

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Optimierte konstante Domänen für die effektive Expression von
Fab-Fragmenten in *E. coli*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Tiede

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Höhne
2. Prof. Dr. B. Micheel
3. Prof. Dr. S. Dübel

Datum der Promotion: 22.03.2010

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	I
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	VI
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	VIII
<u>ABSTRACT</u>	X
<u>A EINLEITUNG</u>	1
A.1 ANTIKÖRPER – EINE EINFÜHRUNG	1
A.2 ANTIKÖRPERFRAGMENTE	2
A.3 ENTWICKLUNG DER REKOMBINANTEN ANTIKÖRPER-TECHNOLOGIE	4
A.3.1 EXPRESSIONSSYSTEME FÜR REKOMBINANTE ANTIKÖRPER.....	5
A.3.2 BAKTERIOPHAGE M13	6
A.3.3 PHAGEN-DISPLAY	7
A.3.3.1 Antikörpergenbibliotheken	8
A.4 REKOMBINANTE EXPRESSION VON FAB-FRAGMENTEN IN <i>E. COLI</i>	10
A.5 VORSTELLUNG DES MODELLANTIÖRPER CB4-1	11
A.6 ZIEL DER ARBEIT	12
<u>B MATERIAL UND METHODEN</u>	13
B.1 MATERIAL	13
B.1.1 CHEMIKALIEN.....	13
B.1.2 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	13
B.1.3 BAKTERIEN-NÄHRMEDIEN UND SUPPLEMENTE	14
B.1.4 OLIGONUKLEOTIDE	15
B.1.5 <i>E. COLI</i> -STÄMME.....	17
B.1.6 PLASMIDE	17
B.1.7 ENZYME UND ANTIKÖRPER.....	18
B.1.8 PEPTIDE UND PROTEINE FÜR ELISA-ASSAYS.....	19
B.2 METHODEN	20
B.2.1 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	20

B.2.1.1	Präparation von Total-RNA aus Hybridomazellen.....	20
B.2.1.2	Reverse Transkription von Total-RNA	20
B.2.1.3	Kultivierung von <i>E.coli</i> Stämmen	20
B.2.1.3.1	Herstellung von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen (CaCl ₂ -Methode)	20
B.2.1.3.2	Herstellung von elektro-kompetenten ER2738 (für Phagen-Display).....	21
B.2.2	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> STÄMMEN MIT PLASMID-DNA.....	21
B.2.2.1	Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	21
B.2.2.2	Elektroporation von DNA-Bibliotheken in ElectroTen Blue Zellen und ER2738.....	21
B.2.2.3	Bestimmung der Transformationseffizienz von selbst hergestellten elektro-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	22
B.2.3	<i>IN VITRO</i> MODIFIZIERUNG VON DNA.....	23
B.2.3.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	23
B.2.3.2	<i>Error-prone</i> -PCR	24
B.2.3.3	Herstellung lokal randomisierter DNA-Abschnitte	24
B.2.3.4	SOE (Splicing by Overlapping Extension)-PCR.....	26
B.2.3.5	Einführung von Punktmutationen.....	26
B.2.3.6	DNA- <i>Shuffling</i> (nach Stemmer)	27
B.2.3.7	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
B.2.3.8	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	28
B.2.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
B.2.4	NATIVE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	29
B.2.5	AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN	30
B.2.6	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	30
B.2.7	DNA-SEQUENZIERUNG	31
B.2.8	ISOLIERUNG VON PLASMIDEN	31
B.2.9	EXPRESSION UND REINIGUNG VON REKOMBINANTEN PROTEIN	31
B.2.9.1	Cytoplasmatische Expression von GFP M53T.....	31
B.2.9.2	Expression Fab-Fragmenten im Mikrotiterplattenformat [80].....	31
B.2.9.3	Analytische Expression von Fab-Fragmenten (20 ml Zellkultur)	32
B.2.9.4	Präparative Expression von Fab-Fragmenten.....	32
B.2.9.5	Analytischer Periplasmaaufschluss	32
B.2.9.6	Präparativer Periplasmaaufschluss	33

B.2.9.7	Quantifizierung von Proteinen im Periplasma und Mediumüberstand	33
B.2.10	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	33
B.2.10.1	Metallchelate-Affinitätschromatographie	33
B.2.10.2	SDS-PAGE	34
B.2.10.3	Coomassiefärbung von Proteingelen	35
B.2.10.4	Western-Blot	35
B.2.10.5	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	36
B.2.11	ARBEITEN MIT FILAMENTÖSEN PHAGEN	38
B.2.11.1	Selektion von rekombinanten Fab-Fragmenten mittels Phagen-Display	38
B.2.11.2	Präparation von M13K07 Helferphagen	39
B.2.11.3	Präparation von Phagemidbibliotheken	39
B.2.11.4	PEG – Fällung von Phagen aus dem Zellkulturüberstand	39
B.2.11.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Phagen [31]	40
B.2.11.6	<i>Panning</i> von Fab4myc Phagemidbibliotheken	40
B.2.11.7	Reamplifikation eluierter Phagen	41
B.2.11.8	Herstellung von Phagen im 96er Mikrotiterplattenformat	42
B.2.12	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON FAB4MYC VORTEILSMUTANTEN	42
B.2.12.1	K_D -Bestimmung über ELISA	42
B.2.13	DENATURIERUNG DURCH GUANIDINIUMHYDROCHLORID	43
B.2.14	DYNAMISCHE DIFFERENZIALKALORIMETRIE (DSC)	45
C	ERGEBNISSE	46
C.1	DESIGN EINER FAB-EXPRESSIONSKASSETTE MIT AUSTAUSCHBAREN KONSTANTEN DOMÄNEN DER LEICHTEN UND SCHWEREN KETTE	46
C.2	KONSTRUKTION VON PHAGEMIDVEKTOREN	48
C.2.1	AMPLIFIKATION DER ORIGINALEN DOMÄNEN DES FAB-FRAGMENTS CB4-1 AUS HYBRIDOMAZELLEN	49
C.2.2	PCR ZUR ERZEUGUNG VON SEC-SIGNALSEQUENZEN UND MYCTAG	50
C.2.3	SOE-PCR FÜR DIE GENERIERUNG EINER SCHWEREN UND LEICHTEN KETTE DES CB4-1 FAB- KONSTRUKTES	50
C.2.4	KONSTRUKTION DES PHAGEMIDVEKTORS PSEC-FAB1MYC MIT ORIGINALEN, MURINEN KETTEN DES ANTIKÖRPERS CB4-1	50
C.2.5	KONSTRUKTION DES PSEC-FAB2MYC VEKTORS	51

C.2.6	KONSTRUKTION DES PSEC-FAB3MYC VEKTORS	51
C.2.7	KONSTRUKTION DES PSEC-FAB4MYC VEKTORS	52
C.2.8	KONSTRUKTION DES VEKTORS PSEC-FAB5MYC	53
C.2.9	EXPRESSION VON GFP-M53T	53
C.2.10	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN EXPRESSIONSTEMPERATUR	54
C.2.11	VERGLEICHENDE EXPRESSIONSANALYSE DER ERZEUGTEN FAB-KONSTRUKTE.....	55
C.3	VERGLEICH DES SEC- UND SRP-TRANSPORTS	57
C.3.1	KONSTRUKTION DES PHAGEMIDVEKTORS MIT FAB4MYC UND SRP-SIGNALSEQUENZ DSBASS	57
C.3.2	KONSTRUKTION DER SCHWEREN KETTE MIT DSBASS-SIGNALSEQUENZ.....	57
C.3.3	KONSTRUKTION DER LEICHTEN KETTE MIT DSBASS-SIGNALSEQUENZ.....	59
C.3.4	EXPRESSION VON FAB4MYC MIT SEC- UND SRP-SIGNALSEQUENZ IN <i>E. COLI</i> JM83.....	59
C.4	EXPRESSION VON SEPARIERTEN EINZELKETTEN DES FAB4MYC	60
C.4.1	KONSTRUKTION VON PLASMIDVEKTOREN FÜR DIE EXPRESSION VON EINZELKETTEN	60
C.4.1.1	Konstruktion eines Expressionsvektors der schweren Ketten mit OmpA Signalsequenz.....	60
C.4.1.2	Konstruktion eines Expressionsvektors der leichten Kette mit PhoA Signalsequenz	61
C.4.1.3	Konstruktion eines Expressionsvektors der leichten Kette mit OmpA Signalsequenz	61
C.4.2	EXPRESSIONSANALYSE DER SCHWEREN UND LEICHTEN KETTE DES FAB4MYC	62
C.4.3	NACHWEIS EINER HINTERGRUNDEXPRESSION DES <i>TET</i> REGULIERTEN PROMOTORS	63
C.4.4	EINFÜHRUNG EINES ELISA- <i>SCREENING</i> -PROTOKOLLS	64
C.5	AUFBAU VON RANDOMISIERTEN ANTIKÖRPERGENBIBLIOTHEKEN	66
C.5.1	<i>ERROR</i> -PRONE-PCR BIBLIOTHEKEN „A“	66
C.5.2	BIBLIOTHEKEN „B“	70
C.5.3	LOOP BIBLIOTHEKEN „C“	72
C.5.4	AUFBAU DER LOOP-BIBLIOTHEK C-C _{H1}	74
C.6	<i>AFFINITÄTSPANNINGS</i>	75
C.6.1	AUFBAU EINER PHAGENBIBLIOTHEK MIT RANDOMISIERTER SCHWERER DOMÄNE	75
C.6.2	<i>PANNING</i>	75
C.6.3	OPTIMIERUNG DES <i>PANNING</i> -PROTOKOLLS	76
C.6.4	ERNEUTES <i>PANNING</i> MIT <i>ERROR-PRONE</i> -BIBLIOTHEK C-C _{H1} MIT HITZEINAKTIVIERUNG	78
C.6.5	<i>DNA-SHUFFLING</i>	79
C.6.6	AUFBAU DER BIBLIOTHEK A-C _{H1} - <i>SHUFFLING</i>	80
C.6.7	AUFBAU UND <i>PANNING</i> DER PHAGENBIBLIOTHEK A-C _{H1} - <i>SHUFFLING</i>	80

C.6.8	BIBLIOTHEK A-C _H 1-SHUFFLING-C _{KAPPA}	82
C.6.9	PANNING DER A-C _H 1-SHUFFLING-C _{KAPPA} BIBLIOTHEK	83
C.7	CHARAKTERISIERUNG VON MUTATIONSMUTANTEN	84
C.7.1	WACHSTUMSKURVEN VON SELEKTIONSMUTANTEN	85
C.7.2	PRÄPARATIVE EXPRESSION UND REINIGUNG VON SELEKTIONSMUTANTEN.	87
C.7.3	ABSCHÄTZUNG DER FAB-FRAGMENT-AUSBEUTE IN <i>E. COLI</i>	89
C.7.4	K _D -BESTIMMUNG MITTELS ELISA.....	90
C.7.5	STABILITÄT DER FAB-VARIANTEN GEGENÜBER THERMISCHER DENATURIERUNG	91
C.7.6	STABILITÄT DER FAB-VARIANTEN GEGENÜBER CHEMISCHER DENATURIERUNG	91
C.8	ÜBERTRAGUNG VON OPTIMIERTEN KONSTANTEN DOMÄNEN.....	93
C.8.1	EXPRESSION DES MUA9 MIT OPTIMIERTEN KONSTANTEN DOMÄNEN.....	93
<u>D</u>	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>96</u>
D.1	AUFBAU VON ANTIKÖRPERGENBIBLIOTHEKEN	96
D.2	GRENZEN DES KONVENTIONELLEN PHAGEN-DISPLAYS	98
D.3	FUNKTIONELLE FAB-EXPRESSION IN <i>E. COLI</i>.....	100
D.4	IDENTIFIKATION VON AMINOSÄUREPOSITIONEN FÜR DIE VERBESSERTE FAB-EXPRESSION	102
D.5	CHARAKTERISIERUNG VON SELEKTIONSMUTANTEN	104
D.6	ÜBERTRAGBARKEIT DER VERBESSERTEN EXPRESSIONSFÄHIGKEIT AUF ANDEREN VARIABLE DOMÄNEN	104
D.7	ANTIÖRPERALTERNATIVEN.....	105
D.8	FAZIT UND AUSBLICK.....	107
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>108</u>
	<u>DANKSAGUNG & LEBENS LAUF</u>	<u>115</u>
	<u>PUBLIKATIONS LISTE.....</u>	<u>116</u>
	<u>ERKLÄRUNG.....</u>	<u>117</u>

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
aTc	Anhydrotetracyclin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Complementary DNA
°C	Temperatur in Celsius
CDR	<i>complementary determining region</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
C _{H1}	konstante Domäne der schweren Kette
C _{Kappa}	konstante Domäne der leichten Kette
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat(e)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment cristallizable</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
h	Stunde
HC	<i>heavy chain</i>
His	Histidin

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig(A,D,E,G,M)	Immunglobulin (A,D,E,G,M)
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante [M]
LC	<i>light chain</i>
M	Molar
min	Minute
Moi	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
Ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidenflourid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
üN	Über Nacht
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Proteine mit spezifischen Bindungseigenschaften, enzymatischen Aktivitäten und physikochemischen Charakteristika sind leistungsfähige Werkzeuge für die Forschung sowie für biotechnologische und diagnostische Anwendungen. Darüber hinaus spielen bestimmte Proteine, die Antikörper, eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Biopharmaka. Dabei sind *in vitro*-Selektionsmethoden wie das Phagen-Display die Mittel der Wahl, um gegen nahezu alle beliebigen Antigene Antikörper zu selektieren und zu optimieren. Das Arbeiten mit filamentösen Phagen ist jedoch an das *E. coli* Expressionssystem gebunden und es können daher nur in *E. coli* exprimierbare Proteine selektiert und optimiert werden. In Bezug auf Antikörper stehen somit nur Antikörperfragmente, in erster Linie das scFv-Fragment und das Fab-Format, zur Verfügung. Im Gegensatz zum scFv garantiert das Fab-Fragment eine hohe Stabilität sowie monomeres Auftreten und lässt sich leicht und ohne Funktionsverlust in ein vollständiges Immunglobulin umwandeln. Die (periplasmatische) Expression von Fab-Fragmenten in *E. coli* stellt jedoch ein multifaktorielles Problem dar und ist häufig mit der Bildung von Aggregaten, sogenannten Einschlusskörpern, verbunden. Die Ausbeute an löslichem Protein ist nicht zuletzt dadurch gering.

Diese Arbeit hat zum Ziel, die Ausbeute an funktionellem Fab mittels Zufallsmutagenese innerhalb der konstanten Domänen der leichten und schweren Kette des Modellantikörpers CB4_1 zu erhöhen. Generierte Antikörperbibliotheken wurden unter optimierten Selektionsbedingungen gescreent und Selektionsmutanten durch *DNA-Shuffling* weiter optimiert. Drei verbesserte Varianten wurden anschließend hinsichtlich ihrer Affinität und Stabilität in Bezug zum Ausgangskonstrukt Fab4myc charakterisiert. Dabei konnte eine um einen Faktor von bis zu 28 verbesserte Fab-Expression ermittelt werden. Des Weiteren wurden für alle drei Varianten Bindungseigenschaften ermittelt, die mit denen des Fab4myc übereinstimmen. Stabilitätsuntersuchungen mit Hilfe von Guanidinhydrochloridtitration und Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) zeigten nur für zwei Konstrukte eine leicht verringerte Stabilität.

Es konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Phagen-Display-System neben dem Screenen auf Affinität auch ein brauchbares Werkzeug für die Expressionsoptimierung von Proteinen darstellt. In Bezug auf Phagen-Display-Systeme, die auf dem Fab-Format basieren, ist zu erwarten, dass der Einsatz modifizierter konstanter Domänen zur Verminderung des *in vivo*-Selektionsdrucks beiträgt und dadurch die Komplexität der Bibliothek erhöht. Die zusätzliche

Überprüfung einer allgemeinen Übertragbarkeit der verbesserten Fab-Expression durch optimierte konstante Domänen führte in zwei von drei Fällen zu einem positiven Ergebnis. Hierbei wurde deutlich, dass neben den konstanten Domänen auch V_H einen Einfluss auf die funktionelle Fab-Expression hat.

Abstract

Proteins with specific binding properties, enzymatic activities and physicochemical characteristics are effective tools for research as well as biotechnical and diagnostic applications. Moreover, certain proteins - antibodies - play key roles in the development of biotherapeutics. Phage display is currently one of the most frequently used *in vitro* methods for the selection and optimisation of antibodies against the vast majority of arbitrary antigens. Work with filamentous phages is tied to the *E. coli* expression system and thus only proteins expressible in *E. coli* can be selected and optimised. In terms of antibodies, only antibody fragments such as scFv- and Fab-Fragment are available. In contrast to the scFv-Fragment, the Fab-Fragment ensures high stability, as well as monomeric formation and is easy to convert into whole human immunoglobulins without loss of functionality. The periplasmic expression of Fab-Fragments in *E. coli* presents a multifactorial problem which is often related to the formation of insoluble aggregates, also known as inclusion bodies. The expression yield of soluble protein is however, relatively low.

The aim of this task was to increase the expression yield of functional proteins in the model antibody CB4-1 by mutagenesis within the constant domains of the heavy and light chain. Generated antibody libraries were screened and selected under optimised conditions and the selected mutants further optimised by DNA-*shuffling*. Three improved expression variants were then characterised according to affinity and stability concerning the wildtyp Fab-fragment Fab4myc, whereby an increased Fab-expression yield of factor 28 could be determined. In addition, similar binding properties for all four constructs were able to be determined. Analysis of stability with the support of guanidium hydrochloride titration and differential scanning calorimetry (DSC) revealed a slight decrease in stability for two constructs.

The results of the task demonstrated, that besides in screening for affinity, the phage display system proved to be a viable tool for the optimised expression of proteins. With regards to Fab-format based phage display systems, it is expected that the insertion of modified constant domains contribute to the decrease of the *in vivo* selective pressure and as a result increase the library complexity. A further examination of the general communicability of improved Fab-expression by optimised constant domains yielded a positive result in two out of three cases. It is therefore concluded, that alongside constant domains, V_H must also have an influence on functional Fab expression.

A EINLEITUNG

A.1 Antikörper – eine Einführung

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Proteine des Immunsystems und werden von B-Lymphozyten gebildet. Sie kommen sowohl als Membranproteine auf den Zelloberflächen als auch im Blutplasma vor und sind gegen körperfremde Stoffe (Antigene) gerichtet. Durch die Antigen-Antikörper-Bindung sind sie in der Lage, die Abwehr gegen infektiöse Organismen wie Bakterien, Viren, Pilze oder auch Tumorzellen zu vermitteln. Für diesen Zweck ist eine enorme Vielzahl von Antikörpern mit unterschiedlichen Spezifitäten notwendig. Für die geschätzten $>10^{11}$ Varianten stellt der Organismus keine kompletten Gene zur Verfügung, sondern erreicht die notwendige Variabilität über somatische Rekombination während der Differenzierung von B-Lymphozyten. Es existieren insgesamt fünf Antikörper-Isotypenklassen: IgA, IgD, IgG, IgE und IgM. Das wichtigste Immunglobulin ist das IgG, welches mit ca. 80% den Hauptbestandteil der Immunglobuline im humanen Serum ausmacht [1]. Immunglobulin G ist ein Heterotetramer aus jeweils zwei identischen schweren Ketten (2 x 50 kDa) und zwei identischen leichten Ketten (2 x 25 kDa). Aus einem begrenzten Satz von Gensegmenten werden die schwere (sechs Gensegmente V, D, J und 3 x C) und leichte Kette (drei Gensegmente V, J und C) gebildet. Zusammen hat das IgG-Molekül eine Masse von ca. 150 kDa und wird durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Die variablen Domänen bilden die Antigenbindungsregion (Paratop) des Antikörpers. In diesen Bereichen finden sich in jeder Kette jeweils drei Sequenzabschnitte (CDR) mit 3-20 Aminosäuren [2], die sich durch hypervariable Sequenzen von den Gerüstbereichen, den *Framework*-Regionen, unterscheiden. Die insgesamt sechs CDR-Bereiche liegen im nativ gefalteten Zustand des Antikörpers in variablen Loops beieinander und bilden an der Oberfläche der variablen Region des Antikörpers die Antigenbindestelle, welche durch die *Framework*-Regionen strukturell stabilisiert wird. Die Antigenbindestelle bildet eine spezifische Oberfläche für eine Antigen determinante, das Epitop. Die dabei vermittelte Affinität basiert einzig und allein auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbeziehungen, hydrophoben Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräften. Die C_H2- und C_H3-Regionen der schweren Ketten bilden im assemblierten IgG den Fc-Teil. Dieser Bereich des Antikörpers ist nicht direkt an der Antigenbindung beteiligt, sondern dient zur Vermittlung von Effektorfunktionen für weitere Teile des Immunsystems. Die Glykosylierung spezifischer Aminosäurereste innerhalb der C_H2-Region kann die

Komplementaktivierung und Makrophagenbindung hervorrufen, während der C_H3-Teil an spezielle Plasmaproteine binden kann. Antikörper können somit neben der Antigenbindung auch weite Teile der humoralen Immunantwort stimulieren und stellen daher ein Bindeglied zwischen humoralem und zellulärem Immunsystem dar.

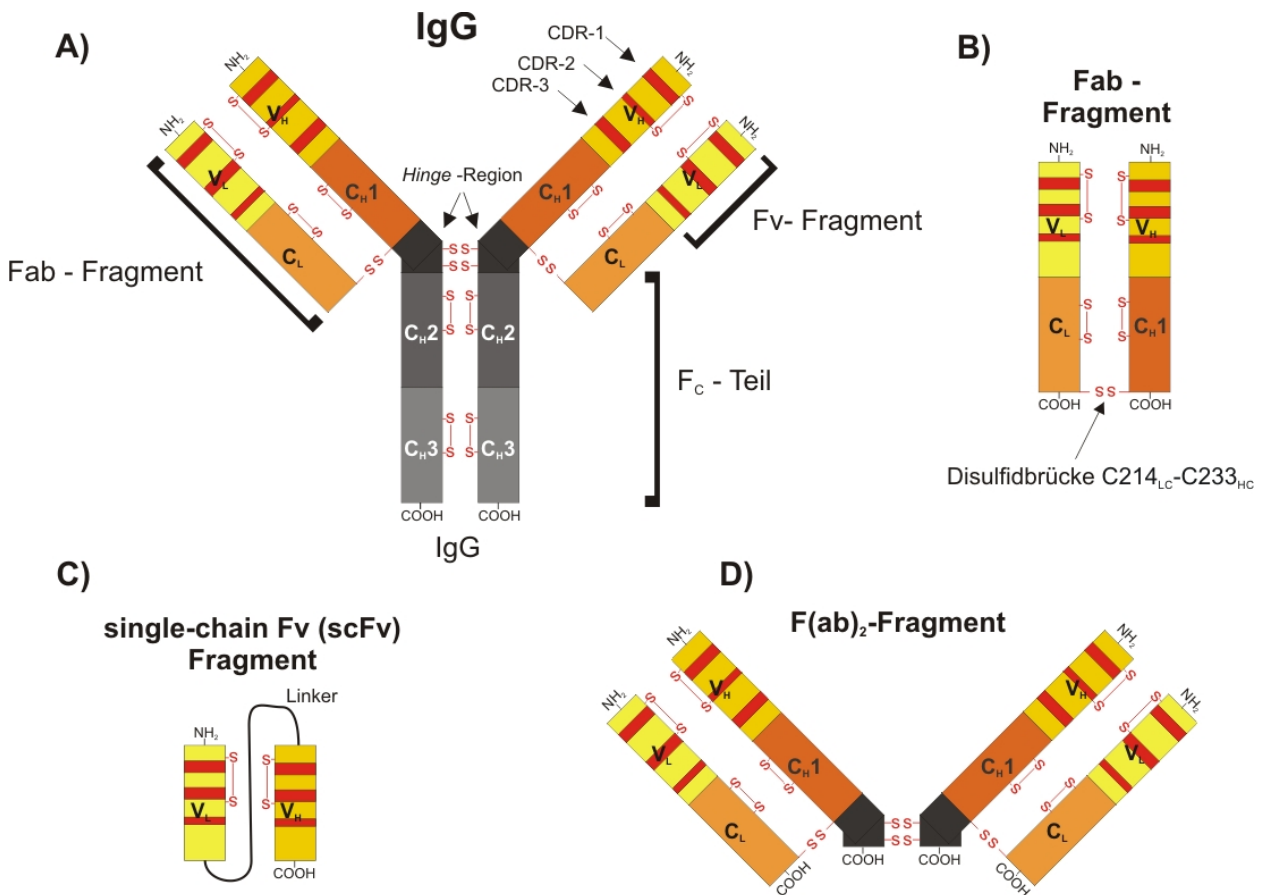


Abb. A-1: Darstellung des Immunglobulins IgG und dessen Antikörperfragmente. A) Schematische Darstellung des IgG-Antikörpers. B) Schematische Darstellung des Fab-Fragments. C) Schematische Darstellung eines scFv-Fragments. D) Schematische Darstellung eines F(ab)₂-Fragments.

A.2 Antikörperfragmente

Neben vollständigen Immunglobulinen finden auch Antikörperfragmente in einem weiten Umfeld aus Forschung, Diagnostik und Therapie Anwendung. Dabei können sie in Anwendungsbereichen, die keine Effektorfunktionen benötigen, Vorteile aufweisen. Dies kann zum Beispiel bei der Neutralisierung von Toxinen oder von Rezeptoren der Fall sein. Darüber hinaus besitzen Antikörperfragmente auf Grund ihrer geringeren Größe eine verbesserte Tumorpenetration [3] und eine schnellere Clearance im Vergleich zu vollständigen IgGs. Die am häufigsten verwendeten Antikörperfragmente sind das „fragment antigen binding“ (Fab) und das „single chain fragment variable“ (scFv). Das nur aus den variablen Regionen der leichten (V_L)

und schweren Kette (V_H) bestehende F_V -Fragment neigt bei geringen Konzentrationen zu Dissoziation, ein Effekt, der durch die Einführung eines zusätzlichen Peptidlinkers verhindert wird. Das scF_V -Fragment ist verhältnismäßig schlecht löslich und daher für die Kokristallisation weniger geeignet im Vergleich zu Fab-Fragmenten, welche zudem eine erhöhte Langzeitstabilität aufweisen. Ein weiterer Nachteil des scF_V -Fragments ist, dass es bei höheren Konzentration zur Bildung von Dimerstrukturen tendiert [4], was zu Aviditätseffekten führt. Dies kann bei der Selektion von hochaffinen Bindern zu Problemen führen. Dieser Nachteil wird durch den Einsatz von Fab-Fragmenten vermieden. Durch die Fragmentierung eines vollständigen IgGs mit Papain wird ein Antikörper in zwei Antigen-bindende Fragmente (Fab) gespalten. Diese Methode ist auch heute noch die häufigste Art der Fab-Gewinnung. Die Fab-Fragmente bestehen aus der kompletten leichten Kette und dem *fragment difficult* (fd) (V_H - C_{H1} Bereich) der schweren Kette. Die Ketten sind über eine intramolekulare Disulfidbrücke im C-terminalen Bereich beider Ketten kovalent miteinander verbunden. Fab-Fragmente haben eine ähnliche Stabilität wie die korrespondierenden IgG Antikörper. Daher können Fab-Fragmente hochauflösend kristallisiert werden und dienen oft der Kokristallisation zum Beispiel von Transmembranproteinen. Die folgende Tab. A-1 zeigt, welche Fab-Konstrukte heute medizinisch relevant sind. Zusätzlich zu dessen Anwendung in Forschung, Diagnostik und Therapie dient das Fab-Format durch den Einsatz im Phagen-Display der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern.

Durch die Spaltung vollständiger IgGs durch Pepsin kann ein weiteres Antikörperfragment gewonnen werden: das $F(ab')_2$ -Fragment. Dieses Format stellt ein dimeres Fab-Konstrukt dar, indem die beiden monomeren Fab-Konstrukte innerhalb der zusätzlichen *Hinge*-Region über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Davon abgeleitete Fab-Dimere wie die Fab-dHLX-Antikörper der Firma MorphoSys werden zum Beispiel in der Immunhistochemie eingesetzt und können bifunktionell ausgestattet sein. Darüber hinaus gibt es auch noch einen weiteren Ansatz zur Entwicklung von Antikörperfragmenten. In einigen Organismen wie beim Kamel oder beim Hai kommen sogenannte „single domain antibodies“ vor, die im Gegensatz zum humanen IgG keine leichte Kette besitzen. Beim Kamel fehlt zusätzlich noch die C_{H1} -Domäne. Neben diesen gibt es aber auch schon erste Antikörpergenbibliotheken mit rein humanen V_H -Regionen [5]. Erste Domänantikörper sind in klinischen Phasen und besitzen Potenzial für wissenschaftliche, diagnostische und therapeutische Anwendungen. Eine Übersicht dazu gibt ein kürzlich veröffentlichtes Review von Wesolowski [6].

Tab. A-1: Fab-Fragmente in klinischen Anwendungen [7]

Handelsname	Fab-Format	Fab-Erzeugung	Antigen	Mechanismus	Indikation (Freigabe durch FDA)
Abciximab	Monoklonales Chimer murines/ humanes Fab	Papain	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$	Hemmung der Blutplättchen- Aggregation	Prävention: Restenose
Arcitumomab (CEA-Scan)	Monoklonales murines Fab markiert mit ^{99m}Tc	Papain	CEA	Tumor imaging	Diagnose: Darmkrebs
Crotalidae Polyvalent Immune Fab (Ovine, CroFab)	Polyklonales ovines Fab	Papain	Schlangengift	Neutralisierung der Toxine	Therapie: Schlangenbisse
Digoxin Immune Fab (Ovine, DigiFab)	Polyklonales ovines Fab	Papain	Digoxin	Neutralisierung der Toxine	Therapie: Digoxin Überdosis
Ranibizumab (Lucentis)	Monoklonales humanisiertes Fab	<i>E. coli</i>	VEGF-A	Hemmung der Angiogenese	Therapie: Makular Degenerierung
Certolizumab Pegol (cimzia)	Monoklonales humanisiertes und PEGyliertes Fab	<i>E. coli</i>	TNF- α	Hemmung der Inflammation	Therapie: Crohn's Krankheit

A.3 Entwicklung der rekombinanten Antikörper-Technologie

Die Entwicklung einer spezifischen Antikörperproduktion geht bis ins vorletzte Jahrhundert zurück und begann mit der Produktion von polyklonalen Antikörpern durch Immunisierung von Tieren. Die ersten Immunisierungen gegen Diphtherie und Tetanus gelangen damals von Behring und Kitasato bei Pferden [8]. Nach der Entdeckung der Antikörper wurde nur kurze Zeit später die Wirkungsweise der Antitoxine (heute Immunglobuline) durch die Seitenkettentheorie von Ehrlich [9] erklärt. Von Behring als auch Ehrlich erhielten für ihre Arbeiten den Nobelpreis für Medizin im Jahre 1901 beziehungsweise 1908. Fünfzig Jahre später konnte dann die chemische Struktur von Antikörpern an der Rockefeller Universität in New York durch Edelman und Porter aufgeklärt werden.

Ein weiterer Durchbruch gelang Köhler und Milstein [10] mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern durch die Hybridomatechnologie. Hierbei fusionierten sie immortale Tumorzellen (Myelomzellen) mit Lymphozyten der Milz. Dieser Schritt war essentiell, um die

kurze Lebensdauer von Antikörper-sezernierenden Lymphozyten in Kultur zu erhöhen. Allerdings hat auch diese Technologie ihre Grenzen. Das anspruchsvolle Expressionssystem, die mögliche Instabilität von aneuploiden Zelllinien und vor allem die Problematik, humane Antikörper gegen toxische oder hoch konservierte Antigene zu produzieren [11], führten letztendlich zu der Entwicklung der rekombinanten Antikörper-Technologie. Die Grundlage für diese neue Technologie stellte die Entdeckung der *in vitro* DNA-Synthese durch die Polymerase-Kettenreaktion durch Mullis [12, 13] und die Entwicklung der ortsgerichteten Mutagenese durch Smith [14] und seiner Kollegen dar (1993 bekamen Mullis und Smith dafür den Nobelpreis in Chemie). Durch die *in vitro* DNA-Synthese und der Antikörpersequenzinformation ist es heute möglich, viele verschiedene rekombinante Antikörperfragmente mit verschiedenen Spezifitäten für eine enorme Bandbreite von Anwendungen zu generieren.

A.3.1 Expressionssysteme für rekombinante Antikörper

Ein Durchbruch in der Antikörper-Technologie war die rekombinante Expression von Antikörperfragmenten im oxidierenden Milieu des periplasmatischen Raums von *E. coli* [15-17]. Die Expression von vollständigen Immunglobulinen in *E. coli* scheint dagegen schwierig und konnte bisher nur von Simmons gezeigt werden [18]. Eine hohe Transformationrate, schnelles Wachstum, kostengünstige Medien und hohe Resistenz gegenüber Scherkräften machten *E. coli* zum Expressionssystem der Wahl. Nachteile werden in erster Linie in der begrenzten Fähigkeit von posttranslationalen Modifikationen, Proteinfaltung und der Sekretionsfähigkeit der Wirtszellen gesehen. Dennoch können Antikörperfragmente neben dem Periplasmaaufschluss auch aus dem Kulturüberstand gewonnen werden [19]. Neben *E. coli* haben sich auch noch weitere prokaryontische Expressionssysteme herausgebildet. So können Antikörperfragmente auch in *Proteus mirabilis* [19], *Bacillus subtilis* und *Bacillus brevis* [20-25] in löslicher und funktioneller Form exprimiert werden. Im Bereich der therapeutischen Anwendungen, die vollständige Antikörper mit Glykosylierung benötigen, ist die Expression mit Hilfe von Prokaryonten bisher nicht möglich. Hierfür war die Entwicklung von eukaryontischen Expressionssystemen unabdingbar. Heutzutage reicht die Spanne dieser Expressionssysteme von einfachen Organismen wie der Hefe bis hin zu transgenen Pflanzen [26, 27] und Tieren [28]. Säugetierzelllinien besitzen trotz hoher Aufwandskosten derzeit die höchste Bedeutung, insbesondere bei der Herstellung von therapeutischen Antikörpern. In einem wachsenden Markt dieser Biotherapeutika werden nicht zuletzt auch die derzeit hohen Kosten zur Entwicklung neuer profitabler Expressionssysteme führen. Eine detaillierte Übersicht zu den gegenwärtig

verwendeten Expressionssystemen bietet das „Handbook of Therapeutic Antibodies Volume II“ von Stephan Dübel [29].

A.3.2 Bakteriophage M13

Filamentöse Phagen der Klasse M13, f1 und fd gehören zur Familie der *Inoviridae*, deren Virusgenom aus über 6400 Basenpaaren einer zirkulären und einzelsträngigen DNA besteht. Das Viruspartikel ist ca. 930 nm lang und 6,5 nm breit. Es zeichnet sich dadurch aus, dass es gegenüber Trypsin und hohen Temperaturen sehr robust ist [30]. Der M13-Phage besitzt 11 Gene, von denen drei für die Replikation, drei für den Zusammenbau der Phagenpartikel und fünf für die Hüllproteine verantwortlich sind [31]. Das Protein pVIII ist der Hauptbestandteil der Virushülle und bildet aus annähernd 2700 Kopien die tubuläre Struktur der Hülle. An einem Ende besitzt das Phagenpartikel jeweils ca. 5 Kopien der kleinen hydrophoben Hüllproteine pVII und pIX. Am gegenüberliegenden Kopfende des Partikels liegen das pIII und pVI jeweils in drei bis fünffacher Kopie vor [32]. Das pIII-Protein besteht aus drei unabhängigen Domänen, die über glycinreiche Regionen miteinander verbunden sind [33]. Die erste Domäne N1 ist verantwortlich für die Translokation der DNA ins Cytoplasma und Insertion der Hüllproteine in die Membran während der Infektion. Die zweite Domäne N2 dient der Bindung zum F-Pili [34], wodurch ausschließlich Zellen infiziert werden, die ein F'-Plasmid oder ein F'-Episom tragen. Um die Domänen N1 und N2 gekürzte pIII-Proteine, wie sie im Phagen-Display eingesetzt werden, sind nicht mehr infektiös. Die carboxyterminale bzw. dritte Domäne CT ist essentiell für den Aufbau von stabilen Phagenpartikeln [35, 36].

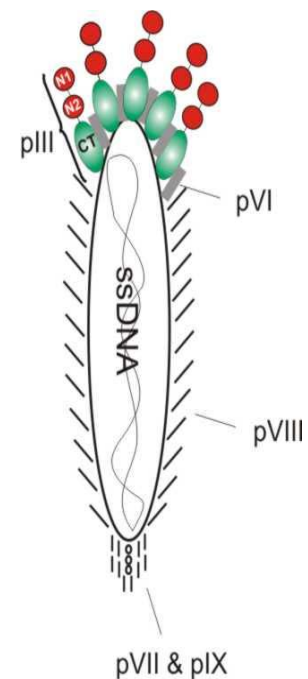


Abb. A-2: M13 Phage – schematische Darstellung

Bakteriophagen gehören zu den nicht lytischen Phagen, das heißt sie töten ihren Wirt nach Infektion nicht ab, sondern produzieren permanent neue Phagen (ca. 200 Phagen pro Zellzyklus), die ins Medium sezerniert werden. Lediglich die Wachstumsgeschwindigkeit infizierter Bakterien wird reduziert. Bakteriophagen eignen sich besonders für das Arbeiten mit Antikörperbibliotheken, da die Phagenzusammensetzung im Periplasma des Wirts stattfindet, wo Antikörperfragmente im gefalteten Zustand vorliegen.

Neben der Fusion mit pIII, kann auch die Fusion mit pVIII [37, 38], pVI [39], pVII und pIX, hier in Kombination für ein heterodimeres Display [40], verwendet werden.

A.3.3 Phagen-Display

Zeitgleich mit der Entwicklung der PCR-Technologie entstand um Smith 1985 die Präsentation von Polypeptiden auf filamentösen Phagen [41]. Neben der Optimierung von Proteineigenschaften (Stabilität oder Faltungseffizienz) und dem Aufspüren von Interaktionspartnern (z.B. in Signaltransduktionswegen) erlaubte diese als Phagen-Display bezeichnete Methode erstmals die Selektion von spezifischen und funktionellen Antikörperfragmenten aus kombinatorischen Antikörpergenbibliotheken [42-46] mittels *E. coli*. Die Isolierung basierte allein auf der Antigen-Antikörperreaktion und stellte somit eine Abkopplung von der bis dahin üblichen Antikörperproduktion durch Immunisierung dar [11]. An dieser Stelle soll daran erinnert sein, dass beim Antikörper-Phagen-Display entgegen dem Wortlaut keine kompletten Antikörper dargestellt werden können, sondern nur Antikörperfragmente. Display-Systeme, die Antikörpergene ins Phagengenom inserieren, wurden entwickelt für den Phagen T7 [47], Phagen Lambda [48-50] und die Ff-Klasse der filamentösen Phagen f1, fd, und M13 [46]. Der Phage T7 eignet sich bisher nicht für ein Antikörper-Display, da die Phagenzusammensetzung im reduzierenden Milieu des Cytoplasma meist nur ungefaltete Antikörperfragmente zulässt. Daher sind meist filamentöse Phagen der Ff-Klasse im Einsatz, die zusätzlich die Produktion von löslichem Protein bei Einführung eines Amber-Stopcodons zwischen dem Antikörperfragment und dem Hüllprotein pIII erlauben, sofern Phagemidvektoren benutzt werden. Nutzt man einen *E. coli* Suppressor-Stamm (z.B. ER2738), so wird das Fusionsprotein aus Antikörperfragment und pIII für den Phagenaufbau produziert, während von *E. coli* Non-Suppressor-Stämmen wie JM83 nur die Antikörperfragmente selbst exprimiert werden [51, 52]. Der Vorteil besteht darin, dass beim Wechsel von Phagen- zu Proteinexpression keine zusätzlichen Umklonierungen nötig sind.

Für das Phagen-Display mit Antikörper-pIII-Fusionsprotein haben sich zwei verschiedene Systeme durchgesetzt. Im ersten Fall wird das Fusionsgen direkt in das Phagengenom inseriert im Austausch mit dem pIII-Wildtyp (wt) [46]. Im zweiten Fall wird das Fusionsprotein in einem separaten Plasmid, in diesem Fall auch Phagemid genannt, mit eigenem Replikationsstart, Promotor, Resistenzmarker und einer intergenischen Region des filamentösen Phagen f1 kloniert. Bei der Verwendung dieser Phagemid-Systeme müssen bei der Phagen-Herstellung die zusätzlichen Virusproteine durch Helferphagen wie M13K07 zur Verfügung gestellt werden.

Diese speziellen Helferphagen besitzen eine Mutation in ihrem Genom, die bewirkt, dass vorzugsweise der Phagemidvektor in neuentstehende Phagen eingebaut wird [53]. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass Helferphagen auch das pIII-Wildtyp-Protein zur Verfügung stellen und somit die Displayrate des Fusionsproteins limitieren. Die wenigen antikörpertragenden Phagen sind meist monovalent und erlauben die Selektion von Antikörpern mit hoher monovalenter Affinität. Der Fakt, dass nur wenige produzierte Phagen das Fusionsprotein letztendlich auf ihrer Oberfläche tragen, reduziert die Effizienz dieses Systems [42, 43, 45, 54-56]. Dieses Problem kann umgangen werden, wenn auf alternative Helferphagen, sogenannten Hyperphagen zurückgegriffen wird. Hyperphagen zeichnen sich dadurch aus, dass sie kein funktionelles pIII mehr produzieren können und stattdessen das Antikörper-pIII-Fusionsprotein einbauen, was ein multivalentes Display ermöglicht. Diese Methode erlaubt ein verbessertes Antikörper-Phagen-Display um zwei Zehnerpotenzen und erhöht somit die *Panningeffizienz* [57]. Für die Selektion hochaffiner Binder mit hoher *Panningeffizienz* eignet sich daher eine Kombination aus Hyperphagen und M13K07. Dabei kommen meist in der ersten Runde Hyperphagen zum Einsatz, wohingegen die folgenden Phagenreamplifikationen mit M13K07 generiert werden. Eine weitere Möglichkeit multivalentes Display zu erreichen, ist der Einsatz von Ex-Phagen. Bei diesen Phagen wurden zwei Amber-Stopcodons in das gIII-Gen des Helferphagen-genoms eingefügt und das Phagen-Display in einem *E. coli* Non-Suppressor-Stamm durchgeführt.

Neben der Verwendung eines vollständigen pIII-Proteins kann das Antikörperfragment auch am N-terminalen Ende oder der zweiten Domäne des Hüllproteins pIII fusioniert werden [42, 43, 45], was zum Verlust der Infektiosität des pIII-Fusionsproteins führt. Dieses System ist daher nicht mit Hyperphagen kompatibel. Da die Phagemid-DNA gegenüber der Phagen-DNA eine wesentlich bessere Transformationsrate besitzt [42, 43] und leichter zu handhaben ist, basieren fast alle Arbeiten auf der Phagemid-Ebene. Das Phagen-System ist von allen Display-Systemen die am weitesten verbreitete Selektionsmethode. Alternativ dazu haben sich noch weitere Varianten entwickelt wie zum Beispiel das Display auf Oberflächen von Bakterien [58, 59], das Ribosomen-Display [60], Puromycin-Display [61] und das Hefe-Display-System [62].

A.3.3.1 Antikörpergenbibliotheken

Das Phagen-Display ist an die *E. coli* Expression gebunden und kann im Bezug auf Antikörper nur für in *E. coli* exprimierbare Fragmente genutzt werden. In erster Linie werden Fab- und scFv-Bibliotheken generiert. Die bisher größten Antikörpergenbibliotheken besitzen eine

theoretische Variabilität im Bereich von 10^{10} . Die meisten Antikörpergenbibliotheken sind innerhalb der variablen Domänen der leichten und schweren Kette durch lokale (z.B. CDRs) oder statistische Randomisierung modifiziert und werden für ein Screening auf spezifische Binder verwendet. Dabei unterscheidet man Immunbibliotheken von naiven und synthetischen Bibliotheken. Immunbibliotheken basieren auf der Immunisierung von Tieren mit dem gewünschten Antigen. Dabei wird im Spenderorganismus eine primäre und sekundäre Immunantwort gegen das Antigen induziert und es liegen bei Isolierung der B-Lymphozyten bereits affinitätsgereifte IgG-Antikörper vor. Anschließend können die Gensegmente der variablen Region durch spezifische Primersets amplifiziert und eine Immunbibliothek erzeugt werden [44]. Beim Screening von Immunbibliotheken reichen meist auch kleinere Bibliotheken aus, um hochaffine Binder zu selektieren. Nachteil ist jedoch, dass Immunbibliotheken für jedes Antigen wieder neu erzeugt werden müssen. Des Weiteren ist der Aufbau von Immunbibliotheken gegenüber sehr toxischen und hochkonservierten Antigenen nicht möglich. Für diesen Fall eignen sich naive Bibliotheken, die durch Rekombination des IgM-Genrepertoires von nicht immunisierten B-Lymphozyten erzeugt werden. Da IgM an der primären Immunantwort beteiligt ist und eine große Komplexität der Antikörpergene vorliegt, können aus naiven Bibliotheken Antikörper gegen nahezu alle beliebige Antigene isoliert werden [2, 63]. Dem gegenüber können Antikörpergenbibliotheken auch rein synthetisch hergestellt werden (z.B. die HuCal-Bibliothek von MorphoSys). Dabei können die CDR-Regionen der leichten und schweren Kette durch Mutagenese beliebig randomisiert und im gewünschten *Framework* eingesetzt werden. Synthetische Bibliotheken finden heute Einsatz bei der Suche nach diagnostischen und therapeutischen Antikörpern und können gegen alle beliebigen Antigene eingesetzt werden. Bei der Verwendung von Antikörpergenbibliotheken muss mitbedacht werden, dass neben Antikörperfragmenten auch Abbruch-Varianten (verursacht durch Synthesefehler) vorkommen. Darüber hinaus rufen Antikörperfragmente unterschiedliche toxische Effekte in der Wirtszelle hervor. Dies führt dazu, dass bestimmte Klone entweder unterrepräsentiert sind oder vollständig aus der Bibliothek verschwinden. Daher sagt die Größe einer Bibliothek noch nichts über ihre Komplexität aus.

