

2 MATERIAL UND METHODEN

Allgemeine Lösungen und Medien:

SuperBroth (SB) Medium

Trypton	60 g
Hefeextrakt	40 g
MOPS	20 g
Aqua dest.	ad 2 l
pH 7,0	

S.O.C. Medium:

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,46 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
Glukose	3 g
Aqua dest.	ad 1l
pH 7,0	

1 M MgCl₂-Lösung

MgCl ₂	203,3 g (1 M)
Aqua dest.	ad 1l

TBS

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	50 mM
NaCl	150 mM
Aqua dest.	ad 1l
pH 7,5	

Antibiotikahaltige LB-Agar

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Antibiotikum	
Aqua dest	ad 1l
pH 7,0	

PBS

NaCl	8,5 g (145 mM)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,28 g (7,2 mM)
NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O	0,156 g (1,1 mM)
Aqua dest.	ad 1l
pH 7,5	

Feste Chemikalien wurden von der Firma Merck KGaA, Darmstadt bezogen, flüssige Chemikalien stammten von der Firma Baker (kmf-Laborchemie Handels GmbH, Lohmar), soweit in der Methodenbeschreibung nicht anders vermerkt.

2.1 Isolierung spezifisch bindender Fab-Phagen mittels Phagen Display

2.1.1 Herstellung von Fab-Phagen

Die DNA einer IgG-Phagen-Bibliothek, gewonnen aus den Lymphozyten einer Probandin ohne Autoimmunkrankheit (Hoffmann et al., 2000), wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. Melanie Hoffmann zur Verfügung gestellt.

2.1.1.1 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Spezielle Lösungen:

Laufpuffer: TAE-Puffer (1x)

TAE-Puffer (50x)	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	242 g (2 M)
Eisessig	57,1 ml
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	19 g (50 mM)
Aqua dest.	ad 1 l
pH 8,0	

Probenpuffer:

TE-Puffer (1x)	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	1,21 g (10 mM)
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	0,38 g (1 mM)
Aqua dest.	ad 1 l
pH 8,0	

Ladepuffer:

Bromphenolblau 0,2 %	35 ml
Glycerol 30 %	15 ml

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese diente der Größenfraktionierung von DNA-Proben. Agarose, mit einem für die Molekularbiologie spezifischen Reinheitsgrad (LE Agarose; Seakem®, Cambrex Corporation, New Jersey, USA), wurde je nach Größe der zu

analysierenden DNA in einer Konzentration von 1-2 % verwendet. Sie wurde dazu in 1x TAE-Puffer aufgekocht und mit 1 µl Ethidiumbromid (1 %; Roth, Karlsruhe) pro 10 ml Agarose-Ansatz versetzt. Das Gel wurde in eine horizontale Gelkammer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) gegossen und nach dem Erstarren mit Laufpuffer überschichtet. Mit Probenpuffer verdünnte Proben (PR) wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer (LP) im Verhältnis von ca. 1:4 (LP:PR) versetzt. Nach dem Beladen des Gels wurde eine elektrische Spannung von 200 V angelegt (Power Pac 300; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA). Die erforderliche Laufzeit konnte anhand der Bromphenolblaubande abgeschätzt werden.

Nach Beendigung des Laufes wurden die DNA-Banden im UV-Durchlicht (Dual-Intensity Transilluminator; UVP Inc, Upland, USA) sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videoprinter-Anlage (Herolab Easy 429K-Kamera; Herolab, Wiesloch/Video Copy Processor; Mitsubishi, Japan) dokumentiert. Zur Orientierung bei der Auswertung des Gels diente ein DNA-Größenmarker (1kb DNA ladder; Gibco, Life Technologies, Karlsruhe), der zusätzlich zu den Proben aufgetragen wurde.

2.1.1.2 Optimierung der IgG-Phagen-Bibliothek

10 µl der Original-DNA wurden in einem 1% Agarose-Gel bei 150 Volt eine Stunde aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande mit einer Größe von ca. 3,2 kb (Phagemidklone mit zwei Inserts) wurde mit einem sterilem Skalpell bei möglichst kurzer UV-Betrachtung herausgeschnitten und mittels QIAquick-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel gereinigt und in 30 µl Aqua bidest aufgenommen.

2.1.1.3 Quantifizierung der optimierten und gereinigten DNA

Drei verschiedene Volumina (0,5 µl, 1 µl, 5 µl) der optimierten DNA wurden parallel zu einer Verdünnungsreihe eines DNA-Standards 5 Minuten bei 200 Volt in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte durch visuellen Vergleich der DNA-Probe mit der Verdünnungsreihe des DNA-Standards bei UV-Belichtung.

2.1.1.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen

10 ml SB-Medium mit 10 µg/ml Tetrazyklin (Tet) wurden mit Zellen eines eingefrorenen *Escherichia coli* (*E.coli*) XL1-Blue Stocks (Stratagene, La Jolla, USA) angeimpft und bei 37°C mit 200 rpm über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Übernachtskultur in 200 ml vorgewärmtes SB/Tet Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte von 0,8 – 1,2 (600 nm) bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Nach 20 min Kühlung auf Eis folgte eine Sedimentation der Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 3000g und 4°C (GSR-6 Zentrifuge; Beckmann, München). Die pelletierten Zellen wurden mit 200 ml eiskaltem Aqua bidest. resuspendiert und danach erneut 10 min bei 3000g und 4°C sedimentiert. Es folgte nochmals eine Resuspension des Zellpellets mit 100 ml eiskaltem Aqua bidest. mit sich anschließender Zentrifugation bei 4°C und 3000g für 10 min. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 4 ml 10 %igem, eiskaltem Glycerol aufgenommen und wiederum 10 min bei 3000g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden mit 2 ml 10 %igem, eiskaltem Glycerol

resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und sofort auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -70°C.

