

3 Ergebnisse

Zur Erarbeitung der Ziele der vorliegenden Dissertation wurden zum einen Versuche zur Optimierung von Fab-Fragment-Expression und Aufreinigung und zum anderen Versuche zur Isolierung und Charakterisierung von spezifisch bindenden Fab-Phagen durchgeführt. Das Kapitel gliedert sich deshalb in zwei Teile. Der erste Teil beschreibt die Ergebnisse der Optimierung von Fab-Fragment-Expression und Aufreinigung als Vorarbeit für Isolierung und Charakterisierung der Fab-Phagen. Der zweite Teil stellt die Ergebnisse des Biopannings mit dem Fab-Fragment LO31 und die anschließende Charakterisierung der isolierten Fab-Phagen dar.

3.1 Expression und Aufreinigung von löslichen Fab-Fragmenten

Fab-Phagen Klone, die in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Peter Fischer in früheren Studien isoliert und charakterisiert worden waren, sollten als lösliche Fab-Fragmente exprimiert und aufgereinigt werden. Es war geplant, die aufgereinigten Fab-Fragmente in weiteren Versuchen, zum einen als Antigen im Biopanning, zum anderen in einem ELISA zur Bestimmung von Bindungsspezifitäten, einzusetzen.

3.1.1 Herstellung löslicher Fab-Fragmente

3.1.1.1 Präparation des Phagemids zur Herstellung von löslichen Fab-Fragmenten

Für die Produktion von löslichen Fab-Fragmenten wurde das Gen III, das für die Verbindung von M13-Phagenhülle und Fab-Fragment bei der Produktion von Fab-Phagen verantwortlich ist, durch NheI/ SpeI-Restriktion aus dem Phagemid herausgeschnitten. Mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese wurden anschließend das Gen III und das restliche Phagemid voneinander getrennt (Abbildung 7 a) und das Phagemid aus dem Gel herauspräpariert (Abbildung 7 b).

Da die Restriktionsenzyme NheI und SpeI kohäsive Enden bilden, konnte das Phagemid problemlos selbstligiert und zur Elektrotransformation eingesetzt werden.

Einzelkolonien von Bakterien, die das restringierte Phagemid enthielten, wurden für die simultane Produktion von Fab-Fragmenten in kleiner Menge (siehe 2.2.1.2) eingesetzt. Klone, bei denen eine Fab-Fragment Expression im ELISA nachgewiesen werden konnte, wurden als Glycerolstock konserviert und für die Produktion von Fab-Fragmenten in großer Menge (siehe 2.2.1.3) eingesetzt.

Der gesamte Vorgang wurde mit jedem Fab-Phagenklon, der für spätere Untersuchungen benötigt wurde, durchgeführt.

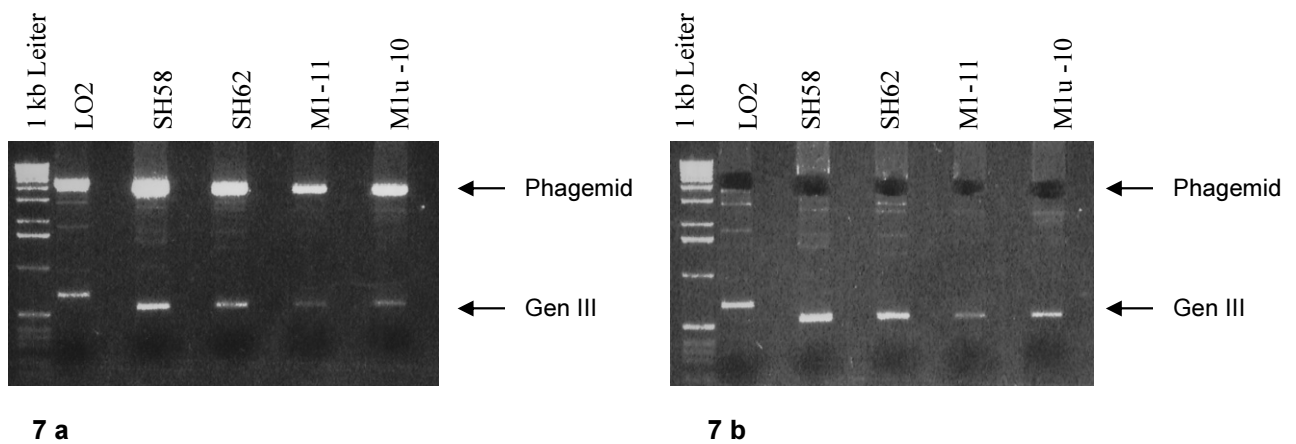


Abbildung 7 a und b:

Entfernung des Gen III durch Restriktion mit NheI/SpeI und präparativer Agarose- Gelelektrophorese

Verschiedene Fab-Phagen-Klone wurden enzymatisch verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 7 a). Das restringierte, linearisierte Phagemid wurde anschließend aus dem Agarose-Gel herauspräpariert (Abb. 7 b). Die unterschiedlichen Größen des Gen III resultieren aus dem Gebrauch verschiedener Vektoren (LO2 => pComb3; SH58, SH62, M1-11, M1u-10 => pComb3H).

3.1.1.2 Untersuchungen zur Fab-Fragment Expression

Verschiedene Fab-Fragmente wurden nach einer in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Methode (siehe 2.2.1.3) exprimiert. In einem Sandwich-ELISA zur Bestimmung der relativen Fab-Fragment-Konzentration zeigte sich, dass bei gleichen Expressionsbedingungen einige Fab-Fragmente stark (z.B. GK8), andere dagegen schwach (z.B. aLO31-17) exprimiert wurden (Abbildung 8).

Nach der sich anschließenden Aufreinigung erzielte man mit stark exprimierenden Klonen eine gute, mit schwach exprimierenden Klonen eine schlechte Ausbeute an aufgereinigten Fab-Fragmenten. Um dieses Problem zu lösen, wurde versucht, die Bedingungen der Fab-Fragment-Expression zu optimieren. Dazu wurden in einem ersten Versuch Fab-Fragmente von drei verschiedenen Klonen, GGb02, SH64 und LO31, bei drei verschiedenen Expressions-Temperaturen (Raumtemperatur [RT], 30°C, 37°C) hergestellt. Es zeigte sich, dass ein Variieren der Temperatur bei der Expression der drei Klone keine deutlichen Unterschiede in der Expressionsstärke hervorrief. (Abbildung 9).

ERGEBNISSE

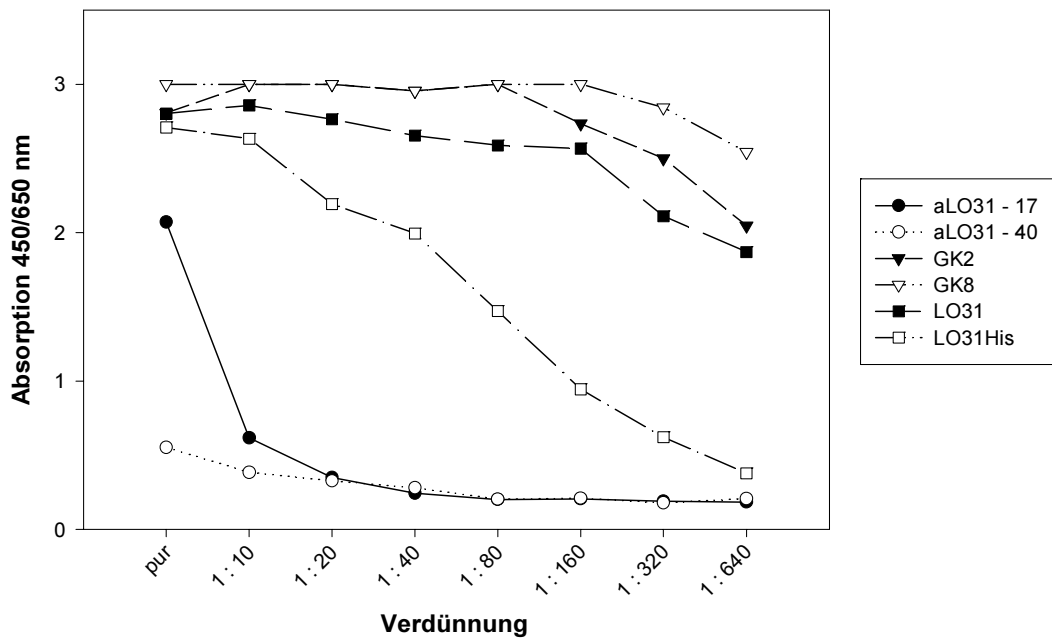


Abbildung 8: ELISA zum Vergleich der Expressionsstärke verschiedener Fab-Fragment Klone

Sechs verschiedene Fab-Fragment Klone (aLO31-17, aLO31-40, GK2, GK8, LO31, LO31His) wurden bei gleichen Bedingungen exprimiert. In einem Sandwich-ELISA wurde anschließend von den ausverdünnten Bakterien-Lysaten (1:10 bis 1:640) die relative Fab-Fragment-Konzentration bestimmt. Im Vergleich zeigten stark exprimierende Klone, wie z.B. GK8, auch bei hohen Verdünnungen (1:640) noch eine hohe Extinktion.

