

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das humorale Immunsystem</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Aufbau von Antikörpern</b>	<b>1</b>
1.3	<b>Biosynthese von Antikörpern / Entstehung der Antikörpervielfalt</b>	<b>2</b>
1.4	<b>Autoimmunerkrankungen</b>	<b>4</b>
1.5	<b>Therapie von Autoimmunerkrankungen</b>	<b>5</b>
1.5.1	Konventionelle Therapie	5
1.5.2	Therapie durch Antikörpergabe	6
1.5.3	Spezielle Behandlungsstrategien	6
1.6	<b>Intravenös verabreichtes Immunglobulin der Klasse G</b>	<b>7</b>
1.6.1	Wirkungsweise von IVIG	7
1.6.1.1	Fc-vermittelte Effekte	8
1.6.1.2	Fab-vermittelte Effekte	9
1.6.2	Spezielle Untersuchungen zur antiidiotypischen Wirkungsweise von IVIG	11
1.7	<b>Das Phagen Display System</b>	<b>13</b>
1.8	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	<b>Isolierung spezifisch bindender Fab-Phagen mittels Phagen Display</b>	<b>18</b>
2.1.1	Herstellung von Fab-Phagen	18
2.1.1.1	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	18
2.1.1.2	Optimierung der IgG-Phagen-Bibliothek	19
2.1.1.3	Quantifizierung der optimierten und gereinigten DNA	19
2.1.1.4	Herstellung elektrokompenter Zellen	19
2.1.1.5	Elektrotransformation von <i>E.coli</i> mit anschließender Fab-Phagen Produktion	20
2.1.1.6	Bestimmung der Transformationseffizienz und des Fab-Phagen-Titers	20
2.1.2	Selektive Isolierung von Fab-Phagen	21
2.1.2.1	Biopanning der Fab-Phagen	21
2.1.2.2	Kontrolle der Effizienz des Biopannings	22
2.1.2.3	Herstellung von Einzelklon-Output-Phagen der letzten Biopanning-Runde	22
2.1.2.4	Sandwich-ELISA zur Bestimmung des relativen Phagentiters	23
2.1.2.5	Sandwich-ELISA zur Identifizierung antigenbindender Einzelklon-Fab-Phagen	23

<b>2.2</b>	<b>Herstellung und Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente</b>	<b>23</b>
2.2.1	Herstellung löslicher Fab-Fragmente	23
2.2.1.1	Entfernung des G III-Fragments	23
2.2.1.2	Simultane Produktion von Fab-Fragmenten in kleiner Menge	24
2.2.1.3	Produktion von Fab-Fragmenten in großer Menge	24
2.2.2	Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente	25
2.2.2.1	Herstellung einer anti-Fab Protein G-Sepharose Affinitäts-Chromatographie-Säule	25
2.2.2.2	Aufreinigung von Fab-Fragmenten durch anti-Fab Affinitäts-Chromatographie	26
2.2.2.3	Aufreinigung von Fab-Fragmenten durch Protein A Affinitäts-Chromatographie	27
2.2.2.4	Aufreinigung von Fab-Fragmenten durch thiophile Adsorptions-Chromatographie	27
2.2.3	Analysierung löslicher Fab-Fragmente	28
2.2.3.1	Sandwich-ELISA zur Bestimmung der relativen Fab-Fragment-Konzentration	28
2.2.3.2	Weiterverarbeitung der FPLC-Kollektions-Fraktionen	29
2.2.3.3	Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration	29
2.2.3.4	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.2.3.5	Silberfärbung von Phast-Proteingelen	30
<b>2.3</b>	<b>Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen</b>	<b>30</b>
2.3.1	Restriktionsenzymanalyse mit SacI / XbaI bzw. XhoI / SpeI	30
2.3.2	Restriktionsenzymanalyse mit BstNI	30
2.3.3	Automatische Sequenzierung	31
2.3.4	Sequenzanalyse	32
2.3.5	Herstellung von Fab-Phagen in 2 ml Kultur	33
2.3.6	Sandwich-ELISA zur Bestimmung von spezifischen Bindungseigenschaften	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Expression und Aufreinigung von löslichen Fab-Fragmenten</b>	<b>34</b>
3.1.1	Herstellung löslicher Fab-Fragmente	34
3.1.1.1	Präparation des Phagemids zur Herstellung von löslichen Fab-Fragmenten	34
3.1.1.2	Untersuchungen zur Fab-Fragment Expression	35
3.1.2	Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente	38
3.1.2.1	Aufreinigung durch anti-Fab Affinitätschromatographie	38
3.1.2.2	Aufreinigung durch Protein A Affinitätschromatographie	39
3.1.2.3	Aufreinigung durch thiophile Adsorptionschromatographie	40
3.1.3	Herstellung und Aufreinigung von Fab-Fragmenten für die Isolierung und Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen	41
<b>3.2</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen</b>	<b>42</b>
3.2.1	Isolierung LO31 bindender Fab-Phagen	42

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.2.2	Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen	45
3.2.2.1	Auswahl von Output-Klonen für weitere Untersuchungen	45
3.2.2.2	Restriktionsenzymanalyse mit SacI/XbaI bzw. XhoI/SpeI	46
3.2.2.3	Sequenzen der anti-LO31 Klone	46
3.2.2.4	Zugehörige Keimbahngensegmente und Mutationsraten	48
3.2.2.5	Bindungseigenschaften der anti-LO31 Klone	50
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression und Aufreinigung von Fab-Fragmenten</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Isolierung spezifisch LO31-bindender Fab-Phagen</b>	<b>54</b>
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung spezifisch LO31-bindender Fab-Phagen</b>	<b>55</b>
4.3.1	Strukturelle Charakterisierung der Fab-Phagen auf molekularer Ebene	55
4.3.2	Funktionelle Charakterisierung der LO31-bindenden Fab-Phagen	55
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>73</b>