Um eine Aussage über die Qualität der kompetenten Zellen machen zu können, wurde eine Probe-Elektrotransformation unter Standardbedingungen mit einer definierten Menge DNA durchgeführt und die Anzahl der transformierten Zellen pro µg DNA bestimmt. Es wurden außerdem Wachstumskontrollen auf tetracyklin-, carbenizillin- und kanamycinhaltigen Nährböden durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen auszuschließen.

2.1.1.5 Elektrotransformation von *E.coli* mit anschließender Fab-Phagen Produktion

10 µl der optimierten, gereinigten und eisgekühlten DNA einer IgG-Phagen-Bibliothek wurden zu 200 µl frisch aufgetauter, elektrokompetenter Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde sofort in eine eisgekühlte Elektrotransformationsküvette (*E.coli* Pulser Cuvette, 0,2 cm electrode gap; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) überführt. Es folgte eine Elektrotransformation mit 25 µF, 2500 V, 200 Ω und einer Feldstärke von 12,5 kV/cm (Gene Pulser, Pulse-Controller, Capacitance Extender; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA). Die transformierten Zellen wurden unverzüglich in 3 ml eiskaltes S.O.C. Medium aufgenommen und bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Nach 1 h wurden die 3 ml S.O.C. in 10 ml SB Medium mit 20 µg/ml Carbenizillin (Carb) und 100 µl 1M MgCl₂-Lösung überführt und wiederum 1 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Es folgte abermals eine Verdünnung mit 100 ml SB (inklusive 50 µg/ml Carb und 1 ml 1M MgCl₂-Lösung), welche 1 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt wurde. Durch Zugabe von $1,4 \times 10^{11}$ pfu Helferphagen vom Typ VCS-M13 (Stratagene, La Jolla, USA) wurde eine Phageninfektion induziert. Anschließend wurde die Kultur weitere 1,5 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Danach wurden 70 µg/ml Kanamycin zugegeben, um eine Doppelsektion zu erreichen, bei der jene *E.coli* wuchsen, welche das Plasmid enthielten und zusätzlich mit Helferphagen infiziert waren. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 220 rpm weitergeschüttelt.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen 20 min bei 3000 rpm (GSR-6 Zentrifuge; Beckmann, München) und 20°C sedimentiert. Die Fab-Phagen wurden mit 3 g NaCl und 4 g PEG 8000 aus dem Überstand präzipitiert. Aus dem Sediment konnte Plasmid-DNA gewonnen werden. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 12000g und 4°C (Sorvall RC 50 Plus Zentrifuge; Du Pont, Nemours GmbH, Bad Nauheim) für 20 min. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das Phagenpellet in 2 ml TBS mit 1 % Casein resuspendiert. Eine Zentrifugation bei 6000 rpm (Mikrozentrifugen (Micro Max); IEC) für 5 min trennte die restlichen Bakterien von den Fab-Phagen. Die Fab-Phagen wurden kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C aufbewahrt.

2.1.1.6 Bestimmung der Transformationseffizienz und des Fab-Phagen-Titers

Die Größe der Phagen-Bibliothek wurde durch die Ermittlung der Transformationseffizienz bestimmt. Dazu wurden von einer 10 ml Phagen-Anzuchtkultur, direkt nach dem Überführen der 3 ml S.O.C. Medium (siehe 2.1.1.5), 0,1 µl, 1 µl und 50 µl auf carbenizillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformationseffizienz errechnete sich durch die Anzahl der gewachsenen Einzelkolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (13000 bei Auszählung des 1µl Nährbodens).

Um den Titer der Fab-Phagen zu bestimmen, wurde eine *E.coli* Kultur angelegt. Es wurden 20 ml tetrazyklinhaltiges (10 µg/ml) SB Medium mit einem *E.coli* Stock (Stratagene, La Jolla, USA) angeimpft und 1-2 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Währenddessen wurde mit den Fab-Phagen und SB Medium eine Verdünnungsreihe von 10⁻² bis 10⁻¹⁰ hergestellt. Anschließend wurden je 10 µl der Verdünnungsreihe von 10⁻⁶ bis 10⁻¹⁰ in je 50 µl *E.coli* Kultur gegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Die einzelnen Ansätze wurden auf carbenizillinhaltigen LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der Phagen pro µl TBS/Casein erhielt man, indem man die Anzahl gewachsener Einzelkolonien durch die Zahl 10 und anschließend nochmals durch die ausplattierte Verdünnungsstufe des ausgezählten Agars dividierte.

2.1.2 Selektive Isolierung von Fab-Phagen

2.1.2.1 Biopanning der Fab-Phagen

Spezielle Lösungen:

Elutionspuffer

Glycin	7,5 g (0,1 M)
Aqua dest.	ad 1l
pH 2,2	

Neutralisationspuffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	121,1 g (1 M)
Aqua dest.	ad 1l
pH 9,0	

5-6 Maxisorb-Röhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) wurden mit je 17 µg/ml Antigen in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet.

Ein Röhrchen je Biopanning-Runde wurde am Morgen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1 %igem Casein in PBS für 30 min bei 37°C geblockt. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit je 2 ml PBS, bevor mit 300 µl Fab-Phagen (das entsprach einer Anzahl von ca. 10¹² Phagen bei der ersten Biopanning-Runde) für 2 h bei 37°C inkubiert wurde. Um ungebundene Phagen zu entfernen, wurde bei der ersten Biopanning-Runde zweimal mit 1 ml 1 %igem Casein in PBS und einmal mit 1 ml PBS gewaschen, wobei der Waschpuffer jeweils für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Während der folgenden Biopanning-Runden wurde zehnmal mit einer Inkubation von 2 min gewaschen.