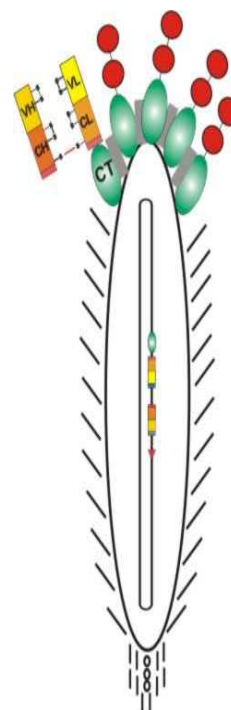


Abb. A-3: Fab präsentierende M13 Phage – schematische Darstellung

A.4 Rekombinante Expression von Fab-Fragmenten in *E. coli*

Während vollständige IgGs wegen ihrer spezifischen Glykosylierungen in C_H2 bisher nur in kostenintensiven eukaryontischen Expressionssystemen exprimiert werden, können Fab-Fragmente aus *E. coli* gewonnen werden. Bei der Fab-Expression in *E. coli* werden die leichte und schwere Kette separat mit einer Sec-Leadersequenz exprimiert und in das oxidierende Milieu des Periplasmas transportiert. Dort werden die leichte und schwere Kette assembliert und durch die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken zusätzlich stabilisiert. Die funktionelle Fab-Expression stellt in *E. coli* ein multifaktorielles Problem dar, welches sich zusammensetzt aus der Expressionshöhe, Transportfähigkeit und Faltungsgeschwindigkeit beider Ketten, sowie der Cytotoxizität des nativen Fragments. Zusätzlich steht die Assemblierung beider Kettenfragmente in direkter Konkurrenz zu leichten Kettendimeren, sogenannten Bence-Jones-Proteinen. Die Expressionsrate in *E. coli* ist relativ hoch, was jedoch nicht bedeutet, dass viel lösliches und funktionelles Fab gebildet wird. In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz wird mehr oder weniger viel Protein unlöslich in toxischen Einschlusskörpern, auch *Inclusion bodies* genannt, abgelegt. Nach aufwendiger und verlustreicher Prozedur können solche *Inclusion bodies* auch zu funktionellem Fab rückgefaltet werden [64]. Weitere Versuche wurden unternommen, um die häufig schlechten Ausbeuten zu steigern. Mit nur mäßigem Erfolg wurden so Chaperone, Disulfidisomerasen oder Prolin-cis-trans-Isomerasen [65, 66] mit dem Antikörperfragment koexprimiert. Aber auch Mutationen an kritischen Stellen der β -Faltblattstruktur, wie den cis-Prolinen und den Disulfidbrücken wurden von Skerra und Plückthun durchgeführt, um den Einfluss auf Stabilität und Faltung zu untersuchen [67]. Sie fanden keinen erheblichen Einfluss von Promoterstärke, verwendetem prokaryonten Signalpeptid, Wechsel von IgA zu IgG, mutierter Disulfidbrücke oder eliminierten cis-Prolinen (beides letzteres in der C_H1 -Domäne) auf die Faltungseffizienz von Fab-Fragmenten. Sie postulierten, dass das Problem in der Aggregation von Faltungsintermediaten zu suchen ist und dass insbesondere das Fragment der schweren Kette zur Bildung unlöslicher Aggregate neigt. Alfthan und Mitarbeiter weisen auf die Bedeutung der konstanten Domäne der schweren Kette für eine effektive Fab-Sekretion in *E. coli* hin [68]. Knappik ging sogar noch einen Schritt weiter und sieht die Probleme der Proteinfaltung innerhalb der variablen Region der schweren Kette und optimierte die Expression funktioneller Antikörperfragmente durch Punktmutationen innerhalb des Frameworks von V_H [69]. Des Weiteren versuchten Teerinen und Mitarbeiter die Stabilität durch Punktmutationen innerhalb der konstanten Domänen zu erhöhen [70], allerdings ohne Erfolg. Die Untersuchungen der Gruppe von Buchner zeigten, dass die Prolin-cis/trans-Isomerisierung auch bei Fab-

Fragmenten der geschwindigkeitbestimmende Schritt zum funktionellen Fab ist, wobei die Isomerisierung offenbar erst nach der Assemblierung erfolgt [71]. Darüber hinaus wurden Zelllinien mit oxidierendem Milieu im Cytoplasma entwickelt, wodurch gebildete Antikörperfragmente nicht mehr ins Periplasma transportiert werden müssen [72]. Innerhalb der variablen Domänen konnte bereits gezeigt werden, dass einzelne Aminosäureaustausche zu verbesserten Fab-Expressionen führten [73, 74]. Des Weiteren konnte Roberge durch *Combinatorial Consensus Mutagenesis* (CCM) die Ausbeute eines fusionierten scFv-Fragments um den Faktor 4 verbessern [75]. In Bezug auf die konstanten Domänen eines Fab-Fragments sind derartige Versuche bisher nicht systematisch untersucht worden.

A.5 Vorstellung des Modellantikörpers CB4-1

Als Modellantikörper wurde der α -p24 (HIV-1) Antikörper CB4-1 gewählt. Dieser Antikörper wurde in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert. So wurden im Vorfeld Temperatur- und Denaturantienstabilität von verschiedenen Fragmenten des Antikörpers CB4-1 in Kooperation mit Prof. H. Welfle, MDC Berlin-Buch, untersucht [76]. Zudem wurden ortsspezifische Mutagenesen an einem scFv-Konstrukt des Antikörpers CB4-1 durchgeführt, im Zusammenhang mit Untersuchungen zum polyspezifischen Bindungsverhalten [77].

Neben der Charakterisierung des Antikörpers CB4-1 wurde parallel die Eignung eines zirkulär permutierten GFP-Moleküls [78] getestet. Durch die zirkuläre Permutation wurde ein zusätzlicher *loop* (*loop NC*) erzeugt, dessen Eignung für die Präsentation von Peptiden überprüft wurde. Durch die Insertion mit dem CB4-1 Antigenpeptid p24 konnte dieser *loop NC* funktionalisiert werden. Die resultierenden GFP-Varianten wurden von einem α -p24-Antikörper (CB4-1) mit einer Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich gebunden. Peptidpräsentierende Proteine sind ein preiswertes Werkzeug, insbesondere für die Beschichtung von Mikrotiterplatten, wo sich Peptide allein oftmals nicht bewährt haben.

A.6 Ziel der Arbeit

Das vorliegende Projekt hat zum Ziel, durch die Erzeugung von Zufallsmutationen sowie durch lokale Randomisierungen spezieller Positionen in den konstanten Domänen der leichten und schweren Kette eines Fab-Fragments mit anschließender Selektion von im Periplasma bevorzugt exprimierten Varianten mittels Phagen-Display Aminosäurepositionen zu identifizieren, die für eine optimale Faltung, Assemblierung und Ausbeute des kompletten Fragments von Bedeutung sind.

Als Modell sollen die variablen Regionen des murinen α -p24 (HIV-1) Antikörpers CB4-1 dienen. Als Target für die Selektion dient das Epitop-Peptid p24. Dadurch wird sichergestellt, dass nur nativ gefaltete, korrekt assemblierte funktionelle Varianten angereichert werden. Hierbei wird postuliert, dass Vorteilsmutanten aufgrund einer verbesserten Fab-Expression vermehrt Fab-präsentierende Phagen (Abb. A-3) bilden und sich daher mit den *Panning*-Runden anreichern. Für selektierte Fab-Varianten, die anschließend periplasmatisch löslich exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt werden, sind folgende Parameter zu analysieren: Proteinausbeute der Expression, vergleichende Affinität zum Epitop-Peptid (ELISA), Stabilität (DSC, GndHCl-Titration der Fluoreszenzemission).

Durch Kombination der optimierten konstanten Domänen mit weiteren variablen Domänen unterschiedlicher Spezifität (abgeleitet vom α -CD16-muA9 [79], α -Lysozym AK D1.3, α -HBV-preS2 AK 1F6) soll die generelle Übertragbarkeit solcher konstanter Domänen für die Expressionsoptimierung von Fab-Fragmenten untersucht werden.

Eine effektive rekombinante Expression dieser Fragmente ist für therapeutische, diagnostische und biotechnologische Zwecke von großem Interesse.

B MATERIAL UND METHODEN

B.1 Material

B.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anderweitig aufgeführt, von folgenden Herstellern bezogen: Acros Organics, BioRad, Gibco, Invitrogen, Merck, NEB, Novagen[®], Peqlab, Promega, Roth, Roche, Sigma, Stratagene.

B.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. B-1: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
10 x Laemmli Puffer	30,2 g Tris, 144 g Glycin freie Säure, 5 g SDS, mit dH ₂ O auffüllen
5 x SDS Auftragspuffer	250 mM Tris/ HCl pH 6.8, 7,5 % w/v SDS, 0,25 % w/v Bromphenol Blau, 625 mM DTT, 25 % v/v Glycerol, mit dH ₂ O auffüllen, -20°C
5 x SDS Auftragspuffer (nicht reduzierend)	250 mM Tris/ HCl pH 6.8, 7,5 % w/v SDS, 0,25 % w/v Bromphenol Blau, 25 % v/v Glycerol, mit dH ₂ O auffüllen, -20°C
10 % w/v APS	10 % w/v Ammonium Persulfat in dH ₂ O, kann in kleinen Aliquots bei – 20°C gelagert werden
Coomassie-Färbelösung	10 % v/v Essigsäure, 40 % v/v Ethanol, 0,25 % w/v Coomassie Brilliant Blau R250, mit dH ₂ O auffüllen, durch Papierfilter filtriert
Entfärbelösung	10 % v/v Essigsäure, 40 % v/v Ethanol (vergällt), mit dH ₂ O auffüllen
Ponceau S Lösung	0,2 % w/v Ponceau S, 1 % v/v Essigsäure, mit dH ₂ O auffüllen, sterilfiltriert
6 x DNA Auftragspuffer	30 % v/v Glycerol, 0,25 % w/v Bromphenol Blau, mit 50 mM Na ₂ EDTA pH 8.0 auffüllen
10 x TBE	108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8.0, mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen
E-Blotpuffer	7,5 g Tris, 36,2 g Glycin freie Säure, 500 ml Ethanol (vergällt), mit dH ₂ O auf 2,5 l auffüllen
5 x TBS-T	75,6 g Tris, 109,7 g NaCl, 12,5 ml Tween 20, einstellen auf pH 7.5, mit dH ₂ O auf 2,5 l auffüllen
PEG/NaCl	20 % w/v Polyethylenglycol-8000, 2,5 M NaCl, mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen und autoklavieren, bei 4°C lagern
Phagentötungslsg.	1 % w/v SDS, 0,1 M NaOH, mit dH ₂ O auf 5 l auffüllen
Glycin/HCl	0,2 M Glycin (freie Säure), mit HCl auf pH 2.2 einstellen, mit dH ₂ O auffüllen und sterilfiltrieren

Name	Zusammensetzung
pH 2.2	
Tris/HCl pH 9.1	1 M Tris, mit HCl auf pH 9,1 einstellen, mit dH ₂ O auffüllen und steriltrieren
10 x PBS	400 g NaCl, 10 g KCl, 106,5 g Na ₂ HPO ₄ , 8,2 g KH ₂ PO ₄ , mit dH ₂ O auf 5 l auffüllen und autoklavieren
TE-Puffer	605 mg Tris, 1 ml 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8.0, mit dH ₂ O auf 500 ml pH 8.0 auffüllen
0,5 M Na ₂ EDTA	93,1 g EDTA, mit dH ₂ O auf 500 ml pH 8.0 auffüllen und autoklavieren. Hinweis: EDTA löst sich erst nach Zugabe von NaOH!
DEPC H ₂ O	800 µl Diethylpyrocarbonat mit Milli Pore H ₂ O auf 1 l auffüllen und gut mischen
Periplasma-Puffer	500 mM Saccharose, 100 mM Tris, 1 mM Na ₂ EDTA, mit dH ₂ O auf 500 ml pH 8.0 auffüllen und steriltrieren, bei 4° lagern

B.1.3 Bakterien-Nährmedien und Supplemente

Für die Herstellung von Agar-Platten werden vor dem Autoklavieren 15g/l Agar, bei Top-Agar 8g/l Agar-Agar hinzugegeben.

Tab. B-2: Kulturmedien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % w/v Bacto-Trypton, 0,5 % w/v Bacto-Yeast Extract, 171 mM NaCl, pH 7,5
LB-Medium/ Sucrose	1 % w/v Bacto-Trypton, 0,5 % w/v Bacto-Yeast Extract, 171 mM NaCl, 300 mM Sucrose, pH 7,5
Low salt LB-Medium	1 % w/v Bacto-Trypton, 0,5 % w/v Bacto-Yeast Extract, 85,5 mM NaCl, pH 7,5
2 x TY-Medium	1,6 % w/v Bacto-Trypton, 1,0 % w/v Bacto-Yeast Extract, 85,5 mM NaCl, pH 7,5
SOA-Medium	2 % w/v Bacto-Trypton, 0,5 % w/v Bacto-Yeast Extract, 10 mM NaCl, pH 7,5
SOB-Medium	2 % w/v Bacto-Trypton, 0,5 % w/v Bacto-Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,5
SOC-Medium	SOB-Medium wird mit 1/50 vol sterile 20% Glucoselösung versetzt
Minimal-Medium	90 % Mineralsalzlsg., 2 % w/v Glucose, 10 mM MgSO ₄ , 0,1 % Thiamin-Hydrochlorid-Lösung
GTY	0,25 % w/v Bacto-Trypton, 0,125 % w/v Bacto-Yeast Extract, 10% Glycerol, pH 7,5, steriltriert
Supplemente	
Mineralsalzlösung	31 mM Na ₂ HPO ₄ , 19 mM KH ₂ PO ₄ , 25 mM NH ₄ Cl, 5 mM Na ₃ -Citrat, autoklaviert
MgCl-Lösung	1 M MgCl, autoklaviert
MgSO ₄ -Lösung	1 M MgSO ₄ , autoklaviert

Name	Zusammensetzung
Glucoselösung	20 % Glucose in H ₂ O, autoklaviert
Thiamin-Hydrochlorid-Lösung	10 mg/ml nur sterilfiltriert, Lagerung 4°C
IPTG-Lösung	0,1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung -20°C
Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml in N,N-Dimethylformamide (DMF)
Chloamphenicol	30 mg/ml in Ethanol, sterilfiltriert, Lagerung -20°C, 1:1000 einzusetzen
Ampicillin	100 mg/ml in 50 % Ethanol, sterilfiltriert, Lagerung -20°C, 1:1000 einzusetzen
Tetracyclin	5 mg/ml in 50 % Ethanol, sterilfiltriert, Lagerung -20°C, 1:500 einzusetzen
Kanamycin	30 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung -20°C, 1:600 einzusetzen

B.1.4 Oligonukleotide

Tab. B-3: Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'
SeqCT1 (Tetfor)	CCA CTC CCT ATC AGT GAT AGA GAA AAG TG
SeqCT2 (VHCB41for)	TAC AAG AAA GGA CTA CTG GGG C
SeqCT3 (PhoArev)	GGT AAG AGT GCC AGT GCA ATA G
SeqCT4 (VLCB41for)	TGA TGA CTT TCC GCT CAC GTT C
SeqCT5 (pIIIrev)	CAT AAT CAA AAT CAC CGG AAC CGG
SeqCT6 (hc-kappa-rev)	GGA AGA TGA AGA CAG ATG GTG C
CT1a (Xba-OmpA-for)	TGG AAC TCT AGA TAA CGA GGG CAA AAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT
CT1b (VH-CB4-1for)	TAT CGC GAT TGC AGT GGC ACT GGC TGG TTT CGC TAC CGT AGC GCA GGC CCA GGA CCC GCT GCA GTC TGG
CT2 (VH-CB4-1-Eaglrev)	TTT CGC GGC CGA AAC GGT GAC CAG AGT CCC TTG GCC
CT3a (Eagl-mCH1for)	ACC GTT TCG GCC GCG AAA ACA ACA GCC
CT3b (mCH1-6xHis-Ncolrev)	ATT TTC TCC ATG GTT ATT AAT GGT GAT GGT GGT GAT GGT GAT GGT GAA CAC GTG GTT CAA TTT TCT TG
CT4a (Ncol-PhoAfor)	AGT CAT ATT CCA TGG AGA AAA TAA AGT GAA ACA AAG CAC TAT TGC ACT GGC ACT CTT ACC
CT4b (VL-CB4-1for)	TGC ACT GGC ACT CTT ACC GTT ACT GTT TAC CCC GTG ACA AAA AGC CGA CAT CAA GAT GAC CCA GTC T
CT4c (VL-CB4-1-KpnIrev)	TGG TGC AGC ATC AGC ACG TTT CAG GTC CAG TTT GGT ACC CGC ACC GAA C
CT5a (mCkappafor)	GAC CTG AAA CGT GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC

Name	Sequenz 5' → 3'
CT5b (mCkappa-EcoRVrev)	CTC TTC TGA TAT CAG TTT TTG TTC GCA CTC ATT CCT GTT GAA GCT C
CT5c (MycTag-NheIrev)	TAC GAC TGC TAG CCT ATG CGG CCC CAT TCA GAT CCT CTT CTG ATA TCA GTT TTT GTT CGC
CT6a (mCH1-IgG1-EagIfor)	ACC GTT TCG GCC GCA AAG ACC ACT CCT CC
CT6b (6xHis-NcoIrev)	ATT TTC TCC ATG GTT ATT AAT GGT GAT GGT GGT GAT
CT7a (hCkappa-KpnIfor)	GGT GCG GGT ACC AAA CTG GAC CTG AAA CGG ACT GTG GCT GCA C
CT7b (hCkappa-EcoRVrev)	CTC TTC TGA TAT CAG TTT TTG TTC GCA CTC TCC GCG GTT GAA GC
CT8-(hCH1-IgG1-EagIfor)	ACC GTT TCG GCC GCC TCC ACC AAG GG
CT9a (hCH1-IgGM-EagIfor)	CCG TTT CGG CCG GGA GTG CAT CCG CCC CAA C
CT9b (hCH1-IgGMrev)	ATG GTG ATG GTG GTG ATG TTT GGG AGG CAG CTC AGC
CT10a (Xba-DsbAssfor)	GGG CCG TGG CGG CGG GCT GGA CGT CGA CAA AAA TCT AGA TAA GAA GGA AG
CT10b (DsbAss-VH-CB4-1rev)	CAG ACT GCT GCA GCT GGT CCT GCG CCG ATG CGC TAA ACG CT
CT10c (DsbAss-VH-CB4-1for)	AGC GTT TAG CGC ATC GGC GCA GGA CCA GCT GCA GCA GTC TG
CT10d (VH-CB4-1-EagIrev)	TTG GTG GAG GCG GCC GAA ACG GTG ACC AGA GTC CCT TGG
CT11a (NcoI-DsbAssfor)	GGC GGG GCC ATG GAG AAA ATA AAA TGA AAA AGA TTT GGC TGG CGC
CT11b (DsbAss-VL-CB4-1rev)	GGA GAC TGG GTC ATC TTG ATG TCC GCC GAT GCG CTA AAC GCT
CT11c (DsbAss-VL-CB4-1for)	AGC GTT TAG CGC ATC GGC GGA CAT CAA GAT GAC CCA GTC TCC
CT12a (XbaI-OmpAfor)	TGG AAC TCT AGA TAA CGA GGG CAA AAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GC
CT12b (HC 6xHis-HindIIIrev)	CCT GGA CCA AGC TTA TTA ATG GTG ATG GTG GTG ATG GCA AGA TTT GGG CTC AAC
CT13a (XbaI-PhoA-LCfor)	CGG TGG CCG TGG GGC TCT AGA GAA AAT AAA GTG AAA CAA AGC AC
CT13b (LC-6xHis-HindIIIrev)	GAC TAA CGT AAG CTT ATT AAT GGT GAT GGT GGT GAT GGC ACT CTC CGC GGT TGA AGC TC
CT14b (OmpA-VLrev)	GAC TGG GTC ATC TTG ATG TCG GCC TGC GCT ACG GTA GCG
CT14c (OmpA-VLfor)	CGC TAC CGT AGC GCA GGC CGA CAT CAA GAT GAC CCA GTC

B.1.5 *E. coli*-Stämme

Tab. B-4: Phagen und *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp
M13K07 - Helferphagen (Invitrogen)	
XL-1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR)]
ElectroTen-Blue® Electroporation Competent Cells	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kanr [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)]
JM-83	F' ara Δ(pro-lac) rpsL thi Φ80lacZΔM15 λ ⁻
ER2738	F' proA+B+lacI _R Δ(lacZ)M15zzf::Tn10(TetR)/fhuA2 glnVΔ(lac-proAB) thi-1Δ(hsdS-mcrB)5
BL21 (DE3) pLysS	F- ompT hsdS(rB- mB-) gal dcm (DE3)pLysS (CamR)

B.1.6 Plasmide

Tab. B-5: Plasmide

Vektor	Insertion	Zur Verfügung gestellt von:
pDsb/Ass_M53T	Expressionsvektor für periplasmatische Expression, Signalpeptid von DsbAss,	Matthias Paschke (unsere Arbeitsgruppe)
pSec/Fab4myc	Expressionsvector für periplasmatische Expression via Sec, bicistronisches Konstrukt für Fab-Expression	diese Arbeit
pASK88_M44	Expressionsvektor für periplasmatische Expression via mit human CH1 und Ckappa	Arne Skerra (TU-München)
pASK85_M41	Expressionsvektor für periplasmatische Expression via Sec mit murinen CH1 und Ckappa	Arne Skerra (TU-München)
pET9	Expressionsvektor für GFP M53T, welches als Festphasenantigen beim Phagen-Panning gebraucht wird	Matthias Paschke (unsere Arbeitsgruppe)
pASK88-muA9	Vektor für die periplasmatische Expression der muA9	Arne Skerra (TU-München)

B.1.7 Enzyme und Antikörper

Tab. B-6: Enzyme und Antikörper

Name	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, USA
DNase I recombinant, RNase free	Roche, Mannheim
Polymerasen	
Taq DNA-Polymerase	InViTek, Berlin
PfuTurbo® DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
DNA-modifizierende Enzyme	
T4 DNA-Ligase	Roche,
Benzonase® Endonuklease	Merck, Darmstadt
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, USA
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, USA
Primäre Antikörper	
α -poly His-HRP	Sigma, St. Louis, USA
α -poly His-HRP	Seramun, Heidesee
α -Tetra-His (maus)	Qiagen, Hilden
α -Penta-His (maus)	Qiagen, Hilden
α -Fd-Phagen-HRP vom Schaf	Seramun, Heidesee
α -Maus-Ckappa-HRP	Acris Antibodies, Herford
α -human-Ckappa (Maus)	Sigma, St. Louis, USA
Sekundäre Antikörper	
α -Maus IgG-HRP vom Schaf	Amersham Biosciences, UK
α -Maus IgG-HRP vom Schaf	Seramun, Heidesee

B.1.8 Peptide und Proteine für ELISA-Assays

Tab. B-7: Proteine für die Beschichtung von ELISA-Platten

Name	Quelle
CB4-1-Epitop-Peptid (NH ₂ -GATPQDLNTML-COOH)	Thermo Electron GmbH, Ulm
p24	Dr. Christa Scholz, Dina Reinhart
GFP24_M53T	Matthias Paschke

B.2 Methoden

B.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

B.2.1.1 Präparation von Total-RNA aus Hybridomazellen

Total-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aus Hybridomazellen gewonnen. Insgesamt wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt.

B.2.1.2 Reverse Transkription von Total-RNA

Für die Herstellung von cDNA wurde die Cloned AMV Reverse Transkriptase (Invitrogen) genutzt. Für die Hemmung der RNase-Aktivität wurde der RNase-Inhibitor der Firma Roche verwendet. Die Random Primer wurden von der Firma Stratagen bezogen. Es wurden 4 μ l der extrahierten Total-RNA (520 ng/ μ l) mit 2 μ l dNTPs, 1,5 μ l Random Primer und 5,5 μ l H₂O versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 4 μ l 5x cDNA Synthese Puffer, 1 μ l DTT, 1 μ l RNase Hemmer und 1 μ l der AMV Reverse Transkriptase zu dem Ansatz hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 25°C, dann 55 min bei 45°C inkubiert und mit 5 min bei 85°C abgestoppt.

B.2.1.3 Kultivierung von *E.coli* Stämmen

B.2.1.3.1 Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen (*CaCl*₂-Methode)

Es wurden 100 ml *Low Salt* LB (Luria-Bertani) Flüssigmedium mit 1 ml einer in *Low Salt* LB Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) Übernachtskultur eines *E. coli* Stammes inokuliert und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,45 bei 600 nm Wellenlänge ($OD_{600} = 0,45$) wachsen gelassen, auf zwei 50 ml Plastikröhrchen verteilt und durch Zentrifugation 10 min bei 5000 x g und 4°C sedimentiert. Für eine höhere Transformations-effizienz kann die Hauptkultur bei 30°C wachsen gelassen werden. Das gesamte Zellpellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ resuspendiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 4°C, 5000 x g). Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 4°C, 5000 x g). Anschließend konnte das sedimentierte Pellet in 4 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂, 15 % Glycerol aufgenommen und resuspendiert werden. Es wurden 100 μ l Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

B.2.1.3.2 Herstellung von elektro-kompetenten ER2738 (für Phagen-Display)

Es wurden 50 ml SOA/Tet-Medium am Vorabend mit einer Einzelkolonie von *E. coli* ER2738 beimpft und bei 30°C und 180 rpm über Nacht wachsen gelassen. Aus der Vorkultur wurden am nächsten Tag 2 ml ER2738 in 1 Liter SOA überimpft und bei 30°C und 160 rpm geschüttelt. Beim Erreichen einer $OD_{600} = 0,8 - 0,9$ wurde die Kultur auf vorgekühlte Zentrifugenbecher verteilt und 15 min auf Eis gekühlt, dann zentrifugiert (15 min, 4°C, 4000 x g) und der Überstand anschließend sofort dekantiert. Das Pellet wurde insgesamt zweimal mit 500 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert, zentrifugiert (15 min, 4°C, 4000 x g) und der Überstand anschließend dekantiert. Ein weniger kompaktes Pellet wurde erhalten und in einem letzten Schritt in 1,8 ml eiskaltem GYT Medium resuspendiert. Aliquots von 100 µl oder 200 µl müssen bei –80°C gelagert werden.

B.2.2 Transformation von *E. coli* Stämmen mit Plasmid-DNA

B.2.2.1 Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. 20 ng gereinigtes Plasmid mit 100 µl Zellen gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min auf Eis gestellt, 2 min im 42°C-Wasserbad inkubiert (Hitzeschock) und 2 min auf Eis gestellt. Dann wurde die Zellsuspension mit 1 ml SOC-Medium gemischt und 1 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Es wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Der Rest des Ansatzes wurde zentrifugiert (3 min, 5000 x g), der Überstand abgekippt, Zellen in dem verbliebenen Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Bei einer Retransformation wurden 10 µl und 100 µl des Ansatzes ausplattiert.

B.2.2.2 Elektroporation von DNA-Bibliotheken in ElectroTen Blue Zellen und ER2738

ElectroTen Blue Zellen bzw. **ER2738** wurden auf Eis aufgetaut und 40 µl Zellen (**190 µl Zellen**) zu 0,5 µg (**5 µg**) Plasmid-Bibliothek gegeben. Nach einem kurzen Auf- und Abpipettieren wurde 60 s auf Eis inkubiert und die Zellsuspension blasenfrei in eine vorgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette (peqlab) bzw. **0,2 cm Elektroporationsküvette (peqlab)** pipettiert. Danach musste die Feuchtigkeit von der Außenseite der Küvette mit einem Papiertuch entfernt und die Elektroporation bei 1,7 kV (**2,25 kV**), 25 µFD und 200 Ohm in einem Elektroporator (GenePulser, BioRad) gestartet werden. Nach dem Puls wurde die Zellsuspension sofort mit 2 x 750 µl (**3 x 1 ml**) SOC aus der Küvette gespült, in 13 ml-Kulturröhrchen überführt und für 1,5 h

bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Es wurden 10 µl des Transformationsansatzes abgenommen und zur Bestimmung der Gesamtkolonieanzahl benutzt. Der Rest des Ansatzes wurde zentrifugiert (3 min, 5000 x g), der Überstand abgekippt, Zellen in 150 – 200 µl Medium pro Elektroporation resuspendiert und auf 22 x 22 cm LB-Selektionsplatten (ca. 4 Elektroporationen pro Platte) ausplattiert. ElectroTen Blue Zellen wurden bei 37°C, ER2738 bei 30°C über Nacht inkubiert.

Für die Bestimmung der Gesamtkolonieanzahl der Bibliothek wurden folgende Verdünnungen ausplattiert:

1 µl der Kultur

10 µl einer 1:100 Verdünnung

1 µl einer 1:100 Verdünnung

10 µl einer 1:1000 Verdünnung

und 1 µl einer 1:1000 Verdünnung auf LB-Selektionsplatten.

Zur Bestimmung der Gesamtkolonieanzahl wird folgendermaßen gerechnet:

$$\text{Gesamtkolonieanzahl} = \frac{\text{Kolonien} \times \text{Verdünnungsstufe} \times \text{Gesamtvolumen} (\mu\ell)}{\text{ausgestrichenes Volumen} (\mu\ell)}$$

Am Folgetag wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers und 20 ml LB/Cm/10 % Glycerol-Flüssigmedium pro Selektionsplatte geerntet. ElectroTen Blue Zellen wurden anschließend genutzt, um eine 150 ml LB/Cm Kultur mit $OD_{600} = 0,2$ für Maxiprep anzusetzen. ER2738 wurden genutzt, um eine Phagenbibliothek zu generieren. Restliche Zellen wurden mit 20 – 30 % Glycerol bei -80°C weggefroren.

B.2.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz von selbst hergestellten elektro-kompetenten *E. coli* Zellen

Gemäß dem Protokoll für die Elektroporation elektro-kompetenter Zellen wurden 10 pg pUC18 Plasmid DNA in 40 µl Zellen transformiert und je 2 µl, 10 µl und 100 µl Zellen auf LB-Amp, LB-Kan, LB-Tet und LB-Cm Platten ausplattiert. Je nach Zelltyp sollten auf LB-Amp (pUC18 Vektor-Resistenz) und entsprechend der Resistenz der Zellen Kolonien wachsen. Eine gute Transformationseffizienz liegt zwischen 10^9 - 10^{10} Zellen pro µg DNA. Es wird die Gesamtkolonieanzahl laut Formel unter B.2.2.2 berechnet und auf 1 µg DNA hochgerechnet.

B.2.3 *In vitro* Modifizierung von DNA

B.2.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Standardverfahren zur selektiven Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen durch den Einsatz von zwei Oligonukleotiden (Primern) und einer hitzestabilen Polymerase. Die Primer sind dabei komplementär zum jeweiligen 3'-Ende der einzelnen DNA Stränge der zu amplifizierenden Doppelhelix. In Tab. B-8 sind die wesentlichen Abläufe einer Standard-PCR aufgezeigt. Der Doppelstrang wird zunächst aufgeschmolzen (Denaturierung, 95°C), Primer werden angelagert (Annealing, 50-72°C, abhängig von Länge und GC-Gehalt der Primer) und der Gegenstrang zu jedem Einzelstrang wird ausgehend von dem 3'-Ende des Primers durch eine Polymerase bei 72°C neu synthetisiert. Ein typisches PCR-Reaktionsgemisch besaß folgende Inhaltsstoffe: 5 µl 10 x NH₄-Puffer, 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 0,4 µl 100 mM dNTP-Gemisch, 4 µl Primer 1 (10 pM), 4 µl Primer 2 (10 pM), 0,5 µl Taq-Pfu Polymerase-Gemisch, x µl *Template* DNA (1-100 ng für Plasmid DNA) und x µl DEPC-H₂O mit einem Endvolumen von 50 µl. Für alle Standard-PCRs wurde der RoboCycler Gradient 40 von Stratagen benutzt. Vorteil des Geräts ist, das hier vier separate Heizblöcke für Denaturierung, Annealing, Elongation und abschließende Kühlung verwendet werden, wodurch zeitaufwendige Aufheizungen und Abkühlungen wegfallen und weniger Nebenprodukte generiert werden.

Tab. B-8: Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	1 min	Initiale Denaturierung
2	95 °C	1 min	Denaturierung
3	54 °C	1 min	Annealing
4	72 °C	1 min	Elongation
5	68 °C	10 min	End - Elongation
6	8 °C		Kühlphase

} 30 Zyklen

Kolonie-PCR: Nach der Transformation von Ligationsansätzen wurden Kolonie-PCRs zum Nachweis des eingebauten Inserts durchgeführt. Dazu wurden 150 µl Reaktionsansatz in 10 µl Ansätze aufgeteilt und jeweils mit einem frisch transformierten Klon angeimpft. Hierfür wurden

die Klone mit sterilen Zahnstochern berührt und anschließend im 10 µl Ansatz getaucht. Zwei Ansätze wurden für die Positiv- und Negativkontrolle benutzt.

B.2.3.2 *Error-prone*-PCR

Unter Verwendung des GeneMorph II Random Mutagenesis Kit von Stratagene wurde eine *Error-prone*-PCR zur Erzeugung von statistischen Mutationen innerhalb der kompletten humanen C_{H1}- und humanen C_{kappa}-Domäne durchgeführt. Als *Template* wurden ca. 1 ng des gereinigten Gens der jeweiligen Domäne eingesetzt und im empfohlenen PCR-Ansatz des Herstellers mit 40 Zyklen inkubiert. Um eine hohe Mutationsrate zu gewähren, wurden nacheinander drei PCRs durchgeführt. Als *Template* diente jeweils ca. 1 ng gelgereinigtes PCR-Produkt der vorherigen PCR. Nach dem letzten Zyklus konnten die PCR-Produkte im PCR-Mix und den entsprechenden Restriktionsenzymen und Restriktionspuffern direkt verdaut werden.

Tab. B-9: Primer für Synthese von *Error-prone* Bibliotheken der Gruppe „A“

Primer	Sequenz 5' → 3'
V _H EagIfor_pd1	AGA TGA TAA TGA TCA AGG GAC TCT GGT CAC CGT TTC <u>GGC CG</u>
HisTagNcoIrev_pd2	GCC CAC AGT CTC <u>CAT GGT</u> TAT TAA TGG TGA TGG TGG TGA TG
V _L KpnIfor_pd3	TCA CGT TCG GTG <u>CGG GTA CCA</u> AAC TGG ACC TGA AA
MycTagEcoRVrev_pd4	GCC TCG CCG TCG CCT CTT <u>CTG ATA TCA</u> GTT TTT GTT C

B.2.3.3 Herstellung lokal randomisierter DNA-Abschnitte

Lokal randomisierte DNA-Abschnitte wurden mit Hilfe von Wobbleprimern erzeugt. Bei dieser Methode bindet der Wobbleprimer direkt auf der zu randomisierenden Position, während ein zweiter Primer an einem Ende des Genabschnitts bindet. In Abhängigkeit der zu randomisierenden Positionen werden somit zwei bis drei Genabschnitte erzeugt. Damit diese Genabschnitte durch eine SOE-PCR miteinander hybridisiert werden können, müssen sich der Reversprimer des ersten Abschnitts und der Forwardprimer des zweiten Abschnitts mit ca. 20 Basenpaaren überlappen. Des Weiteren müssen die Primer, die innerhalb des Gens binden, so gewählt werden, dass mögliche Adeninüberhänge nicht zur Punktmutation führen.

Tab. B-10: Primer für lokal randomisierte Bibliotheken

Primer	Sequenz 5' → 3'
Primer für die Synthese der Bibliothek „B“	
C _H 1_eagl_for_P1	AAT AAT AGT TAT AGA AGT TTC <u>GGC CGC</u> CTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT CTT CC
C _H 1_for_P2	CCA CCA AGG GCC CAT CGG TCT TCC CCN NBG CAC CCT CCT CCA AGA G
C _H 1_rev_P3	AGT CCT TGA CCA GGC AGC CVN NGG CCG CTG TGC CCC CAG AG
C _H 1_for_P4	GCC TGG TCA AGG ACT ACT TCN NBG AAN NBG TGA CGG TGT CGT GGA ACT C
C _H 1_rev_P5	AGA GTC CTG AGG ACT GTA GGA CAG CCG GGA AGG TVN NCA CGC CGC TGG TCA GG
C _H 1_for_P6	ACA GTC CTC AGG ACT CTA CTC CCT CAG CAG CNN BGT GAC TGT GNN BTC CAG CAG CTT GGG CAC CCA GAC
C _H 1_rev_P7	ATG GTG ATG GTG GTG ATG VNN AGA TTT GGG CTC AAC TTT CTT GTC GAC CTT GGT GTT GCT GGG
C _H 1_rev_P8	GCC CAC AGT <u>CTC CAT</u> GGT TAT TAA TGG TGA TGG TGG TGA TG
C _{kappa} Kpnl_for_P9	TAT ACC ATA TAG <u>GGT ACC</u> AAA CTG GAC CTG AAA CGG ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC
C _{kappa} _for_P10	GTG GCT GCA CCA TCT GTC NNB ATC NNB CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GG
C _{kappa} _rev_P11	TAT CCA CCT TCC ACT GTA CTT TGG CCT CTC TVN NAT AGA AVN NAT TCA GVN NGC ACA CAA CAG AGG CAG
C _{kappa} _for_P12	ACA GTG GAA GGT GGA TAA CGC CCT CCA ATC GGG TAA CTC
C _{kappa} _rev_P13	CCT CTT CTG ATA TCA GTT TTT GTT CVN NCT CTC CGC GGT TGA AGC TC
Primer für lokalrandomisierte Loopbibliothek (Bibliothek „C“)	
C _H 1_lp1_eaglfor	TTT TGA TAA GAT CAT GTT TCG GCC GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA
C _H 1_lp2_for	CGG TCT TCC CCC TGG CAN NBN NBT CCA AGN NBN NBN NBG GGG GCA CAG CGG CCC T
C _H 1_lp3_rev	CAC CGG TTC GGG GAA GTA GTC CTT GAC CAG GCA GCC CAG GGC CG
C _H 1_lp4_for	ACT TCC CCG AAC CGG TGA CGG TGT CGT GGN NBT CAG GCG CCN NBA CCA GCG GCG TGC ACA CC
C _H 1_lp5_rev	CAC CAC GCT GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA CTG TAG GAC AGC CGG GAA GGT GTG CAC GCC GC
C _H 1_lp6_for	ACT CCC TCA GCA GCG TGG TGA CTG TGN NBN NBA GCA GCN NBG GCA CCC AGA CCT ACA TCT G
C _H 1_lp7_rev	AAT GGT GAT GGT GGT GAT GVN NAG ATT TGG GCT CAA CTT TCT TGT CGA CCT TGG TGT TGC TGG G
C _H 1_lp8_Ncol_rev	CGT CGC GGT CCG GCC <u>AGC CAT</u> GGT TAT TAA TGG TGA TGG TGG TGA TG

Primer	Sequenz 5' → 3'
C _{kappa} _lp9_kpnI_for	ATT TGC GGG TAC CAA ACT GGA CCT GAA ACG GAC TGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT CTT C
C _{kappa} _lp10_for	GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC NNB NNB NNB GAT NNB NNB NNB AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG
C _{kappa} _lp11_rev	CTG CTT TGC TCA GCG TCA GGG TGC TGC TGA GGC TGT AGG TGC TGT CC
C _{kappa} _lp12_for	CAG CAG CAC CCT GAC GCT GAG CAA AGC AGA CNN BNN BAA ACA CAA AGT CTA CGC CTG C
C _{kappa} _lp13_EcoRV_rev	CGC CAC GGC <u>TGA TAT CAG</u> TTT TTG TTC VNN CTC TCC GCG GTT GAA GCT C

B.2.3.4 SOE (Splicing by Overlapping Extension)-PCR

Für die Hybridisierung der einzelnen DNA-Abschnitte wurde ein Standard-PCR-Mix ohne Primer angesetzt. Die DNA-Teilstücke wurden im gleichen Verhältnis mit maximal 2 µg DNA eingesetzt. Das PCR-Programm sah wie folgt aus und wurde zweimal nacheinander mit frischer Taq/Pfu-Polymerase durchgeführt:

Tab. B-11: Standard SOE-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	4 min	Initiale Denaturierung
2	95 °C	1 min	Denaturierung
3	54 °C	1 min	Annealing
4	72 °C	2,5 min	Elongation
5	68 °C	10 min	End - Elongation
6	8 °C		Kühlphase

} 10 Zyklen

Anschließend wurde das korrekte PCR-Produkt gelgereinigt und noch einmal mit den äußeren Primern mittels PCR amplifiziert, um Restriktionsschnittstellen einzufügen.

B.2.3.5 Einführung von Punktmutationen

Die Einführung spezifischer Nukleotidaustausche innerhalb eines Plasmids wurde nach dem Protokoll des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagen) durchgeführt. Das Verfahren beruht hierbei auf der Synthese von nicht-methylierten Plasmiden, die sich dadurch

von *E. coli* produzierten und somit methylierten *Templates* unterscheiden. Das entstandene PCR-Produkt wurde durch einen Restriktionsverdau mit Dpn I vom *Template* getrennt, da Dpn I nur methylierte *Template*-DNA verdaut.

B.2.3.6 DNA-*Shuffling* (nach Stemmer)

Beim DNA-*Shuffling* wurden 15,55 µg DNA durch DNase (Roche) zunächst fragmentiert und DNA-Fragmente der Größe von 50 – 200 Basenpaaren geextrahiert und gereinigt. Die Fragmente werden in einer anschließenden Reassemblierungsreaktion zu chimären Gensequenzen der ursprünglichen Länge zusammengesetzt. Die Reassemblierungsreaktion ist eine PCR-ähnliche Reaktion ohne Primer, in der homologe Fragmente miteinander hybridisieren und an den überstehenden Enden von der Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt werden. Innerhalb der Zyklen von Denaturierung, Annealing und Extension werden die kurzen DNA-Fragmente zu Gensequenzen der Familie homologer Gene ursprünglicher Länge rekonstituiert, welche die Mutationen der Elterngene in kombinatorischer Weise tragen. Dazu wurde zunächst jede mutierte C_H1-Domäne in einem 110 µl Ansatz mittels Standard-PCR amplifiziert, anschließend gepoolt und mittels PCR Reinigungskit von Macherey Nagel gereinigt. In einem Vorversuch wurde dann die optimale DNase-Konzentration bei Inkubation von 10 min und 25°C bestimmt. Unter Verwendung des Thermocycler Varius TCV der Firma Landgraf wurde dann die Hybridisierung wie folgt durchgeführt:

Tab. B-12: DNA-*Shuffling* PCR Programm

Schritt	Temperatur	Zeit		
1	95°C	30 s	Denaturierung*	} 10 Zyklen
2	45°C	30 s	Annealing	
3	72°C	30 s	Elongation	
4	95°C	30 s	Denaturierung	} 30 Zyklen
5	50°C	30 s	Annealing	
6	72°C	30 s	Elongation	
7	68°C	10 min	End-Elongation	
6	8°C		Kühlphase	

*Abkühlung auf 45°C in 0,5°C/s

B.2.3.7 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Analytischer Verdau. Für den Nachweis einer erfolgreichen Ligation wurde ein analytischer Verdau von Transformationsklonen durchgeführt. Dazu wurden 2 µl Miniprep DNA und 2 µl Mastermix für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Der Mastermix bestand aus 4,4 µl 10 x Restriktionspuffer, 0,3 µl je Enzym und auf 22 µl aufgefülltes H₂O. Der Restriktionsverdau wurde anschließend mittels Gelelektrophorese bewertet.

Präparativer Verdau. Ein typischer 50 µl Restriktionsansatz setzte sich zusammen aus 2 - 10 µg DNA, 10 – 20 Units je Restriktionsenzym, 1 x Restriktionspuffer (Neb) und gegebenenfalls 0,1 g/l Rinderserumalbumin (BSA). Alle verwendeten Restriktionsansätze wurden 4 – 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend gelgereinigt.

Vektorverdau für Phagemidbibliotheken. Ein 1 ml Reaktionsansatz bestand aus 100 µg Vektor mit 100 Units Restriktionsenzym, 1 x Restriktionspuffer, gegebenenfalls 0,1 g/l BSA und H₂O_{DEPC}. Der Ansatz wurde in 40 µl Aliquots geteilt und 16 h bei 37°C inkubiert. Des Weiteren wurden bei der Vektorvorbereitung nur sequenzielle Verdaue durchgeführt.

B.2.3.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Selbstligation des Vektors während der Ligation zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA nach dem Restriktionsverdau durch die Alkalische Phosphatase (Cip) dephosphoryliert. Hierfür wurden die Restriktionsenzyme im 50 µl Ansatz, wenn möglich, hitzeinaktiviert und anschließend mit 1 µl Cip für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Bei der Herstellung von Phagemidbibliotheken wurde der Dephosphorylierungsschritt zweimal durchgeführt. Dabei wurde nach der ersten Dephosphorylierung der Ansatz mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt, das Eluat auf 1 x Puffer 3 (Neb) eingestellt und mit 1:50 Cip versetzt. Die Inkubation erfolgte noch einmal für 1 h bei 37°C. Anschließend konnte der Vektor mittels Gelelektrophorese und NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt werden.

B.2.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurden klassische Zwei-Fragment-Ligierungen durchgeführt. Dazu wurde das Insert im Verhältnis 1:4 zum Vektor eingesetzt. Ein typischer 20 µl Ligationsansatz (100 – 500 ng DNA) bestand aus 2 µl 10 x Ligationspuffer, 2 µl Ligase, x µl Insert-DNA, x µl Vektor-DNA und x µl H₂O. Die benötigten Insert-Menge konnte nach der folgenden Formel berechnet werden:
$$\text{Insert [ng]} = 4 \times \text{bp}_{\text{Insert}} \times \text{Vektor [ng]} / \text{bp}_{\text{Vektor}}$$

Ligation von Phagmidbibliotheken: Bei der Herstellung von Phagmidbibliotheken wurden pro Bibliothek im 1,2 ml Ansatz maximal 12 µg DNA mit einem Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 ligiert. Dabei wurden zuerst DNA und H₂O für 5 min auf 50°C erhitzt, auf 4°C abgekühlt und mit 120 µl 10 x Ligationspuffer und 60 µl T4 DNA Ligase (Roche) versetzt. Um die Ligationseffizienz zu steigern, wurde der Ansatz in 25 µl Aliquots aufgeteilt und 16 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

B.2.4 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren zu analytischen und präparativen Zwecken. Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Nukleinsäuren im homogenen elektrischen Feld. Da Nukleinsäuren weitestgehend eine identische Ladungsdichte besitzen, hängt die Auftrennung hauptsächlich von der Gesamtladung und damit von der Molekülgröße und Struktur ab. Dabei ist die Laufstrecke eines Fragments dem dekadischen Logarithmus der Fragmentlänge proportional. Die Größe eines Fragments kann mit Hilfe von Größenstandards bestimmt werden. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer gekocht, mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt und in eine Plexiglasskammer mit Taschenformer gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 x TBE-Puffer überschichtet, die zu trennenden Nukleinsäuren mit einem Fünftel ihres Volumens an 6-fach konzentrierten DNA-Probenpuffer versetzt und in die pufferbedeckten Taschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte mit konstanter Spannung von 160 V für analytische Gele bzw. 100 V bei präparativen Gelen.

