluß auf die Diffusionsrate zu haben. Wird an diese Oberfläche nun das zweite Enzym (Produzent des Endproduktes) gebunden, so gelangt es dadurch in eine Umgebung mit einer relativ konstanten, erhöhten Konzentration des Zwischenproduktes. Dies führt zu einer schnellen und linearen Bildung des nachweisbaren Endproduktes.

Eine Vielzahl von Oberflächen fanden für den Aufbau von *Enzyme Channeling Immunoassays* Verwendung, darunter Partikel aus Agarose und Latex sowie die Polystyrol Oberflächen von Mikrotiterplatten.

Litman et al. (1980) etablierten einen Assay zum Nachweis humaner Antikörper unter Verwendung der Enzyme Hexokinase und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH). Weitere zum Aufbau des Systems herangezogene Enzympaare waren Glucoseoxidase/Peroxidase und Phosphatase/ β -Galactosidase. Für den Nachweis von Polyribose Phosphat (PRP) auf der Oberfläche von *Hemophilis influenzae* wurde in einem *Enzyme Channeling Assay* wurde eine Nachweisgrenze von 10 fmol/L PRP publiziert (Ullman et al., 1984).

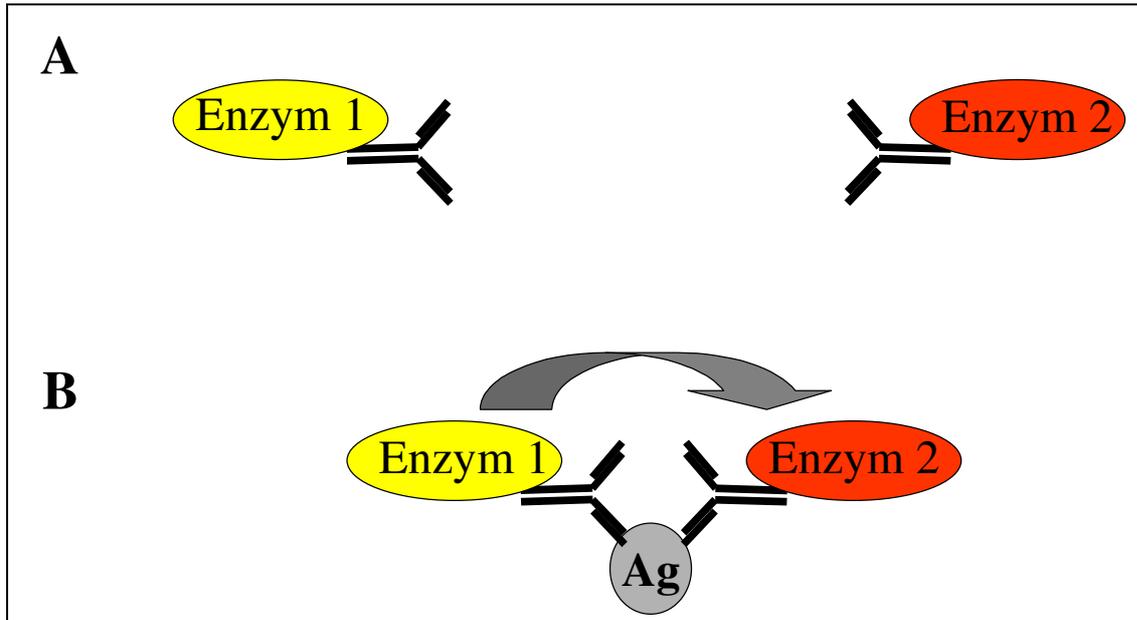


Abb. 3-6: Schematische Darstellung eines *Enzyme Channeling Immunoassays*. Zum Einsatz kommen Antikörperkonjugate zweier Enzyme (A). Das Produkt des ersten Enzyms ist gleichzeitig Substrat des zweiten Enzyms. Die Antigen (Ag) vermittelte räumliche Nähe beider Enzyme erhöht die Zugänglichkeit dieses Substrats für das zweite Enzym und damit die Bildung des Produktes durch das zweite Enzym (B). Die Entstehung dieses Produktes wird meßtechnisch verfolgt und zur Konzentrationsbestimmung des Antigens herangezogen.

3.1.3.3 Modulation der Enzymaktivität durch Effektormoleküle

Der Aufbau homogener Immunoassays ist auch mit Hilfe von Komponenten möglich, die mit dem zum Nachweis eingesetzten Enzym interagieren und auf diese Weise dessen Aktivität beeinflussen. Dafür kommen Substrate, Coenzyme und Inhibitoren von Enzymen in Frage sowie auch Enzymfragmente.

Substrate-linked Fluorescence Immunoassays (SLFIA) sind ein Beispiel für die erste Gruppe. Sie bestehen aus einem Konjugat des Enzymsubstrats und dem Analyten. Die Konjugation hat dabei keinen Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym. Erst die Antikörperbindung an den Analyten im Konjugat bewirkt, daß der Substratanteil auf Grund sterischer Behinderung nicht mehr für das Enzym zugänglich ist. Ein entsprechender Assay wurde unter Verwendung von Haptenkonjugaten von β -Galactosidylumbelliferon aufgebaut (Li et al., 1981). Das Substrat wird von β -Galactosidase zu einem fluoreszierenden Umbelliferon Produkt umgesetzt. Ein anderes System beruht auf einem ATP-Hapten Konjugat und Luciferase, deren Chemilumineszenz-Signal infolge Antikörperbindung

reduziert wird (Carrico et al., 1976). Die Methoden besitzen im Unterschied zu anderen Immunoassays nicht den Vorteil einer Signalverstärkung. Das heißt, die Anzahl der ein Meßsignal erzeugenden Moleküle kann niemals größer sein als die Anzahl der Moleküle des Analyten. Matrixeffekte, d.h. störende Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen der Meßprobe mit den immunchemischen Komponenten und Enzymen, erschweren eine Anwendung zusätzlich.

Systeme, die auf Konjugaten zwischen dem Analyten und einem Cofaktor des Enzyms beruhen, besitzen den Vorteil einer Signalverstärkung. Ein erfolgreiches Beispiel hierfür ist die Verwendung eines FAD-Analyt Konjugats, das sich mit einer inaktiven Apo-Glucoseoxidase zur enzymatisch aktiven Glucoseoxidase zusammenfügt (Morikawa et al., 1985). Die Antikörperbindung des Konjugats unterbindet hierbei die Aktivierung des Enzyms. Gaben des freien Analyten verdrängen den Antikörper vom Konjugat und stellen damit die Enzymaktivität wieder her. Das System wurde unter dem Namen ARIS (*apoenzyme reactivation immunoassay system*) kommerzialisiert.

In Analogie zu den Cofaktor Systemen wurden auch Konjugate von Enzym-Inhibitoren verwendet. Beispiele hierfür sind die Verwendung von Ethoxymethylphosphonothioat, einem irreversiblen Inhibitor der Acetylcholinesterase (Blecka et al., 1983), und Methotrexate, einem reversiblen Inhibitor der Dihydrofolate Reduktase (Place et al., 1983).

Die letzte in diesem Zusammenhang zu besprechende Gruppe von Assays ist die der *Complementation Immunoassays*. Einige Enzyme können in Fragmente zerlegt werden, die lediglich nach erneuter Assoziation zum kompletten Holoenzym enzymatisch aktiv werden. Antikörper können die Assoziation vermitteln oder inhibieren, was zum Assayaufbau ausgenutzt werden kann. Dies wurde am Beispiel von Ribonuclease A für den Nachweis von Thyroxin demonstriert (Gonnelli et al., 1981; Farina und Gohlke, 1983). Jedoch erwies sich die Empfindlichkeit des Ribonuclease Nachweises als zu gering, so daß alternative Enzyme herangezogen wurden. Besonders der Einsatz genetisch modifizierter β -Galactosidase im sogenannten CEDIA System (*cloned enzyme donor immunoassay*) zeigte hierbei bessere Resultate. Das native Enzym besteht aus vier identischen Untereinheiten. Diese Untereinheiten können gentechnisch in zwei modifizierte Fragmente zerlegt werden. Die nunmehr acht Fragmente assoziieren zum kompletten aktiven Enzym. Die beiden neuen Fragmente bestehen aus einem kleineren Donor und einem größeren Akzeptor-Peptid. Im CEDIA besitzen beide Fragmente Deletionen in ihren Peptidsequenzen. Das Donor-Peptid ist gentechnisch derart modifiziert, daß es die Konjugation eines spezifischen Analyten ermöglicht und gleichzeitig die Wiederherstellung der Enzymaktivität durch Assoziation mit

dem Akzeptor-Peptid zuläßt. Die Antikörperbindung an den gekoppelten Analyten verhindert die Wiederherstellung der Enzymaktivität. CEDIA ist von kommerzieller Bedeutung (Engel und Khanna 1992; Henderson et al., 1986).

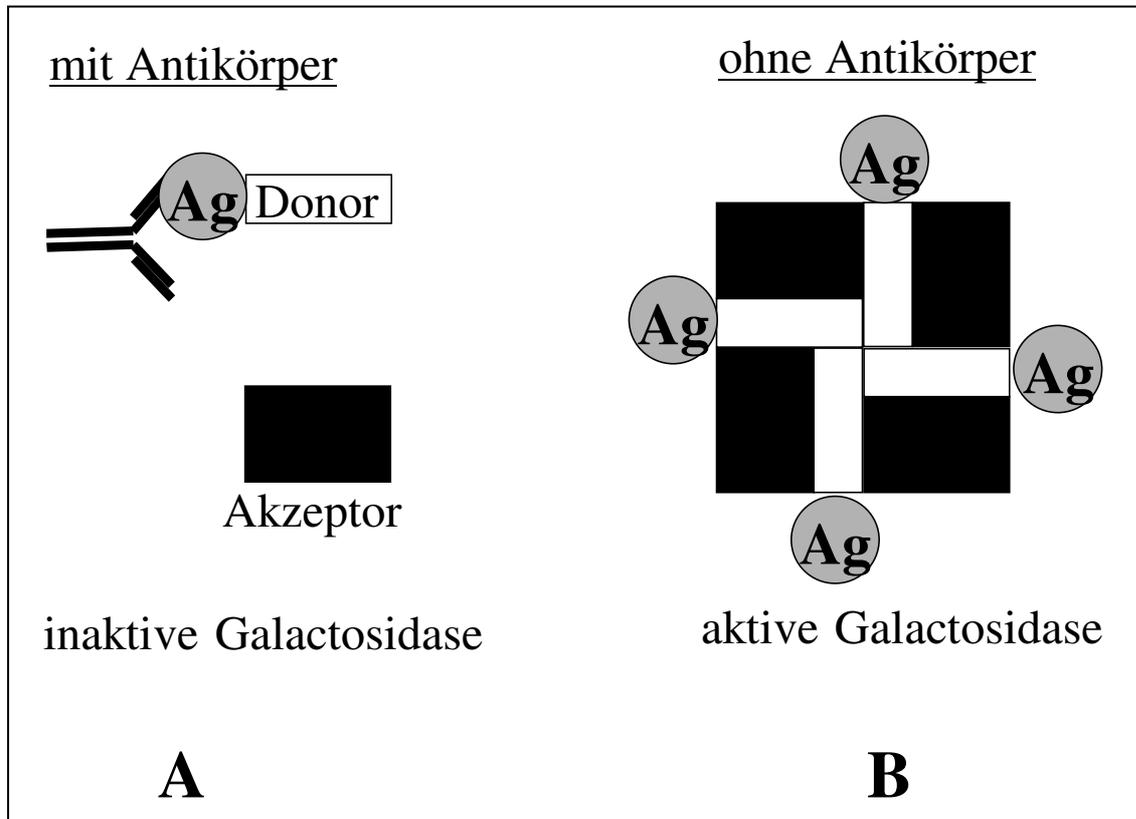


Abb. 3-7: Schematische Darstellung eines *Enzyme Complementation Immunoassays*. Die Assemblierung des Donor-Peptids mit dem größeren, inaktiven Akzeptor-Fragment führt zur Rekonstitution der Enzymaktivität. Das Antigen ist an das Donor-Peptid gekoppelt. Die Antikörper-Bindung des Antigens unterbindet die Rekonstitution der Enzymaktivität (**A**). Ohne Bindung des Antikörpers erfolgt die Assemblierung des Enzyms, dessen Aktivität über seinen Substratumsatz meßtechnisch verfolgt wird (**B**).

3.1.4 Elektroaktive Markierungen

Homogene Immunoassays wurden auch unter Verwendung von elektrochemisch aktiven Molekülen realisiert. Derartige Moleküle, wie z.B. Ferrocen, lassen sich an der Oberfläche einer Elektrode leicht oxidieren. Dies erfolgt bei Spannungen von 340 mV, die andere Bestandteile der Meßprobe z.B. Serumproteine nicht beeinträchtigen. Für den Elektronentransfer vom Ferrocen auf die Elektrode ist deren enger Kontakt notwendig. Wird das Ferrocen infolge Antikörperbindung zu „sperrig“, unterbleibt dieser Kontakt, was in einem Abfall des Stromes an der Meßelektrode resultiert. Dieses Prinzip ist die Grundlage homogener elektrochemischer Immunoassays. Im konkreten Fall wird Ferrocen an den Analyten z.B. Thyroxin gekoppelt. Die Messung erfolgt in Gegenwart eines Enzyms, welches die Aufgabe hat, Ferrocenium Ionen zum neutralen Ferrocen zu reduzieren. Hierfür werden Glucose und Glucoseoxidase verwendet. Bindet ein Antikörper Thyroxin, so wird der Kontakt zwischen Ferrocen-Konjugat und Elektrode unterbunden, was in einem Stromabfall resultiert. Freies Thyroxin konkurriert mit dem Konjugat um die Antikörperbindung, wodurch der Meßstrom wiederum steigt (Robinson et al., 1986).

Dem selben Prinzip folgend wurden auch homogene Elektrochemilumineszenz Immunoassays (ECL) entwickelt. Diese sind empfindlicher als die zuvor beschriebenen. Sie beruhen auf chemischen Verbindungen, welche leicht an einer Elektrode zu oxidieren und im Anschluß mittels zyklischer Voltammetry zu reduzieren sind. Bei geeigneter Spannung ist der letzte Prozeß exotherm genug, um die Verbindung in einen angeregten, Photonen emittierenden Zustand zu versetzen. Die Emission von Licht wird photometrisch verfolgt. Wie für die amperometrischen Messung ist der enge Kontakt zur Elektrode notwendig. Dieser wird durch eine Antikörperbindung unterbunden. In Elektrolumineszenz Immunoassays fanden Pyrene (Ikaryama et al., 1985) sowie Ruthenium Chelate (Blackburn et al., 1991) Verwendung.

3.1.5 *Oxygen Channeling Immunoassay*

Die größten Empfindlichkeiten eines homogenen Systems wurden mit einem *Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay* (LOCI) erreicht (Ullman et al., 1996). Das zugrunde liegende Prinzip ähnelt dem des *Enzyme Channeling* bzw. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*. Verwendung finden Latex umhüllte Sphären oder Hohlkügelchen (*beads*). Diese Sphären sind mit einer Größe von etwa 250 nm so klein, daß sie in wässriger Lösung nicht sedimentieren. Zwei unterschiedliche Arten von Sphären kommen im Test zum Einsatz. Die erste, die Chemilumineszenz Sphäre (*chemiluminescer bead*), ist gefüllt mit einem gelösten Olefin. Die Reaktion des Olefins mit Singulett Sauerstoff führt zu einem Dioxetan, welches spontan zerfällt und hierbei Licht emittiert. Die zweite Sphäre (*photosensitizer bead*) enthält photosensitive Verbindungen wie Phthalocyanine. Diese sind in der Lage, nach Lichtabsorption Sauerstoff in seinen Singulett Zustand zu überführen. Beide Arten von Sphären sind durch ihre Latexhülle vollständig vom Kontakt mit der Meßprobe und damit von störenden unspezifischen Wechselwirkungen abgeschirmt. Das Funktionsprinzip ist folgendes. Die Bestrahlung der Lösung mit Licht führt in den photosensitiven Sphären zu einem Energietransfer vom angeregten photosensitiven Molekül auf den in der Sphäre gelösten Sauerstoff. Der entstehende Singulett Sauerstoff diffundiert in die umgebende Lösung. Mit einer Lebensdauer von nur 4 µs existiert dieser jedoch nur in unmittelbarer Nahe (etwa 300 nm) der ihn freisetzenden Sphäre. Binden nun die Chemilumineszenz und photosensitive Sphäre aneinander, so diffundiert Singulett Sauerstoff in die Chemilumineszenz Sphäre und initiiert die Lumineszenz. Ungebundene Chemilumineszenz Sphären bleiben davon unberührt. Die Bindung beider Sphären aneinander kann durch Antikörper vermittelt werden. Es ist sowohl der Aufbau von *Sandwich* – als auch von kompetitiven Immunoassays möglich. Die Anregung der Lösung erfolgt mit einem Laser für 0,1 - 1 Sekunde bei 680 nm. Die Messung der resultierenden Chemilumineszenz Emission wird bei einer Wellenlänge von 550-560 nm durchgeführt. Im LOCI werden Sensitivitäten vergleichbar zu denen heterogener Immunoassays erreicht. Für einen Immunoassay zum Nachweis von TSH (Thyroidea stimulierendes Hormon) wurde eine Nachweisgrenze von 4,1 fmol/L (0,11 pg/ml) beschrieben. Die Messung kam mit einer Inkubationszeit von nur 14 Minuten aus, welches im heterogenen System nicht zu erreichen ist. Die kommerzielle, diagnostische Anwendung ist bei Dade Behring (Deerfield, Illinois) in Vorbereitung. Seine Nutzung zum *high throughput screening* erfolgt bereits in der Packard Instruments (Boston) Alphascreen Technologie.

Neuere Untersuchungen zeigen, daß wahrscheinlich alle Antikörper die Umwandlung von Singulett Sauerstoff in Wasserstoffperoxid und Ozon katalysieren können (Wentworth et al., 2001; 2003). Die Funktion dieser Katalyse ist noch ungeklärt – möglicherweise handelt es sich um einen sehr ursprünglichen Mechanismus zur Abwehr von Mikroorganismen. Inwieweit sich dieser Effekt negativ auf die Sensitivität des beschriebenen *Oxygen Channeling Immunoassays* auswirkt, läßt sich nur schwer abschätzen.

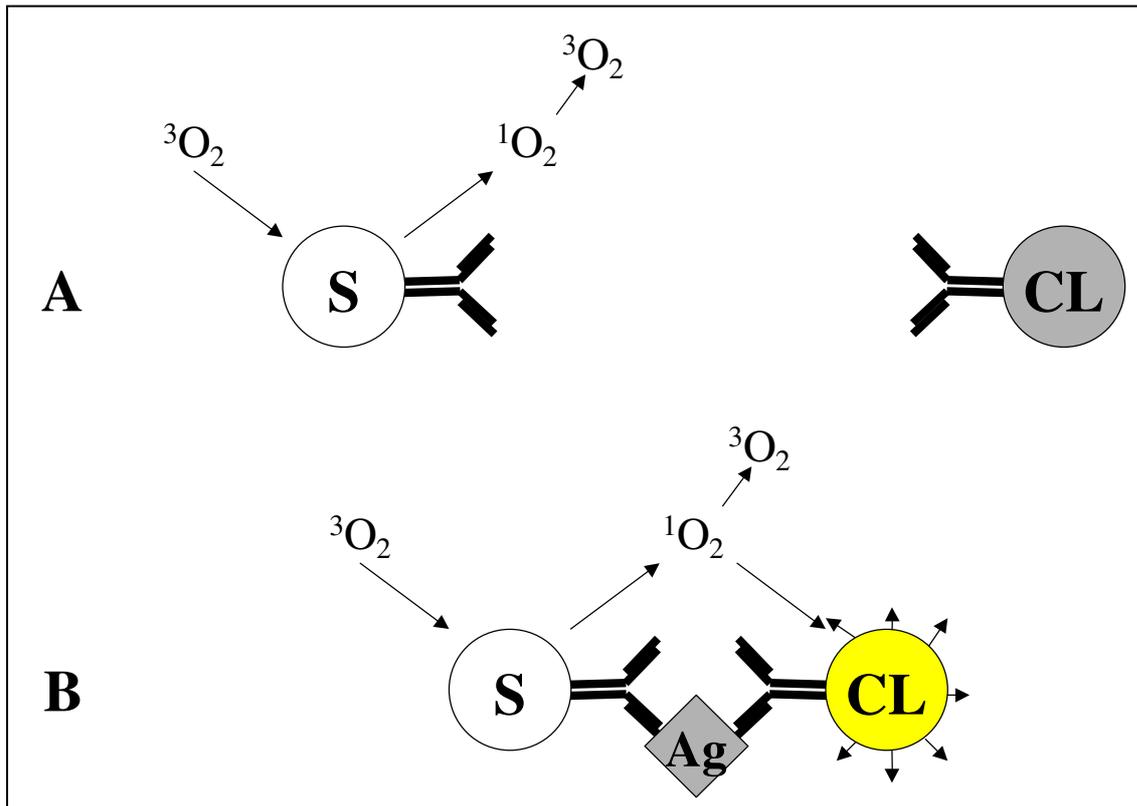


Abb. 3-8: Schematische Darstellung eines *Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI)*. Es kommen zwei Arten von Antikörper gekoppelten Sphären zum Einsatz. Die photosensitive Sphäre (S) produziert nach Anregung Singulett Sauerstoff. Die Chemilumineszenz Sphäre (CL) emittiert eine Chemilumineszenz-Emission nach Kontakt mit Singulett Sauerstoff (A). Die Bindung des Antigens (Ag) durch die an die Sphären gekoppelten Antikörper vermittelt deren räumliche Nähe. Nur diese Nähe ermöglicht die Weitergabe des Singulett Sauerstoffs von der photosensitiven Sphäre an die Chemilumineszenz Sphäre (B). Wird diese Nähe nicht hergestellt vergeht der Singulett Sauerstoff ungenutzt und die Chemilumineszenz bleibt aus.

3.2 Produktion und immundiagnostischer Einsatz von Antikörpern

Antikörper gehören zweifellos zu den wichtigsten Reagenzien in den modernen Biowissenschaften. Sie sind unverzichtbare Werkzeuge in biologischer und medizinischer Forschung, in Diagnostik und Analytik sowie zunehmend in der Therapie verschiedener Krankheiten. Von dementsprechend großem Interesse sind die Techniken zur Generierung und Produktion von Antikörpern und alle Anstrengungen zur Weiterentwicklung und Verbesserung dieser Techniken. Dies wird in führenden Zeitschriften immer wieder hervorgehoben:

The value of antibodies in commercial ventures and research laboratories continues to expand. While established antibody-based technologies are evolving to produce ever-refined products, new applications and laboratory techniques based on the specificity of antibody for their targets are entering the scientific mainstream.

Nature 431; 227: 2004

Der einfachste Zugang zu Antikörpern ist der über die Immunisierung eines Versuchstieres. Aus dem Serum sind die polyklonalen Antikörper leicht zugänglich. Die Aufreinigung monospezifischer Antikörper, d.h. derjenigen Antikörper, die, wenn auch polyklonal, das selbe Antigen binden, ist Routine. Für eine Vielzahl von Anwendungen, inklusive dem Aufbau von Immunoassays, sind diese Antikörperpräparate oft schon ausreichend. Polyklonale Antikörperpräparate stellen jedoch eine einmalige Momentaufnahme des Immunstatus eines bestimmten Versuchstiers dar. Sie sind auch bei Verwendung großer Versuchstiere endlich. Ist die Charge aus einer Blutentnahme verbraucht, sind mit einem neuen Präparat die Arbeiten zur Optimierung und Validierung des Assays erneut zu bestreiten.

3.2.1 Monoklonale Antikörper

Für spezifische Anwendung, z.B. wenn diese die Bindung eines bestimmten Epitops voraussetzt, ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern unverzichtbar. Die Entscheidung für einen monoklonalen Antikörper steht jedoch auch oft im Zusammenhang mit dessen besserer Charakterisierbarkeit und der dadurch bedingten besseren Standardisierung der Bedingungen im einmal aufgebauten Immunoassay. Die einen monoklonalen Antikörper permanent in Zellkultur produzierende Zelle wird als Hybridom bezeichnet. Hybridome können in flüssigem Stickstoff gelagert werden und ermöglichen somit eine kontinuierliche und zeitlich unbegrenzte Versorgung mit dem gewünschten monoklonalen Antikörper.

Ein Hybridom ist das Fusionsprodukt eines einzelnen, einen bestimmten Antikörper sezernierenden B-Lymphozyten mit einer in Zellkultur unsterblichen Myelomzelle. Wie von Köhler und Milstein (1975) demonstriert, vereinigen sich in der Hybridomzelle die Eigenschaften beider Fusionspartner. Die potentielle Unsterblichkeit der Myelomzelle wird mit der Fähigkeit zur Antikörperproduktion des B-Lymphozyten vereinigt. Die Hybridomtechnik ermöglicht einen einfachen Selektionsschritt, in dessen Ergebnis die nicht fusionierten Myelomzellen absterben. Nicht fusionierte Lymphozyten stellen kein Problem dar, sie sind in Zellkultur nur für begrenzte Zeit lebensfähig. Diese HAT-Selektion (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin – Selektion) funktioniert kurz umrissen wie folgt. Für die Synthese der Purinbasen stehen der Zelle zwei Stoffwechselwege zur Verfügung, der der Neusynthese sowie ein Nebenweg über Hypoxanthin und Guanin. Der Weg der Neusynthese kann durch Gaben der Toxine Aminopterin oder Azaserin inhibiert werden. Dieser Eingriff trifft sowohl Myelom- als auch die Hybridomzellen. Die verwendeten Myelomzellen haben zusätzlich einen Defekt im Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), im Nebenweg der Purinbasen-Synthese. Im Selektionsmedium sind die Myelomzellen somit nicht in der Lage zur Synthese von Purinbasen – sie sterben ab. Zusätze von Hypoxanthin und Thymidin erlauben das Überleben der Hybridome. Die Zugabe von Thymidin wird notwendig, da Aminopterin zusätzlich auch im Stoffwechselweg zur Pyrimidinsynthese die Thymidinkinase inhibiert.

Die überlebenden Hybridome werden einem Screening unterzogen, bei dem unter den vielen Einzellklonen die gewünschten Antikörperproduzenten identifiziert und isoliert werden. Dieser Schritt verursacht den Hauptteil des personellen und materiellen Aufwandes der Methode. Sterilitätsprobleme sind der Hauptgrund für die zwar notwendige, aber bisher ausgebliebene Automatisierung der Hybridomtechnik. Eine Methode, dieses Screening durch

eine einfache Selektion der den gewünschten Antikörper produzierenden Zelle zu ersetzen, wäre wünschenswert, steht jedoch bisher nicht zur Verfügung.

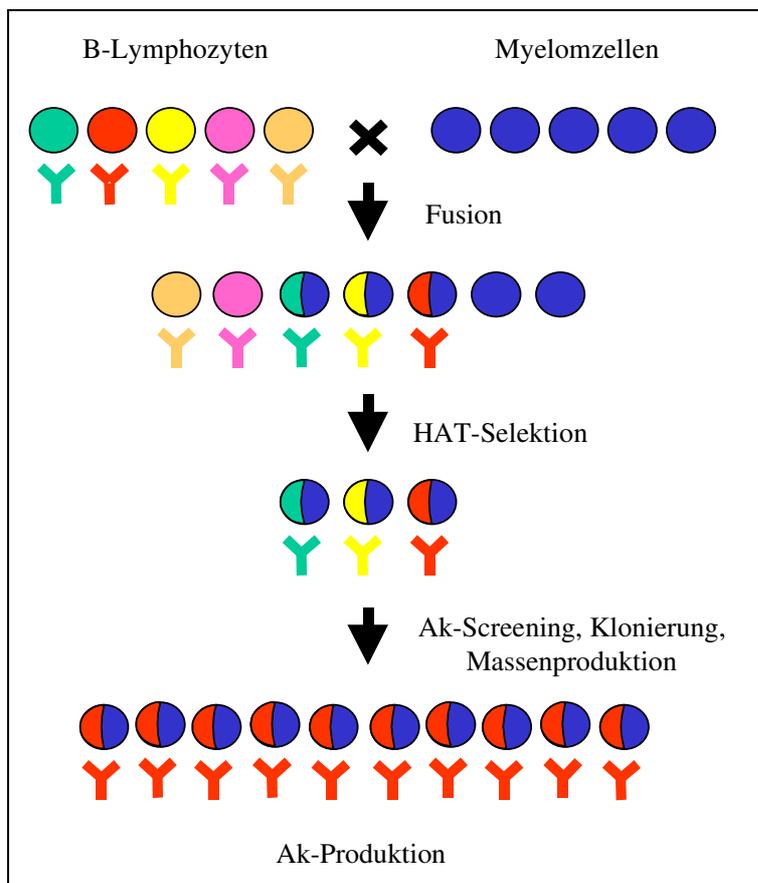


Abb. 3-9: Schematische Darstellung der Hybridom-Technik zur Produktion von monoklonalen Antikörpern. B-Lymphozyten werden mit Myelomzellen fusioniert. Nach HAT-Selektion bleiben lediglich die Hybridome (Fusionsprodukte aus B-Lymphozyt und Myelomzelle) zurück. Diese sind permanent in Zellkultur lebensfähig sowie sezernieren einen Antikörper. Screening und Klonierung der Zellen führen zu einem den gewünschten monoklonalen Antikörper sezernierenden Hybridom. (Quelle: Micheel, 2003)

3.2.2 Bispezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper stellen eine spezielle, artifizielle Gruppe von Antikörpern dar. Alle natürlichen Antikörper, soweit es sich um IgG handelt, sind monospezifisch und bivalent. Bispezifische Antikörper vereinen in einem Antikörpermolekül die Bindungsspezifitäten von zwei Elternantikörpern. Sie werden auf drei Wegen hergestellt, durch chemische Rekombination, durch Zellfusion von Hybridomen sowie durch gentechnische Manipulationen (Fanger, 1995).

Der Einsatz von bispezifischen Antikörpern in der Immundiagnostik ist bisher von nur geringer praktischer Bedeutung, weil Aufwand zu ihrer Erzeugung und Reinigung sehr groß ist. Zudem ist ihre Avidität auf Grund der Aufgabe der Bivalenz geringer als die der Elternantikörper. Ihr Potential liegt vorrangig auf therapeutischem Gebiet. So ermöglichen sie den gerichteten Transport von z.B. Toxinen an eine Zielzelle. Auch eine Zerstörung von Zielzellen (z.B. Tumorzellen) durch körpereigene Effektorzellen kann durch bispezifische Antikörper vermittelt werden. Dabei erfolgt neben der Herstellung des engen Kontaktes auch die Aktivierung der Effektorzelle (Lum et al., 2006).