Durch Zugabe von 300 µl Elutionspuffer und 5-minütiger Inkubation konnten gebundene Fab-Phagen eluiert werden, welche anschließend sofort in 60 µl Neutralisationspuffer aufgenommen wurden. Mit dem Eluat wurden 3 ml einer frischen *E.coli* Kultur (siehe 2.1.1.6) infiziert und bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Nach 20 min erfolgte eine Überführung der Kultur in 10 ml SB Medium mit 20 µg/ml Carbenizillin (Carb) und 0,1 mmol MgCl₂. Proben von 0,1 µl, 1 µl und 50 µl konnten zur Phagentiterbestimmung (Phagen-Output der Panning-Runde) auf carbhaltigen LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Die 13 ml-Kultur wurde 1 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt und anschließend in 100 ml SB Medium mit 50 µg/ml Carb und 1 mmol MgCl₂ gegeben. Es folgte wiederum eine Inkubation

für 1 h bei 37°C und 220 rpm, bevor mit $1,4 \times 10^{11}$ pfu Helferphagen (siehe 2.1.1.5) infiziert wurde. Nach 1,5 h Inkubation bei 37°C und 220 rpm wurde durch die Zugabe von 70 µg/ml Kanamycin eine Doppelselektion eingeleitet und es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und 220 rpm.

Die Präzipitation der Fab-Phagen am nächsten Morgen erfolgte wie bereits bei der Fab-Phagen-Produktion beschrieben. Aus dem Zellpellet der Übernachtskultur konnte DNA isoliert werden. Mit den gewonnenen Phagen wurde eine erneute Biopanning-Runde durchgeführt und der Phagentiter (siehe 2.1.1.6) ermittelt, um den Phagen-Input der Panning-Runde zu bestimmen.

Es wurden 5 – 6 Biopanning-Runden durchgeführt, um eine Anreicherung spezifisch gebundener Fab-Phagen zu erreichen.

2.1.2.2 Kontrolle der Effizienz des Biopannings

Eine Anreicherung spezifisch gebundener Fab-Phagen war durch die Zunahme der eluierten Phagen bei jeder Biopanning-Runde zu erkennen. Zudem wurde ein Anstieg des prozentualen Anteils der gebundenen Phagen, errechnet aus dem Quotienten von Phagen-Input und Phagen-Output, erwartet.

Um die Qualität der eluierten Fab-Phagen abzuschätzen, wurde mit Hilfe des Wizard Plus Miniprep-Kits (Promega, Madison, USA) eine Isolierung von Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers aus dem Zellpellet der Übernachtskultur (siehe 2.1.2.1) durchgeführt und die so gewonnene DNA mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.1.1.1) beurteilt. Durch einen DNA-Größenvergleich konnte abgeschätzt werden, ob bei einem Großteil der eluierten Fab-Phagen leichte und schwere Kette des Fab-Fragments vorhanden waren.

Für ein weiteres Abschätzen der Anreicherung spezifisch bindender Fab-Phagen diente die im ELISA (siehe 2.1.2.5) ermittelte Stärke der Bindung der Gesamtoutputphagen der einzelnen Panning-Runden an das im Biopanning eingesetzte Antigen.

2.1.2.3 Herstellung von Einzelklon-Output-Phagen der letzten Biopanning-Runde

Eine sterile 48-Loch-Zellkulturplatte (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) wurde mit 300 µl SB-Ansatz (50 ml SB-Medium, 50 µg/ml Carbenizillin und 500 µl 1 M MgCl₂-Lösung) pro Vertiefung gefüllt. Ausgehend von einer Bakterienplatte der letzten Panning-Output-Bestimmung wurde jede Vertiefung mit einer Einzelkolonie angeimpft. Parallel dazu wurde eine Stamm-Platte von allen Vertiefungen auf einem carbenizillinhaltigen LB-Agar angelegt und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die 48-Loch-Platte schüttelte für 5 h bei 37°C und 150 rpm, bevor mit $3,5 \times 10^7$ pfu Helferphagen pro Vertiefung infiziert wurde. Es wurde eine weitere Stunde bei 37°C und 150 rpm inkubiert und anschließend eine Doppelselektion durch Zugabe von 70 µg/ml Kanamycin eingeleitet. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C und 150 rpm geschüttelt.

Am nächsten Morgen erfolgte eine Zentrifugation der 48-Loch-Platte für 20 min bei 3000 rpm und Raumtemperatur (GSR-6 Zentrifuge; Beckmann, München), mit dem Ziel, die Bakterien zu sedimentieren. Die Phagenüberstände wurden in eine über Nacht mit 1 %igem Casein in PBS geblockte 96-Loch-Platte (TPP Zellkultur Testplatte; Renner GmbH, Dannstadt)

überführt und bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert. Die Stamm-Platte wurde ebenfalls bei 4°C aufgehoben.

2.1.2.4 Sandwich-ELISA zur Bestimmung des relativen Phagentiters

Eine 96-Loch-EIA-Platte (Costar; Corning Inc, Corning, USA) wurde pro Vertiefung mit 6 ng monoklonalem Anti-M13 Antikörper (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach einmaligem Waschen (ImmunoWash Model 1575; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) mit 0,2 % Casein in PBS wurde mit 1 %igem Casein in PBS für 1 h bei 37°C geblockt. Es wurde wiederum einmal mit 0,2 % Casein in PBS gewaschen, bevor 50 µl von 1:10 verdünnten Phagenüberständen in jede Vertiefung pipettiert wurden. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C folgte ein 5-maliges Waschen, um nichtgebundene Bestandteile zu entfernen. Zur Detektion gebundener Phagen diente ein Peroxidase-markierter Anti-M13 Antikörper (HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), der in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt wurde. 50 µl/Vertiefung inkubierten für 1 h bei 37°C, bevor nach 5-maligem Waschen die Farbentwicklung mit 50 µl TMB (Tetramethylbenzidin, Fa. Kirkegaard & Perry, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) pro Vertiefung eingeleitet wurde. Die Farbreaktion wurde nach 5 min mit 1 M H₃PO₄ gestoppt und die Absorption bei 450/650 nm im ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) gemessen. Dabei war die Farbentwicklung direkt proportional zur Phagenkonzentration der Proben.

2.1.2.5 Sandwich-ELISA zur Identifizierung antigenbindender Einzelklon-Fab-Phagen

Eine 96-Loch-EIA-Platte (Costar; Corning Inc, Corning, USA) wurde mit 300 ng Antigen/Vertiefung über Nacht bei 4°C beschichtet. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 2.1.2.4 beschrieben. Allerdings wurden die Phagenüberstände unverdünnt eingesetzt. Die Stärke der Farbentwicklung des ELISA war proportional zur Bindungsstärke der Fab-Phagen an das Antigen. Die gemessene Absorption wurde mit Hilfe von Sigma Plot 2000 Version 6.0 graphisch dargestellt.

2.2 Herstellung und Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente

2.2.1 Herstellung löslicher Fab-Fragmente

2.2.1.1 Entfernung des G III-Fragments

Um eine Trennung der Fab-Fragmente von der Phagenoberfläche zu erreichen, musste das G III-Fragment, das für das Phagen-Hüllprotein kodiert, mit den Restriktionsenzymen NheI und SpeI aus dem Phagemid herausgeschnitten werden. Das Phagemid konnte anschließend selbstligiert werden, da NheI und SpeI kohäsive Enden ergeben.

1-5 µg Einzelklon-Phagen-DNA wurden mit 60 U NheI und 20 U SpeI in Puffer M (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach der direkten Zugabe von 5 µl Ladepuffer zum Restriktionsansatz, wurde mit einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.1.1.1) das G III-Fragment von dem Rest des Phagemids getrennt. Dazu wurde, nach dem Beladen des 1 %igem low melting-Gels (large DNA low melt Agarose; Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf), eine Spannung von 100 V für 1,5 h angelegt und anschließend die Phagemid-Bande (ca. 4,1 kb bei pComb3H und 4,7 kb bei pComb3) unter möglichst kurzer UV-Betrachtung herausgeschnitten. Nach dem Schmelzen der Gelbande bei 68°C für 20 min, wurden 7 µl des DNA-Agarose-Gemisches zu 13 µl Ligationsansatz mit 2 µl T₄-DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gegeben und über Nacht bei 16°C inkubiert.

5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Elektrotransformation von 200 µl elektrokompeter Zellen verwendet (siehe 2.1.1.5). Jeweils 10 µl bzw. 100 µl der zuvor 1 h inkubierten S.O.C.-Kultur wurden auf carbenizillinhaltigem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, um Einzelkolonien zu erhalten.

2.2.1.2 Simultane Produktion von Fab-Fragmenten in kleiner Menge

Eine sterile 48-Loch-Zellkulturplatte (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) wurde pro Vertiefung mit 300 µl SB-Stocklösung aus 50 ml SB Medium, 50 µg/ml Carbenizillin und 1 ml 1 M MgCl₂-Lösung (20 mM) gefüllt. Jede Vertiefung wurde mit Bakterien-Material einer Einzelkolonie von 2.2.1.1, zuzüglich Kontrollen, angeimpft. Parallel dazu wurde eine Stamm-Platte von allen Vertiefungen auf einem carbenizillinhaltigen LB-Agar angelegt. Die 48-Loch-Platte inkubierte für 5 h bei 37°C und 150 rpm, die Agar-Platte über Nacht bei 37°C. Um die Expression der Fab-Fragmente in der 48-Loch-Platte zu induzieren, wurden 150 µl SB-Stocklösung mit 1 mM IPTG (dioxanfrei; Roth, Karlsruhe) in jede Vertiefung gegeben. Die Expression erfolgte über Nacht bei 30°C und 150 rpm.

Eine Zentrifugation der 48-Loch-Platte bei 3000 rpm und Raumtemperatur für 20 min (GSR-6 Zentrifuge; Beckmann, München) sedimentierte die Bakterien. Die Überstände wurden in eine 96-Loch-Zellkulturplatte (TPP; Renner GmbH, Dannstadt), die über Nacht mit 1 % Casein in PBS geblockt worden war, überführt und bis zur weiteren Austestung bei 4°C gelagert. Die Bakterienpellets wurden jeweils mit 100 µl PBS/PMSF (34 µg/ml) resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, erfolgte ein viermaliges Einfrieren (-80°C; 20 min) und Auftauen (37°C; 10 min). Nach dem letzten Auftauen wurde die Platte für 15 min bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, um die groben Zellbestandteile von den freigesetzten Fab-Fragmenten zu trennen. Die Fab-fragmenthaltigen Überstände wurden direkt im ELISA eingesetzt.

2.2.1.3 Produktion von Fab-Fragmenten in großer Menge

20 ml SB Medium mit 50 µg/ml Carbenizillin und 10 mM MgCl₂ wurden mit Bakterienmaterial eines Glycerolstocks oder einer Stammplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Es folgte eine Überführung der Übernachtskultur in 500 ml SB Medium mit 50 µg/ml Carbenizillin und 20 mM MgCl₂. Nach einer Inkubation bei 37°C und 220 rpm bis zu einer

optischen Dichte von ca. 1,0 bei 600 nm (Ultrospec III; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (dioxanfrei; Roth, Karlsruhe) die Expression der Fab-Fragmente induziert. Die Kultur schüttelte über Nacht bei 30°C und 220 rpm.

Um die Zellen zu sedimentieren wurden diese für 20 min bei 1500g und Raumtemperatur zentrifugiert (Sorvall RC 3B Plus; Du Pont, Nemours GmbH, Bad Nauheim). Das Zellpellet wurde mit 10 ml PBS/PMSF (34 µg/ml) resuspendiert. Die Lysierung der auf Eis gekühlten Zellen erfolgte anschließend durch 2-minütige Ultraschallbehandlung bei 1 sec Intervallen von 3 VA (Vibra cell; Sonics & Materials Inc, Newton, USA). Die Zellreste wurden für 20 min mit 1500g bei 4°C sedimentiert (GSR-6 Zentrifuge; Beckmann, München) und der Überstand mit den Fab-Fragmenten in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte eine weitere Sedimentation mit 27000g und 4°C für 20 min (Sorvall RC 50 Plus; Du Pont, Nemours GmbH, Bad Nauheim). Der Überstand wurde sterilfiltriert (SFCA Filter Unit, 50 mm Diameter Membrane; Nalgene®, Nalge Nunc International, Rochester, USA) und sofort zur Aufreinigung eingesetzt.

2.2.2 Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente

2.2.2.1 Herstellung einer anti-Fab Protein G-Sepharose Affinitäts-Chromatographie-Säule

Spezielle Lösungen:

0,2 M Natriumborat-Lösung

Natriumborat	0,2 M
Aqua dest.	ad 1l
pH 9,0	

100 mM DMP-Lösung

DMP (Pierce, Rockford, USA)	259,18 mg
PBS	ad 10 ml

0,2 M Ethanolamin-Lösung

Ethanolamin	0,2 M
Aqua dest.	ad 1l

2 mg eines Ziege-anti-human IgG F(ab')₂ Antikörpers (Pierce, Rockford, USA) wurden zu 2 ml GammaBind G Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben und 1 h rotierend bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 100 rpm für 5 min ebenfalls bei Raumtemperatur (GSR-6 Zentrifuge; Beckmann, München), um danach nichtgebundene Antikörper vorsichtig abzupipettieren. Der restliche Ansatz wurde zweimal gewaschen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 ml 0,2 M Natriumborat-Lösung zugegeben und anschließend für 5 min mit 100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abpipettiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Ansatz mit 8 ml 0,2 M Natriumborat-Lösung und 2 ml 100 mM DMP-Lösung resuspendiert und 30 min rotierend bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation mit

100 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 10 ml einer 0,2 M Ethanolamin-Lösung zu dem Ansatz gegeben und 2 h rotierend bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 5 min mit 100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Sediment mit 2 ml PBS resuspendiert.

Das gesamte Material wurde in eine für das FPLC-System geeignete Säule (HR 5 Column; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) luftblasenfrei eingefüllt. Die Säule wurde 30 min mit PBS äquilibriert und vor dem ersten Beladen mit Elutionspuffer eluiert, um ungekoppelten Antikörper zu entfernen.

Zur Lagerung wurde die Säule 10 min mit 0,02 % NaN_3 in PBS äquilibriert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Aufreinigung von Fab-Fragmenten durch anti-Fab Affinitäts-Chromatographie

Spezielle Lösungen:

Ladepuffer PBS

Elutionspuffer

Zitronensäure	0,05 M
NaCl	0,5 M
Aqua dest.	ad 1l
pH	3,0

1 M Tris-Lösung

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	121 g
Aqua dest.	ad 1l
pH	9,0

Die Aufreinigung wurde mit Hilfe eines FPLC-Systems (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Vor dem ersten Lauf wurde die Säule mit 10 ml PBS äquilibriert. Es folgte eine weitere Äquilibrierung mit 5 ml PBS vor jedem neuen Beladen der Säule. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurden 2 ml des Lysates der Fab-Fragment-Produktion (Herstellung siehe 2.2.1.3) auf die anti-Fab-Säule geladen. Die beladene Säule inkubierte für 10 min. Die Säule wurde anschließend mit 5 ml PBS 10 min gewaschen, um Fremdproteine zu entfernen. Die gebundenen Fab-Fragmente wurden durch den Fluss des Elutionspuffers mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert und sofort nach dem Auffangen mit 1 M Tris-Lösung, pH 9,0 neutralisiert.

Um Fab-Fragmente in großer Menge aufzureinigen, wurde die oben beschriebene Methode modifiziert. Nach dem ersten Beladen der Säule wurde der Lauf gestoppt und es folgte ein zweites Beladen der Säule mit 2 ml Lysat, nachdem vorher mit 2 ml PBS äquilibriert worden war. Der sich anschließende Inkubationsschritt entfiel. Der Rest des Laufes erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.2.3 Aufreinigung von Fab-Fragmenten durch Protein A Affinitäts-Chromatographie

Spezielle Lösungen:

Ladepuffer PBS

Elutionspuffer

Natriumcitrat	0,1 M
Aqua dest.	ad 1l
pH	3,0

1 M Tris-Lösung siehe 2.2.2.2

Die Aufreinigung mit Hilfe von Protein A Affinitäts-Chromatographie kann nur mit Fab-Fragmenten durchgeführt werden, die von der V_H3-Familie abstammen. Der Vorgang der Aufreinigung erfolgte prinzipiell wie unter 2.2.2.2 beschrieben. Allerdings wurde hier eine fertige Protein A-Säule (HiTrap rProtein A; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) benutzt und für die Elution kam 0,1 M Natriumcitrat, pH 3,0 zum Einsatz.

2.2.2.4 Aufreinigung von Fab-Fragmenten durch thiophile Adsorptions-Chromatographie

Spezielle Lösungen:

50 mM Natriumphosphat-Lösung

Na ₃ PO ₄	14,2 g
Aqua dest.	ad 2l
pH	7,5

3 M Ammoniumsulfat-/50 mM Natriumphosphat-Lösung

(NH ₄) ₂ SO ₄	39,6 g
Na ₃ PO ₄	0,71 g
Aqua dest.	ad 100 ml
pH	7,5

1 M Ammoniumsulfat-/50 mM Natriumphosphat-Lösung

(NH ₄) ₂ SO ₄	264 g
Na ₃ PO ₄	14,2 g
Aqua dest.	ad 2l
pH	7,5

6 M Harnstoff-Lösung

Harnstoff	180,2 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Das Prinzip der Aufreinigung mittels thiophiler Adsorptions-Chromatographie beruht auf der Bindung von Fab-Fragmenten über Tryptophan- und/oder Phenylalanin-Reste an einen schwefelhaltigen, immobilisierten Liganden der Chromatographie-Matrix.

Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des FPLC-Systems (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Es wurden 2 ml Fractogel EMD TA 650 S (Merck KGaA, Darmstadt) in eine für das FPLC-System geeignete Säule (HR 5 Column; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) luftblasenfrei eingefüllt. Die Säule wurde anschließend 30 min mit 1 M Ammoniumsulfat-/50 mM Natriumphosphat-Lösung bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min äquilibriert. Vor der Aufbewahrung bei 4°C wurde die Säule 10 min mit 20 % Ethanol gespült.

Zu Beginn einer Aufreinigung wurde 15 min mit 1 M Ammoniumsulfat-/50 mM Natriumphosphat-Lösung äquilibriert. Das Lysat der Fab-Produktion (siehe 2.2.1.3), welches für diese Art der Aufreinigung nicht in PBS, sondern in 10 ml 50 mM Natriumphosphat-Lösung aufgenommen worden war, wurde mit 5 ml 3 M Ammoniumsulfat-/50 mM Natriumphosphat-Lösung versetzt. Der gesamte Ansatz wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min mit 1 M Ammoniumsulfat-/50 mM Natriumphosphat-Lösung auf die Säule geladen. Mit demselben Puffer wurde die Säule anschließend 10 min gewaschen. Um gebundene Fab-Fragmente zu lösen, wurde die Säule mit einem linear abfallenden Konzentrationsgradienten von 1 zu 0 M Ammoniumsulfat, gelöst in 50 mM Natriumphosphat, eluiert. Es folgte ein Waschschriff mit 20 ml 50 mM Natriumphosphat, um alle restlichen Proteine zu entfernen. Zur Regeneration der Säule wurde mit 20 ml 6 M Harnstoff gewaschen.

2.2.3 Analysierung löslicher Fab-Fragmente

2.2.3.1 Sandwich-ELISA zur Bestimmung der relativen Fab-Fragment-Konzentration

Eine 96-Loch-EIA-Platte (Costar; Corning Inc, Corning, USA) wurde pro Vertiefung mit 30 µl unkonjugiertem Ziege anti-human IgG, F(ab')₂ Fragment spezifisch (Pierce, Rockford, USA; 1:1000), bei 4°C über Nacht beschichtet.

Nach einmaligem Waschen mit 0,2 % Casein in PBS (ImmunoWash Model 1575; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) wurde die Platte mit 1 % Casein in PBS eine Stunde bei 37°C geblockt. Es folgte ein einmaliges Waschen, bevor jeweils 50 µl der zu untersuchenden Proben in die Vertiefungen gegeben wurden. Die Platte inkubierte 1 h bei 37°C und wurde anschließend fünfmal gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Fab-Fragmente wurde ein Ziege anti-human IgG, F(ab')₂ Fragment spezifisch, Peroxidase konjugiert (Pierce, Rockford, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. 50 µl pro Vertiefung inkubierten 1 h bei 37°C. Es wurde fünfmal gewaschen, bevor mit 50 µl TMB (Tetramethylbenzidin, Fa. Kirkegaard & Perry, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) pro Vertiefung die Farbreaktion gestartet wurde. Nach 5 min wurde mit 1 M Phosphorsäure gestoppt und die Absorption bei 450/650 nm im ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) gemessen. Die Intensität der Farbe repräsentierte die relative Fab-Fragment-Konzentration der Probe.

Die Ergebnisse des ELISAs wurden mit Hilfe von Sigma Plot 2000 Version 6.0 graphisch dargestellt.

2.2.3.2 Weiterverarbeitung der FPLC-Kollektions-Fractionen

FPLC-Fractionen mit einer hohen Konzentration an aufgereinigtem Fab-Fragment wurden gepoolt und mittels Centriplus YM-10-Säulen (Amicon Bioseparations) nach Angaben des Herstellers einkonzentriert. Variable Volumina, je nach Ausbeute der Aufreinigung, wurden auf ein Volumen von ca. 2,5 ml gebracht. Die einkonzentrierten Proben wurden anschließend mit PD 10 Säulen (Sephadex G-25M; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) umgepuffert. Die Säulen wurden mit 15 ml PBS äquilibriert, bevor 2,5 ml einkonzentrierte Fab-Fragment-Probe auf jeweils eine Säule gegeben wurde. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Probe, wurde pro Säule mit 3,5 ml PBS eluiert.

Die einkonzentrierten und umgepufferten Proben wurden bis zu einer weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.3.3 Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von Gamma Globulinen des Rindes (Pierce, Rockford, USA). 10 µl Probe bzw. Standard wurden zu 200 µl BCA-Gebrauchslösung gegeben und 30 min bei 60°C inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 560 nm wurden Standards und Proben im ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer vom Computer berechneten Standardkurve (Revelation MRX-Software; Dynex-Technologies GmbH, Berlin).

2.2.3.4 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Spezielle Lösung:

Probenpuffer:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	20 %
Bromphenolblau	0,2 %
pH	8,0

Mittels der SDS-PAGE wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe des PhastSystems (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Zur Denaturierung der Proteine wurden 10 µl Probe mit 2,5 µl Probenpuffer versetzt und für 2 min bei 100°C erhitzt. Ein Low-MW-Protein-Marker (LMW; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde auf die gleiche Weise behandelt. Die Proben bzw. der Marker wurden anschließend zu je 1 µl pro Spur auf ein 8-25 Gradienten PhastGel (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geladen. Unter Verwendung von SDS-Puffer Streifen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde das Gel in die Apparatur des PhastSystems eingebaut

und die Elektrophorese nach Herstellerangaben (Separation Technique File 110) durchgeführt.

2.2.3.5 Silberfärbung von Phast-Proteingelen

Die Silberfärbung von Phast-Proteingelen wurde vollautomatisch nach Angaben des Herstellers in der Färbekammer des PhastSystems (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt (Development Technique File 210). Die Entwickler, 8,3 % Glutaraldehyd und 0,25 % Silbernitrat, wurden vor jeder Färbung frisch angesetzt.

2.3 Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen

2.3.1 Restriktionsenzymanalyse mit SacI / XbaI bzw. XhoI / SpeI

Die Restriktion mit den Enzympaaren SacI / XbaI und XhoI / SpeI wurde durchgeführt, um Phagemide auf das Vorhandensein von Inserts, die für die leichte und schwere Kette kodieren, zu überprüfen. Die für die Restriktion eingesetzten Enzym- und DNA-Konzentrationen beruhten auf Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe.

Phagemid-DNA wurde durch den Einsatz eines DNA Reinigungs-Systems (Wizard Plus Minipreps; Promega, Madison, USA), nach Angaben des Herstellers, aus einer Bakterienkultur isoliert. 5 µl der gereinigten DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 6 U SacI und 6 U XbaI in Puffer A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für 2 h bei 37°C verdaut. Ebenfalls 5 µl wurden für den Verdau mit 12 U XhoI und 4 U SpeI in Puffer H (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden anschließend jeweils mit 2 µl Ladepuffer versetzt und in einem analytischen 2 %igen Agarose-Gel bei 100 V 45 min aufgetrennt (siehe 2.1.1.1). Die Auswertung des Gels erfolgte bei UV-Belichtung (Dual-Intensity Transilluminator; UVP Inc, Upland, USA).

2.3.2 Restriktionsenzymanalyse mit BstNI

BstNI, ein Enzym mit vielen Schnittstellen, wurde eingesetzt, um eine Vielzahl von Klonen auf ihre Diversität in der variablen Region zu untersuchen. Die Methode wurde benutzt, um sich einen schnellen Überblick über die Heterogenität der Phagemide zu verschaffen.

16 µl Phagemid-DNA, die mit Hilfe des Wizard Plus Miniprep-Kits (Promega, Madison, USA) isoliert worden war, wurde zu 9 µl Restriktionsmix mit 8 U BstNI in NE Puffer 2 und BSA (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) gegeben und 1 h bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl Ladepuffer zu dem Ansatz gegeben und bei 200 V in einem 2 %igem Agarose-Gel 30 min aufgetrennt (siehe 2.1.1.1). Unter UV-Belichtung konnten die Bandenmuster ausgewertet werden.

2.3.3 Automatische Sequenzierung

Spezielle Lösungen:

TBE-Puffer (10x)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M)	40 ml
Aqua dest.	ad 1l
pH	8,0

Stopplösung

Formamid	95 %
EDTA	20 mM
Bromphenolblau	0,1%
Xylen Cyanol	0,05%

Sequenzier-Primer:

Primer	Sequenz	Bindungs-Region	Annealing-Temperatur
PeIB	5'-ACC TAT TGC CTA CGG CAG CCG-3'	VH 5'	62°C
SeqGb	5'-GTC CTT GAC CAG GCA GCC CAG-3'	VH3'	62°C
OmpA	5'-AAG ACA GCT ACT GCG ATT GCA-3'	VL5'	62°C
Seq Lb	5'-GAA GTC ACT TAT GAG ACA CAC-3'	VL3' _{lambda}	42°C
Seq Kb	5'-ATA GAA GTT GTT CAG CAG GCA-3'	VL3' _{kappa}	42°C
aM1-11lc	5'-TAC CAT AGA TGA GGA GCC TGG-3'	VL3' _{kappa}	60°C

Die Sequenzierung wurde nach dem Cycle-sequencing-Prinzip mit fluoreszenz-markierten Primern nach der Methode von Sanger durchgeführt. Der Sequenzierlauf erfolgte im LiCor-Sequencer (MWG-Biotech, Ebersberg).

0,5 – 5 µg Phagemid-DNA (isoliert mit Wizard Plus Miniprep-Kit, Promega, Madison, USA oder Plasmid Mini Kit, Qiagen, Hilden) wurden mit 2 pmol 5'IRD 800-Primer (MWG-Biotech, Ebersberg) versetzt und mit Aqua bidest auf ein Volumen von 21 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dunkel gehalten. 5 µl des Ansatzes wurden anschließend jeweils zu 2 µl A, C, G bzw. T-Reagenz (Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben. Nach der Zugabe von einem Tropfen Mineralöl (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) zu jedem Ansatz wurde die Cycle-Sequenzierungsreaktion in einem Hybaid OmniGene Thermocycler (Hybaid Limited, Teddington, UK) nach folgendem Schema durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing	s.o.	15 sec	
Elongation	70°C	15 sec	

Die Reaktion wurde mit 3 µl Stopplösung pro Ansatz beendet. Die Proben wurden bis zum Auftragen kühl und dunkel gelagert.

Zwei Glasplatten mit einer Frontlänge von 66 cm wurden mit 99 % Ethanol gründlich gereinigt und unter Verwendung von 0,25 mm Spacer zusammengebaut. 10 ml Sequagel Complete und 40 ml Sequagel XR (Sequagel XR EC 842; Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) wurden mit 0,4 ml 10 % Ammonium-Persulfat gemischt und das Gel mit Hilfe einer Spritzflasche luftblasenfrei gegossen.

Nach der Polymerisation des Gels (nach ca. 1,5 h) wurde im Auftragebereich des Gels ein Haifischzahn-Kamm eingesetzt und jede Tasche des Kammes mit 1,5 µl Probe beladen.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte im LiCor-Sequencer (LI-COR Bioscience GmbH, Bad Homburg) bei folgenden Parametern: Spannung 1500 V, Stromstärke 35 A, Leistung 31,5 W, Temperatur 50°C, Rahmen 25. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet.

2.3.4 Sequenzanalyse

Die Auswertung des Laufes mit der Erstellung der Sequenzen erfolgte automatisch durch den LiCor-Sequencer (LI-COR Bioscience GmbH, Bad Homburg). Für die manuelle Kontrolle der Sequenzen wurden zusätzlich sog. scf-files gespeichert und ausgewertet.

Die Rohdaten wurden mit dem Programm Mac-DNAsis analysiert. Voraussetzung dafür war, dass die komplette variable Region und der erste Teil der konstanten Region lesbar und damit auswertbar waren. Schlecht lesbare Sequenzen wurden manuell ausgewertet oder mit neu isolierter DNA wiederholt sequenziert. Auch die Sequenzierung in 3'- und in 5'-Richtung konnte zur Lösung von Problemen beitragen.

Die Analyse der Rohdaten begann mit der Bestimmung von Anfang- und Endsequenz der V-Regionen eines Fab-Fragments. Dabei wurde nach folgenden Nukleotidabfolgen gesucht:

atg gcc GAG GTG CAG CTG CTC ...	Beginn V _H -Region
... TCC TCA – gcc tcc acc aag ggc	Ende V _H -Region – Beginn C _{H1} -Region
gcg gcc GAG CTC ... CAG CCT ...	Beginn V _L _{lambda} -Region
... CTA GGT – cag ccc aag gct gcc	Ende V _L _{lambda} -Region – Beginn C _L -Region
gcg gcc GAG CTC ACT ...	Beginn V _L _{kappa} -Region
... ATC AAA – cga act gtg gct	Ende V _L _{kappa} -Region – Beginn C _L -Region

Die Großbuchstaben zeigen jenen Teil der Sequenz an, mit dem weitergearbeitet wurde. Diese Sequenzen wurden gespeichert und zusätzlich in Aminosäuresequenzen umgeschrieben.

Die so erhaltenen Nukleotidsequenzen der V-Region wurden anschließend mit Hilfe von Mac-DNAsis auf Homologien untereinander und zu früher isolierten Klonen untersucht.

Die anschließende Bestimmung der zugehörigen Keimbahnsegmente erfolgte über das Internet mit dem Programm DNA-Plot in der V-Base Datenbank. Die Zuordnung der CDR-Regionen wurde dabei nach dem Schema von Kabat durchgeführt und, wie die Namen der Keimbahngene, aus V-Base übernommen.

Es wurden die Homologie zu den Keimbahngensegmenten und die Mutationsraten berechnet. Die durch die PCR-Primer festgelegten Anfangssequenzen wurden dabei nicht in die Berechnung miteinbezogen.

2.3.5 Herstellung von Fab-Phagen in 2 ml Kultur

2 ml SB-Ansatz (2 ml SB, 100 µg Carbenizillin, 20 µl 1 M MgCl₂-Lösung) wurden mit Bakterienmaterial einer Bakterienplatte oder eines Glycerolstocks angeimpft und 5 bis 6 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Es wurde anschließend mit $2,8 \times 10^9$ pfu Helferphagen (siehe 2.1.1.5) infiziert und weitere 1 bis 2 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Eine Doppel-selektion wurde durch die Zugabe von 140 µg Kanamyzin eingeleitet. Die Kultur schüttelte über Nacht bei 37°C und 220 rpm.

Am nächsten Morgen wurde das Bakterienmaterial bei 10000 rpm für 5 min (Mikro-zentrifugen; IEC) sedimentiert, der Fab-phagenhaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.6 Sandwich-ELISA zur Bestimmung von spezifischen Bindungseigenschaften

Die durch das Biopanning selektierten Fab-Phagen wurden im ELISA auf ihre spezifischen Bindungseigenschaften untersucht. Es sollte vornehmlich überprüft werden, ob die isolierten Fab-Phagen Bindungspräferenzen zu Fab-Fragmenten bestimmten genetischen Ursprungs haben. Zusätzlich wurde die Bindung zu Fc-Fragment und IVIG-Fab-Fragment untersucht.

Eine 96-Loch-EIA-Platte (Costar; Corning Inc, Corning, USA) wurde mit 300 ng/Vertiefung Fab-Fragment bzw. Fc-Fragment über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Fab-Fragmente, deren unterschiedlicher Keimbahngenursprung bereits in früheren Studien bestimmt worden war, waren für diese Untersuchung exprimiert und aufgereinigt worden. Die beschichtete 96-Loch-Platte wurde am nächsten Morgen einmal mit 0,2 % Casein in PBS gewaschen (ImmunoWash Model 1575; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA), eine Stunde bei 37°C mit 1 % Casein in PBS geblockt und erneut einmal mit 0,2 % Casein in PBS gewaschen. Bei vergleichbaren Phagentitern wurden von den selektierten Phagenklonen jeweils 50 µl zu den unterschiedlichen Fab-Fragmenten bzw. zum Fc-Fragment gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurde fünfmal gewaschen und anschließend 50 µl eines monoklonalen, HRP markierten anti-M13 Antikörpers (1:5000 verdünnt; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in jede Vertiefung gegeben, um gebundene Fab-Phagen nachzuweisen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h und ein 5-maliges Waschen mit 0,2 % Casein in PBS. Mit 50 µl TMB (Tetramethylbenzidin, Fa. Kirkegaard & Perry, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) pro Vertiefung wurde die Farbreaktion gestartet und nach 10 min mit 1 M Phosphorsäure gestoppt. Die Absorption wurde bei 450/650 nm im ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) gemessen und die Bindung der Fab-Phagen an die Fab-Fragmente bzw. an Fc-Fragment durch die Absorptionsstärke bestimmt.

Die Ergebnisse des ELISAs wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel 2002 graphisch dargestellt.