Die Nukleinsäurefragmente wurden mit Ethidiumbromid, welches zwischen benachbarte Basen der Nukleinsäure interkaliert, unter ultraviolettem Licht der Wellenlänge von 302 nm in Form von Banden mit intensiv orangefarbener Fluoreszenz sichtbar gemacht. Als Marker wurden in Abhängigkeit von der Gelstärke und Kammbreite 3 – 10 µl 2-Log DNA Marker benutzt.

Tab. B-13 Puffer und Medium der Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
10 x TBE	108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8.0, mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen
6 x DNA Auftragspuffer	30 % v/v Glycerol, 0,25 % w/v Bromphenol Blau, mit 50 mM Na ₂ EDTA pH 8.0 auffüllen
Agarosegel	0,7 – 2.7 % Agarose, 1 µl Ethidiumbromid, 1 x TBE

B.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA Fragmente für nachfolgende Anwendungen aus Agarosegelen zu isolieren oder von Enzymen oder dNTPs zu reinigen, wurde das NucleoSpin® Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Agarose wird hierbei durch eine chaotrope Salzlösung irreversibel geschmolzen. Die DNA ist in Anwesenheit der Salze in der Lage, an eine Silika-Filtermembran zu binden, während aufgelöste Agarosereste nicht binden und innerhalb einer Säule abzentrifugiert werden können. Mit Hilfe des Kits konnten Fragmentgrößen von 65 bp bis zu 5 kb extrahiert werden.

Das DNA-Fragment wurde mittels eines sterilen Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die anschließende Reinigung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Zusätzlich zum Herstellerprotokoll wurde bei Basenfragmenten kleiner 100 bp das Verhältnis DNA-Lösung zu NT-Puffer auf 1:3 erhöht. Die erhöhte chaotrope Salzkonzentration unterstützt dabei die Bindung kleinerer DNA-Fragmente an die Silikamembran und erhöht somit auch die Ausbeute.

Plasmidreinigung für die Elektroporation: Ligierte Vektor-DNA bzw. Maxiprep-DNA für die Elektroporation von in ElectroTen Blue Zellen bzw. ER2738 wurden mittels NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt. Dabei wurde der Waschschrift mit 600 µl NT 3-Puffer zweimal durchgeführt und die DNA anschließend zweimal in 70°C warmen H₂O eluiert.

B.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann aufgrund der π -Elektronensysteme der konjugierten Doppelbindungen in den Basen von Nukleinsäuren über die Absorption von ultraviolettem Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden.

Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm kann als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen werden. Für reine DNA-Lösungen erhält man Werte um 1,8 und für RNA-Lösungen um 2,0. Die Absorption bei 260 nm dient als Grundlage für die Konzentrationsbestimmung. Je nach Typ der Nukleinsäure werden verschiedene Umrechnungsfaktoren eingesetzt. Diese auf Lösungen mit einer Schichtdicke von 1 cm bezogenen Näherungswerte sind abhängig von der relativen Basenzusammensetzung der Nukleinsäuren. Für einzelsträngige DNA-Oligomere entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von etwa 33 µg/ml. Für RNA beträgt dieser Wert etwa 40 µg/ml und für doppelsträngige DNA etwa 50 µg/ml. Mit Hilfe dieses Verhältnisses und des eingesetzten

Verdünnungsfaktors (VF) der Lösung ließ sich die Konzentration spektrometrisch bestimmen ($C_{\text{DNA}} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times \text{VF}$).

B.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten als Dienstleistung durch das Sequenzierlabor von Martin Meixner unter Verwendung von Sequenzierprimern (Tab. B-3) und des Sequenzers ABI Prism 377 nach dem BigDye-Terminator Cycle-Sequencing-Protokoll.

B.2.8 Isolierung von Plasmiden

In Abhängigkeit der gewünschten Anwendung bzw. des Bedarfs an Plasmid-DNA wurden anhand der Firmenprotokolle Mini- und Maxi-Plasmidprep-Kits der Firma Qiagen und Macherey-Nagel durchgeführt.

B.2.9 Expression und Reinigung von rekombinanten Protein

B.2.9.1 Cytoplasmatische Expression von GFP M53T

Nach erfolgreicher Transformation des Plasmids pDsb/Ass_EM53T in BL21 (plysS) Zellen, wurden die Transformanten auf LB-Cm-Kana und 1 % Glucose-Platten ausplattiert. Für die Anzucht einer 100 ml Vorkultur (LB-Cm-Kana und 1 % Glucose) wurde eine frische Kolonie BL21 (plysS) verwendet und über Nacht bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden die 2 x 1 Liter Hauptkultur (LB-Cm-Kana) ohne Glucose mit 1/50 Volumen Vorkultur gestartet und bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Bei einer $\text{OD}_{600} = 0,6$ wurde die Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG Endkonzentration gestartet und für 4 bis 5 h exprimiert. Anschließend konnten die Zellen durch Zentrifugation von 15 min und 5500 x g geerntet werden. Das Zellpellet wurde in 1:50 Aufschlußpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 1 x Bugbuster, 25 U/ml Benzonase und 40 mM Imidazol) bei Raumtemperatur resuspendiert und 20 min bei 70°C hitzebehandelt. Denaturierte Proteine wurden durch Zentrifugation von 20 min bei 30600 x g entfernt und die Proteinlösung bei -20°C gelagert.

B.2.9.2 Expression Fab-Fragmenten im Mikrotiterplattenformat [80]

Eine 96-DeepWell-Platte wurde mit 200 μl /Well LB-Cm-Medium befüllt, mit einer Einzelkolonie pro Vertiefung beimpft und über Nacht bei 30°C und 250 rpm geschüttelt (Masterplatte). Es wurden 5 μl dieser Übernachtskultur in 185 μl /Well LB-Cm-Medium überführt (1:40 Verdünnung) und 90 min bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Bei einer $\text{OD}_{600} \cong 0,5$ wurde

die Fab-Expression mit 10 µl 4 µg/ml Anhydrotetrazyklin (1:500 in LB) induziert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 18°C und 250 rpm geschüttelt.

Am dritten Tag wurden die Zellen sedimentiert durch 10 min Zentrifugation bei 4000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, die Pellets in 100 ml/Vertiefung Periplasmapuffer resuspendiert und auf Eis inkubiert. Zwanzig Minuten später wurden die Mikrotiterplatten ein letztes Mal für 10 min und 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für den Nachweis-ELISA genutzt.

B.2.9.3 Analytische Expression von Fab-Fragmenten (20 ml Zellkultur)

Es wurden 5 ml LB-Cm-Medium mit einer frischen Bakterienkultur von *E. coli* JM83 beimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur von 20 ml LB-Cm durch Zugabe von 500 µl (1:40) Übernackkultur gestartet. Bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ wuchsen die Zellen ca. 1 h lang bei 37°C und 220 rpm. Anschließend wurde die Schüttlertemperatur auf 18°C reduziert. Bei einer $OD_{600} = 0,5$ wurde die Expression durch Zugabe von 1 ml 4 µg/(ml LB) Anhydrotetrazyklin (aTc) gestartet. Fab-Konstrukte wurden 24 h bei 18°C und 220 rpm exprimiert und durch Zentrifugation (5 min, 5000 x g) geerntet.

B.2.9.4 Präparative Expression von Fab-Fragmenten

Es wurden 50 ml LB/Cm-Medium mit einer frischen Bakterienkolonie von JM83-Zellen beimpft und über Nacht bei 30°C und 220 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 1 Liter LB/Cm-Medium mit 10 ml (1:100) inokuliert und bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Bei $OD_{600} = 0,3$ wurde die Temperatur auf 18°C reduziert und die Kultur bei $OD_{600} = 0,5$ mit aTc induziert (Endkonzentration = 0,2 µg/ml). Die Expressionszeit betrug 24 h bei 18°C und 180 rpm. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 5500 x g, 4°C) geerntet und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde entweder für kurze Zeit bei -20°C gelagert oder gleich dem Periplasmaaufschluss zugeführt.

B.2.9.5 Analytischer Periplasmaaufschluss

Zellpellets von 1 ml Kulturen wurden in 120 µl Periplasmapuffer resuspendiert und für ca. 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Späroblasten durch zweimalige Zentrifugation von 5 min bei 2000 x g und anschließend 20 min bei 16.000 x g abgetrennt. Fertige Periplasmaproben wurden durch Western-Blot und ELISA überprüft. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

B.2.9.6 Präparativer Periplasmaaufschluss

Zellpellets wurden in 1/100 Volumen Periplasmapuffer auf Eis resuspendiert. Nach ca. 30 min Inkubation wurde der Periplasmaaufschluss 15 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und ein weiteres Mal 20 min bei 30.600 x g und 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

B.2.9.7 Quantifizierung von Proteinen im Periplasma und Mediumüberstand

Unter der Voraussetzung, dass die Affinität der optimierten Fab-Varianten konstant bleibt, kann der Anteil der löslich exprimierten und funktionellen Antikörper im Periplasma durch ELISA (Siehe Protokoll B.2.10.5) bestimmt werden. Als Standard dient eine vollständig gereinigte Probe des Fab CB4-1, dessen Proteingehalt photometrisch über den spezifischen Extinktionskoeffizienten bestimmt wurde.

B.2.10 Proteinchemische Methoden

B.2.10.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC; [81]) beruht auf der Bindungswechselwirkung von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche, vor allem Cystein- oder Histidin-Seitenketten, zu Übergangsmetallionen. Auch rekombinante Proteine mit künstlich angehäuften Oligohistidin-Sequenzen können wegen ihrer besonderen Affinität zu chelatisierten Metallionen auf diese Weise gereinigt werden ([82]). Die IMAC wurde deshalb zur Einzugs-Reinigung von GFP-EM53T und diversen Fab-Varianten mit einem C-terminalen His-Tag herangezogen.

Die Reinigung erfolgte unter Verwendung von HisTrap HP Säule (GE Healthcare), einer Chromatographie Matrix mit Nitrilotetraessigsäure-Gruppen (NTA) als Chelatbildner. Eine Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml wurde zunächst bei einer konstanten Flußrate von 1 ml/min mit Wasser gespült und anschließend mit 15 Säulenvolumen (SV) 4 % Puffer A äquilibriert. Während dessen wurde die in Puffer A dialysierte Periplasmaprobe zentrifugiert (20 min, 47800 x g, 4°C) und sterilfiltriert (0,45 µm). Zusätzlich wurden auch alle Periplasmafraktionen direkt vor dem Aufrufen mit 1/1000 Benzonase behandelt und für mehrere Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend konnte die Probe mit maximal 1 ml/min aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit 4 % Puffer A gespült werden. Das gebundene Protein wurde durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 40 ml Volumen von 20 bis

300 mM Imidazol eluiert. Das gereinigte Protein wurde anschließend gegen einen geeigneten Puffer dialysiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und bei -80°C gelagert.

Tab. B-14: Verwendete Puffer für die Proteinreinigung

Name	Zusammensetzung
Dialysepuffer I	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.4, verwendete Puffer 500 mM NaCl, mit dH ₂ O auffüllen
Dialysepuffer II	10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0 einstellen und mit dH ₂ O auffüllen
Gradifraq Puffer A	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.4, 500 mM NaCl, sterilfiltriert, entgast und mit dH ₂ O auffüllen
Gradifraq Puffer B	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.4, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, sterilfiltriert, entgast und mit dH ₂ O auffüllen

B.2.10.2 SDS-PAGE

Durch das im SDS-PAGE-Auftragspuffer enthaltene SDS werden alle Proteine mit einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung abgesättigt (SDS mit negativen SO₄²⁻ Gruppen). Die Laufgeschwindigkeit in einem Elektrophoresegele ist somit nur noch von der Größe und nicht mehr von der unterschiedlichen Ladung der Proteine abhängig. Als diskontinuierliche SDS-PAGE wurden erst ein 12 %iges Trenngel (pH 8,8) und nach deren Polymerisation darauf ein Sammelgel (pH 6,8) in eine Gelpräparationskammer gegossen. Daraufhin wurde das auspolymerisierte Gelsystem in eine mit 1 x Laemmli-Puffer befüllte Elektrophoresekammer (BioRAD) überführt. Die Proteinprobe wurde währenddessen mit 5 x SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht, um Tertiärstrukturen und Disulfidbrücken zu zerstören. Anschließend wurde die Probe auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 80 V gestartet. Aufgrund des pH-Wertes des Sammelgels (pH 6,8) kommt es zu einer Konzentrierung der Proteine an der Front zum Trenngel und damit zu einer besseren Auflösung der Auftrennung von Proteinen im Trenngel. Bei Erreichen des Trenngels wurde die angelegte Spannung auf 20 mA/Gel und maximal 180 V erhöht. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit dem Auslaufen der Bromphenolbande aus dem Gel beendet.

Tab. B-15: Puffer und Gele der SDS-PAGE

Name	Zusammensetzung
10 x Laemmli Puffer	30,2g Tris, 144 g Glycin freie Säure, 5 g SDS, mit dH ₂ O auffüllen
5 x SDS Auftragspuffer	250 mM Tris/ HCl pH 6,8, 7,5 % w/v SDS, 0,25 % w/v Bromphenol Blau, 625 mM DTT, 25 % v/v Glycerol, mit dH ₂ O auffüllen, -20°C
Sammelgel (4,2 %)	Für fünf Gele: 1,4 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid, 7,3 ml H ₂ O, 1,25 ml 1 mM Tris/HCL-Puffer pH 6,8, 50 µl 20 % SDS, 20 µl TEMED und 50 µl 10 % w/v APS
Trenngel (12 %)	Für fünf Gele: 10 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid, 8,3 ml H ₂ O, 6,25 ml 1,5 M Tris/HCL-Puffer pH 8,8, 125 µl 20 % SDS, 25 µl TEMED und 250 µl 10 % w/v APS

B.2.10.3 Coomassiefärbung von Proteingelen

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele direkt in ca. 20 ml Coomassiefärbelösung gegeben und für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Gele kurz mit Wasser gewaschen und mit 20 ml Entfärbelösung so lange entfärbt bis klare Proteinbanden sichtbar waren.

Tab. B-16: Coomassie-Färbung

Puffer	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	10 % v/v Essigsäure, 40 % v/v Ethanol, 0,25 % w/v Coomassie Brilliant Blau R250, mit dH ₂ O auffüllen, durch Papierfilter filtriert
Entfärbelösung	10 % v/v Essigsäure, 40 % v/v Ethanol (vergällt), mit dH ₂ O auffüllen

B.2.10.4 Western-Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde die Western-Blot-Analyse verwendet. Dabei wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) elektrophoretisch überführt und spezifisch mit einem α -His-POD (Sigma) nachgewiesen. Zwei Filterpapiere (6 cm x 9 cm) wurden in E-Blotpuffer getränkt, die PVDF-Membran kurz in EtOH (vergällt) getaucht und 1 min in Wasser geschwenkt. Die Membran wurde anschließend zu dem Filterpapier in E-Blotpuffer gelegt. Der Blot wurde luftblasenfrei zusammengebaut, indem ein puffergetränktes Filterpapier auf die (untere) Anode, die Membran darüber, das Gel auf die Membran und ein zweites Filterpapier darauf gelegt wurde. Zum Abschluss wurde die (obere) Katode aufgelegt und der Elektrotransfer für 20 min bei 20 V durchgeführt. Die Membran wurde 1 h oder über Nacht in 5 % w/v Milchpulver in TBS-T abgesättigt und 1 x 5 min in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde 1 h in 2 ml Antikörperlösung in TBS inkubiert und 3 x 5 min in TBS-T gewaschen. Es

wurden nur POD-(Peroxidase) markierte Antikörper verwendet, die mit 1 bis 2 ml SeramunBlau® prec (Seramun) entwickelt wurden. Die Reaktion ist mit Wasser abgestoppt worden.

Tab. B-17: Puffer für Western-Blot

Puffer	Zusammensetzung
E - Blotpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin freie Säure, 20 % Ethanol (vergällt), mit dH ₂ O auf 2,5 l auffüllen
5 x TBS-T	75,6 g Tris, 109,7 g NaCl, 12,5 ml Tween 20, einstellen auf pH 7.5, mit dH ₂ O auf 2,5 l auffüllen

B.2.10.5 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA ist ein heterogener Enzym-Immunoassay, der auf der Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Dabei kann entweder ein spezifischer Antikörper an einer festen Trägersubstanz (z. B. Zellulose, Polystyrol) gebunden vorliegen oder das Antigen liegt gebunden vor. Nach der Inkubation mit der Probe bilden sich Immunkomplexe aus und in einem nachfolgenden Schritt können weitere Enzym-markierte Antikörper binden.

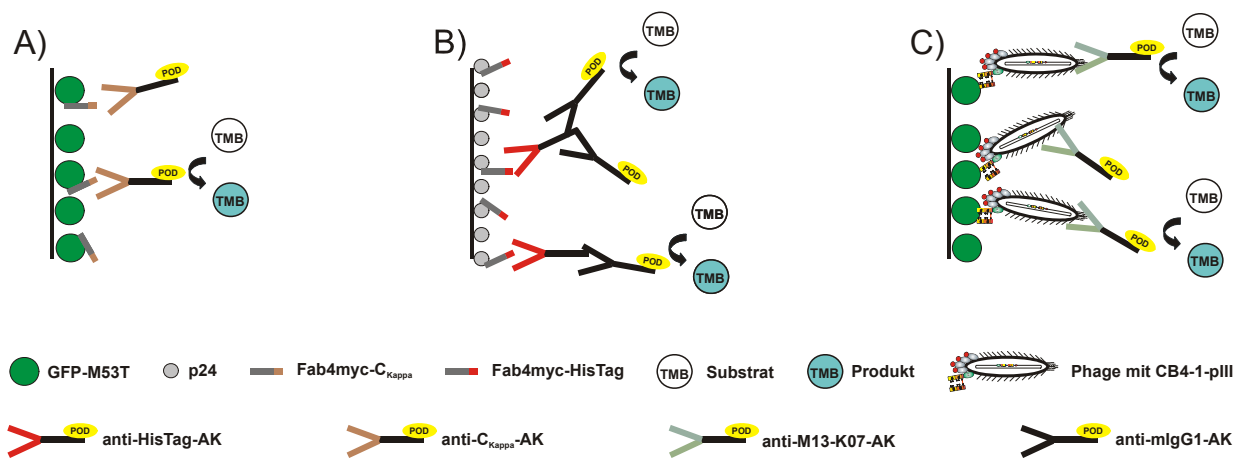


Abb. B-1: Verwendete ELISA-Varianten. A) Mit GFP-M53T beschichteten Platten können lösliche Fab-Fragmente nur über die C_{Kappa}-Domäne detektiert werden, da GFP selbst His-getaggt ist. B) Nachweis löslicher Fab-Fragmente an rekombinanten p24, Nachweis erfolgte über Antikörpergemisch aus Maus α-Tetra-His-Antikörper 1:4000 und α-Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:7000. c) Phagen-ELISA an GFP-M53T, Nachweis über α-Fd-Phagen-HRP 1:1000. Substrat aller ELISA: TMB (SeramunBlau®fast).

Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht werden. Die Antigenkonzentrationen in der Probe kann anschließend durch den Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivitäten ermittelt werden. Das Antigen des α-p24-(HIV-1)-Antikörpers CB4-1 wurde entweder von Christa Scholz und Dina Reinhard (unsere Arbeitsgruppe) zur Verfügung gestellt oder in Form

des zirkulär permutierten GFP-M53T [78] nach Abschnitt B.2.9.1 und B.2.10.1 selbst exprimiert und gereinigt.

Phagen-ELISA (Abb. B-1 C)). Zum Nachweis der Ausbildung von funktionellen rekombinanten Fab-Fragmenten auf der Oberfläche eines Phagen wurde ein Bindungsassay mit dem spezifischen Antigen durchgeführt. Dafür wurde eine 96er MaxiSorb Mikrotiterplatte (Nunc) mit 100 μ l pro Vertiefung 10 μ g/ml GFP-M53T in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet, 3 x mit PBST (0,1 % v/v Tween 20) gewaschen, mit 300 μ l 2 x Blockierungslösung/PBS über Nacht bei 37°C blockiert und wieder 3x mit PBST gewaschen. Anschließend wurden 80 μ l des phagenhaltigen Zellkulturüberstands aus der Phagenpräparation im 96er Mikrotiterplattenformat (B.2.11.8) in 1 x Blockierungslösung/PBS in die beschichtete Mikrotiterplatte überführt und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde 10 x mit PBS-T gewaschen. Der Nachweis für gebundene Phagen erfolgte mit dem α -Fd-Phagen-HRP (1:1000 in 1 x Blockierungslösung/ PBS) 1 h bei RT. Nach 10 x Waschen mit PBS-T wurde mit 100 μ l/Vertiefung SeramunBlau[®] fast (Seramun) entwickelt und im ELISA-Reader die Kinetik der TMB Oxidierung gemessen. Der Messfilter wird auf 650 nm und der Referenzfilter auf 450 nm eingestellt. Das Messintervall beträgt 20 s und es werden 30 Messpunkte über 10 min aufgenommen. Vor jeder Messung wird 2 s geschüttelt.

ELISA löslich exprimierter Fab-Fragmente im 96er Mikrotiterplattenformat [80]. Für den Nachweis von löslich exprimierten Fab wurden Mikrotiterplatten mit 100 μ l/Vertiefung mit 1 μ g/ml p24/PBS beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Beschichtungslösung verworfen und die Platten auf trocknen Tüchern ausgeklopft und dreimal mit PBS-T gewaschen. Ohne zusätzlichen Blockingschritt wurden 40 μ l Periplasmaüberstand (B.2.9.2) in die mit p24 beschichteten und mit 40 μ l/Vertiefung 2 x Blocking/PBS gefüllten Mikrotiterplatten überführt und 2 h bei RT und 150 rpm geschüttelt. Anschließend wurde 3 x mit PBS-T gewaschen und 100 μ l/Vertiefung Antikörperlösung pipettiert und für 2 h, 150 rpm und RT inkubiert (Tab. B-18: Protokoll zum Fab-Expressions-ELISA). Das Antikörpergemisch bestand aus Maus- α -Tetra-His-Antikörper 1:4000 (Qiagen) und α -Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:7000 (Seramun). Anschließend musste die Mikrotiterplatte mit 10 x PBS-T gewaschen werden, bevor die Antikörperbindung mittels 100 μ l/Vertiefung mit SeramunBlau[®] fast (Seramun) nachgewiesen wurde (Abb. B-1 B). Es wurde wieder die Kinetik der Oxidation des Tetramethylbenzidins (TMB) gemessen. Als Referenz wurde immer in Dreifachbestimmung das Ausgangskonstrukt Fab4myc bzw. die bis dato beste Mutante mitgeführt. Bevor der ELISA-Test via His-Tag eingeführt wurde, konnte die lösliche Fab-Expression auch mittels α -mC_{Kappa}-POD

(Acris Antibodies, Abb. B-1 A) bzw. α -hC_{Kappa} (Sigma)/ α -Maus-IgG-HRP (Amersham Biosciences) und TMB nachgewiesen werden.

Tab. B-18: Protokoll zum Fab-Expressions-ELISA

Fab-Expressions-ELISA			
1	Beschichten mit p24	100 μ l (1 μ g/ml)	ÜN@ 4 °C
2	3 x Waschen mit PBS-T		
3	Bindung (40 μ l Periplasma und 40 μ l 2 x Blocking/ PBS)	80 μ l	2 h RT
4	3 x Waschen mit PBS-T		
5	Maus α -Tetra-His-Antikörper 1:4000 α -Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:7000	100 μ l	2 h RT
6	10 x Waschen mit PBS-T		
7	Entwicklung mit SeramunBlau [®] fast	100 μ l	

B.2.11 Arbeiten mit filamentösen Phagen

B.2.11.1 Selektion von rekombinanten Fab-Fragmenten mittels Phagen-Display

Die *in vitro*-Selektion von Antikörperfragmenten [83] über ihre Bindungsaktivität wird „*Panning*“ genannt. Das Antigen ist dabei immobilisiert an einer festen Phase, wie zum Beispiel Nitrocellulose [84], Magnetische Beads [85] oder Säulenmaterial [43], meistens jedoch an der Oberfläche von Polysterolgefäßen [86][86][85][85][84][84][86] oder 96-Well-Mikrotiterplatten [42]. Für die Selektion der Phagenbibliothek wurden Mikrotiterplatten-Module der Firma Nunc benutzt.

Die Fab-Fragment tragenden Phagen wurden an den oberflächengebundenen Antigen p24 gebunden. Durch sorgfältiges Waschen wurden bindende von nicht-bindende Phagen getrennt und konnten im nächsten Schritt durch pH-Shift eluiert werden. Eluierte Phagen dienten dann der Infektion von neuen ER2738-Zellen. Ein neuer Selektionszyklus wurde gestartet, in dem Phagemid-tragende ER2728 Zellen erneut mit Helferphagen M13K07 infiziert und neue Antikörperfragment-tragende Phagen produziert wurden. Diese neue Phagenbibliothek wurde dann für eine erneute *Panning*-Runde genutzt. Es wurden so viele *Panning*-Runden durchgeführt bis sich spezifische Phagen signifikant angereichert haben. Zwischen drei durchgeführten *Panning*-Runden wurden jeweils Phagen- und Expressions-ELISA durchgeführt, um Vorteilmutanten zu selektieren und die Qualität des Eluats zu bewerten.

B.2.11.2 Präparation von M13K07 Helferphagen

Es wurden 20 ml 2 x TY-Medium mit einer Kolonie ER2738-Zellen beimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,2$ geschüttelt. Je 190 μ l dieser Kultur wurden mit 10 μ l einer Lösung von M13K07 Phagen der Verdünnungsstufen 10^5 bis 10^{10} gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die infizierten Kulturen wurden zu je 3 ml TOP-Agar (48°C) gegeben, kurz gemixt, auf vorgewärmte LB-Agarplatten gegossen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde ein kleiner Plaque mit einer 1000 μ l Pipettenspitze gepickt, zu 3-4 ml einer exponentiell wachsenden ER2738-Kultur ($OD_{600} = 0,5$) gegeben und 2 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden 500 ml 2 x TY Medium inokuliert und 1 h bei 37°C und 140 rpm geschüttelt, Kanamycin bis zu einer Endkonzentration von 50 μ g/ml hinzugegeben und über Nacht bei 37°C und 140 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert (4°C, 20 min, 5500 x g) und die Phagen durch zweimalige PEG/NaCl-Fällung aus dem Kulturüberstand gewonnen. Nach der 2. Fällung wurden die Phagen in 2 ml TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen. Der Helferphagentiter sollte ca. 10^{12} cfu/ml betragen.

B.2.11.3 Präparation von Phagemidbibliotheken

Es wurden 1 l 2 x TY-Cm-Medium mit ER2738-Zellen (entweder direkt mit Transformationskultur oder aus Übernachtskultur) auf $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und bei 37°C mit 160 rpm geschüttelt. Beim Erreichen der $OD_{600} = 0,5-0,6$ wurde die Kultur schnell auf 25°C abgekühlt (auf Eis mit Thermometer), dann mit 6×10^{12} cfu M13K07 Helferphagen gemischt ($Moi=15$, 1 OD_{600} entspricht ca. 8×10^8 Zellen/ml) und für 30 min bei 25°C und 80 rpm inkubiert. Anschließend wurde Kanamycin bis zu einer Endkonzentration von 50 μ g/ml zur Kultur gegeben und diese nun 15 min bei 25°C und 160 rpm geschüttelt. Anschließend wurde das Medium gewechselt: Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 5500 x g, 4°C) sedimentiert, der Kulturüberstand verworfen und die Zellen in 1 l auf 25°C temperiertem 2 x TY-Cm mit Kanamycin (50 μ g/ml) und Tetracyclin (1 μ g/ml) resuspendiert. Diese Kultur wird 8 h oder über Nacht (14-16 h) bei 25°C und 160 rpm geschüttelt. Anschließend konnten die rekombinanten Phagen aus dem Kulturüberstand gewonnen werden.

B.2.11.4 PEG – Fällung von Phagen aus dem Zellkulturüberstand

Zellen und Zelltrümmer wurden vom phagenhaltigen Zellkulturüberstand durch Zentrifugation (4°C, 5500 x g, 15 min) getrennt und mit $\frac{1}{4}$ Volumen PEG/NaCl-Lösung versetzt. Nach 1 h auf Eis (Fällung kann auch über Nacht durchgeführt werden) wurden die Phagen sedimentiert (4°C,

30.000 x g, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Phagenpellet wurde in 5 ml TE-Puffer aufgenommen und durch ein 0,45 µm Filter gereinigt. Optional konnte eine zweite Fällung durchgeführt werden. Dabei wurde die Phagenlösung mit ¼ Volumen PEG/NaCl-Lösung versetzt und 1 h oder über Nacht auf Eis inkubiert. Die Phagen wurden sedimentiert (4°C, 30.000 x g, 15 min) und mit 500 µl TE-Puffer oder PBS aufgenommen. Die Phagenlösung konnte bei 4°C gelagert oder mit einem Volumen Glycerol gemischt bei -70°C eingefroren werden.

B.2.11.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Phagen [31]

Der Phagentiter wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde ein Spektrum von 240 – 320 nm aufgenommen. Anschließend wurde der Maximalwert bei einer Absorption von A_{269} um den Wert der Basislinie bei A_{320} bereinigt. Die Nukleotidanzahl aller Phagemidvektoren entspricht 4929 Basen. Die Berechnung ist verfälscht, da eine Phagenbibliothek in der Regel eine Mischpopulation von Phagen widerspiegelt. Neben den Phagemid-tragenden Phagen sind auch M13K07-Helferphagen vorhanden, die ein Genom von 6407 Basen besitzen. Da aber bei der Verwendung von Helferphagen mit defektem Replikationsursprung das Phagemid mit einem Verhältnis von 1000:1 eingebaut wird [53, 87], trägt nur ein geringer Anteil der Phagen ein Helferphagen Genom. Der gemessene Fehler ist daher zu vernachlässigen.

$$\text{Phagenpartikel / ml} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \times (6 \times 10^{16})}{\text{Nukleotidanzahl des Phagemidvektors}}$$

B.2.11.6 Panning von Fab4myc Phagemidbibliotheken

Es wurden Mikrotitervertiefungen mit 10 µg/ml GFPuv und GFP_M53T beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Mikrotitervertiefungen wurden mit 2 x Blocking-Puffer bis zum Rand gefüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal gewaschen und das *Prepanning* für 1 h bei RT mit 10^{12} Phagen/Vertiefung durchgeführt. Dieser Schritt diente dazu unspezifische Phagen zu eliminieren. Im Anschluss wurde die Phagenlösung direkt in die GFP-M53T beschichteten Vertiefungen für 2 h bei RT gegeben. Nach dem Binden antigenspezifischer Phagen wurde noch einmal intensiv 10 x mit PBS-T gewaschen, um nicht gebundene Phagen zu entfernen. Im letzten Schritt wurden gebundene Phagen durch Inkubation von 5 min mit Glycin/HCl pH 2,2 eluiert und durch Zugabe von Tris/HCl pH 9,0 neutralisiert.

Tab. B-19: Protokoll zum Phagen-ELISA

Phagen-ELISA			
1	Beschichten mit GFPuv und GFP-M53T	200 µl 10 µg/ml/	ÜN@ 4 °C
2	Blocken	300 µl	ÜN@ 37 °C
3	3 x Waschen mit PBS-T		
4*	Hitzeinaktivierung der Phagenbibliothek		20 min 60 °C
5	<i>Prepanning</i> mit GFPuv	100 µl	1 h RT
6	Bindung mit GFP-M53T	80 µl	2 h RT
7	10 x Waschen mit PBS-T		
8	Elution mit Glycin/HCl pH 2.2	100 µl	5 min
9	Neutralisation mit Tris/HCl pH 9.2	15 µl	

* eine Hitzeinaktivierung der Phagenbibliothek wurde nur bei der A-C_H1 und A-C_H1-*shuffling* Bibliothek durchgeführt

B.2.11.7 Reamplifikation eluierter Phagen

Für eine weitere *Panning*-Runde mussten eluierte Phagen reamplifiziert werden. Dazu wurden die Phagen (ca. 500 µl) aus dem *Panning* mit 3 ml ER2738 ($OD_{600} = 0,5 - 0,6$; 37°C) gemischt und 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Zur Titerbestimmung wurden 1 µl und 10 µl auf 2 x TY-Cm-Agar ausplattiert. Die Kultur wurde sedimentiert (5 min, 3500 x g, 4°C), das Zellpellet in ca. 500 µl Medium resuspendiert, auf eine 22x22cm 2 x TY-Cm-Platte mit Hilfe der ColiRollers ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert (Temperatur auf 28°C gesenkt, wenn >16 h Inkubation). Zum weiteren Arbeiten mit den Zellen, wurden sie am nächsten Tag mit ca. 20 ml 2 x TY-Cm-Medium und 10 % Glycerol von der Platte geschabt und in Flüssigkultur genommen, wobei die Kultur auf eine $OD_{600} = 0,08 - 0,1$ eingestellt und bei 37°C und 180 rpm geschüttelt wird. Beim Erreichen der $OD_{600} = 0,5$ wurde die Kultur schnell auf 25°C abgekühlt (auf Eis mit Thermometer), dann mit $1,5 \times 10^{11}$ cfu M13KO7-Helferphagen gemischt und für 30 min bei 25°C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde Kanamycin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zur Kultur gegeben und diese nun 15 min bei 25°C und 180 rpm geschüttelt. Im Anschluß daran wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 5500 rpm, 4°C) sedimentiert, der Kulturüberstand verworfen und die Zellen in 25 ml auf 25°C temperiertem 2 x TY-Cm mit Kanamycin (50 µg/ml) und Tetracyclin (1 µg/ml) resuspendiert. Diese Kultur wird 8 h oder über Nacht (14 - 16 h) bei 25°C und 180 rpm geschüttelt.

Anschließend konnten die rekombinanten Phagen aus dem Kulturüberstand durch Fällung gewonnen werden.

B.2.11.8 Herstellung von Phagen im 96er Mikrotiterplattenformat

Eine 96-DeepWell-Platte wurde mit 200 µl/Well 2 x TY-Cm-Medium befüllt, mit einer Phagemid enthaltenen Einzelkolonie pro Vertiefung beimpft und über Nacht bei 30°C und 250-rpm geschüttelt (Masterplatte). Es wurden 5 µl dieser Übernacht-Kultur in 200 µl/Well 2 x TY-Cm-Medium überführt (1:40 Verdünnung) und 90 min bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Nach dieser Zeit hatten die Kulturen eine $OD_{600} \cong 0,5$ erreicht. Die Kulturen wurden auf 25°C abgekühlt, mit 10 µl (2×10^9 cfu) M13KO7-Helferphagen gemischt (Moi = 30) und 30 min bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Kanamycin-Lösung (Kan-Stammlösung (30 µg/ml) 1:10 in 2 x TY verdünnt) hinzugegeben und die Inkubation für 15 min bei 250 rpm fortgesetzt. Durch Zentrifugation (10 min, 3500 x g, 4°C) wurden die Zellen sedimentiert und in 200 µl vortemperiertem (30°C) 2 x TY-Cm-Medium plus 60 µg/ml Kanamycin und 1 µg/ml Tetracyclin resuspendiert. Zur Phagen-Produktion wurden die Kulturen über Nacht (ca. 14 h) bei 30°C und 250 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden am Folgetag abgetrennt (15 min, 3500 x g, 4°C) und der Zellkulturüberstand direkt als Phagenlösung für den Einzelphagen-ELISA verwendet (siehe dazu Abschnitt B.2.10.5).

B.2.12 Biochemische Charakterisierung von Fab4myc Vorteilsmutanten

B.2.12.1 K_D -Bestimmung über ELISA

Eine einfache und allgemein angewendete Methode für das Bestimmen von Antigen/Antikörpergleichgewichten ist der klassische, indirekte ELISA nach Friguet [88]. Dabei erlaubt die Sensitivität des ELISA die Messung von Gleichgewichtskonstanten (K_D) bis zu 10^9 M. Mikrotiterplatten wurden mit 0,5 µg/ml p24 in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet und dreimal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden 50 µl PBS pro Vertiefung vorgelegt und eine Verdünnungsreihe mit 50 µl einer 312,5 nM Peptidlösung (NH₂-GATPQDLNNTML-COOH) gestartet. Entlang der Mikrotiterplatte wurde so die Peptidlösung von Vertiefung zu Vertiefung 1:2 verdünnt bis letztendlich 11 Verdünnungsstufen entstanden. Die 12. Vertiefung wurde als Referenz ohne Peptid mitgeführt. Anschließend wurden 50 µl mit 0,4 µg/ml Fab und zweifach Blockingpuffer hinzugegeben und für 18 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit PBS-T gewaschen und mit dem Antikörpergemisch aus Maus- α -Tetra-His-Antikörper 1:4000 und α -Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:8000 in PBS und

1 x Blockingpuffer für 2 h inkubiert. Nach zehnmalem Waschen wurde dann die Peroxidase durch 50 µl/Vertiefung TMB-Substrat SeramunBlau® fast aktiviert und für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die weitere Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption bei 450 nm (Referenz 620 nm) am ELISA-Reader (Anthos HT2) gemessen.

Aus den ELISA-Daten konnte dann die Gleichgewichtskonstante K_D nach folgender Formel abgeleitet werden:

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = 1 + \frac{K_D}{\alpha_0} \text{ sofern die lineare Abhängigkeit gilt: } \frac{i}{i_0} = \frac{A}{A_0}$$

A_0 = Absorption 450nm des Fab-Peptid-Gemisch

A = Absorption 450nm der Fab-Referenz ohne Peptid

α_0 = Peptidkonzentration

i_0 = Fab-Konzentration

i = frei Fab-Konzentration des Fab-Peptid-Gemisch

Aus der Gleichgewichtskonstanten K_D konnte die freie Standardenergie ΔG° nach der Formel:

$\Delta G^\circ = RT \ln KD$ mit der Gaskonstante $R = 8,3145 \times 10^{-3} \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ und $T_{\text{ELISA}} = 298,15 \text{ K}$ (25°C) berechnet werden.

B.2.13 Denaturierung durch Guanidiniumhydrochlorid

Die Faltungsstabilität ausgewählter Fab-Varianten wurde durch chemische Denaturierung mit Guanidiniumchlorid (GdnHCl) untersucht [89, 90]). Hierzu wurde die reversible Entfaltung in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 6 M GdnHCl anhand der konformationsabhängigen Proteinfluoreszenz verfolgt. Die Änderung des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Denaturierung war dabei für die einzelnen Fab-Varianten verschieden stark ausgeprägt.

Zur Herstellung von Proteinlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an GdnHCl wurde zunächst eine 8 M Stammlösung des Denaturierungsmittels in PBS-Puffer vorbereitet. Diese Stammlösung sowie alle übrigen Lösungen, die im Denaturierungsexperiment eingesetzt wurden, wurden durch Sterilfiltration von Partikeln befreit (0,45 µm). Ausgehend von der Stammlösung wurden in 15 ml Reaktionsgefäßen durch Verdünnung mit PBS-Puffer typischerweise 31 Arbeitslösungen mit 0,2 M Übergangsstufen von 0 bis 6,67 M GdnHCL hergestellt.

Für jeden Messwert wurde eine Probe mit einem Volumen von 500 µl in einem 1,5 ml

Reaktionsgefäß angesetzt. Dafür wurden je 450 µl der GdnHCl-Arbeitslösung mit 50 µl einer ca. 0,44 mg/ml Lösung der jeweiligen Fab-Variante in PBS-Puffer gemischt. Zusätzlich wurde zur Korrektur des Fluoreszenzsignals für jeden Messwert eine weitere Lösung angesetzt, bei der anstelle der Proteinlösung PBS-Puffer zugegeben wurde. Die Ansätze wurden durchmischt und bis zu 26 Tage bei 25°C inkubiert.

Nach den Fluoreszenzmessungen wurde die tatsächliche GdnHCl-Konzentration der einzelnen Entfaltungsansätze refraktometrisch überprüft. Als Messwert wurde die Differenz der Brechungsindizes der Probenlösungen und des PBS-Puffers, Δn_{GdnHCl} , bestimmt und die tatsächliche GdnHCl-Konzentration $[D]$, unter Vernachlässigung des Proteingehaltes, nach dem Modell von Nozaki [91] errechnet:

$$[D] = 55,147 \times \Delta n_{\text{GdnHCl}} + 38,68 \times \Delta n_{\text{GdnHCl}}^2 - 91,6 \times \Delta n_{\text{GdnHCl}}^3$$

Die Messung erfolgte an vier unterschiedlichen Tagen (1T, 4T, 8T, 26T) im Mikrotiterplattenformat am Tecanreader SAFIRE II der Gruppe von Kries (FMP, Berlin). Am 13. Tag erfolgte eine zusätzliche Kontrollmessung mittels Küvetten am laborinternen Fluoreszenz-Spektrometer (LS50B, Perkin Elmer). Auch wenn die Ergebnisse beider Instrumente sich soweit deckten, wurden die Messwerte des Fluoreszenz-Spektrometers für die weitere Auswertung benutzt. Unter Verwendung der Origin Software und der folgenden Formel für die Berechnung des Fluoreszenzsignals F nach Clarke [92] konnten die gemessenen Werte gefittet werden:

$$F = \frac{(\alpha_N + \beta_N [D]) + (\alpha_D + \beta_D [D]) \exp\left[m_{D-N} \left(\frac{[D] - [D]^{50\%}}{RT}\right)\right]}{1 + \exp\left[m_{D-N} \left(\frac{[D] - [D]^{50\%}}{RT}\right)\right]}$$

α_N Messwert des nativen Proteins bei GdnHCL-Konzentration gleich 0

α_D Messwert des denaturierten Proteins bei GdnHCL-Konzentration gleich 6,1

$\beta_N = \Delta\alpha_N / \Delta[D]$

$\beta_D = \Delta\alpha_D / \Delta[D]$

$[D]$ GdnHCL-Konzentration

$[D]^{50\%}$ GdnHCL-Konzentration am Übergangspunkt, wo 50 % des Proteins entfaltet vorliegen

m_{D-N} Proportionalitätsfaktor

B.2.14 Dynamische Differenzialkalorimetrie (DSC)

Die Aufnahme der Thermogramme der DSC-Messungen erfolgte mit einem VP DSC Mikro-Kalorimeter der Firma Microcal (Northhampton, MA). Das Zellvolumen betrug jeweils 0,52 ml, die Referenzzelle wurde jeweils mit dem entsprechenden Probenpuffer (PBS) befüllt. Vor jeder Messung wurden die Lösungen unter Verwendung der ThermoVav (Microcal, Northhampton, MA) entgast. Durch einen Druckaufbau von 1,8 bar innerhalb der Zellen wurde die Blasenbildung besonders bei höheren Temperaturen reduziert. Die Subtraktion der Basislinie, die Normierung auf die eingesetzte Probenkonzentration sowie die weiteren Auswertungen wurden mit Hilfe der Gerätesoftware Origin 7.0 von Microcal durchgeführt.

Nach dem Befüllen der Zellen wurden die Proben für mindestens 20 min äquilibriert und im Anschluss ein Up- und Down-Scan aufgenommen. Das Gerät wurde bei den Experimenten im High-Gain-Modus betrieben. Die Heizrate betrug $60^{\circ}\text{C h}^{-1}$ bei allen Experimenten. Es wurden ca. 1,5 ml der gereinigten Fab-Fragmente Fab4myc (19,5 μM), Fab4myc-DS-G8_3.1 (25,4 μM), Fab4myc-epC10_2.0 (15,5 μM), Fab4myc-epH8_2.4 (19,5 μM) eingesetzt.

Diese Arbeiten wurden mit der freundlichen Unterstützung von Gerdi Hölzl in der Arbeitsgruppe von Sandro Keller am FMP Berlin durchgeführt.

C ERGEBNISSE

Als Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit dient der Phagemidvektor pDsb/M53T von Matthias Paschke (nicht veröffentlichte Arbeit). Der Vektor stellt ein Derivat des generischen Vektors pASK75 dar, der mit dem TetA Promotor/Operator System eine stringente Expression des gewünschten Proteins erlaubt [93]. Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, eignet sich dieses Promotorsystem auch für den Einsatz im Phagen-Display [94].

Der Vektor pDsb/M53T ist konstruiert für das Phagemidsystem und benötigt für die Produktion rekombinanter Phagen die Infektion mit Helferphagen. Für den Einsatz im Phagen-Display besitzt der Vektor die gekürzte Proteinsequenz von pIII (250 bis 406 AS). Die N-terminale Domäne fehlt, was dazu führt, dass das Fusionsprotein-pIII nicht mehr mit dem F-pili von *E. coli* in Kontakt kommen kann und somit nicht mehr infektiös ist. Deshalb lässt dieses System eine Anwendung von Hyperphagen, die ein vollständiges pIII-Protein voraussetzen, nicht zu. Bestandteile des Vektors sind neben dem *tet*-Promotor/Operator (tet^{op}), ein *tet*-Repressor (*tetR*), der Replikationsursprung *ColE1*, als auch *fl ori*, eine intergenische Region und die Chloramphenicol-Resistenz, der im Gegensatz zur Ampicillin-Resistenz ein geringer Vektorverlust während des Phagen-Displays nachgesagt wird. Sie ist zusätzlich entgegengesetzt inseriert, wodurch ein mögliches Durchlesen der Sequenz nicht zur Expression der inserierten Proteine führt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse zum Teil recht detailliert dargestellt, sofern sie von den allgemeinen Methoden abweichen. Dies liegt in erster Linie daran, dass auch Methoden, insbesondere Fab-Expression, Probenaufbereitung und verwendete Antikörper, während der zurückliegenden 3 ½ Jahre fortan verbessert und an die Bedingungen angepasst wurden.