An dieser Stelle soll zunächst nur auf die Generierung von Hybridhybridomen durch Zellfusion eingegangen werden. Ein Hybridhybridom (Quadroma, Tetradoma) ist das Fusionsprodukt zweier Hybridome. Im Anschluß an die Zellfusion stellt sich das Problem der Selektion derjenigen Zellen die den gewünschten bispezifischen Antikörper sezernieren. Eine Möglichkeit zur Selektion stellen unterschiedliche, in die Elternantikörper eingebrachte, Stoffwechseldefekte bzw. Antibiotikaresistenzen dar. Nur das Fusionsprodukt beider Zellen verfügt über eine Kombination dieser beiden Eigenschaften und ist zum Wachstum in einem geeigneten Selektionsmedium in der Lage, während die nichtfusionierten Elternzellen sterben (Sonsivilai and Lachmann, 1990).

Auch die Fluoreszenzmarkierung der Elternzellen und die sich an die Fusion anschließende Selektion der Zellen mit Hilfe eines FACS (*fluorescence activated cell sorter*) ist möglich (Karawajew et al., 1987). Geeignete Fusionsmethoden vorausgesetzt, ist auch ein sofortiges Screening von Einzelklonen auf das Vorhandensein des bispezifischen Antikörpers möglich. Die Elektrofusion ist eine Methode, die die hierfür notwendigen, hohen Fusionsraten zuläßt (Behring et al., *in preparation*). Im Gegensatz zur klassischen Fusion mit PEG (Polyethylenglycol) werden die Zellen hierbei mittels eines kurzen und gerichteten Stromstoßes fusioniert.

Der bispezifische Antikörper ist das Ergebnis der korrekten Kombination von vier Antikörperketten. Diese Kombination findet im endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Um

einen funktionstüchtigen, d.h. beide Eltern-Antigene bindenden, bispezifischen Antikörper zu bilden, ist die Kombination von leichter und schwerer Kette des ersten sowie von leichter und schwerer Kette des zweiten Elternantikörpers notwendig. Die Kombination der Ketten zum Antikörpermolekül erfolgt zufällig. Auch alle anderen Kombinationsereignisse finden statt, führen jedoch zu keinem bispezifischen Antikörper. Somit verfügen nur wenige (1/10) der durch das Hybridhybridom sezernierten Antikörper über die gewünschte Bispezifität. Dies setzt die tatsächliche Produktivität der Hybridhybridome stark herab. Es macht zudem eine aufwendige Reinigung des bispezifischen Antikörpers notwendig.

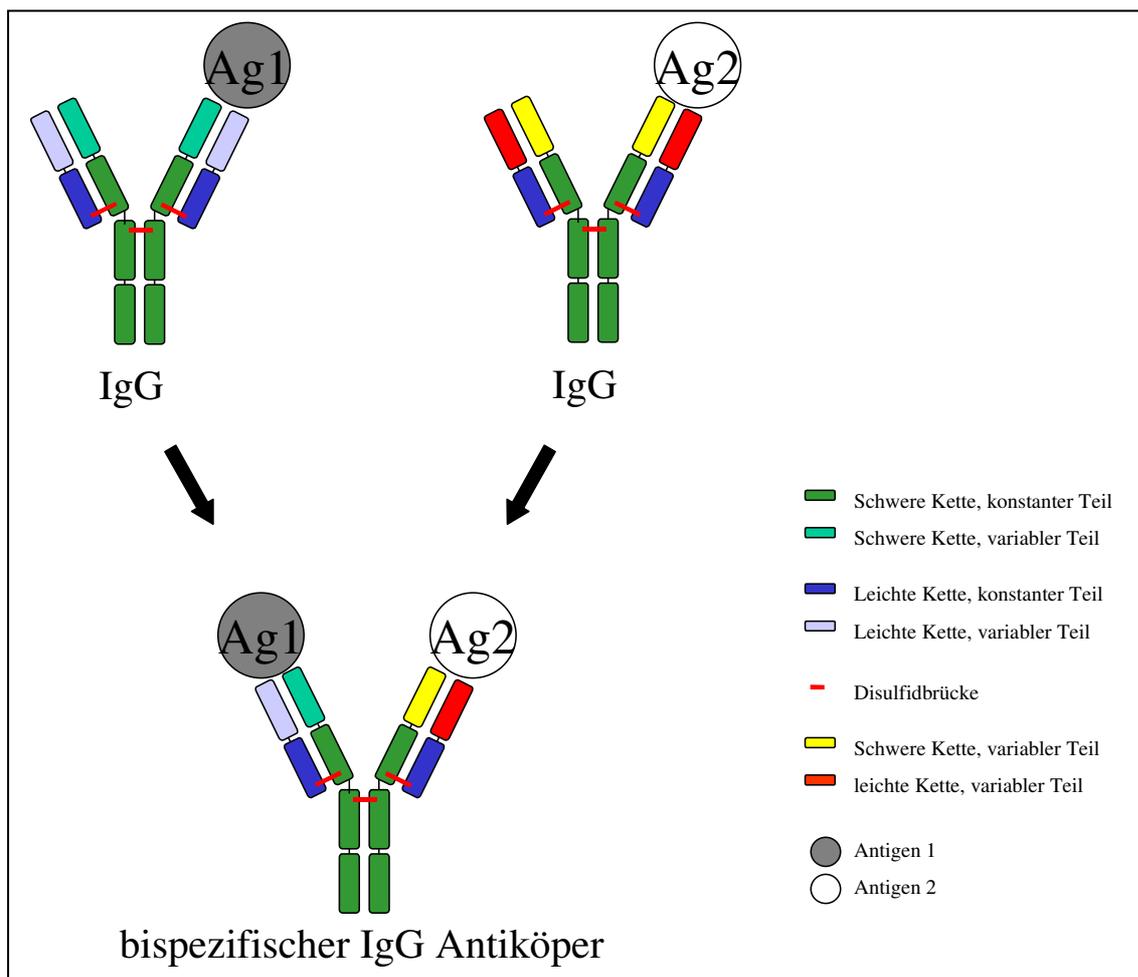


Abb. 3-10: Schematische Darstellung der Entstehung eines bispezifischen IgG Antikörpers durch Hybridfusion. Zwei Hybridome, die Binder (monoklonale Antikörper) unterschiedlicher Antigene (Ag) produzieren, werden fusioniert. Die aus der Fusion hervorgehende Zelle sezerniert neben anderen Antikörpermolekülen auch den dargestellten bispezifischen IgG Antikörper. Dieser vereint die Bindungsspezifitäten der beiden Elternantikörper in einem Molekül und ist somit zur Bindung beider Antigene befähigt.

3.2.3 Rekombinante Antikörper

Eine weitere Methode zur Gewinnung und Modifikation von Antikörpern ist deren Klonierung und Expression als rekombinantes Protein (Breitling und Dübel, 1997). Dazu können z.B. die Antikörpergene aus einem Hybridom oder B-Lymphozyten kloniert werden. Beide Genabschnitte für die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette werden durch eine ein Linkerpeptid kodierende Sequenz verbunden und in ein geeignetes Plasmid kloniert. Exprimiert wird das Antikörperfragment somit als ein einkettiger Polypeptidstrang. Es ist damit ein Monomer und kein Heterodimer wie das native IgG Molekül. Die Expression des Einketten-Antikörper-Fragmentes (scFv) erfolgt in einer dafür geeigneten Zelle, im einfachsten Fall in *E.coli*.

Das *Phage Display* ist eine weitere Möglichkeit, einen rekombinanten Antikörper mit der gesuchten Bindungsspezifität zu erhalten. Dabei werden die rekombinanten Antikörper auf der Oberfläche von Phagen exprimiert. Diese Technik bedient sich großer Phagenbibliotheken von 10^9 und mehr Klonen (McCafferty et al., 1996; Kay et al., 1996). Eine einmal etablierte Phagenbibliothek kann für die Selektion von Bindern unterschiedlichster Antigene verwendet werden. Die genetische Manipulation dieser Bibliotheken durch artifizielle Sequenzen ermöglicht zudem die Konstruktion bindender Moleküle unabhängig vom natürlich vorkommenden Repertoire. Die Selektion der rekombinanten Antikörper erfolgt im sogenannten *Panning*, durch Bindung an das immobilisierte Antigen. Gebundene Phagen werden isoliert und, nach erneuter Infektion von *E.coli* Zellen, für eine weitere Selektionsrunde eingesetzt.

Die Expression von Peptiden auf der Oberfläche von Phagen wurde zuerst durch Smith (1985) demonstriert. Dieser Fortschritt, ergänzt durch PCR (*polymerase chain reaction*) (Mullis and Faloona, 1987) und den Nachweis der Expression von Antikörperfragmenten in *E.coli* (Skerra and Plückthun, 1988; Better et al., 1988), ermöglichte es, klonierte Antikörpergene schnell und einfach zu vervielfältigen und auf ihre Bindungseigenschaften zu selektieren. Die ersten auf diesem Wege gewonnenen rekombinanten Antikörper wurden von Huse et al., (1989); McCafferty et al., (1990); Barbas et al., (1991) und Hoogenboom et al., (1991) publiziert.

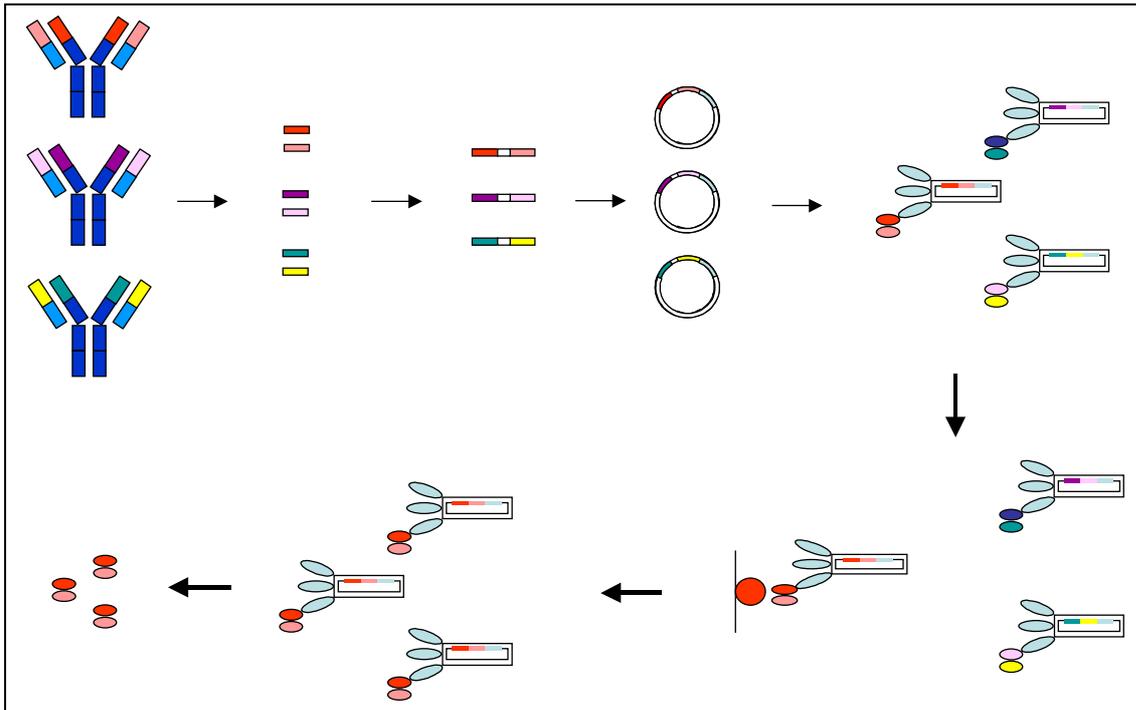


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der Gewinnung rekombinanter Antikörper mit Hilfe des *Phage display*. Die Gene der variablen Bereiche von Antikörpern (V_L und V_H) werden mit Genen fusioniert, die Oberflächenproteine von *E.coli* infizierenden filamentösen Phagen kodieren. Dadurch werden die Antikörperfragmente an der Phagenoberfläche präsentiert. Damit können mit Hilfe der Phagen große Antikörperbibliotheken neuer, unbekannter Spezifitäten angelegt werden, aus denen, spezifische Antikörper isoliert werden können. Der isolierte, spezifisch bindende Phage enthält auch die genetische Information für die Synthese des Antikörperfragmentes. Er kann unbegrenzt vermehrt und für die Herstellung von Einkettenantikörpern eingesetzt werden (Micheel, 2003).

Die gentechnische Herstellung von Antikörpern hat zur Hybridomtechnik einige Vorteile jedoch auch seine eigenen Schwierigkeiten und Grenzen. Ein Vorteil stellt die Überwindung der Schwierigkeiten zur Gewinnung von humanen Antikörpern dar, wie sie speziell für therapeutische Anwendungen am Menschen nötig sind. Einmal kloniert lassen sie sich zudem leichter und schneller produzieren. Die Möglichkeit einer Feineinstellung von Affinität und Spezifität des Genproduktes über die Manipulation des einzelnen Genes ist auch für diagnostische Anwendungen von Interesse. Mittels rekombinanter Techniken, wie z.B. beim *Phage Display*, ist es möglich, das Immunsystem des immunisierten Versuchstieres für die Gewinnung von Antikörpern vollständig zu umgehen. Somit gelingt es, Antikörper gegen Antigene zu isolieren, die schwach oder gar nicht immunogen sind. Ebenso ist die Isolation von Antikörpern gegen Toxine möglich.

Das Haupthindernis dieser Technik liegt jedoch in deren technischen Anforderungen. Besondere Schwierigkeiten werden durch Faltungsprobleme verursacht. Viele rekombinante Antikörper tendieren dazu, nicht korrekt zu falten. Die Polypeptidkette, obgleich korrekt translatiert, bildet nicht die korrekte Sekundärstruktur aus. Dies führt zum Funktionsverlust des rekombinanten Antikörpers, er ist nicht zur Bindung seines Antigens befähigt. Auch ein Ausweichen vom prokaryotischen auf eukaryotische Expressionssysteme, inklusive Säugerzellen, ist nicht in jedem Fall erfolgreich.

Die Hybridomtechnik ist deshalb immer noch der zuverlässigere Weg zum gewünschten Antikörper. Deren vollständige Ablösung durch rekombinante Techniken ist bisher nicht erfolgt und vorläufig auch nicht zu erwarten (Lerner et al., 1992; Moore and Clayton, 2003).

3.3.4 Rekombinante bispezifische Antikörper

Die Klonierung von Antikörperfragmenten stellt auch einen Zugang zu bispezifischen Antikörpern da. Dabei werden die unterschiedlichen Bindungseigenschaften zweier rekombinanter Antikörperfragmente in einem Dimer kombiniert. Auch die Konstruktion von Multimeren ist möglich (Fanger, 1995; Breitling und Dübel, 1997; Plückthun und Pack, 1997). Zum Einen bilden Einketten-Antikörper-Fragmente (scFv) spontan Dimere und auch Multimere, wobei der Anteil dieser Fraktionen von der Länge des Linkerpeptids abhängt, das die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette mit einander verbindet. Ist das Linkerpeptid zwischen den variablen Regionen der leichten und der schweren Kette im Antikörperfragment mit etwa fünf Aminosäuren sehr kurz, so ist die Bildung bindungsfähiger Monomere ausgeschlossen. Die variablen Regionen von leichter und schwerer Kette des selben Moleküls sind in diesem Fall aus sterischen Gründen nicht zur Bildung einer funktionstüchtigen Antigenbindungsstelle in der Lage. Monomere bilden sich bei einer Linkerlänge von etwa zwanzig Aminosäuren. Durch die Variation der Linkerlänge ist es möglich Dimere mit zwei identischen Antigenbindungsstellen, wie auch Heterodimere mit zwei unterschiedlichen Bindungsstellen zu erzeugen. Heterodimere entstehen, wenn ein rekombinantes Protein, bestehend aus variabler Region der schweren Kette des ersten Antikörper, Linkerpeptid und variabler Region der leichten Kette des zweiten Antikörpers, mit einem zweiten rekombinanten Protein, bestehend aus der leichten Kette des ersten Antikörpers, Linkerpeptid und variabler Region der schweren Kette des zweiten Antikörpers kombinieren.

Es ist ebenso möglich Heterodimere durch das Einfügen eines weiteren Linkers zwischen den beiden scFv herzustellen. Eine andere Möglichkeit zur Generierung bispezifischer Antikörper stellt das Einfügen von C-terminalen Cysteinen in die scFv dar. Diese bilden nach erfolgter Oxidation stabile Disulfidbrücken zwischen den beiden scFv. Der direktere Weg ist das Anfügen von Assoziationsdomänen an den C-Terminus der scFv. Diese Assoziationsdomänen bestehen aus einer langen und flexiblen Brückensesquenz und sich anschließenden, eine gegenseitige Bindung zulassenden, Sequenzen. Derartige Konstrukte werden als Miniantikörper bezeichnet (Abb. 3-10).

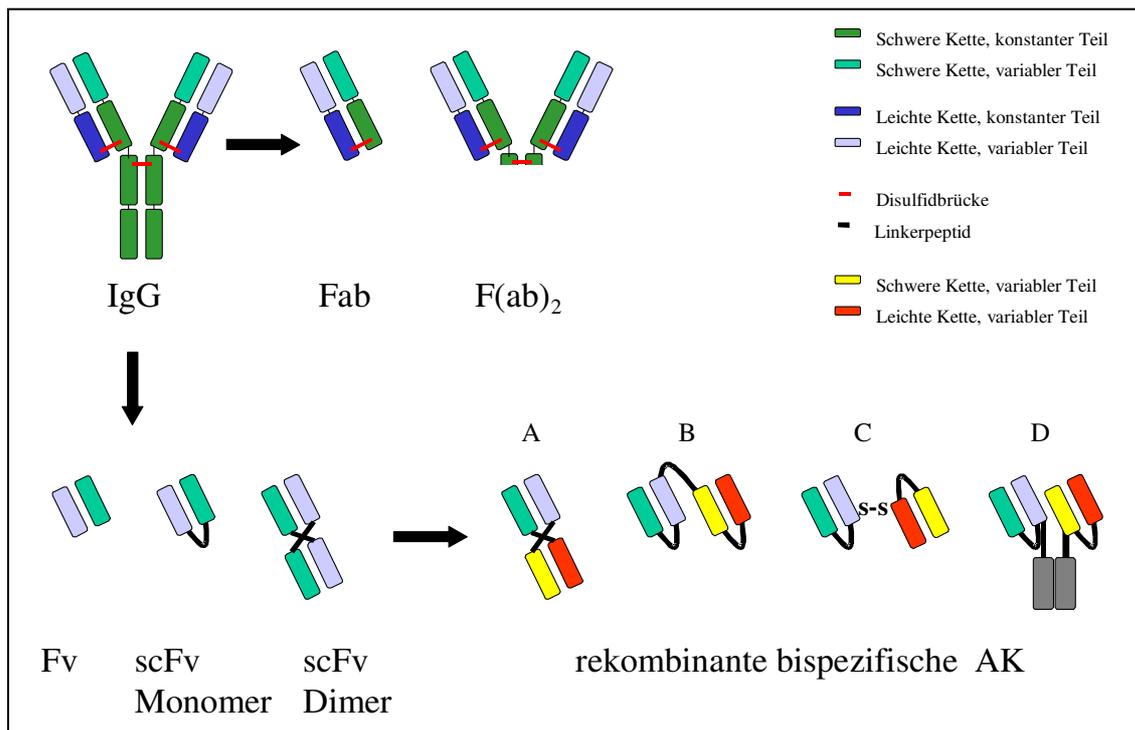


Abb. 3-12: Schematische Darstellung der Entstehung von Antikörperfragmenten und rekombinanten bispezifischen Antikörpern durch gentechnische Veränderungen des Antikörpers. Bispezifische rekombinante Antikörper entstehen durch die gentechnische Kombination der variablen Regionen aus leichter und schwerer Kette zweier Elternantikörper zu einem Molekül. Die Klonierung und Expression ist möglich als: Diabodies (A) und Tandem-Antikörper (B) sowie durch das Einbringen zusätzlicher Cysteine am C-Terminus und Bildung einer Disulfid-Brücke (C), oder durch die Einführung von Dimerisierungsdomänen zwischen den Antikörperfragmenten (D).

Rekombinante bispezifische Antikörper sind insbesondere von therapeutischen Interesse (Fischer et al., 2006). Sie ermöglichen den gerichteten Transport eines Effektormoleküls, z.B. eines Toxins, oder die Bindung einer Effektorzelle an eine definierte Zielzelle, z.B. eine Tumorzelle (Löffler et al., 2003). Im Vergleich zu den aus Zellfusion hervorgegangenen bispezifischen Antikörpern verfügen sie, wie im übrigen alle Antikörperfragmente, über eine bessere Gewebegängigkeit. Auf dem Wege der genetischen Manipulation ist es zudem möglich, Affinität, Serum-Halbwertszeit und Immunogenität der Konstrukte zu beeinflussen. Rekombinante bispezifische Antikörper sind vergleichsweise kleine Moleküle. Sie vermitteln damit eine im Vergleich zum kompletten Antikörper engere Verbindung von zwei Antigenen. Dies ist für den Aufbau einer bestimmten Art homogener Immunoassays von Interesse,

nämlich immer dann, wenn das zu erzeugende Meßsignal die räumliche Nähe von zwei Komponenten, z.B. von Enzymen voraussetzt. Rekombinante bispezifische Antikörper sind dennoch in der Immundiagnostik von nur sehr geringer Bedeutung. Der Grund hierfür liegt im großen Aufwand zu deren Generierung, Produktion und Reinigung. Insbesondere die erfolgreiche Expression derartiger bispezifischer Konstrukte, wie überhaupt von rekombinanten Antikörpern, ist oft problematisch. Oft falten die Polypeptidketten in der sie produzierenden Zelle nicht korrekt. Damit geht die Fähigkeit zur Bindung des Antigens verloren. Der mit einer fehlerhaften Faltung einhergehende Funktionsverlust, ist besonders häufig im prokaryotischen Expressionssystem zu beobachten. In diesen Fällen muß auf eukaryotische Expressionssysteme ausgewichen werden.

4. Zielstellung

Das Ziel der ersten beiden Teile dieser Arbeit war der Aufbau homogener Immunoassays. Der erste Teil der Arbeit befaßte sich mit dem Aufbau solcher homogener Systeme unter Ausnutzung eines *Substrate Channeling* zwischen zwei Enzymen. Die dafür notwendige räumliche Nähe sollte durch bispezifische Antikörper vermittelt werden.

Der zweite Teil der Arbeit bediente sich des *Fluorescence Quenching* für den Aufbau eines homogenen Testsystems. Ausgenutzt wurde hierfür der gegenseitige Bindungsausschluß zweier Antikörper bei der Bindung eines Dihapten-Konjugats.

In Analogie dazu wurde ein ähnlicher gegenseitiger Bindungsausschluß im dritten und abschließenden Teil der vorliegenden Arbeit zum Aufbau eines Verfahrens zur **Selektion Antikörper-produzierender Zellen** eingesetzt. Verwendung fanden hierfür Toxin-Konjugate.

4.1. Klonierung bispezifischer rekombinanter Antikörper

Die Aufgabenstellung sah die Klonierung von bispezifischen rekombinanten Antikörpern vor. Diese sollten das *Substrate Channeling* zwischen zwei Enzymen in einem homogenen Immunoassay vermitteln. Die beiden verwendeten Enzyme waren Glucoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD).

Zuerst sollten Einketten-Antikörper-Fragmente (scFv) mit Bindungsspezifitäten für jedes der beiden Enzyme kloniert und erfolgreich exprimiert werden. Hybridome, die diese Antigene bindende Antikörper produzierten, standen als Ausgangsmaterial zur Verfügung. Aus diesen Zellen sollte die RNA isoliert, die enthaltene mRNA in cDNA überführt und aus dieser die Genfragmente der variablen Regionen der schweren und leichten Kette des Antikörpers mittels PCR amplifiziert werden. Diese sollten durch eine ein Linkerpeptid kodierende Sequenz miteinander verbunden und in ein geeignetes Plasmid kloniert werden. Der Expression in *E. coli* sollte sich die Charakterisierung des klonierten Genproduktes im ELISA (*Enzyme linked immunosorbant assay*) anschließen.

Die klonierten Einketten-Antikörper-Fragmente (scFv) sollten den Ausgangspunkt für die Herstellung eines bispezifischen rekombinanten Antikörper darstellen. Dieser sollte die Bindungsspezifitäten der beiden einzelnen scFv in einem Molekül vereinen. Der entstandene bispezifische rekombinante Antikörper sollte somit zur Bindung sowohl von Glucoseoxidase (GOD) als auch Peroxidase (POD) befähigt sein.

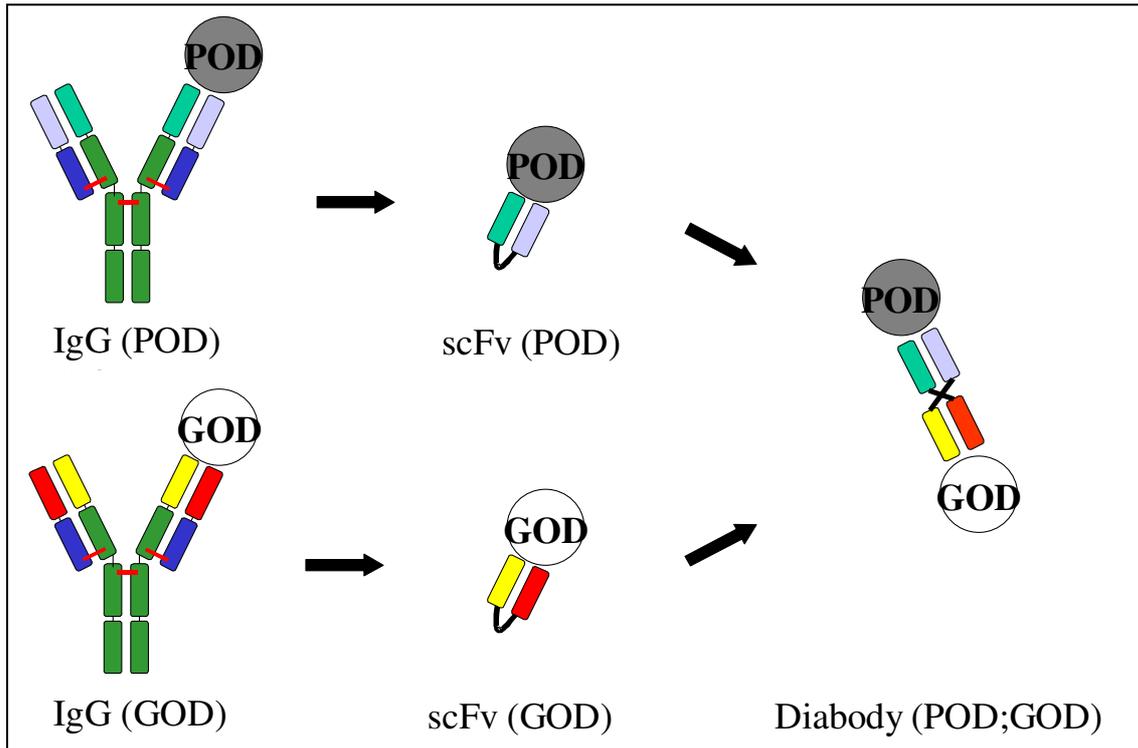


Abb. 4-1: Strategie zur Klonierung eines bispezifischen rekombinanten Antikörpers. Ausgangspunkt der Arbeiten waren Hybridome, die Antikörper (IgG) mit Bindungsspezifitäten für die Enzyme POD und GOD produzierten. Aus diesen sollte die Klonierung der scFv und schließlich des rekombinanten bispezifischen Antikörpers erfolgen, der beide Bindungsspezifitäten in einem Molekül vereint.

4.2. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels *Substrate Channeling*

Ziel der Arbeiten sollte der Aufbau eines homogenen Immunoassay sein, in dem das *Substrate Channeling* zwischen zwei Enzymen ausgenutzt werden sollte. Verwendung fanden die Enzyme Glucoseoxidase (GOD), Peroxidase (POD) sowie Katalase. Glucoseoxidase dehydriert Glucose zu Gluconsäure-5-lacton, das unter Wasseranlagerung in Gluconsäure übergeht. Das entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist Substrat der Peroxidase. Peroxidase katalysiert die Oxidierung verschiedener Substrate (in unseren Experimenten von Tetramethylbenzidin - TMB) mit H_2O_2 als Oxidationsmittel, welches zu Wasser reduziert wird. Aufgabe war es, mittels Antikörpern eine große räumliche Nähe zwischen diesen beiden Enzymen herzustellen, bzw. wieder aufzulösen. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Umsatzraten des Substrats TMB sollten im System photometrisch bestimmt und für die Konzentrationsbestimmung eines Analyten herangezogen werden. Katalase befand sich frei in Lösung. Sie hatte die Aufgabe, den zu beobachtenden Effekt auf den engen Kontaktbereich zwischen Glucoseoxidase und Peroxidase zu begrenzen. Dies sollte geschehen, indem das durch die Glucoseoxidase freigesetzte und in die Lösung diffundierende Wasserstoffperoxid durch die sich frei in Lösung befindliche Katalase einer Umsetzung durch die freie Peroxidase entzogen wird.

Die Entwicklungsarbeiten zu homogenen Immunoassays sind generell überwiegend von der physikalisch-technischen Seite her motiviert, d.h. der Schwerpunkt der Arbeiten liegt zumeist auf der Etablierung des Meßprinzips und dessen Optimierung. Im Gegensatz dazu war die Motivation dieser Arbeit eine andere. Sie sollte sich, in einer neuen Herangehensweise, vollständig auf die zur Vermittlung des, für ein *Substrate Channeling* notwendigen, engen räumlichen Kontakts der beiden Enzyme konzentrieren. Unterschiedliche Arten von Antikörpern sollten für diese Zweck herangezogen werden. Von besonderem Interesse war der Einsatz bispezifischer Antikörper. Die damit verfolgte Absicht war es, einen engeren und definierteren Kontakt zwischen den beiden Enzymen zu ermöglichen, als dies für die beschriebenen Systeme unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern bisher möglich war. Damit verband sich die Hoffnung, die erzielten Sensitivitäten dieser Assays aus den achtziger Jahren (Litman et al., 1980; Ullman et al., 1984) derart zu verbessern, daß deren immundiagnostische Nutzung möglich wird.