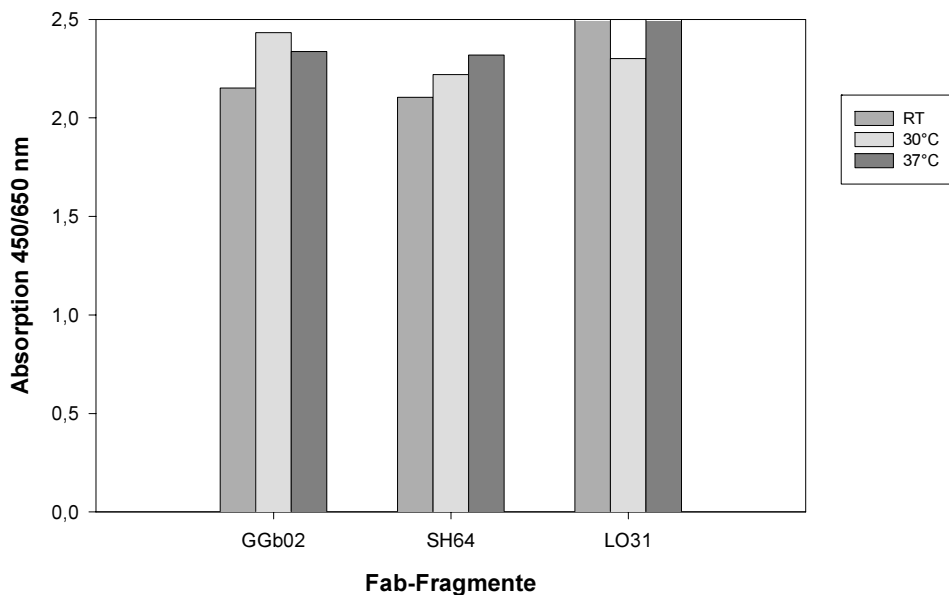


Abbildung 9: ELISA zum Vergleich der Expressionsstärke bei 3 verschiedenen Expressionstemperaturen

Drei verschiedene Fab-Fragmente (GGb02, SH64, LO31) wurden bei drei verschiedenen Temperaturen (RT, 30°C, 37°C) exprimiert. Die relative Fab-Fragment Konzentration der Bakterien-Lysate wurde in einem Sandwich-ELISA bestimmt.

ERGEBNISSE

In einem zweiten Versuch wurde die Einleitung der Expression variiert. Dazu wurde bei drei verschiedenen optischen Wachstumsdichten (0,6; 0,8 und 1,0) und mit drei verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert. Die Untersuchung wurde mit einem mittel bis schwach exprimierenden Fab-Fragment-Klon (GGb02) durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die größtmögliche Ausbeute an Fab-Fragment GGb02 durch Induktion bei einer optischen Dichte von 1,0 mit einer IPTG-Konzentration von 5 mM erzielt werden konnte (Abbildung 10).

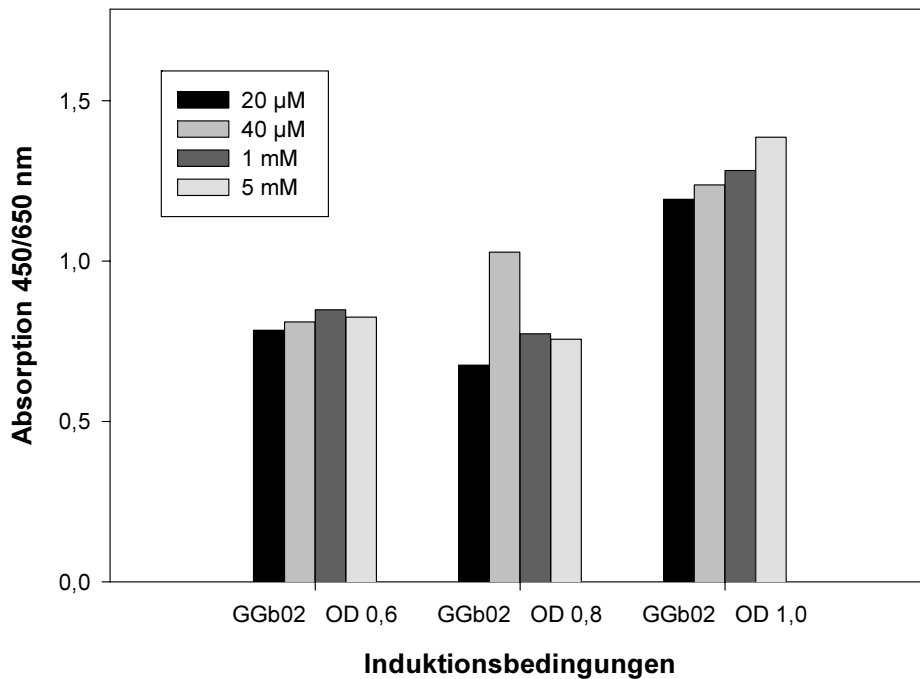


Abbildung 10: ELISA zum Vergleich der Expressionsstärke bei verschiedenen Induktionsbedingungen

Die Expression des Fab-Fragments GGb02 wurde bei drei verschiedenen Wachstumsdichten (OD 0,6; OD 0,8; OD 1,0) und mit vier verschiedenen IPTG-Konzentrationen (20 µM, 40 µM, 1mM, 5mM) eingeleitet. Die relative Fab-Fragment Konzentration der verschiedenen Ansätze wurde in einem Sandwich-ELISA bestimmt.

Betrachtet man die Ergebnisse insgesamt, konnte man folgendes feststellen: Zum einen scheint es keine Expressionsbedingungen zu geben, die für alle Fab-Fragment-Klone gleichermaßen optimal sind, zum anderen sind im Fall von Fab-Fragment GGb02 die ermittelten optimalen Bedingungen fast identisch mit den im Labor üblicherweise eingesetzten. Als Konsequenz ergab sich, dass für mehr als zehn verschiedene benötigte Fab-Fragment-Klone die optimalen Bedingungen hätten einzeln ausgetestet werden müssen und unter Umständen aber trotzdem auf diese Art keine große Steigerung der Expression hätte erreicht werden können, wie im Fall von Fab-Fragment GGb02.

3.1.2 Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente

Die Aufreinigung von löslichen Fab-Fragmenten wurde in der Arbeitsgruppe üblicherweise mittels anti-Fab-Affinitätsäulen chromatographie durchgeführt. Wie unter 3.1.1.2 erwähnt, bestand das Problem, dass die Ausbeute bei einigen Fab-Fragment-Klonen zu gering war, um damit weitere Versuche durchzuführen. Da ein Vergleich der relativen Fab-Fragment-Konzentration im Bakterienlysats vor der Aufreinigung und nach der Aufreinigung zeigte, dass nur ein geringer Anteil der Fab-Fragmente aus dem Lysat an die Säule band, wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden getestet und miteinander verglichen, um die Aufreinigung der Fab-Fragmente aus dem Lysat zu optimieren.

Es wurde jeweils nach folgendem Schema vorgegangen:

- Säulen chromatographische Aufreinigung mit Hilfe des FPLC-System
- Bestimmung der relativen Fab-Fragment Konzentration in den Elutionsfraktionen im Sandwich-ELISA
- Analyse der aufgereinigten Fab-Fragmente durch SDS-PAGE und Silberfärbung

3.1.2.1 Aufreinigung durch anti-Fab Affinitäts chromatographie

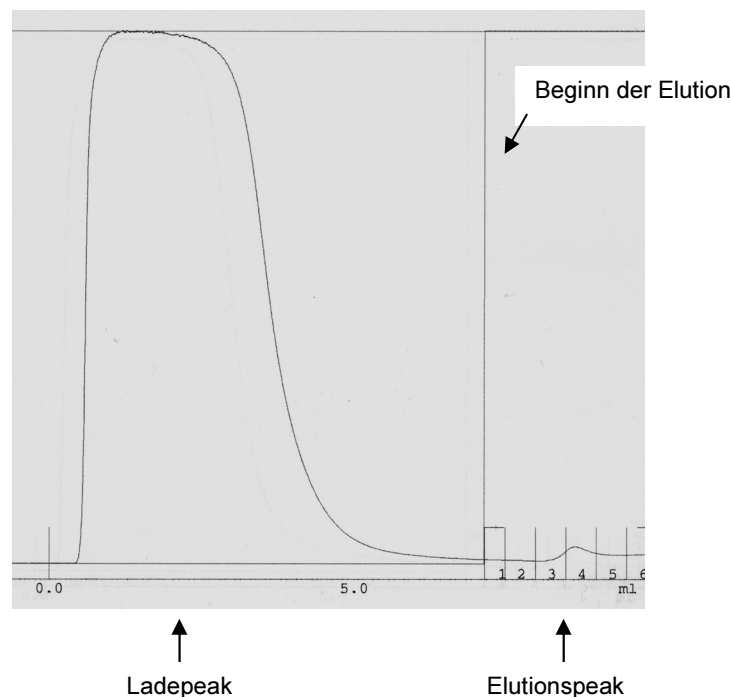


Abbildung 11: Elutionsprofil der Aufreinigung des Fab-Fragments LO31 durch anti-Fab-Affinitäts chromatographie

Abbildung 11 zeigt das Elutionsprofil der Aufreinigung des Fab-Fragment-Klons LO31, bei dem durch starke Expression eine gute Ausbeute an aufgereinigtem Fab-Fragment erzielt werden konnte. Im Verlauf der Fraktionen 3, 4 und 5 ist deutlich ein Elutionspeak erkennbar, bei dem auch die höchste Fab-Fragment Konzentration im ELISA nachzuweisen war. Wie die SDS-PAGE zeigte (Abbildung 12), war es mit dieser Methode möglich, mit stark exprimierenden Klonen ein intaktes und reines Fab-Fragment zu gewinnen. Das in Abbildung

ERGEBNISSE

12 dargestellte Fab-Fragmente LO31 wurde in dem unter 3.2.1 beschriebenen Biopanning als Antigen eingesetzt.