C.1 Design einer Fab-Expressionskassette mit austauschbaren konstanten Domänen der leichten und schweren Kette

Für den Aufbau einer Fab-Expressionskassette für die Präsentation von Fab-Fragmenten auf der Oberfläche von filamentösen Phagen mussten zunächst die geeigneten Parameter festgelegt werden. Es stellte sich die Frage nach der Art des Promotors, der Verwendung einer mono- oder bicistronischen Expressionskassette und die Wahl des zu fusionierenden Fragments mit dem Oberflächenprotein pIII des Phagen. Mit der Vorgabe des Ausgangsvektors pDsb/M53T war bereits die Verwendung des fest regulierten *tet*-Promotors, als auch die Verwendung eines

verkürzten pIII-Proteins, festgelegt. Darüber hinaus wurde nach der genaueren Untersuchung von Parametern für Phagen-Display-Systeme durch Kirsch [95] entschieden, eine bicistronische Expressionskassette zu verwenden. Die Kassette soll dabei so etabliert werden, dass entgegen der üblichen Phagen-Bibliotheken auf Fab-Basis, das Fragment der leichten Kette mit dem verkürzten Hüllprotein pIII fusioniert wird. Das Fragment der schweren Kette sollte als frei in den periplasmatischen Raum zu sezernierendes Protein kodiert werden. Dadurch werden Varianten des schweren Ketten-Fragments, die verstärkt zur Aggregation neigen, primär vom Screening ausgeschlossen. Sowohl das leichte, als auch schwere Ketten-Fragment sollten zur Unterscheidung mit unterschiedlichen Affinitäts-Tags ausgestattet sein. Hierfür sollte das leichte Kettenfragment mit einem Myc-Tag versehen werden, während das schwere Kettenfragment mit einem His-Tag fusioniert werden sollte. Dieser eignet sich zusätzlich zur Affinitätsreinigung und garantiert den Ausschluss von möglichen leichten Kettendimeren. Für den Aufbau eines *Phagen-Display*-Systems mit modifizierten konstanten Domänen war es außerdem nötig, die Expressionskassette so zu gestalten, dass sowohl die leichte als auch die schwere konstante Domäne leicht ausgetauscht werden können. Da zu Beginn des Projekts keine Angaben zur Expressionsstärke eines rekombinant hergestellten CB4-1 Fab-Fragments gemacht werden konnten, sollten alternativ noch weitere mögliche Ausgangsvarianten erzeugt und hinsichtlich der Expression an löslichen Fab-Fragmenten untersucht werden (siehe folgende Tabelle).

Tab. C-1: Übersicht der zu generierenden Phagemidvektoren mit originalen variablen Domänen des anti-p24 Antikörpers CB4-1.

Fab	Konstante C _{H1} schwere Domäne	Konstante leichte Domäne
Fab1myc	murines IgG2C	murines C _{kappa}
Fab2myc	murines IgG1	murines C _{kappa}
Fab3myc	humanes IgG1	murines C _{kappa}
Fab4myc	humanes IgG1	humanes C _{kappa}
Fab5myc	humanes IgGM	humanes C _{kappa}

Diese Varianten mussten bei der Wahl geeigneter Restriktionsschnittstellen mitbeachtet werden. Anhand der bekannten Nukleotidsequenzen von V_L-CB4-1, V_H-CB4-1, mC_{H1} (IgG2C), mC_{H1} (IgG1), hC_{H1} (IgG1), hC_{H1} (IgM), mC_{Kappa}, hC_{Kappa} und vom Vektorgerüst des pDsbAss-M53T konnten mit Hilfe des frei verfügbaren NEBcutters V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) alle

besetzten Restriktionsschnittstellen ermittelt werden. Anschließend konnte unter Verwendung des online zugängigen Primer-Generators (<http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi>) am C-terminalen Ende der V_H - und V_L -Region des CB4-1 eine EagI- bzw. KpnI-Schnittstelle ohne Veränderung der Aminosäuresequenz erzeugt werden. Während die vorhandene NcoI-Schnittstelle für die konstante schwere Domäne verwendet werden konnte, musste auf die gleiche Art wie oben beschrieben noch eine weitere Schnittstelle innerhalb des Myc-Tags gefunden werden. Hierbei konnte ohne den Austausch einer Aminosäure nur die Restriktionsschnittstelle des *blunt end* schneidenden Enzyms EcoRV generiert werden.

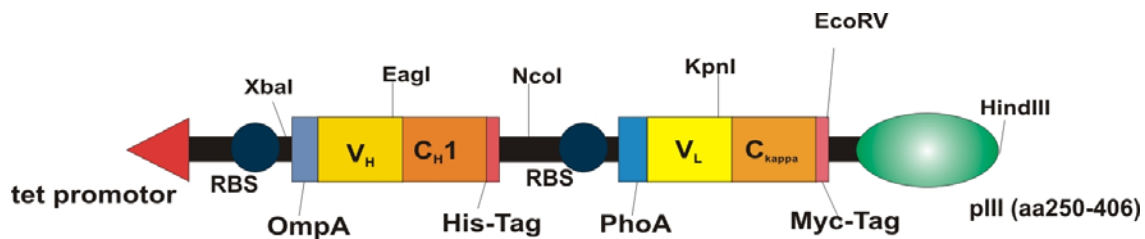


Abb. C-1: Bicistronische Expressionskassette mit austauschbaren konstanten Domänen C_{H1} und C_{κ} des Phagemidvektors pSec-Fab4myc. Die leichte Kette ist fusioniert mit gekürztem pIII Protein des Phagen M13

Die resultierende Expressionskassette ermöglicht den einfachen Austausch von konstanten Domänen der leichten und schweren Kette. Mit Hilfe der neusynthetisierten Restriktionsschnittstellen können die Domänen C_{H1} und C_{κ} über EagI/NcoI bzw. KpnI/EcoRV in einem Schritt ausgetauscht werden.

C.2 Konstruktion von Phagemidvektoren

Für die Optimierung der Expressionshöhe von Fab-Fragmenten war es notwendig, ein Ausgangskonstrukt zu finden, dessen Expressionshöhe wenigstens die Durchführung von biophysikalischen Methoden, wie zum Beispiel Dynamische Differenzialkalorimetrie (DSC), zulässt. Da die rekombinante Expression des Fab-Fragments des α -p24 Antikörpers CB4-1 unbekannt war, sollten verschiedene Fab-Konstrukte auf Basis des CB4-1 (Tab. C-1) konstruiert und in Abhängigkeit ihrer Expression verglichen werden. Die Konstruktion anhand der Fab1myc ist in Abb. C-2 beschrieben. Die Primersequenzen können der Tabelle B-3, Seite 15-16 entnommen werden. Die korrekte Ligation der Phagemidvektoren wurde jeweils durch die Sequenzierung bei Dr. Martin Meixner bestätigt.

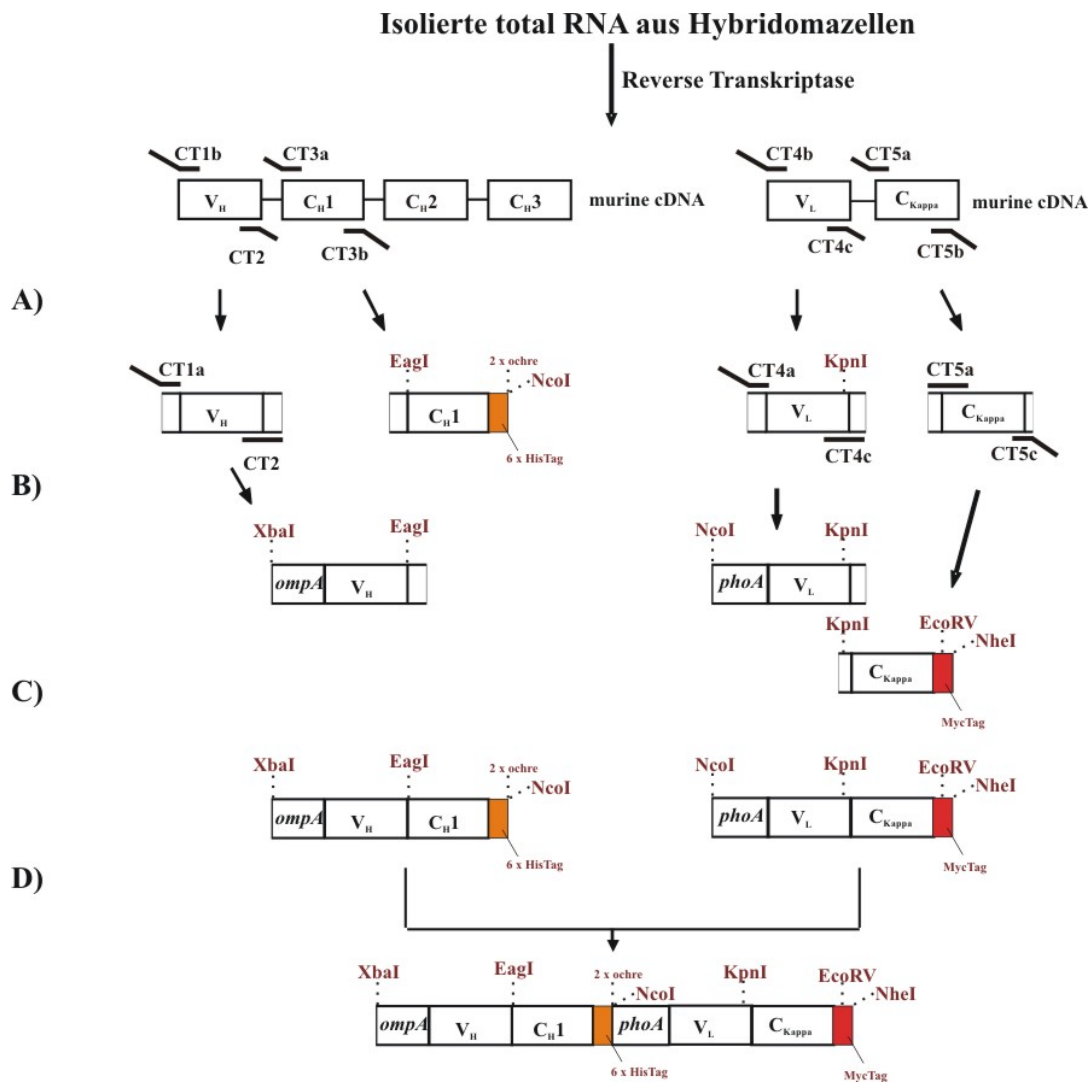


Abb. C-2: Schematische Darstellung der Konstruktion des Fab1myc aus Hybridomazellen. A) PCR mit cDNA-Template zur Amplifikation der variablen und konstanten Domänen des Fab-Fragments CB4-1. B) zweite PCR für die Einführung der Signalsequenzen. C) SOE-PCR, Hybridisierung der variablen und konstanten Domänen zur Generierung der leichten und schweren Kette. D) Ligation der beiden Konstrukte und Bildung der Expressionskassette. Über XbaI und NheI konnte die Expressionskassette in einen Phagemidvektor eingeführt werden.

C.2.1 Amplifikation der originalen Domänen des Fab-Fragments CB4-1 aus Hybridomazellen

Für die Amplifikation der einzelnen Domänen des CB4-1 Fab-Fragments wurde zunächst die Total-RNA aus 1×10^7 Hybridomazellen gewonnen. Anschließend wurde mittels Reverse Transkriptase aus RNA cDNA hergestellt, die zugleich das *Template* für eine PCR-Reaktion darstellt. Unter Standardbedingungen wurden zum PCR-Mix neben der cDNA die Primer CT1b und CT2 für die Amplifikation von V_H-CB4-1 und die Primer CT3a und CT3b für die Amplifikation von C_{H1} mIgG2C hinzugegeben. Analog dazu konnten die Domänen der leichten Kette mit Primer CT4b und CT4c (V_L-CB4-1) und die Primer CT5a und CT5b (mC_{kappa}) erzeugt werden (Abb. C-2 A).

C.2.2 PCR zur Erzeugung von Sec-Signalsequenzen und MycTag

Die PCR-Produkte von V_H und V_L des CB4-1 dienen nach einer Gelreinigung als *Template* für eine zweite PCR mit CT1a/CT2 (Tab. B-3) für OmpA- V_H und CT4a/CT4c für PhoA- V_L , um die Sec-Signalsequenzen OmpA für V_H und PhoA für V_L am N-terminalen Ende der variablen Domänen zu generieren. Zusätzlich musste ein vollständiger MycTag am C-terminalen Ende der mC_{kappa} -Kette erzeugt werden. Dabei diente auch das erste PCR-Produkt als *Template* für eine zweite PCR-Reaktion mit CT5a und CT5c (Abb. C-2 B).

C.2.3 SOE-PCR für die Generierung einer schweren und leichten Kette des CB4-1 Fab-Konstruktes

Für die Synthese der schweren Kette wurden die gelgereinigten PCR-Produkte von OmpA- V_H und mC_{H1} -6xHisTag im gleichen Verhältnis zum PCR-Mix ohne Primer gegeben und die SOE-PCR durchgeführt. Anschließend wurde das Hybridisierungsprodukt gereinigt und für dessen Amplifikation eine Standard-PCR mit den Primern CT1a und CT3b (Tab. B-3) gestartet. Die Synthese der leichten Kette verlief analog. Zum PCR-Mix ohne Primer wurden die gelgereinigten Produkte von PhoA- V_L und mC_{kappa} -MycTag im gleichen Verhältnis zugegeben und die SOE-PCR durchgeführt. Das Hybridisierungsprodukt wurde gereinigt und als *Template* für dessen Amplifikation mit den Primern CT4a und CT5c eingesetzt (Abb. C-2 C).

C.2.4 Konstruktion des Phagemidvektors pSec-Fab1myc mit originalen, murinen Ketten des Antikörpers CB4-1

Dem Ausgangsvektor wurde durch einen Restriktionsverdau mit XbaI und NheI die komplette Expressionskassette des GFP-M53T und dessen RBS-Signalsequenz Dsb/Ass entnommen. Gleichzeitig wurde die schwere Kette mit XbaI/NcoI verdaut, während die leichte Kette mit NcoI/NheI verdaut wurde. Nachdem die Produkte gelgereinigt wurden, konnte durch eine Dreifragment-Ligation der neue Phagemidvektor pSec-Fab1myc entstehen, der die originalen murinen Fab-Domänen des α -p24-Antikörpers CB4-1 enthält. Der neu erzeugte Phagemidvektor enthält das murine Fab-Konstrukt des Antikörpers CB4-1 mit austauschbaren konstanten Domänen. Die schwere konstante Domäne konnte dadurch leicht über die Restriktionsschnittstellen EagI und NcoI ausgetauscht werden. Die leichte konstante Domäne dementsprechend über KpnI und EcoRV.

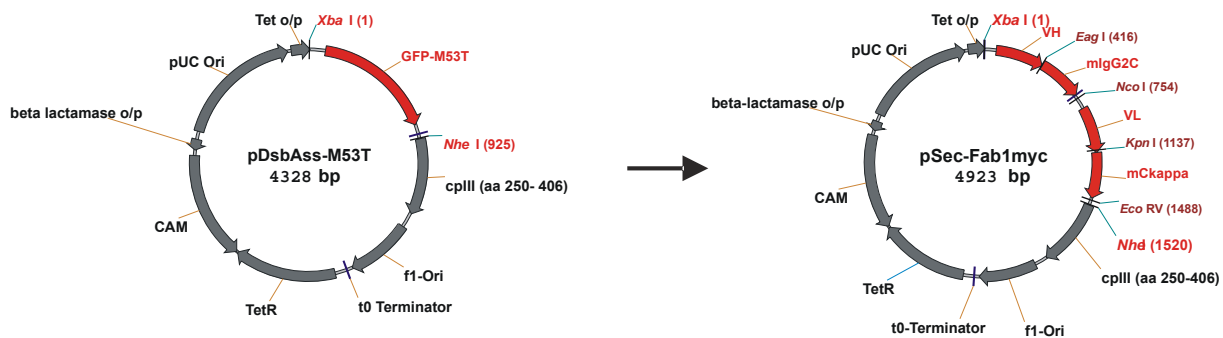


Abb. C-3: Klonierung des Phagemidvektors pSec-Fab1myc. Der rot markierte Vektorabschnitt stellt die ausgetauschten Bereiche dar. Durch XbaI/NheI-Verdau wurde die GFP-Kassette entnommen und an dessen Stelle die Fab-Expressionskassette eingesetzt.

C.2.5 Konstruktion des pSec-Fab2myc Vektors

Die murine C_H1 Domäne der Immunglobulinklasse 1 wurde mit den Primern CT3a und CT3b (Tab. B-3) aus dem Vektor pASK85_M41 durch eine Standard-PCR amplifiziert und anschließend im PCR-Mix mit EagI/NcoI verdaut. Gleichzeitig wurde auch das Phagemid pSec-Fab1myc aus C.2.4 mit EagI/NcoI verdaut und anschließend Phosphatase-behandelt. Mittels Ligation konnte aus dem Vektorgerüst des pSec-Fab1myc und dem geschnittenen PCR-Produkt der Vektor pSec-Fab2myc gewonnen werden.

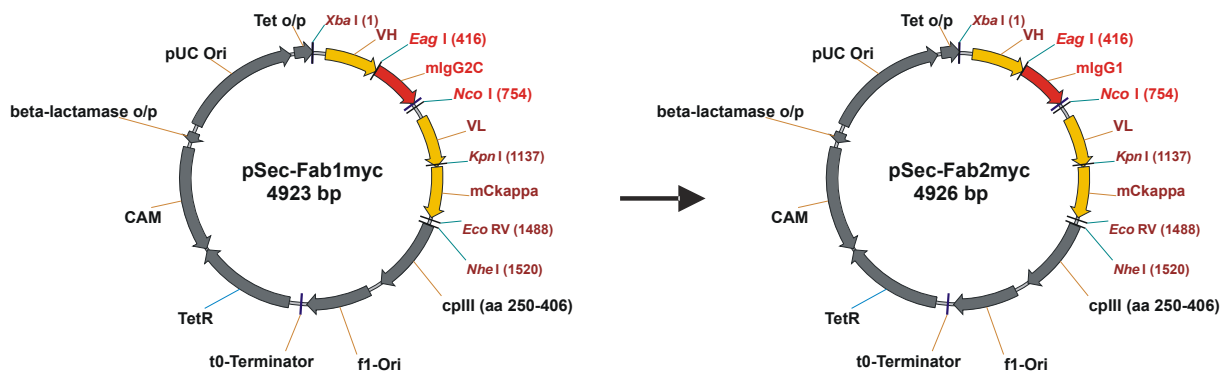


Abb. C-4: Konstruktion des pSec-Fab2myc. Durch den Austausch der rot markierten murinen schweren konstanten Domänen mIgG2C → mIgG1 wird aus pSec-Fab1myc der Phagemidvektor pSec-Fab2myc. Gelb markierter Vektorabschnitt kennzeichnet die Fab-Expressionskassette.

C.2.6 Konstruktion des pSec-Fab3myc Vektors

Neben den vollständigen murinen Fab-Konstrukten des CB4-1 der Vektoren pSec-Fab1myc und pSec-Fab2myc sollten auch Fragmente mit humanen konstanten Domänen generiert werden. Dafür wurde die humane C_H1-Domäne aus dem Vektor pASK88-M44 (durch Skerra, TU München zur Verfügung gestellt) mit den Primern CT8 und CT6b (Tab. B-3) in einer Standard-PCR amplifiziert und mit EagI/NcoI im PCR-Mix verdaut. Als Vektorgerüst konnte das

verdaut und mit Phosphatase-behandelte Konstrukt aus C.2.5 verwendet werden. Durch Ligation der gelgereinigten Konstrukte wurde der Vektor pSec-Fab3myc erzeugt.

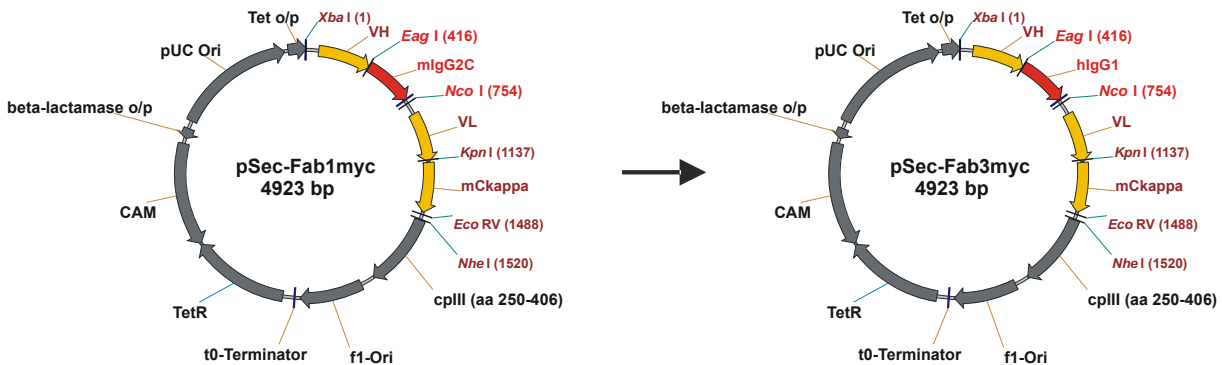


Abb. C-5: Konstruktion des pSec-Fab3myc. Durch den Austausch der rot markierten schweren konstanten Domänen murine IgG2C → human IgG1 wird aus pSec-Fab1myc der Phagemidvektor pSec-Fab3myc mit chimärem Fab-Konstrukt. Gelb markierter Vektorabschnitt kennzeichnet die Fab-Expressionskassette.

C.2.7 Konstruktion des pSec-Fab4myc Vektors

Der Vektor pSec-Fab3myc enthält bereits eine humane konstante Domäne. Für den Einbau der leichten humanen Domäne wurde dieser Vektor mit KpnI/EcoRV verdaut, gereinigt und Phosphatase-behandelt. Die humane C_{kappa}-Domäne konnte durch eine Standard-PCR mit den Primern CT7a und CT7b (Tab. B-3) amplifiziert und anschließend mit KpnI/EcoRV verdaut werden. Als *Template* diente der Vektor pASK88-M44 von Skerra. Durch Ligation des Vektorgerüsts mit dem PCR-Produkt entstand der Vektor pSec-Fab4myc.

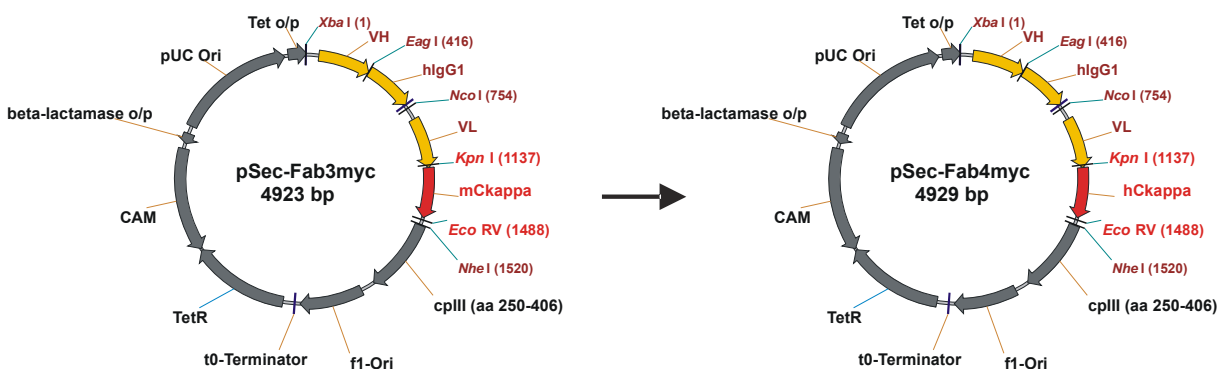


Abb. C-6: Konstruktion des pSec-Fab4myc. Durch den Austausch der rot markierten schweren konstanten Domänen murin C_{Kappa} → humanC_{Kappa} wird aus pSec-Fab3myc der Phagemidvektor pSec-Fab4myc mit chimärem Fab-Konstrukt. Gelb markierter Vektorabschnitt kennzeichnet die Fab-Expressionskassette.

C.2.8 Konstruktion des Vektors pSec-Fab5myc

Neben der humanen schweren C_H1 Domäne der Klasse IgG1 sollte auch die C_H1 Domäne eines IgM Antikörpers getestet werden. Hierfür musste Total-RNA aus der Hybridomazelllinie CB0-3 generiert werden und anschließend durch Reverse-Transkriptase-Reaktion cDNA gewonnen werden. Mit cDNA als *Template* konnte in einem ersten PCR-Schritt mit den Primern CT9a und CT9b (Tab. B-3) die C_H1 Domäne amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und diente als *Template* für eine weitere PCR für die Synthese des C-terminalen 6xHisTag mit NcoI-Schnittstelle. Unter Verwendung der Primer CT9a und CT6b konnte das korrekte Produkt amplifiziert und sofort mit EagI/NcoI verdaut werden. Zeitgleich wurde der Vektor pSec-Fab3myc mit EagI/NcoI verdaut. Durch Ligation des Vektorgerüsts mit dem PCR-Produkt wurde der Vektor pSec-Fab5myc erzeugt.

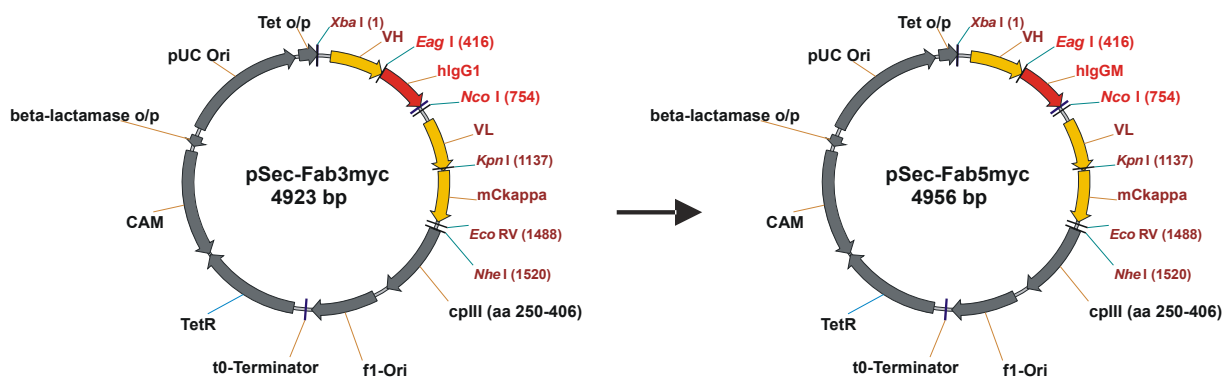


Abb. C-7: Konstruktion des pSec-Fab5myc. Durch den Austausch der rot markierten schweren konstanten Domänen human IgG1 → human IgGM wird aus pSec-Fab3myc der Phagemidvektor pSec-Fab5myc mit chimärem Fab-Konstrukt. Gelb markierter Vektorabschnitt kennzeichnet die Fab-Expressionskassette.

C.2.9 Expression von GFP-M53T

Für den Nachweis von löslich exprimierten Fab-Fragmenten über ELISA, als auch für das *Panning* von Phagenbibliotheken wurde GFP-M53T benutzt. Das modifizierte GFP-Molekül trägt als zusätzlichen Loop das Antigenpeptid (GATPQDLNTML) des Antikörpers CB4-1 und konnte deshalb für die Beschichtung von Mikrotiterplatten und Vertiefungen genutzt werden. Für die Expression wurde das Plasmid pET9 von Matthias Paschke zur Verfügung gestellt. Die GFP-Mutante wurde entsprechend der Vorschrift exprimiert und gereinigt. In der Vorkultur diente zusätzliche Glucose (1 %) der Unterdrückung der Hintergrundexpression des Lac-Promotors.

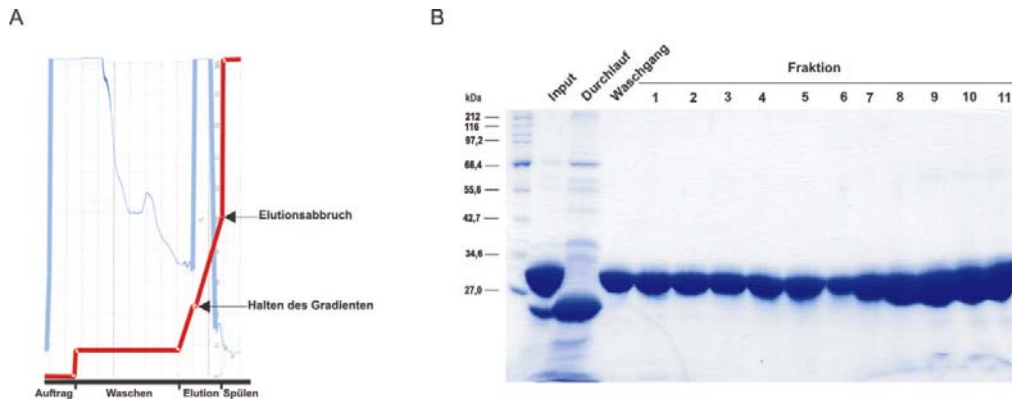


Abb. C-8: Reinigung von GFP-M53T. (A) Elutionschromatogramm von GFP-M53T und Coomassie gefärbtes Gel der ersten 11 eluierten Fraktionen. Pro Fraktion wurden 1-2 μ l aufgetragen.

Wie in Abb. C-8 gezeigt, konnte GFP-M53T mit einer hohen Reinheit von der Säule eluiert werden. Des Weiteren konnten Abbruch-Fragmente, die bei der Expression oder beim Aufschluss entstanden sind, gut abgetrennt werden und erscheinen deshalb als dicke Bande im Durchlauf. Da die 5 ml HisTrap-Säule ihre Kapazitätsgrenze (nur optisch überprüft) erreicht hatte, wurden erste GFP-M53T Moleküle bereits beim Waschgang eluiert. Trotzdem konnte eine sehr hohe Ausbeute an sauberem GFP-M53T gewonnen werden. Das Eluat wurde im Trispuffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert und ist selbst bei 4°C über mehrere Jahre haltbar.

C.2.10 Bestimmung der optimalen Expressionstemperatur

Aufgrund von Literaturrecherchen war bekannt, dass Ausbeuten von Fab-Konstrukten häufig sehr gering ausfallen und neben der Aminosäurezusammensetzung auch von der Expressionstemperatur abhängig sind. Daher wurden verschiedene Expressionstemperaturen (37°C, 30°C, 22°C und 18°C) gewählt und die Ausbeute an löslichen Fab1myc (siehe C.2.4) durch ELISA überprüft. Der Nachweis basierte auf der Detektion der leichten konstanten Domäne C_L mit α mC_{kappa}-HRP-Antikörper. Da im ELISA nur funktionelle Fab-Konstrukte nachgewiesen werden, ist die Detektion von leichten Kettendimeren unwahrscheinlich. Zur Kontrolle wurden die schweren Ketten V_H - C_{H1} zusätzlich im Western-Blot mit dem α -His-Tag-HRP (Sigma) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Eine 30 ml Hauptkultur wurde mit 300 μ l einer Übernachtskultur angeimpft und bis $OD_{600} = 0,4$ bei 30°C und 180 rpm geschüttelt. Bei einer $OD_{600} = 0,5$ wurde die Fab-Expression durch die Zugabe von Anhydrotetrazyklin (aTc) induziert. Nach fünf Stunden Expression bei 18°C und

180 rpm wurden Zellen geerntet, das Pellet in 1:100 Periplasmapuffer aufgenommen und im ELISA auf den Anteil an funktionellem Protein überprüft.

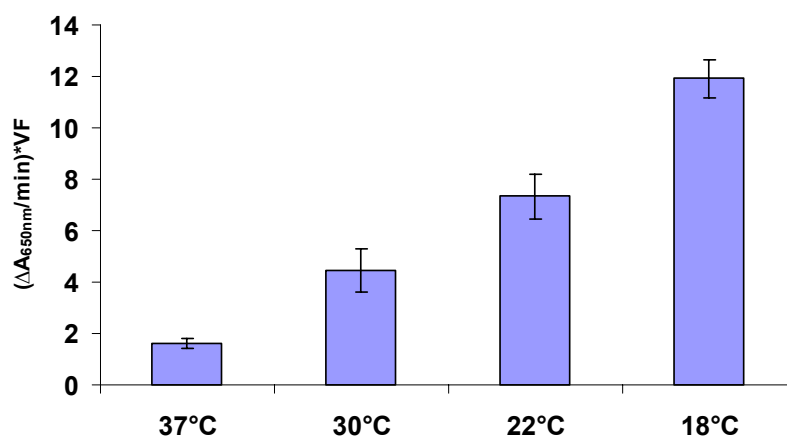


Abb. C-9: Temperaturscreen der Fab-Expression. ELISA zum Nachweis funktioneller Fab-Konstrukte des Fab1myc. Periplasma wurde mit Verdünnungsreihe aufgetragen und mit α -mC_{kappa}-HRP-Antikörper und TMB (SeramunBlau®fast) nachgewiesen.

Der Versuch zeigt eine deutlich bessere Fab-Expression bei geringeren Temperaturen. Als die beste Expressionstemperatur stellte sich 18°C heraus und wurde als Standard für alle weiteren Expressionen festgelegt.

C.2.11 Vergleichende Expressionsanalyse der erzeugten Fab-Konstrukte

Für eine vergleichende Expression der fünf Fab-Konstrukte wurde *E. coli*-Stamm JM83 gewählt. Übernachtskulturen dienten der Inokulation einer 30 ml Hauptkultur. Mit Erreichen der $OD_{600} = 0,5$ wurde die Proteinexpression mit Anhydrotetrazyklin induziert und die Expressionstemperatur auf 18°C reduziert. Insgesamt wurde über 5 h bei 180 rpm geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation wurden die Zellpellets in 300 μ l Periplasmapuffer (1:100) resuspendiert und für 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Der Nachweis einer Fab-Expression wurde durch Western-Blot und ELISA überprüft. Für ein ELISA wurden Mikrotiterplatten mit 100 μ g/ml GFP-M53T (Siehe Abschnitt C.2.9) beschichtet. Zur Kontrolle wurden alle Proben noch einmal auf unbeschichtete Vertiefungen gegeben. Insgesamt wurden vier Expressionen pro Konstrukt durchgeführt.

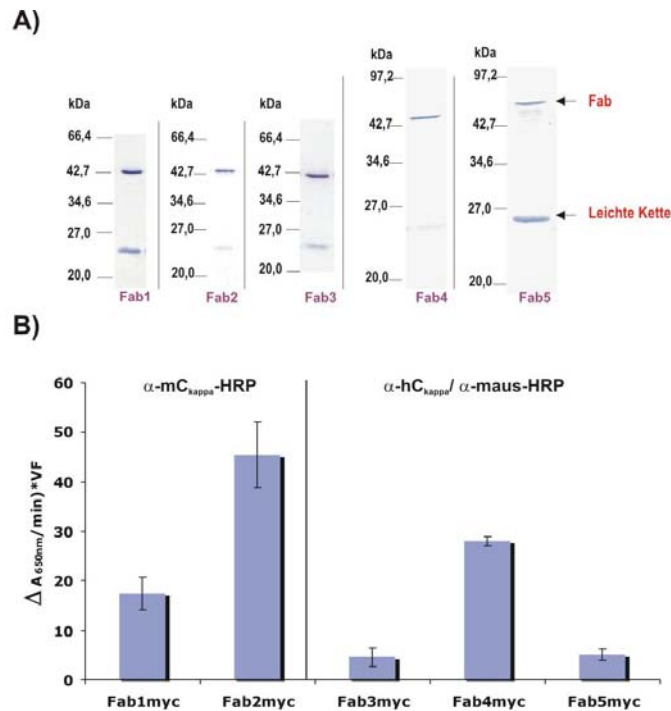


Abb. C-10: Expressionsanalyse von löslich exprimierten Fab-Fragmenten. A) Western-Blot der fünf Fab-Konstrukte. Es wurden jeweils 8 μ l Periplasmafraktion aufgetragen und mit α -mC_{kappa}-HRP-Antikörper (Fab1myc und Fab2myc) beziehungsweise α -hC_{kappa}-Antikörper/ α -Maus-IgG1-HRP-Antikörper. B) ELISA einer Verdünnungsreihe von Periplasmafraktionen. Nachweis erfolgte mit den gleichen Antikörpern wie unter A), Substrat: TMB (SeramunBlau[®]fast).

Die Auswertung der ELISA Ergebnisse ließ darauf schließen, dass Fab-Konstrukte mit konstanten Domänen der Klasse IgG1 die stärkste Expression löslicher Antikörperfragmente zeigen. Dies gilt sowohl für das murine (Fab2myc) als auch für das humane Konstrukt (Fab4myc). Aufgrund der unterschiedlichen Nachweisantikörper beider Konstrukte konnten sie nicht direkt miteinander verglichen werden. Die Ausbeuten präparativer Expressionen zeigten aber keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Wahl eines Referenz-Fab-Konstruktes für die Optimierung von konstanten Domänen.

Anhand der Expressionsanalysen der fünf Fab-Konstrukte musste ein Fab-Konstrukt gewählt werden, dass die Durchführung biophysikalischer Messungen wie DSC und die chemische Denaturierung mittels GdnHCL zulässt. Wie in Abb. C-10 gezeigt, haben Fab2myc und Fab4myc den höchsten Anteil an löslichen Fab im Periplasma. Zusätzlich konnte Fab4myc mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 85 μ g/l bei präparativen Expressionen die höchste Ausbeute generieren. Des Weiteren war die Optimierung von humanen konstanten Domänen hinsichtlich diagnostischer und therapeutischer Anwendungen interessanter. Das chimäre Konstrukt Fab4myc mit murinen variablen Domänen des α -p24-Antikörpers CB4-1 und humaner konstanter Domänen der Subklasse IgG1 und C_{kappa} wurde als Basis für die nachfolgende Optimierung verwendet.

C.3 Vergleich des Sec- und SRP-Transports

Die Expression von periplasmatischen Fab-Fragmenten ist ein multifaktorielles Problem aus cytoplasmatischer Expression, Periplasmatransport, Faltung, Toxizität und korrekter Ausbildung des Heterodimers. Daraus resultieren oftmals geringe Ausbeuten an löslichem Protein und damit verbunden auch eine geringere Displayrate bei der Anwendung des Phagen-Display-Systems. Literaturhinweise deuten darauf hin, dass der kotranslationale Transport über SRP (single-recognition particle) die Displayrate wie im Falle von DARPins (designed ankyrin-repeat proteins) erhöhen [96]. Deshalb wurde ein Konstrukt des chimären Fab4myc mit SRP Signalsequenz DsbAss für die schwere, als auch für die leichte Kette gebaut und auf deren Expression hin untersucht.

C.3.1 Konstruktion des Phagemidvektors mit Fab4myc und SRP-Signalsequenz DsbAss

Da die Signalsequenz DsbAss mit 19 Aminosäuren bzw. 57 Nucleotiden für eine Primersynthese zu groß ist, wurde entschieden, zwei überlappende PCR-Produkte zu amplifizieren und mittels SOE-PCR zu fusionieren.

C.3.2 Konstruktion der schweren Kette mit DsbAss-Signalsequenz

Im ersten Schritt wurde die SRP-Signalsequenz aus dem Vektor pDsbAss/M53T mittels PCR und den Primern CT10a und CT10b (Tab. B-3) amplifiziert. In einer zweiten PCR wurde die schwere variable Region des pSec-Fab4myc mit den Primern CT10c und CT10d amplifiziert. Die Primer CT10b und CT10c sind komplementär zueinander und garantieren so die Hybridisierung beider PCR-Produkte während der SOE-PCR. Sie binden direkt in der Übergangsregion von DsbAss und V_H -CB4-1.

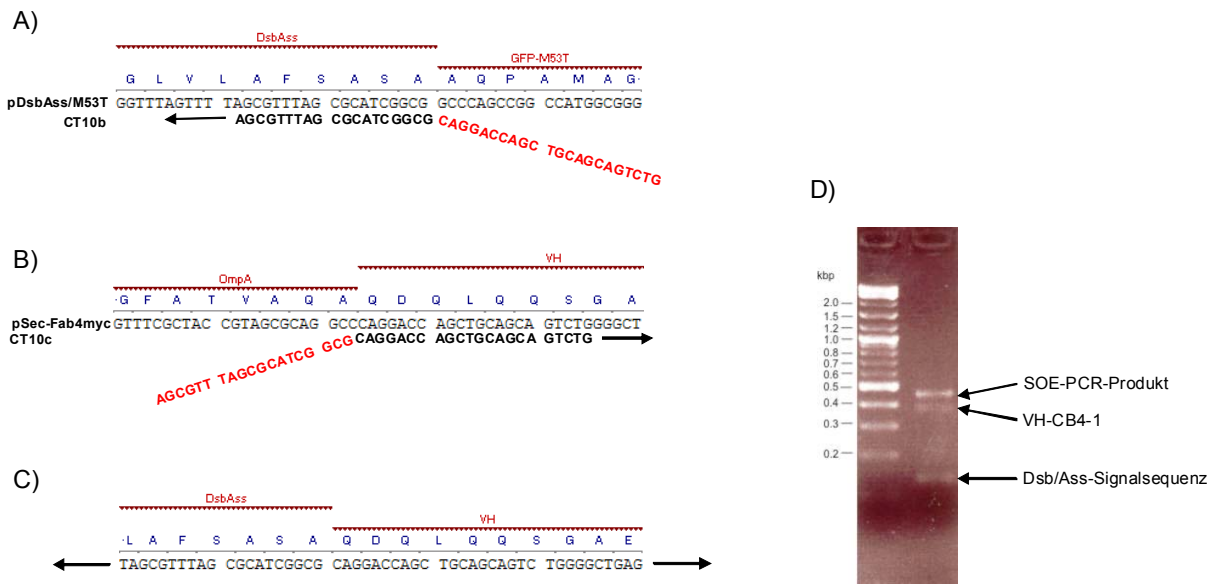


Abb. C-11: Modelldarstellung der SOE-PCR. A) 1. PCR: Bindung des reverse Primers CT10b an das *Template* pDsb/M53T zur Amplifikation von der SRP-Signalsequenz DsbAss. Für eine bessere Illustration wurde der Primer komplementär dargestellt. B) 2. PCR: Bindung des *forward* Primers CT10c (komplementär zu CT10b) an das *Template* pSecFab4myc und Amplifikation von V_H des Antikörpers CB4-1. C) Darstellung des SOE-PCR-Produktes der amplifizierten PCR-Produkte aus A) und B). D) 2 % Gel der PCR-Produkte. Dsb/Ass-Signalsequenz entspricht dem PCR-Produkt von A), V_H-CB4-1 dem PCR-Produkt von B) und SOE-PCR-Produkt zeigt die erfolgreiche Hybridisierung der einzelnen PCR-Produkte von A) und B).

Das korrekte Produkt der SOE-PCR wurde nach einer Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und zur Amplifikation noch einmal als *Template* für eine abschließende PCR mit den beiden äußeren Primern CT10a und CT10d eingesetzt. Das Amplifikationsprodukt wurde im PCR-Mix mit XbaI und EagI verdaut und gereinigt. Parallel dazu wurde auch der Vektor pSec-Fab4myc mit XbaI und EagI verdaut und gereinigt. In der Ligation wurden Vektor- und Insertmoleküle im Verhältnis 3:1 eingesetzt.

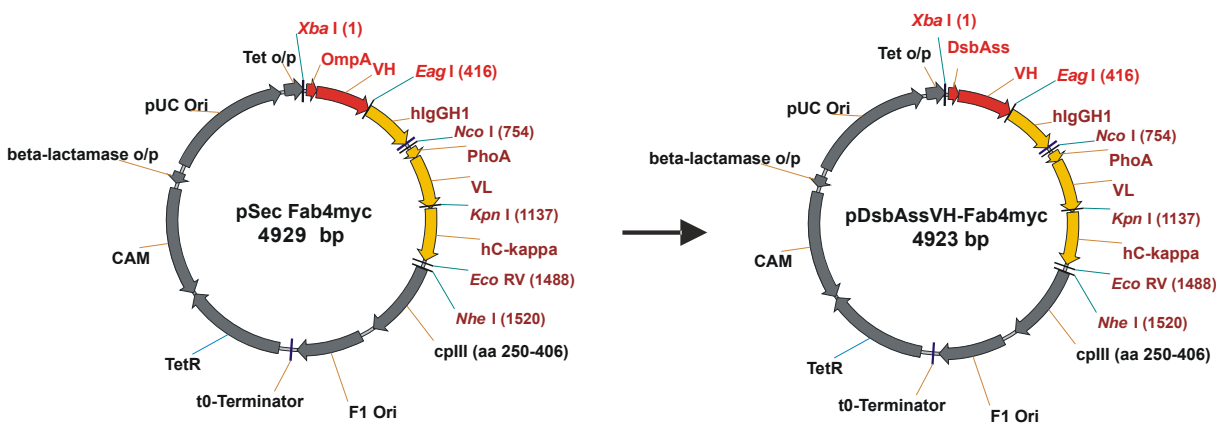


Abb. C-12: Konstruktion des Phagemidvektors pDsbAssV_H-Fab4myc. Durch den Austausch der rot markierten Vektorabschnitte wurde OmpA-V_H durch DsbAss-V_H ersetzt. Gelb markierter Vektorabschnitt kennzeichnet die Fab-Expressionskassette.

C.3.3 Konstruktion der leichten Kette mit DsbAss-Signalsequenz

Bei der Konstruktion der leichten Kette wurde analog zur schweren Kette verfahren. In einer ersten PCR mit pDsbAss/M53T als *Template* und den Primern CT11a und CT11b (Tab. B-3) wurde die Signalsequenz amplifiziert. In der zweiten PCR mit pSec-Fab4myc als *Template* und den Primern CT11c und pd4 (Tab. B-9) wurde die komplette leichte Kette amplifiziert. CT11b und CT11c sind komplementär zueinander und garantierten die Synthese eines Hybridisierungsprodukts während der SOE-PCR aus beiden PCR-Produkten. Das Hybridisierungsprodukt wurde gereinigt und noch einmal in einem letzten PCR-Schritt mit den Primern CT11a und pd4 amplifiziert, mit NcoI/EcoRV geschnitten und gereinigt. Parallel wurde der entstandene Vektor aus Abschnitt C.3.2 mit NcoI/EcoRV geschnitten und gereinigt. Durch Ligation des Vektorkonstruktes mit dem Insert wurde der Phagemidvektor erzeugt, der einen Transport des CB4-1 Fabkonstruktes via SRP zulässt.

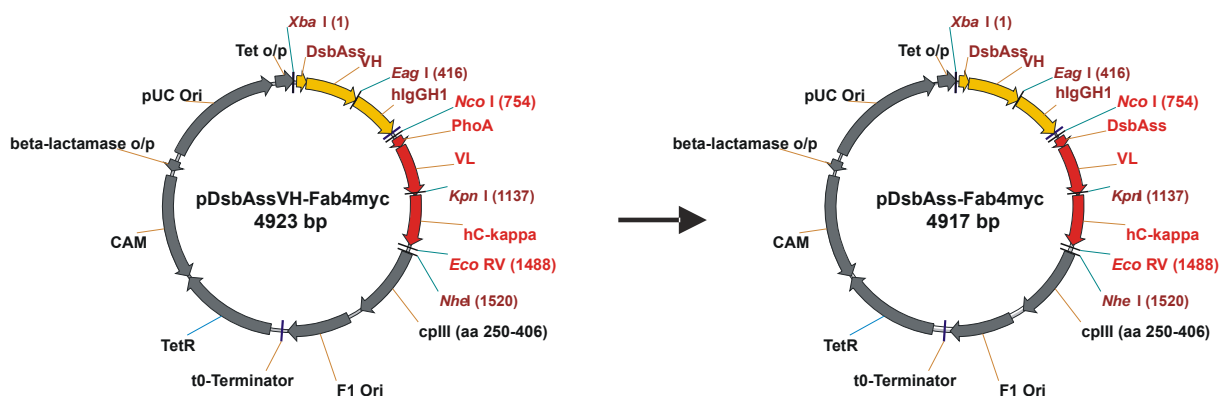


Abb. C-13: Konstruktion des Phagemidvektors pDsb-Fab4myc. Durch den Austausch der rot markierten Vektorabschnitte, wurde komplette leichte Kette PhoA-LC durch DsbAss-LC ersetzt. Gelb markierter Vektorabschnitt kennzeichnet die Fab-Expressionskassette.