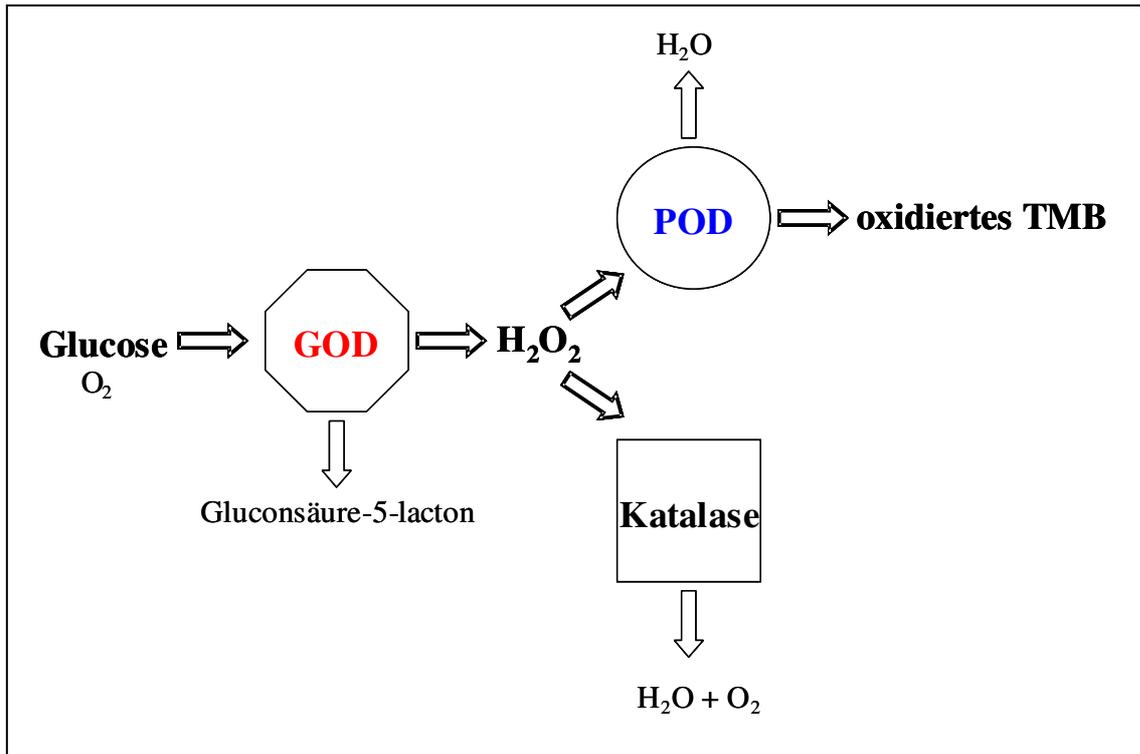


Abb. 4-2: Darstellung der Wechselwirkung der Enzyme Glucoseoxidase (GOD), Peroxidase (POD) und Katalase im *Substrate Channeling Assay*. Peroxidase und Katalase konkurrieren um das durch die Glucoseoxidase gebildete Wasserstoffperoxid. Dessen Umsatz durch Peroxidase führt zur Oxidation des Substrats TMB und damit zu einem photometrisch verfolgbaren Meßsignal. Der Umsatz durch Katalase resultiert in keinem Meßsignal.

4.2.1 *Substrate Channeling* mittels etablierter Immunoassay-Techniken

Es sollte ein *Substrate Channeling* System unter Verwendung etablierter Immunoassay-Techniken (d.h. vorerst ohne einen bispezifischen rekombinanten Antikörper) realisiert werden. Dies geschah mit dem Ziel, das Potential der zu etablierenden Technik auszuloten, sowie um erste Erfahrungen im Hinblick auf den Einsatz der sich zu diesem Zeitpunkt noch in der Klonierung befindlichen bispezifischen rekombinanten Antikörperfragmente zu gewinnen. Diese Herangehensweise bot zwei Vorteile. Sie war zum Einen im Vergleich zum angestrebten Einsatz eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers leichter in die Praxis umzusetzen, da auf etablierte Methoden sowie auf verfügbare bzw. leichter selbst anzufertigende Materialien zurückgegriffen werden konnte. Zum Anderen wurden die Einstellung der Enzymkonzentrationen radikal vereinfacht, indem sukzessive ein immunologischer Komplex (bestehend aus geeigneten Enzym-Hapten- bzw. Enzym-Antikörper-Konjugaten) an der festen Phase aufgebaut wurde. Die Handhabung der Experimente sollte somit vereinfacht und ihre Reproduzierbarkeit gewährleistet werden.

Als ein erstes Modellsystem sollte ein *Substrate Channeling* System zum Nachweis von Fluorescein bzw. des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 etabliert werden. Dazu wurde an der festen Phase ein Immunkomplex bestehend aus den beiden Enzymen GOD und POD aufgebaut. Im Einzelnen wurde hierfür wie folgt vorgegangen. Mikrotiterplatten wurden mit Antikörpern beschichtet, die den konstanten Teil muriner Antikörper banden. Die verbliebenen freien Bindungsplätze wurden nachfolgend geblockt. Der Immunkomplex wurde nun sukzessive, unterbrochen von Waschschritten, mit den folgenden Materialien aufgebaut. Der zur Beschichtung eingesetzte Antikörper band einen murinen Anti-GOD-Antikörper, dieser wiederum band ein GOD-Fluorescein Konjugat und das Fluorescein dieses Konjugats wurde seinerseits von einem Einketten-Antikörper-Fragment (scFv B13-DE1) gebunden, der an POD gekoppelt war. Im Ergebnis dieser Abfolge entstand ein an der Mikrotiterplatte fixierter Immunkomplex, in dem die beiden Enzyme GOD und POD in großer räumlicher Nähe zueinander vorlagen. Freie Enzyme waren infolge der Waschschritte nicht vorhanden. Die Stabilität der eingesetzten Materialien vorausgesetzt, sollte diese Vorgehensweise zu identischen Ausgangsbedingungen in den sich anschließenden Experimenten führen.

Der Immunkomplex sollte als konstanter Kern des *Channeling Systems* beibehalten werden. Variiert wurden die Konzentrationen der eingesetzten Glucose, Katalase und des Substrats TMB, die Pufferbedingungen sowie die Volumina der Ansätze. Ziel dieser Optimierungsarbeiten sollte es sein, maximale Meßsignale für den intakten Immunkomplex sowie minimale für den aufgelösten Komplex zu erhalten. Grundlage der Messungen war die

Auflösung des bestehenden Immunkomplexes in Abhängigkeit der Konzentration des Analyten. Die Auflösung des räumlichen Kontakts zwischen den Enzymen resultierte in einer Reduktion des *Channeling* Effekts, was photometrisch über den Umsatz des Substrats (TMB) verfolgt werden sollte. Aufgelöst wurde der Immunkomplex durch Verdrängung des an GOD-Fluorescein gebundenen scFv B13-DE1 - POD - Konjugats durch den Analyten, entweder freies Fluorescein oder den Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1.

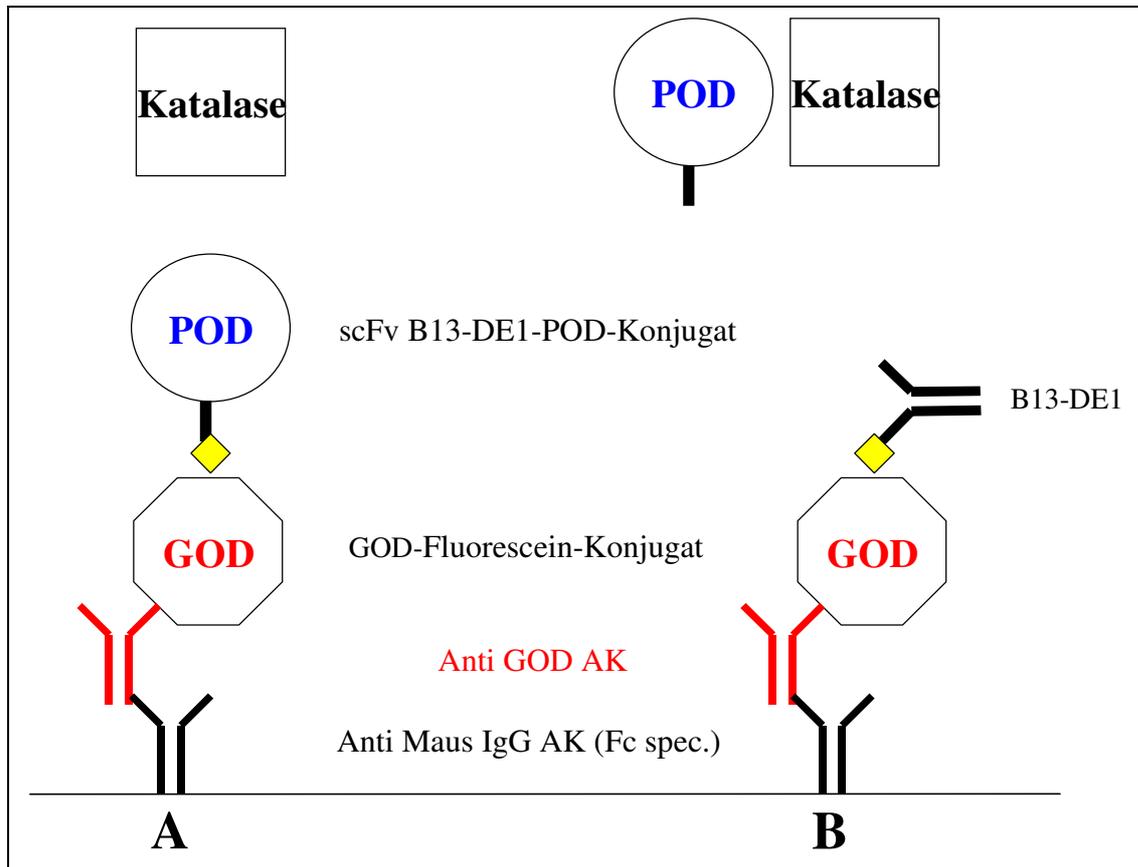


Abb. 4-3: Schematische Darstellung des *Substrate Channeling Immunoassays*: Vermittlung der räumlichen Nähe zwischen den Enzymen mittels etablierter Immunoassay-Techniken. Die Enzyme GOD und POD befinden sich im aufgebauten Immunkomplex in räumlicher Nähe zueinander, was ein *Channeling* des H_2O_2 zwischen den beiden Enzymen ermöglicht (A). Dieser *Channeling* Effekt wird mit Auflösung des Immunkomplexes durch Gabe des Analyten (Fluorescein bindender Antikörper B13-DE1) sukzessive bis zu dessen vollständigem Erliegen reduziert (B). Katalase sichert die Nachweisbarkeit dieses Prozesses, indem es das freigesetzte H_2O_2 abfängt, so daß dieses nur kurzzeitig für eine Umsetzung durch POD zur Verfügung steht.

4.2.2 Substrate Channeling mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper

In einem weiteren Experiment sollte die räumlichen Nähe zwischen den beiden Enzymen GOD und POD durch einen monoklonalen bispezifischen Antikörper hergestellt werden. Der Aufbau dieses Experiments kam somit den ursprünglichen Vorstellungen von der Verwendung eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers sehr nah.

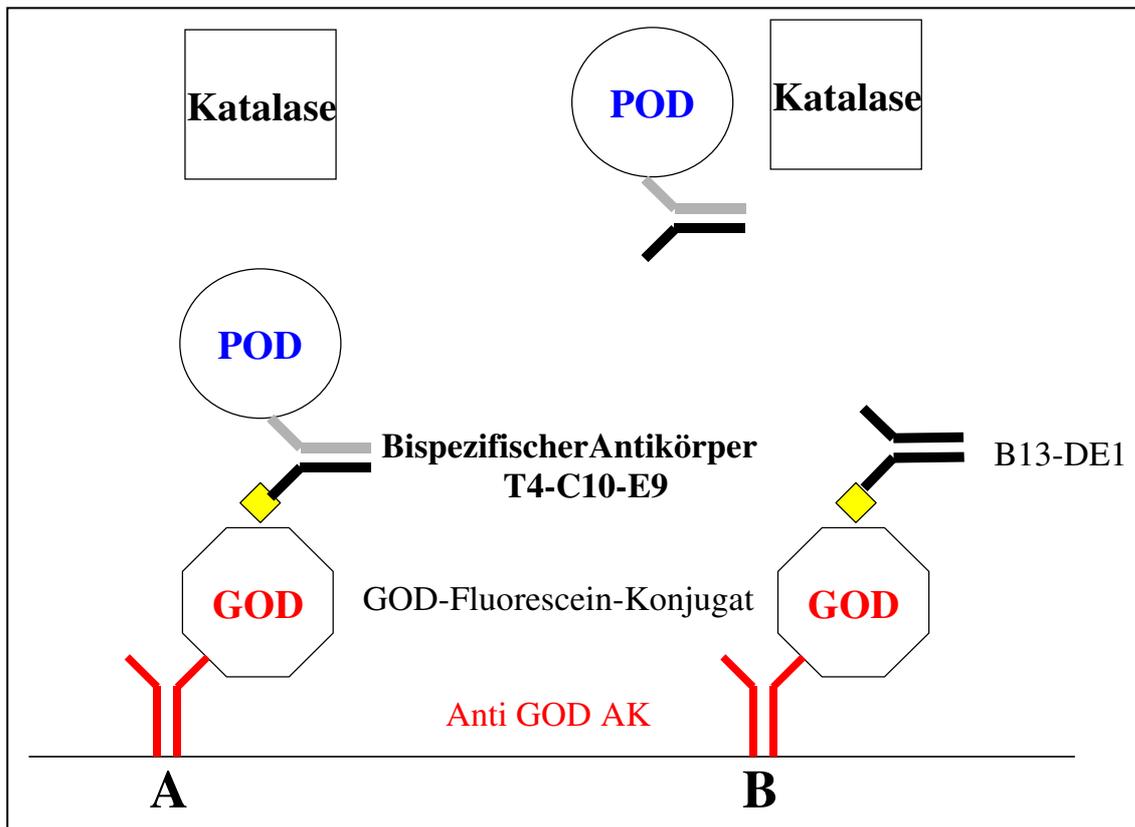


Abb. 4-4: Schematische Darstellung des *Substrate Channeling Immunoassays*: Vermittlung der räumlichen Nähe zwischen den Enzymen mittels eines monoklonalen bispezifischen Antikörpers. Die Enzyme GOD und POD befinden sich im aufgebauten Immunkomplex in räumlicher Nähe zueinander, was ein *Channeling* des H_2O_2 zwischen den beiden Enzymen ermöglicht. Die räumliche Nähe wird durch einen bispezifischen Antikörper vermittelt (A). Dieser *Channeling* Effekt wird mit Auflösung des Immunkomplexes durch Gabe des Analyten (Fluorescein bindender Antikörper B13-DE1) sukzessive bis zu dessen vollständigem Erliegen reduziert (B). Katalase sichert die Nachweisbarkeit dieses Prozesses, indem es das freigesetzte H_2O_2 abfängt, so daß dieses nur kurzzeitig für eine Umsetzung durch POD zur Verfügung steht.

Der Assay sollte wiederum für den Nachweis des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 eingesetzt werden. Dazu sollte wie folgt vorgegangen werden. Es wurden Mikrotiterplatten mit einem GOD bindende monoklonalen Antikörper beschichtet, der im anschließenden Inkubationsschritt ein GOD-Fluorescein Konjugat band. Im Unterschied zu dem bereits beschriebenen System wurde jedoch diesmal die räumliche Nähe zwischen den Enzymen GOD und POD durch einen monoklonalen bispezifischen Antikörper vermittelt. Der bispezifische Antikörper band sowohl das Fluorescein des GOD-Fluorescein Konjugats als auch POD. Dieses System wurde nun auf seine Tauglichkeit als homogener Immunoassay getestet. Der Immunkomplex wurde variierenden Konzentrationen des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 ausgesetzt. Die mit steigender Antikörperkonzentration zunehmende Auflösung des Immunkomplexes sollte in einer Abnahme des Meßsignals resultieren.

4.3. Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels *Fluorescence Quenching*

Das bereits vorgestellte System bestehend aus Fluorescein und dem Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1 verfügte über eine weitere, über die bloße Bindung zwischen Hapten und Antikörper hinausgehende, Eigenschaft. Die Fluoreszenz von Fluorescein wird durch die Bindung des Antikörpers B13-DE1 gelöscht. Wie frühere Experimente ergaben, ist dieses *Fluorescence Quenching* sehr effektiv, 99 % des Signals wird durch die Antikörperbindung gelöscht (Grunwald et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Es lag Nahe, diesen Effekt für den Aufbau eines homogenen Immunoassay auszunutzen.

Zu diesem Zweck sollte als Kern des Systems ein Konjugat aus einem Analyten und Fluorescein synthetisiert werden. Neben B13-DE1, der Fluorescein bindet, lag für die Versuche ein anderer monoklonaler Antikörper (B91-CG2) vor, der den Analyten Diuron band (Werner et al., 2002). Kerngedanke des Experimentes war es, daß beide Haptene (sowohl Fluorescein, als auch der Analyt) im Konjugat von ihrem jeweiligen Antikörper gebunden werden, jedoch eine gleichzeitige Bindung beider Makromoleküle, auf Grund der räumlichen Nähe beider Haptene im Konjugat, ausgeschlossen ist. Somit sollte sich entsprechend der vorhandenen Antikörper- und Konjugatkonzentrationen ein Gleichgewicht einstellen, das einfach und direkt über die Fluoreszenz des Fluoresceins (bzw. dessen Löschung) einer Messung zugänglich wäre. Externe Gaben des Analyten sollten dieses Gleichgewicht zugunsten der Bindung von Fluorescein durch den Fluorescein bindenden Antikörper und damit Fluoreszenz Löschung verschieben. Unter Zuhilfenahme einer zuvor aufgenommen Standardreihe würde somit eine Konzentrationsbestimmung des Analyten möglich.

Frühere Arbeiten zu einem derartigen *Fluorescence Quenching* Immunoassay von Nargessi et al. (1979), Zuk et al. (1979) und Ullman et al. (1981) waren über das Niveau eines bloßen Funktionsnachweises nicht hinausgekommen und wurden sehr bald aufgegeben bzw. vergessen. Im Unterschied zu diesen Arbeiten aus den achtziger Jahren, konnten die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente unter Verwendung hochaffiner, monoklonaler Antikörper durchgeführt werden, die für die damaligen Experimente nicht zur Verfügung standen. Die Empfindlichkeit des Systems sollte sich hierdurch derart erhöhen lassen, daß seine praktische Nutzung wahrscheinlich wird.

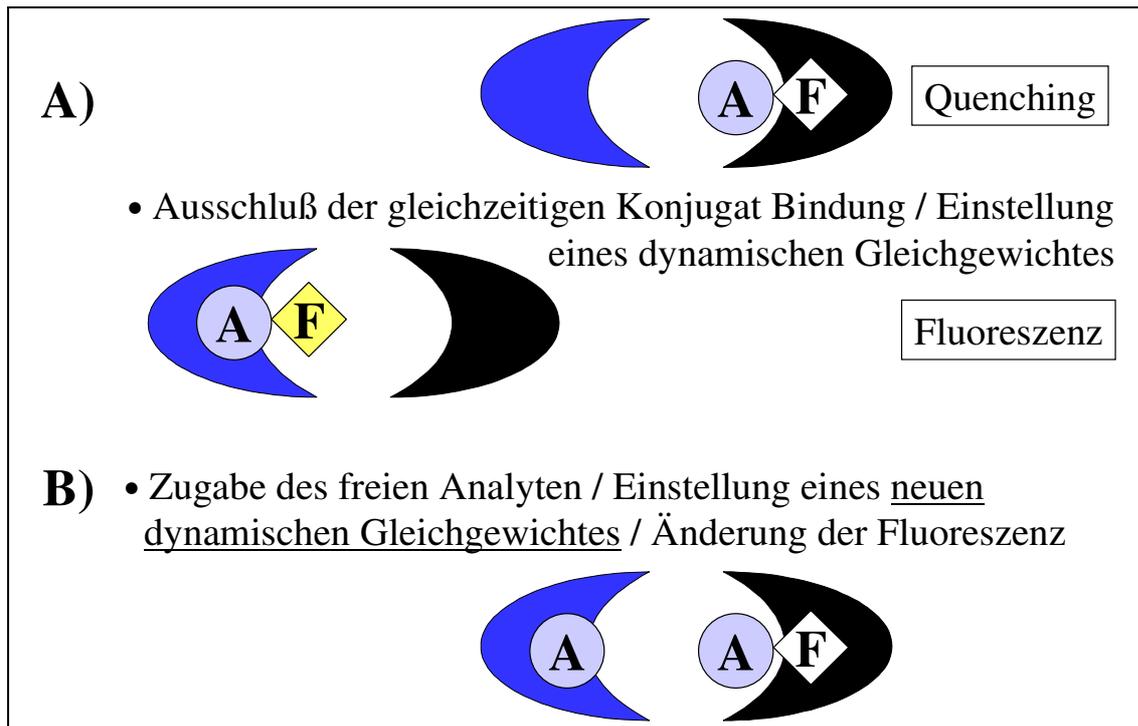


Abb. 4-5: Schematische Darstellung eines *Fluorescence Quenching Immunoassays*

Es konkurrieren zwei monoklonale Antikörper um die Bindung an ein Konjugat, bestehend aus dem Analyten (A) sowie Fluorescein (F). In Abhängigkeit von den Konzentrationen des Konjugats, der Antikörper sowie deren Affinitäten zum Konjugat stellt sich ein Gleichgewicht ein. Die Lage des Gleichgewichtes wird über die Fluoreszenz von Fluorescein bzw. deren Löschung nach Bindung durch den Antikörper B13-DE1 meßtechnisch verfolgt (A). Externe Gaben des Analyten (A) verschieben das Gleichgewicht zugunsten der Bindung des Fluorescein bindenden Antikörpers an das Konjugat und damit Löschung der Fluoreszenz (B).

4.4. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten

Die Produktion monoklonaler Antikörper erfordert nach wie vor aufwendige *Screening* Methoden zum Auffinden und zur Isolation des den Antikörper produzierenden Zellklons. Der Engpaß besteht dabei weniger in der Schwierigkeit der angewendeten Methoden, als vielmehr in ihrem enormen Zeit- und Materialaufwand. Zudem sind sie, vornehmlich aus Sterilitätsgründen, nur begrenzt einer Automatisierung zugänglich. Etwas positiver ist die Ausgangslage beim *Phagedisplay* zur Gewinnung von Einketten-Antikörper-Fragmenten. Hierbei erfolgt eine Selektion der Binder beim *Panning* durch Bindung an eine mit Antigen beschichtete Oberfläche. Generell wünschenswert wäre jedoch eine Methode, die die direkte Selektion des den Antikörper (oder das Antikörperfragment) produzierenden Zellklons ermöglicht. Eine solche Methode sollte im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden.

Anwendung fand wiederum die gegenseitige sterische Behinderung der Bindung von Molekülen an ein Konjugat bestehend aus zwei Hapten. Das Konjugat bestand aus einem an ein Toxin gekoppelten Liganden. Voraussetzung für dieses Experiment ist der Erhalt der Toxizität nach erfolgter Konjugation. Der Selektion sollte folgendes Prinzip zu Grunde liegen: Die Bindung eines Antikörpers an den Liganden im Toxinkonjugat verursacht die Inhibition der Toxizität des Toxins im Konjugat. Der gebundene Antikörper behindert dabei sterisch die Wechselwirkung des Toxinanteiles mit dessen Zielstruktur auf der Zelle. Zellen, die einen derartigen Antikörper sezernieren, erhalten einen Selektionsvorteil. Geeignete Konzentrationen des Toxinkonjugats vorausgesetzt, sollten sich derartige Zellen gegenüber nicht produzierenden Zellen bzw. gegenüber von Produzenten unerwünschter Binder im System anreichern.

Die Experimente wurden in *E.coli* durchgeführt. Das verwendete Toxin war Ampicillin. Ein Konjugat aus Fluorescein und Ampicillin wurde für die Selektion von Klonen verwendet, die das Fluorescein bindende Antikörperfragment (scFv B13-DE1) exprimierten.

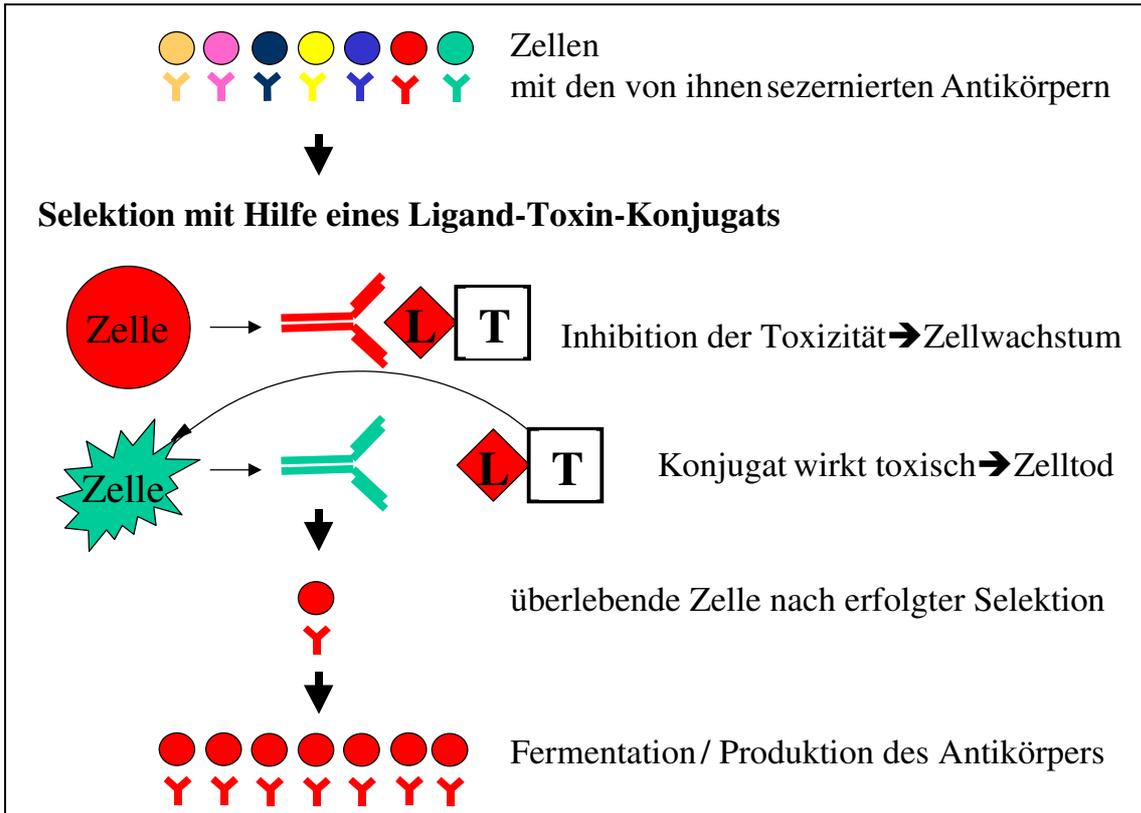


Abb. 4-6: Prinzip der Selektion einer einen spezifisch bindenden Antikörper sezernierenden Zelle mittels eines Konjugats aus Liganden (L) und Toxin (T). Die Selektion erfolgt aus einem Gemisch von Zellen, die unterschiedliche Antikörper sezernieren. Die Bindung eines Antikörpers an den Liganden (L) im Ligand-Toxin-Konjugat inhibiert die Wechselwirkung des Toxin-Anteils mit der Zelle. Nur Zellen, die einen den Liganden bindenden Antikörper sezernieren, überleben die Selektion.

5. Material und Methoden

Verwendete Materialien

Antikörper und Antikörperkonjugate:

9E10	anti myc tag	AG Biotechnologie	Chan et al., (1987)
E9-AA6	anti GOD	AG Biotechnologie	
D11-DG2	anti CEA	AG Biotechnologie	Jantscheff et al., (1991)
B91-CG5	anti Diuron/Monuron	AG Biotechnologie	Werner et al., (2002)
T4-C10-E9	anti FITC/POD	AG Biotechnologie	Karawajew et al., (1988)
B13-DE1	anti Fluorescein	AG Biotechnologie	Micheel et al., (1988)
scFv B13-DE1	anti Fluorescein	AG Biotechnologie	Schenk et al., (2007)
Ziege-anti-Maus-IgG - Fc spezifisch		Sigma, München	
Ziege-anti-Maus-IgG - POD		Dianova, Hamburg	

Enzyme:

Glucoseoxidase (GOD)	Sigma, München
Peroxidase (POD)	Sigma, München
Katalase	Sigma, Steinheim
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
M-MuLV Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Antibiotika:

Ampicillin	Fluka, Steinheim
Kalium Clavulanate	Biochemie S.p.A., Rovereto
Tetracycline	Fluka, Steinheim

Vektoren:

pOPE101	Kontermann et al., (1995)
pCANTAB	McCafferty et al., (1994)

Zellen und Zellklone:

XL-1 blue	Stratagene, La Jolla
Klon Z10	exprimiert scFv B13-DE1
Klon A3	exprimiert scFv Kontrolle

Chemikalien:

oligo(dT) ₁₅ Primer	BioTez GmbH, Berlin-Buch
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)	Riedel-de Haen, Seelze
5(6)-Carboxyfluorescein N-Succinimidylester	Sigma, München
D-Biotin-N-Hydroxy Succinimedester	Sigma, München
Streptavidin	Böhringer, Mannheim
TMB	Serva, Heidelberg

Konjugate:

Das Monuron-Fluorescein Konjugat (MW 670) wurde in unserem Auftrag durch die Firma Biosyntan GmbH (Berlin) synthetisiert.

5.1. Klonierung rekombinanter Antikörperfragmente (scFv) aus Hybridomen

Die Zielstellung sah den Aufbau eines *Substrate Channeling* Systems unter Verwendung eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers vor, der sowohl GOD als auch POD band. Die hierfür notwendigen Schritte zur Klonierung von rekombinanten Antikörperfragmenten (scFv) aus den vorhandenen Hybridomen (Behrsing et al., unpublizierte Daten) werden im Folgenden dargelegt. Alle gentechnischen Arbeiten erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, entsprechend der Protokolle aus *Molecular Cloning* (Sambrook and Russell, 2001).

RNA Isolation aus Hybridomzellen

Die Isolation der zellulären RNA aus den Hybridomen erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen InViSorb RNA Kit II von InViTek (Berlin). Grundlage der Isolation war das Standardprotokoll des Herstellers. Die folgenden Hybridome wurden als Ausgangsmaterial eingesetzt (Tab 5-1).

Hybridome, die Glucoseoxidase (GOD) bindende monoklonale Antikörper sezernieren:

Name des Hybridoms	Subklasse des Antikörpers
E9-AB12	IgG 2a
E9-BG10	IgG 2a
E9-CB 8	IgG 2a
E13-BC8	IgG 1
E13-HC3	IgG 2b
E13-AA6	IgG 2b

Hybridome, die Peroxidase (POD) bindende monoklonale Antikörper sezernieren:

Name des Hybridoms	Subklasse des Antikörpers
a-POD (Ternynck et al., 1983)	IgG 1
B92-ED7	IgG 1
B92-DG6	IgG 1
B92-FG9	IgG 1
B4-AMD	IgG 1
B49-DB12	IgG 2b

Tab. 5-1: Zusammenstellung der für die Klonierung von Antikörperfragmenten (scFv) eingesetzten Hybridome und der sezernierten Antikörper

cDNA Synthese

Der für das Umschreiben der mRNA in cDNA notwendige dT₁₅dV Primer wurde über BioTez Berlin-Buch GmbH bezogen. M-MuLV Reverse Transkriptase nebst Puffer waren Produkte von MBI Fermentas. Für die c-DNA Synthese wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

Amplifikation der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten (V_L und V_H)

Die Amplifikation der variablen Regionen der leichten (V_L) und schweren Ketten (V_H) erfolgte mittels PCR. Es kam eine Gruppe von entarteten Hin-Primern sowohl für die Amplifikation von V_L (L1-4) als auch von V_H (H1-5) zum Einsatz. Primer K (für Kappa) war der universelle Rück-Primer für die Amplifikation von V_L, Primer G (für IgG) der für V_H (Tab. 5-2). Das Design der Primer sowie das verwendete PCR-Protokoll wurden den Publikationen von Dübel et al., (1994) und Schenk et al., (1995) entnommen.