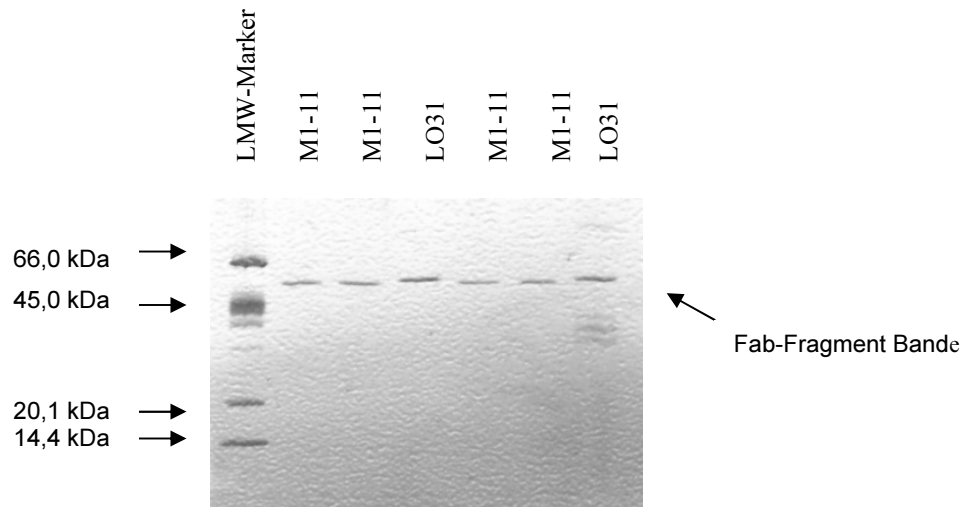


Abbildung 12: SDS-PAGE und Silberfärbung von anti-Fab-aufgereinigten Fab-Fragmenten

3.1.2.2 Aufreinigung durch Protein A Affinitätschromatographie

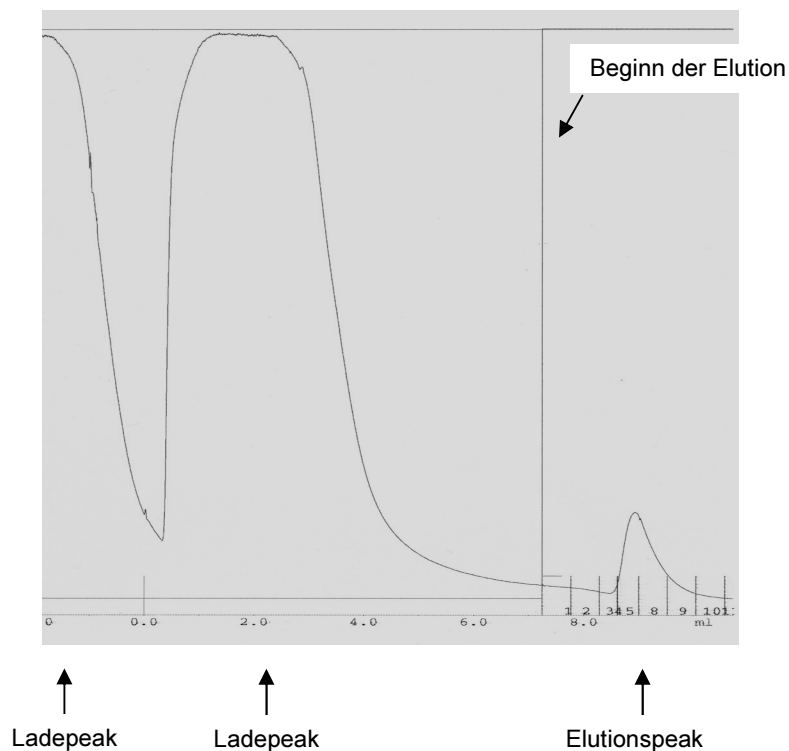


Abbildung 13: Elutionsprofil der Aufreinigung des Fab-Fragments LO19 durch Protein A Affinitätschromatographie

Mit Hilfe von Protein A wurde das Lysat eines mittelstark exprimierenden Fab-Fragment Klons der VH3-Familie aufgereinigt. Das Elutionsprofil (Abbildung 13) zeigte einen großen Elutionspeak, der das Lösen der Proteine von der Protein A-Säule darstellte. In den Peak-

ERGEBNISSE

fraktionen konnte auch hier die höchste Konzentration an Fab-Fragment im ELISA nachgewiesen werden. In der SDS-PAGE aber (Abbildung 14), wurde, neben einer schwachen Fab-Fragment Bande und einigen anderen schwachen Banden, eine starke Bande im Bereich um 14,4 kDa gefunden. Mit dieser Methode war es demnach nicht möglich, ein fremdprotein-freies Fab-Fragment zu gewinnen.

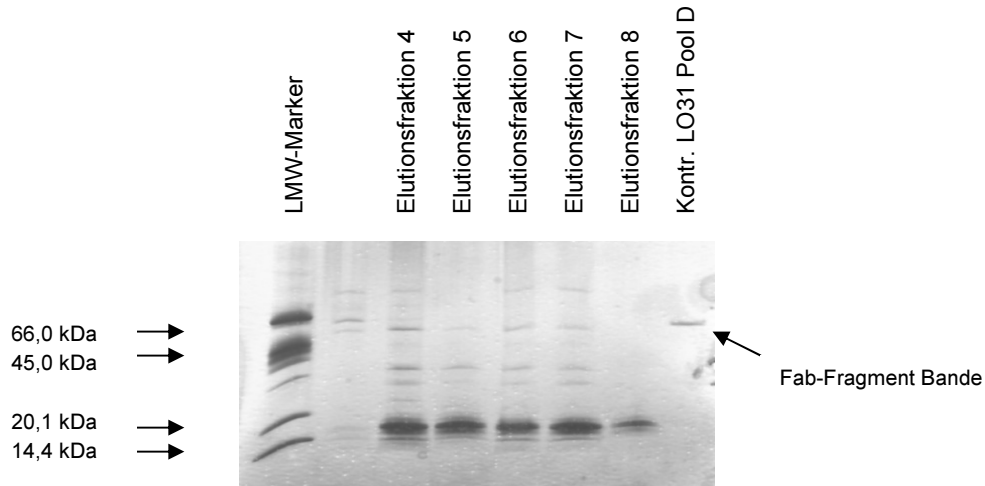


Abbildung 14: SDS-PAGE und Silberfärbung von Protein A-aufgereinigten Fab-Fragmenten

3.1.2.3 Aufreinigung durch thiophile Adsorptionschromatographie

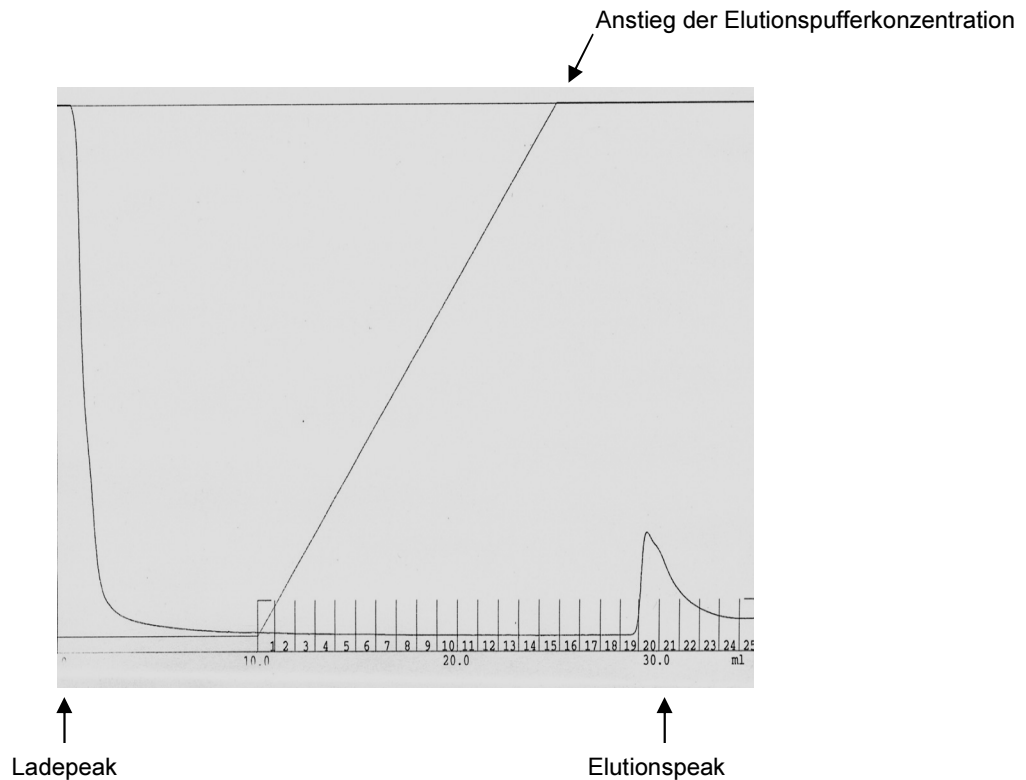


Abbildung 15: Elutionsprofil der Aufreinigung des Fab-Fragments LO31 durch thiophile Adsorptionschromatographie

ERGEBNISSE

Das Elutionsprofil (Abbildung 15) zeigt einen großen Proteinpeak am Ende des Elutionsgradienten. Wie auch bei den anderen Aufreinigungen, konnte hier die stärkste Konzentration an Fab-Fragment im ELISA nachgewiesen werden. Die Analyse dieser Elutionsfraktionen im Proteingel ergab, dass neben einem starken Fab-Fragment Anteil zahlreiche andere Proteine in den Fraktionen vorhanden waren (Abbildung 16).

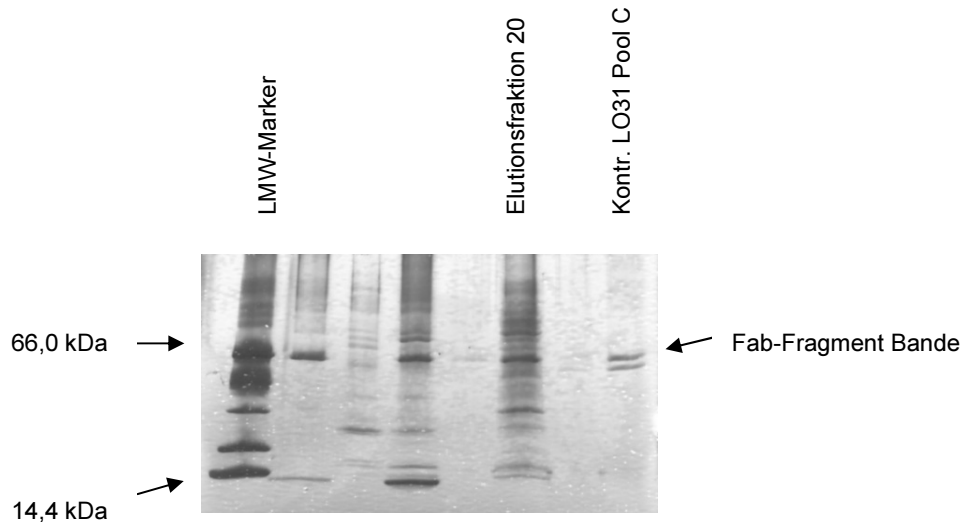


Abbildung 16: SDS-PAGE und Silberfärbung von durch thiophile Adsorption aufgereinigten Fab-Fragmenten

Betrachtet man die Ergebnisse der Aufreinigungsversuche zusammenfassend, dann konnte man feststellen, dass es nur mit der anti-Fab Affinitätschromatographie möglich war, ein nahezu fremdproteinfreies Fab-Fragment zu gewinnen. Eine Steigerung der Ausbeute an aufgereinigten Fab-Fragmenten durch einen Wechsel der Aufreinigungsmethode war nicht möglich.

3.1.3 Herstellung und Aufreinigung von Fab-Fragmenten für die Isolierung und Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen

Als Konsequenz der Ergebnisse der Optimierungsversuche wurde das Vorgehen bei der Auswahl der Fab-Phagen Klone geändert. Wurden ursprünglich Klone für die weiteren Versuche ausgewählt, die aufgrund von Bindungseigenschaften und Keimbahngenabstammung interessant waren, so mussten nun Klone gewählt werden, die stark exprimiert wurden und sich gut aufreinigen ließen. Diese Klone wurden nach den in der Arbeitsgruppe üblichen Methoden exprimiert (siehe 2.2.1.3) und aufgereinigt (siehe 2.2.2.2). Die Elutionsfraktionen mit den höchsten Fab-Fragment Konzentrationen wurden einkonzentriert, umgepuffert und in der SDS PAGE analysiert. Abschließend wurde der absolute Proteingehalt bestimmt.

ERGEBNISSE

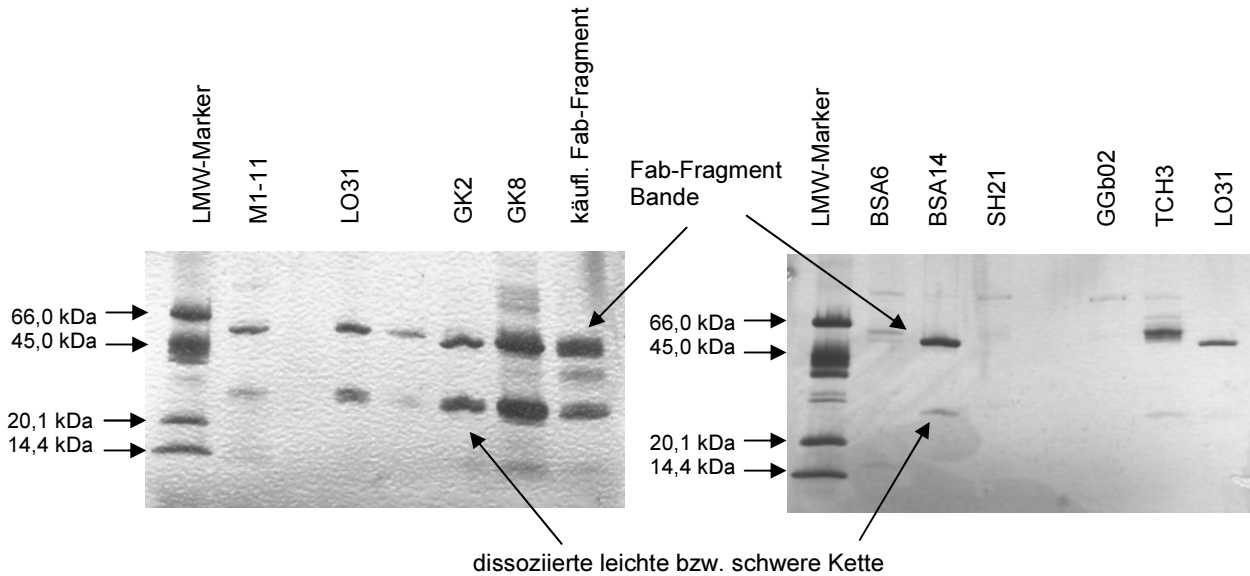


Abbildung 17: SDS-Page und Silberfärbung von Fab-Fragmenten, die mittels anti-Fab- Affinitäts-chromatographie aufgereinigt in weiteren Versuchen eingesetzt wurden

Abbildung 17 stellt die in weiteren Versuchen eingesetzten Fab-Fragmente M1-11 (Leucht et al., 2001), LO31 und GGb02 (Jendreyko et al., 1998), GK2, GK8 und TCH3 (Uttenreuther-Fischer et al., 2006), BSA6 und BSA14 (Osei & Fischer, unveröffentlicht) und SH21 (Osei et al., 2000) in der SDS-PAGE dar. Neben gut gereinigten zum Teil starken Fab-Fragment Banden fand man eine zweite Bande in dem Bereich zwischen 20 und 30 kDa. In anderen Untersuchungen konnten in dieser Bande einzelne leichte und schwere Ketten nachgewiesen werden, wie sie z. B. bei längerer Lagerung der aufgereinigten Fab-Fragmente entstehen. Die für das Biopanning benötigten Fab-Fragmente wurden direkt nach der Herstellung ohne lange Zwischenlagerung eingesetzt.

3.2 Isolierung und Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen

Mit Hilfe des Phagen Display Systems und antiidiotypischen Biopanning sollten Fab-Phagen, die an das Fab-Fragment LO31 binden, aus einer Fab-Phagen-Bibliothek einer gesunden Probandin selektiert und strukturell und funktionell charakterisiert werden.

3.2.1 Isolierung LO31 bindender Fab-Phagen

Für die Herstellung der für das Biopanning benötigten Fab-Phagen Bibliothek musste die DNA einer IgG-Bibliothek optimiert werden, damit möglichst viele Phagen nach der Anzucht, aufgrund ihres genetischen Materials, ein Fab-Fragment auf der Oberfläche präsentieren. Die DNA wurde dazu durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 18 a) und die Bande, die das Phagemid mit zwei Inserts repräsentierte, herauspräpariert (Abbildung 18 b).

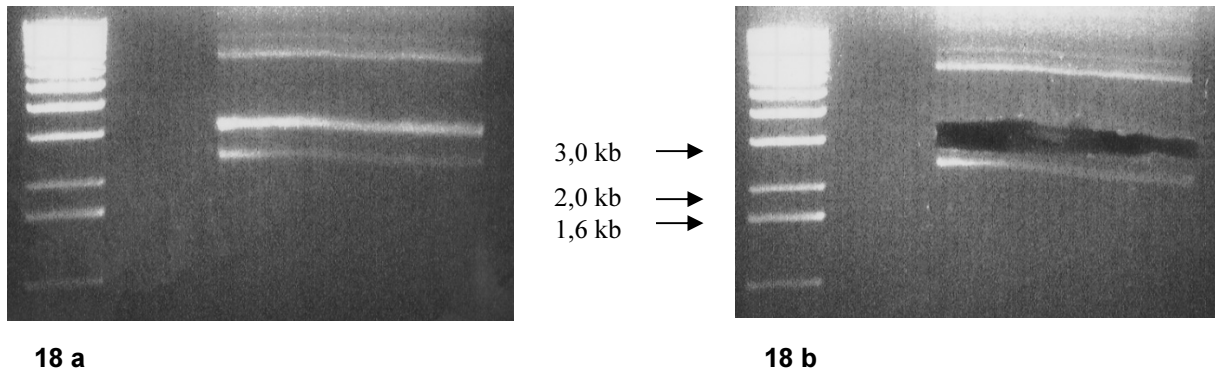


Abbildung 18 a und b:

Präparative Agarose-Gelelektrophorese zur Optimierung einer IgG-Bibliothek

Die DNA einer IgG-Bibliothek wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 18 a) und die gewünschte Bande herauspräpariert (Abbildung 18 b).

Die DNA wurde aus der Gelbande gereinigt und quantifiziert. 100 ng der DNA wurden für die Elektrottransformation mit anschließender Fab-Phagen Produktion eingesetzt.

Die Transformationseffizienz, die in diesem Fall auch die Größe der Phagen-Bibliothek darstellte, betrug $1,1 \times 10^6$.

Der Phagentiter der im Anschluß hergestellten Fab-Phagen betrug $1,4 \times 10^{10} / \mu\text{l}$.

Für das Biopanning wurden 300 μl der Phagen unverdünnt in der ersten Runde eingesetzt. Um spezifisch bindende Phagen anzureichern, wurden 5 Biopanning Runden durchgeführt, wobei die Röhrchen jeweils mit 5 μg Fab-Fragment beschichtet waren.

Eine Gegenüberstellung von Phagen Input und Phagen Output, zur Berechnung des prozentualen Anteils der gebundenen Phagen (siehe 2.1.2.2), ergab folgendes: Der in Zahlen dargestellte Verlauf des Biopannings (Tabelle 1) war nahezu optimal. Bei relativ gleich bleibendem Phagen-Input war ein stetiger Anstieg des Phagen-Outputs zu verzeichnen. Die einzige Ausnahme bildete der Abfall des Phagen-Outputs von Runde eins zu Runde zwei.

Der Anstieg des Phagen-Outputs und die Zunahme des prozentualen Anteils der gebundenen Phagen deuteten darauf hin, dass sich spezifisch LO31-bindende Phagen angereichert hatten.

ERGEBNISSE

Tabelle 1: Phagen Input und Phagen Output im Biopanning auf Fab-Fragment LO31

Biopanning Runde	Phagen Input	Phagen Output	Output x 100 / Input
1	$4,2 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-6} \%$
2	$4,5 \times 10^{10}$	$5,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^{-5} \%$
3	$2,0 \times 10^{13}$	$3,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-5} \%$
4	$2,4 \times 10^{13}$	$5,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-5} \%$
5	$4,9 \times 10^{13}$	$7,7 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{-4} \%$

Eine DNA Kontrolle der Output-Phagen (Abbildung 19) zeigte, dass die Qualität der Phagemide erhalten geblieben war, das heißt, dass die Phagemide der Phagen-Output Klone die Inserts für leichte und schwere Kette hatten.

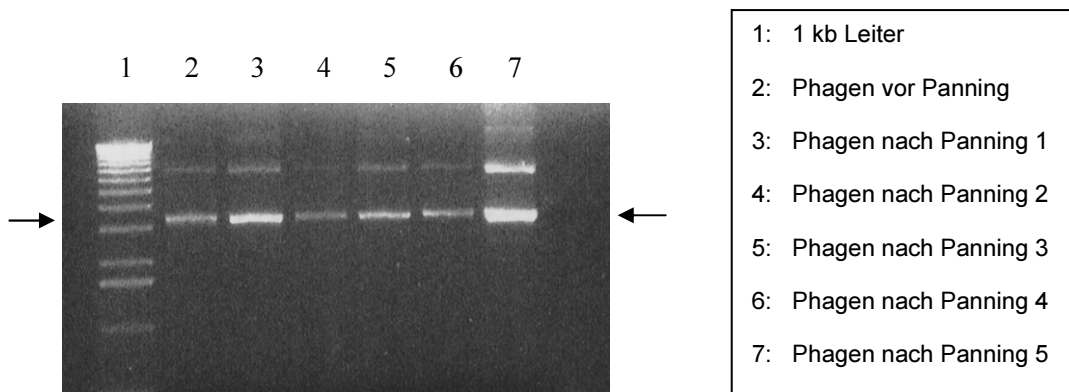


Abbildung 19: Agarose-Gelelektrophorese der DNA von Biopanning Output Phagen

Nach jeder Biopanning Runde wurde Phagemid-DNA präpariert und im Agarose-Gel beurteilt. Es konnte dabei keine zusätzliche Bande unterhalb der relevanten Phagemid-Bande nachgewiesen werden, so dass man davon ausging, dass die Phagemide beide Inserts hatten.

Um den Erfolg des Biopanning, d.h. die Anreicherung von LO31-bindenden Fab-Phagen, zu überprüfen, wurden die Gesamtoutput-Phagen auf ihre Bindungsfähigkeit zu LO31 in einem Sandwich-ELISA getestet (Abbildung 20). Es war zu beobachten, dass sich die Bindungsfähigkeit der Gesamtoutput-Phagen von Biopanning-Runde zu Biopanning-Runde verstärkte. Die einzige Ausnahme bildete Runde 5 des Biopanning, bei der im ELISA keine Bindung an LO31 nachweisbar war.

ERGEBNISSE

Demgegenüber konnten aber aus dem Gesamtoutput-Phagen-Pool dieser Runde zahlreiche LO31-bindende Einzelklone isoliert werden. Es wurde daher davon ausgegangen, dass es sich bei dem Ergebnis der Bindung der Gesamtoutput-Phagen an LO31 um einen Artefakt handelt und, entsprechend dem Nachweis von zahlreichen LO31-bindenden Einzelklonen aus Biopanning-Runde 5, eine weitere Anreicherung spezifisch LO31-bindender Fab-Phagen von Biopanning-Runde 4 zu Biopanning-Runde 5 stattgefunden hatte.

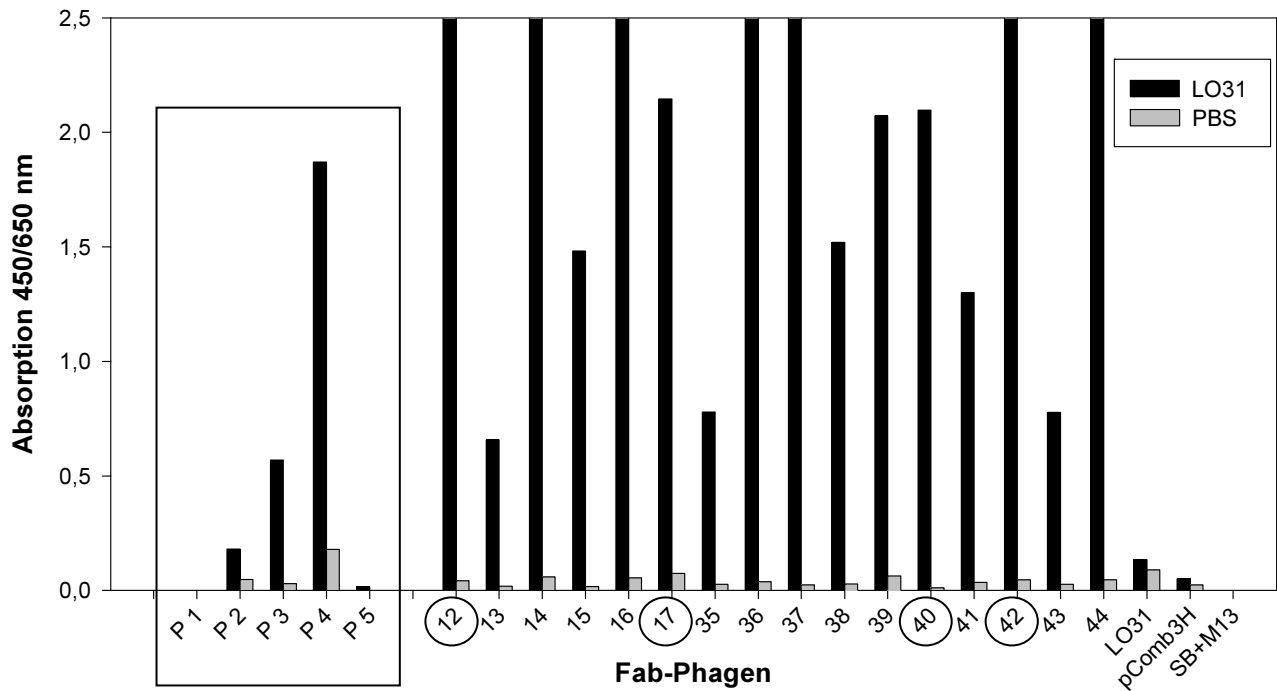


Abbildung 20: ELISA zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Gesamtoutput- und Einzelklonoutput-Phagen an das Fab-Fragment LO31

Die Gesamtoutput-Phagen jeder Biopanning-Runde (P1-P5) und die Einzelklonoutput-Phagen von Biopanning 5 (Nr.12-44) wurden, wie LO31 Fab-Phagen, pComb3H und M13-Helferphagen als Negativ-Kontrollen, auf ihre Bindungsfähigkeit zu Fab-Fragment LO31 bzw. PBS (Kontrolle) getestet. Mit den umkreisten Einzelklonoutput-Phagen wurde nach der BstNI-Restriktions-enzymanalyse weitergearbeitet.

3.2.2 Charakterisierung spezifisch bindender Fab-Phagen

3.2.2.1 Auswahl von Output-Klonen für weitere Untersuchungen

Da frühere Studien der Arbeitsgruppe gezeigt hatten, dass in einem Biopanning Output zahlreiche, auch identische Klone vorhanden sein können, musste ein Auswahlverfahren angewandt werden, um möglichst verschiedene Klone aus dem Phagen-Output Pool für weitere Untersuchungen zu gewinnen.

Zu diesem Zweck wurde der Output nach Runde 5 des Biopanning mit Hilfe des Restriktions-enzym BstNI auf Diversität der Einzelklone untersucht. Anhand des Restriktionsergebnisses

(Abbildung 21) wurden vier Einzelklone ausgewählt (12, 17, 40, 42), die aufgrund des Restriktionsmusters unterschiedlich erschienen.

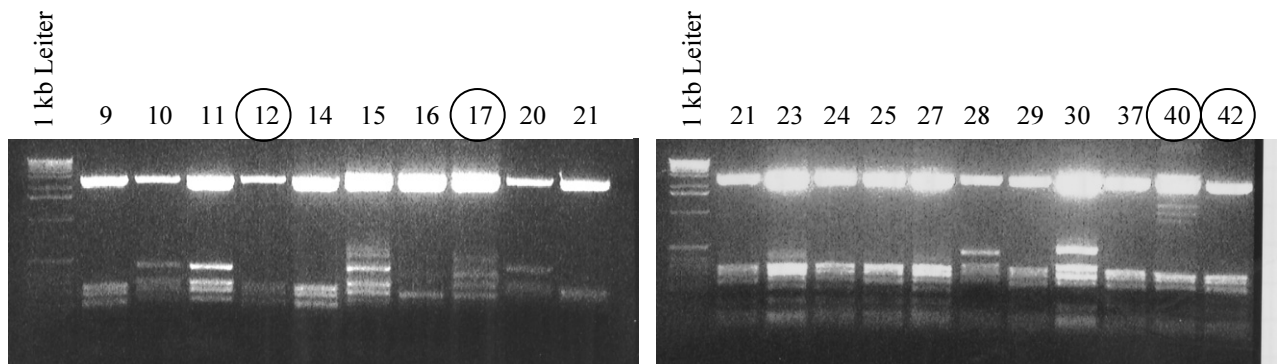


Abbildung 21: BstNI-Restriktionsenzymanalyse von LO31-Einzelklonoutput-Phagen nach Biopanning 5

3.2.2.2 Restriktionsenzymanalyse mit SacI/XbaI bzw. XhoI/SpeI

Da sich anti-LO31 Klon 17 bei ersten Sequenzierungen schlecht sequenzieren ließ, wurde der Klon auf das Vorhandensein von den Sequenzen für leichte und schwere Kette überprüft. Es wurde dazu ein Verdau mit den Enzymen SacI/XbaI bzw. XhoI/SpeI durchgeführt.

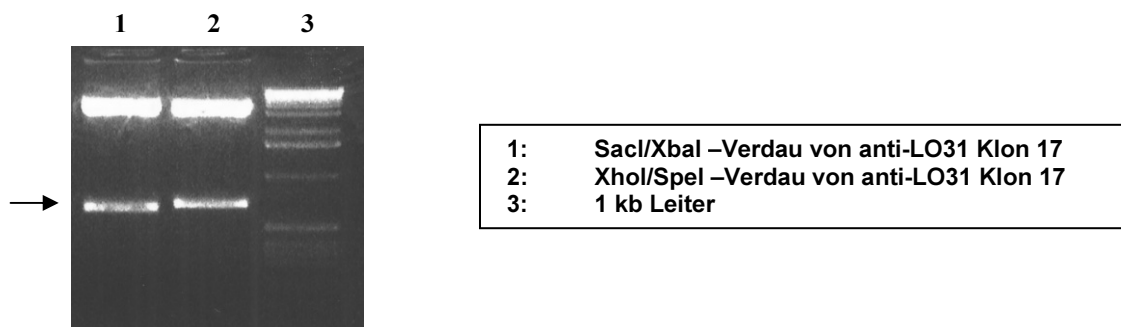


Abbildung 22: Restriktionsenzymanalyse mit den Enzymen SacI/XbaI bzw. XhoI/SpeI zum Nachweis von Inserts für leichte (SacI/XbaI) und schwere Kette (XhoI/SpeI)

Es konnte bei dem anti-LO31 Klon 17 ein Insert in der Leichtketten- und ein Insert in der Schwerkettenregion nachgewiesen werden.

3.2.2.3 Sequenzen der anti-LO31 Klone

Es wurden die V-Regionen von anti-LO31 Klon 12, 17, 40 und 42 sequenziert. Es stellte sich heraus, dass die Klone 12, 40 und 42 identisch waren, obwohl sie im BstNI-Restriktionsmuster unterschiedlich erschienen. Lediglich Klon 17 hatte abweichende Sequenzen für leichte und schwere Kette.

ERGEBNISSE

Ein Vergleich der Sequenzen der leichten und schweren Kette auf DNA- und Proteinebene zeigte deutliche Unterschiede zwischen dem Klon 17 und den drei identischen Klonen 12, 40 und 42 sowohl in den CDR- als auch in den Gerüstregionen (Abbildung 23 und 24). Die CDR-Regionen unterschieden sich dabei nicht nur in ihrem Aminosäuremuster, sondern auch in ihrer Länge.

	Primer-Region				50	
MGgLO3117	1	GAGGTGCAGC	TGCTCGAGCA	GTCTGGGGCT	GAGGTGAAGA	AGCCTGGGGC
MGgLO3140		GAGGTGCAGC	TGCTCGA÷÷÷	GTCGGGGCCA	GGACTGGTGA	AGCCTTCACA
						CDR1 100
MGgLO3117	51	CTCAGTGAAG	GTTTCCTGCA	AGGCATCTGG	ATACACCTTC	ACCAAC÷÷÷÷
MGgLO3140		GACCCTGTCC	CTCACCTGCA	CTGTCTCTGG	TGGCTCCATC	AGCAGTGGTG
	CDR1					
MGgLO3117	101	÷÷TACTATAT	GCACTGGGTG	CGACAGGCC	CTGGACAAGG	GCTTGAGTGG
MGgLO3140		GTTACTACTG	GAGCTGGATC	CGACAGCCCG	CCGGGAGTCG	GCTGGAGTGG
						CDR2 200
MGgLO3117	151	ATGGGATGGA	TCAACCCTGA	CAGTGGTGGC	ACACACTATG	CACAGAAAGTT
MGgLO3140		ATTGGGCGTA	TTTATACCAA	TGGGGGCACC	GAGTATAACC	CG÷÷÷TCCCT
						CDR2 250
MGgLO3117	201	TCAGGGCAGG	GTCACCATGA	CCAGGGACAC	CTCCATCAGC	ACAGCCTACA
MGgLO3140		CAAGAGTCGA	GTCACCATGT	CAGTAGACAC	GTCCAAGAGC	CAGTTCTCCC
						CDR2 300
MGgLO3117	251	TGGAGCTGAG	CAGCCTGAGA	TCTGACGACA	CGGCCGTGTA	TTACTGTGCG
MGgLO3140		TCAACCTGGC	CTCTGTGACC	GCCGCAGACA	CGGCCGTCTA	TTACTGTGCG
						CDR3 350
MGgLO3117	301	AGAGAGAGGT	ATAGCAGTGG	CCGGGATAGC	CTCGACTTTG	ACTACTGGGG
MGgLO3140		CGAG÷÷÷÷÷	GTGTTTCCTA	TGGGGAT÷÷T	TTCA÷÷÷÷CG	ACTATTGGGG
						CDR3 378
MGgLO3117	351	CCAGGGAACC	CTGGTCACCG	TCTCCTCA		
MGgLO3140		CCAGGGAACC	CTGGTCACCG	TCTCCTCA		

Abbildung 23: DNA Alignment der schweren Ketten von anti-LO31 Klon 17 und anti-LO31 Klon 40

ERGEBNISSE

	1	Primer-Region		50
MGgLO3117		GAGCTCCAGC CGCCCTCAGT GTCCGTGTCC CCAGGACAGA CAGCCAGCAT		
MGgLO3140		GAGCTCCAGC CTGCCTCCGT GTCTGGGTCT CCTGGACAGT CGATCACCAT		
	51		CDR1	100
MGgLO3117		CACCTGCTCT GGAGATAA÷÷ ÷÷÷÷÷ATTGG GGG÷÷ATAAA TATGCTTGCT		
MGgLO3140		CTCCTGCACT GGAACCAGCA GTGACGTTGG CGGTTATAAC TATGTCTCCT		
	101			CDR2 150
MGgLO3117		GGTATCAACA GAAGCCAGGC CAGTCCCCTG TGCTCGTCAT CTATGAAGAT		
MGgLO3140		GGTACCAACA CCACCCCGGC AAAGCCCCCA AACTCATGAT TTATGAGGTC		
	151	CDR2		200
MGgLO3117		AACAAGCGGC CCTCAGGGAT CCCTGAGCGA TTCTCTGGCT CCAATTCTGG		
MGgLO3140		AGTAATCGGC CCTCAGGGGT TTCTAATCGC TTCTCTGGCT CCAAGTCTGG		
	201			250
MGgLO3117		GAACACAGCC ACTCTGACCA TCAGCGGGAC CCAGTCTATA GATGAGGCTG		
MGgLO3140		CAACACGGCC TCCCTGACCA TCTCTGGGCT CCAGGCTGAG GACGAGGCTG		
	251		CDR3	300
MGgLO3117		ACTATTACTG TCAGGCGTG÷ ÷÷GGACAGCA ACACTGTGGT TTTCGGCGGA		
MGgLO3140		ATTATTACTG CTCCTCATAT ACAAGCAGCA CCACTTGGGT GTTCGGCGGA		
	301		324	
MGgLO3117		GGGACCAAAC TGACCGTCCT AGGT		
MGgLO3140		GGGACCAAGG TGACCGTCCT AGGT		

Abbildung 24: DNA Alignment der leichten Ketten von anti-LO31 Klon 17 und anti-LO31 Klon 40

3.2.2.4 Zugehörige Keimbahngensegmente und Mutationsraten

Die sequenzierten V-Regionen, aufgelistet nach dem Kabat Nummerierungsschema, konnten durch eine Datenbankabfrage auf verschiedene Keimbahngenfamilien und damit auch verschiedene Keimbahngensegmente zurückgeführt werden. Die Homologie der V_H -Regionen zu den Keimbahngensegmenten reichte dabei von 92,3 % bis 97,1 %, die der V_L -Regionen von 96,8 bis 98,4 %. Es wurden weiterhin die zugehörigen D- und J-Segmente bestimmt, wobei die Homologie dieser Segmente zu den Keimbahngensegmenten gering war (Tabelle 2 und 3).

ERGEBNISSE

Tabelle 2: Zugehörige Keimbahngensegmente der isolierten schweren Ketten

Klon	V _H Familie/Segment	V _H Bezeichnung	Homologie %	D _H	J _H
anti-LO31 17	1-02	DP-75/VI-2...+ (Z14071)	97,1	D6-19 (X97051)	JH4b (X86355)
anti-LO31 12, 40, 42	4-61	3d279d+ (L10097)	92,3	D1 (J00233)	JH4b (X86355)

Die Namen der zugehörigen Keimbahngensegmente wurden durch die V-BASE Datenbank ermittelt. Die Nummern in Klammern geben die EMBL accession Nummer an.

... Abkürzung des Keimbahngensegment-Namens und/oder Existenz von Synonymen

+ bereits kartographiertes Keimbahngensegment

Tabelle 3: Zugehörige Keimbahngensegmente der isolierten leichten Ketten

Klon	V _L Familie/Segment	V _L Bezeichnung	Homologie %	J _L
anti-LO31 17	2a2	2a2.272A12/DPL11...+ (Z73664)	98,4	JL3b (D87017)
anti-LO31 12, 40, 42	3r	3r.9C5/DPL23...+ (Z73647)	96,8	JL2/JL3a (M15641)

Die Namen der zugehörigen Keimbahngensegmente wurden durch die V-BASE Datenbank ermittelt. Die Nummern in Klammern geben die EMBL accession Nummer an.

... Abkürzung des Keimbahngensegment-Namens und/oder Existenz von Synonymen

+ bereits kartographiertes Keimbahngensegment

Es wurden die Mutationsraten der CDR-Regionen und der Gerüstregionen (*Framework-Regionen* (FRs)) bestimmt (Tabelle 4 und 5). Bei allen Klonen zeigte sich eine höhere Mutationsrate in den CDR-Regionen als in den FR-Regionen. Auch das Verhältnis von Austausch- zu stillen Mutationen war in den CDR-Regionen bei zwei Ketten größer als 2,9, in den FR-Regionen bei allen Ketten kleiner als 2,9. Dies deutete auf antigen-gerichtete, somatische Mutationen der Keimbahngensequenzen hin.

Der anti-LO31 Klon 17 zeigte insgesamt die niedrigste Mutationsrate und damit die größte Homologie zu den Keimbahngenen, wie oben schon beschrieben.

Tabelle 4: Mutationsraten der isolierten schweren Ketten

Klon	V _H CDRs	V _H CDRs	V _H FRs	V _H FRs	Gesamte V _H -Region	Gesamte V _H -Region
	<i>Mut/total A/S</i>	<i>% ratio</i>	<i>Mut/total A/S</i>	<i>% ratio</i>		
anti-LO31 17	4/69 4/0	5,8 ∞	4/204 1/3	2,0 0,3	8/273	2,9
anti-LO31 12, 40, 42	8/69 4/4	11,6 1	13/204 9/4	6,4 2,3	21/273	7,7

Mut: Mutationen; total: Gesamtbasenzahl; A: Austauschmutationen; S: stille Mutationen; ratio: Verhältnis A/S (ratio 4/0 mathematisch nicht definiert; hier zur Verdeutlichung als ∞ angegeben)

Tabelle 5: Mutationsraten der isolierten leichten Ketten

Klon	V _L CDRs	V _L CDRs	V _L FRs	V _L FRs	Gesamte V _H -Region	Gesamte V _H -Region
	Mut/total A/S	% ratio	Mut/total A/S	% ratio	Mut/total	%
anti-LO31 17	2/81 0/2	2,5 0	2/177 1/1	1,1 1	4/258	1,6
anti-LO31 12, 40, 42	3/75 3/0	4,0 ∞	5/177 2/3	2,8 0,7	8/252	3,2

Mut: Mutationen; total: Gesamtbasenanzahl; A: Austauschmutationen; S: stille Mutationen; ratio: Verhältnis A/S (ratio 4/0 mathematisch nicht definiert; hier zur Verdeutlichung als ∞ angegeben)

3.2.2.5 Bindungseigenschaften der anti-LO31 Klone

Um zu bestätigen, dass die isolierten Fab-Phagen in antiidiotypischer Weise an das Fab-Fragment LO31 gebunden haben, wurde die Bindung der isolierten Fab-Phagen an Fc-Fragment getestet. Als Vergleich diente die Bindung an Fab LO31 (Abbildung 25).

Die anti-LO31 Klone 17 und 40 zeigten keine Bindung an Fc-Fragment.

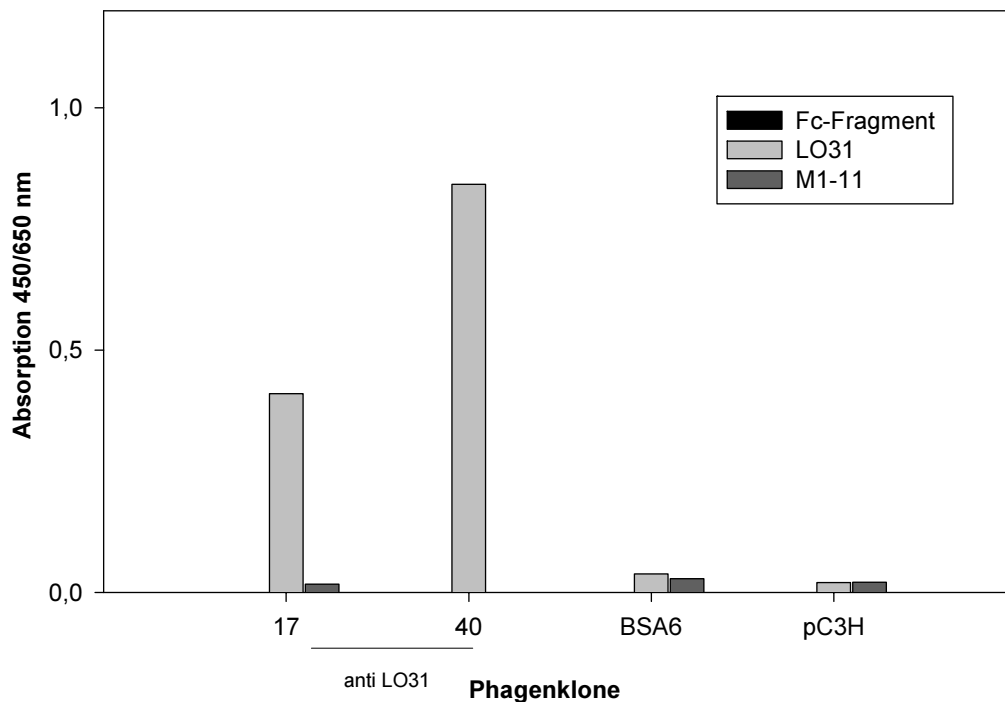


Abbildung 25: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der anti-LO31 Klone 17 und 40 an Fc-Fragment

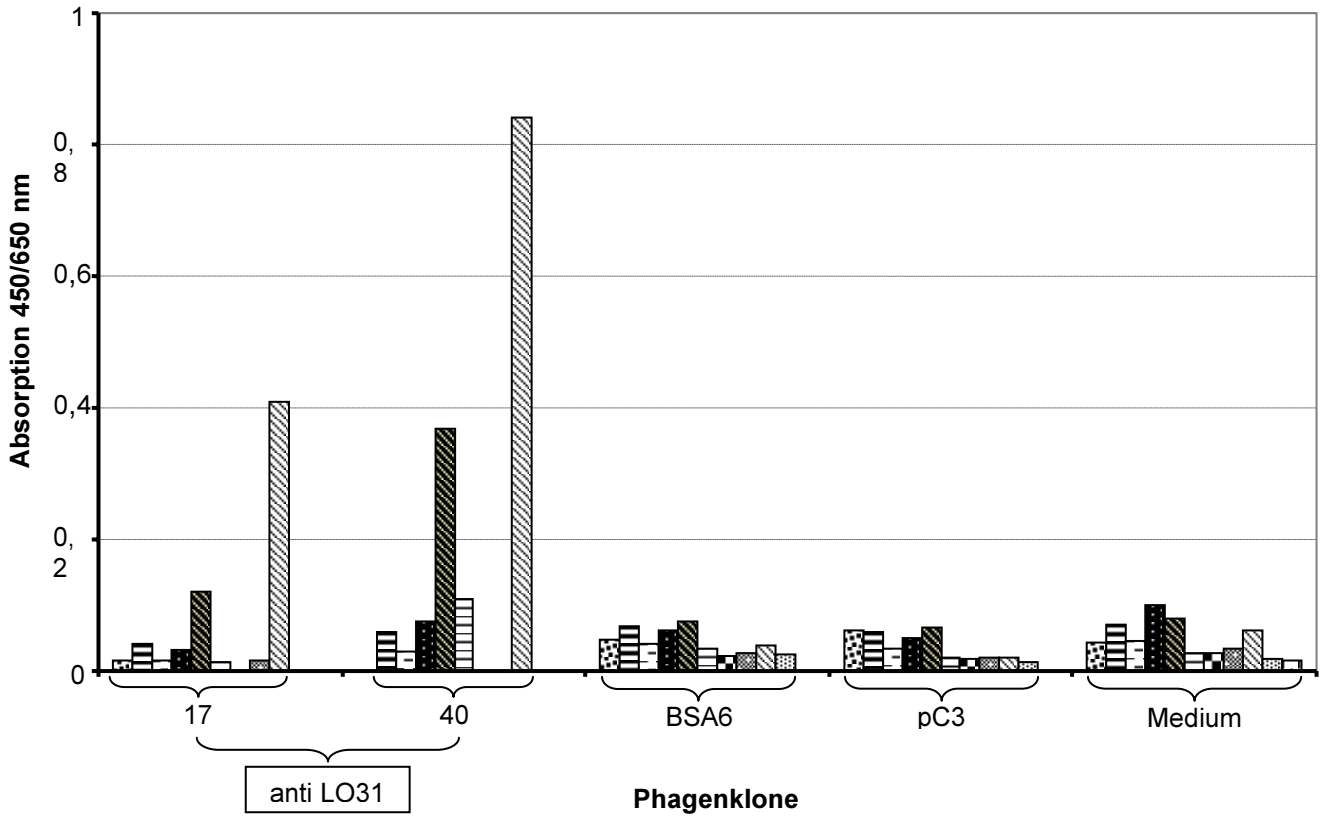
Die anti-LO31 Klone 17 und 40 wurden in einem Sandwich-ELISA auf ihr Bindungsverhalten zu Fc-Fragment getestet. Die Phagenklone BSA6 und pComb3H, sowie das Fab-Fragment M1-11 dienten als Negativ-Kontrollen. Die Bindung an das Fab-Fragment LO31 stellte die Positiv-Kontrolle dar. Die Höhe der Absorption gab die Stärke der Bindung an.

In einer weiteren Untersuchung wurden die anti-LO31 Klone 17 und 40 auf ihr Bindungsverhalten zu anderen Fab-Fragmenten getestet. Die für dieses Experiment hergestellten und aufgereinigten Fab-Fragmente LO31 und GGb02 (Jendreyko et al., 1998), GK2, GK8 und TCH3 (Uttenreuther-Fischer et al., 2006), BSA6 und BSA14 (Osei & Fischer, unveröffentlicht), SH21 (Osei et al., 2000) und M1-11 (Leucht et al., 2001) stammten aus anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe und unterschieden sich zum Teil in ihrem genetischen Ursprung und ihren Bindungseigenschaften.

Bei der Durchführung des ELISA wurde darauf geachtet, dass die ELISA-Platte mit gleichen Fab-Fragment Konzentrationen beschichtet war und dass äquivalente Fab-Phagen-Konzentrationen zum Einsatz kamen. Als Negativ-Kontrollen dienten der anti-BSA Phagen-Klon 6 und der leere pComb3H Vektor.

Die anti-LO31 Fab-Phagen 17 und 40 banden nur das Fab-Fragment LO31 spezifisch. Im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen zeigten sie außerdem eine schwächere Bindung an das Fab-Fragment TCH3, das, wie LO31, vom Keimbahngesegment V_H 3-30 abstammte. Andere Fab-Fragmente wurden nicht gebunden (Abbildung 26).

ERGEBNISSE



Fab-Fragment	Bindungseigenschaft	Keimbahgen
GGb02	IVIG-Target	V _H 3-30
TCH3	α ch14.18 (anti-Id)	V _H 3-30
GK2	α ch14.18 (anti-Id)	V _H 3-30
LO31	IVIG-Target	V _H 3-30
BSA6	anti-BSA	V _H 3-23
BSA14	anti-BSA	V _H 3-23
SH21	IVIG-Target	V _H 3-23
M1-11	IVIG-Target	V _H 3-23
GK8	α ch14.18 (anti-Id)	V _H 4-04
IVIG-Fab		
Fc-Fragment		

Abbildung 26: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der anti-LO31 Klone 17 und 40 an andere Fab-Fragmente

Die anti-LO31 Klone 17 und 40 wurden in einem Sandwich-ELISA auf ihr Bindungsverhalten zu den Fab-Fragmenten GGb02, BSA6, BSA14, SH21, TCH3, GK2, GK8, M1-11 und LO31 getestet. Die Phagenklone BSA6 und pComb3H, sowie Nährmedium mit Helferphagen dienten als Negativ-Kontrollen. Es wurden gleiche Mengen von Fab-Fragment und äquivalente Konzentrationen von Fab-Phagen eingesetzt. Die Stärke der Absorption gab die Stärke der Bindung an.