C.3.4 Expression von Fab4myc mit Sec- und SRP-Signalsequenz in *E. coli* JM83

Die Fab-Expression über den Sec- und SRP-Transportweg wurde in einer 30 ml Kultur für 20 h bei 18°C durchgeführt. Durch Zentrifugation wurden die Zellen gerntet und in 500 µl Periplasmapuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Periplasmafraktion diente sowohl Western-Blot als auch ELISA-Analysen.

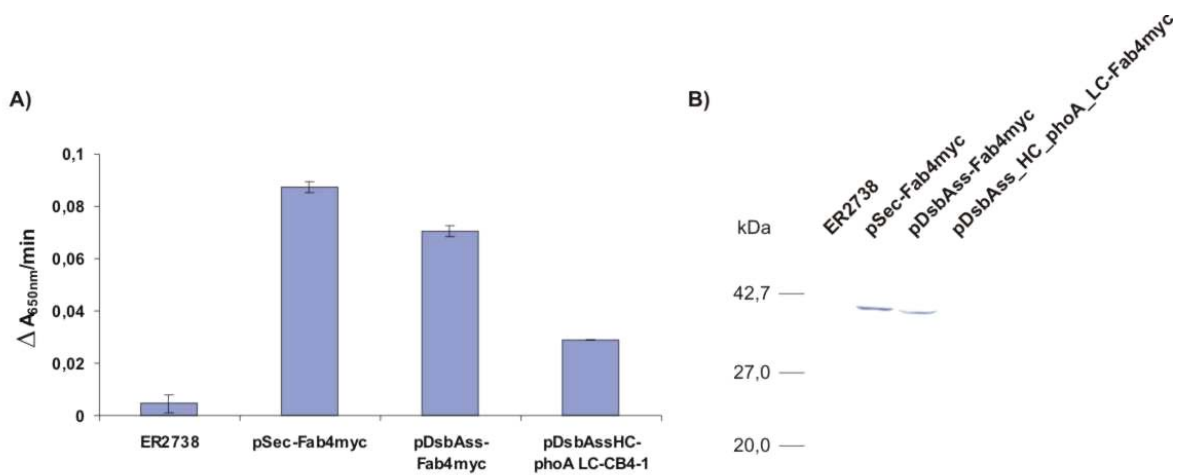


Abb. C-14: Vergleich löslicher Fab-Expression via Sec- und SRP-Transportweg. A) ELISA von löslichen Fab-Fragmenten. Vertiefungen wurden mit 10 µg/ml GFP24 beschichtet und mit 40 µl Periplasmaprobe inkubiert. Nachweis erfolgte über α -hC_{kappa}-Antikörper-HRP und TMB (SeramunBlau®fast). B) Western-Blot von Periplasmaproben. Jeweils 15 µl wurden aufgetragen und mit α -His-HRP nachgewiesen, Substrat TMB (SeramunBlau®prec).

Nach diesen Ergebnissen konnte keine verbesserte Fab-Expression durch Verwendung des SRP-Signalwegs ausgemacht werden. Zusätzlich wurden Phagen der einzelnen Konstrukte generiert und im Phagen-ELISA überprüft (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis war identisch mit dem der löslichen Fab-Expression. Alle weiteren Arbeiten basieren deshalb auf dem herkömmlichen Sec-Transportweg.

C.4 Expression von separierten Einzelketten des Fab4myc

C.4.1 Konstruktion von Plasmidvektoren für die Expression von Einzelketten

Neben der Expression von vollständigen Fab-Fragmenten sollte in einem weiteren Versuch gezeigt werden, inwieweit *E.coli* die Expression der Einzelketten zulässt. Für diesen Versuch wurden drei Expressionsvektoren auf Basis des pSec-Fab4myc konstruiert, die keine C-terminale Domäne des pIII Proteins mehr enthalten. Des Weiteren sollten alle exprimierten Proteine über einen 6xHisTag nachweisbar sein.

C.4.1.1 Konstruktion eines Expressionsvektors der schweren Ketten mit OmpA Signalsequenz

Mit einer Standard-PCR wurde die schwere Kette aus dem Vektor pSec-Fab4myc mit den Primern CT12a und CT12b (Tab. B-3) amplifiziert. Mit dem Primer CT12b wurde dabei die neue Restriktionsschnittstelle für HindIII eingeführt. Für die Klonierung wurden der Vektor und das PCR-Produkt mit XbaI und HindIII geschnitten, gereinigt und im Verhältnis 3:1 Insert/Vektor ligiert.

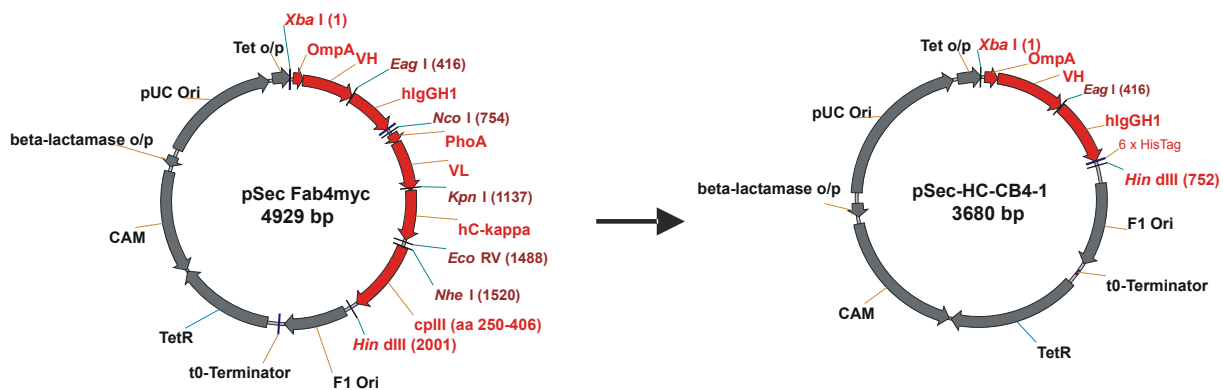


Abb. C-15: Konstruktion des pSec-HC-CB4-1. Rot markierter Vektorbereich wurde durch XbaI/HindIII-Verdau ausgetauscht. Der neue Vektor enthält nur noch die schwere Kette des Fab-Konstruktes mit OmpA Signalsequenz.

C.4.1.2 Konstruktion eines Expressionsvektors der leichten Kette mit PhoA Signalsequenz

Die leichte Kette des CB4-1 mit PhoA-Signalsequenz wurde aus dem Vektor pSec-Fab4myc mittels PCR und den Primern CT13a und CT13b (Tab. B-3) amplifiziert, mit XbaI und HindIII geschnitten und mit dem Vektorgerüst aus C.4.1.1 ligiert.

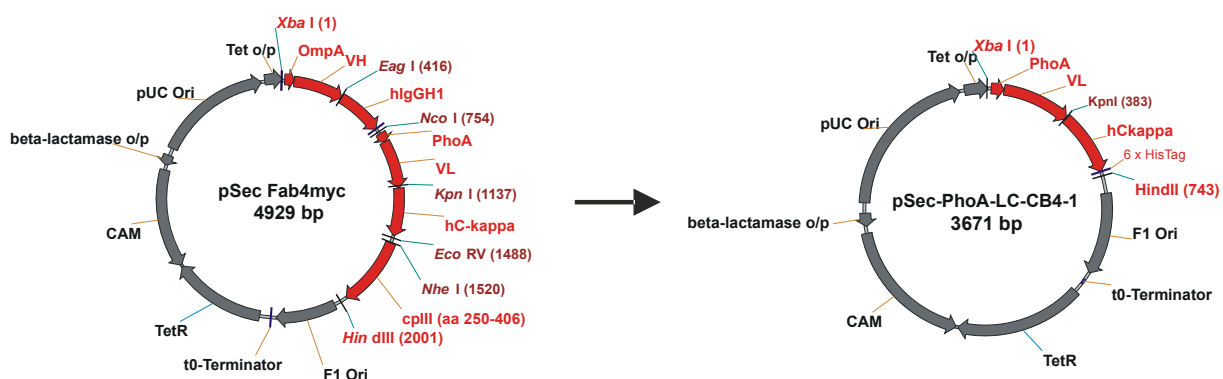


Abb. C-16: Konstruktion des pSec-PhoA-LC-CB4-1. Rot markierter Vektorbereich wurde durch XbaI/HindIII-Verdau ausgetauscht. Der neue Vektor enthält nur noch die leichte Kette des Fab-Konstruktes mit PhoA-Signalsequenz.

C.4.1.3 Konstruktion eines Expressionsvektors der leichten Kette mit OmpA Signalsequenz

Die Konstruktion der leichten Kette mit der OmpA-Signalsequenz verlief analog wie in C.3.2 beschrieben. In einer ersten PCR mit pSec-Fab4myc und den Primern CT12a und CT14a (Tab. B-3) wird die OmpA-Signalsequenz amplifiziert. In der zweiten PCR wurde aus dem Vektor pSec-Fab4myc die leichte Kette V_L -C_{kappa} mit CT14b und CT13b amplifiziert. CT14a und CT14b sind komplementär zueinander und ermöglichen dadurch die Fusion beider PCR-

Produkte durch eine zusätzliche SOE-PCR. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einer letzten PCR mit den äußeren Primern CT12a und CT13b weiter angereichert, geschnitten und in das vorbereitete Vektorkonstrukt aus C.4.1.1 mittels Ligation eingeführt.

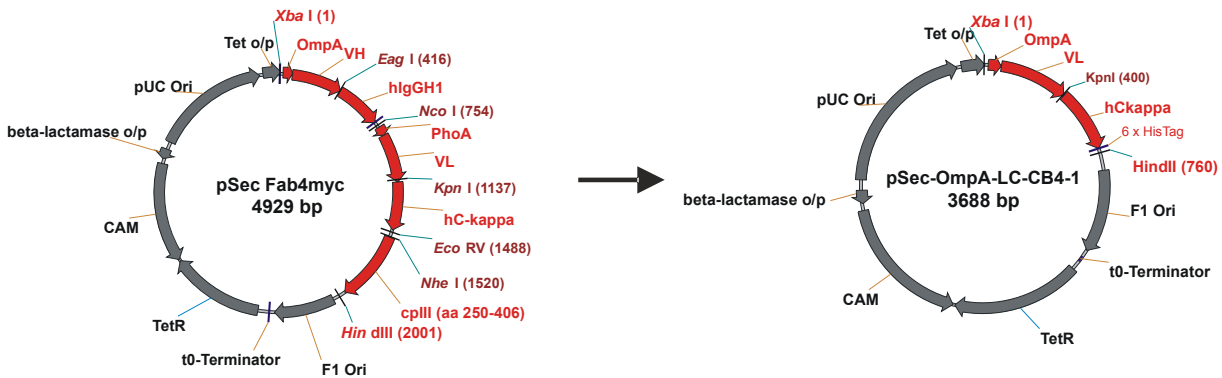


Abb. C-17: Konstruktion des pSec-OmpA-LC-CB4-1. Rot markierter Vektorbereich wurde durch XbaI/HindIII-Verdau ausgetauscht. Der neue Vektor enthält nur noch die leichte Kette des Fab-Konstruktes mit OmpA-Signalsequenz.

C.4.2 Expressionsanalyse der schweren und leichten Kette des Fab4myc

Für den Nachweis der separaten Expression der leichten und schweren Kette wurden JM83-Zellen mit den erzeugten Expressionsvektoren pSec-OmpA-HC-CB4-1, pSec-PhoA-CB4-1 und pSec-OmpA-CB4-1 transformiert und auf LB-Cm-Platten ausplattiert. Die Induktion einer 30 ml Hauptkultur erfolgte mit aTc (0,2 µg/ml Endkonzentration) bei einer OD₆₀₀ = 0,5 für 24 h bei 18°C. Nach OD₆₀₀-Abgleich wurden maximal 25 ml Kultur zentrifugiert und das Pellet in 450 µl Periplasmapuffer resuspendiert.

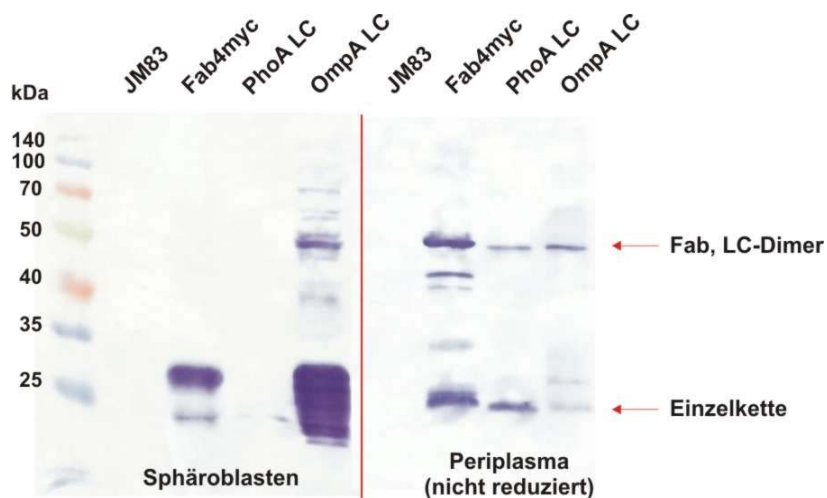


Abb. C-18: Western-Blot von Einzelketten-Expression.

Es dienten 25 µl der Periplasmafraktion der Isolierung von Sphäroblasten, die nach Zentrifugation in 25 µl reduzierenden Probenpuffer aufgenommen wurden. Mittels 12 % SDS-PAGE und Western-Blot wurde die Proteinexpression in den Sphäroblasten und im Periplasma nachgewiesen. Dieser Versuch zeigte, dass die schwere Kette V_H-C_{H1} des CB4-1 allein nicht exprimierbar ist. Die Zellen stellten dagegen nach Induktion der Proteinexpression sofort das Zellwachstum ein und begannen zu lysieren. Wird neben der schweren Kette auch die leichte Kette mit exprimiert, wie beim Fab4myc, so ist die Expression funktioneller Fab-Fragmente möglich. Das schwere Ketten-Fragment wird demnach durch die Ausbildung funktioneller Heterodimere stabilisiert. Dagegen ist, wenn auch nicht besonders stark ausgeprägt, die Expression der leichten Ketten allein auch möglich. Wie in Abb. C-18 zu sehen, werden dabei leichte Ketten-Dimere, sogenannte *Bence-Jones* Proteine, ausgebildet. Während sich beim Periplasma-Blot (rechts) keine wesentlichen Unterschiede der beiden verwendeten Signalsequenzen zeigten, so ist der Nachweis der leichten Ketten in den Sphäroblasten grundverschieden. Danach zeigt sich bei der Expression von leichten Ketten-Fragmenten mit OmpA eine starke Bande im Bereich von 25 kDa, der Größe einer einzelnen Kette. Bei der Verwendung der PhoA-Signalsequenz ist dagegen kaum eine Bande innerhalb der Sphäroblasten-Fraktion auszumachen. Dies ist möglicherweise ein Grund, dass Zellen mit PhoA eine wesentlich höhere optische Dichte ($OD_{600} = 3,3$) nach 24 h Expression erreichen konnten.

C.4.3 Nachweis einer Hintergrundexpression des *tet* regulierten Promotors

Obwohl der *tet*-Promotor als äußerst stringent gilt, fiel bei den bisherigen Arbeiten mit dem Tet-regulierten Promotor auf, dass die unterschiedlichen Konstrukte bei gleichen Bedingungen zu unterschiedlichen Plasmidausbeuten führten. Des Weiteren war das Wachstumsverhalten der Konstrukte auf LB-Agar-Platten als auch in Lösung stark unterschiedlich. Deshalb sollte in einem zusätzlichen Versuch gezeigt werden, ob es auch unter nicht induzierten Bedingungen zur Proteinexpression kommt. Für den Ansatz wurden 5 ml LB-Medium mit einer frischen Kolonie von JM83 Wildtyp und JM83 mit Fab4myc gewählt.

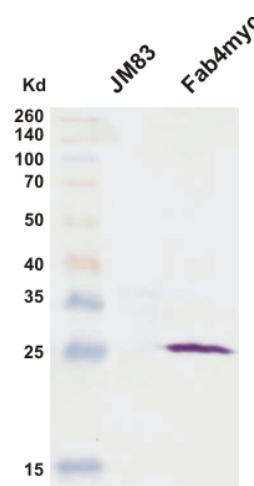


Abb. C-19: Western Blot der Hintergrundexpression des Tet-Promotors. 8 µl des Totallysates von JM83 und Fab4myc wurden jeweils aufgetragen. Der Nachweis erfolgte über den α -His-Tag-HRP (Sigma) 1:1000 und TMB (SeramunBlau®prec).

Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Anschließend wurden je 200 µl Zellen ($OD_{600} = 3,5$) für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 10 µl SDS-Probenpuffer (inklusive Benzonase) aufgenommen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel auf eine Membran geblottet und 2 h mit α -His-Tag-HRP Antikörper von Sigma (1:1000) detektiert. Der Nachweis erfolgte über die TMB-Entwicklung. Wie in Abb. C-19 zu sehen, konnte nur bei Fab4myc eine eindeutige Bande bei ca. 25 kDa ausgemacht werden. Dies entspricht der Größe einer schweren Kette V_H-C_{H1} und gilt daher als Nachweis einer Hintergrundexpression des verwendeten *tet*-Promotors.

C.4.4 Einführung eines ELISA-Screening-Protokolls

Für die Selektion von Fab-Varianten mit verbesserter Expression musste neben dem etablierten Phagen-Display-Verfahren zusätzlich ein ELISA-Screening durchgeführt werden. Dadurch sollte festgestellt werden, ob durch Phagen-Display angereicherte Mutanten auch eine verbesserte Expression aufweisen. Das ELISA-Screening musste so aufgebaut sein, dass es den Nachweis funktioneller Fab-Moleküle aus Mikrotiteransätzen erlaubt. Im Gegensatz zu Abb. C-10 sollte der Nachweis nicht über die konstante leichte Kette, sondern über den His-Tag der schweren Kette geführt werden, da für den α -hC_{Kappa}-Antikörper nicht die gleiche Bindungsstärke bei modifizierten konstanten Regionen garantiert werden konnte.

Tab. C-2: Auswahl-Antikörper für anti-His-ELISA-Screening

Nummer	Antikörper	Verdünnungsfaktor
1	α -mono-His-Antikörper-HRP (Sigma)	1:1000
2	α -poly-His-Antikörper-HRP	1:1000
3	Maus- α -Tetra-His-Antikörper (Qiagen)	1:1000
4	Maus- α -Penta-His-Antikörper (Qiagen)	1:1000
5	α -Maus-Antikörper-HRP (Amersham Bioscience)	1:5000
6	α -Maus-Antikörper-HRP (Seramun)	1:5000

Außerdem sollte ein Nachweis von möglicherweise schwach oder unspezifisch bindenden leichten Ketten-Dimeren vermieden werden. Für den Versuch wurden im Institut verfügbare α -His-Antikörper und Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (Tab. C-2) verwendet. Für diesen Nachweis wurden Mikrotiterplatten mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ p24 beschichtet. Da GFP-M53T selbst einen His-Tag besitzt, konnte es für diesen Zweck nicht verwendet werden. Die in Tab. C-2 gelisteten Antikörper wurden in p24 beschichteten Mikrotiterplatten allein und in Kombination mit Sekundärantikörpern getestet. Für den Nachweis wurden Vertiefungen mit je 80 ng gereinigtes Fab3myc inkubiert und anschließend mit den Antikörpern in den entsprechenden Verdünnungsfaktoren detektiert. Bei Antikörperkombinationen wurde sequenziell erst mit dem primären, anschließend mit dem sekundären Antikörper detektiert. Der eigentliche Nachweis einer Bindung zwischen dem Antikörper und Fab3myc wurde über die TMB-Umsetzung bestimmt. Zur Negativkontrolle wurden alle Antikörper bzw. Antikörperkombinationen auch in nicht-beschichteten beziehungsweise nicht mit Fab3myc inkubierten Vertiefungen getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Keine der Negativkontrollen ergab ein ELISA-Signal und somit konnte eine unspezifische Bindung, sowohl zum Oberflächenmaterial als auch zum p24, ausgeschlossen werden.

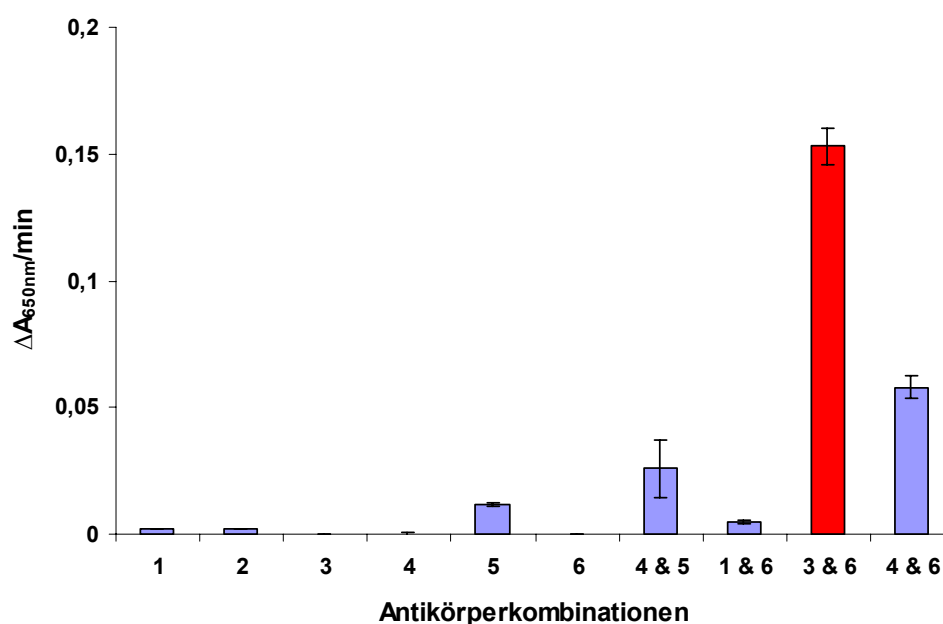


Abb. C-20: ELISA-Ergebnisse des anti-His-Tag-Antikörper-Tests. Jede Vertiefung wurde mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ p24 beschichtet. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 80 μl 1 $\mu\text{g/ml}$ gereinigtes Fab3myc für 2 Stunden inkubiert. Der Nachweis gebundener Fab-Fragmente erfolgte mit Antikörpern bzw. Antikörperkombinationen gemäß der Nummerierung der Tab. C-2: Auswahl-Antikörper für anti-His-ELISA-Screening, Substat: TMB (SeramunBlau[®]fast). Rot markierter Datenpunkt kennzeichnet die beste Antikörperkombination aus Maus α -Tetra-His (Qiagen) und α -Maus-Antikörper-HRP (Seramun) für den Nachweis von Fab-Fragmenten.

Wie der Abb. C-20 zu entnehmen ist, eigneten sich weder der HRP-markierte monoklonale Antikörper von Sigma, noch der polyklonale Antikörper von Seramun (Balken 1 und 2). Beide Antikörper konnten Fab3myc nur unzureichend nachweisen und fielen daher für ELISA-*Screenings* aus. Darüber hinaus war auch der sekundäre α -Maus-Antikörper von Amersham Bioscience ungeeignet, der neben dem α -His-Tag-Antikörper (Balken 4 & 5) auch Bereiche des Fab3myc detektierte. Dies ist insofern unerwünscht, da modifizierte konstante Regionen die Signalstärke möglicherweise beeinflussen könnten. Für einen einwandfreien Nachweis eines His-Tags eignete sich daher nur der sekundäre α -Maus-Antikörper-HRP von Seramun, der keine Wechselwirkungen zum Fab3myc aufwies (Balken 6).

In Verbindung mit dem α -Tetra-His (roter Balken 3 & 6), als auch den α -Penta-His (Balken 4 & 6) von Qiagen ist er für ein α -His-ELISA-*Screening* sehr gut geeignet. Dabei wurde deutlich, dass der α -Tetra-His (roter Balken) zusätzlich eine wesentlich höhere Empfindlichkeit gegenüber dem α -Penta-His (Balken 4 & 6) aufwies und somit am besten für den Expressions-ELISA eingesetzt werden konnte.

Die optimalen Verdünnungsfaktoren der beiden Antikörper mussten für die Anwendung noch individuell eingestellt werden (Daten nicht gezeigt).

C.5 Aufbau von randomisierten Antikörpergenbibliotheken

Zur Generierung von expressionsoptimierten Varianten des Fab-Fragments des CB4-1 war es zunächst nötig, mutierte Antikörpergenbibliotheken der konstanten Domänen der leichten und schweren Kette zu synthetisieren. Nach den Projektvorgaben sollten drei unabhängige Antikörpergenbibliotheken synthetisiert werden, die auf Zufallsmutagenese und lokal randomisierten Positionen basieren. Anschließend wurden die Genbibliotheken durch geeignete Restriktionsschnittstellen in den ausgewählten Phagemidvektor pSec-Fab4myc eingesetzt und elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF (Stratagene) oder ER2738-Zellen mit der DNA-Bibliothek via Elektroporation transformiert. Für die Bestimmung der Qualität bzw. Güte der erstellten Bibliothek wurden Kontrollsequenzierungen durchgeführt.

C.5.1 Error-prone-PCR Bibliotheken „A“

Die Bibliothek „A“ basiert auf Zufallsmutagenese innerhalb der humanen Gene C_H1 (IgG1) und C_{kappa} des Phagemidvektors pSec-Fab4myc, die durch *Error-prone-PCR* generiert wurden. Die Gene der schweren und leichten Kette wurden mittels Random-Mutagenese Kit (GeneMorphII

Kit, Stratagene) aus dem vorhandenen Vektor pSec-Fab4myc mit den spezifischen Primern V_H EagIfor und HisTagNcoIrev, sowie V_L KpnIfor und MycTagEcoRVrev (Tab. B-9) amplifiziert (40 Zyklen). Nach der Reinigung des PCR-Produkts mit Hilfe eines PCR-purification-Kits (NucleoSpin[®] Extract II, Macherey Nagel) wurde die enthaltene DNA verdünnt und eine Menge von ca. 1 ng DNA als *Template* für weitere *Error-prone*-PCRs verwendet. Durch weitere Runden konnte die Mutationsrate erhöht werden. Insgesamt wurden nach diesem Verfahren drei *Error-prone*-PCRs nacheinander durchgeführt. Nach dem letzten PCR-Schritt konnte das PCR-Produkt ohne weiteren Reinigungsschritt im PCR-Mix mit den Restriktionsenzymen EagI/NcoI (C_{H1}) und KpnI/EcoRV (C_{Kappa}) und den passenden Restriktionspuffern verdaut werden.

Synthese der Bibliotheken A- C_{Kappa} und A- C_{Kappa} - C_{H1}

Der Vektor pSecFab4myc wurde mit KpnI und EcoRV verdaut und nach einer Gelreinigung mit der C_{Kappa} -Bibliothek ligiert. Der entsalzte Ligationsvektor wurde dann mit elektrokompenten *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) transformiert. Die Transformationseffizienz betrug 5×10^7 und entsprach damit gleichzeitig der maximalen theoretischen Komplexität der Bibliothek.

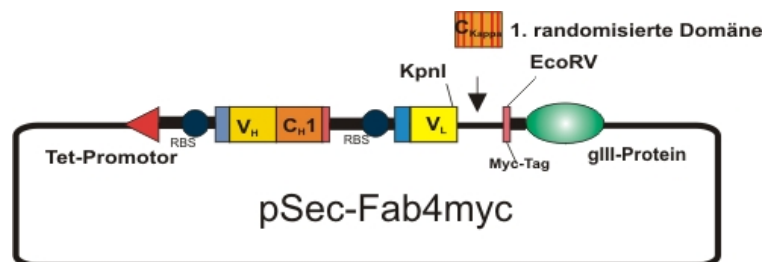


Abb. C-21: Schematische Klonierung der Antikörpergen-bibliothek A- C_{Kappa} . Mittels Zufallsmutagenese randomisierte C_{Kappa} -Domäne wurde mit Hilfe von KpnI und EcoRV geschnitten und in den Vektor pSec-Fab4myc inseriert. Modifizierte Domänen sind rot schraffiert.

Für eine Abschätzung der Qualität wurden 88 Klone kontrollsequenziert. Davon waren ca. 77 % funktionell. Die restlichen Mutanten hatten Stopcodons (9), Deletionen (6) oder waren falsch ligiert (5). Die fertige Bibliothek A- C_{Kappa} wurde nach einer Maxiprep durch den Verdau mit EagI und NcoI für den Einbau der schweren konstanten C_{H1} -Domäne vorbereitet. Nach der Ligation mit der randomisierten C_{H1} -Domäne und deren Transformation wurden 74 Klone zur Kontrollsequenzierung gegeben. Insgesamt besaßen nur 42 Klone noch eine vollständige C_{Kappa} -Domäne. Davon hatten genau 50 % eine funktionelle C_{Kappa} -Domäne. Neben Abbruchmutanten durch Stopcodons (15 Klone) waren Deletionen (7 Klone) die häufigste Ursache für einen Kettenabbruch.

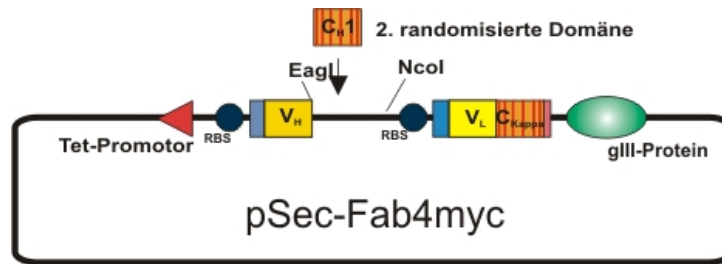


Abb. C-22: Schematische Klonierung der Antikörpergenbibliothek A-C_{Kappa}-C_{H1}. Mittels Zufallsmutagenese randomisierte C_{H1}-Domäne wurde mit Hilfe von KpnI und EcoRV geschnitten und in den Vektor pSec-Fab4myc inseriert. Modifizierte Domänen sind rot schraffiert.

In der Tab. C-3 ist die Qualität bezüglich der C_{Kappa}-Domäne dargestellt. Während nach dem ersten Einbau der C_{kappa}-Domäne nur 5 Klone bzw. 6 % falsch ligiert waren, stieg der Anteil nach dem Einbau der C_{H1}-Domäne auf 42 % an und machte schon einen Hauptanteil in dieser Bibliothek aus. Eine genauere Analyse ergab, dass über 90 % der falsch ligierten Klone auf die EcoRV-Schnittstelle zurückzuführen waren. Neben den falsch ligierten Klonen nahm auch der Anteil der Klone mit Stopcodons und Deletionen rasant zu. So stieg der Anteil der Stopcodons allein von 11 auf 36 %, während der Anteil der Deletionen von 7 auf 17 % stieg. Im gleichen Maß, mit dem solche Negativmutanten zunahm, ging der Anteil funktioneller C_{kappa}-Domänen zurück. Während nach dem ersten Einbau der Anteil funktioneller Fab-Fragmente mit 77 % noch relativ hoch war, so brach der Anteil der korrekten C_{Kappa}-Domänen nach dem Einbau der schweren konstanten Domäne ein. Nur noch 29 % aller sequenzierten Klone besaßen danach noch eine funktionelle leichte Kette. Der Einbau der zweiten konstanten Domäne war somit mit einem erheblichen Qualitätsverlust allein innerhalb der C_{Kappa}-Domäne verbunden.

Tab. C-3: Qualitätsanalyse der Bibliothek A-C_{Kappa} und A-C_{Kappa}-C_{H1} anhand der leichten konstanten Domäne. Klammerwerte sind bezogen auf sequenzierte Klone abzüglich der falsch ligierten Klone.

Bibliothek	Sequenzierte Klone (vollständige C _{kappa})	Stopcodons	Deletionen	Falsch ligierte Klone	Funktionelle C _{Kappa}
A-C _{Kappa}	88 (83/94 %)	9 (11 %)*	6 (7 %)*	5 (6 %)**	68 (77 %)**
A-C _{Kappa} -C _{H1}	74 (42/56 %)	15 (36 %)*	7 (17 %)*	31 (42 %)**	21 (29 %)**

* bezogen auf vollständige C_{kappa} Klone, ** bezogen auf alle sequenzierten Klone

Bei den Deletionsmutanten fiel signifikant auf, dass die meisten aller Deletionen im gleichen Sequenzabschnitt (1. Basenpaar der C_{Kappa}-Domäne), wenn nicht sogar an der gleichen Position auftraten. Abb. C-23 zeigt ein Alignment, wo 6 der 7 identifizierten Deletionsmutanten

dargestellt sind. Eine weitere Deletionsmutante hatte eine Deletion außerhalb des angegebenen Bereichs und wurde daher nicht abgebildet.

Für die schwere konstante Domäne waren die Auswirkungen von Falsch-Ligationen, Stopcodons und Deletionen analog zur C_{Kappa} -Domäne. Nur 30 Klone von 74 hatten nach dem Einbau eine funktionelle C_{H1} -Domäne. Die hohe Ausfallrate innerhalb der leichten und schweren konstanten Domäne summierte sich bei der Gesamtbetrachtung der randomisierten Bibliothek. Nur noch ca. 10 % der Klone waren funktionell, und die maximale Komplexität der Bibliothek verringerte sich dadurch auf ca. 1×10^7 .

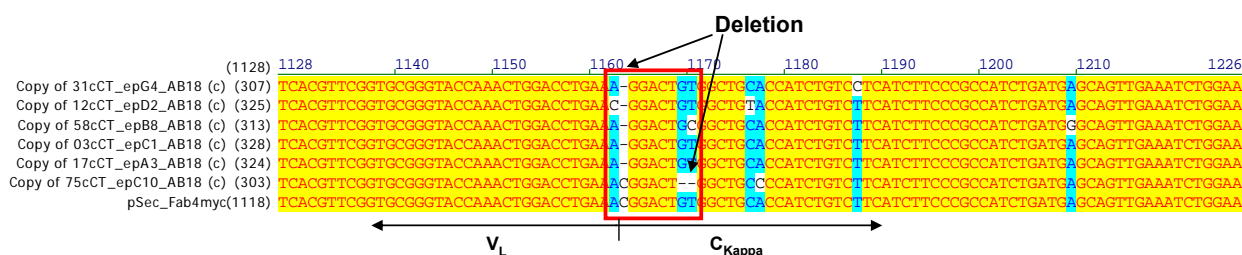


Abb. C-23: Alignment von Deletionsmutanten der C_{Kappa} -Domäne. Sequenziert wurden 96 Klone der A- C_{Kappa} - C_{H1} Bibliothek. Der rote Rahmen kennzeichnet die Position der Deletion von 6 der 7 Deletionsmutanten.

Synthese der Bibliotheken A- C_{H1} . Ein neuer Ansatz wurde mit dem Einbau der konstanten Domänen C_{H1} in pSec-Fab4myc verfolgt. Während beim ersten Ansatz C_{Kappa} und C_{H1} sequenziell eingebaut wurden, um eine vollständig randomisierte Bibliothek zu generieren, sollte bei diesem Ansatz bereits nach dem Einbau von C_{H1} die Bibliothek auf Vorteilsmutanten selektiert werden.

Tab. C-4: Übersicht der erstellten Antikörpergenbibliotheken der Gruppe „A“.

Bibliothek	transformierte Vektor-DNA	Runden Error-prone PCR	Theoretische Variabilität	Güte funkt. Fab/seq. Klon	Mutationsrate PMs*/ Gen
A- C_{Kappa}	9,85 μg	3	5×10^7	68/88	1-7
A- C_{Kappa} - C_{H1}	16,3 μg	-	1×10^8	21/74 (C_{Kappa}) 30/74 (C_{H1}) 7/74 (gesamt)	1-7
A- C_{H1}	2,65 μg	3	$5,8 \times 10^7$	6/8	1-7
A- C_{H1} - <i>shuffling</i>	6 μg	-	$2,8 \times 10^7$	8/8	-
A- C_{H1} - <i>shuffling</i> - C_{Kappa}	20 μg	-	$1,6 \times 10^7$	18/24	1-7

*PMs steht für Punktmutationen, die zum Aminosäureaustausch führten.

Da die Probleme der funktionellen Fab-Expression in erster Linie bei der schweren Kette vermutet wurde, sollte zuerst die schwere konstante Domäne über *EagI* und *NcoI* in den Vektor eingebaut und anschließend selektiert werden. Nach dessen Einbau in pSec-Fab4myc wurden 2,65 µg der ligierten Vektor-DNA transformiert und 8 Transformanten auf ihre Qualität hin sequenziert. Sechs der 8 Klone enthielten ein funktionelles Fab-Fragment, während jeweils ein Klon eine Deletion bzw. ein Stopcodon aufwies.

C.5.2 Bibliotheken „B“

Die zweite Bibliothek basierte auf lokaler Randomisierung innerhalb der humanen C_{H1} und C_{kappa} -Domänen und wurde mittels Wobbleprimern erstellt. Gegenstand der lokalen Mutagenese waren Positionen, die nach Literatursagen in Verdacht standen, die funktionelle Fab-Expression negativ zu beeinflussen [67]. In dieser Bibliothek wurden daher cisProline, C-terminale Cysteine und Kontaktpositionen zwischen leichter und schwerer Kette randomisiert (Abb. C-24 A). Hierfür wurden mittels PCR Genfragmente amplifiziert, die so gestaltet waren, dass sie durch SOE-PCR wieder zur ursprünglichen Gengröße hybridisiert werden konnten. Die Abb. C-24 zeigt die schematische Vorgehensweise für die lokale Randomisierung eines Gens.

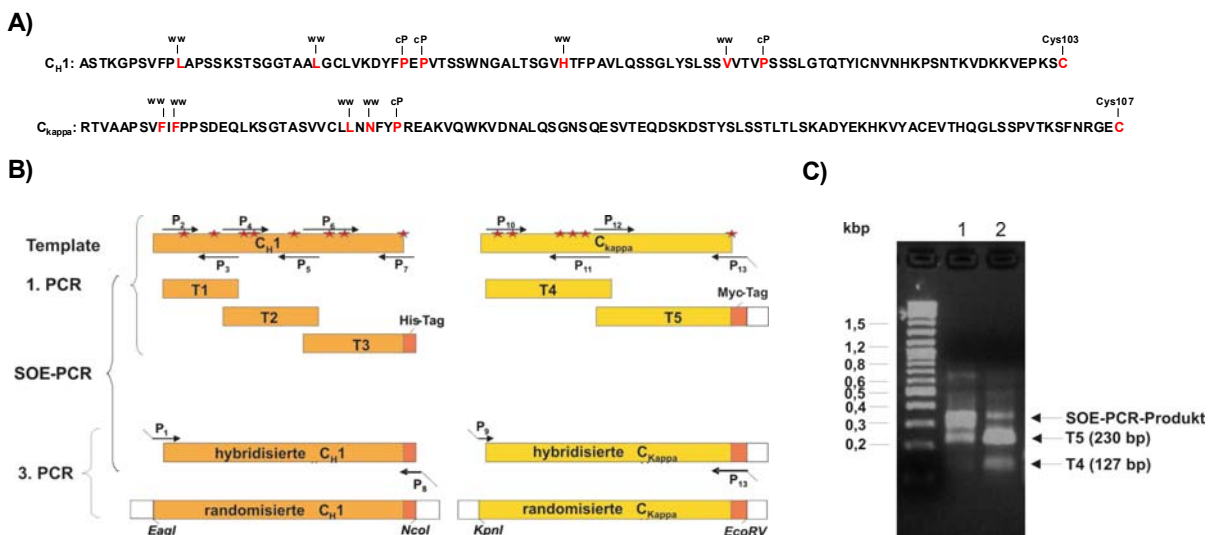


Abb. C-24: Synthese der Fab-Bibliothek „B“. A) Aminosäuresequenz der humanen konstanten Ketten C_{H1} und C_{kappa} . Rot markierte Aminosäuren kennzeichnen die randomisierten Positionen, WW (Wechselwirkung zwischen den Ketten), cP (cis Prolin) und Cys (C-terminale Cysteine). B) Schematische Darstellung der Synthese lokalrandomisierter Gene mittels Wobbleprimern. Rote Sternchen kennzeichnen die randomisierten Positionen. C) 2% Agarosegel zum Nachweis der korrekten Hybridisierung der C_{kappa} -Kette aus den Teilstücken T4 und T5, nach 2 x 10 PCR-Zyklen (Bahn 1) und 10 PCR-Zyklen (Bahn 2). Die Primersequenzen sind der Tab. B-10 zu entnehmen.

Hierbei wurden in einem ersten PCR-Schritt die Teilstücke T1 (Primerpaar P2/P3), T2 (Primerpaar P4/P5), T3 (Primerpaar P6/P7) für die C_{H1} und T4 (Primerpaar P10/P11) und T5 (Primerpaar P12/P13) für C_{Kappa} amplifiziert. Die Primer der überlappenden Region waren so gewählt, dass mindestens 19 Basen überlappten. In einem zweiten PCR-Schritt wurden anschließend die gelgereinigten Teilstücke in gleichen molaren Verhältnissen, maximal 2 μ g DNA, zum SOE-PCR-Mix (ohne Primer) zugegeben. Wie unter C) eindeutig zu sehen ist, konnte erst nach 10 PCR-Zyklen (Bahn 2) eine schwache Bande für das Hybridisierungsprodukt (C_{Kappa}) ausgemacht werden. Die Ausgangs-Fragmente T4 und T5 lagen dagegen noch in ausreichender Menge vor, um die PCR ein weiteres Mal für 10 Zyklen zu starten. Nach 2 x 10 Zyklen (Bahn 1) lag der Großteil der Fragmente als Hybridisierung vor, und es konnte keine Bande für das Teilstück T4 mehr nachgewiesen werden. SOE-PCR-Reaktionen mit mehr als 20 Zyklen waren nicht erfolgreich (Schmierbande, Daten nicht gezeigt). Des Weiteren waren 2 x 10 Zyklen im Ergebnis besser als 1 x 20 Zyklen. Neben C_{Kappa} wurde C_{H1} durch die Hybridisierung der Teilstücke T1, T2 und T3 generiert. Das Hybridisierungsprodukt wurde gelgereinigt und diente anschließend vollständig als *Template* für eine dritte PCR zur Amplifizierung der randomisierten Gene und zur Einführung der N- und C-terminalen Restriktionsschnittstellen. Mit Hilfe der Primer P1/P8 bzw. P9/P13 (Tab. B-10) konnte die schwere und leichte konstante Region amplifiziert werden. Das fertige PCR-Produkt konnte dann nach einem weiteren Reinigungsschritt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und passendem Restriktionspuffer verdaut werden.

Einbau der konstanten Domänen in den Phagemidvektor pSec-Fab4myc. Der Vektor und die Bibliothek der C_{Kappa} -Domäne wurden mit KpnI und EcoRV verdaut. Während die C_{Kappa} -Domäne im PCR-Mix nach der letzten Amplifizierung verdaut wurde, musste der Vektor sequenziell mit KpnI und anschließend EcoRV verdaut und zweimal Phosphatase behandelt werden. Erst als die Kontrolligation des Vektors keine Transformanten mehr erzeugte, wurde der Vektor für den Einbau der Bibliotheken zugelassen. Nach Ligation mit der Bibliothek wurde der Vektor mittels Nucleospin Extraction Kit entsalzt und anschließend mit elektrokompenten *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) transformiert. Für die Qualitätsbestimmung der Bibliothek wurden 46 Klone kontrollsequenziert. Nur 30 % der sequenzierten Klone enthielten funktionelle Fabs. Über 30 % und damit der größte Anteil der Konstrukte hatten einen Primerframeshift (eine Deletion im Bereich der Primerbindungsregion). Die restlichen Konstrukte hatten neben Stopcodons (8 %) auch wieder Ligationsfehler (10 %).

Tab. C-5: Übersicht der erstellten Antikörpergenbibliotheken der Gruppe „B“

Bibliothek	transformierte Vektor-DNA	Theoretische Variabilität	Güte funkt. Fab/seq. Klon
B-C _{Kappa}	4,5 µg	4,2 x 10 ⁷	16/46
B-C _{Kappa} -C _{H1}	14,9 µg	3,7 x 10 ⁸	14/61 (C _{Kappa}) 14/61 (C _{H1}) 1/61 (gesamt)

Der Vektor mit randomisierter C_{kappa}-Domäne wurde anschließend für den weiteren Einbau der C_{H1}-Domäne mit EagI und NcoI verdaut. Nach dessen Ligation und Elektroporation sind 61 Klone sequenziert worden. Die Auswertung ergab, dass nur noch ca. 23 % der Klone eine funktionelle C_{Kappa}-Domäne oder eine funktionelle C_{H1}-Domäne hatten. Nur ein Konstrukt hatte sowohl eine korrekte leichte, als auch eine korrekt schwere Kette. Im Gegensatz zur Bibliothek A-C_{Kappa}-C_{H1} lag das Hauptproblem nicht bei falsch ligierten Klonen, sondern bei Primerdeletionen. Fast 50 % aller Klone hatten allein innerhalb der C_{Kappa}-Domäne eine Deletion. Zusätzlich gab es mit 18 % einen hohen Anteil an Stopcodons. Falsch ligierte Klone machten einen Anteil von 14 % aus.