H1 (33mer)	<i>NcoI</i> 5' CAG CCG G CC ATG G CG CAG GT(C/G) CAG CTG CAG (C/G)AG 3'
H2 (51mer)	<i>NcoI</i> 5' CAG CCG G CC ATG G CG GAG GTG AAG CTG CAG GAG TCA GGA CCT AGC CTG GTG 3'
H3 (38mer)	<i>NcoI</i> 5' CAG CCG G CC ATG G CG CAG GT(C/G) (A/C)A(A/G) CTG CAG (C/G)AG TC(A/T) GG 3'
H4 (35mer)	<i>NcoI</i> 5' CCG G CC ATG G CG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GG 3'
H5 (32mer)	<i>NcoI</i> 5' CAG CCG G CC ATG G TC CA(A/G) CT(G/T) CTC GAG TC(A/T) GG 3'
G (39mer)	<i>Hind III</i> 5' ACC AGG GGC CAG TGG ATA GAC AAG CTT GGG TGT CGT TTT 3'
L1 (36mer)	<i>Mlu I</i> 5' GAA GCA A CGC GTA A GAT ATC (G/T)TG (A/C)T(G/C) ACC CAA (A/T)CT CCA 3'
L2 (41mer)	<i>Mlu I</i> 5' GAA GCA A CGC GTA A GAT ATC GTG AT(A/G) AC(A/C) CA(A/G) GAT GAA CTC TC 3'
L3 (41mer)	<i>Mlu I</i> 5' GAA GCA A CGC GTA A GAT ATC (A/T)TG (A/C)TG ACC CAA (A/T)CT CCA CTC CT 3'
L4 (41mer)	<i>Mlu I</i> 5' GAA GCA A CGC GTA A GAT ATC GT(G/T)CTC AC(C/T) CA(A/G) TCT CCA GCA AT 3'
K (30mer)	<i>BamHI</i> 5' GAA GAT GGA TCC AGC GGC CGC AGC ATC AGC 3'

Tab. 5-2: Primer zur Amplifikation der variablen Regionen muriner Antikörpergene

Die Hin-Primer für V_H enthalten eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease NcoI (blau), die Primer für V_L für MluI (rot). Der Rück-Primer G enthält eine Schnittstelle für HindIII, der Primer K eine Schnittstelle für BamHI (grau).

Klonierung der PCR-Amplifikate in einen Expressionsvektor

Für die Klonierung wurde der Vektor pOPE101 (Kontermann et al., 1995) verwendet. Alle Klonierungen erfolgten in *E.coli* (XL-1 blue) Zellen. Die Genfragmente für die schwere und die leichte Kette wurden zunächst getrennt voneinander kloniert. Zur Klonierung der V_H – Gene wurden Vektor wie Amplifikat mit NcoI / HindIII gespalten, zur Klonierung der V_L – Gene mit MluI / BamHI. Nach Ligation, Elektroporation, Anzüchtung und Reinigung der Konstrukte wurden diese mit XmnI / HindIII gespalten. Durch die Ligation der erhaltenen Halbvektoren wurden beide variablen Regionen, verbunden durch eine für ein Linkerpeptid kodierende DNA-Sequenz, in einem Vektor vereint. Mit diesem Vektor wurden wiederum *E.coli* (XL-1 blue) mittels Elektroporation transformiert. Die Expression des klonierten scFv lag unter Kontrolle eines *lac*-Promotors. Während der Klonierungsarbeiten wurde dieser Promotor durch Glucose reprimiert.

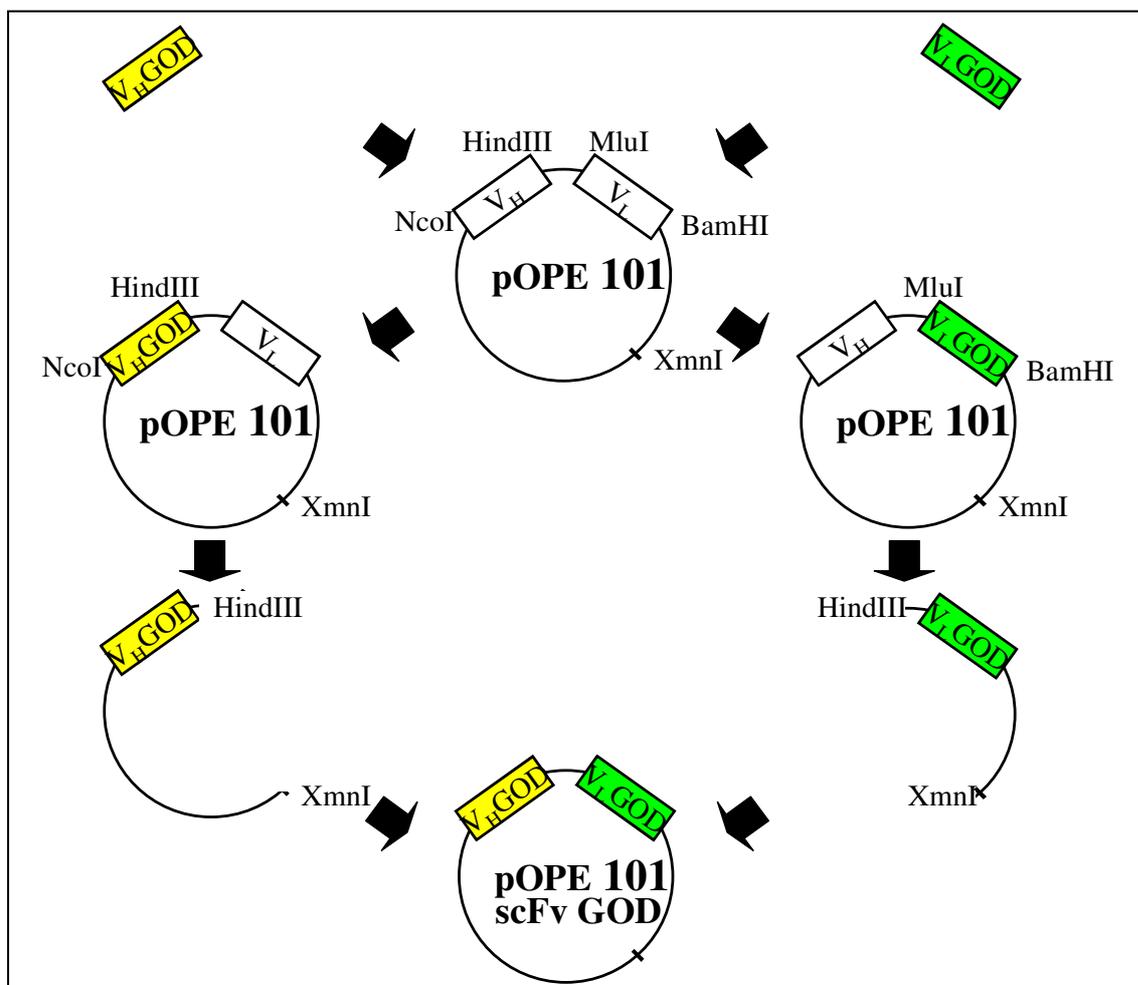


Abb. 5-3: Schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung rekombinanter Antikörperfragmente (scFv)

Expression, Isolation sowie Nachweis der rekombinanten Antikörperfragmente (scFv)

Die Expression des scFv wurde mittels IPTG induziert und das Expressionsprodukt in Kulturüberstand, Periplasma sowie Cytosol nachgewiesen.

In einem sich anschließenden ELISA erfolgte der Nachweis der Bindung des Antigens durch den klonierten und exprimierten scFv. Getestet wurde auf Bindung der Enzyme GOD bzw. POD. Dazu wurden auf Mikrotiterplatten folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Beschichtung mit 9E10 (anti myc tag): 20 µg/ml; 50 µl/well; in PBS; über Nacht bei 4°C
- Blockierung verbliebener Bindungsplätze mit neonatalem Kälberserum: 5 %; in PBS; 1h
- Bindung des scFv aus den Proben über dessen C-terminalen myc tag: 50 µl/well; 4h
- Zusatz des Enzyms GOD bzw. POD zur vorgelegten Probe: 5 µl; 50 µg/ml; in PBS; 1h

Anmerkung: Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Mikrotiterplatte mit Leitungswasser gewaschen.

- Substratreaktion mittels GOD- bzw. POD-Substratlösung 100 µl/well; 0,5h

GOD-Substratlösung: 1 Teil	TMB (1,2 mg/ml in Ethanol)
9 Teile	280 mM Glucose in 67 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 5,6
POD	1 µg/ml Endkonzentration

POD-Substratlösung: 1 Teil	TMB (1,2 mg/ml in Ethanol)
5 Teile	Harnstoff/H ₂ O ₂ (0,1 %)
4 Teile	NaH ₂ PO ₄ (0,1 M)

- Stop der enzymatischen Reaktion mittels H₂SO₄ (1 M) 100 µl/well
- Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm (630 nm)

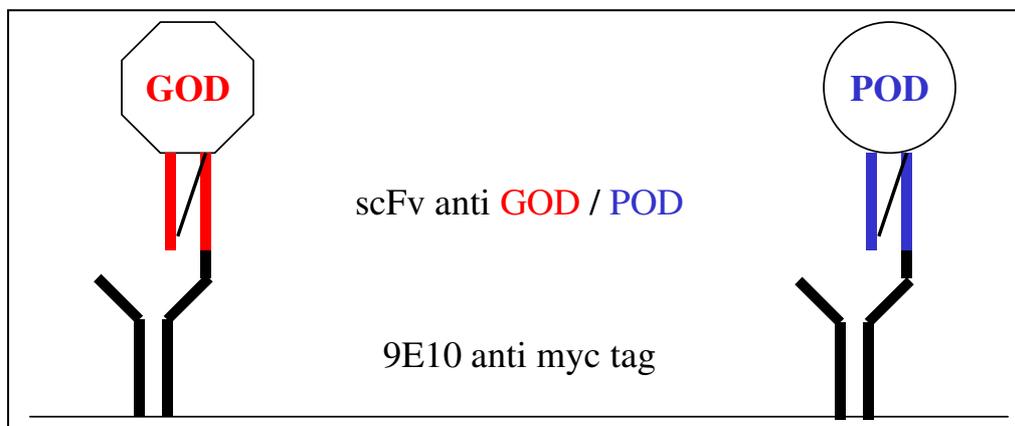


Abb. 5-4: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips zum Nachweis von GOD bzw. POD bindenden Antikörperfragmenten (scFv)

Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten, das Antikörperfragment (scFv) kodierenden, DNA-Sequenzen erfolgte durch InViTek GmbH (Berlin) mit Hilfe eines Kapilar-Sequenzers von Applied Biosystems (Langen).

5.2. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels *Substrate Channeling*

5.2.1. *Substrate Channeling* mittels etablierter Immunoassay-Techniken

Bestimmung von Antikörper-Konzentrationen mittels Substrate Channeling

Zur Durchführung des Experiments wurde ein Immunkomplex aufgebaut, in dem GOD und POD in großer räumlicher Nähe zueinander vorlagen (Abschnitt 4.2.1). Externe Gaben des Analyten (des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 (Micheel et al., 1988) führten zur Auflösung des Komplexes, was meßtechnisch über die Abnahme des Substratumsatzes verfolgt wurde. Auf Mikrotiterplatten wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Aufbau des Immunkomplexes

- Beschichtung mit Ziege-anti-Maus- IgG (Fc spezifisch): 10 µg/ml; 50 µl/well; in PBS; über Nacht inkubiert bei 4°C
- Blockierung verbliebener Bindungsplätze mit neonatalen Kälberserum: 5 %; in PBS; 1h
- Inkubation mit anti GOD Antikörper E9-AA6 Kulturüberstand: 50 µl/well; 1h
- Inkubation mit einem GOD-Carboxyfluorescein Konjugat: 1:100; 50 µl/well; in PBS; 1h (etwa 1mg/ml)
- Inkubation mit einem scFv B13-DE1 - POD Konjugat: 1:100; 50 µl/well; in PBS; 1h (etwa 1mg/ml)

Anmerkung: Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Mikrotiterplatte mit Leitungswasser gewaschen.

Das GOD-Carboxyfluorescein Konjugat wurde durch Kopplung von 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide Ester (FLUOS) an die Aminogruppen der GOD hergestellt (Aslam and Dent, 1998). Im Kopplungsansatz wurden 100 µg FLUOS und 1mg GOD eingesetzt. Das Präparat hatte eine Konzentration von etwa 1 mg/ml.

Die Kopplung des scFv B13-DE1 an POD erfolgte über dessen Aminogruppen an die zuvor mittels Perjodat aktivierten Zuckerreste der POD (Tijssen, 1985). Im Kopplungsansatz wurden 125 µg POD und 250 µg scFv B13-DE1 eingesetzt. Das Präparat hatte eine Konzentration von etwa 1 mg/ml.

2. Auflösung des Immunkomplexes durch den Analyten

Verdünnungsreihen, beginnend mit einer Konzentration von 1 mg/ml, wurden von dem Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1 bzw. dem scFv B13-DE1 sowie den Kontrollproteinen, dem CEA bindenden Antikörper D11-DG2 und BSA, angefertigt. Es wurden 150 µl/well aufgetragen.

3. Nachweis des *Substrate Channeling* im verbliebenen intakten Immunkomplex

Nach einer Stunde wurden 150 µl/well der Substratlösung zu den vorgelegten 150 µl hinzugegeben. Die Substratreaktion wurde nach einer Stunde mit 100 µl einer 1 M H₂SO₄ Lösung gestoppt und die optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge 630 nm).

Substratlösung:	10 ml	Gesamtvolumen		
	2 ml	TMB	1,2 mg/ml	in Ethanol
	20 µl	Katalase	1 mg/ml	in H ₂ O
	0,5 ml	Glucose	280 mM	in 67 mM NaH ₂ PO ₄ pH 5,6
	7,48 ml	NaH ₂ PO ₄	67 mM	in H ₂ O pH 5,6

Bestimmung von Haptenkonzentrationen mittels *Substrate Channeling*

Diese Experimente fanden in nahezu vollständiger Analogie zu den zuvor beschriebenen Experimenten zur Bestimmung von Antikörperkonzentrationen statt. Im Unterschied zu diesen wurden bei allen nun folgenden Experimenten die Mikrotiterplatten beim Aufbau des Immunkomplexes direkt mit dem GOD bindenden Antikörper E9-AA6 beschichtet (10 µg/ml; 50 µl/well; in PBS; 1h)

Nach Auftrag der Fluorescein-Verdünnungsreihe wurden alle weiteren Inkubationsschritte unter Lichtausschluß durchgeführt. Dies wurde notwendig, um eine Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein und eine damit einhergehende Überlagerung des dem Meßsystem zu Grunde liegenden, auf *Substrate Channeling* beruhenden, Meßsignals auszuschließen.

Dieser Effekt wurde während der vorliegenden Experimente beobachtet. Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente sind in Abschnitt 6.2.3 beschrieben.

Die Photooxidation von Peroxidase-Substraten durch Fluorescein ist eine unikale Eigenschaft dieses Haptens. Bei Wahl eines anderen Haptens zur Vermittlung der räumlichen Nähe zwischen den beiden Enzymen würde dieser Effekt nicht auftreten.

5.2.2. *Substrate Channeling* mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper

In diesen Experimenten wurde der Immunkomplex mit Hilfe des monoklonalen bispezifischen Antikörpers T4-C10-E9 (Karawajew et al., 1988) hergestellt (Abschnitt 4.2.2). Dieser war in der Lage, sowohl POD als auch das Hapten Fluorescein zu binden. Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Aufbau des Immunkomplexes

- Beschichtung mit dem anti-GOD-Antikörper E9-AA6: 10 µg/ml; 50 µl/well; in PBS; über Nacht inkubiert bei 4°C
- Blockierung verbliebener Bindungsplätze mit neonatalem Kälberserum: 5 %; in PBS; 1h
- Inkubation mit einem GOD-Carboxyfluorescein Konjugat: 1:500; 50 µl/well; in PBS; 1h (etwa 1mg/ml)
- Inkubation mit dem bispezifischen Antikörper T4-C10-E9: 1:10; 50 µl/well; in PBS; 1h (etwa 10 – 20 µg/ml; affinitätsgereinigt an immobilisierter POD) unter Zusatz von 5 µg/ml POD

Anmerkung: Alle Arbeitsschritte wurden durch einen Waschschrift mit Leitungswasser abgeschlossen.

Das GOD-Carboxyfluorescein Konjugat wurde durch Kopplung von 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide Ester (FLUOS) an die Aminogruppen der GOD hergestellt (Aslam and Dent, 1998). Im Kopplungsansatz wurden 100 µg FLUOS und 1mg GOD eingesetzt. Das Präparat hatte eine Konzentration von etwa 1 mg/ml.

2. Auflösung des Immunkomplexes durch den Analyten

Verdünnungsreihen beginnend mit einer Konzentration von 250 µg/ml wurden von dem Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1 bzw. dem scFv B13-DE1 sowie dem CEA bindenden Antikörper D11-DG2 und BSA angefertigt. Es wurden 100 µl/well aufgetragen.

3. Nachweis des *Substrate Channeling* im verbliebenen intakten Immunkomplex

Nach einer Stunde wurden 100 µl/well der Substratlösung zu den vorgelegten 100 µl hinzugegeben. Die Substratreaktion wurde nach einer Stunde mit 100 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge 630 nm).

5.3. Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein

Wie in den Experimenten zum *Substrate Channeling* beobachtet, verursachen hohe Fluorescein-Konzentrationen eine Photooxidation des Peroxidasesubstrats TMB. Das *Substrate Channeling System* wurde zuerst für die Bestimmung des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 etabliert. Um dieses jedoch auch für die Konzentrationsbestimmung von Fluorescein einzusetzen, war es unerlässlich, den Vorgang der Photooxidation im System zu verstehen und zu eliminieren. Dies war durch den Ausschluß von Licht möglich. Die folgenden Experimente wurden zu diesem Themenkomplex durchgeführt:

Nachweis der Photooxidation

Die Experimente wurden auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden 100 µl einer Fluorescein-Verdünnungsreihe vorgelegt. Im ersten Ansatz wurden 100 µl einer TMB-haltigen Lösung (0,24 mg/ml TMB; 20 % Ethanol; 67 mM NaH₂PO₄) zugegeben. Dem zweiten Ansatz wurden 100 µl einer TMB freien Lösung (67 mM NaH₂PO₄) zugesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde bei Tageslicht auf dem Arbeitsplatz belassen, nach einer Stunde mit 100 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt (Referenzwellenlänge 630 nm).

Inhibition der Photooxidation durch den Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1

Es wurden 50 µl einer Fluorescein Lösung vorgelegt (Endkonzentration im Gesamtansatz 0,5 µg/ml). Dazu kamen 50 µl der Verdünnungsreihen von B13-DE1 bzw. des CEA bindenden Kontrollantikörpers D11-DG2 sowie 100 µl der bereits beschriebenen TMB Lösung (0,24 mg/ml TMB; 20 % Ethanol; 67 mM NaH₂PO₄). Die Ansätze wurden parallel zueinander im Tageslicht belassen bzw. abgedunkelt. Die Reaktion wurde nach einer Stunde mit 100 µl; 1 M H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm (630 nm) vermessen.

5.4. Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels *Fluorescence Quenching*

Das Prinzip dieses Assays beruht auf dem Ausschluß der gleichzeitigen Bindung zweier Antikörper an ein Konjugat aus Monuron und Fluorescein. Die Lage des sich in Lösung einstellenden dynamischen Gleichgewichts wird durch die Gabe des Analyten Diuron verschoben. Diese Gleichgewichtslage ist über die Fluoreszenz von Fluorescein (die nach Bindung des Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1 gelöscht wird) meßtechnisch zugänglich (Abschnitt 4.3).

Die Messungen zum *Fluorescence Quenching* erfolgten in PBS in sich wie folgt zusammensetzenden Ansätzen.

Anti-Fluorescein Antikörper	B13-DE1	80 nM
Anti-Diuron Antikörper	B91-CG5	20 nM
Monuron-Fluorescein Konjugat		10 nM

Die Fluoreszenz-Messung erfolgte fünf Minuten nach Zugabe des Analyten Diuron in einem Endvolumen von 200 µl. Die Wellenlänge der Anregung war 494 nm, die der Emission 525 nm. Für jeden Meßpunkt wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Messungen wurde ein Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS50B eingesetzt.

5.5. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten

Das Selektionsprinzip beruht auf dem Einsatz eines Konjugats bestehend aus einem Liganden sowie einem Toxin. Die Toxizität dieses Konjugats auf *E.coli* Zellen wird durch die Bindung eines Antikörpers an den Liganden inhibiert. Dies ermöglicht dem Produzenten des Antikörpers das Überleben in einem entsprechenden Selektionsmedium. Nichtproduzenten bzw. Produzenten unerwünschter Antikörpers sterben (Abschnitt 4.4).

Synthese der Toxinkonjugate

5(6)-Carboxyfluorescein N-Succinimidylester (Sigma) wurde mit Ampicillin in einem molaren Verhältnis von 2:1 konjugiert. In der Reaktion wurden 2 mg des Fluorescein-Derivats und 1 mg Ampicillin eingesetzt. Die Reaktion fand in 0,5 ml PBS, bei Raumtemperatur statt. Sie wurde nach zwei Stunden durch die Zugabe von 1 M Tris; pH 7.5 in einem Volumenverhältnis von 1:10 gestoppt. Das resultierende Fluorescein-Ampicillin Konjugat (FITCillin) wurde ohne weitere Reinigung für die Experimente eingesetzt. Die Konzentration des Konjugats wurde als identisch zu der des für die Konjugation eingesetzten Ampicillin definiert.

Das Biotin-Ampicillin Konjugat (Biotinillin) wurde in Analogie dazu unter Verwendung von D-Biotin-N-Hydroxy Succinimidester (Sigma) synthetisiert.

Inhibition der Wirkung des Toxinkonjugats auf *E.coli* durch bindende Makromoleküle

Alle anschließend beschriebenen Experimente wurden in Zellkulturplatten (TPP; Flachboden), in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt. Die Ansätze setzten sich zu gleichen Teilen wie folgt zusammen aus:

1. einer Verdünnungsreihe des Antikörpers B13-DE1 in einem Kontrollantikörper (D11-DG2) gleicher Konzentration (10 mg/ml) und
2. einer Suspension von *E.coli* (XL-1 blue) in 2YT Kulturmedium

Die Endkonzentration des Toxinkonjugats FITCillin betrug 45 µg/ml. Die Testansätze wurden über Nacht bei 37°C und unter mäßigem Schütteln inkubiert und das Bakterienwachstum am folgenden Tag mittels Messung der optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt.

Die Experimente zum Toxinkonjugat Biotinillin wurden in Analogie zu den beschriebenen Experiment mit Streptavidin (Boehringer, Mannheim) an Stelle des Antikörpers durchgeführt. Im Unterschied zum FITCillin Experiment erfolgte die Verdünnung des Streptavidins in PBS. Biotinillin wurde in diesem Experiment in einer Endkonzentration von 22 µg/ml eingesetzt.

Selektion scFv exprimierender Zellen

Für dieses Selektionsexperiment wurde eine Mischung aus zwei *E.coli* Klonen verwendet. Klon Z10 (Schenk et al., 2007) exprimierte den Fluorescein bindenden scFv B13-DE1. Klon A3 (Böttger; nicht publiziert) wurde als Kontrollklon zur Überwachung des Selektionserfolgs eingesetzt. Er exprimierte ein Antikörperfragment (scFv), das keine der im System verwendeten Komponenten band. Beide Zellklone unterschieden sich lediglich in der Art des von ihnen exprimierten scFv, ihr Wachstum war, auch nach Induktion der Expression, bei den für die Selektion relevanten Antibiotika-Konzentrationen, identisch. Beide Antikörper-Sequenzen waren in einen pCANTAB Vektor (McCafferty et al., 1994) kloniert. Die durch den Vektor kodierte β -Lactamase wurde in den Experimenten durch Kalium Clavulanate (Biochemie S.p.A. Rovereto – Italien) inhibiert. Eine aktive β -Lactamase würde den β -Lactamring im Ampicillinanteil des Toxinkonjugats spalten und damit dessen Toxizität aufheben. Eine Selektion, basierend auf der Toxizität von β -Lactam - Antibiotika wäre ohne diesen Inhibitor nicht möglich.

Die Experimente wurden wiederum in einem Volumen von 100 µl auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Ansätze bestanden aus:

1. 10 µl Antibiotikum, FITCillin bzw. Ampicillin,
2. 10 µl Kalium Clavulanate und
3. 80 µl 2YT Kulturmedium, das 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µM IPTG sowie beide Zellklone in definiertem Mischverhältnis (in sehr geringer, spektrometrisch nicht mehr nachweisbarer Konzentration) zueinander enthielt.

Die Endkonzentrationen der Antibiotika wurden von 53,33 bis 0,92 µg/ml, die des β -Lactamase Hemmers Kalium Clavulanate von 20 bis 5,92 µg/ml variiert. Die Ansätze wurden wie bereits beschrieben über Nacht bei 37°C und unter mäßigem Schütteln inkubiert und das Bakterienwachstum am folgenden Tag mittels Messung der optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt. Derjenige Ansatz, in dem ein langsam aufkommendes Wachstum zu beobachten war, wurde für die sich anschließende Beurteilung des Selektionserfolges herangezogen. Die in ihm enthaltenen Zellen wurden nach geeigneter

Verdünnung auf Kulturplatten (2YT; 1,5 % Agar; 10 µg/ml Tetracyclin) ausgestrichen. Diese Kulturplatten erlaubten das Wachstum beider Zellklone. Nach einer Inkubation bei 37°C wurden am nächsten Morgen Einzelklone gepickt und in Zellkulturplatten (TPP, 96 well, Flachboden) mit Kulturmedium (2YT; 10 µg/ml Tetracyclin; 100 µM IPTG) überführt. Das Kulturmedium erlaubte wiederum das Wachstum beider Zellklone sowie induzierte zusätzlich die Expression der Antikörperfragmente. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und unter mäßigem Schütteln wurden die im Kulturüberstand befindlichen Antikörperfragmente im ELISA auf Fluorescein-Bindung getestet.

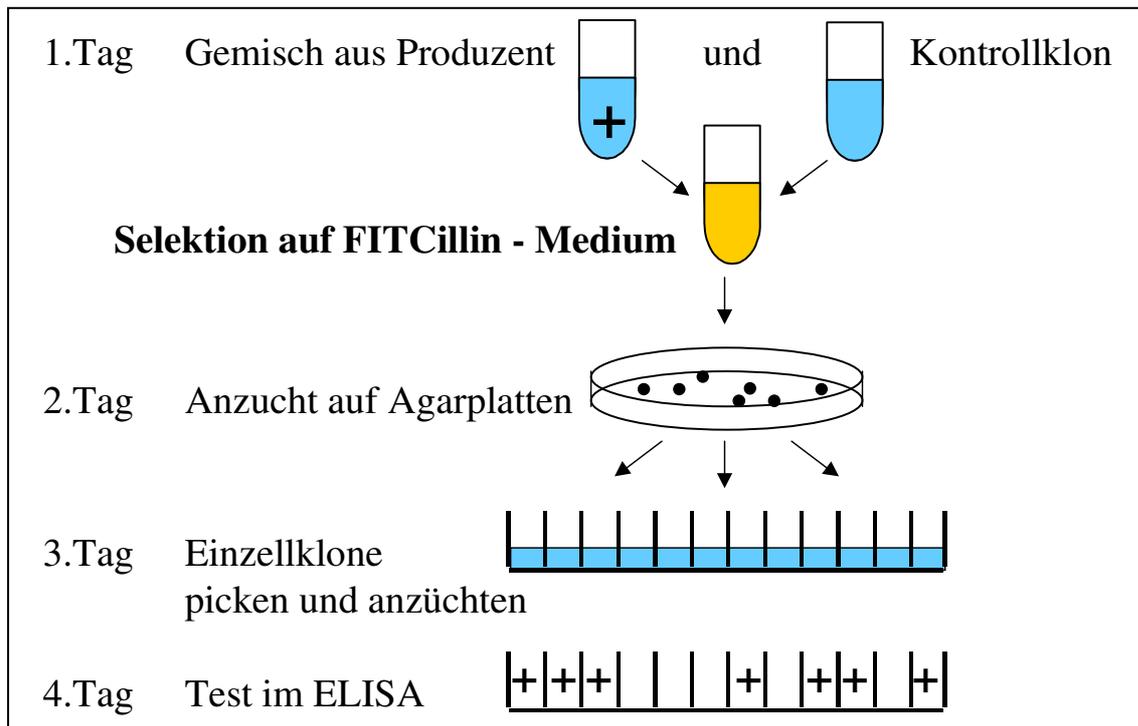


Abb. 5-5: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Selektion von *E.coli* Zellen, die den Fluorescein bindenden scFv B13-DE1 sezernieren.

Für den Nachweis des Fluorescein bindenden scFv B13-DE1 wurden mit einem BSA-Fluorescein Konjugat beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Der an Fluorescein gebundene scFv B13-DE1 wurde über dessen myc-tag durch den Antikörper 9E10 gebunden. Der Nachweis dieses Antikörpers erfolgte über ein Ziege-anti-Maus-IgG - Peroxidase Konjugat. Der Umsatz des Peroxidase-Substrats TMB wurde photometrisch bei 450 nm (Referenz 630 nm) bestimmt.

Folgende Inkubationsschritte wurden dabei durchgeführt:

- Beschichtung mit BSA-Fluorescein: 10 µg/ml; in PBS; 50 µl/well; über Nacht bei 4°C
- Blockierung verbliebener Bindungsplätze mit neonatalem Kälberserum: 5 %; in PBS; 1h
- Inkubation mit Kulturüberständen der induzierten Einzellklone 100 µl/well; 1h
- Inkubation mit 9E10 (anti myc tag): 20 µg/ml; 50 µl/well; 1h
- Inkubation mit Ziege anti-Maus-IgG – Peroxidase (Sigma): 1 : 5000; 50 µl/well; 1h

Anmerkung: Alle bisherigen Inkubationsschritte wurden durch einen Waschschrift mit Leitungswasser abgeschlossen.

