3. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse gliedern sich nach dem Ablauf der Etablierung eines Pichia-pastoris-Expressionssystems sowie den hierbei aufgetretenen Problemen mit ihren Lösungsversuchen.

Um eine effizientes eukaryontisches Hefeexpressionssystem zu etablieren, mussten erst Methoden etabliert werden, die einen Nachweis der gesuchten Proteine ermöglichten.

Aus den Ergebnissen der ersten Transformations- und Expressionsversuche ergab sich die Notwendigkeit, ein Nachweisverfahren zu etablieren, das die genomische Integration der DNA-Sequenzen nach der Transformation der Klone ermöglicht. Des Weiteren mussten verschiedene selektiv wirkende Wachstumsbedingungen für die transformierten Klone getestet werden.

Der A33rbGFP Fusionsantikörper, der unter dem Aspekt entwickelt und hergestellt wurde, die Verwendungsmöglichkeiten des eukaryontischen Pichia-pastoris-Expressionssystems zu zeigen, wurde nach seiner Expression mittels immunologischer Assay in Zellkulturen auf seine Funktion untersucht.

Im Anschluss wurde versucht, die Expression des A33rbCD Fusionsantikörpers mit dem Pichia-pastoris-Expressionssystem zu realisieren. Die dabei aufgetretenen Schwierigkeiten führten zur Klonierung der DNA eines Fusionsantikörpers, der aus dem A33-Single-Chain-Fragment und Cytosindeaminase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (A33rbCDy) besteht.

3.1. Funktionsprüfung des bakteriellen Expressionssystems

Um die Funktionsfähigkeit des bei Arbeitsbeginn bereits vorhandenen bakteriellen Expressionssystem zu dokumentieren, wurden zwei Bakterienkulturen induziert, die den Plasmidvektor pET25 (Invitrogen, Groningen) mit den Gensequenzen für die Fusionsantikörper A33rbGFP (Abb. 3.1.) oder A33rbCD (Abb. 3.2.) trugen.

Der Vektor pET25 erlaubte das Wachstum der Klone unter dem Selektionsdruck von Ampicillin, da das Vektorrückgrat ein Resistenzgen gegen Ampicillin (Abb. 3.1.) beinhaltet. Die Bakterienkultur wuchs bis zu einer OD_{600} von 1.0 und wurde anschließend durch IPTG am Promotor T7pro induziert. Da die DNA-Sequenz für den A33rbCD Fusionsantikörper

ebenfalls in einen pET25 Vektor kloniert war, wurde dieser Klon analog zum A33rbGFP kultiviert und induziert.



Abb 3.1.Vektorkarte des Vektors pET25 mit der integrierten DNA-Sequenz des A33rbGFP Fusionsantikörpers. Diese besteht aus den Sequenzen des Single-Chain-Fragments mit A33rb-VL (leichte Kette), A33rb-HL (schwere Kette) sowie der Verbindungssequenz (Linker), die die beiden Ketten verbindet. Es folgt die Sequenz des Green-Fluorescent-Protein (GFPuv).



Abb 3.2.Vektorkarte des Vektors pET25 mit der integrierten DNA-Sequenz des A33rbCD Fusionsantikörpers. Diese besteht aus den DNA-Sequenzen des Single-Chain-Fragments mit A33rb-VL (leichte Kette), A33rb-HL (schwere Kette) sowie der Verbindungssequenz (Linker), die die beiden Ketten verbindet. Anschließend folgt die Sequenz der bakteriellen Cytosindeaminase (ECcytda).



Abb. 3.3. Coomassie-Gel zur Identifizierung der bakteriell exprimierten FusionsantikörperA33rbGFP und A33rbCD.

Beide Klone zeigten die Expression des jeweiligen Proteins mit dem zu erwartenden Wanderungsverhalten im SDS-Gel entsprechend der Proteingröße von ca. 50 kDa beim A33rbGFP und ca. 70 kDa beim A33rbCD Fusionsprotein. In den Überständen der jeweiligen Kultur waren jedoch keine Proteine der entsprechenden Größen zu finden (Abb. 3.3.).

3.2. Etablierung und Optimierung der Nachweismethoden

Zur weiteren Charakterisierung und zur Etablierung eines spezifischen Nachweissystems wurden Western Blots mit den oben beschriebenen Zelllysaten pET25-A33rbGFP- und pET25-A33rbCD–positiver Kulturen durchgeführt (s. a. Abb. 3.3.).



Abb. 3.4. links : Western Blot zur Darstellung des A33rbCD-Fusionsantikörpers; rechts : Western Blot zur Darstellung des A33rbGFP-Fusionsantikörpers.

Die GFP-Komponente des A33rbGFP Fusionsantikörpers war durch einen Western Blot mit einem aus einer Maus stammenden anti-GFP-Antikörper als primärem und einen anti-Maus-IgG als sekundärem Nachweisreagenz darzustellen und zeigte das erwartete Wanderungsverhalten im SDS-Gel entsprechen einer Proteingröße von ca. 50 kDa (Abb. 3.4. links).

3.3. Klonierung eines pPIC 9 K-A33rbGFP-Vektorkonstrukts

Das pET25-A33rbGFP Vektorkonstrukt wurde bakteriell propagiert und präparativ isoliert.



Abb. 3.7. Agarosegel von drei Hispeed-Midi-Prep Plasmidisolationen des pET25-A33rbGFP Vektorkonstrukts nach Restriktionsspaltung durch Avr II und Not I. Alle Ansätze zeigen eine Bande in der Größe von 1495 bp, die der Größe des A33rbGFP DNA-Konstrukts entsprach, und einer Bande bei ca. 5.5 kbp, die dem Vektor Rückgrat pET25 entsprach.

Die Gensequenz des A33rbGFP (1495 bp) wurde aus dem Vektorkonstrukt mittels Restriktionsspaltung durch die Enzyme *Avr* II und *Not* I herausgelöst (Abb. 3.7.)

Ergebnisse

Das A33rbGFP DNA-Konstrukt wurde durch Gelextraktion isoliert. Parallel hierzu wurde der Vektor pPIC 9 K bakteriell propagiert, isoliert und durch die Restriktionsenzyme *Avr* II und *Not* I geöffnet (Abb. 3.8.), um als neues Vektorrückgrat zur Verfügung zu stehen.



Abb. 3.8. Agarosegel links Plasmid pPIC 9 K (ca. 12 kbp) rechts A33rbGFP-DNA-Sequenz (1495 bp)

Der geöffnete Vektor pPIC 9 K und die Gensequenz für den A33rbGFP Fusionsantikörper wurden ligiert. Das hierbei entstandene Vektorkonstrukt (Abb. 3.9.) wurde durch Hitzeschock in *Escheri*chia *coli* transformiert. Die nach der Transformation auf ampicillinhaltigen Agarböden wachsenden Bakterienklone wurden in LB-Medium mit Ampicillin propagiert und mittels Plasmidisolierung und Restriktionsspaltung durch die Enzyme *Avr* II und *Not* I auf die Präsenz des A33rbGFP-Konstrukts untersucht.



Abb. 3.9. pPIC 9 K-A33rb-GFP-Vektorkonstrukt. Es beinhaltet die DNA-Sequenzen des Single-Chain-Fragments mit dem Abschnitt A33rb-VL (leichte Kette), A33rb-HL (schwere Kette) sowie der Verbindungssequenz (Linker), die die beiden Ketten verbindet, und der DNA-Sequenz des Green-Fluorescent-Protein (GFPuv). Die DNA-Sequenzen AOX-5' und AOX-3' dienen der Integration der DNA-Sequenz in das Hefegenom am Genort der Alkoholoxidase (AOX). Die DNA-Sequenzen 5'AOX und 3'AOX werden als Start- und Endsequenz zur diagnostischen PCR genutzt. Es zeigte sich, das nach Plasmidisolierung und Restriktionsverdau durch die Enzyme *Avr* II und *Not* I die Klone 2, 5 und 6 einen DNA-Abschnitt der Länge der von 1495 bp trugen, der der DNA-Sequenz des A33rbGFP-Konstrukts entsprach (Abb. 3.10.).



Abb. 3.10.Agarosegel 10 transformierter Escherichia coli Klone, deren Plasmid-DNA durch die Restriktionsenzyme Avr II und Not I geschnitten wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Klone 3, 5 und 6 Träger eines 1495 bp großen DNA-Abschnitts waren, der in seiner Größe der integrierten DNA-Sequenz des A33rbGFP Fusionsantikörpers entsprach.

Das pPIC 9 K-A33rbGFP-Vektorkonstrukt (Abb. 3.10) des Escherichia coli Klons 5 wurde zur Transformation in *Pichia pastoris* ausgewählt, bakteriell propagiert, isoliert und durch das Restriktionsenzym *Pme* I linearisiert.

3.4. Transformation von Pichia Pastoris mit dem pPIC 9 K-A33rbGFP-Konstrukt

Das linearisierte pPIC 9 K-A33rbGFP-Konstrukt wurde durch Elektroporation in die *Pichia pastoris* Stämme GS115 und KM71 integriert. Die transformierten Hefezellen wurden auf Histidin-defizienten Agarplatten für 5 Tage ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Dadurch wurden pro Platte ca. 30 auf Histidin-defizienten RDH-Agarplatten wachsende Klone generiert. Diese wurden auf RDB-Platten mit aufsteigender Kanamycin-Konzentration zur Selektion auf das Kanamycin-Resistenzgen mittels eines Stempelkissens übertragen, wodurch ein durchschnittliches Wachstum von 8 Klonen pro RDB-Platte mit einer Konzentration von 4 mg/ml Kanamycin erreicht wurde.

Wenn anstelle der Stempelübertragung die Histidin-defizienten Agarplatten mit 300 μ l sterilem Wasser abgewaschen wurden, und anschließend 80 μ l dieser Hefezellsuspension auf Kanamycin-haltige RDB-Platten aufgetragen wurden, konnte kein Selektionsdruck erzeugt werden, da bis zur höchsten Kanamycin-Konzentration auf allen Platten rasenartiges Wachstum zu beobachten war.

Durch Wiederholung von Transformationen und Selektion konnten 80 Hefeklone in einem Verhältnis der Stämme KM71 zu GS115 von ca. 1:3 geniert werden.

3.5. Expression des A33rbGFP Fusionsantikörpers in Pichia Pastoris

Die ersten 30 Klone, die direkt unter Expressionsbedingungen im Maßstab *Suche* kultiviert wurden, zeigten keine Expression des gesuchten A33rbGFP Fusionsantikörpers.

Um die auf den Kanamycin-haltigen RDB-Platten wachsenden Klone ohne Integration der Gensequenz des A33rbGFP Fusionsantikörpers von denen mit Integration zu unterscheiden, wurden die Klone deshalb durch PCR-Versuche mit den Primerpaaren 5'AOX/3'AOX sowie 5'A33rbGFPdiagnostic/3'A33rbGFPdiagnostic auf Integration des gesuchten DNA-Abschnitts des A33rbGFP Fusionsantikörpers untersucht. Dabei wurden die entstandenen Amplifikate aus den PCR-Versuchen mit den Primerpaaren 5'AOX/3'AOX als Matrix für die PCR-Versuche mit dem Primerpaar 5'A33rbGFPdiagnostic/3'A33rbGFPdiagnostic verwendet.



Abb. 3.11 Agarosegel ausgewählter KM71 Klone, von denen die Klone 63, 65, 68 und 70 ein Amplifikat durch die Primer 5'AOX und 3'AOX lieferten.



Abb. 3.12 Agarosegel ausgewählter GS115 Klone. Hier lieferten die Klone 77, 78, 79 und 80 einen amplifizierten Genabschnitt durch die Primer 5'AOX und 3'AOX.



Abb. 3.13.Agarosegel ausgewählter Klone mit dem amplifizierten Genabschnitt durch die Primer 5`A33rbGFPdiagnostic und 3`A33rbGFPdiagnostic (Klon 63, 74 und 75).



Abb. 3.14.Agarosegel ausgewählter Klone mit dem amplifizierten Genabschnitt durch die Primer 5`A33rbGFPdiagnostic und 3`A33rbGFPdiagnostic (Klon 78, 79 und 80). Als Kontrollen wurde das isolierte Plasmid eines pET25 A33rbGFP Vektorkonstrukts mitgeführt (GFP).

60

Durch diese PCR-Versuche wurden die Klone KM71 63 und GS115 31, 37, 74, 75, 78, 79 und 80 identifiziert, die mit den Primerpaaren 3'AOX/5'AOX (Abb. 3.11. und 3.12.) sowie 3'A33rbGFPdiagnostic/5'A33rbGFPdiagnostic (Abb. 3.13. und 3.14.) ein Amplifikat lieferten (AOX: 1987 bp, A33rbGFPdiagnostic: 1502 bp).

Diese Klone wurden unter Expressionsbedingungen im Maßstab *Suche* kultiviert und für drei Tage induziert. Die Überstände der einzelnen Klone wurden im Western Blot analysiert.

Die Überstände der einzelnen Klone GS115 31, 37, 74, 78, 79, 80 und KM71 63 zeigten jeweils die gesuchte Bande mit einem Wanderverhalten im SDS-Gel entsprechend einer Größe von ca. 50 kDa, die dem A33rbGFP Fusionsantikörper entsprach (Abb. 3.15 und 3.16). Nicht transformierte (Abb. 3.15.: Bande 1 und 2 von links) oder leer transformierte (Abb. 3.15.: Bande 3 und 4 von links) Hefestämme zeigten keine entsprechende Bande in der zu erwartenden Größe.



Abb. 3.15.Western Blot der Überstände der *Pichia pastoris* Klone GS115 31 und 37, die eine Bande bei 50 kDa zeigten, das dem Wanderungsverhalten des A33rbGFP Fusionsantikörpers im SDS Gel entsprach, und ihre Negativkontrollen (nicht oder leer transformierte Stämme).



Abb. 3.16.Western Blot der Überstände ausgewählter *Pichia past*oris Klone, die eine Bande bei 50 kDa zeigten, das dem Wanderungsverhalten des A33rbGFP Fusionsantikörpers im SDS Gel entsprach.

3.6. Expressionsversuch eines pPIC 9-A33rbCD-Vektorkonstrukts

Bei Beginn der Arbeit standen 24 Hefeklone zur Verfügung, die mit einem pPIC 9-A33rbCD-Vektorkonstrukt transformiert wurden, ohne dass ihre Funktionsfähigkeit zur Expression des Fusionsantikörpers A33rbCD getestet worden war.

Die vorhandenen Klone wurden zur Regeneration für 5 Tage auf RDB-Platten ausgestrichen. Alle Klone zeigten Wachstum. Im Anschluss wurden sie auf Histidin-defizienten RDH-Platten zur erneuten Kontrolle der Integration und zum Aufbau eines Selektionsdrucks ausgestrichen. Auch hier zeigten alle Klone Wachstum. Die Klone wurden mittels einer diagnostischen PCR auf die genomische Integration der DNA-Sequenz für den A33rbCD Fusionsantikörper unter Verwendung der Primer 5'AOX und 3'AOX analysiert.



Abb. 3.17.Agarosegel beispielhaft untersuchter *Pichia pastoris* Klone auf die integrierte Gensequenz des A33rbCD-Fusionsantikörpers mittels der Primer 5'AOX und 3'AOX in der PCR. Als Positivkontrolle (+) wurde der Vektor pPIC 9 amplifiziert. Die Klone 9,14,15,18 zeigten die gesuchte Doppelbande von 2.2 kbp und 2.5 kbp.

Als Positivkontrolle wurde der Vektor pPIC 9 mitgeführt, der sich in einer Größe von 492 bp darstellte. Die Klone GS115 9, 14, 15 und 18 zeigten die erwartete Doppelbande bestehend aus dem 2.2 kbp großen Amplifikat des Wildtyp AOX-Gen und einem ca. 2.5 kbp großem Amplifikat, das aus dem 2049 bp langen Amplifikats der A33rbCD-Gensequenz sowie dem 492 bp langen Amplifikat des pPIC 9 Vektorabschnitt bestand (Abb. 3.17.).



Abb. 3.18.Coomassie-Gel zur Überprüfung der Klone GS115 9, 14, 15 und 18 auf Expression des A33rbCD Fusionsproteins in den Kulturüberstand. Kein Klon zeigte eine Expression eines Proteins mit dem erwarteten Wanderungsverhalten eines Proteins von ca. 70 kDa.

Die Klone GS115 9,14,15 und 18 wurden im Such-Maßstab in BMYG bis zu einer Absorption bei OD_{600} von 1-3 kultiviert und anschließend in BMMY bei unveränderter Absorption umgesetzt. Kein Klon zeigte nach dreitägiger Induktion durch Methanol im Kulturüberstand die Expression eines Proteins mit dem erwarteten Wanderungsverhalten eines Proteins von ca. 70 kDa (Abb. 3.18.).

Entsprechend den Klonierungsschritten, die zum A33rbGFP-pPIC 9 K-Vektorkonstrukt führten, wurde ausgehend von einem A33rbCD-pET 25-Vektorkonstrukt die Gensequenz des A33rbCD Fusionsantikörpers (2049 bp) durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Avr* II und *Not* I isoliert und mit dem Vektor pPIC 9 K ligiert. Dieses Konstrukt (Abb. 3.20.) wurde in *Escherichia coli* transformiert.

Die auf penicillinhaltigen Agarböden wachsenden Klone wurden auf ihre Insertion des gesuchten Genabschnitts mittels Restriktionsverdau durch die Enzyme *Avr* II und *Not* I analysiert (Abb. 3.19.). Die Bakterienklone 6, 11 und 13 zeigten die erwartete Bande von 2049 bp.



Abb. 3.19. Agarosegel von A33rbCD-pPIC 9 K Plasmiden aus Escherichia coli Klone, die nach Plasmidisolierung durch Restriktionsverdau mit den Enzymen Avr II und Not I gespalten wurden. Die Klone 6, 11 und 13 zeigten eine Bande der Größe von 2049 bp.

Das Vektorkonstrukt A33rbCD-pPIC 9 K (Abb. 3.19.) des Klons 13 wurde von GeneAnalysisService, Berlin sequenziert. Die Analyse ergab die erwartete Sequenz von 2049 bp. Das Vektorkonstrukt A33rbCD-pPIC 9 K wurde bakteriell propagiert, mit dem Restriktionsenzym *Sal* I linearisiert und in *Pichia pastoris* transformiert. Die auf Histidindefizienten Agarplatten wachsenden Klone wurden mittels Stempelkissen auf RDB-Platten mit einer Kanamycin Konzentration von 4 mg/ml übertragen. Die hier wachsenden 80

Hefeklone wurden auf die Integration des A33rbCD-Genabschnitts mit den Primern 5'AOX und 3'AOX sowie 5'CDdiagnostic und 3'CDdiagnostic untersucht.



Abb. 3.20.Vektorkarte des pPIC 9 K-A33rbCD-Vektorkonstrukt. Es beinhaltet die DNA-Sequenz des Single-Chain-Fragments bestehend aus A33rb-VL (leichte Kette), A33rb-HL (schwere Kette) und der Verbindungssequenz (Linker), die die beiden Ketten verbindet, sowie dem bakteriellen Enzym Cytosindeaminase (ECcytda). Die DNA-Sequenzen 5'AOX und 3'AOX werden als Startund Endsequenz zur diagnostischen PCR genutzt.

3.8. Kontrolle der genomischen Integration des A33rbCD-Vektorkonstrukts



Abb. 3.21.Agarosegel ausgewählter *Pichia pastoris* Klone analysiert mittels PCR mit dem Primerpaar 5'AOX/3'AOX. Als Positivkontrolle (+) wurde das isolierte Plasmid pPIC 9-K-A33rbCD amplifiziert. Alle Klone zeigten die erwartete Bande von 2541 bp.



Abb. 3.22.Agarosegel ausgewählter *Pichia pastoris* Klone analysiert mittels PCR mit dem Primerpaar 5'CDdiagnostic/3'CDdiagnostic. Als Positivkontrolle (+) wurde das isolierte Plasmid pPIC 9-K-A33rbCD amplifiziert. Alle Klone zeigten die erwartete Bande von 2052 bp.

Es wurden Klone gefunden, bei denen durch PCR-Versuche mit den Primerpaaren 3'AOX/5'AOX eine Bande bei ca. 2.5 kbp erzeugt werden konnte, die aus dem 2049 bp langen Amplifikat der A33rbCD-Gensequenz mit seinen AOX-Primern sowie dem 492 bp langen Amplifikat des pPIC 9 K Vektorabschnitt bestand. Die Bande bei 2.2 kbp stammte von dem Amplifikat des Wildtyp AOX-Gen (Abb. 3.21.).

Beim anschließenden PCR-Versuch mit dem Primerpaar 5'CDdiagnostic/3'CDdiagnostic, bei dem als Matrizen die Amplifikate aus dem vorangegangenen PCR-Versuch dienten, entstand eine erwartete Bande bei 2052 bp (Abb. 3.22). Als Positivkontrolle bei beiden PCR-Versuchen diente das aus Bakterien isolierte Plasmid pPIC 9 K-A33rbCD.

3.9. Expressionsversuch des A33rbCD Fusionsantikörpers in Pichia pastoris

Die durch die PCR-Analysen detektierten Klone, welche die A33rbCD-Gensequenz integriert hatten, wurden im Maßstab *Suche* kultiviert und induziert.



Abb. 3.23.Western Blot auf Protein L basierend von Überständen ausgewählter *Pichia pastoris* Klone nach 3-tägiger Induktion. Es zeigte sich keine gesuchte Bande von ca. 70 kDa. Als Positivkontrolle (+) diente ein Zelllysat eines A33rbCD produzierenden Escherichia coli Klons.

Bei 75 Klonen (exemplarisch Abb. 3.23.) aus vier verschiedenen Transformationsansätzen zeigte sich kein Klon, der ein Protein in der zu erwartenden Größe von ca. 70 kDa exprimierte, obwohl die PCR-Analysen eine Integration der A33rbCD-Gensequenz anzeigte.

3.10. Optimierungsversuch der Sensitivität des Protein L/Streptavidin Western Blots

Falls es bei den Klonen, die auf die Integration des DNA-A33rbCD-Abschnitts positiv getestet wurden, zu einer intrazellulären Expression des Fusionsantikörpers gekommen war, musste mit dem Western Blot eine höhere Spezifität erreicht werden.



Abb. 3.24. Western Blot mit 10 μg Streptavidin und verschiedenen Mengen Protein L. Als Standard und Positivkontrolle wurden ein Zelllysat eines Escherichia coli Klons (E. coli) mitgeführt, der A33rbCD intrazellulär synthetisiert hatte. Zur Anwendung kam das Zelllysat des *Pichia pastoris* Klons 9.

Es zeigte sich, dass Streptavidin unspezifische Bindungen mit dem *Pichia pastoris* Zelllysat einging, da bei Verzicht auf Protein L im Western Blot trotzdem ein Bandenmuster nachweisbar war. Dagegen zeigten sich keine Banden bei der aus dem *Escherichia coli* Zelllysat bestehenden Kontrolle (Abb. 3.24.).



 Streptavidin
 2.5 μg
 1.25 μg
 0.6 μg

Abb. 3.25.Western Blot mit 10 μg Protein L und verschiedenen Mengen Streptavidin. Als Standard und Positivkontrolle wurden ein Zelllysat eines *Escherichia coli* Klons (E coli) mitgeführt, der A33rbCD intrazellulär synthetisiert hatte. Es wurde das Zelllysat des *Pichia past*oris Klon 9 verwendet.

Durch Reduktion des verwendeten Streptavidin bei konstanter Protein-L-Konzentration konnte keine Spezifitätssteigerung erreicht werden (Abb. 3.25.).

3.11. Expressionsversuch im Such-Maßstab von einem Milliliter

Um mehr Klone auf ihre Expressionseigenschaften zu testen, wurde der Versuch unternommen, 1-ml-Hefekulturen zu verwenden, die für 24 h bei Raumtemperatur wuchsen, um sie anschließend weitere 24 h mit Methanol zu induzieren.

Zur Etablierung wurden Klone verwendet, die durch PCR-Versuche positiv auf die Integration des A33rbGFP-DNA-Abschnitts getestet waren. Als Positivkontrolle wurden ein A33rbGFP-haltiges bakterielles Zelllysat verwendet.



Abb. 3.26.Western Blot mit Hefezelllysaten, die von 1-ml-Kulturen mit A33rbGFP transfizierten Klonen stammten. Als Positivkontrolle wurde ein Zelllysat eines A33rbGFP-produzierenden *Escherichia. coli* verwendet.

Es zeigte sich, dass durch einen Western Blot mit den Nachweisreagenzien Maus-anti-GFP-IgG und Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus-IgG kein Nachweis eines Proteins möglich war, das dem Wanderungsverhalten des Proteins von ca. 50 kDa Größe gemäß der Positivkontrolle (+) glich (Abb. 3.26.).

3.12. Klonierung eines A33-Fusionskonstrukts mit einer aus der Hefe Saccharomyces

cerevisiae stammenden Cytosindeaminase (A33rbCDy)

Ausgehend von dem kommerziell vertriebenen Vektor pORF-Fcy (InvivoGen, San Diego), der die DNA-Sequenz einer aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammenden Cytosindeaminase trägt, wurde mittels einer PCR ein Amplifikat durch das Primerpaar 3'CDyeast und 5'CDyeast generiert. Dieses Amplifikat (im Folgenden "CDy-DNA-Sequenz" bezeichnet) beinhaltete die von der Hefe stammende Cytosindeaminase, die von den Schnittstellen *Spe* I und *Not* I flankiert wurde (Abb. 3.27.).



Abb. 3.27.Agarosegel mit der 477 bp großen CDy-DNA-Sequenz. Diese wurde aus dem Vektor pORF-Fcy mittels PCR durch das Primerpaar 3'CDyeast und 5'CDyeast generiert. Eine Wasser-Kontrolle, die nicht den Vektor pORF-Fcy als Matrix beinhaltete, zeigte keine Bande der erwarteten Größe.

Das Amplifikat CDy wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Groningen) in den Vektor pCR II-TOPO kloniert. Dieses Vektorkonstrukt wurde weiterhin in die chemisch kompetenten Bakterienzellen TOP 10F' transformiert. Die hiernach wachsenden Klone wurden in LB-Medium mit Ampicillin propagiert und mittels Plasmidisolierung und Restriktionsspaltung durch Enzyme *Spe* I und *Not* I auf die Integration des Vektorplasmids mit der CDy-DNA-Sequenz überprüft. (Abb. 3.28.). Die CDy-DNA-Sequenz des Klons 1 wurde im Anschluss präparativ isoliert.



Abb. 3.28.Agarosegel drei transformierter, bakterieller Klone, deren Plasimde isoliert wurden und anschließend durch eine Restriktionsspaltung durch Enzyme Spe I und Not I analysiert wurden. Alle drei Klone zeigten eine Bande, die der Größe der gesuchten CDy-DNA-Sequenz entsprach.

Gleichzeitig wurde das Vektorkonstrukt pPIC 9 K-A33rbGFP bakteriell propagiert isoliert. Die DNA-Sequenz des Green-Fluorescent-Protein wurde durch eine Restriktionsspaltung mit den Enzymen *Spe* I und *Not* I entfernt (Abb. 3.29.). Das dabei entstandene 10028 bp große pPIC 9 K-A33rb-Fragment bestehend aus der DNA-Sequenz des A33-Single-Chain-Fragments und der des Plasmidvektors pPIC 9 K wurde präparativ isoliert.



Abb. 3.29.Agarosegel eines durch die Restriktionsenzyme Spe I und Not I aufgespalteten pPIC 9 K-A33rbGFP Vektorkonstrukts. Dabei entstanden zwei DNA-Fragmente: zum einen dass pPIC 9 K-A33rb-Fragment (10028) zum anderen das GFP-Fragment (736).

Das entstandene Vektorfragment wurde anschließend mit dem CDy-DNA-Fragment fusioniert. Das so erzeugte Vektorkonstrukt beinhaltete die DNA-Sequenzen des Vektorrückgrats pPIC 9 K sowie die DNA-Sequenzen des A33 Single-Chain-Fragments und der aus der Hefe stammenden Cytosindeaminase. Dieses Konstrukt wurde in *Escherichia coli* transformiert. Die transformierten Klone wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten für 12 h bei 37°C inkubiert. Die hier wachsenden Klone wurden propagiert. Es folgte eine Plasmidisolierung und eine Restriktionsspaltung durch die Enzyme *Spe* I und *Not* I, um Klone zu finden, die die CDy-DNA-Sequenz und somit das auch das pPIC 9 K-A33rbCDy-Konstrukt integriert hatten (Abb. 3.30.).



Abb. 3.30.Agarosegel der Plasmid-DNA von 4 Klonen, die durch die Restriktionsenzyme Spe I und Not I aufgespalteten wurden. Dabei entstand bei der Plasmid-DNA des Klones 3 ein Fragment der Größe von 471 bp, das aufgrund seiner Größe der aus Hefen stammenden Cytosindeaminase entsprach Zum Vergleich wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen ein A33rbGFP-pPIC 9 K-Vektorkonstrukt (A33rbGFP) gespalten. Dabei entstand ein Fragment von 736 bp.

Die Plasmid-DNA-Sequenz des Klons 3 mit dem pPIC 9 K-A33rbCDy-Konstrukt wurde von GeneAnalysisService, Berlin sequenziert. Die Analyse ergab die erwartete Sequenz des A33rbCDy-Abschnitts von 1230 bp.

3.13. Funktionsnachweis des A33rbGFP Fusionsantikörpern mittels

Fluoreszenzmikroskopie

Tumorzellen der Zelllinie LIM 1215 (A33 positive Kolonkarzinomzelllinie (75)) wurden mit dem Kulturüberstand des A33rbGFP-produzierenden Hefestammes GS115 78 inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.



Abb. 3.31.links: Tumorzelllinie LIM 1215 nativ. rechts: Tumorzelllinie LIM 1215 inkubiert mit Kulturüberstand des A33rbGFP produzierenden Hefestammes GS115 78.

Im Vergleich zur Nativkontrolle (Abb. 3.31. rechts) zeigten die Zellen nach Inkubation eine deutliche Fluoreszenzzunahme (Abb. 3.31. links).

3.14. Funktionsnachweis des A33rbGFP Fusionsantikörpers mittels

Durchflusszytometrie

Ca. 10^6 Zellen der A33-antigen-positiven Zelllinie LIM 1215 (75) wurde mit 1000 µl des A33rbGFP-haltigen Kulturüberstands für 20 min inkubiert. Als Kontrolle wurde die Zelllinie HT 29 analog verwendet, von der eine deutlich geringere Expression des A33-Antigens bekannt war (49).



Abb. 3.32.Histogrammdarstellung der relativen Fluoreszenzintensität (FL1-Height) und ihre entsprechenden Zellzahl (Counts) für Einzelmessungen eines Ansatzes, bei dem jeweils 30000 Zellen gemessen wurden.

	relative Fluoreszenz im Median			
1) nativ LIM 1215	3.25			
2 nativ HT 29	3.22			
3) HT 29 + 1000 µl А33rbGFP	7.50			
④ LIM 1215 + 1000 μl A33rbGFP	22.88			

Es zeigte sich bezogen auf den nativen Ansatz eine relative Verstärkung der Fluoreszenz bei der Zelllinie LIM 1215 um den Faktor 7 nach Inkubation mit dem Fusionsantikörper A33rbGFP, im Vergleich dazu nahm die relative Fluoreszenz bei der Zelllinie HT 29 um den Faktor 2.3 zu (Abb. 3.32.).



Abb. 3.33.In dem oben dargestellten Dot Blot ist die Abhängigkeit der Zellgröße (FSC-Height) von der Granularität (SSC-Height) der Zelllinien LIM 1215 und HT 29 vor und nach Inkubation mit dem A33rbGFP-haltigen Kulturüberstand des *Pichia pastoris* Klones 78 gezeigt. Außerdem ist das life-gate G1 dargestellt.

Die Streulichteigenschaften (Granularität und Zellgröße) der beiden Zellenlinien LIM 1215 und HT 29 waren nach der Inkubation mit dem A33rbGFP-haltigen Hefekulturüberstand im Vergleich zu nicht inkubierten Ansätzen nicht wesentlich verändert (Abb. 3.33.). Zur Überprüfung der spezifischen Bindung des A33rbGFP Fusionsantikörpers wurde ein Blockierungsassay verwendet. Dabei wurde die Zelllinie LIM 1215 mit 90 µg komplettem IgG-huA33 Antikörper oder als Kontrolle mit einem humanem, irrelevanten IgG-Immunglobulin für 20 min vorinkubiert. Dabei sollten die A33-antigenen Strukturen durch den IgG-huA33 Antikörper besetzt werden. Nach einer Waschprozedur erfolgte die Inkubation mit 1000 µl des A33rbGFP-haltigen Kulturüberstand. Außerdem wurde die Zelllinie LIM 1215 in einem weiteren Ansatz mit irrelevanten, humanem IgG Immunglobulin inkubiert, das nicht um die A33 Antikörperbindungsstelle konkurrierte.



Abb. 3.34.Histogrammdarstellung der relativen Fluoreszenzintensität (FL1-Height) und ihre entsprechenden Zahlzahl (Counts) für Einzelmessungen eines Ansatzes, bei dem jeweils 30000 Zellen gemessen wurden.

Zelllinie LIM 1215	relative Fluoreszenz im Median
1 nativ	3.65
2 + IgG-huA33 + A33rbGFP	5.09
③ + A33rbGFP	20.72
(4) + IgG + A33rbGFP	22.03

Das Blockierungsassay zeigte, dass sich die Fluoreszenz durch Vorinkubation mit dem kompletten IgG-huA33 Antikörper um das Vierfache reduzieren ließ im Vergleich zur Inkubation mit dem Fusionsantikörper A33rbGFP ohne vorherige Blockierung. Die Vorinkubation mit humanem IgG Immunglobulin hatte kaum Auswirkung auf das Fluoreszenzverhalten im Vergleich zum nicht vorinkubierten Ansatz (Abb. 3.34.).

Um das unterschiedliche Bindungsverhalten des A33rbGFP Fusionsantikörpers an verschiedenen Tumorzelllinien zu zeigen, wurde exemplarisch die Zelllinie HT 29 mit 90 μ g kompletten IgG-huA33 für 20 min vorinkubiert, gewaschen und anschließend mit 100 μ l des A33rbGFP-haltigen Kulturüberstandes inkubiert.



Abb. 3.35.Histogrammdarstellung der relativen Fluoreszenzintensität (FL1-Height) und ihre entsprechenden Zahlzahl (Counts) für Einzelmessungen eines Ansatzes, bei dem jeweils 30000 Zellen gemessen wurden.

Zelllinie HT 29	relative Fluoreszenz im Median
1 nativ	3.05
2 + IgG-huA33 + A33rbGFP	4.87
(3) + A33rbGFP	6.73

Die relative Fluoreszenz nahm durch die Inkubation mit dem Fusionsantikörper A33rbGFP um den Faktor 2 im Vergleich zum nativen Ansatz zu. Diese relative Fluoreszenzzunahme ließ sich durch Vorinkubation mit dem kompletten IgG-huA33 Antikörper um den Faktor 1.3 reduzieren (Abb. 3.35.).

3.15. Analyse des Fluoreszenzverhaltens verschiedener Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien COLO 205, LS-174-T, CX 94, HCT 116, HT 29, LIM 1215 (jeweils ca. 10^6 Zellen) wurden für 20 min mit je 1000 µl des Kulturüberstands des *Pichia pastoris* Klons GS115 78 inkubiert, um das Bindungsverhalten des A33rbGFP Fusionsantikörpers an den verschiedenen Zelllinien zu untersuchen.

Jede dieser Zelllinien wurde außerdem für 20 min mit 9 µg IgG-huA33 blockiert und für 20 min mit 1000 µl des Kulturüberstands des Klons GS115 78 inkubiert.

Alle Ansätze wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Fluoreszenzeigenschaften analysiert.

Rel. Fluoreszenzen im Median						
bei verschiedenen Zelllinien	COLO 205	CX 94	LS-174-T	HCT 116	HT 29	LIM 1215
Nativ	2,44	3,05	2,46	2,29	3,22	3,65
Inkubiert mit A33rbGFP	22,47	6,85	17,78	5,88	7,50	20,72
Blockiert mit IgG-huA33	16,11	4,53	12,19	4,29	5,05	5,09
Faktor der rel. Fluoreszenz- zunahme nach Inkubation	9,21	2,25	7,23	2,57	2,33	5,68
Faktor der rel. Fluoreszenz-						
reduktion nach Blockierung	1,40	1,51	1,46	1,37	1,48	4,07

Tabelle 3.1.

Fluoreszenzwerte verschiedener Zelllinien nativ, mit dem Fusionsantikörper A33rbGFP inkubiert sowie mit dem Antikörper IgG-huA33 blockiert und anschließend mit dem Fusionsantikörper A33rbGFP inkubiert.

Die verschiedenen Zelllinien wiesen unterschiedlich starke Fluoreszenzveränderungen nach der Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörpers auf. Diese schwankten zwischen einer relativen Fluoreszenzzunahme von 2.25 der Zelllinie CX 94 bis zu 9.21 der Zelllinie COLO 205 (Tab. 3.1.).

Nach Blockierung durch den Antikörper IgG-huA33 zeigten alle Zelllinien eine Reduktion der Fluoreszenz im Vergleich zur einfachen Inkubation mit dem Fusionsantikörper A33rbGFP. Dabei schwankte der Faktor der relativen Fluoreszenzreduktion zwischen 1.37 bei der Zelllinie HCT 116 und 4.07 bei der Zelllinie LIM 1215 (Tabelle 3.1.).

3.16. Biosensor-Analyse des Bindungsverhaltens des A33rbGFP Fusionsantikörpers

Die Biosensor-Analysen wurden freundlicher Weise von Dr. Gerd Ritter und Leonhard Cohen am Ludwig Institute of Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA erstellt.



Abb. 3.37.Kurvendiagramm zur Darstellung des Bindungsverhaltens des huA33 Antikörpers (rote Kurve) und des A33rbGFP Fusionsantikörpers (grüne Kurve) aus *Pichia pastoris* im Biosensor-Assay. Auf der Abzisse ist der zeitliche Verlauf in Sekunden (s), auf der Ordinate die relative Signalintensität (Response) aufgetragen.

Der Biosensor ermöglicht eine direkte Messung der Bindung von Liganden an ein auf einer Matrix (Chip) fixiertes Molekül. Der Chip wird mit gebündeltem Licht bestrahlt, das nach der Reflexion am Chip von Detektoren gemessen wird und auf seine Wellenlängenveränderungen vor und nach Inkubation des Chips mit dem Liganden analysiert wird. Anschließend können diese Wellenlängenveränderungen zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Dieses wird als relative Antwort (Response, RU) bezeichnet und ist ein relatives Maß für das Bindungsverhalten eines Liganden (76).

Wie in der Abb. 3.37. gezeigt, wurde ein mit huA33-Antigen beladener Chip für 200 s einem Strom mit Spülflüssigkeit ausgesetzt, um anschließend in der Bindungsphase mit dem stark verdünnten Überstand der Hefekultur des Klons GS115 78 inkubiert zu werden. Dabei näherte sich die Bindungskinetik asymptotisch einem Plateau an, das bei ca. 500 s erreicht wurde. Dann folgte ab 550 s die Dissoziationsphase, in der wieder mit Puffer gespült wurde. Analog wurde mit dem Antikörper huA33 verfahren.

Verglichen wurden die beiden relativen Antworten in der Dissoziationsphase bei 700 s untereinander sowie zum Ausgangswert bei 100 s. Dabei zeigte der A33rbGFP Fusionsantikörper eine um die Hälfte reduzierte relative Antwort gegenüber dem huA33 Antikörper bei einer deutlichen Steigerung (ca. 60 RU) gegenüber seinem Ausgangswert.

3.17. Funktionstest des A33rbGFP Fusionsantikörpers am klinischen Resektat

Es wurde ein klinisches Resektat eines gesunden Kolonepithels in Mikrotomschnitte zerlegt, die auf einem Objektträger mittels Acetat fixiert und für 30 min mit 100µl Kulturüberstand des A33rbGFP produzierenden Klons GS115 78 inkubiert wurden.



Abb. 3.38.links: Mikrotomschnitt eines gesunden Kolongewebes vor Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper rechts: Mikrotomschnitt des selben gesunden Kolongewebes nach Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper

Die Strukturen der Darmmukosa lassen sich ohne Inkubation kaum darstellen (Abb. 3.38. links). Nach der Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper stellt sich das Epithel der Darmmukosa deutlich durch grüne Fluoreszenz dar (Abb. 3.38. rechts).