C.5.3 Loop Bibliotheken „C“

Die dritte Antikörpergenbibliothek basierte wie die Bibliothek „B“ auf der Randomisierung von lokalen Positionen. Dabei waren spezielle Loopregionen Gegenstand der Mutagenese, die in publizierten Kristallstrukturen durch hohe B-Faktoren auffielen. Solche flexiblen Bereiche könnten die Faltung und somit die Ausbildung funktioneller Fab-Fragmente unterdrücken. Anhand der Raumstruktur eines ebenfalls chimären Fab-Fragments mit humaner C_{H1}- und C_{Kappa}-konstanter Region (1UCB) wurde eine „Hotspotanalyse“ durchgeführt. Positionen, die Wechselwirkungen zu Loops der gleichen Kette oder Wechselwirkungen zur anderen Kette aufwiesen, wurden durch Wobbleprimer lokal randomisiert. Insgesamt wurden Positionen innerhalb von drei Loops der schweren konstanten Region (C_{H1}) und zwei Loops der leichten konstanten Region (C_{Kappa}) randomisiert. Zusätzlich wurden wie bei Bibliothek „B“ die C-terminalen Cysteine modifiziert. Der Aufbau wurde hierbei analog zu Bibliothek „B“ (siehe Abb. C-24 B und C) durchgeführt. Abb. C-25 stellt die modifizierten Aminosäuren, in rot markiert, dar. Es wurden 11 bzw. 9 Positionen innerhalb von C_{H1} und C_{Kappa} randomisiert.

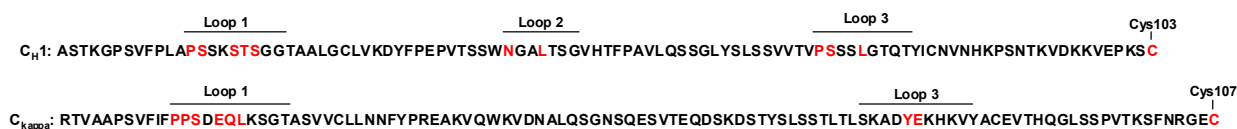


Abb. C-25: Randomisierte Positionen der Bibliothek „C“. Rot markierte Aminosäuren stellen die randomisierten Positionen dar.

Wie beispielhaft unter Abb. C-24 B gezeigt, wurden auch die Teilstücke der Bibliothek „C“ generiert. So wurden die Primerpaare lp2/lp3, lp4/lp5 und lp6/lp7 (Tab. B-10) für die Amplifizierung der Teilstücke T1, T2 und T3 der C_{H1} -Domäne verwendet, für die Synthese der Teilstücke T4 und T5 der C_{Kappa} -Domäne die Primerpaare lp10/lp11 und lp12/lp13. Durch die nachfolgende SOE-PCR wurden aus T1, T2 und T3 die C_{H1} -Domäne und aus T4 und T5 die C_{Kappa} -Domäne hybridisiert. Die gereinigten SOE-PCR-Produkte wurden im letzten Schritt vollständig als *Template* für die Amplifizierung der kompletten C_{H1} - (mit Primerpaar lp1/lp8) und C_{Kappa} -Domäne (mit Primerpaar lp9/lp13) eingesetzt.

Einbau der konstanten Domänen in den Phagemidvektor pSec-Fab4myc. Mit KpnI/EcoRV geschnittener Vektor wurde mit der ebenfalls mit KpnI/EcoRV verdauten C_{Kappa} -Domäne ligiert und elektrokompente *E. coli* XL1-Blue MRF' damit transformiert. Weitere 82 Klone wurden nach der erfolgreichen Insertion der leichten konstanten Domäne kontrollsequenziert. Von den Klonen besaßen demnach 50 % eine funktionelle C_{Kappa} -Domäne. Nicht-funktionelle C_{Kappa} -Domänen fielen durch einen hohen Anteil von Primerdeletionen (38 %) und Stopmutationen (7 %) auf. Die neu entstandene Vektor-DNA wurde anschließend mit EagI und NcoI verdaut und mit der C_{H1} -Domäne ligiert.

Tab. C-6: Übersicht der erstellten Antikörpergenbibliotheken der Gruppe „C“

Bibliothek	transformierte Vektor-DNA	Theoretische Variabilität	Güte funkt. Fab/seq. Klon
C- C_{Kappa}	4,5 µg	$2,58 \times 10^7$	41/82
C- C_{Kappa} - C_{H1}	18,5 µg	$1,85 \times 10^8$	12/89 (C_{Kappa}) 8/89 (C_{H1}) 0/89 (gesamt)
C- C_{H1}	1,7 µg	$1,15 \times 10^7$	0/8

Insgesamt 89 Klone wurden für eine Gütekontrolle ausgewählt. Im Ergebnis wurde die Tendenz der ersten beiden Bibliotheken A-C_{Kappa}-C_{H1} und B-C_{Kappa}-C_{H1} bestätigt. Der Anteil funktioneller C_{kappa}-Domänen reduzierte sich von 50 auf 13 %. Des Weiteren war der Anteil der schweren konstanten Domäne von < 10 % extrem gering. Nicht zuletzt dadurch konnte kein einziges funktionelles Fab unter den 89 Klonen gefunden werden. Nicht-funktionelle Konstrukte wurden verursacht durch falsche Ligation (56 %), Primerframeshifts (22 %) und Stopmutationen (8 %). Letztendlich war das Ergebnis der drei Bibliotheken mit randomisierten schweren und leichten konstanten Domänen identisch. In allen drei Fällen nahm die Qualität der Bibliothek mit dem weiteren Einbau der C_{H1}-Domäne rapide ab.

C.5.4 Aufbau der Loop-Bibliothek C-C_{H1}

Alternativ zu den ersten Bibliotheken wurde auch mit der Loopbibliothek noch ein weiterer Ansatz verfolgt. Wie schon bei der *Error-prone*-Bibliothek sollte dabei mit dem Einbau der schweren konstanten Domäne begonnen werden. Nach Ligation und Reinigung des Ligationsvektors wurden insgesamt 1,7 µg DNA mit elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF⁷ transformiert. Dabei konnte eine Bibliothek mit einer theoretischen Variabilität von $1,15 \times 10^7$ erzeugt werden. Die Güte bzw. Funktionalität wurde durch acht Kontrollsequenzierungen bestimmt.

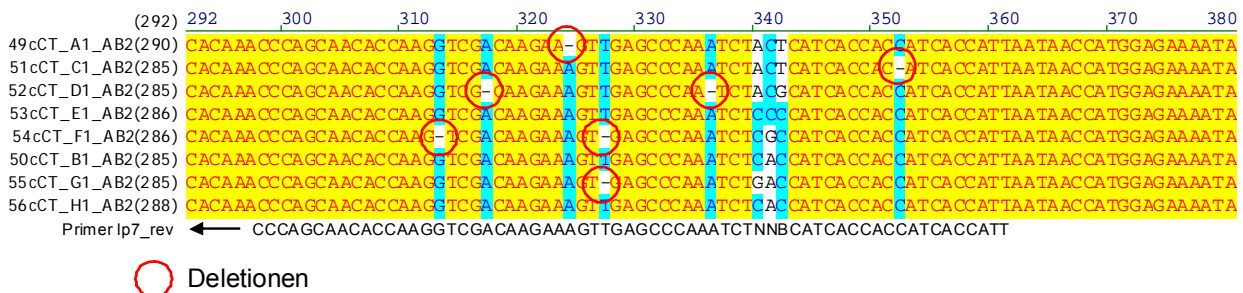


Abb. C-26: Ausschnitt der Kontrollsequenzierung der C-C_{H1}-Bibliothek. Rote Kreise markieren Deletionen innerhalb der Primerbindungsregion des Primers lp7-rev.

In Abb. C-26 ist ein Ausschnitt der Sequenzierung im Primerbereich des lp7-rev dargestellt. Durch die roten Kreise sind Deletionen markiert, die zum Rasterschub führten und somit keine korrekte Translation der Fab-Fragmente mehr zuließen. Allein in diesem Teilbereich fielen über 50 % der Klone (A1, C1, D1, F1 und G1) als funktionelle Antikörperfragmente aus. Die verbliebenen Klone B1, E1 und H1 wiesen bereits in *Downstream*-DNA-Bereichen

Leserasterverschiebungen bzw. Stopcodons auf (Daten nicht gezeigt) und besaßen dadurch auch keine korrekte Gensequenz einer konstanten Domäne. Insgesamt konnte somit keine funktionelle Sequenz für ein Antikörperfragment gefunden werden.

C.6 Affinitätspannings

Für die Selektion von Expressionsvorteilsmutanten wurden zunächst elektrokompente ER2738-Zellen mit 5 µg DNA der generierten Antikörpergenbibliotheken pro 0,2 cm Elektroporationsküvetten transformiert und mit Hilfe von Helferphagen M13K07 über Nacht bei 25°C in Phagen verpackt.

Den Antikörpergenbibliotheken A-C_{Kappa}-C_{H1}, B-C_{Kappa}-C_{H1} und C-C_{Kappa}-C_{H1} mit komplett randomisierten leichten und schweren konstanten Domänen musste nach den Kontrollsequenzierungen eine schlechte Güte ausgestellt werden. Trotzdem wurde ein erstes *Panning* durchgeführt. Da bei diesem *Panning* keinerlei Binder selektiert werden konnten, wurde diese Strategie nicht weiterverfolgt und in Folge dessen eingestellt. Des Weiteren konnte nach der Kontrollsequenzierung der Bibliothek C-C_{H1} kein funktionelles Fab nachgewiesen werden. Es wurde von einer weiteren Selektion dieser Bibliothek mittels Phagen-Display abgesehen. Alle nachfolgenden Arbeiten gehen deshalb nur noch von der Bibliothek A-C_{H1} mit randomisierter konstanter schwerer Domäne aus.

C.6.1 Aufbau einer Phagenbibliothek mit randomisierter schwerer Domäne

Vorraussetzung für die Selektion von Fab-Fragmenten mit verbesserter Expression, mit Hilfe der Phagen-Display-Technik, war die Präsentation der in der Bibliothek vorhandenen Zufallsmutanten auf der Oberfläche von filamentösen Phagen. Für die Phagengenerierung wurden elektrokompente *E. coli* ER2738 in sieben Ansätzen mit insgesamt 35 µg der Phagemid-DNA transformiert. Dabei wurden insgesamt $3,1 \times 10^9$ Transformanten erhalten. Nach Kultivierung der Transformanten mit Helferphagen M13K07 wurde eine Phagenbibliothek generiert, die für die Selektion von Expressionsvorteilsmutanten eingesetzt wurde.

C.6.2 Panning

Zur Analyse der einzelnen Selektionszyklen wurden nach jedem Zyklus 90 Klone mit drei Positivkontrollen und drei Negativkontrollen im Mikrotiterplattenmaßstab kultiviert und in einem Einzelphagen-ELISA und Fab-Expressions-ELISA auf Bindung überprüft. Dabei konnte

gezeigt werden, dass die Phagen der meisten Klone ein positives Signal ergaben, während die lösliche Fab-Expression der gleichen Klone im Expressions-ELISA kein Signal ergab. Dieses Phänomen nahm mit der Anzahl der Zyklen stark zu. Nach dem dritten Selektionszyklus wurden acht Kontrollsequenzierungen durchgeführt.

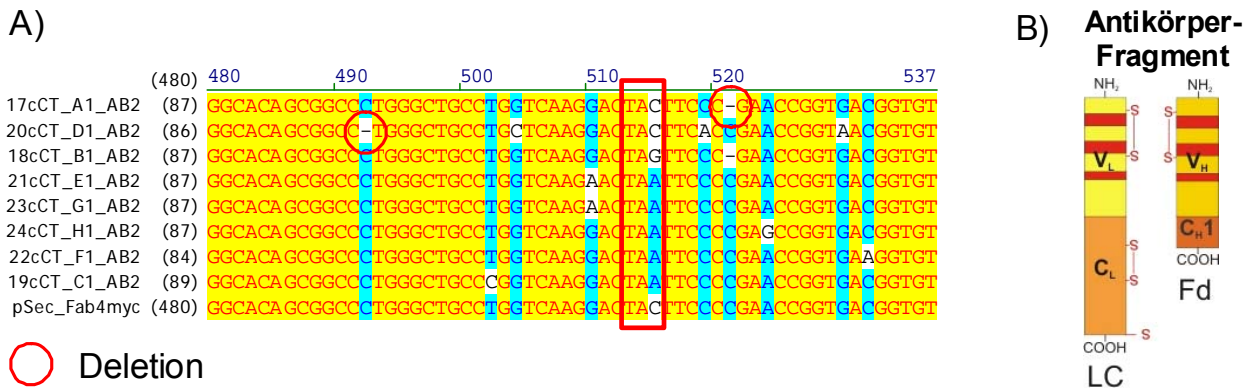


Abb. C-27: Selektion von *Escape*-Mutanten A) Ausschnitt der Kontrollsequenzierung nach dem 3. *Panning*. Rote Kreise markieren Deletionen innerhalb der Sequenz. Im rot markierten Kästchen ist die 31. Aminosäureposition der C_H1-Domäne hervorgehoben. Fünf der acht Sequenzen weisen dort einen C→A Austausch auf, der zum Stopcodon TAA führt. B) Darstellung der angereicherten Antikörper-Fragmente mit verkürzter schwerer Kette.

Die Sequenzierung von acht Klonen ergab, dass alle Klone im gleichen Sequenzabschnitt entweder eine Rasterschubmutation oder ein Stopcodon aufwiesen. Das im roten Kästchen markierte Tripletts entsprach der 31. Aminosäure (Tyrosin) der schweren konstanten Domäne. Allein an dieser Position zeigten sechs der acht Sequenzen ein Stopcodon (TAA bzw. TAG). Nur zwei dieser Sequenzen waren dabei identisch, die weiteren Klone waren genotypisch verschieden. Letztendlich hatten sich Klone mit verkürzten C_H1-Domänen angereichert. Diese Mutanten konnten noch funktionelle Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Phagen präsentieren und zeigten somit ein positives Signal im Einzelphagen-ELISA. Da die schwere Kette durch Rasterschubmutationen oder Stopcodons nicht vollständig abgelesen wurde, konnte somit auch der Expression-ELISA, der auf dem Nachweis des C-terminalen His-Tags der schweren Kette basiert, keine Signale mehr liefern.

C.6.3 Optimierung des *Panning*-Protokolls

Die herkömmliche Durchführung der *Panning*-Prozedur führte wie unter C.6.2 und Abb. C-27 gezeigt, nicht zur Anreicherung kompletter Fab-Konstrukte. Vielmehr wurden Abbruchvarianten mit verkürzter schwerer Kette angereichert. Für die Selektion vollständiger Fab-Konstrukte war es daher notwendig, die *Panning*-Prozedur dahingehend zu verändern, dass keine

Abbruchvarianten mehr selektiert werden können. Hierfür war es notwendig, Unterschiede zwischen den Abbruchvarianten und vollständigen Fab4myc Fab-Konstrukten zu finden. Da die selektierten Abbruchvarianten dem Fv-Fragment ähneln und Fv-Fragmente durch geringe Stabilitäten sich von Fab-Fragmenten unterscheiden, sollte zuerst die Stabilität der Konstrukte untersucht werden. Hierfür wurden von zwei Abbruchvarianten B1 und E1 (Abb. C-27) und dem Fab-Konstrukt Fab4myc Einzelphagen reamplifiziert, die anschließend einem Temperaturscreen und verschiedenen Guanidiniumhydrochlorid-Konzentrationen ausgesetzt wurden. Bei Temperaturen von 4 bis 90°C und 10°C Abständen wurden $8,5 \times 10^{11}$ Phagen in 100 µl Ansätzen für 20 min inkubiert und anschließend mittels Phagen-ELISA auf Bindung überprüft. Des Weiteren wurden 5×10^{11} Phagen in 100 µl Ansätzen mit 0 bis 2,5 M GdnHCL (mit 0,5 M Abstand) versetzt und für drei Tage bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde wiederum ein Phagen-ELISA durchgeführt.

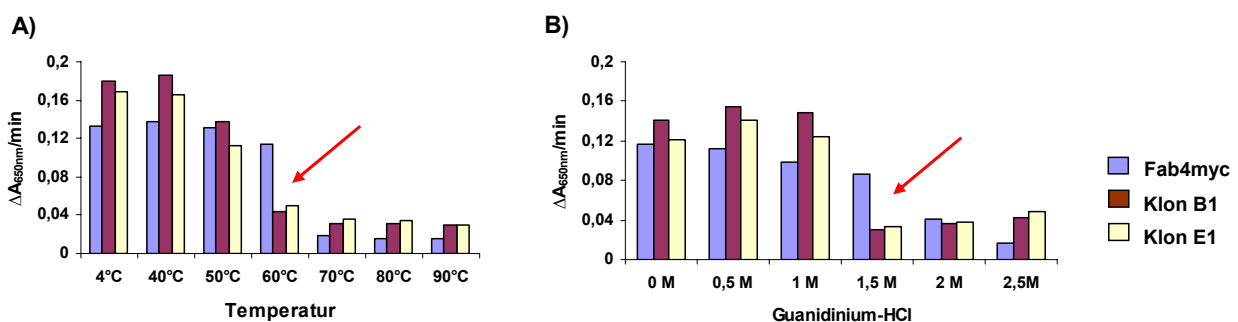


Abb. C-28: Phagen-ELISA von Temperatur- und GdnHCL-behandelten Phagen. Jede Vertiefung wurde mit 10 µg/ml GFP24 beschichtet. Nach der Phagenproduktion wurden $6,8 \times 10^{11}$ (A) bzw. 4×10^{11} (B) in 80 µl und 1 x Blocking-Puffer im ELISA getestet. Der Nachweis gebundener Phagen erfolgte mit α -Fd-Phagen-HRP, Substrat: TMB (SeramunBlau®fast). A) Vergleichende temperaturabhängige Bindung von Phagen des Fab4myc und der Abbruchmutanten B1 und E1. B) Vergleichende GdnHCL-abhängige Bindung von Phagen des Fab4myc und der Abbruchvarianten B1 und E1. Rote Pfeile markieren Bedingungen mit signifikanten Unterschieden der untersuchten Konstrukte.

Sowohl die Temperatur-, als auch die GdnHCL-abhängigen Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass Abbruchmutanten eine geringere Stabilität gegenüber vollständigen Fab-Fragmenten aufwiesen. In beiden Phagen-ELISA konnten Übergangsbereiche ausgemacht werden, wo vollständige Fab-Konstrukte noch intakt waren und binden konnten, während ein Großteil der Abbruchmutanten ihre Konformation und somit ihr Bindungsvermögen verloren hatten. Beide Abbruchmutanten B1 und E1 konnten signifikant aus der Bibliothek entfernt werden, wenn die Phagenbibliothek vor dem *Panning* 20 min bei 60°C hitzeinaktiviert oder einer 1,5 M GdnHCL-Behandlung über 3 Tage bei 4°C ausgesetzt wurden. Da eine Hitzeinaktivierung von Phagen

schneller und leichter zu handhaben war, wurden erneute *Panning*-Runden mit diesem zusätzlichen Schritt durchgeführt.

Die Eliminierung verkürzter Fab-Fragmente aus der Phagenbibliothek über den His-Tag der intakten Fab-Fragmente mittels Ni-NTA oder Co-NTA war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Die Größe des Phagenpartikels behindert möglicherweise den Zugang zum His-Tag.

C.6.4 Erneutes *Panning* mit *Error-prone*-Bibliothek C-C_{H1} mit Hitzeinaktivierung

Da wie unter C.6.3 gezeigt, keine vollständigen Fab-Fragmente angereichert werden konnten, musste die gesamte Phagen-Display-Prozedur wiederholt werden. Zusätzlich zu dem herkömmlichen Protokoll wurde die Phagenbibliothek vor jedem *Panning*-Zyklus für 20 min bei 60°C hitzebehandelt, um Abbruchmutanten zu eliminieren (Abb. C-28).

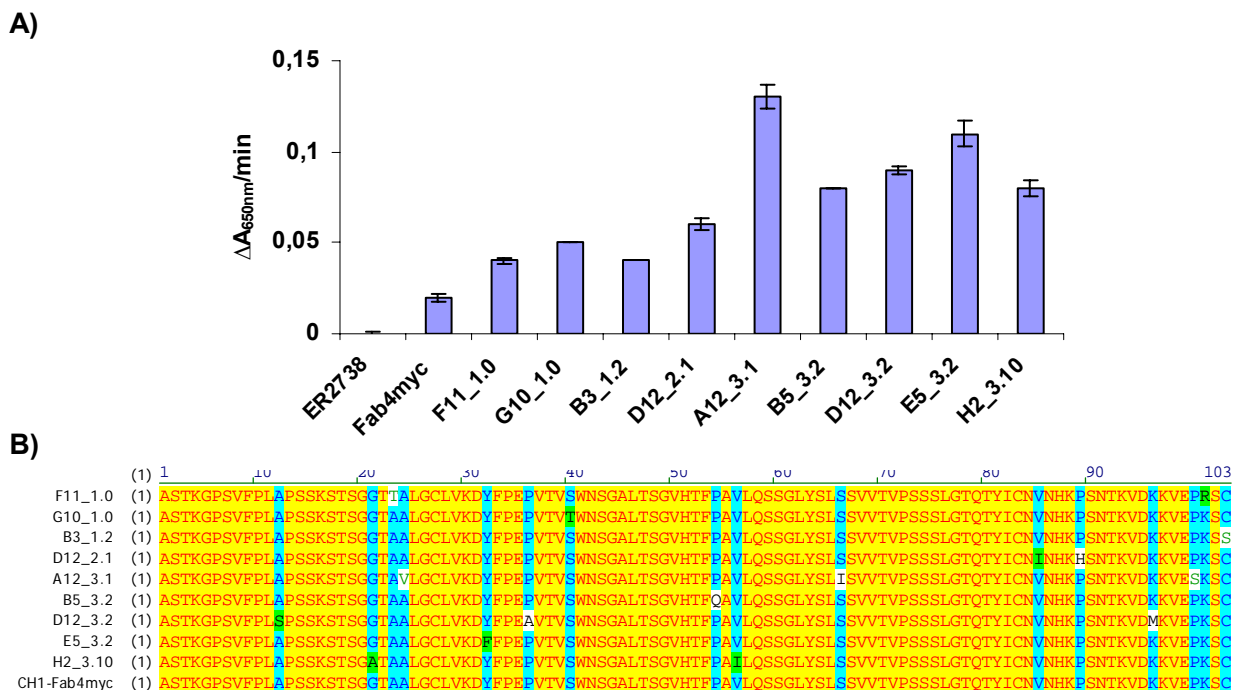


Abb. C-29: Ergebnis des *Pannings* der Bibliothek A-C_{H1}. A) Expressions-ELISA der besten neun Mutanten im Vergleich zu Fab4myc. Fab-Varianten (ER2738) wurden im 200 μl Maßstab kultiviert und Fab-Fragmente über 24 h bei 18°C exprimiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 100 μl Periplasma resuspendiert. Jede Vertiefung wurde mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ p24 beschichtet und mit 40 μl der Periplasmafraktion inkubiert. Der Nachweis gebundener Fab-Fragmente erfolgte mit dem Antikörpergemisch aus Maus α -Tetra-His-Antikörper 1:4000 und Schaf α -Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:7000, Substrat: TMB (SeramunBlau®fast). B) Proteinalignment der C_{H1}-Domäne der besten neun Fab-Varianten der ersten *Panning*-Runden. Die dargestellten Fab-Mutanten stellen zusammen die Basis für das folgende DNA-*Shuffling*.

Insgesamt wurden drei *Panning*-Zyklen durchgeführt und 2340 Klone mittels Expressions-ELISA auf lösliche Fab-Expression überprüft. Hierfür mussten die Klone zunächst im 96-Well-Mikrotiterplattenmaßstab kultiviert und exprimiert werden. Hierbei wurden pro Mikrotiterplatte

drei Positiv- und drei Negativkontrollen mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten nicht-Fab-codierende ER2738-Zellen. Als Positivkontrolle wurde zunächst Fab4myc eingesetzt. Im Verlauf der Selektionsrunden wurde diese Positivkontrolle weiter angepasst und entsprach dann der bis dahin besten Expressionsmutante. Es konnten 23 Mutanten mit einer verbesserten Fab-Expression auf diese Art und Weise aus der Bibliothek A-C_H1 selektiert werden. Die neun besten Varianten wurden zur Reproduzierbarkeit ein weiteres Mal im Mikrotiterplattenansatz exprimiert und im ELISA auf periplasmatische Fab-Produktion überprüft. Wie in Abb. C-29 A) gezeigt, besitzen alle mitgeführten Fab-Konstrukte eine bessere Expression an löslich exprimierten Fab-Fragmenten gegenüber dem Ausgangskonstrukt Fab4myc. Die Ergebnisse der zuvor durchgeführten *Panning*-Runden konnte somit reproduziert werden.

C.6.5 DNA-Shuffling

Das DNA-Shuffling ist eine Methode, mit der *in vitro* die Rekombination von homologen DNA-Sequenzen ermöglicht wird. Vorhandene Gensequenzen können dadurch neu gemischt oder neu kombiniert werden. Durch die Neukombination der in Abb. C-29 B) dargestellten Gene (ohne C_H1-Fab4myc) hofft man auf einen additiven Effekt positiver Mutationen und somit auf neue Varianten mit verbesserten Expressionseigenschaften.

Zunächst wurde die C_H1-Domäne der neun Mutanten in einem 110 µl PCR-Ansatz und den Primern pd1 und pd2 amplifiziert und deren Ausbeute mittels Gelelektrophorese kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die PCR-Produkte gepoolt und mit dem NucleoSpin[®] Extract II gereinigt (Ausbeute: 120 µl mit 311 ng/µl). Nach einem Vorversuch (Abb. C-30 A)) wurden 50 µl DNA mit 20 µl DNase I (2,5 Units), 10 µl DNase-Puffer und 10 µl H₂O für 10 min bei 25°C fragmentiert. Auf einem 2 % Agarosegel wurde die verdaute DNA aufgetragen und Fragmente zwischen 50 und 20 bp aus dem Gel herausgeschnitten. Nach der Gelreinigung (Abb. C-30, Bahn 1b) konnten 50 µl mit 86 ng DNA/µl eluiert werden.

2 µg der fragmentierten DNA wurde nach einem Vorversuch in einem 50 µl Standard-PCR Ansatz ohne Primer eingesetzt und nach dem Protokoll (siehe Material und Methoden) hybridisiert (Abb. C-30, Bahn 2b). Das Hybridisierungsprodukt wurde gereinigt und diente als *Template* für die letzte Amplifizierung der konstanten Domäne mit den Primern pd1 und pd2 (Tab. B-9). Insgesamt wurden 36 µl des Hybridisierungsproduktes für 5 x 100 µl PCR-Ansätze verwendet.

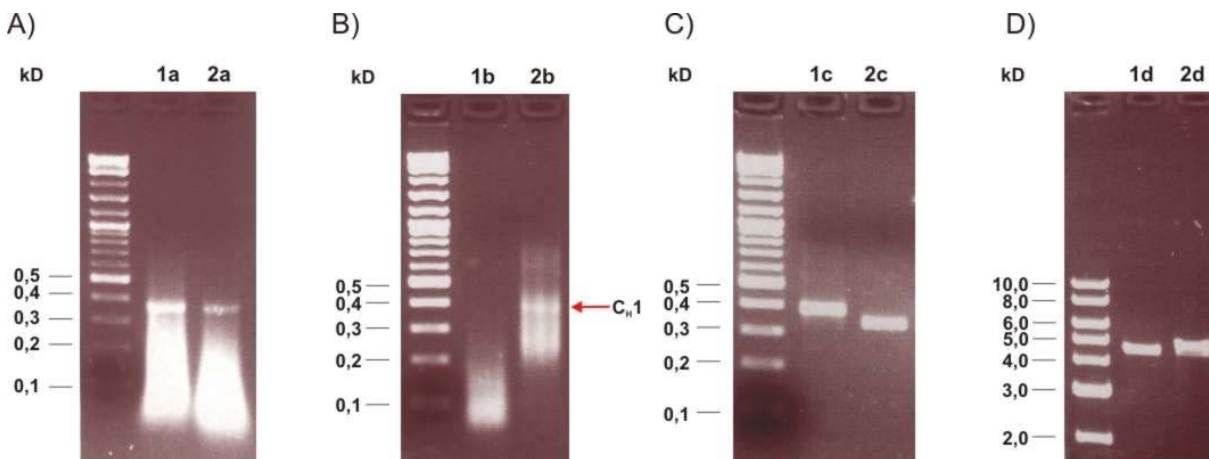


Abb. C-30: Dokumentation der DNA-*Shuffling*-Schritte. A) Vorversuch zum DNase I Verdau. 1,5 µg DNA wurden im 10 µl Ansatz mit 2,5 U DNase I (Bahn 1a) und 3 U DNase I (Bahn 2a) verdaut, 5 µl wurden auf das Gel aufgetragen. B) Hybridisierung fragmentierter DNA. Geextrahierte und gereinigte DNA der Größe von 50–200 bp aufgetragen in Bahn 1b. Bahn 2b zeigt das Hybridisierungsprodukt der fragmentierten DNA aus Bahn 1b. C) Amplifikation der C_{H1} -Domäne und dessen Restriktionsverdau. 1c PCR-Produkt nach Amplifikation des Hybridisierungsprodukts. 2c zeigt das PCR-Produkt nach Verdau mit EagI und NcoI. D) Ligationskontrolle. 1d zeigt nur Vektor-DNA, 2d das Ligationsprodukt aus Vektor und C_{H1} -Domäne nach DNA-*Shuffling*. Der eingesetzte DNA-Probenpuffer enthielt Xylenblau (Gel A), B) und C) anstelle von Bromphenolblau!

Anschließend wurde das PCR-Produkt im PCR-Mix mit EagI und NcoI verdaut (Abb. C-30 C)). Nach der Gelreinigung der verdauten C_{H1} -Domäne wurde sie mit Vektor-DNA im Verhältnis 1:3 (Vektor/ C_{H1} -Domäne) ligiert. Es wurden 9,75 µg Vektor und 2 µg C_{H1} -Domäne sowie H₂O für fünf min bei 50°C erhitzt und anschließend mit Ligasepuffer und T4-Ligase versehen. Die Ligation wurde 16 h bei 4°C in 25 µl Aliquots inkubiert.

C.6.6 Aufbau der Bibliothek A- C_{H1} -*shuffling*

Elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ (Stratagene) wurden in 15 Ansätzen und 6 µg der gereinigten und entsalzten Vektor-DNA transformiert. Dabei konnte eine Bibliothek mit einer theoretischen Komplexität von $2,8 \times 10^7$ generiert werden (Tab. C-4). Für die Gütekontrolle wurden acht Transformanten sequenziert (Daten nicht gezeigt).

C.6.7 Aufbau und *Panning* der Phagenbibliothek A- C_{H1} -*shuffling*

Nach Entsalzung der Phagemid-DNA wurden elektrokompetente *E. coli* ER2738 in vier Ansätzen mit 20 µg DNA transformiert. Dabei konnte eine Transformationsrate von 1×10^{10} erreicht werden. Die Transformanten wurden durch Kultivierung mit Helferphagen M13K07 in Phagenpartikel verpackt.

Das *Panning* wurde wie unter C.6.2 beschrieben und mit zusätzlichem Hitzeschritt durchgeführt. Insgesamt wurden bei drei *Panning*-Zyklen 1980 Klone mittels Expressions-ELISA gescreent und 31 positiv selektierte Klone sequenziert. Abb. C-31 zeigt das Proteinalignment der

selektierten Mutanten. Während die Ausgangsmutanten innerhalb des Gens insgesamt 16 Aminosäure-austausche aufwiesen (Abb. C-29), wurden nur 12 Positionen nach dem DNA-*Shuffling* wiedergefunden. Da die neun mutierten C_H1-Domänen in gleichen molekularen Verhältnissen für das DNA-*Shuffling* eingesetzt wurden, sollten alle Mutationen zu ca. 11 %, somit drei- bis viermal wiedergefunden werden. Stattdessen sind einige wenige (mit rotem Pfeil markiert) überrepräsentiert, während andere Mutationen gar nicht mehr auftauchten. So trat der Austausch A23→T in 58 % aller Mutanten auf, wohingegen der Austausch K101→R nicht wiedergefunden werden konnte. Beide Mutationen stammten aber von ein und derselben Mutante F11-1.0 ab und mussten daher auch gleich häufig vorhanden gewesen sein. Neben dem Austausch A23→T waren auch die Position Y32→F (19 %), S40→T (22 %) und die Position des C-terminalen Cysteins 103→S (48 %) überrepräsentiert.

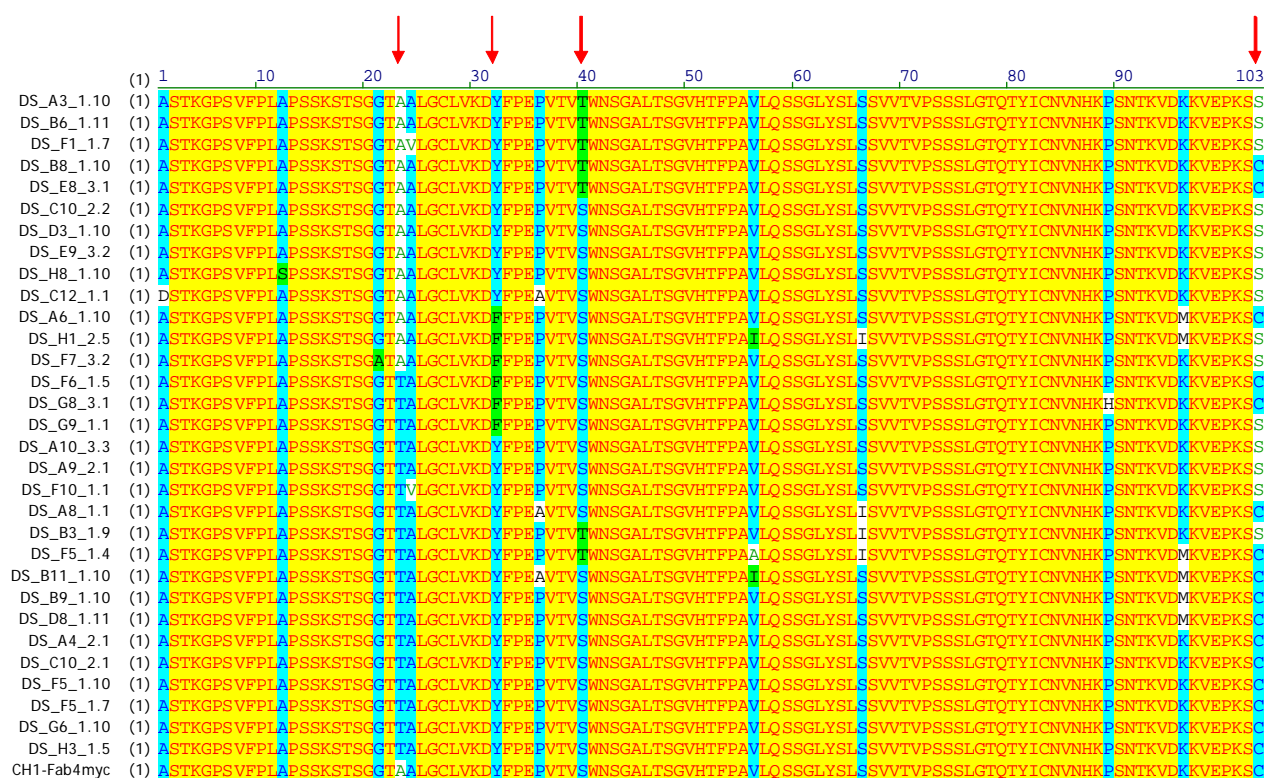
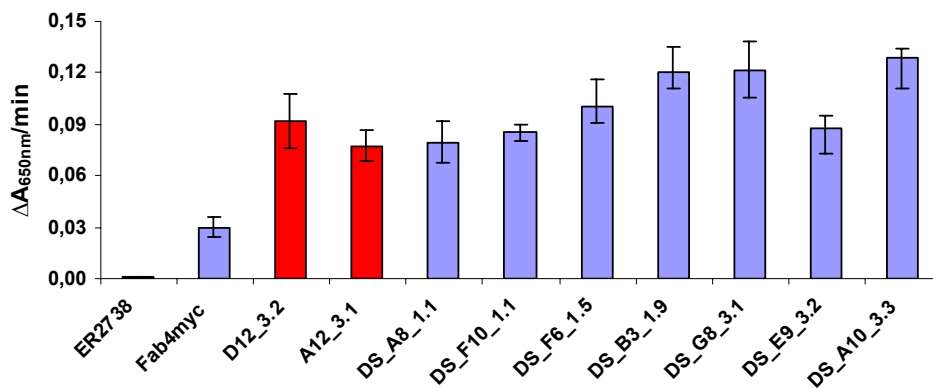


Abb. C-31: Proteinalignment der 31 selektierten Mutanten nach dem DNA-*Shuffling*. Rote Pfeile markieren Positionen mit überrepräsentierten Mutationen.

Alle 31 Varianten wurden im Mikrotiterplatten-Maßstab exprimiert und anschließend im ELISA auf funktionelle periplasmatische Fab-Konstrukte überprüft (Daten nicht gezeigt). Die sieben besten Varianten des DNA-*Shufflings* und zwei zusätzliche Variante aus den ersten *Panning*-Runden wurden für den Einbau der leichten randomisierten C_{Kappa}-Domäne ausgewählt. Einschließlich der nicht-randomisierten C_H1-Domäne (Fab4myc) wurden somit zehn Varianten

noch einmal im Mikrotiterplattenmaßstab exprimiert und die periplasmatischen Fab-Expressionen per ELISA kontrolliert. Abb. C-32 zeigt die Ergebnisse und bewies die Reproduzierbarkeit. Erwartungsgemäß hatten alle Mutanten eine wesentlich bessere Fab-Expression gegenüber dem Ausgangsprodukt. Durch das DNA-*Shuffling* konnten die zuvor besten Varianten noch einmal verbessert werden, A). Zusätzlich ist in Abb. C-32 das Alignment der bis dahin besten Varianten gezeigt, die gleichzeitig als Basis für den Einbau der leichten konstanten Domäne C_{Kappa} ausgewählt wurden.

A)



B)

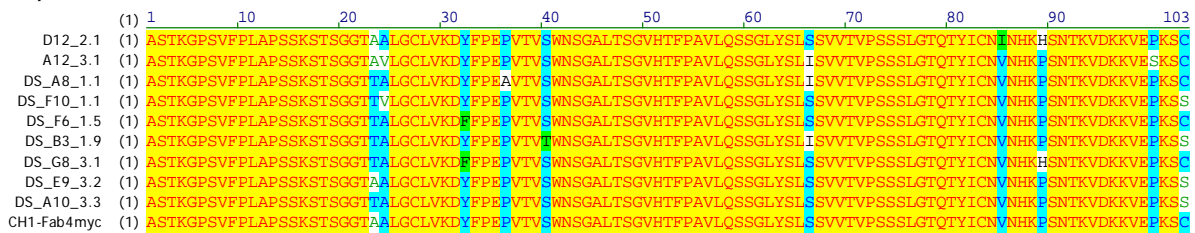


Abb. C-32: Expressions-ELISA ausgewählter Mutanten. A) Rot markierte Mutanten stammen aus dem ersten *Panning* der Bibliothek A-C_{H1}. Fab-Varianten wurden in ER2738-Zellen im 200 µl Maßstab kultiviert und über 24 h bei 18°C exprimiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 100 µl Periplasma resuspendiert. Vertiefungen wurden mit 1 µg/ml p24 beschichteten und mit 80 µl (Periplasmafraktion:Puffer = 1:1) inkubiert. Nachweis erfolgte über Antikörpergemisch aus Maus α-Tetra-His-Antikörper 1:4000 und α-Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:7000, Substrat: TMB (SeramunBlau®fast). Die Meßwertabweichung ließ sich aus vier unabhängigen Reihen darstellen. B) Proteinalignment der ausgewählten Mutanten aus A).

C.6.8 Bibliothek A-C_{H1}-*Shuffling*-C_{Kappa}

Gepoolte Vektor-DNA mit 10 µg Phagemidvektor der ausgewählten Mutanten wurden mit KpnI und EcoRV sequenziell verdaut und zweimal dephosphoryliert. Anschließend konnten 14,5 µg der Vektor-DNA mit ebenfalls KpnI/EcoRV verdauter C_{Kappa}-Domäne über Nacht und bei 4°C ligiert werden (20 bis 25 µl Aliquots). Elektrokompente *E. coli* XL1-Blue MRF' wurden anschließend in 24 Ansätzen mit 20 µg der entsalzten Vektor-DNA transformiert. Dabei konnte eine Bibliothek mit 1,6 x 10⁷ Transformanten generiert werden (Tab. C-4). Es wurden

24 Testsequenzierungen durchgeführt. Davon hatte ein Klon eine Deletion, fünf Klone ein Stopcodon und alle weiteren 18 Klone (75 %) waren funktionell.

C.6.9 Panning der A-C_{H1}-Shuffling-C_{Kappa} Bibliothek

Mit vier Ansätzen wurden elektrokompetente *E. coli* ER2738 mit 20 µg der amplifizierten Vektor-DNA transformiert und Phagen mit Hilfe der Inkubation von Helferphagen hergestellt. Anschließend wurde das bekannte Panning ohne Hitzeschritt durchgeführt.

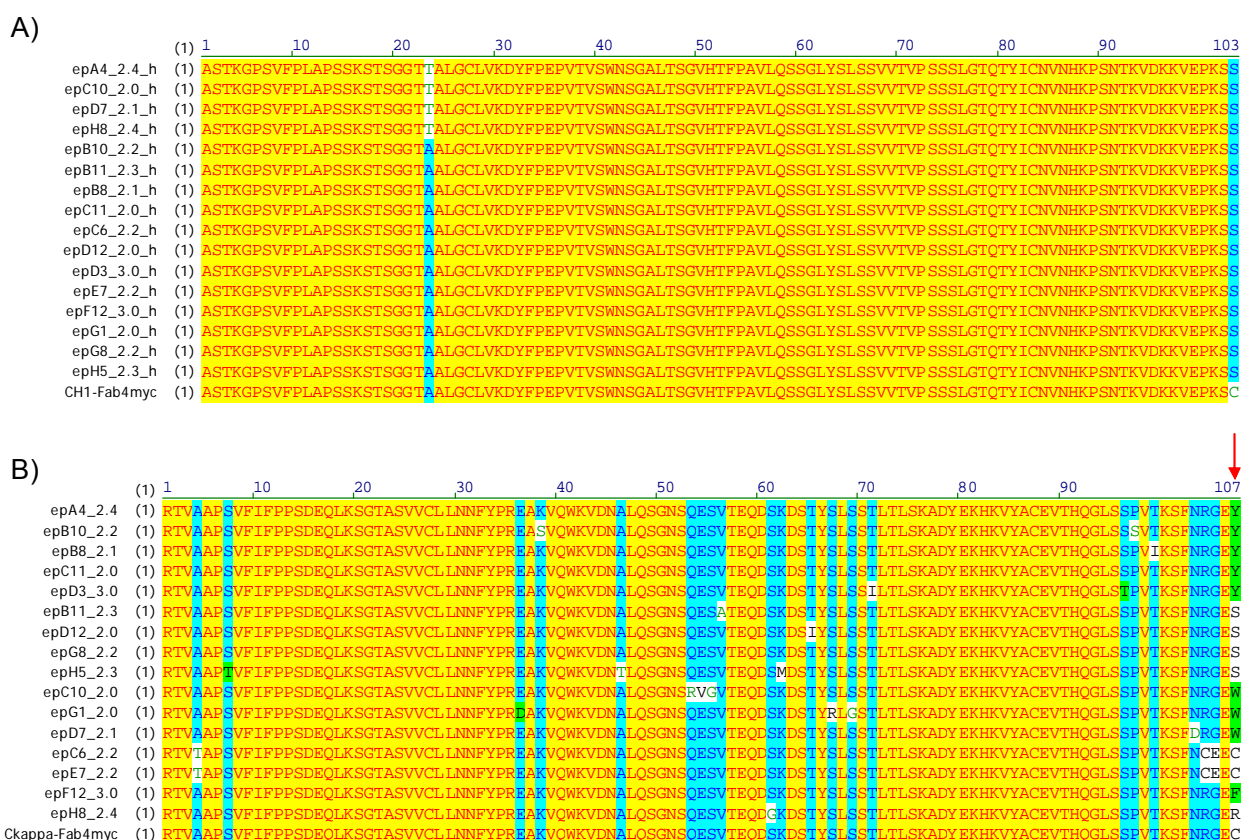


Abb. C-33: Proteinalignment der 16 selektierten Mutanten des 2. und 3. Pannings der Bibliothek A-C_{H1}-shuffling-C_{Kappa}. A) C_{H1}-Domäne. B) C_{Kappa}-Domäne.

Die Hitzeinaktivierung war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr erforderlich, da die schwere Kette in Form von ausgewählten Mutanten vorgegeben war und somit keine störenden Abbruchmutanten entstehen konnten. Insgesamt wurden wieder drei Panning-Runden durchgeführt. Dabei wurde der Anteil der eingesetzten Phagen von 1 x 10¹² in der ersten Panning-Runde auf 5 x 10¹⁰ in der zweiten Panning-Runde und bis auf 1 x 10⁹ in der dritten Panning-Runde reduziert. Insgesamt 720 Klone wurden auf ihre Expression hin überprüft. Sechzehn Mutanten konnten nach dem zweiten und dritten Panning positiv selektiert werden. In Abb. C-33 sind die mutierten konstanten Domänen der schweren A) und leichten Kette B) aufgelistet. Die Sequenzierung der

schweren Kette ergab, dass nur zwei der zehn eingesetzten C_{H1}-Domänen (Abb. C-33 A) und Abb. C-32) wiedergefunden wurden. Die Testsequenzierungen von 24 Klonen direkt nach der Transformation hatte bereits gezeigt, dass alle zehn Varianten in dieser Bibliothek vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Letztendlich konnte keine Fab-Variante mit intakter C-terminaler Disulfidbrücke mehr selektiert werden. Des Weiteren wurden auch keine Varianten mit einer freien Cysteingruppe gefunden. Die Mutanten epC6_2.2 und epE7_2.2 besitzen zwar noch das Cystein107, haben aber zusätzlich in unmittelbarer Umgebung ein zusätzliches Cystein durch Randomisierung hinzugewonnen, so dass man davon ausgehen kann, dass dort eine zusätzliche intramolekulare Disulfidbrücke entstanden ist. Die C-terminale Position des Cystein107 war die am häufigsten mutierte Position innerhalb der C_{Kappa}-Domäne (B) mit hoher Akzeptanz von aromatischen Aminosäuren (über 50 %).