- TMB-Substrat Lösung (Siehe 5.2.1): 50 µl/well; 10 min
- Stop der enzymatischen Reaktion mittels H₂SO₄ (1 M) 50 µl/well
- Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 630 nm)

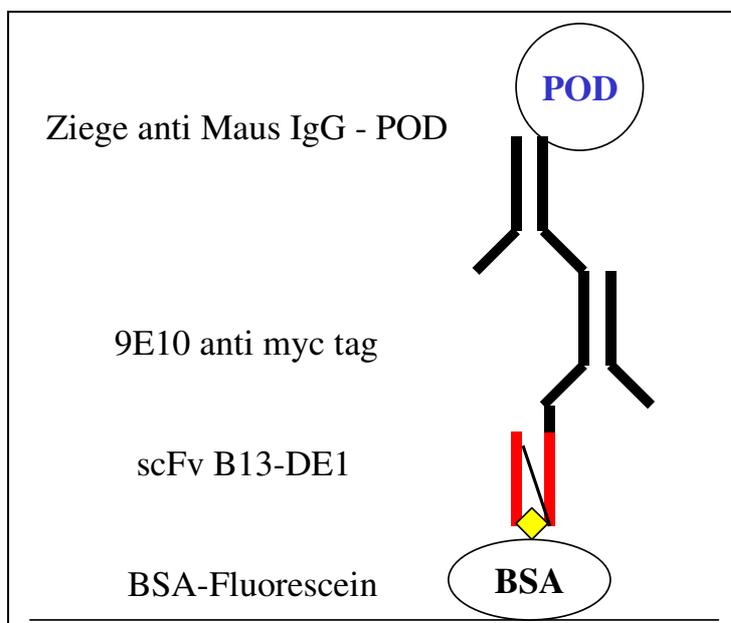


Abb. 5-6: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips zum Nachweis des Fluorescein bindenden scFv B13-DE1

6. Ergebnisse

6.1. Klonierung bispezifischer rekombinanter Antikörper

Die Klonierung eines bispezifischen rekombinanten Antikörperfragments setzt die Klonierung von Einketten-Antikörper-Fragmenten (scFv) der beiden gewünschten Spezifitäten voraus. Es standen jeweils mehr als zehn Hybridome zur Verfügung, die stabil Antikörper (IgG) gegen POD sowie GOD produzierten. Es wurden für jedes Enzym je zehn Hybridome ausgewählt, um die Antikörper-Gene zu amplifizieren. Insgesamt gelang es, zwei scFv zu klonieren, einen mit einer Bindungsspezifität für GOD und einen für POD. Die Benennung der Klone erfolgte in Anlehnung an die für die Klonierung eingesetzten Hybridome. Der das Enzym GOD bindende scFv wurde scFv E13-BC8 benannt. Die Sequenz dieses scFv wurde ermittelt (Abb. 6-3). Es konnte gezeigt werden, daß scFv E13-BC8 gelöste GOD bindet, wobei die Aktivität des Enzyms erhalten bleibt (6-1). Der das Enzym POD bindende scFv wurde scFv B92-FG9 benannt. Seine Antigen-Bindung ist im Abb. 6-2 dargestellt.

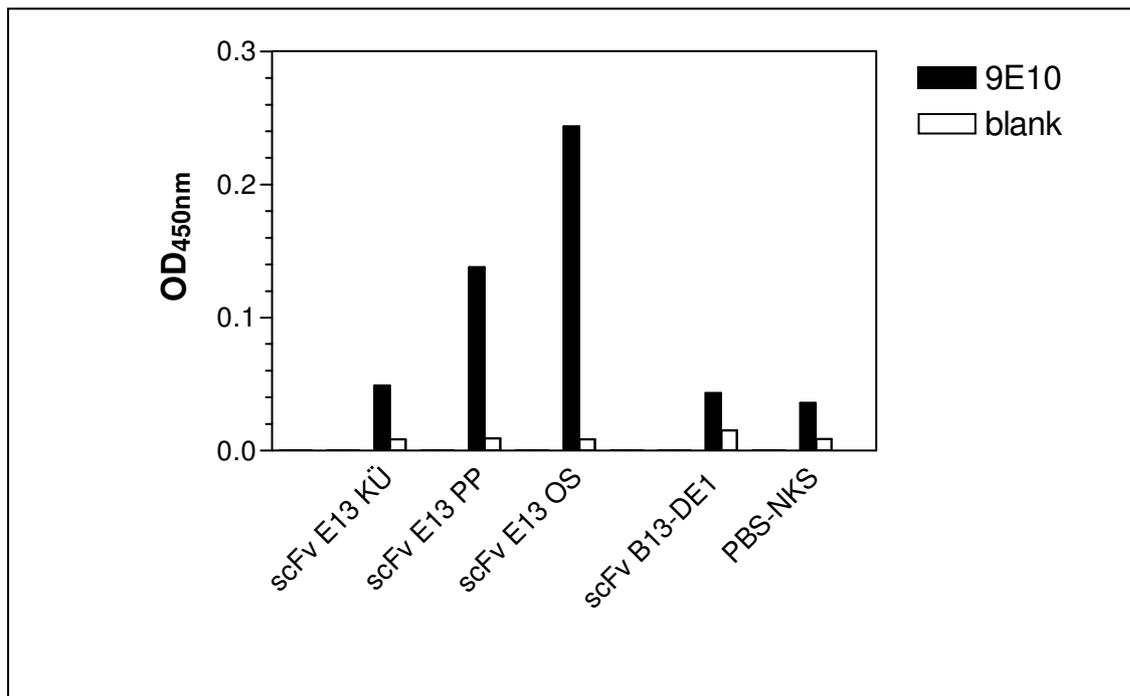


Abb. 6-1: Nachweis der Antigenbindung (GOD) für den scFv E13-BC8

Aufbau des ELISA: Mikrotiterplatten wurden mit dem Antikörper 9E10 beschichtet. Der Antikörper 9E10 band den myc-tag des scFv E13-BC8 aus unverdünntem Kulturüberstand (KÜ), Periplasma- (PP) oder osmotischer Schock- (OS) Fraktion. Der immobilisierte scFv band im Anschluß sein Antigen (GOD), dessen enzymatische Aktivität photometrisch bestimmt wurde. Der scFv B13-DE1 sowie PBS-NKS dienen als Negativ-Kontrollen.

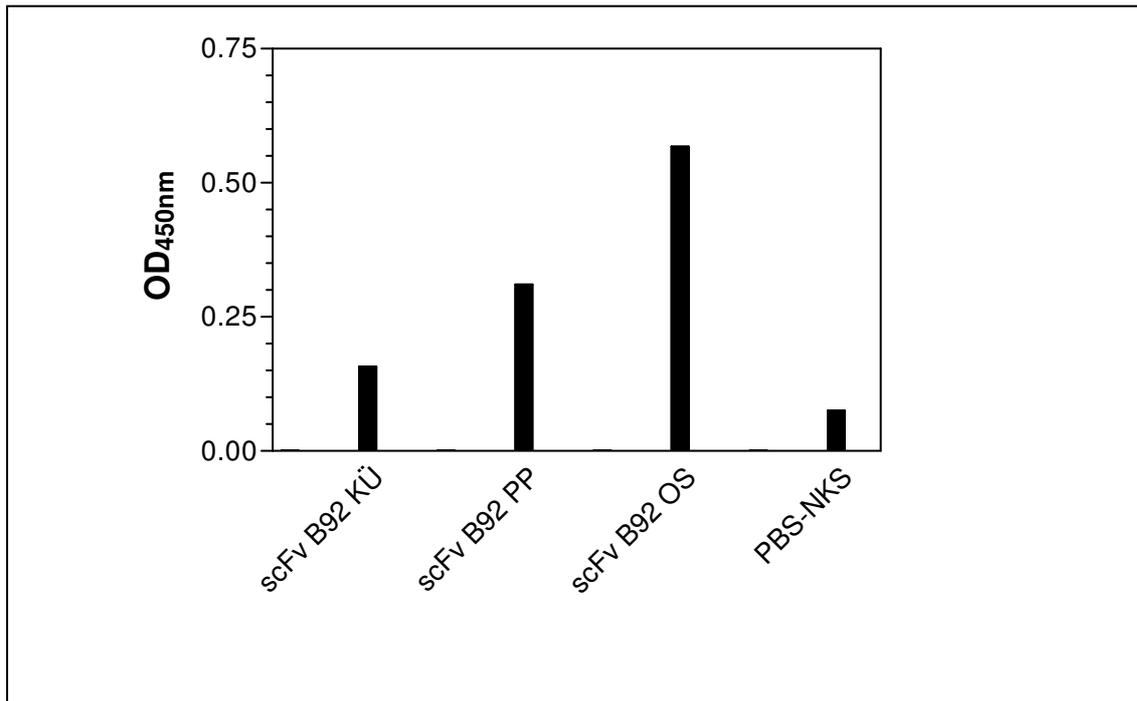


Abb. 6-2: Nachweis der Antigenbindung (POD) für den scFv B92-FG9.

Aufbau des ELISA: Mikrotiterplatten wurden mit dem Antikörper 9E10 beschichtet. Der Antikörper 9E10 band den myc-tag des scFv B92-FG9 aus unverdünntem Kulturüberstand (KÜ), Periplasma- (PP) oder osmotischer Schock- (OS) Fraktion. Der immobilisierte scFv band im Anschluß sein Antigen (POD), dessen enzymatische Aktivität photometrisch bestimmt wurde. PBS-NKS dienten als Negativ-Kontrolle.

Mit diesen beiden scFv ist die Grundlage zur Konstruktion eines bispezifischen rekombinanten Antikörpers, der die Bindungsspezifitäten für GOD und POD in einem Molekül vereint, geschaffen. Die Arbeiten zu dessen Klonierung wurden jedoch nicht begonnen. Ausschlaggebend für diese Entscheidung waren die im folgenden Abschnitt (*Substrate Channeling* mittels etablierter Immunoassay-Techniken) beschriebenen Ergebnisse, die einen solchen Aufwand nicht rechtfertigten.

pelB		MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMA
V _H	FR I	EVKLQESGPSLVAPSQSL SITCTVSGFSLT
	CDR I	NDGVD
	FR II	WVRQPPGKGLEWLG
	CDR II	VIWGGGSTNYNSALMS
	FR III	RLSINKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAK
	CDR III	HELGRGFAY
	FR IV	WGQGTLVTVSA
Linker		AKTTPKLEEGEFSEARV
V _L	FR I	DILMTQSPLSLPVSLGDQTSISC
	CDR I	RSSQSIVHSNGNTYLE
	FR II	WYLQKPGQSPKLLIY
	CDR II	KVSNRFS
	FR III	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
	CDR III	FQGSHFPWT
	FR IV	FGGGTKLEIK
Tags		RADAAS EQKLISEEDL S HHHHHH

Abb. 6-3: Aminosäuresequenz des Glucoseoxidase bindenden scFv E13-BC8.

Die Darstellung der Sequenz erfolgt aufgeschlüsselt nach *Framework* Regionen (FR) und *Complementary determining regions* (CDR) der variablen Domäne der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) der Antigenbindungsregion (nach Kabat et al., 1991). Die Sequenz ist N-terminal flankiert durch die pelB Leadersequenz und C-terminal durch myc und his *Affinitytags*.

6.2. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels *Substrate Channeling*

6.2.1. *Substrate Channeling* mittels etablierter Immunoassay-Techniken

An der festen Phase der Mikrotiterplatte wurde ein Immunkomplex aufgebaut. In diesem lagen, wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, die beiden Enzyme GOD und POD in räumlicher Nähe zueinander vor. Dieser Immunkomplex wurde als konstanter Kern bei allen Experimenten beibehalten. Variiert wurden die Konzentrationen der Glucose, Katalase, dem POD-Substrat TMB, sowie die Pufferbedingungen und die Volumina der Ansätze. Ziel dieser Optimierungsarbeiten war es, maximale Meßsignale für den intakten Immunkomplex sowie minimale für den aufgelösten Komplex zu erzielen. Aufgelöst wurde der Immunkomplex durch Verdrängung des an GOD-Fluorescein gebundenen scFv B13-DE1 - POD - Konjugats entweder durch freies Fluorescein oder durch den Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1 (Abschnitt 4.2.1).

6.2.1.1. *Substrate Channeling Immunoassay* zur Konzentrationsbestimmung des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1

Das System wurde nunmehr variierenden Konzentrationen des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 sowie des scFv B13-DE1 ausgesetzt. Die mit steigender Antikörperkonzentration erfolgende Auflösung des Immunkomplexes resultierte in einer Abnahme des Meßsignals. Eine Antikörperkonzentration von 50 µg/ml bewirkte die vollständige Auflösung des Immunkomplexes. Als Negativkontrollen dienten der CEA bindende Antikörper D11-DG2 sowie BSA. Die Ergebnisse dieser Verdrängung sind in Abb. 6-4 dargestellt.

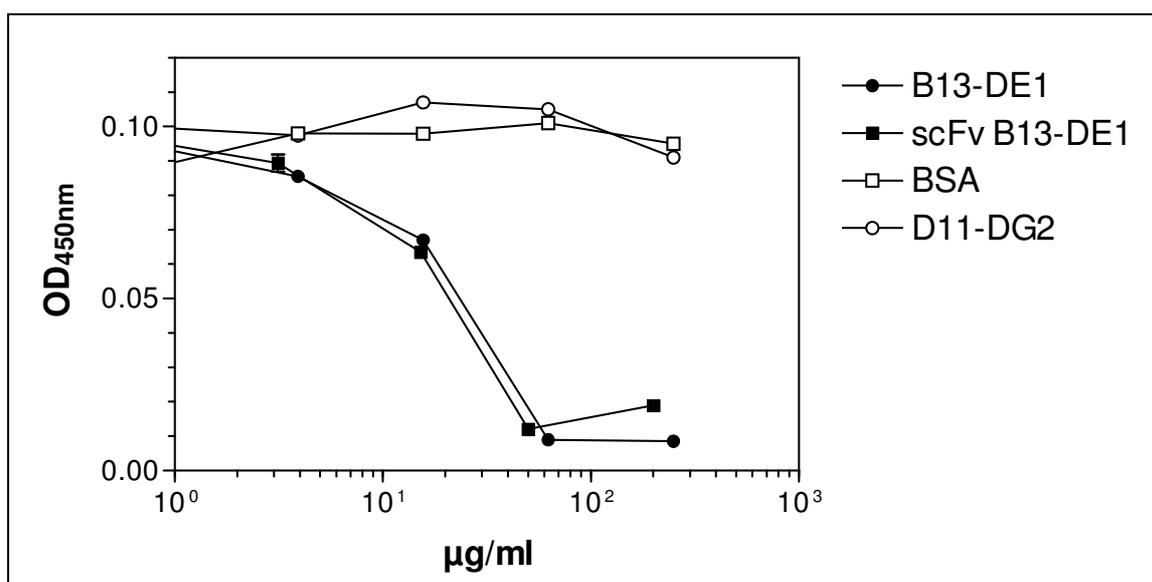


Abb. 6-4: *Substrate Channeling Immunoassay* zur Konzentrationsbestimmung des Antikörpers B13-DE1 und des scFv B13-DE1.

6.2.1.2. *Substrate Channeling* Immunoassay zur Konzentrationsbestimmung des Haptens Fluorescein

Die Experimente wurden wiederholt, indem diesmal der Immunkomplex nicht wie zuvor durch Antikörperbindung sondern durch das freie Hapten Fluorescein aufgelöst wurde. Fluorescein verdrängt dabei das scFv B13-DE1 - POD - Konjugat aus seiner Bindung an das GOD-Fluorescein Konjugat. Die daraus resultierende Reduktion des Meßsignals wird zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Eine Fluorescein-Konzentration von 250 µg/ml bewirkte die vollständige Auflösung des Immunkomplexes und damit einhergehend den Zusammenbruch des *Substrate Channeling* Effekts. (Abb. 6-5).

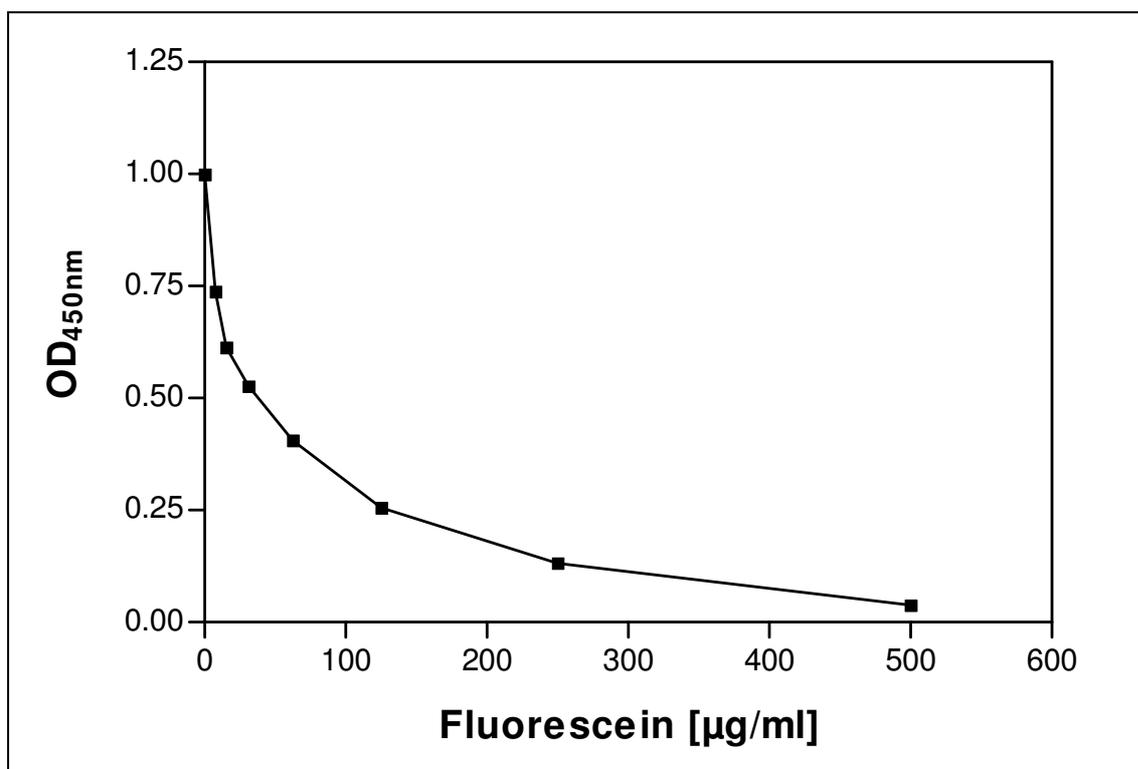


Abb. 6-5: *Substrate Channeling* Immunoassay zur Konzentrationsbestimmung des Haptens Fluorescein

Es war notwendig diese Experimente in Dunkelheit durchzuführen, um die Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein zu unterbinden. Die Photooxidationseffekte und die sich daraus ergebenden Arbeiten und Ergebnisse sind im Abschnitt 6.2.3 zusammengefaßt.

6.2.1.3 Versuche zur Optimierung des *Substrate Channeling Systems*

Die bisher zusammengetragenen Ergebnisse bestätigten die Eignung des verwendeten System, für den Aufbau homogener Immunoassays. Die im Experiment erzielten Sensitivitäten waren jedoch nicht zufriedenstellend. Daher wurden eine Reihe von Arbeiten mit dem Ziel einer Optimierung des Systems unternommen.

Das ursprüngliche *Channeling System* sah eine an der festen Phase immobilisierte GOD vor, welche von POD-Molekülen umgeben war. Der Versuch dieses Prinzip umzukehren, d.h. POD durch GOD-Moleküle zu umgeben, führte zu keiner Verbesserung der Sensitivität des Systems (Abb. 6-6 A).

In einem weiteren Optimierungsversuch wurde abweichend vom ursprünglichen System immobilisierte Katalase (ein Konjugat aus scFv B13-DE1 und Katalase) eingesetzt (Abb. 6-6 B). Katalase-Moleküle umgaben nunmehr die immobilisierte GOD, Peroxidase befand sich in Lösung. Die Aufgabe der Katalase war es, das durch die GOD freigesetzte Wasserstoffperoxid zu zersetzen, und es somit der Reaktion mit Peroxidase zu entziehen. Die beobachtete maximale Abschirmung der GOD durch die sie umgebenden Katalase-Moleküle war mit etwa sieben Prozent zu gering, um bei Auflösung des immunologischen Komplexes mit verwertbaren Meßsignalen rechnen zu können. Der Optimierungsansatz wurde somit aufgegeben.

In einem dritten Optimierungsversuch wurde der in den ursprünglichen Experimenten verwendete Immunkomplex von weiteren GOD bindenden Antikörpern (die jedoch nicht mit dem eigentlichen System interferierten) sowie zusätzlich von anti - Maus Ig Antikörpern umgeben (Abb. 6-6 C). Ziel dieser „Aufblähung“ des Immunkomplexes war es, eine bessere Abschirmung des Komplexes vor der frei in Lösung befindlichen Katalase zu erreichen. Diese Strategie war prinzipiell erfolgreich. Der erwartete abschirmende Effekt war zu beobachten (Abb. 6-7). Jedoch blieb die Sensitivität des Systems davon nahezu unbeeinflusst.

Die den Experimenten zugrunde liegenden Prinzipien sind schematisch in Abbildung 6-6 zusammengestellt.

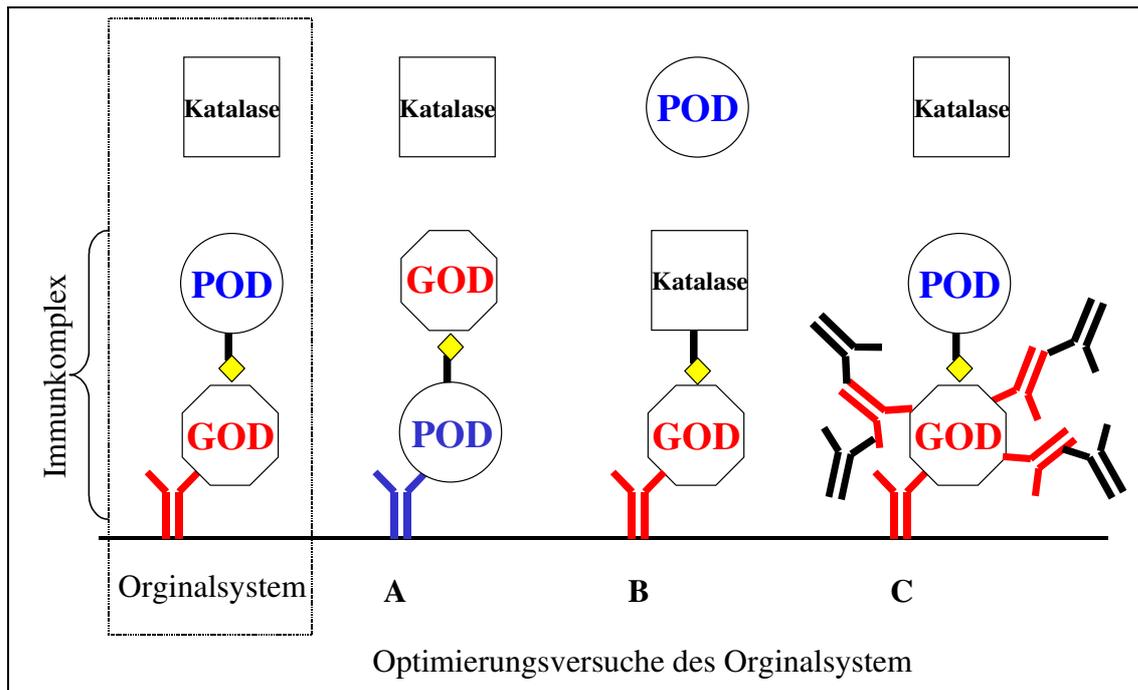


Abb. 6-6: Schematische Darstellung der beschriebenen Optimierungsversuchen. Das Originalsystem wurde durch Austausch der Enzyme (A, B) bzw. durch Abschirmung des Immunkomplexes mittels weiterer Antikörpermoleküle modifiziert (C).

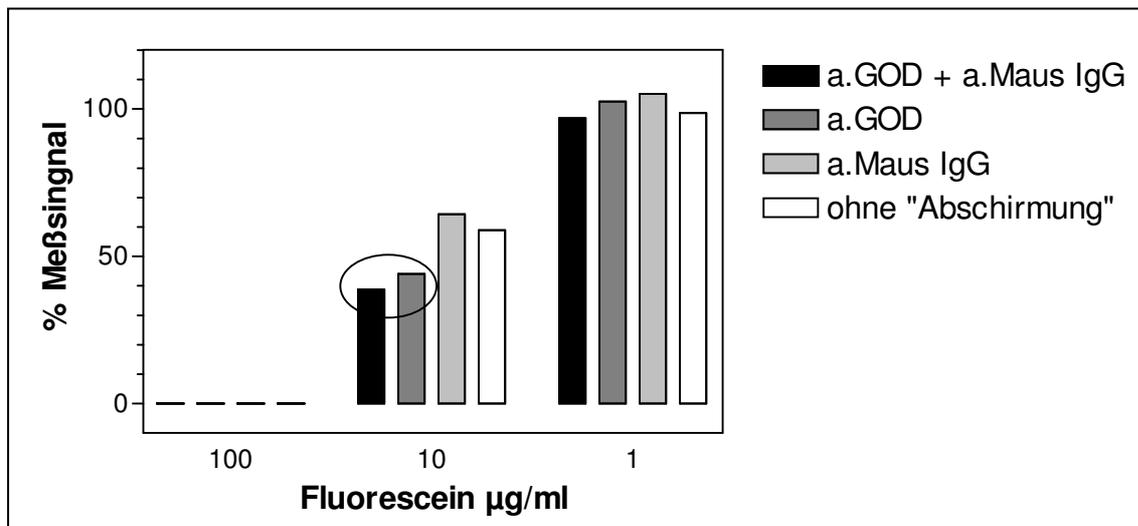


Abb. 6-7: Versuch zur Optimierung des *Substrate Channeling* Systems durch eine Abschirmung des aufgebauten Immunkomplexes in Folge der zusätzlichen Bindung von anti-GOD und anti-Maus-IgG Antikörpern (vgl. Abb. 6-6. C).

Die Darstellung erfolgte in Relation zum absoluten Meßsignal, erhalten für den intakten Immunkomplex. Die weißen Balken repräsentieren das Verhalten des ursprünglichen Systems bei Auflösung des Immunkomplexes durch freies Fluorescein. Der Einfluß des abschirmenden Effekts auf die Signalhöhe ist insbesondere für den schwarzen Balken deutlich sichtbar. Ein deutlicher Einfluß auf die Sensitivität des *Substrate Channeling* Systems blieb jedoch aus.

6.2.2. *Substrate Channeling* mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper

Zur Vermittlung der räumlichen Nähe zwischen den beiden Enzymen GOD und POD wurde bei diesen Experimenten der monoklonale bispezifische Antikörper T4-C10-E9 verwendet. Der bispezifische Antikörper band sowohl das Fluorescein des GOD-Fluorescein Konjugats als auch POD. Der Aufbau dieses Experiments kommt somit den ursprünglichen Vorstellungen von der Verwendung eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers sehr nah. Der Immunkomplex wurde variierenden Konzentrationen des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 ausgesetzt. Die mit steigender Antikörperkonzentration erfolgende Auflösung des Immunkomplexes resultierte in einer Abnahme des Meßsignals (Abschnitt 4.2.2). Das Experiment wurde parallel auch für den scFv des Antikörpers durchgeführt. Als Kontrollen dienten der CEA bindende Antikörper D11-DG2 sowie BSA. Bei einer Antikörperkonzentration von 100 µg/ml wurde der Immunkomplex offenbar vollständig aufgelöst, denn die *Substrate Channeling* Reaktion kam vollständig zum Erliegen. Damit sind die für den monoklonalen bispezifischen Antikörper T4-C10-E9 erzielten Ergebnisse vergleichbar zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen, die unter Verwendung etablierter Immunoassay-Techniken erzielt wurden (Abb. 6-8).

Die unter Verwendung des monoklonalen bispezifischen Antikörper gewonnenen Ergebnisse sollten sich sehr ähnlich zu denen verhalten, die für einen rekombinanten bispezifischen Antikörper zu erwarten wären. Da die Sensitivität des System vergleichsweise gering war, wurden keine weiteren Anstrengungen in dieser Richtung unternommen.

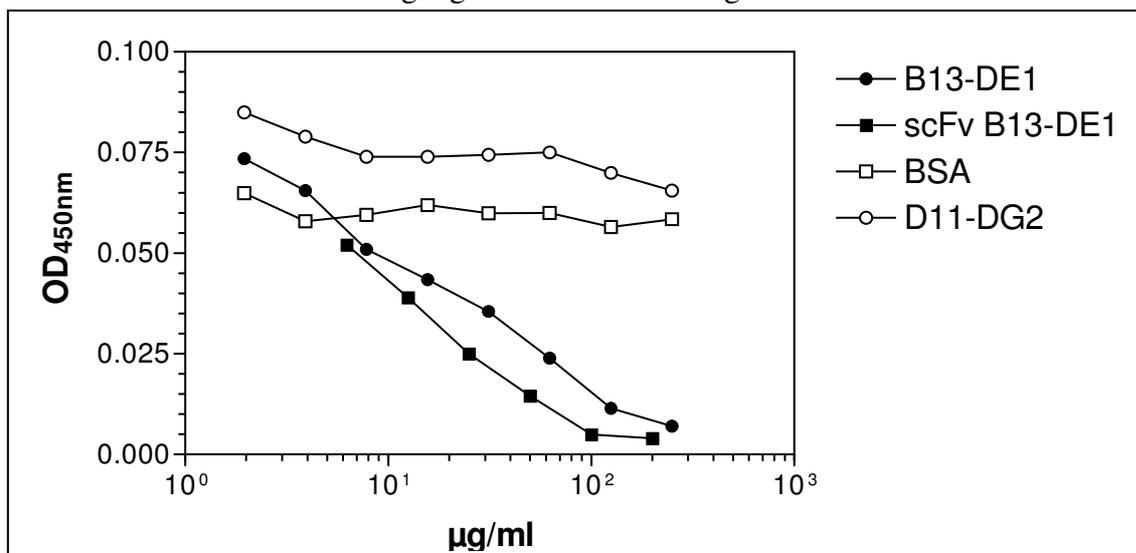


Abb. 6-8: *Substrate Channeling* Immunoassay zur Konzentrationsbestimmung des Antikörpers B13-DE1 und des scFv B13-DE1. Die räumliche Nähe der Enzyme GOD und POD im Immunkomplex wurde in diesem Experiment durch den monoklonalen bispezifischen Antikörper T4-C10-E9 vermittelt.

6.2.3. Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein

Wie in den Experimenten zur Konzentrationsbestimmung des Haptens Fluorescein (6.2.1.2) angedeutet, führte der parallele Einsatz von Fluorescein und dem Substrat TMB zu Problemen. Es war zu beobachten, daß steigende Konzentrationen von Fluorescein zu ebenfalls steigenden Meßsignalen führten. Dies stand im Gegensatz zur erwarteten Reaktion. Steigende Konzentrationen an Fluorescein hätten eine Auflösung des verwendeten Immunkomplexes aus den Enzymen GOD und POD bewirken und damit einen Zusammenbruch des *Channeling* Effekts verursachen sollen. Als Resultat wären somit, im Gegensatz zur Beobachtung, fallende Meßwerte zu erwarten. Das System hatte seine prinzipielle Funktionstüchtigkeit zu diesem Zeitpunkt bereits bei der Bestimmung der Konzentration des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 bewiesen. Auch nach Austausch aller im Experiment eingesetzter Materialien änderte sich nichts an der Reproduzierbarkeit des aufgefundenen Sachverhaltes. Es mußte also einen weiteren, den eigentlichen Meßvorgang überlagernden Effekt geben. Dieser Effekt bestand in der Photooxidation von TMB durch Fluorescein (Abb. 6-9). Infolge der Lichtabsorption durch Fluorescein erfolgt dabei die Umsetzung von TMB-Molekülen mit molekularem Sauerstoff (Kumke et al., unpublizierte Ergebnisse).

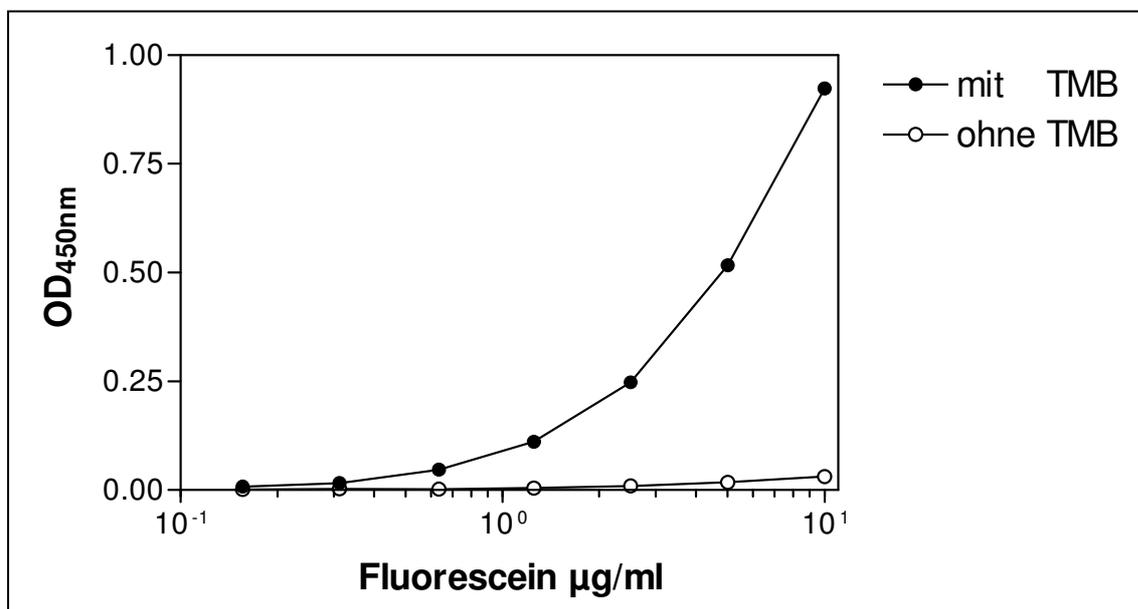


Abb. 6-9: Photooxidation des Substrats TMB durch Fluorescein.

Eine TMB-Lösung wurde mit einer Fluorescein Verdünnungsreihe versetzt und die Proben im Tageslicht belassen. Die erfolgte Photooxidation des TMB wurde photometrisch bestimmt.

Wurde die Meßplatte in kompletter Dunkelheit belassen, war die Photooxidation vollständig unterdrückt. Der Effekt der Photooxidation von Peroxidase-Substraten durch Fluorescein war, wie erwartet, nicht auf TMB begrenzt. Auch OPD (Ortho-Phenyldiamin), ein weiteres Substrat, wurde oxidiert.

Weitere Arbeiten zu diesem Komplex führten zu dem Resultat, daß sich die Photooxidation durch Gaben des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 inhibieren ließ. Dazu wurde eine Lösung, bestehend aus Fluorescein und TMB mit B13-DE1 bzw. mit einem Kontrollantikörper (D11-DG2) gleicher Konzentration versetzt. Das Experiment wurde sowohl im Licht als auch in Dunkelheit durchgeführt (Abb. 6-10).

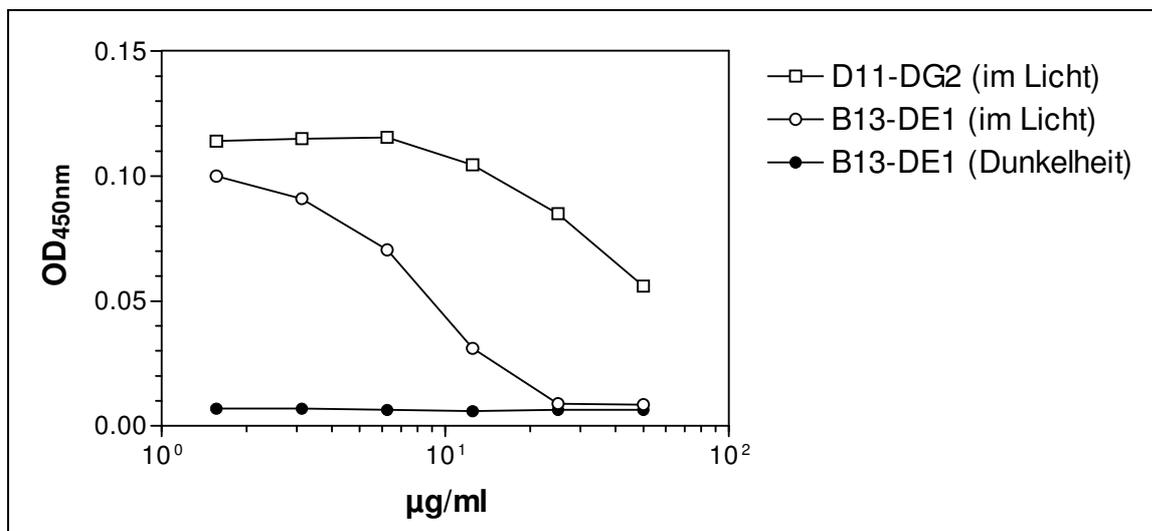


Abb. 6-10: Inhibition der Fluorescein vermittelten Photooxidation von TMB durch den Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1.

Im Experiment wurden jeweils identische Konzentrationen Fluorescein und TMB mit einer Verdünnungsreihe des Antikörpers B13-DE1 versetzt. Die Photooxidation wurde im Gegensatz zum Kontrollantikörper (D11-DG2) deutlich inhibiert. Die für den Kontrollantikörper beobachtete, später einsetzende Inhibition, ist wahrscheinlich ein unspezifischer Proteineffekt.

6.3. Aufbau eines homogenen Immunoassays mittels *Fluorescence Quenching*

Für den Aufbau dieses Assays wurde ausgenutzt, daß die Fluoreszenz von Fluorescein bei der Bindung an den Antikörper B13-DE1 gelöscht wird. Für die Experimente wurde ein Dihapten-Konjugat bestehend aus Monuron und Fluorescein eingesetzt (Abb. 6-11).

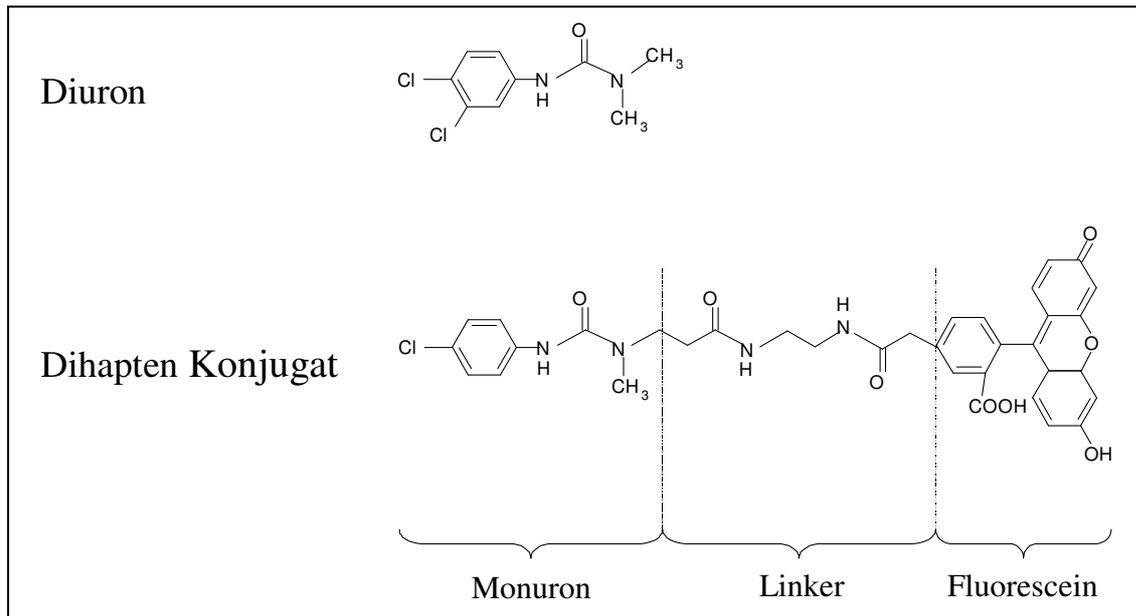


Abb. 6-11: Chemische Struktur des Analyten Diuron sowie des Dihapten Konjugats aus Monuron und Fluorescein, die im Experiment zum Einsatz kamen.

Der Fluorescein bindende Antikörper B13-DE1 sowie der Diuron und Monuron bindende Antikörper B91-CG5 konkurrierten um die Bindung an das Dihapten-Konjugat. Die Verschiebung des Gleichgewichts nach Zugabe von freiem Diuron läßt sich über die Fluoreszenz des Fluoresceins bzw. deren Löschung verfolgen (Abschnitt 4.3.).

Bereits die Zugabe von 14,5 nM (3,2 ng/ml) Diuron bedingte eine fünfzig prozentige Abnahme des Fluoreszenzsignals (Abb. 6-12). Die Messungen wurden durch geringe Konzentrationen von neonatalem Kälberserum (bis 0,5 %) nicht beeinträchtigt.

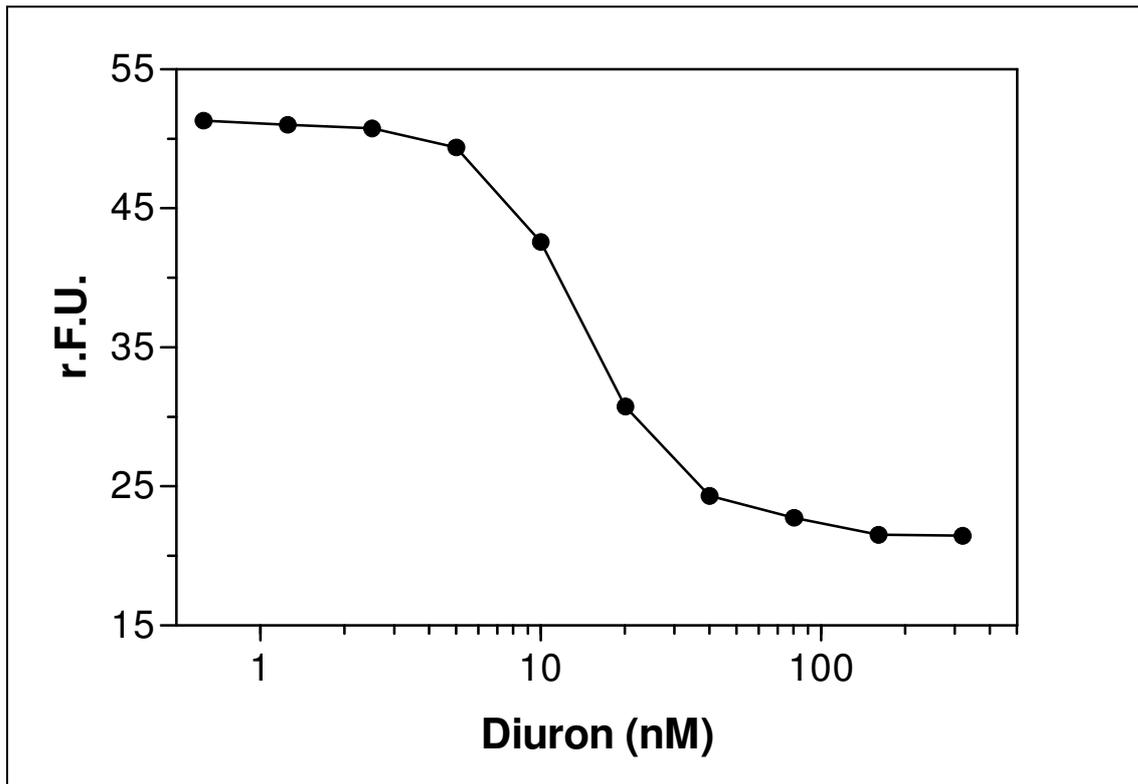


Abb. 6-12: Homogener *Fluorescence Quenching* Immunoassay zur Konzentrationsbestimmung von Diuron. Es konkurrieren zwei monoklonale Antikörper (der eine spezifisch für den Analyten Diuron bzw. für Monuron, der zweite für das Fluorophor Fluorescein) um die Bindung an ein Konjugat, bestehend aus Monuron und Fluorescein. Die Lage des sich einstellenden Gleichgewichts wird über die Fluoreszenz von Fluorescein bzw. deren Löschung nach Bindung durch den Antikörper B13-DE1 meßtechnisch verfolgt. Externe Gaben des Analyten Diuron verschieben das Gleichgewicht zugunsten Fluorescein-Bindung und damit in Richtung Löschung der Fluoreszenz.

6.4. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten

Für die Selektion von Antikörper produzierenden Zellen wurden wieder Hapten-Konjugate verwendet, an die zwei verschiedene Makromoleküle binden können, die sich jedoch gegenseitig sterisch in ihrer Bindung behindern. Das Konjugat bestand aus einem an ein Toxin gekoppelten Liganden. Es ist für das Experiment unerlässlich, daß die Toxizität des Toxins auch nach dessen Kopplung an den Liganden erhalten bleibt. Wird das Konjugat von einem Anti-Ligand-Antikörper gebunden, verliert es seine Toxizität, da der Toxin-Anteil sterisch an der Wechselwirkung mit seiner Zielstruktur auf der Zelle (z.B. einem Enzym) gehindert wird. Zellen die einen derartigen Antikörper sezernieren erhalten somit einen Selektionsvorteil. Geeignete Konzentrationen des Toxinkonjugats vorausgesetzt, werden sich derartige Zellen gegenüber nicht produzierenden Zellen bzw. gegenüber Produzenten unerwünschter Binder im System anreichern (Abschnitt 4.4).

Es wurden zwei Konjugate bestehend aus Ligand und Toxin synthetisiert. Das erste, bestehend aus Fluorescein und Ampicillin, wurde FITCillin genannt (Abb. 6-13), das zweite bestehend aus Biotin und Ampicillin Biotinillin. Beide Konjugate waren wie Ampicillin toxisch für *E.coli* Zellen.

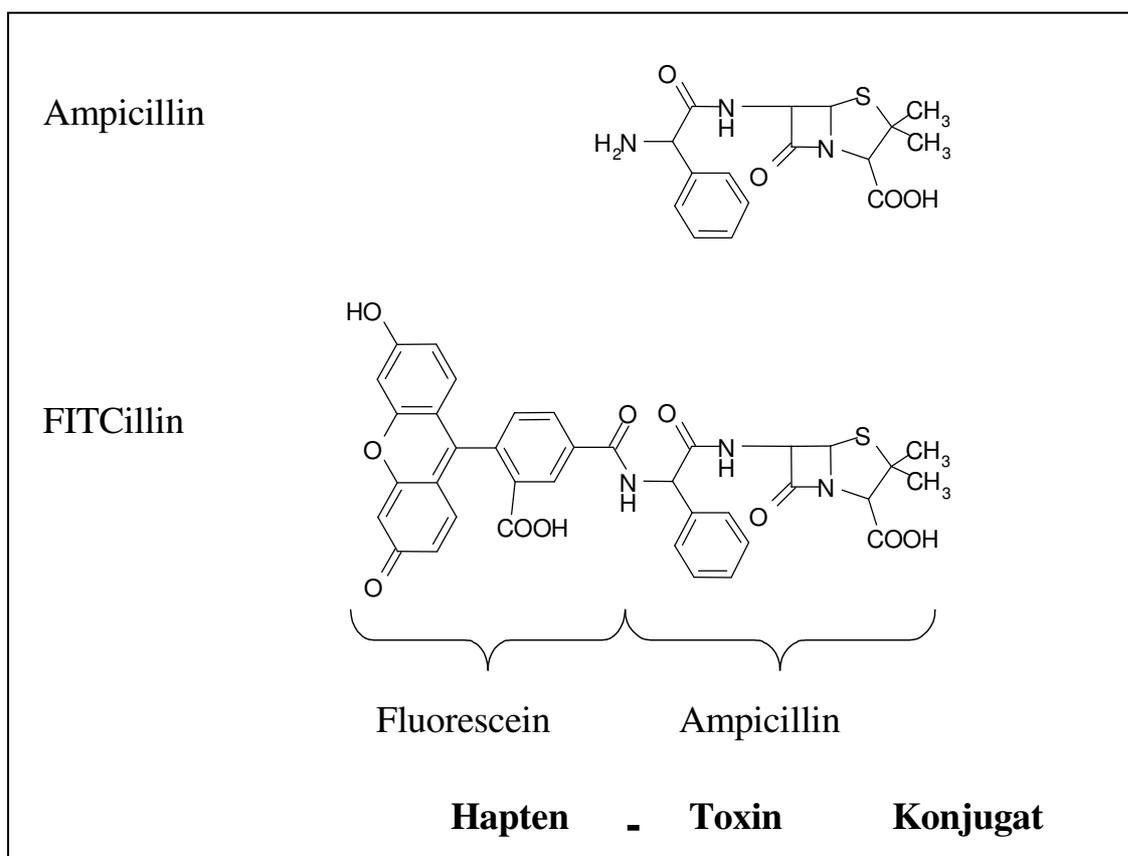


Abb. 6-13: Chemische Struktur des Toxinkonjugats FITCillin, bestehend aus dem Liganden Fluorescein und dem Antibiotikum Ampicillin.

In den folgenden Experimenten wurde das der Selektion zu Grunde liegende Prinzip auf seine Gültigkeit überprüft. Dazu wurden *E.coli* Zellen einer geeigneten Konzentration des Toxinkonjugats ausgesetzt. Die Ansätze wurden durch variierende Konzentrationen des den Liganden bindenden Moleküls ergänzt. Bei diesen externen Gaben handelte es sich, im Fall von FITCillin um den Fluorescein bindenden Antikörper B13-DE1, im Fall von Biotinillin um Streptavidin. Die Inhibition der Toxizität der eingesetzten Toxinkonjugate wurde am folgenden Tag mittels photometrischer Messung der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen bestimmt. Beide Konjugate erwiesen sich wie erwartet als toxisch für *E.coli*. Die Ergebnisse dieser Experimente sind für FITCillin in Abb. 6-14, für Biotinillin in Abb. 6-15 dargestellt.

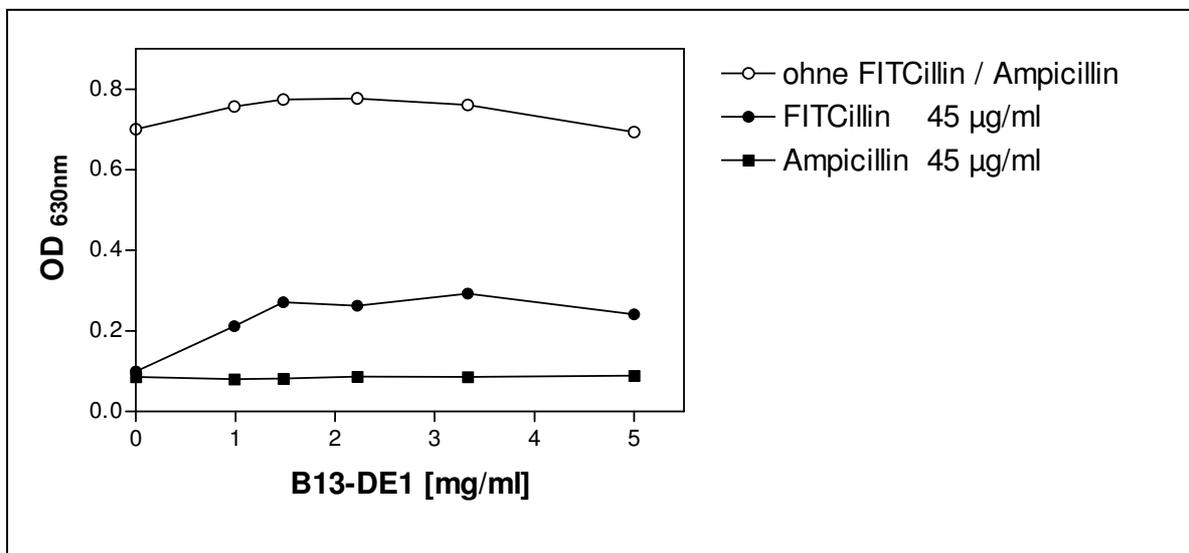


Abb. 6-14: Inhibition der toxischen Wirkung von FITCillin durch externe Gaben des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1. Im Experiment waren die Anzahl der eingesetzten *E.coli*, die jeweiligen Antibiotika-Konzentrationen sowie die Kulturbedingungen konstant. Variiert wurde die Konzentration des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1. Um Proteineffekte auszuschließen, wurde dieser in einem Präparat des CEA bindenden Antikörpers D11-DG2 gleicher Ausgangskonzentration verdünnt.

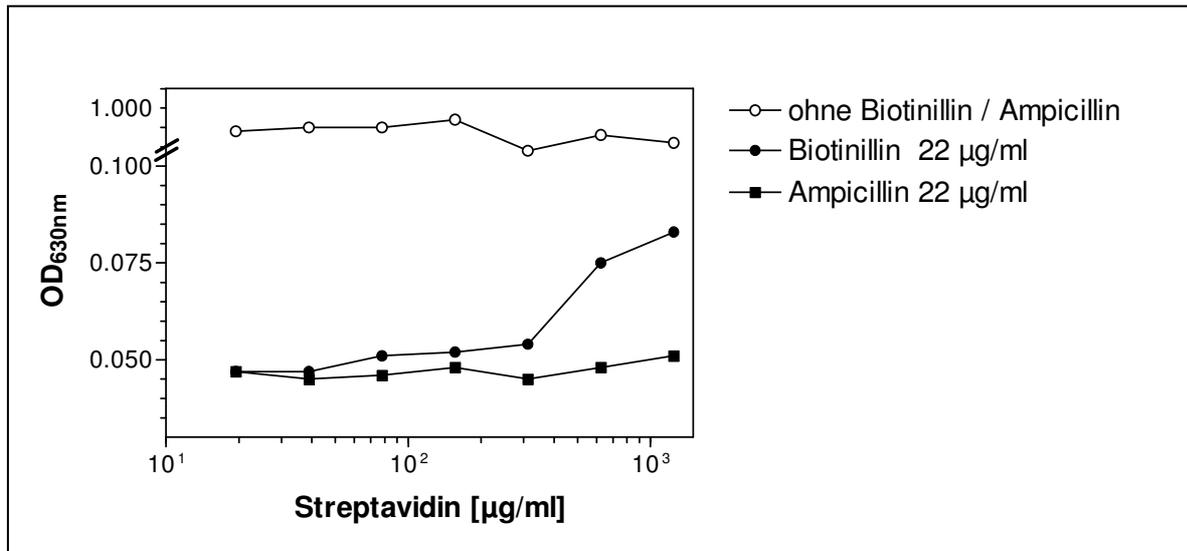


Abb. 6-15: Inhibition der toxischen Wirkung von Biotinillin durch externe Gaben von Streptavidin. Im Experiment waren die Anzahl der eingesetzten *E.coli*, die jeweiligen Antibiotika-Konzentrationen sowie die Kulturbedingungen konstant. Variiert wurde die Konzentration des Biotin-Binders Streptavidin.

Anschließend wurde die Selektion Antikörper produzierender Zellen untersucht. Zu diesen Zweck wurden zwei *E.coli* Klone ausgewählt. Der Erste exprimiert das Fluorescein bindende Einketten-Antikörper-Fragment scFv B13-DE1, der Zweite einen scFv von irrelevanter Bindungsspezifität, der zur Kontrolle des Selektionserfolges diente. Beide Klone unterschieden sich lediglich in der Spezifität des von ihnen exprimierten scFv. Ihr Wachstum war, auch bei Expression des scFv, vergleichbar.

Die Klone wurden zuerst separat auf ihr Wachstumsverhalten auf FITCillin und Ampicillin getestet. Der den scFv B13-DE1 exprimierende Klon war in der Lage, höhere FITCillin Konzentrationen zu tolerieren als der Kontrollklon (Abb. 6-16).

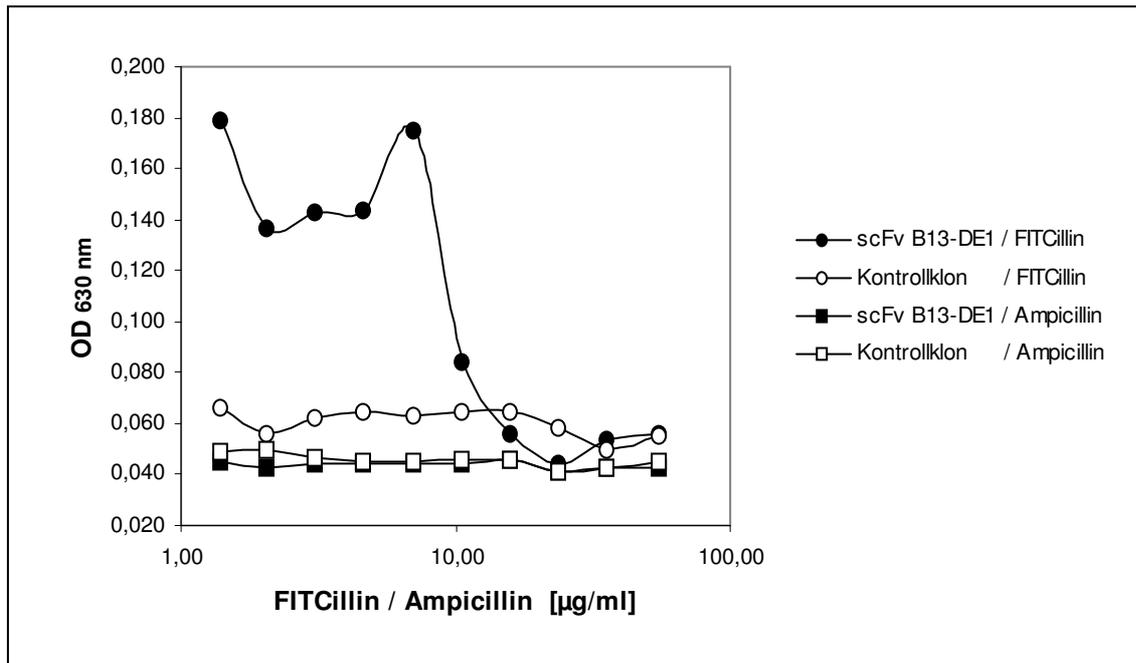


Abb. 6-16: Vergleich des Wachstums des scFv B13-DE1 exprimierenden Klons (Produzent) mit dem eines Kontrollklons auf FITCillin bzw. Ampicillin haltigen Medien. Der den Fluorescein bindenden scFv B13-DE1 exprimierende Zellklon toleriert höhere Konzentrationen des Toxin-Konjugats FITCillin als der Kontrollklon.

In den sich nun anschließenden Experimenten wurden Zellen beider Klone in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt und in dieser Form einer Selektion auf dem Toxin-Konjugat FITCillin unterzogen. In einem Kontrollexperiment wurden die gleichen Gemische einer zum Toxin-Konjugat identischen Konzentration Ampicillin ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigten die erfolgreiche Selektion von Zellen, die den Fluorescein bindenden scFv exprimieren (Abb. 6-17). Bis zu einer Ausgangsverdünnung des Produzenten in dem Kontrollklon von 1:1000 war eine Anreicherung zu beobachten. In dem Kontrollexperiment unter Verwendung von Ampicillin war keine Anreicherung festzustellen. Ampicillin inhibierte das Wachstum beider Klone im gleichen Maße.

Der Selektionserfolg ließ sich durch den Anschluß einer zweiten Selektionsrunde allerdings nicht verbessern.

Start	1. Selektionsrunde	
Anteil an Produzenten	Anteil an Produzenten	Produzenten / getestete Klone
50 %	89,1 %	41/46
2 %	50,0 %	23/46
1 %	50,0 %	23/46
1 %	2,0 %	1/48
0,4 %	78,2 %	36/46
0,4 %	0 %	0/46
0,2 %	58,3 %	28/48
0,2 %	0 %	0/48
0,1 %	31,2 %	15/48
0,02 %	0 %	0/46

Start	2. Selektionsrunde	
Anteil an Produzenten	Anteil an Produzenten	Produzenten / getestete Klone
50 %	69,6 %	32/46
2 %	100 %	48/48
1 %	----	----
1 %	----	----
0,4 %	33,3 %	16/48
0,4 %	----	----
0,2 %	17,4 %	8/46
0,2 %	----	----
0,1 %	----	----
0,02 %	----	----

Selektions-Experiment auf FITCillin
Kontroll - Experiment auf Ampicillin

Abb. 6-17: **Selektion von scFv B13-DE1 exprimierenden Zellen (Fluorescein bindender scFv) auf FITCillin aus definierten Gemischen mit Zellen eines Kontrollklons.** Der den scFv B13-DE1 exprimierende Klon (Produzent) wurde in definierten Verhältnissen mit einem Kontrollklon gemischt. Die Gemische wurden einer Selektion auf FITCillin (Toxinkonjugat) bzw. Ampicillin (ungekoppeltes Toxin) unterzogen. Die aus der Selektion erhaltenen Zellen wurden auf Kulturplatten ausgestrichen und als einzelne Kolonien angezüchtet. Die Kulturüberstände der angezüchteten Einzelklone wurden im ELISA auf den Fluorescein bindenden scFv B13-DE1 getestet.

Bis zu einer Ausgangsverdünnung des Produzenten im Kontrollklon von 1:1000 war eine Anreicherung zu beobachten. Unter Verwendung von Ampicillin war keine Anreicherung festzustellen.

Die aus der ersten Selektionsrunde erhaltenen Gemische beider Zellklone wurden in einem sich anschließenden, identischen Selektionsexperiment eingesetzt. Der Anschluß einer solchen zweiten Selektionsrunde konnte das Selektionsergebnis nicht verbessern.

7. Diskussion

7.1 Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels *Substrate Channeling*

7.1.1 *Substrate Channeling* mittels bispezifischer rekombinanter Antikörperfragmente

Das ursprüngliche Ziel der Arbeiten war es, die gentechnischen Grundlagen für den Aufbau eines homogenen *Substrate Channeling* Immunoassay unter Verwendung eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers zu legen. Dieser Antikörper sollte einen engen und gerichteten Kontakt zwischen den Enzymen herstellen, damit das System eine für praktische Anwendungen relevante Sensitivität erlangt.

Der Aufbau eines derartigen Systems ist möglich. Im Licht der Erfahrungen mit den unter Verwendung etablierter Immunoassay-Techniken aufgebauten *Channeling* Assays scheint jedoch die Hoffnung auf eine damit einhergehende gravierende Steigerung der Sensitivität nicht realistisch. Darum wurden die Bemühungen im Anschluß auf erfolgversprechendere Bereiche konzentriert. Die Diskussion der diese Entscheidung erzwingenden Umstände erfolgt im Abschnitt 7.1.2.

Die wesentlichen Voraussetzungen zur Generierung des rekombinanten bispezifischen Antikörpers wurden geschaffen. Dazu wurden zwei Einketten-Antikörper-Fragmente (scFv) mit der Spezifität für Glucoseoxidase bzw. Peroxidase kloniert (Sellrie et al., 2007). Beide Fragmente verfügten nach der Expression in *E.coli* über gute, wenn auch nicht überragende Bindungseigenschaften für ihr Antigen. Sie zeigten jedoch eine im Vergleich zu den entsprechenden monoklonalen Antikörpern deutlich schwächere Affinität. Dies ist ein für aus Hybridomen klonierte scFv häufig zu beobachtender Befund (Ward, 1993). Die erfolgreiche Expression beider scFv im selben Expressionssystem ist die Voraussetzung für die Klonierung und Expression eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers.

Es konnten zwei scFv aus den zwanzig für die Klonierung eingesetzten Hybridomen gewonnen werden. Die Klonierungseffizienz lag somit bei zehn Prozent. Unseren laborinternen Erfahrungen folgend, kann man im Durchschnitt mit einer Effizienz von fünf Prozent für die gewählte Methode der Klonierung und Expression rechnen. Die erzielte bessere Klonierungseffizienz ist wahrscheinlich ein Zufallsereignis. Die Ursachen für ein Fehlschlagen der Klonierung sind vielfältig. In allen Teilabschnitten des beschriebenen Klonierungsvorgangs kann es zu Fehlern kommen. Diese können jedoch durch die ständige Verifizierung der jeweiligen Zwischenergebnisse durch Elektrophoresen und Sequenzierungen erkannt und eliminiert werden. Doch selbst eine fehlerfreie Klonierung ist

keine Garantie für den Erhalt eines funktionierenden, d.h. einen das Antigen wie der Eltern-Antikörper bindenden scFv. Die Klonierung eines scFv aus der mRNA von Hybridomzellen ist zwar aufwendig und fehlerträchtig, sie stellt jedoch nicht das eigentliche Problem dar. Problematisch ist vielmehr dessen Expression.

Die Ausbeute an rekombinanten Antikörperfragmenten ist nicht vorhersagbar. Bereits die Mutationen eines einzigen Codons kann die Expression in *E.coli* dramatisch beeinflussen (Duenas et al., 1995; Knappik und Plückthun, 1995; Ulrich et al., 1995). In einer Untersuchung mit 512 Mutanten eines Fv-Fragments zeigte sich, daß mehr als 10 % der Punktmutationen in den CDRs die Produktion in *E.coli* behinderte (Ito et al., 1993). Offensichtlich können also viele rekombinante Antikörper in *E.coli* nicht richtig gefaltet werden. Im Umkehrschluß bedeutet dies jedoch auch, daß bereits durch den Austausch einiger weniger Aminosäuren die Ausbeuten drastisch steigen können (Kipriyanov et al., 1997).

Der eigentliche Engpaß bei der Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten in *E.coli* liegt nach diesen Studien offenbar in der Faltung zur korrekten Tertiärstruktur. Dem kann bisher nur durch die Veränderung der Antikörpersequenz selbst (Knappik und Plückthun, 1995) abgeholfen werden. So konnten einige „Schlüsselstellen“ in den *framework*-Bereichen identifiziert werden, die die Faltungseffizienz beeinflussen. Die Coexpression zusätzlicher Faltungshelfer (Knappik et al., 1993) führte bisher nicht zu einer bemerkenswerten Änderung der Ausbeute an funktionellem Protein.

Eine Möglichkeit, die beschriebenen Schwierigkeiten zu umgehen, besteht im Wechsel des Expressionssystems. Versagt die Expression in *E.coli*, so muß dies nicht zwangsläufig auch in anderen Systemen der Fall sein. Man bringt sich jedoch um den Vorteil einer einfach zu handhabenden Bakterienkultur. In diesem Zusammenhang zu erwähnen sind die Expression rekombinanter Antikörper in Hefen (Edqvist et al., 1991; Bowdish et al., 1991) und in Insektenzellen (Baculovirus-System) (Matthews, 1982; Maeda, 1989). Als weitere eukaryotische Expressionssysteme bieten sich Säugerzellen wie z.B. COS-Zellen (Ridder et al., 1995; Morton et al., 1993) und CHO-Zellen (King et al., 1993; Dorai et al., 1994) an.

Unabhängig von den diskutierten Schwierigkeiten ist die direkte Klonierung aus Hybridomen und anschließende bakterielle Expression von Einketten-Antikörper-Fragmenten (scFv) insbesondere beim *Antibody Engineering* ein unverzichtbares Werkzeug (Lu et al., 2006; Harvey et al., 2006; Pignatari et al., 2007).

7.1.2 *Substrate Channeling* mittels etablierter Immunoassay-Techniken

Es wurde ein *Channeling* System unter Verwendung etablierter Immunoassay-Techniken aufgebaut. Die Wahl fiel auf einen an der Oberfläche fixierten immunologischen Komplex, der die beiden Enzyme Glucoseoxidase und Peroxidase enthielt. Externe Gaben des freien Analyten lösten diesen Komplex, bis zum vollständigen Erliegen der *Channeling* Reaktion auf.

Diese Herangehensweise hat sowohl Vor- als auch Nachteile. Von Vorteil ist die Möglichkeit, den Komplex sukzessive und mit definiertem Ergebnis aufzubauen. Dies erleichtert alle Optimierungsarbeiten und ermöglicht darüber hinaus den Vergleich der Daten unterschiedlicher Experimente, die im selben definierten System erarbeitet wurden.

Von Nachteil sind in einem Festphasensystem die längeren Diffusionsstrecken und die damit einhergehenden längeren Inkubationszeiten. Zudem ist es nicht von Vorteil, durch die Auflösung des Immunkomplexes das Meßsignal zu reduzieren, statt dieses im Zuge der Formierung eines solchen Komplexes zu generieren.

Die Formierung des Immunkomplexes aus den beiden Enzymen in Lösung würde diese Probleme umgehen, doch ist die Einstellung der für die Bildung des Komplexes und die Entstehung des Meßsignals notwendigen Parameter ungleich schwerer. Der Aufbau des beschriebenen Festphasensystems ist somit eine Vorstufe für ein System in Lösung. Erst mit den Ergebnissen aus dem Ersten ist der Aufbau des Zweiten realistisch.

Dennoch beschreiben Ullman et al. (1984) für ein solches System unter Verwendung der gleichen Enzyme, wie der für die Arbeit verwendeten, für die Bestimmung von PRP (Poly Ribose Phosphat) eine Nachweisgrenze von 10 fmol/L. Dieser Wert ist für *channeling* Assays in der Literatur einmalig. Wäre dieses Ergebnis jedoch auf andere Antigene einfach zu übertragen gewesen, so wären die Arbeiten zweifellos vorangetrieben worden. Von Bedeutung für die augenscheinlich hohe Sensitivität im Poly Ribose Phosphat System ist in diesem Zusammenhang vermutlich das Vorhandensein einer Vielzahl von Bindungsstellen auf der Oberfläche des Analyten. Ein einziges Analyt-Molekül ist somit für die Formation eines Immunkomplexes unter Einbeziehung einer Vielzahl von Enzymmolekülen verantwortlich. Dies resultiert in einer größeren *Channeling* Rate, generiert damit ein größeres Meßsignal und wäre damit ursächlich für die beobachtete hohe Sensitivität.

Die vorliegende Arbeit beschreibt im Gegensatz dazu ein System, in welchem der Kontakt der Enzyme über ein oder wenige an Glucoseoxidase gekoppelte Fluorescein Moleküle vermittelt wurde. Dies kommt praktischen Anforderungen, wie etwa dem Nachweis von Haptenen, näher. Es ist vermutlich auch die Ursache für die beobachtete weit geringere Sensitivität.

Wie auch schon Litman et al. (1980) gelang mit dieser Arbeit im wesentlichen der Nachweis des Effekts. Die Empfindlichkeit des Systems ist sehr gering und liegt im Bereich sehr alter immunologischer Techniken, wie z.B. der Immundiffusion. Für den Nachweis des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1 liegt sie bisher bei 33 nM (5 µg/ml). Die vollständige Auflösung des Immunkomplexes durch den Analyten (B13-DE1) und die damit einhergehende Reduktion des Meßsignals auf Hintergrundniveau erfolgt bei etwa 330 nM (50 µg/ml).

Das System ist ebenfalls geeignet für den Nachweis des Analyten Fluorescein. Die zur vollständigen Reduktion des Meßsignals notwendige Konzentration ist jedoch mit 500 µg/ml (1,5 mM) sehr hoch.

Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Betrachtung der folgenden Zusammenhänge. Das die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmende Enzym ist vermutlich Glucoseoxidase. Das vollständige Erliegen des *Substrate Channeling* - Effekts setzt die Auflösung des Immunkomplexes und damit einhergehend die Entfernung des letzten Peroxidase-Moleküls aus dem Komplex voraus. Da nur eine geringe Anzahl von Fluorescein-Molekülen an GOD gekoppelt sind, sind auch nur vergleichsweise wenige Antikörper (B13-DE1) notwendig, um den Immunkomplex aufzulösen. Im scFv B13-DE1 – POD Konjugat sind eine Vielzahl scFv und Enzymmoleküle vereint. Es ist daher mehr Analyt (Fluorescein) notwendig, das scFv B13-DE1 – POD Konjugat aus dem Immunkomplex zu lösen.

Das etablierte System ist in seiner jetzigen Form bestenfalls für qualitative Bestimmungen geeignet. Für eine derartige Verwendung ist jedoch der zu betreibende Aufwand zu groß. Die Empfindlichkeit läßt sich durch eine weitere „Aufblähung“ des Immunkomplexes, durch Bindung weiterer Antikörper, verbessern. Jedoch ist der Effekt im Verhältnis zum Aufwand gering. Folgt man den Ergebnissen von Ullman et al. (1984), so ist eine weitere sterische Abschirmung des immunologischen Komplexes wohl insbesondere für sich in Lösung befindliche Immunkomplexe von Vorteil. Auch andere Eingriffe, wie z.B. die Erhöhung der Viskosität der Lösung und eine damit einhergehende Herabsetzung der Diffusionsgeschwindigkeit sind denkbar. Derartige Eingriffe haben leider nur eines gemeinsam, sie erhöhen zusätzlich die Komplexität eines ohnehin schon komplexen Systems.

Hierin liegt vermutlich auch die grundsätzliche Schwäche des *Substrate Channeling* begründet. Ein System aus zwei Enzymen, oder wie im vorliegenden Fall aus drei, ist nur schwer zu handhaben. Mit Technologien die einen besseren Zugriff auf rekombinante Antikörper und darüber hinaus ein gezieltes Design von Proteinen erlauben, werden diese jedoch in Zukunft zu überwinden sein. Derartige Techniken sollten eine bessere Abstimmung

der enzymatischen Eigenschaften der beiden im *Substrate Channeling* System vereinten Moleküle ermöglichen.

Beim *Substrate Channeling* handelt es sich um ein System, in welchem die Herstellung bzw. Auflösung der räumliche Nähe zwischen zwei Komponenten zur Generierung eines Meßsignals genutzt wird. In diesem Zusammenhang sind die dem Substrat möglichen relativ weiten Diffusionsstrecken von Nachteil. Dies erzwang z.B. den Einsatz von freier Katalase, um das entstehende Wasserstoffperoxid außerhalb des Immunkomplexes abzufangen. Hierin ist vermutlich auch eine weitere Ursache, für die geringe Sensitivität des Systems zu suchen. Das Grundprinzip der Ausnutzung der räumlichen Nähe zweier Komponenten zur Generierung eines Meßsignals findet in anderen dem *Substrate Channeling* technologisch verwandten homogenen Systemen Anwendung. Es wurde dahingehend modifiziert, daß entweder Energie zwischen zwei Komponenten transferiert wird, wie beim Fluoreszenz Energie Transfer (FRET; Abschnitt 3.2.1.2), oder daß Sauerstoffradikale als Brücke dienen, wie beim *Luminescent Oxygen Channeling* Immunoassay (LOCI; Abschnitt 3.2.1.5). Beide Systeme beruhen damit auf einer Wechselwirkung von zwei Komponenten, welche nur bei direktem Kontakt möglich wird. Die Systeme umgehen zudem das große Problem der unspezifischen Wechselwirkung ihrer Komponenten mit Bestandteilen der Probe. Dieses wäre für einen *Substrate Channeling* Immunoassay noch ungelöst. Im FRET wird dieses Problem durch eine zeitaufgelöste Messung (TRF; *time-resolved fluorescence*), im LOCI durch die konsequente Abschirmung der Komponenten in Sphären aus Latex, gelöst. Für diese Systeme sind damit pikomolare Nachweisgrenzen im FRET (Blomberg et al., 1999) bzw. femtomolare Nachweisgrenzen im LOCI (Ullman et al., 1996) beschrieben. Ein homogener *Substrate Channeling* Immunoassay wird, beim gegenwärtigen technischen Stand, aus den angeführten Gründen, derartige Sensitivitäten nicht erreichen können. Auch der Einsatz anderer Enzymkombinationen ändert nichts an dieser Einschätzung.

Für den Aufbau homogener Immunoassays, welche sowohl sensitiv als auch praktikabel sind, sollte man sich auf möglichst einfache Systeme beschränken. Besonders Systeme, in denen ein Meßsignal infolge der direkter Wechselwirkung eines Antikörpers mit einer Systemkomponente generiert wird, sollten von Vorteil sein. Derartige Systeme sollten generell leichter zu handhaben und auf viele Antigene zu übertragen sein.

7.1.3 *Substrate Channeling* mittels monoklonaler bispezifischer Antikörper

Es ist ebenfalls möglich, die räumliche Nähe zwischen den Enzymen im immunologischen Komplex durch einen bispezifischen Antikörper zu vermitteln. Die grundsätzlichen Aussagen zum System treffen selbstverständlich auch hier zu.

Die für das System nachgewiesene Sensitivität ist mit der des mit etablierten Immunoassay-Techniken aufgebauten Systems vergleichbar. Die vollständige Auflösung des Komplexes, und die damit einhergehende vollständige Reduktion des Meßsignals, erfolgt bei einer Konzentration von 100 µg/ml des Fluorescein bindenden Antikörpers B13-DE1. In der Literatur sind keine *Substrate Channeling* Systeme unter Verwendung eines monoklonalen bispezifischen Antikörpers beschrieben.

Der Einsatz eines monoklonalen bispezifischen Antikörpers war insofern von Interesse, da er das Ergebnis für einen rekombinanten bispezifischen Antikörper vorwegnahm. Diese Aussage beruht auf der Feststellung, daß der Abstand zwischen den Enzymen im monoklonalen bispezifischen System nur unwesentlich größer ist als im rekombinanten System. Es ist nicht zu erwarten, daß der Aufbau eines *Substrate Channeling* Systems unter Verwendung eines rekombinanten bispezifischen Antikörpers zu einer für eine praktische Anwendung relevanten Verbesserung der Sensitivität des Systems beitragen könnte. Dies gab den entgültigen Ausschlag zur Aufgabe dieses Ansatzes.

7.1.4 Photooxidation des Peroxidase-Substrats TMB durch Fluorescein

Die Beobachtung, daß Fluorescein unter Lichteinwirkung die Photooxidation des Substrats TMB hervorruft, machte die Unterdrückung dieses Effekts in den Experimenten notwendig. Die Experimente wurden, sobald Fluorescein und TMB in einer gemeinsamen Lösung vorlagen, im Dunkeln weitergeführt. Auch ein Arbeiten unter Ausschluß von Sauerstoff wäre möglich gewesen. Der Effekt stellt eine Kuriosität dar. Im Zusammenhang mit immunologischen Anwendungen besitzt er keine bisher erkennbare praktische Bedeutung.

Es besteht eine Gemeinsamkeit zwischen der beobachteten Photooxidation von TMB und der Fluoreszenz von Fluorescein. Beide Effekte lassen sich unspezifisch durch hohe Proteinkonzentrationen bzw. spezifisch durch Antikörperbindung an Fluorescein unterdrücken. Viele hochaffine Fluorescein bindende Antikörper, löschen dessen Fluoreszenz (Watt und Voss, 1977; Voss, 1984). Der Effekt beruht vermutlich auf der Öffnung eines weiteren Relaxationskanals in Folge der Antikörperbindung. Somit wird der strahlungsfreie Übergang des angeregten Fluoresceins in den Grundzustand möglich. Die eingestrahlte Lichtenergie geht strahlungsfrei in thermische Energie über – die Fluoreszenz unterbleibt. Die Photooxidation wird unterbunden, indem über den gleichen Mechanismus eine photochemische Aktivierung von molekularem Sauerstoff und somit die Oxidation von TMB unterbleibt.

Beide Effekte sind gute Beispiele dafür, daß Antikörper über Eigenschaften verfügen können, die über die bloße Bindung des Antigens hinausgehen. Effekte, welche bei einer einseitigen Konzentration auf das Bindungsverhalten vielleicht unerkant bleiben, bzw., wie im Beispiel der Photooxidation, zu experimentellen Problemen führen. Die Nutzung solcher Effekte kann, wie am Beispiel des *Fluorescence Quenching* demonstriert, für bioanalytische Zwecke sehr lohnend sein.

7.2 Aufbau eines homogenen Immunoassay mittels *Fluorescence Quenching*

Der beschriebene *Fluorescence Quenching Immunoassay* ist ein schneller, einfach zu handhabender und dabei sensitiver homogener Immunoassay. Er genügt damit allen an ein solches System gestellten Ansprüchen.

Es war möglich, den ursprünglich von Nargessi et al. (1979); Zuk et al.(1979) und Ullman (1981) als *Fluorescence Protection Immunoassay* vor fast zwanzig Jahren beschriebenen Immunoassay durch den Einsatz hochaffiner monoklonaler Antikörper substanziell zu verbessern.

Für die damaligen Arbeiten standen lediglich polyklonale Antikörper zur Verfügung. D.h. es wurde mit einem Gemisch von Serum-Antikörpern gearbeitet, die sich in ihrer Affinität und Spezifität für Fluorescein wie auch für den Analyten stark unterschieden. Um den Analyten und das Fluorophor mit der für die Demonstration des Testprinzips notwendigen Effektivität zu binden, war die Kompensation der durchschnittlich schlechteren Bindungseigenschaften der Antikörpergemische durch deren höherkonzentrierten Einsatz erforderlich. Nur durch diesen Kompromiß war es möglich, am Fluorophor die nötige Löschung der Fluoreszenz sowie am Analyt-Fluorescein Konjugat den notwendigen gegenseitigen Bindungsausschluß zu realisieren. Dies hatte gravierende, sich nachteilig auf die Sensitivität des Systems auswirkende Folgen. Die damaligen Experimente konnten daher lediglich das Funktionsprinzip bestätigen. Eine Trennung der Subpopulationen im Antikörpergemisch war vor der Entwicklung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein (1975) nicht möglich. Erst der Einsatz monoklonaler Antikörper erlaubt eine über den bloßen Nachweis des Funktionsprinzips hinausgehende Anwendung des Testsystems.

Der etablierte homogene Immunoassay weist für den Nachweis von Diuron eine lediglich um eine Größenordnung geringere Sensitivität als ein konventioneller, heterogener Verdrängungsassay auf (Werner et al., *in preparation*). Die zu 50 % inhibierende Konzentration wurde für den beschriebenen *Fluorescence Quenching* Immunoassay mit 14,5 nM (3,4 ng/ml) Diuron bestimmt (Sellrie et al., 2006).

Die Sensitivität des Systems läßt sich jedoch vermutlich noch weiter steigern. Die durchgeführten Arbeiten dienten lediglich dazu, das Testprinzip soweit zu verbessern, um praktischen, diagnostischen Anforderungen zu genügen. Bei den bisherigen Arbeiten wurden deshalb nur die Konzentrationen der Antikörper und des Konjugats einer Optimierung unterzogen. Alle Arbeiten, die den eigentlichen Kern des Systems, das Analyt-Fluorophor Konjugat betreffen, stehen noch aus. Für die Experimente wurde ein Konjugat bestehend aus Monuron und Fluorescein eingesetzt. Damit verband sich die Erwartung, daß sich die

Verwendung des zum Analyten Diuron strukturell sehr eng verwandten Monuron vorteilhaft auf die Sensitivität des Systems auswirken würde. Ob die etwas geringere Affinität des Antikörpers B91-CG5 für Monuron tatsächlich diese Auswirkung hat, wurde bisher nicht überprüft. Ebenso unklar ist die Auswirkung von Länge und Struktur des *Linkers* zwischen Analyt und Fluorescein im Konjugat. Für das beschriebene Experiment wurden zwei hochaffine monoklonale Antikörper ausgewählt. Inwieweit die Affinitäten der eingesetzten Antikörper Einfluß auf die Sensitivität des Systems haben, wird in weiteren, auf diesen Arbeiten aufbauenden, Experimenten bestimmt werden. Es ist weiterhin notwendig, die Kreuzreaktivität des Assays für Diuron strukturell eng verwandte Verbindungen zu bestimmen.

Das beschriebene System verfügt über eine Reihe außerordentlich vielversprechender Eigenschaften, die im folgenden aufgeführt werden. Der *Fluorescence Quenching* Immunoassay ist ein homogenes System. Wasch- und Inkubationsschritte, die für einen konventionellen, heterogenen Immunoassay typisch sind, sind nicht notwendig. Das Gleichgewicht im System stellt sich in Sekunden bis Minuten ein (in unserem System erfolgte die Messung nach fünf Minuten), was schnelle Messungen zuläßt. Darüber hinaus ist das System universell einsetzbar, d.h. es ist nicht auf ein oder eine Gruppe von Antigenen begrenzt. Da monoklonale Antikörper gegen fast jedes Antigen erzeugt werden können, kann das System auch leicht für andere Hapten-Analyten adaptiert werden. Auch die Analytik von Proteinen ist möglich, obwohl schwieriger. Dafür stehen grundsätzlich zwei Wege offen. Zum einen kann eine sterische Behinderung der Antikörperbindung direkt auf der Proteinoberfläche ausgenutzt werden, indem gekoppeltes Fluorescein und das Epitop des Antikörpers in entsprechender räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Dies wurde im Prinzip von Ullman (1981) und Nargassi (1979) bereits demonstriert. Eine alternative Variante setzt den Einsatz von Konjugaten bestehend aus Peptid und Fluorescein voraus. Bei den Peptiden kann es sich dabei um lineare Epitope der Proteinoberfläche oder um Mimotop-Peptide handeln. Mimotop-Peptide imitieren die Antikörperbindung an das Originalepitop, haben jedoch eine andere chemische Struktur (Monzavi-Karbassi et al., 2003). Die Bindung des Mimotops erfolgt dabei mehrheitlich über andere Aminosäure-Seitenketten des Paratops. Originalepitop und Mimotop können sich dabei gegenseitig aus ihrer Bindung an den Antikörper (Paratop) verdrängen (Sellrie et al., 2002). Beide Arten von Peptiden können aus Phagenbibliotheken selektiert werden (Zwick et al., 1998; Bottger et al., 1999). Die Nutzung dieser Technik würde zudem die Auswahl von Peptiden geeigneter Affinität ermöglichen.

Da die Affinitäten des anti-Analyt und des anti-Fluorophor Antikörpers einen direkten Einfluß auf die Lage des Gleichgewichts haben, kann mit Hilfe des *Fluorescence Quenching* auch die Abschätzung (gegebenenfalls sogar Messung) der Affinität eines Antikörpers, relativ zu der eines bereits bekannten Antikörpers erfolgen.

Auf Grund seiner Einfachheit bei der Durchführung und Universalität in der Wahl der Analyten bietet sich das System für eine Automatisierung an. Entsprechende *Fluorescence Plate Reader* sind kommerziell erhältlich.

Ein praktischer Einsatz des *Fluorescence Quenching Immunoassay* erscheint auch aus diesem Grund als sehr realistisch. Um so erstaunlicher ist es, daß das Meßprinzip bisher nicht mehr Aufmerksamkeit auf sich zog. Eine Ursache hierfür kann in einem generellen Problem fast aller homogener Immunoassays liegen, der unspezifischen Wechselwirkung von Bestandteilen der Meßprobe mit den Assay-Komponenten. Dies erschwert insbesondere die Diagnostik von Analyten in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Serum. So ist bekannt, daß hohe Konzentrationen von Proteinen die Fluoreszenz von Fluorescein löschen. Dies, sowie die Eigenfluoreszenz von Komponenten des Serums erschweren bzw. verhindern dann eine Messung. Die Sensitivität des etablierten *Fluorescence Quenching* Systems blieb somit auch nur bis zu einer Serumkonzentration von einem halben Prozent in der Meßprobe erhalten. Dies schränkt die Einsatzfähigkeit des Systems in seiner bisherigen Form ein.

Die Lösung des Problems besteht in der Kombination des hier beschriebenen Assay Systems mit einer zeitaufgelösten Messung der Fluoreszenz (Hemmila und Mikkola, 2001), vergleichbar mit der bereits beim Fluoreszenz Energie Transfer verwendeten Technik (Abschnitt 3.2.1.2). Fluorescein erlaubt eine solche Messung nicht und muß daher durch andere Fluorophore ersetzt werden. Dazu bieten sich insbesondere die Cheleate und Cryptate von Terbium und Europium an (Banzin et al., 2001 und 2002; Mathis, 1993). Erste eigene Versuche haben gezeigt, daß sich auch die Fluoreszenz dieser Fluorophore durch geeignete Antikörperpräparate löschen läßt (Sellrie et al., unpublizierte Daten).

Es ist damit zu rechnen, daß das Prinzip des *Fluorescence Quenching* Immunoassays, insbesondere für den Nachweis niedermolekularer Substanzen, seinen Platz in praxisrelevanten Anwendungen finden wird.

7.3. Selektion Antikörper produzierender Zellen mittels Toxinkonjugaten

Die Toxizität eines Konjugats aus Ligand und Toxin kann für die erfolgreiche Selektion von Zellen eingesetzt werden, die Liganden bindende Makromoleküle produzieren. Grundlage dieses Effekts ist die sterische Behinderung der Wechselwirkung der Toxin-Komponente des Konjugats, mit dessen Zielstruktur in oder auf der Zelle, wenn das Makromolekül an die Ligand-Komponente des Konjugats bindet.

Eine solche Inhibition der Toxizität wurde für zwei Proteine gezeigt, die unterschiedliche Ligand-Toxin Konjugate binden, für den anti-Fluorescein Antikörper B13-DE1 sowie für das Biotin bindende Streptavidin. Das System wurde zudem zur Selektion von *E.coli* eingesetzt, die einen den Liganden bindenden scFv exprimieren. Dabei wurden *E.coli*-Zellen, die den Fluorescein bindenden scFv B13-DE1 sezernierten, aus einem Gemisch mit anderen Zellen angereichert.

Als Toxin-Komponente im Konjugat wurde Ampicillin verwendet. Der Begriff Toxin wird in diesem Zusammenhang sehr weitreichend verwendet, da Ampicillin lediglich das Wachstum der im Test verwendeten *E.coli* Zellen inhibiert, jedoch nicht unmittelbar deren Zelltod verursacht. Für den Ausgang der Experimente ist dieser Unterschied jedoch unerheblich. Im Folgenden wird daher der Begriff Ligand-Toxin Konjugat verwendet, auch wenn es sich im konkreten Fall um das Konjugat eines Wachstumsinhibitors handelt.

Die beobachteten Effekte sind ausschließlich auf die Bindung des Ligandenanteils des Toxinkonjugats zurückzuführen, denn die Wirkung von Ampicillin wurde nicht beeinflusst. Die Ursache dieses Effekts besteht in der sterischen Behinderung der Wechselwirkung der Toxin-Komponente mit deren Zielstruktur. Nach Bindung des Makromoleküls (gleichgültig ob Antikörper oder Streptavidin) an den entsprechenden Liganden, ist das Ampicillin nicht länger in der Lage mit den Penicillin bindenden Proteinen (PBP) der Zellmembran von *E.coli* zu interagieren. Ampicillin (wie alle anderen β -Lactam-Antibiotika) hemmt das Endstadium der Peptidoglykansynthese und stört so den Zellwandaufbau der Mikroorganismen. Die Antibiotika binden dazu die Penicillin bindenden Proteine (PBP). Der β -Lactam-Ring geht dabei eine kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms Murein-Transpeptidase ein. Dieses Enzym ist für die Quervernetzung des Mureins der Bakterienzellwand notwendig. In Folge der irreversiblen Hemmung der Murein-Transpeptidase durch das Antibiotikum wird der Aufbau der Zellwand gestört (Abraham, 1981).

Ob die eigentliche sterische Behinderung durch das Makromolekül bereits an der Bakterienzellwand oder direkt an den Penicillin bindenden Proteinen der Zellmembran stattfindet, ist unbekannt. Da jedoch das Biotin-Ampicillin Konjugat (Biotinillin) über einen, wenn auch

kurzen Linker zwischen Biotin und Ampicillin verfügt, ist zu vermuten, daß der Bindungsausschluß bereits an der Bakterienzellwand erfolgt. Durch Streptavidin gebundenes Biotinillin ist vermutlich nicht oder nur im begrenztem Maße in der Lage, diese zu durchdringen, um somit seine Wirkung auf die Penicillin bindenden Proteine zu entfalten. Das Ergebnis dieser Überlegung ist auf das Fluorescein-Ampicillin Konjugat (FITCillin) übertragbar.

Die Selektion von scFv exprimierenden *E.coli* Zellen konnte in einem Modellsystem unter Verwendung eines Gemisches aus zwei Klonen demonstriert werden. Eine erfolgreiche Selektion war bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:1000 (Zellen des anti-Fluorescein scFv exprimierenden Klons : Zellen eines Kontrollklons) möglich (Sellrie et al., 2007). Für eine praktische Anwendung muß es gelingen, noch seltenere Zellen aus einem komplexeren Gemisch (ein oder wenige Klone unter mehreren Millionen) zu selektieren.

Der Umstand, daß jenseits eines Mischungsverhältnisses von 1:1000 keine Selektion mehr zu beobachten war, hat seine Ursache im Aufbau des Experiments. Um Zellwachstum zu beobachten, ist der Einsatz sehr geringer Zelldichten beim Start des Experiments notwendig. Da die Experimente auf 96-well Zellkulturplatten in einem Volumen von nur 100 µl durchgeführt wurden, führte dies zu Problemen. Bei sehr ungünstigen Mischungsverhältnissen sind somit keine Zellen mehr vorhanden, die den scFv B13-DE1 produzieren, wodurch eine Selektion dieser Zellen unmöglich wird. Berechnungen auf Grundlage der Auszählung von auf Kulturplatten gewachsenen Einzellkolonien der Startkultur lieferten die theoretische Bestätigung für das Erreichen einer solchen Grenze bei etwa 1:5000 (Anzahl der Produzenten zur Anzahl der Kontrollklone).

In Hinblick auf eine praktische Anwendung ist es notwendig, das Design des Selektionsverfahrens zu verändern. Insbesondere ist die Anzahl der Klone, aus denen die Selektion erfolgen soll, stark zu erhöhen. Im Anwendungsfall sollte die Selektion aus einer Bibliothek von scFv sezernierenden Zellen erfolgen. Um dies zu erreichen, ist vermutlich der Übergang von einer Selektion in Lösung zu einer solchen auf Kulturplatten mit festen Nährmedien notwendig. Erste Experimente in diese Richtung unter Verwendung des beschriebenen Modellsystems erwiesen sich als schwierig. Es gelang bisher nicht, für die Selektion geeignete Kulturplatten, von definierter und homogen auf der Platte verteilter Konzentration des Ligand-Toxin Konjugats (FITCillin) herzustellen. Die für das Gießen der Agar-Platten notwendigen Temperaturen wirkten sich negativ auf die Stabilität des Ampicillin-Konjugats aus. Ein Ausstreichen des Konjugats, wie normalerweise üblich, führt zu dessen inhomogener Verteilung. Die Probleme der Stabilität und der homogenen

Verteilung des Konjugats sind kritisch, da im Selektionsexperiment die Konzentration des Konjugats sehr genau eingehalten werden muß, sie liegt nur geringfügig über der ohnehin tolerierten Ampicillin-Konzentration.

Die Lösung für dieses Problem sollte der Einsatz eines Kulturmediums sein, das sich bei Raumtemperatur verfestigt. Dies könnte z.B. durch den Zusatz eines die Polymerisation eines Mediumbestandteils startenden Katalysators erfolgen.

Die Selektion aus Antikörper-Bibliotheken verursacht weitere Probleme. Mit dem beschriebenen System, ist man gezwungen, mit verhältnismäßig geringen Toxinkonzentration zu arbeiten. Die Ursache hierfür wird offensichtlich, sobald man in Rechnung stellt, daß zur Inaktivierung eines Toxinmoleküls ein Makromolekül notwendig ist. Es findet keine Katalyse mit einem entsprechenden Umsatz statt. Insbesondere, sobald mehrere Selektionsrunden notwendig werden, ist das Auftreten von Resistenzmutationen unvermeidlich. Dies war vermutlich auch die Ursache für die Beobachtung, daß eine zweite Selektionsrunde nicht zu einer Verbesserung des Selektionsergebnisses der ersten Runde führte. Ein weiteres Hindernis, das bei der Selektion aus Antikörper-Bibliotheken auftreten wird, ist die Anreicherung von Zellen, deren Expressionsprodukt den Toxinanteil bzw. Übergangsstrukturen zwischen Ligand und Toxin binden. Sowohl dieses Problem als auch das der Resistenzmutationen kann gelöst werden, wenn wenigstens zwei unterschiedliche Toxine als Konjugate des Liganden in alternierender Reihenfolge zum Einsatz kommen.

Dies macht jedoch den Einsatz weiterer Toxine zusätzlich zum Ampicillin notwendig. Diese müssen niedermolekular, stabil, kommerziell erhältlich, leicht einer Kopplung an den Liganden zugänglich und nach erfolgter Kopplung weiterhin toxisch sein. Das Auffinden von weiteren diese Anforderungen erfüllenden Toxinen ist zweifellos möglich, wenn auch schwierig.

Das vorgestellte Selektionsverfahren ist bisher beschränkt auf die Selektion von Makromolekülen, die niedermolekulare Substanzen binden. Die Konjugation eines Makromoleküls (wie z.B. eines Proteins) an das Toxin wird in den allermeisten Fällen zum Funktionsverlust des Toxins führen. Selbst wenn dies ausbleiben sollte, ist nicht zu erwarten, daß die Toxizität durch Bindung eines weiteren Makromoleküls moduliert wird, zumindest nicht auf Grundlage des postulierten Mechanismus.

Es ist jedoch möglich die Methode auch auf Proteine auszuweiten, wenn geeignete, aus der DNA-Sequenz des Proteins abgeleitete, Peptide im Konjugat mit dem Toxin zum Einsatz kommen. Da jedoch nicht alle so gewonnenen Peptid-Binder auch das native Protein binden,

muß sich an diese Selektion ein konventionelles *Screening* auf Bindung des Proteins anschließen.

Das hier etablierte System verfügt über weitere potentiell sehr interessante Anwendungsmöglichkeiten. Der durch das Toxinkonjugat ausgeübte Selektionsdruck wirkt in zweierlei Richtung auf die Zelle. Sie kann diesem Druck, wenn dieser langsam durch steigende Konzentrationen des Toxinkonjugats erhöht wird, durch die Produktion eines besseren d.h. höher affineren Binders oder durch die bloße Erhöhung der Produktion des Binders begegnen. Beide Eigenschaften sind in der Praxis angestrebte Merkmale. Die Veränderung von Affinität, Spezifität und Expression des bindenden Makromoleküls kann durch Mutagene beeinflusst werden (Adams and Schier, 1999).

Eine weitere Anwendung eines Toxinkonjugats könnte darin bestehen, die Antikörperproduktion eines Klons stabil aufrechtzuerhalten. Im Normalfall gewinnen Zellen, die die Produktion des von ihnen zuvor in großer Menge exprimierten Proteins aufgeben, einen Selektionsvorteil gegenüber jenen, die die Expression weiter aufrechterhalten. Die Anreicherung der Nichtproduzenten in der Kultur könnte durch das Toxin-Konjugat unterbunden werden.

Alle bisherigen Betrachtungen bezogen sich auf den Einsatz des beschriebenen Systems zur Selektion von Zellen, die ein Molekül mit gewünschten Bindungseigenschaften exprimieren. Aber auch die vollständige Umkehrung des Systems erscheint möglich, d.h. der Einsatz zum Auffinden eines Liganden für einen gegebenen Binder. Mit Hilfe der kombinatorischen Chemie ist es möglich, eine Vielzahl von Verbindungen zu synthetisieren und diese im Anschluß mit einem entsprechenden Toxin zu konjugieren. Diese Toxinkonjugate können, nachdem sie auf Erhalt ihrer Toxizität getestet wurden, einzeln oder in Gruppen hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung auf Zellen untersucht werden, die das bindende Molekül produzieren. In einem solchen Testansatz überleben die Zellen nur dann, wenn die durch kombinatorische Chemie entstandene Verbindung durch das von der Zelle produzierte Makromolekül gebunden wird. Eine Automatisierung des Prozesses ist jedoch spätestens an dieser Stelle unumgänglich. Aber auch hierfür bietet sich das Selektionsverfahren auf Grund seiner Einfachheit an.

Das wichtigste Ziel ist jedoch die Adaption des Selektionsverfahrens auf die Produktion von monoklonalen Antikörpern in Erweiterung oder Ergänzung der Hybridomtechnik. Diese ist bisher auf ein Screening der erzeugten Hybridome angewiesen. Dies ist ein sowohl zeit- als auch materialaufwendiger Vorgang, der einen Großteil der anfallenden Kosten ausmacht. Eine Lösung in Form eines einfach zu handhabenden Selektionsverfahrens wäre von großem

wirtschaftlichen Nutzen. Die Etablierung eines solchen Verfahrens erscheint möglich, wie erste Vorversuche unter Verwendung von Zytostatika-Toxin-Konjugaten nahelegen.

Das vorgestellte Selektionsverfahren wird sich dabei durch seine Einfachheit stark von allen anderen Lösungsansätzen zur Umgehung oder Erleichterung des *Screenings* bei der Hybridomtechnik unterscheiden. Unter den publizierten Lösungsansätzen bedienen sich mehrere der Zellsortierung mittels Durchflußzytometrie (Gray et al., 1995; Carroll et al., 2004 und 2005; Bohm et al., 2005). Eine andere kürzlich publizierte Technologie ist das sogenannte *microengraving* (Love et al., 2006). Dabei werden die Hybridomzellen in Vertiefungen einer vorgefertigten Polymermatrix abgelegt und deren Sekretionsprodukt auf einem *mircoarray* analysiert. Keine dieser Technologien ist soweit ausgereift, ein Screening zur Gewinnung von Hybridomen zu ersetzen. Allen gemeinsam ist ihr großer technischer Aufwand. Ich gehe davon aus, daß der hier vorgeschlagene Weg, einer Selektion der Antikörper produzierenden Zellen mittels Toxinkonjugaten, eine einfacheren Weg zur Lösung des Problems bieten kann.

8. Literatur

Abraham, E.P. (1981). The beta-lactam antibiotics. *Sci Am.* **244**,76-86.

Adams, G.P. and Schier, R. (1999). Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J Immunol Methods.* **231**, 249-260.

Aslam, M. (1998) Bioconjugation. *Macmillan Reference Ltd, London*

Bär, S. (1996) Forschen auf Deutsch. *Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, Thun*

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

Bazin, H., Preaudat, M., Trinquet, E. and Mathis, G. (2001). Homogeneous time resolved fluorescence resonance energy transfer using rare earth cryptates as a tool for probing molecular interactions in biology. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **57**, 2197-2211.

Bazin, H., Trinquet, E. and Mathis, G. (2002). Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *J Biotechnol.* **82**, 233-250.

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

Blackburn, G.F., Shah, H.P., Kenten, H., Leland, J., Kamin, R.A., Link, J., Peterman, J., Powell, M.J., Shah, A. et al. (1991). Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin. Chem.* **37**, 1434-1539.

Blecka, L.J., Shaffer, M. and Dworschack, R. (1983). Inhibitor enzyme immunoassays for the quantification of various haptens: A review. *Immunoenzymatic Techniques* (eds Avrameas, S., Druet, P., Masseyeff, R. and Feldmann, G.), 207-214, *Elsevier, New York*

Blomberg, K., Hurskainen, P. and Hemmila, I. (1999). Terbium and rhodamin as labels in a homogeneous time-resolved fluorometric energy transfer assay of the β -subunit of human chorionic gonadotropin in serum. *Clin. Chem.* **45**, 855-861.

Bohm, E., Grillari, J., Voglauer, R., Gross, S., Ernst, W., Ferko, B., Kunert, R., Katinger, H. and Borth, N. (2005). Establishment of a strategy for the rapid generation of a monoclonal antibody against the human protein SNEV (hNMP200) by flow-cytometric cell sorting. *J Immunol Methods.* **307**, 13-23.

Bottger, V., Peters, L., Micheel, B. (1999). Identification of peptide mimotopes for the fluorescein hapten binding of monoclonal antibody B13-DE1. *J Mol Recognit.* **12**,191-197.

Bowdish, K., Tang, Y., Hicks, J.B. and Hilvert, D. (1991). Yeast expression of a catalytic antibody with chorismate mutase activity. *J Biol Chem.* **266**, 11901-11908.

Breitling, F., Dübel St. (1997) Rekombinante Antikörper. *Akad. Verl. , Heidelberg, Berlin*

Carrico, R.J., Yeung, K., Schroeder, H.R., Boguslaski, R.C., Buckler,R.T. and Christner, J.E. (1976). Spezific protein-binding reactions monitored with ligand-ATP conjugates and firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **76**, 95-110.

Carroll, S. and Al-Rubeai, M. (2004). The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther.* **4**, 1821-1829.

Carroll, S. and Al-Rubeai, M. (2005). ACSF labelling and magnetic cell separation: a rapid method of separating antibody secreting cells from non-secreting cells. *J Immunol Methods.* **296**, 171-178.

Chan, S., Gabra, H., Hill, F., Evan, G. and Sikora, K. (1987). A novel tumour marker related to the c-myc oncogene product. *Mol Cell Probes.* **1**, 73-82.

Dandliker, W.B. and Feigen, G. (1961). Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence. *Biophys. Res. Commun.* **5**, 299.

Dandliker, W.B., Kelly, R.J., Dandliker, J., Farquhar, J. and Levin, J. (1973). Fluorescence polarisation immunoassay. Theory and experimental method. *J. Immunochemistry.* **10**, 219-227.

Dorai, H., McCartney, J.E., Hudziak, R.M., Tai, M.S., Laminet, A.A., Houston, L.L., Huston, J.S. and Oppermann, H. (1994). Mammalian cell expression of single-chain Fv (sFv) antibody proteins and their C-terminal fusions with interleukin-2 and other effector domains. *Biotechnology (N Y).* **12**, 890-897.

Dubel S, Breitling F, Fuchs P, Zewe M, Gotter S, Welschhof M, Moldenhauer G, Little M. (1994). Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers. *J Immunol Methods.* **175**, 89-95.

Duenas, M., Ayala, M., Vazquez, J., Ohlin, M., Soderlind, E., Borrebaeck, C.A. and Gavilondo, J.V. (1995). A point mutation in a murine immunoglobulin V-region strongly influences the antibody yield in *Escherichia coli*. *Gene.* **158**, 61-66.

Edqvist, J., Keranen, S., Penttila, M., Straby, K.B. and Knowles, J.K. (1991). Production of functional IgM Fab fragments by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.* **20**, 291-300.

Engel, W.D. and Khanna, P.L. (1992). CEDIA in vitro diagnostics with novel homogeneous immunoassay technique. Current status and future prospects. *J. Immunol. Methods.* **150**, 99-102.

Fanger, M.W. (1995) Bispecific Antibodies. *R.G. Landes, Austin*

Farina, P. and Gohlke, J.R. (1983). Method for carrying out nonisotopic immunoassays, labeled analytes and kits for use in such assays. US Patent 4,378,428

Fischer, N., Léger, O. (2006). Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies. *Pathology*. **74**, 3-14.

Gonnelli, M., Gabellieri, E., Montagnoli, G. and Felicioli, R. (1981). Complementing S-peptide as modulator in enzyme immunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 917-923.

Gray, F., Kenney, J.S. and Dunne, J.F. (1995). Secretion capture and report web: use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells. *J Immunol Methods*. **182**, 155-163.

Harvey, B.R., Shanafelt, A.B., Baburina, I., Hui, R., Vitone, S., Iverson, B.L. and Georgiou, G. (2006). Engineering of recombinant antibody fragments to methamphetamine by anchored periplasmic expression. *J. Immunol. Methods*. **308**, 43-52.

Hemmila, I. and Mikkola V.-M. (2001). Time-Resolution in fluorometry technologies, labels, and applications in bioanalytical assay. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* **38**, 441-519.

Henderson, D.R., Friedman, S.B., Harris, J.D., Manning W.B. and Zoccoli, M.A. (1986). CEDIA, A new homogeneous immunoassay system. *Clin. Chem.* **32**, 1637-1641.

Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques. *Academic Press, San Diego*

Hoogenboom, H.E., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chriswell, D.J., Hudson, P. and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acid Research* **19**, 4133-4137.

Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Altling Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. and Lerner, R.A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* **246**, 1275-1281.

Ikaryama, Y., Kunoh, H. and Aizawa, M. (1985). Electrochemical luminescence-based homogeneous immunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 987-992.

Ito, W., Iba, Y. and Kurosawa, Y. (1993). Effects of substitutions of closely related amino acids at the contact surface in an antigen-antibody complex on thermodynamic parameters. *J Biol Chem.* **268**, 16639-16647.

Jantscheff, P., Bottger, V., Price, M., Micheel, B., Kaiser, G., Zotter, S., Kotzsch, M., Grossmann, H. and Karsten, U. (1991). Production and characterization of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA). *Biomed Biochim Acta.* **50**,1261-1267.

Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. and Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. *U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda*

Karawajew, L., Micheel, B., Behrsing, O. and Gaestel, M. (1987). Bispecific antibody-producing hybrid hybridomas selected by a fluorescence activated cell sorter. *J Immunol Methods.* **96**, 265-270.

Karawajew, L., Behrsing, O., Kaiser, G. and Micheel, B. (1988). Production and ELISA application of bispecific monoclonal antibodies against fluorescein isothiocyanate (FITC) and horseradish peroxidase (HRP). *J Immunol Methods.* **111**, 95-99.

Kay, B., Winter, J. and McCafferty, J. (1996). Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual. *Academic Press, San Diego*

Kimura, S., Iyama, S., Yamaguchi, Y. and Kanakura, Y. (2001). Homogenous enzyme immunoassay for cyclosporine in whole blood using the EMIT 2000 cyclosporine specific assay with the COBAS MIRA-plus analyzer. *J Clin Lab Anal.* **5**, 319-323.

King, D.J., Byron, O.D., Mountain, A., Weir, N., Harvey, A., Lawson, A.D., Proudfoot, K.A., Baldock, D., Harding, S.E. and Yarranton, G.T. (1993). Expression, purification and characterization of B72.3 Fv fragments. *Biochem J.* **290**, 723-729.

Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Martin, A.C., Kupriyanova, O.A. and Little, M. (1997). Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Eng.* **10**, 445-453.

Knappik, A., Krebber, C. and Pluckthun, A. (1993) The effect of folding catalysts on the in vivo folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*. **11**, 77-83.

Knappik, A., Pluckthun, A. (1995). Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng.* **8**, 81-89.

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

Kontermann, R.E., Liu, Z., Schulze, R.A., Sommer, K.A., Queitsch, I., Dübel, S., Kipriyanov, S.M., Breitling, F. and Bautz, E.K.F. (1995). Characterization of the epitope recognised by a monoclonal antibody directed against the largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 473-481.

Lerner, R.A., Kang, A.S., Bain, J.D., Burton, D.R. and Barbas, C.F. 3rd. (1992). Antibodies without immunization. *Science*. **258**, 1313-1314.

Leuversing, J.H.W., Thal, P.J.H.M., Van der Waart, M. and Schuurs, A.H.W.M. (1980). Sol particle immunoassay (SPIA). *J. Immunoassay* **1**, 77-91.

Li, T.M., Benovic, J.L., Buckler, R.T. and Burd, J.F. (1981). Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for theophylline in serum. *Clin. Chem.* **27**, 22-26.

Litman, D.J., Hanlon, T.M. and Ullman, E.F. (1980). Enzyme channeling immunoassay: a new homogeneous enzyme immunoassay technique. *Anal. Biochem.* **106**, 223-229.

Löffler, A., Gruen, M., Wuchter, C., Schriever, F., Kupfer, P., Dreier, T., Hanakam, F., Baeuerle, P.A., Bommert, K., Karawajew, L., Dorken, B. and Bargou, R.C. (2003). Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia*. **17**, 900-909.

- Love, J.C., Ronan, J.L., Grotenbreg, G.M., van der Veen, A.G. and Ploegh, H.L. (2006). A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. *Nat Biotechnol.* **24**, 703-707.
- Lu, Z., Masaki, T., Shoyama, Y. and Tanaka, H. (2006). Construction and expression of a single chain Fv fragment against pharmacologically active paeoniflorin in *Escherichia coli*, and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Planta Med.* **72**, 151-155.
- Lum, L.G., Davol, P.A. and Lee R.J. (2006). The new face of bispecific antibodies: targeting cancer and much more. *Exp. Hematol.* **34**, 1-6.
- Maeda, S. (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* **34**, 351-372.
- Masson, P.L., Cambiaso, C.L., Collet-Cassart, D., Magnusson, C.G.M., Richards, C.B. and Sindic, C.J.M. (1981). *Meth. Enzymol.* **74**, 106-139.
- Mathis, G. (1993). Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. *Clin Chem.* **39**, 1953-1959.
- Matthews, R.E.F. (1982) Classification and Nomenclature of viruses. *Karger Verlag, Basel.*
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554.
- McCafferty, J., Hoogenboom, H.R. and Chiswell, D.J. (1996). Antibody Engineering: A Practical Approach. *IRL Press, Oxford*
- Meyer, K. (1922). Über Hämagglutininvermehrung und hämagglutinationfordernde Wirkung bei menschlichen Seren. *Ztschr. f. Immun. u. exper. Therap.* **34**, 229.
- Micheel B., Jantscheff P., Bottger V., Scharte G., Kaiser G., Stolley P., Karawajew L. (1988). The production and radioimmunoassay application of monoclonal antibodies to fluorescein isothiocyanate (FITC). *J Immunol Methods.* **111**, 89-94.

Micheel, B. (2003). Monoklonale Antikörper: A review. Grundlagen der molekularen Medizin (eds Ganten, D., Ruckpaul, K.), 444-520, *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg*

Monzavi-Karbassi, B., Shamloo, S., Kieber-Emmons, M., Jousheghany, F., Luo, P., Lin, K.Y., Cunto-Amesty, G., Weiner, D.B. and Kieber-Emmons, T. (2003). Priming characteristics of peptide mimotopes of carbohydrate antigens. *Vaccine*. **21**, 753-760.

Moore, P. and Clayton, J. (2003). To affinity and beyond. *Nature*. **426**, 725-731.

Morton, H.C., Atkin, J.D., Owens, R.J. and Woof, J.M. (1993). Purification and characterization of chimeric human IgA1 and IgA2 expressed in COS and Chinese hamster ovary cells. *J Immunol*. **151**, 4743-4752.

Mosbach, K. and Mattiasson, B. (1970). Matrix-bound enzymes. Matrix-bound two-enzyme system. *Acta Chem. Scand*. **24**, 2093-2100.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. **155**, 335-350.

Nargessi, R.D., Landon, J., Smith, D.S. (1979). Use of antibodies against the label in non-separation non-isotopic immunoassay: „indirect quenching“ fluoroimmunoassay of proteins. *J. Immunol. Methods* **26**, 307-313.

Pignatari, G.C, Takeshita, D., Parise, C.B., Soares, F.A., de Moraes, J.Z. and Han, S.W. (2007). Carcinoembryonic antigen (CEA) mimicry by an anti-idiotypic scFv isolated from anti-Id 6.C4 hybridoma. *J. Biotechnol*. **127**, 615-625.

Place, M.A., Carrico, R.J., Yeager, F.M., Albarella, J.P. and Boguslaski, R.C. (1983). A colorimetric immunoassay based on an enzyme inhibitor method. *J. Immunol. Methods* **61**, 209-216.

Plückthun, A. and Pack, P. (1997). New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* **3**, 83-105.

Ridder, R., Geisse, S., Kleuser, B., Kawalleck, P. and Gram, H. (1995). A COS-cell-based system for rapid production and quantification of scFv:IgC kappa antibody fragments. *Gene*. **166**, 273-276.

Robinson, G.A., Martinazzo, G. and Forrest, G.C. (1986). A homogeneous bioelectrochemical immunoassay for thyroxine. *J. Immunoassay* **7**, 1-15.

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

Rubenstein, K.E., Schneider, R.S and Ullman, E.F. (1972). Homogeneous enzyme-immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 846-851.

Sambrook J. and Russell D. (2001). Molecular Cloning – A Laboratory Manual. *Could Spring Harbour Laboratory Press*, Could Spring Harbour, New York

Schenk, J.A., Heymann and Micheel, B. (1995). The accessibility of thiophosphorylated groups in DNA fragments to the enzymatic activity of ligases and restriction endonuclease BbsI. *Biochem Mol Biol Int.* **36**, 1037-1043.

Schenk, J.A., Sellrie, F., Böttger, V., Menning, A., Stöcklein, W.F.M. and Micheel B. (2007) Generation and application of a fluorescein-specific single chain antibody. *Biochimie* (in press).

Sellrie, F., Schenk, J.A., Behrsing, O., Böttger, V., Micheel, B. (2002). A competitive immunoassay to detect a hapten using an enzyme-labelled peptide mimotope as tracer. *J. Immunol. Meth.* **261**, 141-144.

Sellrie, F., Warsinke, A. and Micheel, B. (2006). Homogeneous indirect fluorescence quenching immunoassay for the determination of low molecular weight substances. *Anal Bioanal Chem.* **386**, 206-210.

Sellrie, F. and Micheel, B. (2007). Selection of antibody-producing E.coli cells by means of toxin conjugates. *Biochemical Engineering Journal* (in press).

Sellrie, F., Schenk, J.A., Behrsing, O., Drechsel, O. and Micheel, B. (2007). Cloning and characterization of a single chain antibody to glucose oxidase from a murine hybridoma. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (in press).

Singer, J.M and Plotz, R.M. (1956). The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Amer. J. Med.* **21**, 888-892.

Skar, L.A., Jeaitis, A.J., Painter, R.G. and Cochrane, C.G. (1982). Ligand/receptor internalisation: a spectroscopic analysis and a comparison of ligand binding, cellular response, and internalisation by human neutrophils. *J. Cell Biochem.* **20**, 193-202.

Skerra, A. and Plückthun, A. (1985). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.

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

Songsivilai, S. and Lachmann, P.J. (1990). Bispecific antibody: a tool for diagnosis and treatment of disease. *Clin Exp Immunol.* **79**, 315-321.

Ternynck, T., Gregoire, J. and Avrameas, S. (1983). Enzyme/anti-enzyme monoclonal antibody soluble immune complexes (EMAC): their use in quantitative immunoenzymatic assays. *J Immunol Methods.* **58**,109-118.

Theuretzbacher, U. (1998). Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren. *Chemotherapie Journal.* **4**, 136-142.

Tijssen, P. (1985) Practice and theory of enzyme immunoassay. *Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford*

Ullman, E.F., Schwarzberg, M. and Rubenstein K. (1976). Fluorescent excitation transfer immunoassay. *J. Biol. Chem.* **251**, 4172-4178.

Ullman, E.F. and Khanna, P.L. (1981). Fluorescence excitation transfer immunoassay. *Meth. Enzymol.* **74**, 28-60.

Ullman, E.F. (1981). Recent advances in fluorescence immunoassay techniques. In *Ligand Assay* (eds Langan, J. and Clapp, J.) *J. Masson, New York*

Ullman, E.F., Gibbons, I., Weng, L., DiNello, R. Stiso, S.N. and Litman, D. (1984). Homogeneous immunoassays and immunometric assays. In *Diagnostic Immunology: Technology Assessment and Quality Assurance* (eds Rippey, J.H. and Nakamura, R.M.) *College of American Pathologists, Skokie, Illinois*

Ullman, E.F., Kirakossian, H., Switchenko, A.C., Ishkanian, J., Ericson, M., Wartchow, C.A., Pirio, M., Pease, J., Irvin, B.R. et al. (1996). Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. *Clin. Chem.* **42**, 1518-1526.

Ullman, E.F. (1999). Homogeneous immunoassays. EMIT and beyond. *J. Clin. Ligand Assay* **22**, 221-227.

Ulrich, H.D., Patten, P.A., Yang, P.L., Romesberg, F.E. and Schultz, P.G. (1995). Expression studies of catalytic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 11907-11911.

Von Schulthess, G.K., Cohen, R.J. and Benedek, G.B. (1976). Laser light scattering spectroscopic immunoassay in the agglutination-inhibition mode for human chorionic gonadotropin (hCG) and human luteinizing hormon. *Immunochemistry* **13**, 963-966.

Voss, E.W. Jr. (1984). Fluorescein hapten: An immunological probe. *CRC Press, Inc., Boca Rato, Florida*

Ward, E.S. (1993). Antibody engineering using *Escherichia coli* as host. *Adv Pharmacol.*, **24**, 1-20.

Watt, R.M. and Voss, E.W. Jr. (1977). Mechanism of quenching of fluorescein by anti-fluorescein IgG antibodies. *Immunochemistry*. **14**, 533-551.

Wentworth, P. Jr., Jones, L.H., Wentworth, A.D., Zhu, X., Larsen, N.A., Wilson, I.A., Xu, X., Goddard, W.A. 3rd., Janda, K.D., Eschenmoser, A. and Lerner, R.A. (2001). Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science*. **293**, 1806-1811.

Wentworth, P. Jr., Wentworth, A.D., Zhu, X., Wilson, I.A., Janda, K.D., Eschenmoser, A., Lerner, R.A. (2003). Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 1490-1493.

Werner, D., Behrsing, O., Scharte, G., Woller, J., Steup, M. and Micheel, B. (2002). Monoclonal anti-diuron antibodies prevent inhibition of photosynthesis by diuron. *FEBS Lett.*, **523**, 95-98.

Wild, D. (2001). The Immunoassay Handbook. *Nature Publishing Group, London*

Zuk, R., Rowley, G.L. and Ullman, E.F. (1979). Fluorescence protection immunoassay: a new homogeneous assay technique. *Clin. Chem.* **25**, 1554-1560.

Zwick, M.B., Shen, J. and Scott, J.K. (1998). Phage-displayed peptide libraries. *Curr Opin Biotechnol.* **9**, 427-436.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Biotechnologie“ am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam angefertigt. Für die anregende und sehr kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Gruppe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Burkhard Micheel für die Bereitstellung des Themas sowie die überaus kompetente fachliche wie persönliche Betreuung.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Dr. Olaf Behrsing für die fachliche und methodische Unterstützung.

Mein Dank gilt Dr. Deljana Werner, bei der ich die Technik der Zellkultur erlernte, sowie Gudrun Scharte, Franziska Matyssek, Gerda Wilhelm, Dr. Manuela Heiner und Dr. Katja Heilmann für ihren Rat, Hilfe und Unterstützung.

Katrin Messerschmidt und Astrid Menning gilt mein Dank für die experimentelle Zusammenarbeit und Hilfe.

Für die Unterstützung bei der Klonierung rekombinanter Antikörper möchte ich mich insbesondere bei Jörg Schenk und Oliver Drechsel bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Axel Warsinke (Analytische Biochemie) für die gemeinsamen Messungen zum *Fluorescence Quenching*.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Michael Beck und Dr. Niko Hildebrandt (Physikalische Chemie) für die Unterstützung meiner Experimente.

Ich bedanke mich bei Dr. Rudolf Dölling und Dr. Frank Kernchen (Firma Biosyntan, Berlin) für die fachliche Unterstützung sowie die durchgeführten chemischen Synthesen.

Dr. Volker Böttger (Wilex GmbH, München) gilt mein Dank für die Bereitstellung rekombinanter Antikörper sowie der Firma Biochemie S.p.A., Rovereto für die Unterstützung meiner Arbeit durch die Lieferung einer kleinen Menge Kalium Clavulanate.

Ich möchte mich ebenso bei Edith Micheel für die Korrektur der diversen Publikationen und Anträge bedanken.

Die Arbeiten wurden im Rahmen des Innovationskolleg: „Biomolekulare Erkennungssysteme für die biochemische Analytik“; 16B1-1 der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Die ersten Schritte zur wirtschaftlichen Verwertung der Ergebnisse wurden durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie im Rahmen des Exist Seed Programms gefördert. Mein Dank gilt Prof. Dr. Guido Reger (Stiftungsprofessur für Innovative Existenzgründung und Mittelstandsentwicklung) sowie Stephan Hiller (Firma Biovent; Berlin) für die Unterstützung dieses Vorhabens.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Potsdam, den

Frank Sellrie