C.7 Charakterisierung von Mutationsmutanten

Die bisherigen Expressionen im Mikrotitermaßstab wurden mit ER2738-Zellen durchgeführt. Vorteil dieser Zelllinie war, dass leicht zwischen Phagen-*Panning* und Expression gewechselt werden konnte. Diese Variante hatte jedoch den Nachteil, dass das Fusionsprotein der leichten Kette mit dem gekürzten pIII-Protein exprimiert wurde und somit keine herkömmlichen Fab-Fragmente generiert werden konnten. Da ein Einfluss der zusätzlichen pIII-Domäne auf Expression und Faltung nicht ausgeschlossen werden konnte, musste die Fab-Expression auf JM83 umgestellt werden. JM83 ist ein „non suppressor“ *E. coli*-Stamm, das heißt, es werden keine „TAG“ Stopcodons überlesen. Daher wurde auch ein TAG zwischen leichter Kette und pIII nicht überlesen und es wurde statt des Fusionsproteins nur die leichte Kette und somit nur das Fab-Konstrukt exprimiert. Um eine Auswahl für eine nähere Charakterisierung zu treffen, wurden JM83-Zellen mit allen 16 Konstrukten aus Abb. C-33 transformiert. Zusätzlich wurden JM83-Zellen für eine Transformation mit acht weiteren Mutanten aus vorhergehenden *Pannings* ausgewählt. Dabei stammten A12_3.1, B5_3.1, D12_3.2, E5_3.2 aus der ersten Bibliothek A-C_{H1}, die Varianten DS_F6_1.5 und DS_G8_3.1 aus der DNA-*Shuffling* Bibliothek A-C_{H1}-*Shuffling* und epD2_1.0, epH6_1.0 und epC12_1.1 aus dem 1. *Panning* der Bibliothek A-C_{H1}-*Shuffling*-C_{Kappa}. Nach erfolgreicher Transformation wurden alle Varianten vierfach in einem Mikrotiterplattenmaßstab von 200 µl exprimiert und anschließend im ELISA auf Expression überprüft.

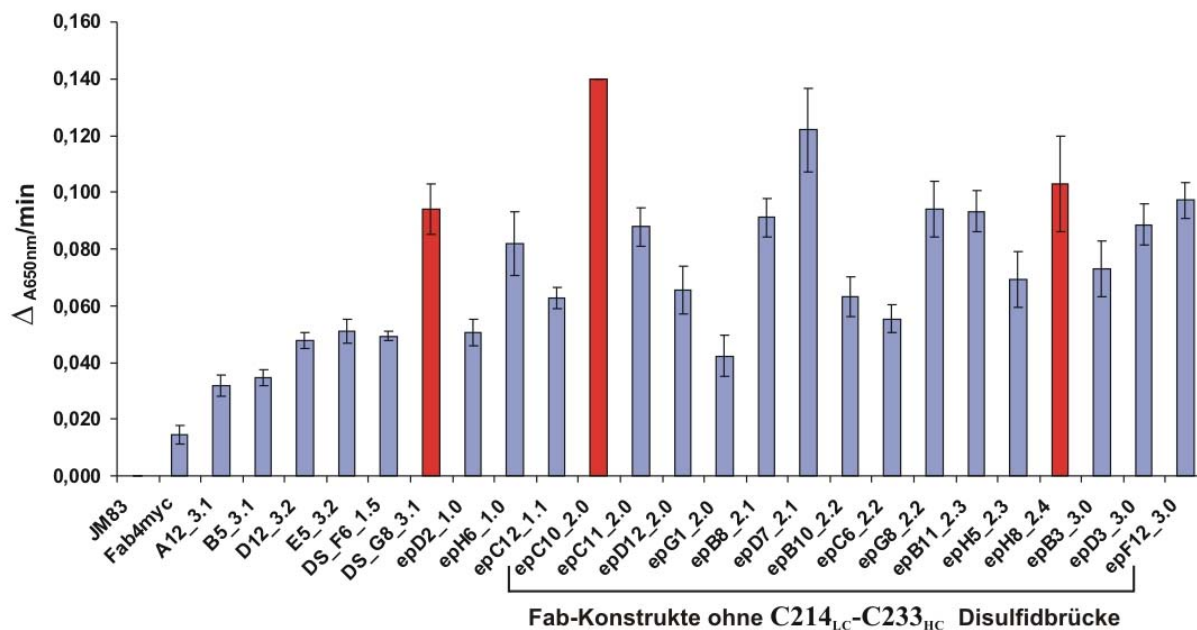


Abb. C-34: Expressions-ELISA in *E. coli* JM83. Fab-Varianten wurden im 200 μ l Maßstab kultiviert und Fab-Fragmente über 24 h bei 18°C exprimiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in 100 μ l Periplasma resuspendiert. Vertiefungen wurden mit 1 μ g/ml p24 beschichtet und mit 80 μ l (Periplasma-fraktion:Puffer = 1:1) inkubiert. Nachweis erfolgte über Antikörpergemisch aus Maus α -Tetra-His-Antikörper 1:4000 und α -Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:7000, Substrat: TMB (SeramunBlau®fast). Die Standardabweichung ließ sich aus vier unabhängigen Reihen berechnen. Rot markierte Mutanten wurden für eine weitere biochemische Charakterisierung ausgewählt.

Anhand der Expressionsergebnisse wurden die expressionsstärksten Mutanten für eine weitere Charakterisierung ausgewählt. Darunter die disulfidverbrückte Variante DS-G8_3.1 aus dem DNA-Shuffling, als auch die beiden nicht disulfidverbrückten Varianten epC10_2.0 und epH8_2.4. Die ebenfalls sehr gut exprimierende Mutante epD7_2.1 wurde aufgrund der gleichen Mutation in der Position 107 nicht beachtet (Abb. C-33).

C.7.1 Wachstumskurven von Selektionsmutanten

Es wurden Wachstumskurven unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen durchgeführt, um das Wachstumsverhalten der Mutanten untereinander zu vergleichen. Zusätzlich wurden Periplasma und Sphäroblasten auf die Fab-Expression hin überprüft. Das Zellwachstum wurde bei optimaler *E. coli* Wachstumstemperatur von 37°C durch Probenentnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten verfolgt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede unter den Konstrukten festgestellt werden (Abb. C-35 A)). Lediglich Wildtyp JM83-Zellen waren bei der Aufnahme von mehreren Wachstumskurven tendentiell etwas besser. Gleichzeitig wurde eine Wachstumskurve unter Induktion mit 0,2 μ g/ml aTc bei der optimalen Expressionstemperatur von 18°C durchgeführt.

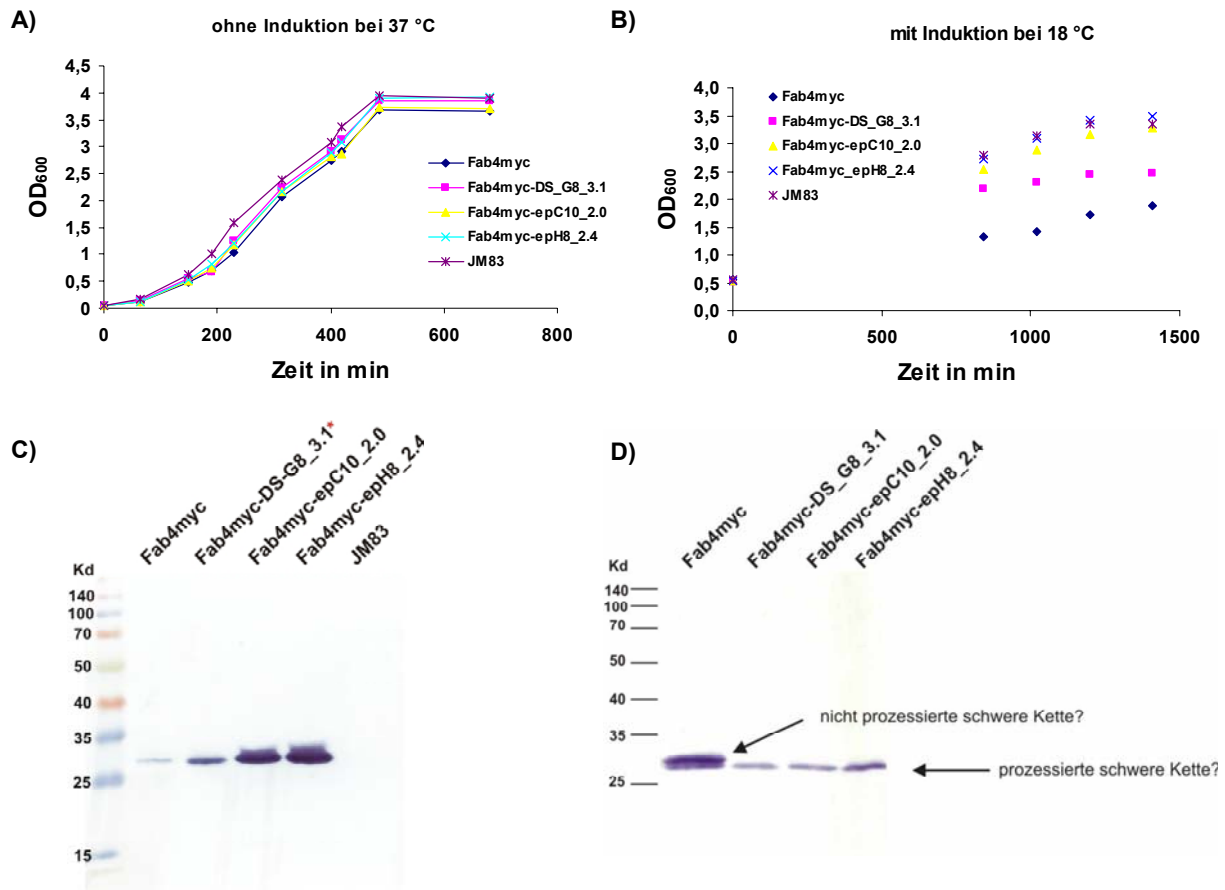


Abb. C-35: Wachstumskurven und Expressionsanalysen von Selektionsmutanten. A) Wachstumskurve bei 37°C, nicht induziert. B) Wachstumskurve während der Expression bei 18°C. Insgesamt wurden für die Werte von A) und B) jeweils vier Wachstumsreihen aufgenommen und gemittelt. C) Western-Blot nach 24 h Expression. 15 µl Periplasma (1,5 ml Kultur bzw. 750 µl Kultur*) wurden aufgetrennt und das Gel geblottet. Der Nachweis der schweren Kette erfolgte mit α-His-Tag-HRP (Sigma) 1:4000 und TMB (SeramunBlau®prec). D) Western-Blot von Sphäroblasten. Späroblasten von 150 µl Kultur und OD₆₀₀ = 2.0 (ausgeglichen) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit α-His-Tag-HRP (Sigma) 1:4000 und TMB (SeramunBlau®prec) nachgewiesen.

Hier zeigten sich deutliche Unterschiede im Wachstumsverlauf und in der maximal erreichten optischen Dichte (Abb. C-35 B)). Mutanten ohne intramolekulare Disulfidbrücke epC10_2.0 und epH8_2.4 sind unter den gleichen Bedingungen schneller gewachsen und konnten maximale OD₆₀₀-Werte von ca. 3,15 bis 3,5 nach 24 h erreichen. Ein nicht ganz so gutes Wachstumsverhalten zeigte dagegen die dritte Mutante DS_G8_3.1, die langsamer wuchs und im Maximum eine OD₆₀₀ von 2,4 bis 2,55 erreichte. Die geringste Wachstumsgeschwindigkeit hatte jedoch die Ausgangsvariante Fab4myc, die nach 24 h Expression maximal eine OD₆₀₀ von 1,8 bis 2,0 erreichen konnte. Zusätzlich zur Wachstumskurve wurde ein Western-Blot der exprimierten Fab-Varianten durchgeführt. Der Nachweis beruht auf dem His-Tag der schweren Kette. Ein Nachweis schwerer Ketten im Periplasma wird als Nachweis von kompletten Fab-Fragmenten angesehen, da einzelne schwere Ketten des CB4-1 nicht löslich exprimierbar sind

(Siehe Abschnitt C.4.2). Die Ergebnisse des Western-Blots deckten sich mit denen der Wachstumskurve unter Induktion und mit einem parallel durchgeführten ELISA (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Western-Blot wurde zur Analyse der Sphäroblasten herangezogen. Dabei konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Ausgangsvariante Fab4myc neben einer bei allen Varianten auftretenden Bande noch eine stärkere zusätzliche Bande zeigt, die knapp oberhalb der anderen Bande verläuft (Abb. C-35 D)).

C.7.2 Präparative Expression und Reinigung von Selektionsmutanten.

Die ausgewählten Fab-Fragmente einschließlich des Ausgangsprodukts mussten für eine weitere biochemische Charakterisierung bezüglich ihrer Affinität und Stabilität im Milligrammbereich zu mindestens 90 % gereinigt vorliegen. Ohne weiteres Umklonieren konnte die präparative Expression in JM83-Zellen durchgeführt werden. Dafür wurden die einzelnen Fab-Fragmente teilweise mehrmals in 3 x 1 Liter-Kolben LB-Cm Medium oder alternativ in LB-Cm-Sucrose-Medium exprimiert. Die Vorkultur wurde 1:100 für die Hauptkultur eingesetzt. Nachdem die Kultur bei 37°C bis $OD_{600} = 0,3$ gewachsen war, wurde die Kultur im Schüttler auf 18°C abgekühlt und bei einer $OD_{600} = 0,5$ mit aTc (Endkonzentration 0,2 µg/ml) induziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die periplasmatische Fab-Fraktion durch den Aufschluss mit Periplasmapuffer (1:100) isoliert. Das dialysierte und mit Benzoase behandelte Periplasma-Extrakt wurde per Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie, kurz IMAC, aufgereinigt. Abb. C-36 zeigt beispielhaft die Reinigung des Fab-Fragments epC10-2.0. Die Reinigung der anderen Konstrukte verlief analog und wurde daher nicht gezeigt. Die dialysierte Periplasmaprobe wurde auf 20 mM Imidazol eingestellt, auf die Säule aufgetragen und mit einem Gradienten zwischen 10 – 60 % Puffer B (30 bis 180 mM Imidazol) eluiert (Abb. C-36 A). Die während der Reinigung entnommenen Proben wurden mit SDS-PAGE und Western-Blot auf Fab-Expression kontrolliert. Im Medium-Überstand, dem Durchlauf und beim Waschen konnte kein Fab nachgewiesen werden. Allerdings konnten Fab-Rückstände in den Sphäroblasten ausgemacht werden, wo Fab-Konstrukte in Form von Einschlußkörpern häufig abgelegt werden. Des Weiteren fiel beim Umpuffern durch Dialyse ein Teil der Antikörperfragmente aus.

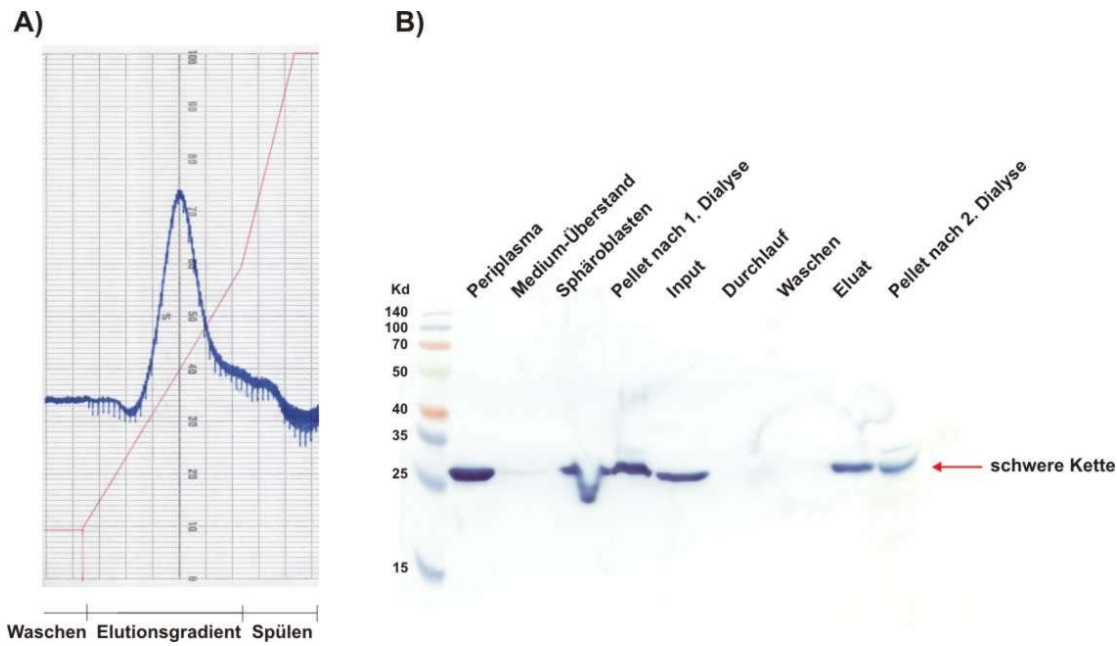


Abb. C-36: Reinigung der Mutante Fab4myc-epC10-2.0. A) Elutions-Chromatogramm der IMAC über His-Trap-Säule (Pharmacia). B) Western-Blot der einzelnen Reinigungsschritte. Pro Spur wurden 15 µl Probe geladen. Nach der Proteinauftrennung wurde das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet, die Membran mit 5 % Milch geblockt und mit α-His-Tag-HRP (Sigma) 1:4000 und TMB (SeramunBlau®prec) nachgewiesen.

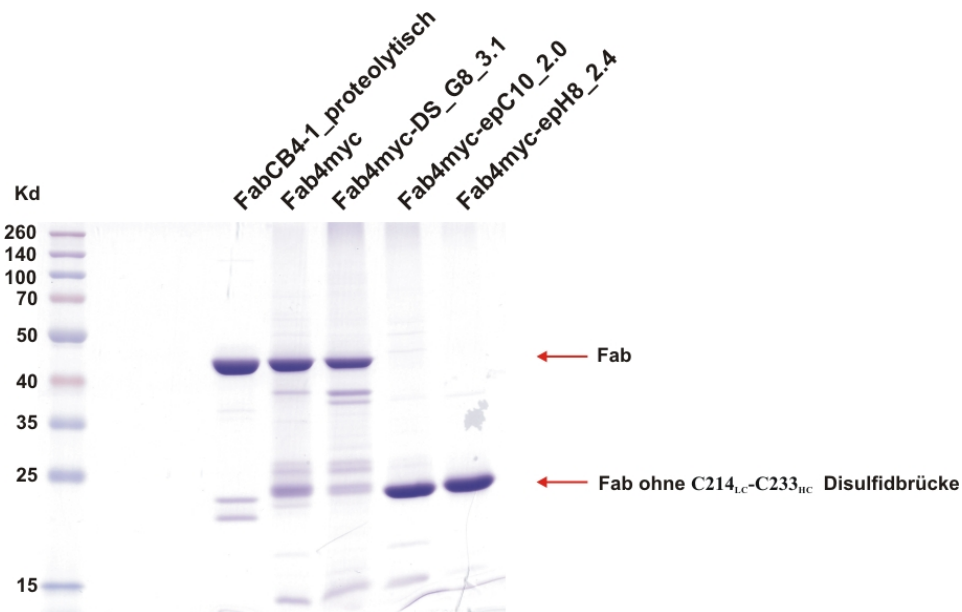


Abb. C-37: SDS-PAGE gereinigter Fab-Fragmente. Es wurden 4 µg des gereinigten Proteins im nicht reduzierten Probenpuffer pro Spur aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt.

Nach der Reinigung aller vier Fab-Konstrukte wurde die Reinheit mittel SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung überprüft. Als Positivkontrolle wurde hierbei eine Probe von

proteolytisch hergestellten FabCB4-1 verwendet. Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt, dass nicht disulfidverbrücktes Fab wesentlich sauberer von der Säule eluiert werden konnte, als Fab-Fragmente mit noch intakter Disulfidbrücke. Dieses Phänomen ist auch bei weiteren Reinigungen aufgetreten (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurde die Reinheit aller Fab-Fragmente für die weitere Untersuchung für ausreichend befunden.

C.7.3 Abschätzung der Fab-Fragment-Ausbeute in *E. coli*

Die Abschätzung löslich exprimierter Fab-Fragmente erfolgte mittels ELISA. Hierfür wurden 1 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten mit 80 µl 1:1 in PBS verdünnten Periplasmaproben inkubiert. Es wurden 25 µl Periplasma von Fab4myc und jeweils 5 µl der Mutanten wurden eingesetzt. Zusätzlich wurden verdünnte Fab-Fragmente der gereinigten Probe von Fab4myc-epH8_2.4 (Abb. C-37) als Protein-Standard eingesetzt. Anhand dieser Standards konnte die Fab-Menge in 25 µl bzw. 5 µl bestimmt und auf mg/L Kultur hochgerechnet werden.

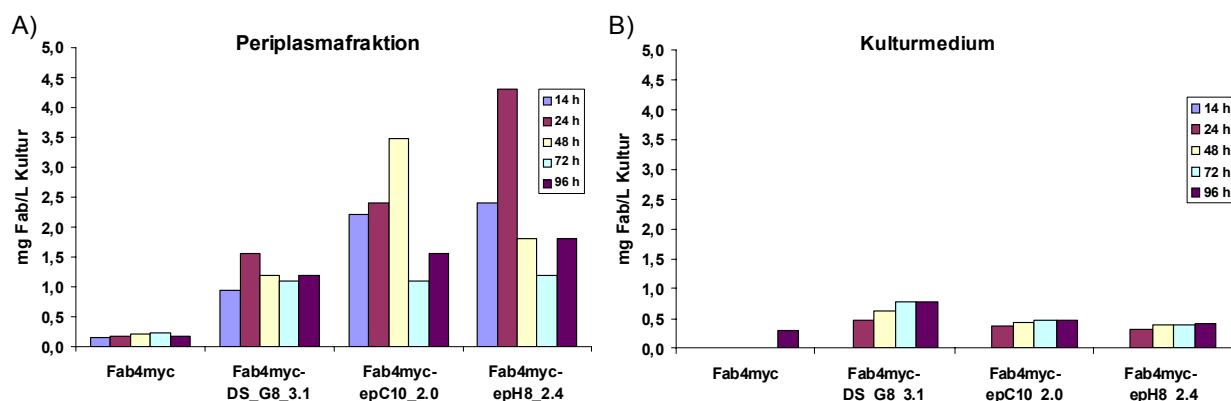


Abb. C-38: Abschätzung der Fab-Fragment-Ausbeute. Anhand von gereinigten Standards wurde bei ELISA-Versuchen die Fab-Ausbeute innerhalb der periplasmatischen Fraktion A) und innerhalb des Kulturmediums B) bestimmt und auf mg Fab pro Liter Kultur hochgerechnet.

Die Auswertung der ELISA-Ergebnisse zeigt, dass signifikant mehr Fab bei den ausgewählten Mutanten in der periplasmatischen Fraktion und im Kulturmedium angereichert wurde. Das Maximum in der periplasmatischen Fraktion wurde nach ca. 24 bis 48 h post Induktion erreicht. Für die bis dahin beste Fab-Variante Fab4myc-epH8_2.4 konnte die periplasmatische Fab-Expression von 160 µg/L Kultur (Fab4myc nach 24 h) auf ca. 4,3 mg/L Kultur gesteigert werden, was einem Faktor von 26 entspricht. Zusammen mit der mediumsezernierten Fraktion erhöhte sich der Faktor auf 28. Der Gesamtausbeutefaktor für Fab4myc-epC10_2.0 betrug 19 (nach 48 h), für Fab4myc-DS_G8_3.1 immerhin noch 12,5 (nach 24 h). Letztendlich konnte

durch die Optimierung der konstanten Domänen sowohl der periplasmatische Anteil, als auch der Anteil mediumsezernierter Fragmente deutlich erhöht werden.

C.7.4 K_D -Bestimmung mittels ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, dass geringe Modifizierungen der konstanten Domänen zu besseren Ausbeuten führen ohne dabei die Affinität des Fab-Fragments zu beeinflussen. Für den Beweis der Hypothese wurden K_D -Werte der gereinigten Fab-Konstrukte mittels ELISA bestimmt. Die Bindung des rekombinanten Fab4myc des Antikörpers CB4-1 und deren Expressionsmutanten an das Epitop-Peptid (GATPQDLNNTML) sowie die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_D erfolgte mit Hilfe eines enzymgekoppelten Verdrängungs-Immunoabsorptionstests nach Friguet [88]. Dieser Test basiert auf Verdrängung gebundener Fabs von der festen Phase (immobilisiertes p24) durch unterschiedliche Konzentrationen an frei löslichen Peptiden. Die Detektion der Bindung der Fab-Fragmente an immobilisierten p24 erfolgte über das Antikörpergemisch aus Maus- α -Tetra-His-Antikörper 1:4000 und α -Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:8000 und dem Substrat TMB (SeramunBlau[®] fast). Der K_D ergibt sich aus der Konzentration an frei löslichem Peptid, bei der das Bindungssignal halbmaximal ist. Insgesamt wurden pro Konstrukt vier unabhängige K_D -Werte an zwei verschiedenen Tagen bestimmt.

Tab. C-7: K_D -Bestimmung von Fab-Mutanten

Fab	CB4-1-Epitop-Peptid (GATPQDLNNTML)	
	K_D (M)	ΔG° (kJ/mol)
Fab4myc	$7,3 \pm 1,4 \times 10^{-10}$	-52,2
Fab4myc-DS_G8_3.1	$8,4 \pm 1,7 \times 10^{-10}$	-51,8
Fab4myc-epC10_2.0	$1,2 \pm 0,2 \times 10^{-9}$	-50,9
Fab4myc-epH8_2.4	$7,6 \pm 1,0 \times 10^{-10}$	-52,0

Die gemessenen Unterschiede waren im Fehlerbereich und es konnten somit keine Affinitätsveränderungen aufgrund modifizierter konstanter Domänen nachgewiesen werden.

C.7.5 Stabilität der Fab-Varianten gegenüber thermischer Denaturierung

Abb. C-39 zeigt die DSC-Thermodiagramme, die mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Sandro Keller (FMP-Berlin) erstellt wurden. Für Fab4myc und die ebenfalls disulfidverbrückte Mutante Fab4myc-DS_G8_2.4 konnten die gleichen maximalen Übergangstemperaturen von 68,9°C ermittelt werden. Da es bei der Messung der disulfidverbrückten Varianten Fab4myc und Fab4myc-DS_G8_3.1 zu einer exothermen Aggregation kam, konnten die Werte nicht thermodynamisch ausgewertet werden. Der Übergangspunkt zwischen dem nativen und denaturierten Zustand wurde daher auch nicht als T_m , sondern als T_{max} angegeben. Für die Konstrukte ohne intramolekulare Disulfidbrücke C214_{LC}-C233_{HC} Fab4myc-epC10_2.0 und Fab4myc-epH8_2.4 konnten die Übergangstemperaturen bei 64°C ($\Delta H = 688 \text{ kJ mol}^{-1}$) und 66,8°C ($\Delta H = 738 \text{ kJ mol}^{-1}$) ermittelt werden. Sie waren damit nur geringfügig niedriger als die des Ausgangskonstruktes Fab4myc.

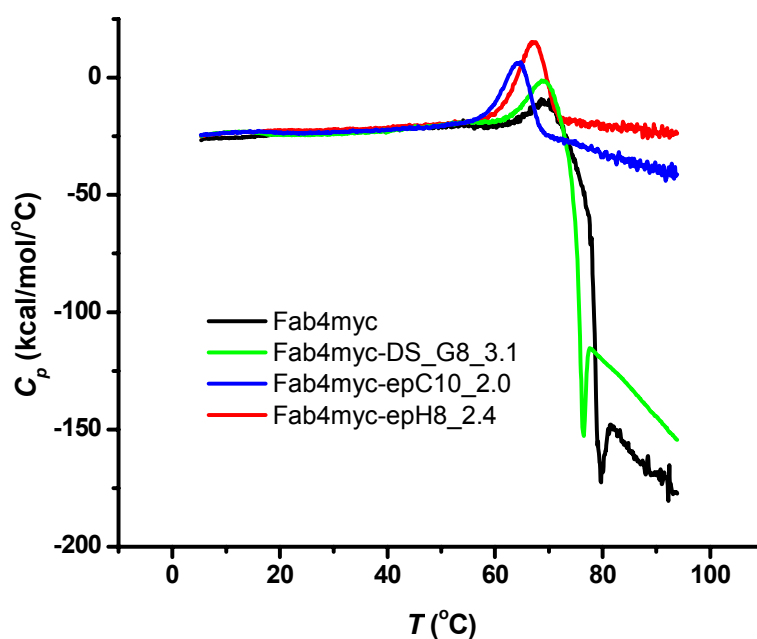


Abb. C-39: Basislinienkorrigierte DSC-Thermogramme der Selektionsmutanten.

C.7.6 Stabilität der Fab-Varianten gegenüber chemischer Denaturierung

Zusätzlich zur Bestimmung der Faltungstabilität durch thermische Denaturierungsstudien wurde die thermodynamische Stabilität der Fab-Varianten durch Denaturierung mit Guanidiniumchlorid (GdnHCl) untersucht. Hierzu wurde die Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an GdnHCl gemessen und die erhaltenen Entfaltungskurven nach der Methode von Clarke [92] ausgewertet (Abb. C-40).

Die Denaturierungskurven aller Fab-Varianten zeigten jeweils einen einstufigen Übergang, der für die Fab-Konstrukte mit intramolekularer Disulfidbrücke Fab4myc und Fab4myc-DS-G8_3.1 zu etwas höheren GdnHCl-Konzentrationen verschoben war. Unter den nicht kovalent verknüpften Konstrukten war die Denaturierungskurve von Fab4myc-epH8_2.4 zu etwas höheren GdnHCl-Konzentrationen verschoben. Die Ergebnisse stehen daher mit denen der thermischen Denaturierung im Einklang und sind in Tabelle Tab. C-8 zusammengefasst.

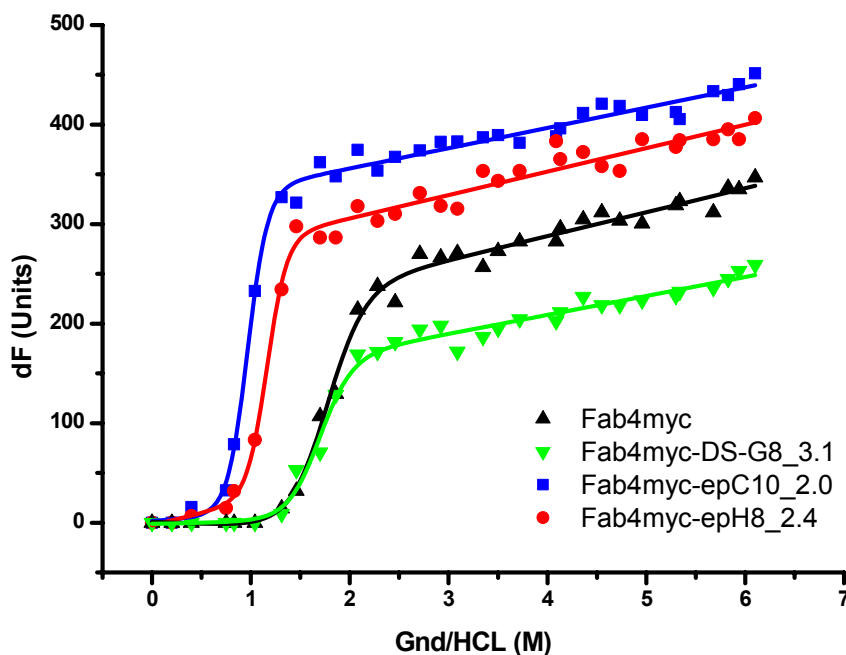


Abb. C-40: Chemische Denaturierung mittels GdnHCl. Die Werte sind zur Basislinie korrigiert und mittels Origin Software berechnet (siehe B.2.13). Die dargestellten Werte wurden am Fluoreszenz-Spektrometer (LS50B, Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und Emissionswellenlänge von 350 nm nach 13 Tagen und 25°C Inkubation gemessen.

Tab. C-8: Zusammenfassung der Ergebnisse der thermischen und chemischen Denaturierung

Fab	T_m °C	$[\text{GdnHCl}]^{50\%*}$ (M)
Fab4myc	68,9 (Tmax)	$1,76 \pm 0,037$
Fab4myc-DS_G8_3.1	68,9 (Tmax)	$1,69 \pm 0,043$
Fab4myc-epC10_2.0	$63,95 \pm 0,020$	$0,97 \pm 0,025$
Fab4myc-epH8_2.4	$66,88 \pm 0,021$	$1,16 \pm 0,029$

* Konzentration an GdnHCl am Übergangspunkt nativ → denaturiert

C.8 Übertragung von optimierten konstanten Domänen

Nachdem die Fab-Expression des Modellantikörpers CB4-1 um einen bis zu 28-fachen Faktor gesteigert werden konnte, wurde in einem weiteren Versuch die generelle Übertragbarkeit optimierter konstanter Domänen überprüft. Für die Untersuchung wurde das humanisierte Fab-Fragment muA9 [79], das nur in geringen Mengen rekombinant exprimiert werden konnte, von Arne Skerra (TU-München) freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Die variablen Domänen des muA9 Fab-Fragments V_H und V_L wurden durch PCR aus dem Vektor pASK88-muA9 amplifiziert. Die leichte variable Domäne V_L , sowie die Vektoren pSecFab4myc, pSec-Fab4myc-DS_G8_3.1, pSecFab4myc_epC10_2.0 und pSecFab4myc_epH8_2.4 wurden mit NcoI und KpnI verdaut. Anschließend wurden JM83-Zellen mit dem Ligationsansatz der gereinigten Vektorkonstrukte und der variablen Domäne transformiert. Anschließend wurden die neuen Vektoren mit XbaI und EagI verdaut, um sie mit der schweren variablen Domäne zu ligieren.

Parallel dazu wurde mehrmals versucht, die schwere variable Domäne V_H -muA9 zuerst in die optimierten Vektoren einzubauen, allerdings ohne Erfolg.

C.8.1 Expression des muA9 mit optimierten konstanten Domänen

Im 20 ml LB-Sucrose-Medium wurden die Konstrukte bei einer $OD_{600} = 0,5$ mit aTc induziert und 24 Stunden bei 18°C exprimiert. Dabei konnten die drei Fab-Konstrukte mit modifizierten konstanten Domänen mit optischen Dichten zwischen 5 und 5,7 doppelt so hohe Werte erreichen wie das Ausgangsprodukt im pASK- und pSec-Vektor (Daten nicht gezeigt). Das Pellet von 5 ml Kultur wurde in 60 µl Periplasmapuffer resuspendiert und mittels Western-Blot analysiert. Für die Untersuchung wurde das LB-Sucrose-Medium gewählt, da von einer sehr schlechten Expression ausgegangen werden musste und Sucrose sich besonders bei schlecht exprimierenden Fab-Fragmenten als vorteilhaft erwies. Abb. C-41 zeigt das Ergebnis von optimierten konstanten Domänen am Beispiel des muA9. Trotz des besseren Wachstums konnte weder eine bessere noch eine schlechtere Fab-Expression festgestellt werden. Die Mutanten verhielten sich bezüglich Ausbeute annähernd gleich. Die Übertragung der optimierten konstanten Domänen auf muA9 führte zu keiner verbesserten Expression. Um die Ursache genauer zu analysieren, wurde ein zusätzlicher Ansatz durchgeführt. Dabei sollten die Fab-Konstrukte bereits nach dem Einbau der variablen Domäne V_L -muA9 exprimiert werden (Abb. C-42). Die entstandenen Fab-Konstrukte enthielten somit alle die variable schwere Domäne V_H -CB4-1 und V_L -muA9. Die

Expression wurde analog zum kompletten muA9 durchgeführt. Abweichend davon wurde jedoch nur LB-Cm-Medium für die Expression verwendet.

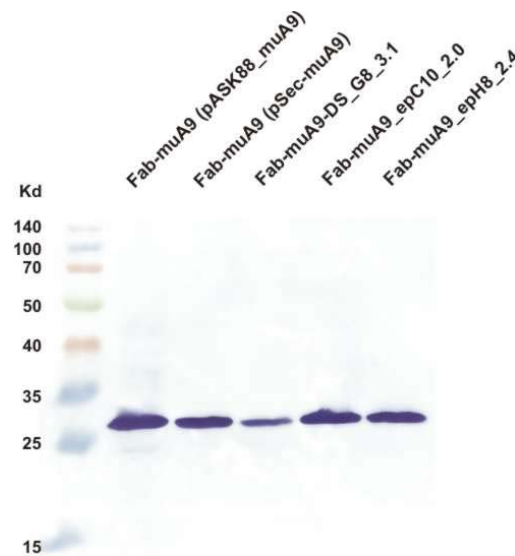


Abb. C-41: Western-Blot mit Fab-muA9. 15 μ l Periplasma wurden per SDS-PAGE pro Spur aufgetrennt, das Gel geblottet und die PVDF-Membran in 5 % Milch geblockt. Nachweis der Fab-Konstrukte über die schwere Kette mit @-His-Tag-HRP (Sigma) 1:4000 nachgewiesen, Substrat: TMB (SeramunBlau[®]prec).

Die Periplasmafraktion aus 10 ml Kultur wurde durch Resuspendieren der Zellpellets mit 120 μ l Periplasmapuffer gewonnen. Für den Nachweis der Fab-Expression wurde ein Western-Blot durchgeführt. Da von einer schlechten Fab-Expression ausgegangen werden musste, wurde die eingesetzte Konzentration des Wildtyp-Konstruktes pASK-muA9 und die des Fab4myc-V_L-muA9 auf das Zehnfache erhöht. Alle weiteren Konstrukte wurden einfach eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde die optimierte Variante Fab4myc-epH8_2.4 mitgeführt (Abb. C-42).

Obwohl das zu optimierende Fab-muA9 zehnfach höher konzentriert eingesetzt wurde, konnte keine Fab-Expression nachgewiesen werden. Somit war diese Konzentration noch nicht ausreichend, um ein Signal zu liefern. Dies stellt keinen Widerspruch zu Abb. C-41 dar, wo das Fab-muA9 nach-zuweisen war. Die Kulturbedingungen beider Versuche stimmten nicht überein, da im ersten Fall LB-Sucrose, im zweiten Mal nur LB-Medium für die Expression verwendet wurde. Eigene Expressions-untersuchungen haben gezeigt, dass Kulturmedien einen hohen Einfluss auf die Fab-Expression haben können.

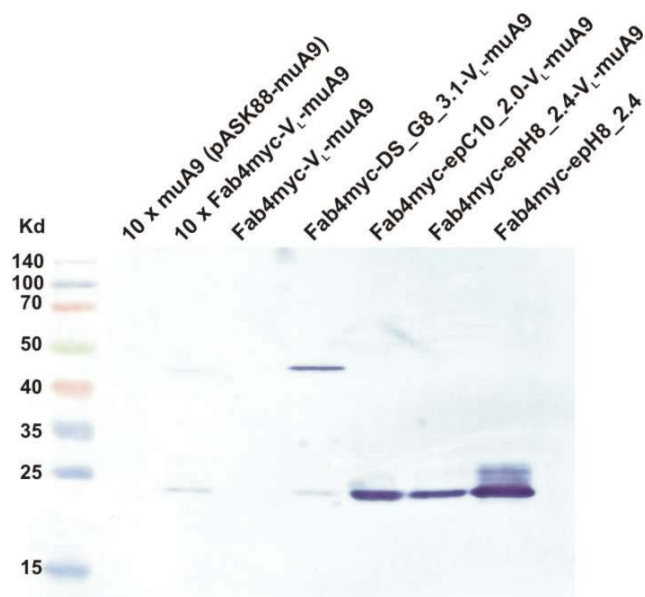


Abb. C-42: Western Blot mit Fab-Konstrukten mit V_L -muA9. 15 μ l bzw. 15 μ l (1:10) Periplasma wurden per SDS-PAGE pro Spur aufgetrennt, das Gel geblottet und die PVDF-Membran in 5 % Milch geblockt. Nachweis der Fab-Konstrukte über die schwere Kette mit α -His-Tag-HRP (Sigma) 1:4000 nachgewiesen, Substrat: TMB (SeramunBlau[®]prec).

Wird die variable Domäne V_L -muA9 auf das Ausgangskonstrukt Fab4myc übertragen, so kann nur bei zehnfacher Konzentration eine sehr schwache Fab-Bande ausgemacht werden. Wird dagegen V_L -muA9 auf die optimierten Varianten übertragen, kann die schwere Kette schon bei einfacher Konzentration sehr gut sichtbar nachgewiesen werden und ist fast so stark wie die Bande der besten Selektionsmutante Fab4myc-epH8_2.4. Demnach hatte V_L -muA9 keinen negativen Einfluss auf die Expressionsfähigkeit des Fab-Fragments und das Problem der Fab-Expression des muA9 liegt somit bei der schweren variablen Domäne V_H -muA9.

D DISKUSSION

Antikörper sind gegenwärtig die wichtigsten Forschungsbestandteile der biopharmazeutischen Industrie. Neben dem Einsatz von Fab-Fragmenten im Phagen-Display für die Entwicklung von Biopharmaka spielt das Fab-Format auch eine wichtige Rolle im Bereich wissenschaftlicher, biotechnologischer und medizinisch-diagnostischer Anwendungen. Dementsprechend hoch ist das Interesse, die Expression von löslichen und funktionellen Fab-Fragmenten in *E. coli* zu steigern. Die Modifizierung von konstanten Domänen von Fab-Fragmenten für eine verbesserte Expression in *E. coli* wurde bisher nicht systematisch untersucht. Deshalb wurden für die Optimierung der konstanten Domänen zwei Strategien verfolgt. Eine Bibliothek wurde mit Hilfe von *Error-prone-PCR* zufällig randomisiert, während zwei weitere Bibliotheken nach „Hotspotanalysen“ lokal randomisiert wurden.

D.1 Aufbau von Antikörpergenbibliotheken

Für die Einführung von zufälligen Mutationen wurden drei aufeinanderfolgende *Error-prone-PCRs* mit jeweils ca. 1 ng *Template* durchgeführt, wobei insgesamt eine Mutationsrate von 11,5 Punktmutationen pro 1000 bp innerhalb der leichten und schweren konstanten Domäne erreicht werden konnte. Laut Hersteller wird pro PCR eine Mutationsrate von 9-16 erreicht und liegt somit ca. dreimal so hoch. Da die Mutationsrate und die Qualität der Bibliothek mit ca. 77 % für ausreichend befunden wurde, konnte ohne weitere Optimierung fortgefahren werden. Eine erhöhte Mutationsrate wäre nur unter Qualitätsverlusten möglich gewesen. Hierfür wären zusätzlich *nested* Primer notwendig, da die Veränderung der PCR-Produkt-Enden nach der dritten Runde keine weitere PCR mit den verwendeten Primern mehr zuließ. Der Qualitätsverlust von *Error-prone-Bibliotheken* infolge einer erhöhten Mutationsrate und der damit verbundenen Häufung von Stopcodons und Deletionen ist ein Nachteil des Verfahrens. Des Weiteren können mit herkömmlichen *Error-prone-PCRs* nur rein theoretisch alle Aminosäuren an jeder Position dargestellt werden. Da dies in den meisten Fällen die Mutation von zwei Positionen innerhalb eines Triplets erfordert, steht praktisch gesehen nur der begrenzte Satz von Aminosäuren zur Verfügung, der durch einen einfachen Basenaustausch generiert werden kann. Dies wird zusätzlich beeinflusst durch unterschiedliche Prioritäten beim Basenaustausch. Eine Alternative bietet die von Schwanberg und Kollegen entwickelte Methode der *Sequenz Saturation Mutagenesis* (SeSaM) Technologie [97]. Der Vorteil der Methode besteht darin, dass erstmals

Mutationen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit an jeder Position des DNA-Moleküls entstehen können, und dass sogar multiple, direkt benachbarte Mutationen innerhalb eines Codons möglich sind.

Ein weiterer Ansatz war die lokale Randomisierung von ausgewählten Positionen innerhalb der konstanten Domänen (siehe dazu Abb. C-24 und Abb. C-25). Die Sequenzierung von Mutanten ergab, dass innerhalb der Primerbindungsregionen übermäßig häufig Deletionen auftraten und somit die Qualität der Bibliothek in Mitleidenschaft gezogen wurde. Die Anzahl der verwendeten Primer von acht (C_H1) bzw. fünf (C_{Kappa}) potenzierten diesen Effekt. Abb. C-26 zeigt, dass fünf von acht Mutanten bereits direkt nach der Elektroporation Deletionen im Bereich des Primers lp7rev aufwiesen. Des Weiteren wiesen zwei der acht Mutanten zwei Deletionen innerhalb des Primers aus, obwohl der Primer mit der höchsten Reinheit bestellt wurde (Gelreinigung). Da die Zellen nach der Elektroporation nur ca. eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden, kann dieser Effekt auch nur teilweise dem *in vivo*-Selektionsdruck zugesprochen werden. Letztendlich war die Primerqualität (MWG Biotech) unzureichend und daher für den Aufbau von Bibliotheken ungeeignet. Neben der Wahl des Oligoherstellers muss auch die Art der Synthese diskutiert werden. Für die Einführung von lokalen Mutationen wurden sogenannte „Wobbleprimer“ verwendet. Dabei wurden die zu modifizierenden Aminosäurepositionen nach dem *single-letter code* mit „NNB“ bzw. „VNN“ angegeben, die den Einbau aller Aminosäuren in dieser Position zulassen, während die Synthese der Stopcodons „TGA“ und „TAA“ ausgeschlossen ist. Die weiterhin mögliche Synthese des Stopcodon „TAG“ reduzierte dennoch die Qualität der Bibliothek erheblich. Ein Nachteil der Synthese per *single letter code* ist, dass durch Verwendung unterschiedlicher Codes zwar die Stopcodon-Synthese theoretisch verhindert wird, dabei aber alle Aminosäuren nicht im gleichen Verhältnis eingebaut werden können und auch die Optimierung in Bezug auf Codon-Verwendung (*codon usage*) nicht möglich ist. Eine wesentlich bessere Variante bietet die Herstellung mittels *Trinucleotid-Mutagenese*-Technologie (TRIM), wobei fertige Tripletts statt einzelner Basen eingebaut werden. Dadurch können *codon usage* optimierte Codons verwendet werden. Bei diesem Verfahren kann an jeder beliebigen zu randomisierenden Position die Auswahl der Aminosäuren und deren prozentualer Anteil selbst bestimmt werden. Die Synthese von Stopcodons ist dabei ausgeschlossen. Die Methode hat darüber hinaus den Vorteil, dass (n-1)-Produkte nicht zu *Escape*-Mutanten führen, da durch den Wegfall eines Tripletts die Sequenz immer noch *in frame* ist. Für den Fall, dass (n-1)-Produkte nicht erwünscht sind, können sie aufgrund des Größenunterschieds auch leichter von korrekten Primern durch HPLC oder Gelreinigung abgetrennt werden. Die Reinigung von herkömmlichen

Wobbleprimern ist diesbezüglich schwieriger, da Primerlängen mit nur ein bis zwei Basen Unterschied schwer getrennt werden können. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung haben Wobbleprimer naturgemäß keine scharfe Bande weder im Gel noch in der HPLC. Die Bandenunschärfe nimmt mit dem Anteil der Wobblepositionen eines Primers zu. Da die Primersynthese mittels TRIM-Technologie nicht generell verfügbar und zudem erheblich teurer ist, wurde von der Verwendung dieser Methode abgesehen.

Ein weiteres Problem beim Einbau der Bibliotheken in den Phagemidvektor war die Verwendung des *blunt end* schneidenden Restriktionsenzym EcoRV. Dies führte zum gehäuftem Auftreten von falsch ligierten Mutanten.

D.2 Grenzen des konventionellen Phagen-Displays

Eine große Herausforderung bei *Phagen-Display*-Experimenten besteht darin, die Phagen-Herstellung und den Selektionsprozess so zu gestalten, dass tatsächlich Proteine mit den gewünschten Eigenschaften selektiert werden. Neben der eigentlichen Selektion im *Panning* ist der gesamte *Phagen-Display*-Prozess verschiedenen Selektionsdrücken ausgesetzt. Ein in diesem Zusammenhang beobachtetes Phänomen war die Anreicherung von sogenannten *Escape*-Mutanten (z.B. Abb. C-26 und Abb. C-27). Diese Mutanten zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Expression der zu präsentierenden Fab-Fragmente beeinträchtigen oder zur Expression von verkürzten Varianten der ursprünglichen Fab-Fragmente führen. Darüber hinaus exprimieren durch Rasterschubmutationen oder Falschligationen entstandene *Escape*-Mutanten häufig verstümmelte Proteine mit stark hydrophoben Aminosäuresequenzen. Die Ursache für die Anreicherung dieser Mutanten liegt zum einen darin, dass durch diese hydrophoben Peptide die produzierten Phagen unspezifisch an die *Panning*-Matrix, möglicherweise auch untereinander, binden. Zum anderen unterliegt die Wirtszelle durch die verminderte Proteinproduktion bei *Escape*-Mutanten während der rekombinanten Phagen-Produktion einer geringeren metabolischen Last. Dies ist besonders stark ausgeprägt bei Antikörpergenbibliotheken, da Antikörperdomänen, wie auch die des Fab4myc, zu Aggregation (Abb. C-35 D)) neigen und daher toxisch für *E. coli* sind. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird dadurch zum Teil erheblich vermindert (Abb. C-35 B)), was die Produktion rekombinanter Phagen reduziert. Des Weiteren beeinträchtigt die Expression des pIII zusätzlich das Zellwachstum. Die toxische Eigenschaft des pIII und der Antikörperketten verschafft *Escape*-Mutanten einen *in vivo*-Selektionsvorteil (Abb. C-23 und Abb. C-26), der unabhängig von der eigentlichen *in vitro*-Selektion ist [98-101].

Dieser *in vivo*-Selektionsdruck kann auch bei allen weiteren Schritten (Plasmidamplifikation,

Reinfektion und Zellanzucht), die keine Expression der LC-pIII-Fusionsproteine und der schweren Kette erfordern, nicht ausgeschlossen werden. Verantwortlich ist die sogenannte Hintergrundexpression der verwendeten Promotoren. So basieren die meisten Phagen-Display-Systeme auf der Verwendung des Lac-Promotors, der prinzipiell bei nicht-induzierten Bedingungen eine Hintergrundexpression aufweist. Erste Versuche, diese Hintergrundexpression zu reduzieren, bestanden darin, durch Überexpression des Lac-Repressors den Promotor stärker zu reprimieren oder durch Zugabe von Glukose die Repression des Promotors durch CAP (*catabolic activator protein*) zu steigern [45, 102, 103]. Krebber und Kollegen kombinierten diese beiden Ansätze und fügten darüber hinaus einen starken Terminator (HP-Terminator) unmittelbar vor dem Lac-Promotor ein [99]. Dieser zusätzliche Transkriptionsterminator sollte die Hintergrundexpression unterbinden, die durch Transkriptionsinitiation an anderen Orten des Plasmides hervorgerufen werden kann. Im Kontext dieser Bemühungen wurde in unserem Labor versucht, ein Phagen-Display-System zu entwickeln, das unter der stringenten Kontrolle des *tet*-Promotors [93] kontrolliert wird [94]. Dieses Promotorsystem wurde daraufhin auch in dieser Arbeit eingesetzt. Die Überprüfung der stringenten Expressionskontrolle wurde unter nicht-induzierten Bedingungen mittels Western-Blot überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass auch der *tet*-Promotor unter den verwendeten Bedingungen eine Hintergrundexpression aufweist (Abb. C-19). Die Frage nach einem geeigneten Promotorsystem kann nur schwer beantwortet werden, da es meines Wissens bisher keinen systematischen Vergleich der im Phagen-Display verwendeten Promotoren gibt.

Im Falle der konstruierten Antikörpergenbibliotheken ist die beschriebene Hintergrundexpression mitverantwortlich dafür, dass die Qualität und somit die Komplexität der Bibliotheken während der ersten und zweiten Sequenzierung (nach dem Einbau der zweiten Domäne C_{H1}) stark abnimmt (Tab. C-3). Mutanten mit Stopcodons, Deletionen oder Falschligationen hatten demnach einen Wachstumsvorteil gegenüber den funktionellen Fab-Fragmenten und reicherten sich übermäßig stark an. Die Bildung von Escape-Mutanten während des Phagen-Displays der Bibliotheken A- C_{Kappa} - C_{H1} , B- C_{Kappa} - C_{H1} , C- C_{Kappa} - C_{H1} führte zu häufig unspezifischen Bindern, die während des *Pannings* nicht abgetrennt werden konnten. Daraufhin wurde die Selektion mit diesen Bibliotheken eingestellt. Für die qualitativ besseren Bibliotheken konnte diese Hintergrundexpression auch positiv genutzt werden, da bereits nach 2 bis 3 *Panning*-Runden Mutanten mit einer verbesserten Expression selektiert werden konnten.

D.3 Funktionelle Fab-Expression in *E.coli*

Die Expression löslicher, funktioneller Fab-Fragmente erfolgte unter der Kontrolle des *tet*-Promotors in *E. coli* Zellen ER2738 und JM83. Die Expression in ER2738 konnte parallel zum Phagen-Display ohne zusätzliche Transformation durchgeführt werden. Im Gegensatz zu JM83 wird in ER2738-Zellen noch das Fusionsprotein der leichten Kette mit pIII exprimiert. Inwiefern das zusätzliche pIII die Expression stört oder behindert, wurde im Detail nicht überprüft. Die Kontrollexpressionen in JM83-Zellen und visuelle Überprüfungen der ELISA-Ergebnisse lassen aber auf keine Unterschiede schließen. Zusätzlich zu der Expression vollständiger Fab-Fragmente wurde auch die Expression der einzelnen Ketten des Fragments untersucht. Danach war die Expression der schweren Kette V_H-C_{H1} allein nicht möglich, wohingegen die leichte Kette V_L-C_{Kappa} , wenn auch in geringen Mengen, exprimiert werden konnte (Abb. C-18). Für den Nachweis funktioneller Fab-Fragmente reichte daher der Nachweis der schweren Kette mittels α -His-Tag-Antikörper aus.

Durch die Modifizierung innerhalb der humanen konstanten Domänen C_{H1} (IgG1) und C_{Kappa} konnte die funktionelle Fab-Expression (JM83, ohne pIII) in *E. coli* erheblich verbessert werden. Die Ausbeute konnte mit Hilfe von Fab4myc-DS-G8_3.1, Fab4myc-epC10_2.0, Fab4myc-epH8_2.4 um das 12,5-, 19- bzw. 28-fache gesteigert werden. Die Angaben betreffen die Gesamtausbeute sowohl von periplasmatischer als auch Medium-sezernierter Fraktion. Die funktionelle Fab-Ausbeute wurde hierbei über einen hochgereinigten Protein-Standard der Variante Fab4myc-epH8_2.4 bestimmt. Bei der Messung wurde davon ausgegangen, dass eine Reduzierung der Konzentration nicht zur Dissoziation der beiden nicht-kovalent verbundenen Domänen führt. Dabei konnten auch geringe Proteinnengen bis zu 12,5 ng (3 nM) Protein gemessen werden. Die Expressionsverbesserung ist dabei nur auf die veränderte Aminosäuresequenz zurückzuführen, da keine der drei charakterisierten Mutanten noch zusätzliche stille Mutationen im Sinne des *codon usage* besaßen. Neben der Aminosäurezusammensetzung der konstanten Domänen spielt auch die Expressionstemperatur eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Fab-Expression umso besser ist, je geringer die Expressionstemperatur gewählt wird (Abb. C-9). Möglicherweise sind geringere Temperaturen und die damit verbundene langsamere Expression der Proteine vorteilhaft für den Transport, Faltung und Assemblierung der beiden Ketten. Neben der Expressionstemperatur hatte auch die Wahl des Mediums einen erheblichen Einfluss auf die lösliche Fab-Expression. So konnte die Fab-Ausbeute des Ausgangskonstruktes Fab4myc unter Verwendung des LB-Sucrose-Mediums bis zu Faktor 5 gesteigert werden, während der Einfluss

des Mediums auf die Mutanten gering war. Das LB-Sucrose-Medium hatte somit in erster Linie nur einen positiven Effekt bei Fab-Varianten mit sehr geringen Ausbeuten. Durch die Verwendung des Sucrose-Mediums konnte gezeigt werden, dass besonders der Anteil mediumsezernierter Fab-Fragmente stark reduziert wird (Daten nicht gezeigt). Offenbar wird die Zellmembran durch Sucrose stabilisiert. Warum dadurch die Fab-Expression unterstützt werden kann, bleibt ungeklärt. Letztendlich hatte das LB-Sucrose-Medium einen positiven Effekt auf die maximale optische Dichte. Sie war im Schnitt bei allen Varianten ca. 1,7 mal höher als beim LB-Medium. Des Weiteren war das Expressionsprofil der Sphäroblasten identisch mit dem unter LB-Bedingungen (Abb. C-35 D)). Das heißt, dass die verbesserte Fab-Expression von Fab4myc im Sucrose-Medium nicht auf die Reduzierung der Einschlusskörper zurückzuführen ist. Da die Mediumzusammensetzung einen Einfluss auf die Fab-Expression haben kann, gelten die in der Arbeit angegebenen Expressionsfaktoren ausschließlich für die Verwendung des LB-Mediums. Verbunden mit einer verbesserten Fab-Expression nahmen sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, als auch die maximal erreichte optische Dichte zu (Abb. C-35 B)). Zudem konnte die Bildung von Aggregaten reduziert werden. In Abb. C-35 D) zeigt nur die Ausgangsvariante Fab4myc eine zusätzliche Bande im Immunoblot. Aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens könnte es sich bei der geringfügig größeren Bande um aggregierte, nicht-prozessierte schwere Kette handeln, die zusätzlich noch die N-terminale Sec-Signalsequenz OmpA (21 Aminosäuren) enthält. Protein, das der kleineren Bande entspricht, die bei allen Konstrukten zu sehen ist, könnte möglicherweise prozessiert und ins Periplasma transportiert sein. Entweder war der Periplasmaaufschluss nicht vollständig und es handelt sich um funktionelle Fabs oder es sind periplasmatische Einschlusskörper, die mit den Sphäroblasten bei der Zentrifugation mitsedimentierten.

Während dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass neben V_H D.6) auch die konstanten Domänen C_{H1} und C_{Kappa} einen negativen Einfluss auf die funktionelle Fab-Expression haben können. Nur so ist zu erklären, dass Abbruchvarianten mit Stopcodons (Abb. C-27, C_{H1}) und Deletionen (Abb. C-23, C_{Kappa}) im N-terminalen Bereich der Domänen vermehrt angereichert wurden.

Bei der Reinigung der verschiedenen Fab-Varianten fiel mehrfach auf, dass die Varianten ohne die Ketten-verbindende Disulfidbrücke ($C214_{LC}$ - $C233_{HC}$) wesentlich sauberer von der HisTrap HP-Säule eluiert werden konnten als die Varianten Fab4myc und Fab4myc-DS-G8_3.1 (Abb. C-37).

D.4 Identifikation von Aminosäurepositionen für die verbesserte Fab-Expression

In Abb. D-1 ist schematisch ein Fab-Fragment dargestellt mit mutierten Aminosäurepositionen (rot markiert) der drei näher charakterisierten Konstrukte Fab4myc-DS-G8_3.1, Fab4myc-epC10_2.0, Fab4myc-epH8_2.4. Die Mutation des C-terminalen Cysteins 233 der schweren konstanten Domäne konnte nicht dargestellt werden, da die verwendete Struktur in diesem Bereich nicht aufgelöst werden konnte. In einem weiterführenden Versuch konnte in unserer Arbeitsgruppe für die Variante Fab4myc-epH8_2.4 anhand von Rückmutationen bereits gezeigt werden, dass alle vier Mutationen A138T-C_{H1}, C233S-C_{H1}, S168G-C_{kappa} und C214R-C_{Kappa} einen annähernd gleichen positiven Einfluss auf die Expression haben. Warum die einzelnen Mutationen zu einer verbesserten Fab-Expression führten, kann nur hypothetisch betrachtet werden. Der Wegfall der intramolekularen Disulfidbrücke C214_{LC}-C233_{HC} könnte sich positiv auswirken, da die Assemblierung beider Ketten im Periplasma erleichtert wird. Diese Hypothese unterstützt, dass auch das zweite Cystein in allen selektierten Mutanten des letzten *Pannings* modifiziert war und somit nicht die Möglichkeit der Ausbildung einer weiteren intra- oder intermolekularen Disulfidbrücke bestand. Nur eine Variante (epC6_2.2 bzw. epC7_2.2, Abb. C-33) wurde gefunden, die noch ein C-terminales Cystein der leichten konstanten Domäne besaß. Allerdings hatte diese Mutante in unmittelbarer Umgebung eine weitere Cysteinmutation, die für die Ausbildung einer neuen intramolekularen Disulfidbrücke zur Verfügung stand. Die C-terminale Cysteingruppe innerhalb von C_{kappa} wurde in erster Linie hin zu hydrophoben Aminosäuren modifiziert (Abb. C-33). Dies kann positive Auswirkungen durch die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen haben oder in systematischen Ursachen liegen. Durch die Verwendung von *Error-prone*-PCR werden in der Regel nur einzelne Basen eines Triplets modifiziert. Dadurch ist die Anzahl der austauschbaren Aminosäuren begrenzt. Im Falle des Cysteins (TGC) stehen somit praktisch nur Serin, Tyrosin, Tryptophan, Arginin und Glycin zur Verfügung. Bis auf Glycin wurden alle genannten Aminosäuren an dieser Position wiedergefunden. Für die Einführung eines Glycins wäre der Basenaustausch T→G nötig, der laut Herstellerangaben des Mutagenese Kits (Stratagene) mit nur 4,7 % aller Mutationen unterrepräsentiert ist. Ein weiterer Aminosäureaustausch mit positivem Effekt auf die Expressionsstärke von funktionellem Fab ist die Position A138T innerhalb von C_{H1}. Durch den Austausch des Alanins zum Threonin innerhalb eines β -Faltblattes könnte eine Tasche, in die das Alanin ragt und sowohl hydrophoben als auch polaren Charakter aufweist, besser ausgefüllt werden. Dabei könnte die Methylgruppe mit hydrophoben Resten L198, P126 und L140 der

gleichen Domäne wechselwirken, während die zusätzliche Hydroxylgruppe mit den polaren Resten S195 und T133 in diesem Bereich die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken hätte. Dadurch könnte die intrinsische Stabilität der Domäne lokal erhöht und möglicherweise die Interaktion mit der C_L-Domäne optimiert werden. Dies muss keinen Widerspruch zu den Ergebnissen der thermischen und chemischen Denaturierung darstellen, die die Gesamtstabilität eines Fab-Fragments (Dissoziation und Auffaltung der Domänen) widerspiegeln. Die vierte untersuchte Position war S168G der leichten konstanten Kette. Durch diesen Austausch innerhalb einer Loopregion geht keinerlei Bindungsenergie verloren und Glycin könnte durch die Erhöhung der Freiheitsgrade zu einer vorteilhafteren lokalen Konformation führen.

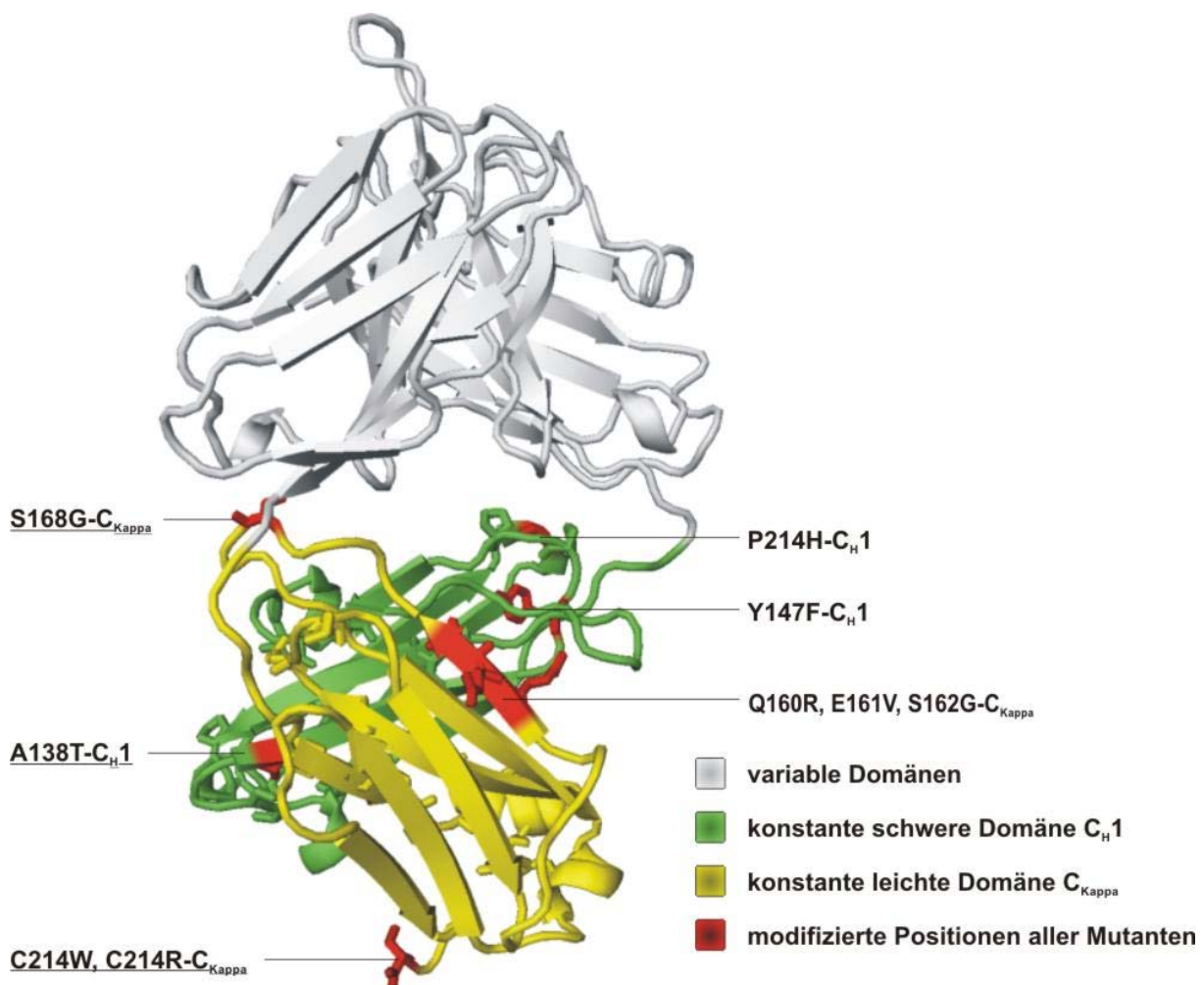


Abb. D-1: Schematische Darstellung eines Fab-Konstruktes. Die modifizierten Positionen der drei charakterisierten Mutanten sind anhand eines chimären Fab-Konstruktes (1UCB, [104]) innerhalb der humanen C_{Kappa} und humanen C_{H1} Domäne rot hervorgehoben. Das C-terminale Ende der schweren konstanten Domäne C_{H1} konnte, wie in vielen anderen Strukturen beobachtet, auch hier nicht aufgelöst werden. Die Position C233-C_{H1} ist daher nicht dargestellt. Für die unterstreichenden Positionen konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits ein jeweils separater positiver Effekt für die Fab-Expression des Fab4myc nachgewiesen werden. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt nach Kabat [105].

D.5 Charakterisierung von Selektionsmutanten

Drei Mutanten wurden für eine weitere Charakterisierung ausgewählt. Neben der Bestimmung eines Ausbeutefaktors waren sowohl die Affinität zum Epitop-Peptid als auch die Stabilität der Mutanten gegenüber Fab4myc von besonderem Interesse. Unter Verwendung des enzymgekoppelten Verdrängungs-Immunoabsorptionstests nach Friguet [88] wurden die Gleichgewichtskonstanten K_D für das Modell-Fab-Fragment Fab4myc, sowie für die drei Mutanten Fab4myc-DS-G8_3.1, Fab4myc-epC10_2.0, Fab4myc-epH8_2.4 bestimmt. Hierbei konnten keine signifikanten Affinitätsunterschiede ermittelt werden. Das Ergebnis folgt dem Prinzip des Phagen-Displays, wo automatisch durch *in vivo*- und *in vitro*-Selektionsdrücke Mutanten mit besseren Eigenschaften selektiert werden. Der zusätzliche Einsatz des Expressions-ELISA reduzierte die mögliche Selektion von Mutanten mit verbesserter Affinität. Dass auch konstante Domänen einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der variablen Regionen haben können, konnte bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden [106-108]. Neben der Affinitätsbestimmung wurden zusätzlich thermische und chemische Denaturierungen durchgeführt, um das Stabilitätsverhalten der Mutanten genauer zu charakterisieren. Bei der thermischen Denaturierung mittels DSC wurde deutlich, dass die Fab-Fragmente Fab4myc und Fab4myc-DS-G8_3.1 mit der intramolekularen Disulfidbrücke C214_{LC}-C233_{HC} eine leicht höhere Stabilität aufweisen und zusätzlich exothermisch aggregieren. Die Übergangstemperaturen konnten dennoch bestimmt werden. Im Falle der chemischen Denaturierung zeigten ebenfalls diese Konstrukte die höchste Stabilität. Unter den beiden nicht-kovalent verknüpften Fab-Konstrukten zeigte wiederum Fab4myc-epH8-2.4 tendenziell eine etwas höhere Stabilität. Letztendlich decken sich die Ergebnisse der thermischen mit denen der chemischen Denaturierung. Eine erhöhte funktionelle Proteinexpression muss somit nicht unmittelbar zu einer erhöhten Stabilität führen.

D.6 Übertragbarkeit der verbesserten Expressionsfähigkeit auf anderen variable Domänen

Die Übertragung des positiven Expressionseffektes durch modifizierte konstante Domänen wurde anhand des schlecht exprimierenden Fab-Fragments muA9 von Skerra (TU-München) untersucht. Dies führte nicht zum gewünschten Ergebnis, da die Fab-Expression annähernd gleich stark war. Wie unter (Abb. C-42) gezeigt, war der Effekt der verbesserten Expression nach dem Einbau der leichten variablen Domäne V_L-muA9 noch vorhanden. Daher muss V_H einen erheblichen Einfluss auf die Fab-Expression haben. Dies ist insofern erstaunlich, als dass

die Unterschiede der leichten variablen Domänen V_L -Fab4myc und V_L -muA9 (Konsensus: 53,6 %, identisch: 40,9 %) wesentlich größer sind als die der beiden schweren Domänen V_H -Fab4myc und V_H -muA9. Innerhalb der schweren variablen Domänen gibt es eine Übereinstimmung der Konsensussequenz von 73,5 %, wobei über 66 % identisch sind. Der größte Sequenzunterschied innerhalb dieser Domänen befindet sich in der HCDR3-Region. Im Gegensatz zu Fab4myc, besitzt das Fab-Fragment von muA9 in der HCDR3 fünf zusätzliche Aminosäuren (ASWYF). Die Anzahl der zusätzlichen Aminosäuren sollten dabei keine Rolle spielen, da in unserem Labor bereits gezeigt wurde, dass auch andere variable schwere Domänen V_H mit exakt gleicher HCDR3-Länge wie muA9 mit diesen optimierten konstanten Domänen verbessert werden konnten. Möglicherweise hat der verstärkt hydrophobe Charakter der drei aufeinanderfolgenden aromatischen Aminosäuren WYF der HCDR3 einen negativen Einfluss auf die Expression. Für die CDR3 der leichten Kette konnten Tuckey und Mitarbeiter zeigen, dass eine einzelne Aminosäure einen erheblichen Einfluss auf die lösliche Expressionsfähigkeit des α -MAP Kinase Fab-Fragments hatte [74]. Eine genaue Untersuchung verschiedener HCDR3 in Bezug auf Aminosäurezusammensetzung, Sequenzlänge und Expressionsfähigkeit wurde meines Wissens noch nicht unternommen. Neben dem Fab-muA9 wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht, inwieweit die Expression der Fab-Fragmente D1.3 und 1F6 durch Kombination der variablen Domänen mit den optimierten konstanten Domänen der Variante Fab4myc-epH8_2.4 erhöht werden kann. Auch wenn die letzten Untersuchungen diesbezüglich noch nicht abgeschlossen sind, konnte in beiden Fällen die Ausbeute signifikant erhöht werden (Western-Blot und ELISA).

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass der Effekt einer verbesserten Fab-Expression durch Übertragung der in dieser Arbeit optimierten konstanten Domänen nicht generell gewährleistet ist und für jedes Fab-Fragment individuell gezeigt werden muss. Bei den untersuchten Konstrukten führte die Übertragung der optimierten konstanten Domänen letztendlich zu einer Verbesserung der Expression bei zwei von drei Varianten.

D.7 Antikörperalternativen

Antikörper sind derzeit die erfolgreichsten Bindungsproteine für therapeutische, biotechnologische und diagnostische Anwendungen [109-111]. Bis vor ca. 20 Jahren war das Immunsystem die einzige Quelle zur Generierung von Antikörpern. Die Etablierung der *in vitro*-DNA-Synthese [12, 13] und die Einführung von *in vitro*-Selektionsmethoden, wie dem Phagen-Display, führten neben der rekombinanten Antikörpertechnologie auch zur Entwicklung neuer

Bindungsproteine. Im Vordergrund standen dabei sowohl Aspekte der generellen Proteinstabilität, der Stabilität unter reduzierenden Bedingungen, des Aggregationsverhaltens und der Proteingröße als auch kommerzielle Überlegungen hinsichtlich der Herstellungskosten und der Schutzrechtsituation [112].

Für alternative Bindungsproteine kommen Proteine in Frage, die eine intrinsische Konformationsstabilität aufweisen und zusätzlich eine flexible Bindungsebene mit Loops verschiedener Länge und Sequenz besitzen. Diese sollten auch hydrophobe Seitenketten zulassen ohne das strukturelle Grundgerüst dabei zu beeinflussen. Bindungsebenen solcher Art dienen dem Aufbau von kombinatorischen Bibliotheken, die anschließend mittels Phagen-Display oder alternativen Displaymethoden gescreened werden.

Da diese Bindungsproteine bisher über keine Effektorfunktionen verfügen, stehen sie in erster Linie im direkten Konkurrenzkampf lediglich zu Antikörperfragmenten wie scFv oder Fab. Vorteile alternativer Scaffolds gegenüber dem Fab-Fragment liegen im geringen Anspruch an das Expressionssystem und oftmals hohen Ausbeuten in *E. coli*. Darüber hinaus stellen alternative Binder nur Monomere dar, die leichter und schneller kloniert werden können. Im Vergleich dazu sind Fab-Fragmente Heterodimere, dessen Ketten separat exprimiert und ins Periplasma transportiert werden müssen, bevor ein funktionelles Fab assembliert wird. Diese Prozedur ist mit Ausbeuteverlust verbunden. Des Weiteren entfällt der mit Ausbeuteverlust verbundene Transport zweier separater Ketten ins Periplasma und dessen Assemblierung zum funktionellen Protein, wie es beim Fab-Fragment der Fall ist.

Alternative Bindungsproteine besitzen Molekülgrößen von unter 20 kDa und sind somit kleiner als die Antikörperfragmente. Ihre geringe Größe verhilft ihnen zu einer sehr guten Gewebegängigkeit, die auch in Fusion mit anderen Molekülen erhalten bleibt. Das hohe Potenzial alternativer Bindungsproteine führte in den letzten Jahren zur Gründung einiger Biotechnologie-Unternehmen, die schon erste Kandidaten in der frühen klinischen Phase oder Phase 2 besitzen. Zu den bekanntesten alternativen Bindungsproteinen zählen die Adnectine [113] Anticaline [114], Kunitz- [115] und PDZ- [116] Domänen, Peptidaptamere [117], Avimere [118], DARPs [119] und Affibodies [120]. Eine detaillierte Zusammenfassung zum derzeitigen Stand der alternativen Antikörpertechnik gibt das kürzlich veröffentlichte Review von Grönwall und Mitarbeitern [121].

D.8 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für das Expressionssystem *E. coli* die Ausbeute an funktionellem Fab des α -p24 (HIV-1) Antikörper CB4-1 durch die Modifikation der konstanten Domänen der leichten und schweren Kette signifikant erhöht werden konnte. Des Weiteren konnte anhand von weiteren Fab-Fragmenten, wie die des muA9, D1.3 und 1F6 gezeigt werden, dass der positive Expressionseffekt mit den konstanten Domänen zum Teil übertragen werden kann. Zusammen mit der zusätzlichen Optimierung der variablen Domänen könnten diese C_{H1} - und C_{kappa} -Domänen einen Anfang für die Expressionsverbesserung beliebiger Fab-Konstrukte darstellen. Aufgrund dessen könnten sie auch als Basis für die Generierung von Fab-Bibliotheken dienen, die auf die Selektion von Bindern für wissenschaftliche, diagnostische und therapeutische Anwendungen zielen. Aufgrund der verbesserten Fab-Expression könnte der *in vivo*-Selektionsdruck reduziert und dadurch die Komplexität dieser Bibliotheken erhöht werden. Dass die primär humanen konstanten Domänen bei therapeutischen Anwendungen dabei eine Immunantwort induzieren könnten, ist sehr unwahrscheinlich, da es sich nur um wenige Mutationen handelt. Dies müsste jedoch im Einzelfall getestet werden.

Neben der Etablierung optimierter konstanter Domänen konnte in dieser Arbeit zusätzlich die Verwendung des Phagen-Display-Systems in Kombination mit direkten hochparallelen Expressionsanalysen in ELISA-Platten für die Expressionsoptimierung von Proteinen gezeigt werden. Dies stellt eine neue Art der Anwendung solcher *in vitro*-Selektionsmethoden dar.

In Bezug auf optimierte konstante Domänen sind weiterführende Arbeiten denkbar. So könnte, wie zuvor schon für die schwere konstante Domäne C_{H1} gezeigt, ein DNA-*Shuffling* der C_{kappa} -Domäne durchgeführt werden. Des Weiteren müsste, wie im Falle der Variante Fab4myc-epH8_2.4 (weiterführende Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe), gezeigt werden, welche der Mutationen der Konstrukte Fab4myc-DS-G8_3.1 und Fab4myc-epC10_2.0 einen Einfluss auf die Expression haben. Mutationen mit Einfluss auf die Fab-Expression sollten in einem weiteren Schritt einer gesättigten Mutagenese unterzogen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Janeway, C., *Immunologie*. 5. ed. 2002, Heidelberg u.a.: Spektrum. XXVI, 777.
2. Griffiths, A.D., et al., *Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries*. *Embo J*, 1993. **12**(2): p. 725-34.
3. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors*. *Cancer*, 2007. **109**(2): p. 170-9.
4. Wörn, A. and A. Plückthun, *Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments*. *J Mol Biol*, 2001. **305**(5): p. 989-1010.
5. Chen, W., et al., *Construction of a large phage-displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain*. *J Mol Biol*, 2008. **382**(3): p. 779-89.
6. Wesolowski, J., et al., *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. *Med Microbiol Immunol*, 2009.
7. Rader, C., *Overview on concepts and applications of Fab antibody fragments*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2009. **Chapter 6**: p. Unit 6 9.
8. Von Behring, E., Kitasato, S., *Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren*. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1890. **16**: p. 1113-1114.
9. Ehrlich, P., *Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung*. *Fortschritte der Medizin*, 1897. **15**: p. 41-43.
10. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
11. Winter, G. and C. Milstein, *Man-made antibodies*. *Nature*, 1991. **349**(6307): p. 293-9.
12. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
13. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
14. Hutchison, C.A., 3rd, et al., *Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(18): p. 6551-60.
15. Better, M., et al., *Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment*. *Science*, 1988. **240**(4855): p. 1041-3.
16. Huston, J.S., et al., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(16): p. 5879-83.
17. Skerra, A. and A. Pluckthun, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. *Science*, 1988. **240**(4855): p. 1038-41.

18. Simmons, L.C., et al., *Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies*. J Immunol Methods, 2002. **263**(1-2): p. 133-47.
19. Kujau, M.J., et al., *Expression and secretion of functional miniantibodies McPC603scFvDhlx in cell-wall-less L-form strains of Proteus mirabilis and Escherichia coli: a comparison of the synthesis capacities of L-form strains with an E. coli producer strain*. Appl Microbiol Biotechnol, 1998. **49**(1): p. 51-8.
20. Bolhuis, A., et al., *Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(7): p. 2934-41.
21. Inoue, Y., et al., *Efficient production of a functional mouse/human chimeric Fab' against human urokinase-type plasminogen activator by Bacillus brevis*. Appl Microbiol Biotechnol, 1997. **48**(4): p. 487-92.
22. Shiroza, T., et al., *Construction of a chimeric shuttle plasmid via a heterodimer system: secretion of an scFv protein from Bacillus brevis cells capable of inhibiting hemagglutination*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. **65**(2): p. 389-95.
23. Wu, S.C., et al., *Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from Bacillus subtilis by coproduction of molecular chaperones*. J Bacteriol, 1998. **180**(11): p. 2830-5.
24. Wu, S.C., et al., *Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from Bacillus subtilis: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(7): p. 3261-9.
25. Wu, X.C., et al., *Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered Bacillus subtilis expression-secretion system*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(1): p. 71-6.
26. Ma, J.K., et al., *Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants*. EMBO Rep, 2005. **6**(7): p. 593-9.
27. Sijmons, P.C., et al., *Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants*. Biotechnology (N Y), 1990. **8**(3): p. 217-21.
28. Pollock, D.P., et al., *Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies*. J Immunol Methods, 1999. **231**(1-2): p. 147-57.
29. Dübel, S., *Handbook of therapeutic antibodies*. 2007, Weinheim: Wiley-VCH.
30. Breitling, F. and S. Dübel, *Rekombinante Antikörper*. 1997, Heidelberg u.a.: Spektrum. 236.
31. Barbas, C.F., *Phage display : a laboratory manual*. 2001, Cold Spring Harbor: CSHL Press. Getr. Zählung.
32. Specthrie, L., et al., *Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage*. J Mol Biol, 1992. **228**(3): p. 720-4.
33. Stengele, I., et al., *Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites*. J Mol Biol, 1990. **212**(1): p. 143-9.

34. Deng, L.W., P. Malik, and R.N. Perham, *Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli*. Virology, 1999. **253**(2): p. 271-7.
35. Crissman, J.W. and G.P. Smith, *Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis*. Virology, 1984. **132**(2): p. 445-55.
36. Kremser, A. and I. Rasched, *The adsorption protein of filamentous phage fd: assignment of its disulfide bridges and identification of the domain incorporated in the coat*. Biochemistry, 1994. **33**(46): p. 13954-8.
37. Cwirla, S.E., et al., *Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6378-82.
38. Felici, F., et al., *Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent expression vector*. J Mol Biol, 1991. **222**(2): p. 301-10.
39. Jespers, L.S., et al., *Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI*. Biotechnology (N Y), 1995. **13**(4): p. 378-82.
40. Gao, C., et al., *Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6025-30.
41. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
42. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 7978-82.
43. Breitling, F., et al., *A surface expression vector for antibody screening*. Gene, 1991. **104**(2): p. 147-53.
44. Clackson, T., et al., *Making antibody fragments using phage display libraries*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 624-8.
45. Hoogenboom, H.R., et al., *Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(15): p. 4133-7.
46. McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. Nature, 1990. **348**(6301): p. 552-4.
47. Danner, S. and J.G. Belasco, *T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 12954-9.
48. Huse, W.D., et al., *Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1275-81.
49. Mullinax, R.L., et al., *Identification of human antibody fragment clones specific for tetanus toxoid in a bacteriophage lambda immunoexpression library*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 8095-9.
50. Kang, A.S., T.M. Jones, and D.R. Burton, *Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11120-3.
51. Griffiths, A.D., et al., *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires*. Embo J, 1994. **13**(14): p. 3245-60.

52. Marks, J.D., et al., *By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(7): p. 779-83.
53. Vieira, J. and J. Messing, *Production of single-stranded plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1987. **153**: p. 3-11.
54. Garrard, L.J., et al., *Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(12): p. 1373-7.
55. Lowman, H.B., et al., *Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display*. Biochemistry, 1991. **30**(45): p. 10832-8.
56. O'Connell, D., et al., *Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies*. J Mol Biol, 2002. **321**(1): p. 49-56.
57. Rondot, S., et al., *A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(1): p. 75-8.
58. Fuchs, P., et al., *Targeting recombinant antibodies to the surface of Escherichia coli: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(12): p. 1369-72.
59. Jostock, T. and S. Dübel, *Screening of molecular repertoires by microbial surface display*. Comb Chem High Throughput Screen, 2005. **8**(2): p. 127-33.
60. Hanes, J. and A. Plückthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 4937-42.
61. Roberts, R.W. and J.W. Szostak, *RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12297-302.
62. Boder, E.T. and K.D. Wittrup, *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(6): p. 553-7.
63. Marks, J.D., et al., *By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage*. J Mol Biol, 1991. **222**(3): p. 581-97.
64. Lee, M.H. and J.W. Kwak, *Expression and functional reconstitution of a recombinant antibody (Fab') specific for human apolipoprotein B-100*. J Biotechnol, 2003. **101**(2): p. 189-98.
65. Bothmann, H. and A. Plückthun, *The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17100-5.
66. Zhang, Z., et al., *Production of soluble and functional engineered antibodies in Escherichia coli improved by FkpA*. Biotechniques, 2003. **35**(5): p. 1032-8, 1041-2.
67. Skerra, A. and A. Plückthun, *Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in Escherichia coli: influence of disulphides and cis-prolines*. Protein Eng., 1991. **4**(8): p. 971-979.
68. Alfthan, K., et al., *Efficient secretion of murine Fab fragments by Escherichia coli is determined by the first constant domain of the heavy chain*. Gene, 1993. **128**(2): p. 203-9.
69. Knappik, A. and A. Plückthun, *Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding*. Protein Eng, 1995. **8**(1): p. 81-9.

70. Teerinen, T., et al., *Structure-based stability engineering of the mouse IgG1 Fab fragment by modifying constant domains*. J Mol Biol, 2006. **361**(4): p. 687-97.
71. Lilie, H., R. Rudolph, and J. Buchner, *Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after formation of quaternary structure*. J Mol Biol, 1995. **248**(1): p. 190-201.
72. DeLisa, M.P., D. Tullman, and G. Georgiou, *Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6115-20.
73. Demarest, S.J., et al., *Engineering stability into Escherichia coli secreted Fabs leads to increased functional expression*. Protein Eng Des Sel, 2006. **19**(7): p. 325-36.
74. Tuckey, C.D. and C.J. Noren, *Selection for mutants improving expression of an anti-MAP kinase monoclonal antibody by filamentous phage display*. J Immunol Methods, 2002. **270**(2): p. 247-57.
75. Roberge, M., et al., *Construction and optimization of a CC49-based scFv-beta-lactamase fusion protein for ADEPT*. Protein Eng Des Sel, 2006. **19**(4): p. 141-5.
76. Welfle, K., et al., *Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody CB4-1 and its Fab and Fc fragments*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1431**(1): p. 120-31.
77. Winkler, K., et al., *Changing the antigen binding specificity by single point mutations of an anti-p24 (HIV-1) antibody*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4505-14.
78. Paschke, M., C. Tiede, and W. Höhne, *Engineering a circularly permuted GFP scaffold for peptide presentation*. J Mol Recognit, 2007. **20**(5): p. 367-78.
79. Schlapschy, M., et al., *Functional humanization of an anti-CD16 Fab fragment: obstacles of switching from murine $\{\lambda\}$ to human $\{\lambda\}$ or $\{\kappa\}$ light chains*. Protein Eng Des Sel, 2009. **22**(3): p. 175-88.
80. Hust, M., S. Dübel, and T. Schirrmann, *Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries*. Methods Mol Biol, 2007. **408**: p. 243-55.
81. Porath, J., et al., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature, 1975. **258**(5536): p. 598-9.
82. Hochuli, E., et al., *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*. Nat Biotech, 1988. **6**(11): p. 1321-1325.
83. Parmley, S.F. and G.P. Smith, *Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes*. Gene, 1988. **73**(2): p. 305-18.
84. Hawlisch, H., et al., *Site-specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets*. Anal Biochem, 2001. **293**(1): p. 142-5.
85. Moghaddam, A., et al., *Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine*. J Immunol Methods, 2003. **280**(1-2): p. 139-55.
86. Hust, M., et al., *The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease*. J Virol Methods, 2002. **106**(2): p. 225-33.
87. Russel, M., S. Kidd, and M.R. Kelley, *An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA*. Gene, 1986. **45**(3): p. 333-8.

88. Friguet, B., et al., *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*. J Immunol Methods, 1985. **77**(2): p. 305-19.
89. Pace, C.N., *Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves*. Methods Enzymol, 1986. **131**: p. 266-80.
90. Pantoliano, M.W., et al., *Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli*. Biochemistry, 1991. **30**(42): p. 10117-25.
91. Nozaki, Y., *The preparation of guanidine hydrochloride*. Methods Enzymol, 1972. **26 PtC**: p. 43-50.
92. Clarke, J. and A.R. Fersht, *Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation*. Biochemistry, 1993. **32**(16): p. 4322-9.
93. Skerra, A., *Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli*. Gene, 1994. **151**(1-2): p. 131-5.
94. Zahn, G., A. Skerra, and W. Höhne, *Investigation of a tetracycline-regulated phage display system*. Protein Eng, 1999. **12**(12): p. 1031-4.
95. Kirsch, M., et al., *Parameters affecting the display of antibodies on phage*. Journal of Immunological Methods, 2005. **301**(1-2): p. 173-185.
96. Steiner, D., et al., *Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(7): p. 823-31.
97. Wong, T.S., et al., *Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. e26.
98. Chames, P., S. Coulon, and D. Baty, *Improving the affinity and the fine specificity of an anti-cortisol antibody by parsimonious mutagenesis and phage display*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5421-9.
99. Krebber, A., J. Burmester, and A. Pluckthun, *Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p*. Gene, 1996. **178**(1-2): p. 71-4.
100. Riechmann, L. and M. Weill, *Phage display and selection of a site-directed randomized single-chain antibody Fv fragment for its affinity improvement*. Biochemistry, 1993. **32**(34): p. 8848-55.
101. Zahn, G., *Herstellung, Charakterisierung und Selektion einer Phagenbibliothek am Beispiel der Selektion von Antikörperfragmenten gegen einen Prolylendopeptidase-Inhibitor*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin., 2000.
102. Orum, H., et al., *Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(19): p. 4491-8.
103. Skerra, A., *Funktionelle Expression Antigen-bindender Immunglobulinfragmente in Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig Maximilians Universität, München., 1989.
104. Sheriff, S., et al., *X-ray structure of the uncomplexed anti-tumor antibody BR96 and comparison with its antigen-bound form*. J Mol Biol, 1996. **259**(5): p. 938-46.
105. Kabat, E.A., et al., *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication, 1991: p. 91-32242.

106. Adachi, M., et al., *Interaction between the antigen and antibody is controlled by the constant domains: normal mode dynamics of the HEL-HyHEL-10 complex*. Protein Sci, 2003. **12**(10): p. 2125-31.
107. Torres, M. and A. Casadevall, *The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity*. Trends Immunol, 2008. **29**(2): p. 91-7.
108. Torres, M., et al., *The immunoglobulin heavy chain constant region affects kinetic and thermodynamic parameters of antibody variable region interactions with antigen*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13917-27.
109. Borrebaeck, C.A., *Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips*. Immunol Today, 2000. **21**(8): p. 379-82.
110. Bradbury, A., et al., *Antibodies in proteomics II: screening, high-throughput characterization and downstream applications*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(7): p. 312-7.
111. Kim, S.J., Y. Park, and H.J. Hong, *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies*. Mol Cells, 2005. **20**(1): p. 17-29.
112. Hey, T., et al., *Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications*. Trends Biotechnol, 2005. **23**(10): p. 514-22.
113. Xu, L., et al., *Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display*. Chem Biol, 2002. **9**(8): p. 933-42.
114. Beste, G., et al., *Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1898-903.
115. Dennis, M.S. and R.A. Lazarus, *Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor VIIa. I. Potent inhibitors selected from libraries by phage display*. J Biol Chem, 1994. **269**(35): p. 22129-36.
116. Schneider, S., et al., *Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(2): p. 170-5.
117. Borghouts, C., C. Kunz, and B. Groner, *Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2005. **5**(6): p. 783-97.
118. Silverman, J., et al., *Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 1556-61.
119. Binz, H.K., et al., *High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 575-82.
120. Nord, K., et al., *Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(8): p. 772-7.
121. Grönwall, C. and S. Ståhl, *Engineered affinity proteins--generation and applications*. J Biotechnol, 2009. **140**(3-4): p. 254-69.

DANKSAGUNG & LEBENSLAUF

Meine Danksagung und mein Lebenslauf werden aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSLISTE

Paschke, M.; **Tiede, C.**; Höhne W.: Engineering a circularly permuted GFP scaffold for peptide presentation. *J. Mol. Recognit.* 2007; 20: 376-378

Christian Tiede & Wolfgang Höhne. Optimised β -sheet domains for effective expression of Fab fragments in *E.coli*. presented at Forschergruppe “Bildung und Stabilität von β -Faltblättern” 16. – 17. November 2007, Potsdam

Christian Tiede & Wolfgang Höhne. Optimised constant domains for effective expression of Fab fragments in *E.coli*. präsentiert beim Forum Life Sciences, 18. – 19. März 2009, München

Optimised constant domains for effective expression of Fab fragments in *E. coli*, Veröffentlichung in Vorbereitung, Erstautor: Christian Tiede

ERKLÄRUNG

„Ich, Christian Tiede, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Optimierte konstante Domänen für die effektive Expression von Fab-Fragmenten in *E. coli*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift