

Lehrstuhl für Biologische Chemie

**Neutralisierung eines Inhibitors der neuronalen Regeneration im  
ZNS: Optimierung des anti-Nogo-A Antikörpers IN-1 durch  
Protein *Engineering***

Dipl.-Biol. Markus Fiedler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ. Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. Prof. Dr. A. Skerra

2. Univ. Prof. Dr. D. Langosch

Die Dissertation wurde am 07.01.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.04.2003 angenommen.

Meiner Familie

*„Reiten, reiten, reiten, durch den Tag, durch die Nacht,  
durch den Tag.*

*Reiten, reiten, reiten.*

*Und der Mut ist so müde geworden und die Sehnsucht  
so groß. Es gibt keine Berge mehr, kaum einen Baum.*

*Nichts wagt aufzustehen. Fremde Hütten hocken durstig  
an versumpften Brunnen. Nirgends ein Turm. Und immer  
das gleiche Bild. Man hat zwei Augen zuviel. Nur in der Nacht  
manchmal glaubt man den Weg zu kennen. Vielleicht kehren  
wir des nächstens immer wieder das Stück zurück,  
das wir in der fremden Sonne mühsam gewonnen haben?*

*[ ... ]“*

„Cornet“ R. M. Rilke



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Struktur und Funktion von Antikörpern .....	1
1.2 Gentechnische Herstellung von Antikörperfragmenten und deren Einsatz in Diagnostik und Therapie .....	3
1.3 Degeneration und Regeneration von Neuronen im Zentralen Nervensystem (ZNS) höherer Vertebraten .....	6
1.3 Neutralisierung des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A (bzw. NI-220) durch den monoklonalen Antikörper IN-1 .....	8
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Material .....	14
2.1.1 Biologisches Material .....	14
2.1.2 Plasmide .....	14
2.1.3 Oligodesoxynukleotide .....	15
2.1.4 Enzyme und sonstige Proteine .....	18
2.1.5 Chemikalien .....	19
2.1.6 Standards und Kits .....	23
2.1.7 Geräte .....	24
2.1.8 Verbrauchsmaterial .....	28
2.1.9 Puffer, Medien und Stammlösungen .....	31
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	36
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen .....	36
2.2.2 Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i> .....	37
2.2.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA .....	37
2.2.2.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA .....	37
2.2.2.3 Isolierung von einzelsträngiger Plasmid-DNA .....	38
2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	39
2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA .....	40
2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese .....	40
2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten .....	40
2.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese .....	41
2.2.5 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden .....	42
2.2.6 Abtrennung von Enzymen (Phenol-Extraktion, Ethanol-Fällung) .....	43

2.2.7	Enzymatische Modifizierung von DNA .....	44
2.2.7.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	44
2.2.7.2	Ligierung von DNA-Fragmenten .....	44
2.2.7.3	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	45
2.2.7.4	Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel .....	45
2.2.7.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung bzw. Synthese von Genen .....	46
2.2.8	Sequenzierung doppelsträngiger DNA .....	48
2.2.8.1	Radioaktive Sequenzanalyse .....	48
2.2.8.2	Automatisierte Sequenzanalyse unter Verwendung fluoreszierender Terminatoren .....	48
2.3	Gentechnische Methoden .....	49
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	49
2.3.1.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Schüttelkolben .....	49
2.3.1.2	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Laborfermenter .....	50
2.3.2	Kolonie-Filterstapel-Assay zur Selektion von Varianten des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments .....	52
2.4	Proteinchemische Methoden .....	54
2.4.1	Chromatographische Verfahren .....	54
2.4.1.1	Proteinreinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie .....	54
2.4.1.2	Proteinreinigung durch Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	55
2.4.1.2.1	IMAC unter Verwendung einer Zn(II)/IDA-Sephrosematrix .....	55
2.4.1.2.2	IMAC an einer Zn(II)/POROS-Matrix unter FPLC-Bedingungen .....	56
2.4.1.3	Proteinreinigung durch Thiophile Adsorptions-Chromatographie (TAC) .....	57
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	57
2.4.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch Absorptionsmessung bei 280 nm .....	59
2.4.4	Konzentrierung von Proteinen .....	59
2.4.5	Ortsgerichtete Kopplung von F <sub>ab</sub> -Fragmenten mit Fluorescein-5-maleimid .....	60
2.5	Immunchemische Methoden .....	60

2.5.1	Western-Blotting .....	60
2.5.2	Bindungsnachweis mittels <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	61
2.5.3	Nachweis von Bindungsaktivität durch Oberflächen-Plasmonresonanz ( <i>Surface Plasmon Resonance</i> , SPR) mit dem BIACORE-System .....	63
2.6	Histologische Methoden .....	66
2.7	Enzymkinetische Methoden .....	67
2.8	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken .....	68
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
3.1	Bakterielle Produktion, Reinigung und <i>In vivo</i> -Einsatz des rekombinanten IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments .....	70
3.1.1	Optimierung des Fermentationsverfahrens zur Herstellung eines partiell humanisierten IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments in <i>E. coli</i> unter Minimierung des Plasmidverlustes in der Fermentationskultur .....	71
3.1.1.1	Erhöhung der Selektionsstringenz mittels Ersatz des Ampicillin- durch ein Chloramphenicol-Resistenzgen .....	73
3.1.1.2	Konstruktion und Verwendung des Vektors pMF1 zur <i>proBA</i> - Komplementierung von <i>E. coli</i> JM83 .....	74
3.1.2	Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für rekombinante F <sub>ab</sub> -Fragmen- te ohne die Notwendigkeit eines Affinitätsanhängsels .....	81
3.1.3	Einsatz des rekombinanten IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments zum Studium der neuronalen Regeneration <i>in vivo</i> .....	85
3.1.4	Konstruktion von pASK106-IN1 und Herstellung einer Fusion aus dem IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragment und der albuminbindenden Domäne von <i>Strepto-</i> <i>coccus</i> Protein G .....	86
3.2	Herstellung funktioneller Fragmente des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A in <i>E. coli</i> .....	88
3.2.1	Konstruktion von pASK111-NiFr2 und Gewinnung eines verkürzten Fragments der zentralen globulären Domäne von Nogo-A .....	88
3.2.2	Optimierung der gentechnischen Produktion und Reinigung des löslichen Nogo-A Fragments .....	91
3.3	Optimierung der Antigenbindung des rekombinanten IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments durch <i>Molecular Modelling</i> und evolutives Protein-Design .....	93
3.3.1	Modellierung des IN-1 Paratops auf Grundlage der 3D-Strukturen der F <sub>ab</sub> -Fragmente TR1.9 und 36-71 .....	94
3.3.2	Verifizierung der Gültigkeit des 1vge/6fab Modells durch ortsgerichtete Mutagenese in der IN-1 Antigen-Bindungsstelle .....	96

3.3.3	Schrittweise Affinitätsmaturierung des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments durch Zufallsmutagenese des CDR-L3 .....	99
3.3.4	Funktionelle Analyse der affinitätsmaturierten Varianten des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments .....	112
3.4	Nachweis der Bindungs- und Neutralisierungsaktivität der affinitätsmaturierten Varianten des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments gegenüber Nogo-A .....	114
3.4.1	Affinitätsanalyse der mutierten IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragmente mit Nogo-A und dessen rekombinanten Fragmenten im ELISA .....	115
3.4.2	Bestimmung der Bindungskonstante des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments und seiner Mutante II.1.8 für das Nogo-A Fragment NiFr4 mittels Oberflächen-Plasmonresonanz .....	117
3.4.3	Analyse der Antigenerkennung durch das IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragment und seiner Mutanten an Gewebeschnitten adulter Ratten .....	122
3.4.4	Untersuchungen zur Neutralisierung der inhibitorischen Wirkung von Nogo-A durch die Mutanten des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments mittels Zellkultur-Assay .....	125
3.5	Humanisierung der Variante II.1.8 des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments durch CDR-Transplantation auf der Grundlage des menschlichen Anti-Thyroidperoxidase Autoantikörpers TR1.9 .....	127
3.5.1	Auswahl der zu humanisierenden Positionen und Synthese der Gene für die V <sub>L</sub> - und die V <sub>H</sub> -Domäne durch <i>Assembly</i> -PCR .....	128
3.5.2	Herstellung und funktionelle Analyse des humII.1.8 F <sub>ab</sub> -Fragments .....	133
3.6	Fusionsproteine aus F <sub>ab</sub> -Fragmenten und der TEM1 $\beta$ -Lactamase .....	136
3.6.1	Konstruktion von Expressionsvektoren und gentechnische Herstellung von Fusionsproteinen eines F <sub>ab</sub> -Fragments mit der TEM1 $\beta$ -Lactamase .....	136
3.6.2	Funktionelle Analyse von Fusionsproteinen aus $\beta$ -Lactamase und F <sub>ab</sub> -Fragment und ihre praktische Anwendung im ELISA .....	143
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>146</b>
4.1	Die Sekretion von eukaryontischen Proteinen in <i>E. coli</i> .....	146
4.1.1	Funktionelle Produktion von Antikörperfragmenten im Fermenter .....	148
4.1.2	Herstellung und Reinigung löslicher Fragmente von Nogo-A in <i>E. coli</i> .....	150
4.2	Affinitätsoptimierung des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments mittels Protein- <i>Engineering</i> .....	152
4.2.1	Erzeugung von Mutanten der V <sub>L</sub> -Domäne des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments .....	155
4.2.2	Die Selektion optimierter F <sub>ab</sub> -Fragmente mit einem Kolonie-Filterstapeltest .....	157
4.2.3	Quantitative Nachweisverfahren für die molekulare Bindung zwischen mutierten IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragmenten und NiFr2 bzw. NiFr4 .....	160
4.3	Neutralisierung von Nogo-A durch Varianten des IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragments .....	161



---

4.4 Ausblick .....	166
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>167</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>169</b>
<b>7 Abkürzungen .....</b>	<b>186</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>188</b>
8.1 Berechnete molare Masse und vorhergesagter molarer Extinktionskoeffizient der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine .....	188
8.2 Aminosäure- und DNA-Sequenz der variablen Domänen des Antikörpers IN-1 .....	189
8.3 Aminosäure- und DNA-Sequenz des rekombinanten Nogo-A Fragments NiFr2 .....	190
8.4 Durch Affinitätsmaturierung erhaltene Varianten der V <sub>L</sub> -Domäne von IN-1 .....	192



## 1 Einleitung

### 1.1 Struktur und Funktion von Antikörpern

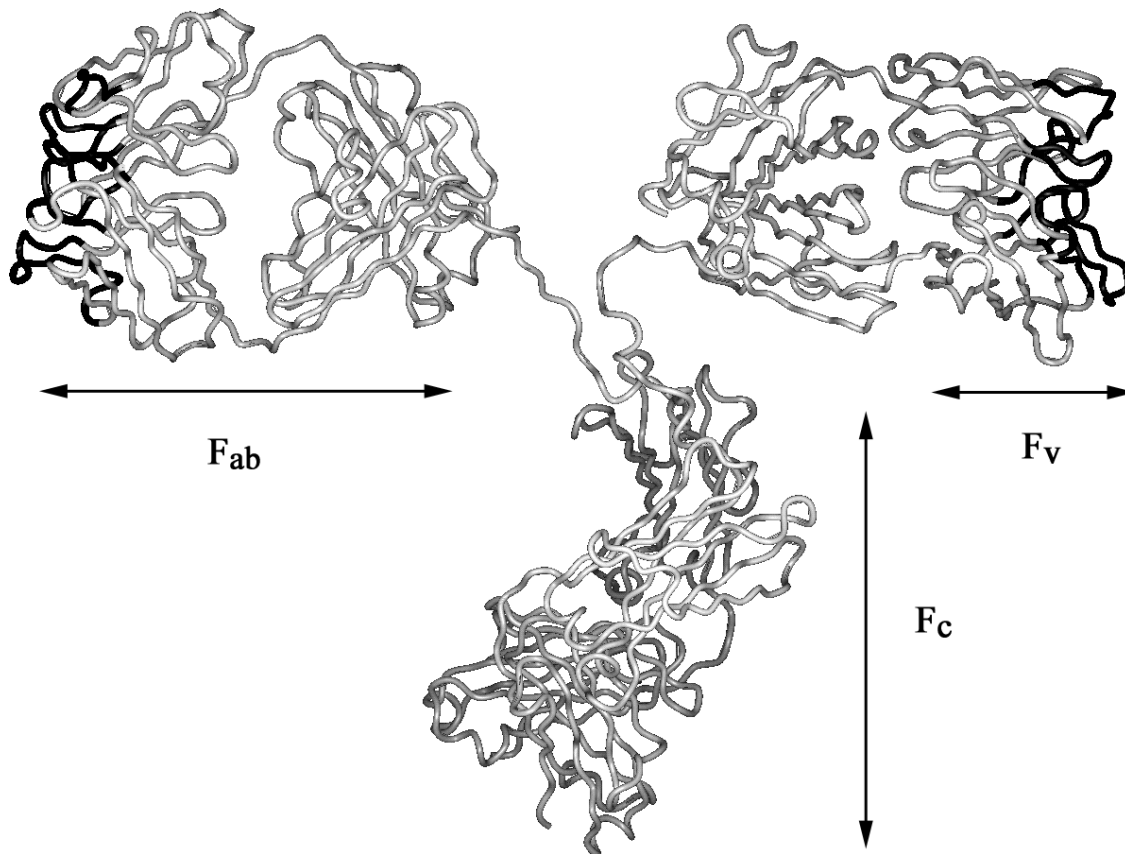
Antikörper sind die Funktionsträger der humoralen Immunantwort bei höheren Vertebraten. Als solche besitzen sie die Fähigkeit, einerseits immunogene Strukturen hochspezifisch zu binden und andererseits Effektorfunktionen zu vermitteln, wie beispielsweise die Aktivierung des Komplementsystems oder die Induktion der Phagozytose (Janeway und Travers, 1995).

Die Eigenschaft der Immunglobuline bzw. Antikörper, strukturell völlig verschiedenartige Antigene und Haptene spezifisch zu binden, ist auf ihre molekulare Architektur zurückzuführen (Übersicht in Padlan, 1994). Jedes Antikörpermolekül (Abb. 1) setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, je zwei identischen leichten (L-Kette, ca. 25 kDa) und zwei identischen schweren (H-Kette, ca. 50 kDa) Polypeptidketten. Die einzelnen Ketten falten sich repetitiv in mehrere kompakte Immunglobulindomänen von je ca. 110 Aminosäuren mit vorwiegend antiparalleler  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die Domänen werden jeweils durch eine zentrale Disulfidbindung stabilisiert. Die leichten Ketten bestehen aus der sogenannten variablen ( $V_L$ ) und einer konstanten ( $C_L$ ) Domäne, die schweren Ketten aus einer variablen ( $V_H$ ) und mehreren konstanten Domänen ( $C_{H1}$  bis  $C_{H3}$  bei den Immunglobulin-Klassen A, D und G;  $C_{H1}$  bis  $C_{H4}$  bei den Klassen E und M). Zwischen der  $C_{H1}$ - und der  $C_{H2}$ -Domäne befindet sich eine Scharnier-Region (*Hinge*), von der ausgehend die beiden schweren Ketten durch zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind.

Durch proteolytischen Abbau können gezielt Antikörperfragmente hergestellt werden (Abb. 1). Durch Proteolyse mit Papain und partielle Reduktion kann das antigenbindende  $F_{ab}$ -Fragment gewonnen werden, das aus der vollständigen leichten Kette und aus der variablen sowie der ersten konstanten Domäne der schweren Kette besteht. Beide Ketten sind noch durch eine interchenare Disulfidbindung kovalent miteinander verknüpft. Weiterhin entsteht das die Effektorfunktion vermittelnde  $F_c$ -Fragment, das aus den C-terminalen  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ -Domänen gebildet wird. Durch limitierte Proteolyse kann – unter bestimmten Umständen – ebenfalls das kleinste antigenbindende Fragment, das sogenannte  $F_v$ -Fragment entstehen, das lediglich aus den variablen Domänen der beiden Polypeptidketten, welche nicht-kovalent miteinander assoziiert sind, gebildet wird (Abb. 1).

Die Erkennung bzw. Bindung des Antigens wird von den variablen Domänen der leichten und der schweren Kette gemeinsam vermittelt. Die Struktur der variablen Domäne weist konservierte Bereiche (Gerüstregionen, *Framework Regions*, FR) auf, die von insgesamt 9  $\beta$ -Faltblattsträngen gebildet werden (im Gegensatz zu 7  $\beta$ -Faltblattsträngen im Falle der konstanten Domänen), und die wenig Sequenzvariabilität zeigen. Die  $\beta$ -Faltblattstränge werden in jeder variablen Domäne u. a. durch drei hypervariable Schleifen, die auch als *Complementarity Determining Regions* (CDRs) bezeichnet werden, miteinander verbunden.

Die Aminosäuren der insgesamt sechs CDRs (CDR L1-3 und CDR H1-3), die für den Kontakt mit dem Antigen zur Verfügung stehen, bilden die eigentliche Antigenbindungsstelle, das Paratop des Antikörpers.



**Abbildung 1:** Die dreidimensionale Struktur eines Antikörpers der Klasse IgG1.  $\alpha$ -Darstellung des monoklonalen Antikörpers Mab231 (PDB-Code: 1igt; Harris *et al.*, 1997). Das  $F_{ab}$ -Fragment (*Fragment Antigen Binding*) umfaßt die leichte Kette sowie die ersten beiden Domänen der schweren Kette. Das  $F_v$ -Fragment (*Fragment Variable Regions*) wird aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette gebildet, während der  $F_c$ -Teil (*Fragment Crystallizable*) die gepaarten carboxyterminalen konstanten Domänen der schweren Kette umfaßt. Die Antigenbindungsstelle ist in schwarz dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Skerra; modifiziert).

Das theoretische Antikörperrepertoire des menschlichen Organismus umfaßt über  $10^{11}$  verschiedene Antikörpermoleküle (Janeway und Travers, 1995), die in ihrer Grundstruktur nahezu identisch sind. Der funktionellen Vielfalt der Antikörper liegt die hohe strukturelle Variabilität eines nur kleinen, definierten Bereichs ihrer Proteinstruktur – nämlich des Paratops – zu Grunde.

Die strukturelle Vielfalt der Antigenbindungsstelle hat ihre Ursache auf genetischer Ebene. Sie beruht im wesentlichen auf der somatischen Rekombination von V- und J-Gensegmenten für die  $V_L$ -Domäne bzw. von V-, D- und J-Gensegmenten für die  $V_H$ -Domäne im Verlauf der

B-Zellreifung (Tonegawa, 1983; Manser *et al.*, 1987). Allein durch die dabei möglichen Kombinationen der vorhandenen Keimbahn-Gensegmente in Verbindung mit einer zufälligen Einführung zusätzlicher Basenpaare an der Verknüpfungsstelle können  $10^8$  bis  $10^{10}$  unterschiedliche Antikörpermoleküle entstehen (Tonegawa, 1983). Des Weiteren unterliegen die Antikörpergene im Zuge der adaptiven Immunantwort einer Affinitätsmaturierung durch somatische Hypermutation (Übersicht in Parham, 1998). Dabei werden mit hoher Rate Punktmutationen gezielt in diejenigen Bereiche der exprimierten Antikörpergene eingeführt, die für die CDRs kodieren.

Trotz der resultierenden hohen strukturellen Variabilität im Bereich der CDRs ist es möglich, deren Peptidkonformationen sogenannten kanonischen Klassen zuzuordnen (Chotia *et al.*, 1989). Die eingenommene Rückgratstruktur wird dabei hauptsächlich von der Länge der jeweiligen CDR sowie vom Auftreten charakteristischer Aminosäurereste an Schlüsselpositionen innerhalb der CDR oder auch im Gerüstbereich bestimmt. Lediglich CDR-H3 läßt sich keiner kanonischen Klasse zuordnen, was vor allem auf deren ausgeprägte Längenvariabilität zurückzuführen ist.

## 1.2 Gentechnische Herstellung von Antikörperfragmenten und deren Einsatz in Diagnostik und Therapie

Unter denjenigen Proteinen, deren natürliche Funktion für künstliche Anwendungen – etwa in der Biotechnologie oder der Medizin – genutzt wird, nehmen Antikörper eine herausragende Stellung ein. Sie haben sich aufgrund ihrer robusten Struktur und ihrer Fähigkeit, nahezu jedes beliebige Antigen hochspezifisch zu binden, zu einem wichtigen Werkzeug der Biowissenschaften entwickelt (Winter und Milstein, 1991). Mit Hilfe der Hybridomtechnik (Köhler und Milstein, 1975) ist es möglich, nahezu jeden monoklonalen Antikörper in beliebiger Menge zu produzieren. Die in den letzten Jahren entwickelten Methoden zur funktionellen Biosynthese von Antikörperfragmenten in *Escherichia coli* (Übersicht in Skerra, 1993) haben das Anwendungsspektrum der Immunglobuline in der Biotechnologie zudem maßgeblich erweitert.

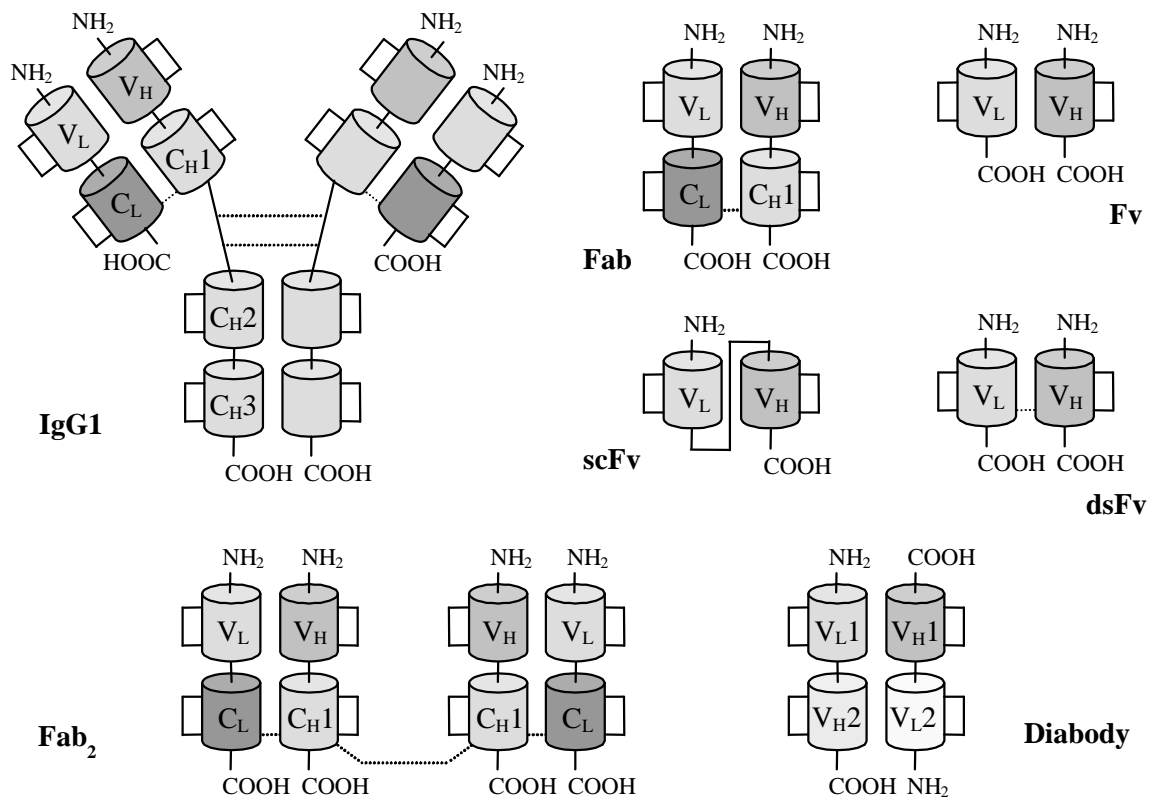
Für die Produktion von Antikörperfragmenten in *E. coli* stehen prinzipiell zwei Strategien zur Verfügung. Zum einen ist die durch Signalsequenzen vermittelte Kosekretion von schwerer und leichter Kette in den periplasmatischen Raum (Skerra und Plückthun, 1988; Better *et al.*, 1988) möglich. In dem dort herrschenden oxidierenden Milieu erfolgt die effiziente Ausbildung der Disulfidbrücken als Voraussetzung für die Faltung und Assoziation der beiden Ketten. Diese Methode führt direkt zu funktionellen Ig-Fragmenten. Zum anderen kann die Produktion der beiden Polypeptidketten im Cytoplasma in Verbindung mit der Bildung von Einschlußkörpern (*Inclusion Bodies*) erfolgen (Cabilly *et al.*, 1984). Die

funktionellen Antikörperfragmente werden erst anschließend über einen Rückfaltungsprozeß *in vitro* gewonnen. Experimentelle Ansätze zur Gewinnung von korrekt gefalteten, funktionellen Ig-Fragmenten direkt aus dem Cytoplasma waren in Einzelfällen zwar erfolgreich (Martineau *et al.*, 1998), jedoch nicht universell realisierbar. Eine Optimierung dieser Strategie kann durch die Verwendung von *E. coli* Wirtsstämmen mit oxidierendem cytosolischem Milieu bzw. stabilisierten Antikörperfragmenten ohne Disulfidbrücken erfolgen (Martineau *et al.*, 1998; Proba *et al.*, 1998; Venturi *et al.*, 2002).

Neben den im Prinzip auch durch konventionelle proteinchemische Methoden erhältlichen F<sub>ab</sub>- und F<sub>v</sub>-Fragmenten (Skerra und Plückthun, 1988; Skerra, 1989) konnten mit Hilfe gentechnischer Methoden und aufgrund des modularen Aufbaus der Immunglobuline diverse künstliche Konstrukte entwickelt werden (Überblick in Plückthun, 1992 bzw. Dübel und Kontermann, 2001). Hervorzuheben sind hier *Single-Chain* F<sub>v</sub>-Fragmente (scFv) (Bird *et al.*, 1988), disulfidverbrückte F<sub>v</sub>-Fragmente (dsFv) (Brinkmann *et al.*, 1993) sowie bivalente (Carter *et al.*, 1992) bzw. bispezifische (z. B. *Diabodies*, Holliger *et al.*, 1993) Antikörperfragmente (Abb. 2).

Für die Diagnostik und den potentiellen Einsatz in der Therapie können durch genetische Fusion der rekombinanten Ig-Fragmente mit Effektormodulen bifunktionelle Proteine erhalten werden. So stehen u. a. Fusionen mit der Alkalischen Phosphatase (Muller *et al.*, 1999) und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP; Griep *et al.*, 1999) zur Verfügung. Fusionen von Antikörperfragmenten mit Radioisotopen oder cytotoxischen Substanzen sind für die Krebsbehandlung von großer potentieller Bedeutung (Immunotoxine; Reiter *et al.*, 1996; Reiter und Pastan, 1998). Dabei wird die selektive Bindung entsprechender Ig-Fragmente an spezifische Oberflächenproteine auf Tumorzellen für die ortsgerichtete Applikation von Therapeutika ausgenutzt (*Tumor Targeting*).

Die Methoden zur Herstellung von Antikörperfragmenten in *E. coli* ermöglichen jedoch nicht nur deren Bereitstellung für Diagnostik und Therapie in ausreichender Qualität und Quantität, sondern auch die einfache und schnelle Modifikation ihrer protein- und immunchemischen Eigenschaften. Die leichte Handhabbarkeit eines bakteriellen Wirts erlaubt die unkomplizierte Veränderung der vektorkodierten Gene des Fremdproteins mit molekularbiologischen Standardmethoden. Durch gezieltes *Antibody Engineering* (Hayden *et al.*, 1997; Kontermann und Dübel, 2001) können so Antikörperfragmente z. B. hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität (Jackson *et al.*, 1992) oder ihrer Wirtsverträglichkeit (Vaughan *et al.*, 1998) optimiert werden.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines Antikörpers der Klasse IgG1 und einer Auswahl von Ig-Fragmenten, die durch bakterielle Produktion bzw. Protein *Engineering* erhalten werden können. Bei scFv-Fragmenten sind die beiden variablen Domänen über ein gentechnisch eingeführtes verbindendes Peptid kovalent miteinander verknüpft. Die Verknüpfung kann entweder vom C-Terminus der V<sub>L</sub>-Domäne zum N-Terminus der V<sub>H</sub>-Domäne erfolgen oder umgekehrt (nicht gezeigt). Bei dsFv-Fragmenten wird eine kovalente Verknüpfung durch Einführung einer künstlichen Disulfidbrücke erreicht. Fab<sub>2</sub> Module bestehen aus zwei Fab-Fragmenten derselben (bivalent) oder unterschiedlicher (bispezifisch) Antigenspezifität. Im ersten Fall kann die Kopplung bereits *in vivo* erfolgen, während im zweiten Falle die Heterokopplung selektiv erst im Anschluß an die Reinigung der beiden unterschiedlichen Fab-Fragmente *in vitro* erfolgt. Diabodies (bispezifisch) entsprechen scFv-Fragmenten, deren auf ca. 5 Aminosäuren verkürzter Peptidlinker eine intramolekulare Paarung der miteinander verbundenen Domänen verhindert. Intrachene Disulfidbrücken sind durch schwarze Klammern, interchene Disulfidbrücken durch gepunktete Linien symbolisiert.

Insbesondere bei der Affinitätsmaturierung sind zwei grundsätzliche experimentelle Ansätze zu unterscheiden. Beim rationalen Design werden ausgehend von einem Strukturmodell geplante Aminosäuresubstitutionen an definierten Positionen der CDRs vorgenommen (Morea *et al.*, 2000). Hierfür zur Verfügung stehende Computerprogramme erlauben die Simulation von Struktur- und Funktionsveränderungen *a priori*. Diese Vorgehensweise kann in letzter Konsequenz bis zum Design eines kompletten künstlichen Paratops für einen Antikörper reichen (Essen und Skerra, 1994; Schiweck und Skerra, 1997).

Bei evolutiven Verfahren werden dagegen durch die Einführung von Zufallsmutationen synthetische Bibliotheken von Antikörperfragmenten hergestellt, die in ihrem Umfang dem

menschlichen Repertoire nahe kommen können (Knappik *et al.*, 2000). Durch geeignete Selektionsstrategien wie dem *Phage Display* oder dem *Ribosome Display* (Winter, 1998, Hoogenboom *et al.*, 1998; Hanes *et al.*, 2000) werden im Erfolgsfall die funktionell optimierten Ig-Fragmente isoliert. Auf diese Weise ist es zudem möglich, Bindeproteine für solche Antigene zu erhalten, die bei einer klassischen Immunisierung toxische Effekte oder nur eine schwache Immunantwort hervorrufen würden.

Etwa zehn rekombinante Antikörper, die durch klassische Hybridomtechnik gewonnen werden, jedoch im Vorfeld z. T. mit Hilfe der oben ausgeführten Techniken optimiert worden sind, stehen derzeit als pharmazeutische Präparate zur Verfügung. Mit z. B. Rituxan® – einem Anti-CD20 Antikörper und dem ersten rekombinanten Antikörper überhaupt, der für die klinische Anwendung zugelassen wurde (1997, Firma Genentech Inc., USA) – werden Non-Hodgkin-artige Lymphome behandelt. Für eine Reihe weitere auf rekombinanten Antikörpern basierender Präparate wurde die Zulassung bei der „*Food and Drug Administration*“ (FDA) der Vereinigten Staaten bereits beantragt (Übersicht in Hollinger und Hoogenboom, 1998).

### **1.3 Degeneration und Regeneration von Neuronen im Zentralen Nervensystem (ZNS) höherer Vertebraten**

Verletzungen von postmitotischen Neuronen des Zentralen Nervensystems (ZNS) von Säugetieren resultieren stets in der Degeneration der betroffenen Zellen und dem damit einhergehenden Verlust ihrer Funktionalität. Im Gegensatz dazu zeigen Nervenzellen des Peripheren Nervensystems (PNS) nach einer Läsion volle strukturelle und funktionelle Regeneration. Hirn- und Rückenmarksverletzungen führen beim Menschen daher meist zur partiellen oder totalen Einschränkung der Sensorik und Motorik des Betroffenen, was sich u. a. im Krankheitsbild der Querschnittslähmung manifestieren kann. Je nach Lage der Rückenmarksläsion kommt es dabei zur Lähmung der Rumpf- und Beinmuskulatur sowie dem Verlust des Empfindungsvermögens für Berührung, Schmerz, Temperatur und Lagesinn (Paraplegie), oder darüber hinaus auch zur Lähmung der Arme (Tetraplegie). Die Schädigung des Halsmarkes führt zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der Atmung. Nach übereinstimmenden Angaben von Interessenvertretungen<sup>1,2</sup> gab es in der Bundesrepublik Deutschland bis Ende 1999 insgesamt 120.000 Querschnittsgelähmte, zu denen jährlich etwa 1.400 Fälle hinzukommen. Die Ursache der Lähmung läßt sich zu 82 % auf Unfälle zurückführen, während 18 % krankheitsbedingt sind. Die Betroffenen sind meist Erwachsene zwischen 25 und 55 Jahren, als Opfer von Verkehrsunfällen (33 %), Sport- und Badeunfällen (29 %) sowie Arbeitsunfällen (15 %).

---

<sup>1</sup> Fördergemeinschaft der Querschnittsgelähmten in Deutschland e. V.

<sup>2</sup> Deutsche Stiftung für Querschnittslähmung e. V.



Therapien zur Wiederherstellung der sensorischen und motorischen Fähigkeiten nach Unfällen beschränken sich aufgrund der unumkehrbaren Degeneration des neuronalen Gewebes auf Rehabilitationsmaßnahmen und haben nur im Falle leichter Rückenmarksschädigungen Erfolg. Bei schwereren Verletzungen, die den Verlust von Neuronen als Funktionsträger beinhalten, ist die Lähmung irreversibel. Therapieansätze müssen daher auf den Erhalt des verletzten Nervengewebes, dessen Regeneration und der Wiederherstellung seiner Funktion abzielen (Horner und Gage, 2000).

Die Unfähigkeit des adulten ZNS zur Regeneration ist seit Ende des letzten Jahrhunderts Gegenstand der Forschung (Ramon y Cajal, 1928), galt aber bis in die neuere Zeit als unumstößliches Dogma. Als Reaktion auf eine Axotomie, die von zentralnervösen Neuronen zunächst überlebt wird, zeigen diese die *De novo*-Synthese von Proteinen, die sonst während der Entwicklung des ZNS das axonale Wachstum regulieren. Hierbei handelt es sich vor allem um Transkriptionsfaktoren wie z. B. c-Jun (Schmitt *et al.*, 1999; Chaisuksunt *et al.*, 2000), das während der Neurogenese eine wichtige Rolle spielt, aber im adulten ZNS normalerweise nicht mehr produziert wird. Weiterhin kommt es zur erneuten Synthese von Proteinen, denen eine Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion zugeordnet wird. Neben dem anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 (Chen *et al.*, 1997) und CAP-23 (Frey *et al.*, 2000), ist dies vor allem GAP-43 (Aigner *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Frey *et al.*, 2000) ein vermutliches Substrat der Proteinkinase C und ein konsistent auftretender Marker für sich entwickelnde bzw. regenerierende Neuronen (Kapfhammer, 1997).

Die Expression solcher Gene der Neurogenese führt in der verletzten Nervenzelle zur Ausbildung eines Wachstumskegels, gefolgt von einer Aussprossung und Verästelung der neugebildeten Fortsätze (Chaisuksunt *et al.*, 2000). Diese Ansätze zur Regeneration, die analogen Vorgängen im Peripheren Nervensystem in morphologischer Hinsicht ähneln, sind im ZNS jedoch transient. Die Länge der neugebildeten axonalen Fortsätze beträgt nur den Bruchteil eines Millimeters, bevor es nach wenigen Stunden zur Retraktion und dem Kollaps des Wachstumskegels kommt. In der Folge atrophiert das Axon, es kommt zur Nekrose des gesamten Neurons und zum Zusammenbruch aller regenerativen Prozesse (David und Aguayo, 1981).

Bereits Ramon y Cajal (1928) postulierte, daß neben physiologischen Barrieren, wie der Narbenbildung nach einer Läsion des Nervengewebes, die Gründe für die Unterdrückung der Regeneration vor allem in der Natur der Mikroumgebung des ZNS zu finden seien. Durch Transplantation von Gewebe aus dem Peripheren Nervensystem in den Cortex von Kaninchen konnte Ramon y Cajals Mitarbeiter Tello (1911) zeigen, daß zentralnervöse Neuronen in dieses einwachsen und entlang der enthaltenen Schwannschen Zellen über große Distanz hinweg auswachsen. Postmitotische Neuronen sind dementsprechend grundsätzlich zur Regeneration befähigt, werden jedoch im ZNS – nicht aber im PNS – aktiv daran gehindert.

Diese Befunde konnten Anfang der achtziger Jahre durch umfangreiche Transplantationsexperimente bestätigt werden (David und Aguayo, 1981; So und Aguayo, 1985).

Die Plastizität des ZNS höherer Vertebraten hängt in starkem Maße von dem Grad seiner Myelinisierung ab. Sie nimmt mit fortschreitender Myelogenese ab und bleibt dagegen bei deren Unterdrückung voll erhalten (Savio und Schwab, 1990). Die Präsenz von GAP-43 (s. o.) als Indikator für axonales Wachstum und damit für Plastizität im ZNS hängt in hohem Maße vom Vorhandensein des Myelins ab (Kapfhammer und Schwab, 1994a,b). Das ZNS-Myelin gewährleistet somit durch seine wachstumsinhibierende Wirkung die Stabilität des neuronalen Systems, verhindert jedoch damit gleichzeitig dessen Reparatur.

Träger der inhibitorischen Aktivität sind vor allem Oligodendrozyten (Schwab und Caroni, 1988), die das zentralnervöse Myelin bilden, wohingegen das Myelin im PNS durch Schwannsche Zellen aufgebaut wird. Der wachstumsinhibierende Effekt beruht auf dem direkten physischen Kontakt zwischen Neuron und Oligodendrozyt, der zunächst zu einem  $Ca^{2+}$ -Anstieg im Neuron führt, gefolgt vom Kollaps seines Wachstumskegels (Bandtlow *et al.*, 1990). Dies lässt sich im einfachsten Falle durch eine Wechselwirkung zwischen membranständigen Rezeptoren bzw. Liganden erklären, welche im regenerierenden Neuron eine Signalkaskade und damit die Degeneration auslösen. Tatsächlich kann bestimmten myelin-assoziierten Proteinen eine wachstumsinhibierende Wirkung zugewiesen werden. Neben dem Myelin-Assoziierten Glykoprotein (MAG, DeBellard *et al.*, 1996), Tenascin (Taylor *et al.*, 1993), Mitgliedern der Collapsin/Semaphorin-Familie (Kolodkin *et al.*, 1993) ist vor allem das neuronale Inhibitorprotein NI-220 – später als Nogo-A bezeichnet – hervorzuheben (Caroni und Schwab, 1988a; Spillmann *et al.*, 1998; Huber und Schwab, 2000).

### **1.3 Neutralisierung des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A (bzw. NI-220) durch den monoklonalen Antikörper IN-1**

Bei NI-220 handelt es sich um ein integrales Membranprotein von Oligodendrozyten aus der Myelinscheide des Rinderrückenmarks (Spillmann *et al.*, 1998), während NI-250 sein Homologes aus der Ratte bezeichnet (Chen *et al.*, 2000). Ausgehend von der molekularbiologischen Analyse und der Identifizierung der cDNA wurde die speziesunabhängige Bezeichnung Nogo-A für das neuronale Inhibitorprotein gewählt (Chen *et al.*, 2000). Die inhibitorische Wirkung von Nogo-A auf das Wachstum bzw. die Regeneration von zentralnervösen Neuronen ist ausführlich beschrieben (Caroni und Schwab, 1988a; Spillmann *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000). Die cDNA für Nogo-A der Ratte (Datenbank-Code: AJ242961) und die homologe Sequenz des Menschen wurden kloniert

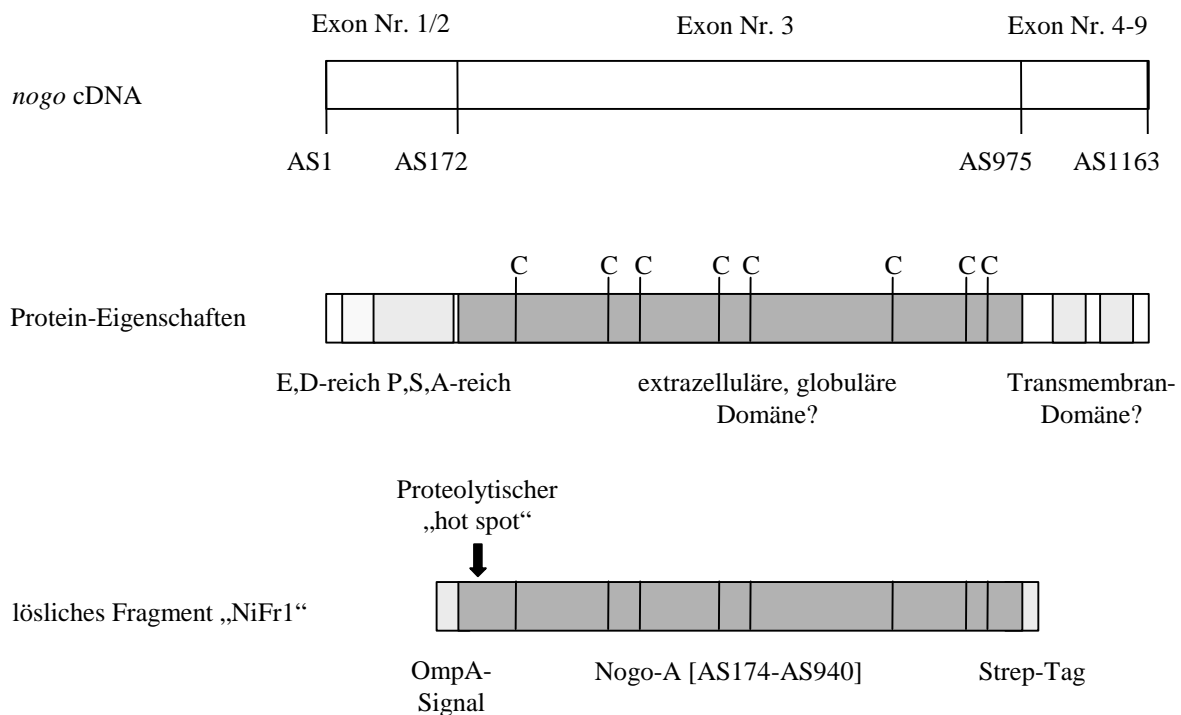
bzw. in Datenbanken identifiziert (Chen *et al.*, 2000; GrandPré *et al.*, 2000). Das *nogo*-Gen kodiert für drei unterschiedliche Proteine (Nogo-A, -B, -C), die durch alternatives Spleißen und/oder alternativen Transkriptionsstart entstehen. Dabei ist lediglich die Transkription von *nogo-A* auf das adulte ZNS beschränkt, während mRNA für *nogo-B* und *nogo-C* auch in anderen Geweben detektiert werden kann (Chen *et al.*, 2000).

Ausschließlich Nogo-A ist inhibitorisch aktiv und höchstwahrscheinlich auf der Innen- und Außenseite der Myelinscheide lokalisiert (Huber und Schwab, 2000). Die Primärsequenz von Nogo-A umfaßt 1.163 Aminosäuren, von denen 803 Reste, die durch das Exon Nr. 3 kodiert sind, in Nogo-B und -C nicht vorkommen. Der N-Terminus (172 Reste) zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen, während der C-Terminus (188 Reste) Ähnlichkeit zu Vertretern der Reticulon-Familie (RTN) aufweist (GrandPré *et al.*, 2000). Die auf der Primärsequenz von Nogo-A basierende Vorhersage ergab sieben potentielle N-, sowie mehrere O-Glykosylierungsstellen. Proteinchemische Analysen ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine tatsächliche Glycosylierung von Nogo-A (Spillmann *et al.*, 1998). Desweiteren konnten ein doppeltes Retentionsignal für das Endoplasmatische Retikulum, sowie zwei carboxyterminale Transmembrandomänen von je 35 und 36 Resten identifiziert werden. Eine aminoternale Signalsequenz, die die Sekretion vermittelt, konnte nicht lokalisiert werden (Chen *et al.*, 2000; Huber und Schwab, 2000).

Hinsichtlich der Topologie von Nogo-A in der Oligodendrozytenmembran gibt es zwei Modelle. Da postuliert worden ist, daß der extrazelluläre Bereich des neuronalen Inhibitorproteins gleichzeitig auch der Träger der inhibitorischen Aktivität ist, wird mit der Topologie von Nogo-A auch die Lokalisierung der Funktion im Protein zur Zeit kontrovers diskutiert (Tessier-Lavigne und Goodman, 2000). GrandPré *et al.* (2000) postulieren die integrale Verankerung des Proteins in einer Weise, durch die der Aminoternus und der gesamte von Exon Nr. 3 kodierte Bereich des Proteins im Cytosol lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu gehen Chen *et al.* (2000) von einer extrazellulären Lage des Aminoternus und der von Exon Nr. 3 kodierten Domäne aus, was von Prinjha *et al.* (2000) anhand funktioneller Analysen mit einem F<sub>c</sub>-Fusionsprotein bestätigt wurde. Allgemeine Strukturvorhersagen lassen für den von Exon Nr. 3 kodierten Proteinabschnitt eine globulär gefaltete Konformation erwarten (Horn, 1998). Das Vorhandensein von insgesamt acht Cysteinresten in diesem Abschnitt, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch Ausbildung von Disulfidbrücken zur stabilen Faltung der hypothetischen extrazellulären Domäne beitragen können, steht in Einklang mit dem zweiten Modell.

Die bakterielle Synthese eines löslichen Fragments (NiFr1) von Nogo-A, das hauptsächlich dem von Exon Nr. 3 kodierten Bereich entspricht und die Aminosäuren 174 bis 940 umfaßt, konnte etabliert werden (Horn, 1998). Dabei erfolgt die Sekretion von NiFr1 in das oxidierende Milieu des periplasmatischen Raums von *E. coli*, um die Ausbildung der bis zu

vier potentiellen Disulfidbrücken und damit die Faltung des Proteins zu gewährleisten. Die effiziente Reinigung wird über das *Strep*-Tag (Schmidt und Skerra, 1993) am Carboxyterminus des Proteins ermöglicht. Das Fragment NiFr1 zeigt jedoch bereits im Periplasma erhebliche Tendenz zu proteolytischem Abbau, wobei eine konservierte Spaltungsstelle zwischen Valin 59 und Serin 60 (bezogen auf den klonierten Leserahmen) nachgewiesen werden konnte (Abb. 3).



**Abb. 3:** Strukturelle Eigenschaften des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A und dessen rekombinanten Fragments NiFr1. Während Exon Nr. 1 und 2 des *nogo* Gens für einen Glu/Asp- bzw. Pro/Ser/Ala-reichen Abschnitt, der wahrscheinlich ungeordnet vorliegt, kodieren, sind durch die Exons Nr. 4 - 9 zwei vermutete Transmembran-Domänen kodiert. Das Genprodukt von Exon Nr. 3 zeigt Charakteristika einer extrazellulären, globulär gefalteten Domäne mit acht Cysteinresten (C), die Disulfidbrücken ausbilden könnten. Für die Herstellung des rekombinanten Nogo-A Fragments NiFr1 in *E. coli* wurden die Reste 174 - 940 des nativen Proteins ausgewählt und am N-Terminus mit der bakteriellen OmpA-Sequenz sowie am C-Terminus mit dem *Strep*-Tag fusioniert (Horn, 1998). Das erhaltene Fragment NiFr1 zeigt bei der Produktion in *E. coli* ausgeprägte proteolytische Degradation, wobei die Spaltung hauptsächlich zwischen den Resten Valin 59 und Serin 60 des prozessierten Proteins stattfindet.

Die Identifizierung von Nogo-A als prominenten Träger der inhibitorischen Aktivität des adulten zentralnervösen Myelins ermöglichte neue Strategien zu dessen funktioneller Neutralisation. Der monoklonale Antikörper IN-1 wurde durch Immunisierung von Mäusen mit angereichertem, inhibitorisch aktiven Myelinprotein der Ratte erhalten (Caroni und Schwab, 1988b). Er neutralisiert die nicht-permissive Eigenschaft von Myelin und ermöglicht

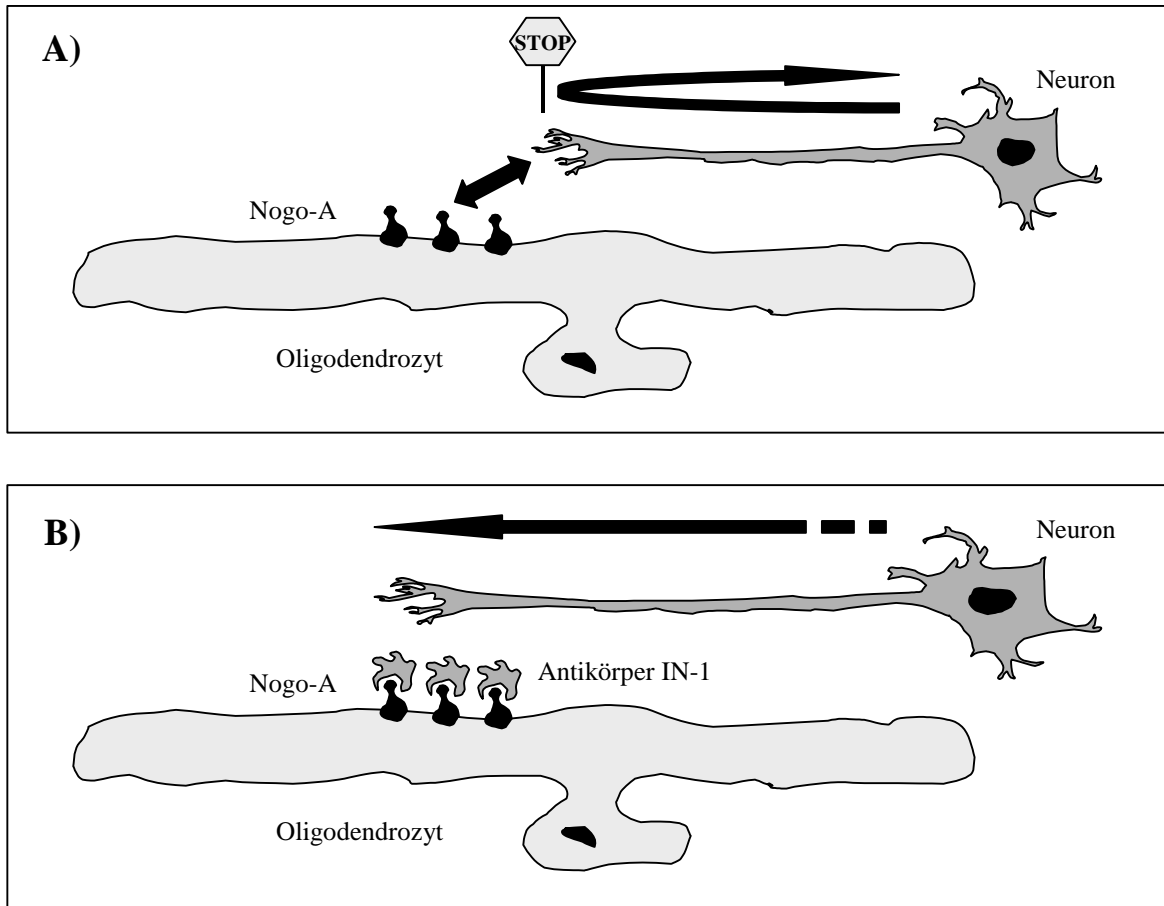
das Aussprossen von postmitotischen Neuronen *in vitro*. Die Applikation des Antikörpers IN-1 an Ratten mit partiell durchtrenntem Rückenmark führte zu einer Regeneration der verletzten Neuronen unter Umwachsen der Läsion (Schnell und Schwab, 1990). Neben der anatomischen Regeneration der Neuronen bewirkt die *In vivo*-Applikation von IN-1 an gelähmten Ratten auch eine Wiederherstellung der zuvor geschädigten motorischen Funktionen (Bregman *et al.*, 1995). Dabei wuchsen die regenerierenden Axone in Gegenwart des Myelins über mehrere Millimeter hinweg und bilden Verästelungen (Arborisierung) sowie terminale Verdickungen, die als präsynaptische Strukturen interpretiert wurden. Neben dem monoklonalen Antikörper IN-1 wurden zwei Antiseren gegen Nogo-A Fragmente entwickelt (AS Bruna und AS472), die in Zellkulturexperimenten ähnliche neutralisierende Effekte hinsichtlich der wachstumsinhibierenden Wirkung von Myelin haben (Chen *et al.*, 2000).

Der postulierte Mechanismus der Neutralisation beruht auf der sterischen Blockierung des Kontaktes zwischen dem Inhibitor auf der Myelinscheide und seinem vermuteten Rezeptor auf dem regenerierenden Axon (Abb. 4). Die spezifische Bindung von Nogo-A durch den Antikörper IN-1 konnte aufgrund der zu schwachen Affinität noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Daten aus *In vitro*-Experimenten deuten jedoch darauf hin, daß es sich bei Nogo-A um das Antigen von IN-1 handelt. Die inhibitorische Aktivität von gentechnisch hergestelltem Nogo-A aus CHO-Zellen wird in Zellkultur ebenso durch IN-1 neutralisiert wie die von angereichertem NI-220 aus Rinderrückenmark (Spillmann *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000).

Der monoklonale Antikörper IN-1 bringt in seiner Eigenschaft als Immunglobulin der Subklasse M jedoch Nachteile mit sich, die seine Handhabung erheblich erschweren. So geht die Reinigung aus dem Zellüberstand der zudem instabilen Hybridom-Zelllinie mit einem Verlust der Aktivität einher (Bandtlow *et al.*, 1996; Huber und Schwab, 2000). Für *In vivo*-Experimente zur Regeneration von Neuronen im Rückenmark mußte den Versuchstieren daher ein antikörpersezernierender Tumor intracerebral implantiert werden (Schnell und Schwab, 1990). Bei einer solchen Vorgehensweise kann eine definierte Dosis des Antikörpers bei Tieren derselben Versuchsreihe nicht gewährleistet werden. Zusätzlich muß – um eine Resorption des Tumors zu vermeiden – das Immunsystem der Versuchstiere stark reprimiert werden, was zur Beeinflussung der Regenerationsvorgänge führen kann.

Ein weiterer Nachteil von IN-1 ist seine wahrscheinlich eingeschränkte Fähigkeit zur Gewebepenetration (Bandtlow *et al.*, 1996). Um diesen Nachteilen des IgM/ $\kappa$  Antikörpers IN-1 zu begegnen und eine detaillierte Analyse seiner Bindungseigenschaften zu ermöglichen, wurden die Gene seiner variablen Domänen kloniert (Kabat-Datenbank: Kode 029919 für V<sub>L</sub>; Kode 029920 für V<sub>H</sub>) und damit die bakterielle Herstellung seines F<sub>ab</sub>-Fragments ermöglicht (Bandtlow *et al.*, 1996). Das rekombinante IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment kann mit hoher Ausbeute produziert und gereinigt, und unter definierten Puffer- und Konzentrationsbedingungen

eingesetzt werden. Es zeigt in Zellkulturexperimenten eine ähnliche Aktivität wie der IgM Antikörper, wenn auch erst bei höherer Konzentration (Bandtlow *et al.*, 1996).



**Abb. 4:** Postulierter Mechanismus der funktionellen Neutralisation von Nogo-A durch den monoklonalen Antikörper IN-1, der zur Regeneration von Neuronen im ZNS führt. **A)** Die Aussprossung von Neuronen wird durch in der Myelinscheide lokalisiertes Nogo-A unterbunden. **B)** Die Maskierung von Nogo-A durch den Antikörper IN-1 neutralisiert dessen inhibitorische Wirkung und führt zu der Ausbildung neuronaler Fortsätze.

Die Verpflanzung des Paratops vom oligomeren IgM Antikörper auf das monovalente  $F_{ab}$ -Fragment bringt naturgemäß den Verlust des Aviditätseffektes mit sich, der dem dekavalenten IgM-Molekül trotz schwacher intrinsischer Affinität eine effektive Bindung des Antigens erlaubt. Das IN-1  $F_{ab}$ -Fragment weist demgegenüber eine ungefähr zehnmal schwächere neutralisierende Wirkung auf (Bandtlow *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, daß der neutralisierende Mechanismus tatsächlich nur auf der Maskierung des IN-1 Antigens beruht und nicht auf z. B. Signaltransduktionseffekten durch *Clustering* oder der Rekrutierung von Faktoren des Immunsystems durch den  $F_c$ -Teil.

Die relativ niedrige Affinität des Antikörpers IN-1 zu seinem vermuteten Antigen Nogo-A beruht vermutlich auf einer nur schwachen Immunreaktion des ursprünglichen Versuchstieres

auf das stark konservierte Antigen (Bandtlow *et al.*, 1996). Immunglobuline der Klasse M sind Produkte der frühen Immunantwort, deren variable Domänen kaum der somatischen Hypermutation im Zuge der B-Zellreifung unterworfen sind. Die Sequenzanalyse der V<sub>L</sub>-Domäne (Bandtlow *et al.*, 1996) deutet darauf hin, daß diese durch ein unmodifiziertes Keimbahngen kodiert wird, welches bereits auch für andere monoklonale Antikörper der Maus identifiziert worden ist (Wang *et al.*, 1991). Die über die Artgrenzen hinweg stark konservierte Primärsequenz von Nogo-A (Huber und Schwab, 2000) und die damit verbundene Vermeidung einer Autoimmunreaktion durch das Versuchstier ist vermutlich der Grund, weshalb es bisher nicht gelungen ist, monoklonale Antikörper der späten Immunantwort nach Immunisierung mit Nogo-A zu erhalten (C. Bandtlow, pers. Mitteilung). Um hochaffine Antikörper gegen Nogo-A bzw. Mutanten des vorhandenen Antikörpers IN-1 mit verbesserter Bindung zu erhalten, erscheint es daher vielversprechend, alternative Methoden der Affinitätsmaturierung anzuwenden.

#### 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Neutralisation von Wachstumsinhibitoren durch den Einsatz des Antikörpers IN-1 oder seines rekombinanten F<sub>ab</sub>-Fragments bietet einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Regeneration von Neuronen nach Hirn- oder Rückenmarksverletzungen (Horner und Gage, 2000). Hierfür ist jedoch ein tieferes Verständnis der angenommenen Interaktion mit Nogo-A auf proteinchemischer Ebene die Voraussetzung. Als vornehmliches Ziel muß dabei die Verbesserung der Antigenaffinität gelten, um genauere immun- und proteinchemische Bindungsanalysen überhaupt erst zu gestatten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher eine Methodik zur Affinitätsmaturierung des rekombinanten Antikörperfragments von IN-1 entwickelt werden. Varianten mit erhöhter Affinität sollten charakterisiert und Bindungsstudien mit Nogo-A oder dessen rekombinanten Fragmenten durchgeführt werden. Hierbei wäre die Entwicklung neuartiger Detektionsmodule von Vorteil. Weiterhin war zu untersuchen, ob eine verbesserte Affinität für Nogo-A tatsächlich eine erhöhte biologische Wirkung mit sich bringt. Um ausreichende Mengen für die *In vitro*- und *In vivo*-Studien zur Verfügung stellen zu können, sollten zudem die Produktions- und Reinigungsverfahren optimiert werden. Schließlich soll die für eine mögliche therapeutische Anwendung notwendige Verträglichkeit im Patienten durch „Humanisierung“ des F<sub>ab</sub>-Fragments erreicht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Biologisches Material

##### Gewebeschnitte

Hirn	<i>Rattus norvegicus</i> , Kryosektionen, 10 $\mu$ m, transversal
Rückenmark	<i>Rattus norvegicus</i> , Kryosektionen, 12 $\mu$ m, transversal

##### Bakteriophagen

VCS-M13	Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg
---------	--

##### Escherichia coli K12-Stämme

CJ236i	<i>dut</i> , <i>ung</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> [F': <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15</i> , Tn10(Tet <sup>r</sup> )] (Fiedler und Skerra, 1999), von A. Skerra, TU München
JM83	<i>ara</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>rpsL</i> (= <i>strA</i> ), $\phi$ 80, <i>lacZ<math>\Delta</math>M15</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), von A. Skerra, TU München
XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\lambda^-$ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 [F': <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15</i> , Tn10(Tet <sup>r</sup> )] (Bullock <i>et al.</i> , 1987), von A. Skerra, TU München
W3110	F, (Bachmann, 1972), von A. Skerra, TU München

#### 2.1.2 Plasmide

pASK75	von A. Skerra, TU München
pASK85-IN1	(Bandtlow <i>et al.</i> , 1996), von A. Skerra, TU München
pASK88-IN1	(Fiedler, 1997; Broesamle <i>et al.</i> , 2000)
pASK100a	von A. Skerra, TU München
pASK111-NiFr1	(Horn, 1998), von A. Skerra, TU München
pASK102-HRS3	(Gresch, 1997), von A. Skerra, TU München
pASK105-D1.3	(König und Skerra, 1998), von A. Skerra, TU München
pASK109-HRS3	von A. Skerra, TU München



Übersicht: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide:

pASK75	<i>tet<sup>P/O</sup></i> , ompA-MCS-strep, <i>bla/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK75proAB	wie pASK75; mit <i>proBA(+)<sup>l</sup></i> vor <i>tet<sup>P/O</sup></i>
pASK75cat(-)	wie pASK75; mit <i>cat(-)</i> vor <i>tet<sup>P/O</sup></i> (Cm <sup>r</sup> )
pASK85	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -his <sub>6</sub> , phoA-V <sub>κ</sub> -C <sub>κ</sub>
pASK88	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H-hum</sub> C <sub>H1</sub> -his <sub>6</sub> , phoA-V <sub>κ-hum</sub> C <sub>κ</sub>
pASK88cat(-)	wie pASK75cat(-) mit ompA-V <sub>H-hu</sub> C <sub>H1</sub> -his <sub>6</sub> , phoA-V <sub>κ-hu</sub> C <sub>κ</sub>
pASK90	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H</sub> -strep, phoA-V <sub>κ</sub> -myc
pASK99	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -strep, phoA-V <sub>κ</sub> -C <sub>κ</sub>
pASK102	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -strep-Cys, phoA-V <sub>κ</sub> -C <sub>κ</sub>
pASK105	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -his <sub>6</sub> , phoA-V <sub>κ</sub> -C <sub>κ</sub> -ABD
pASK106	wie pASK75; cat mit ompA-V <sub>H-hu</sub> C <sub>H1</sub> -his <sub>6</sub> , phoA-V <sub>κ-hu</sub> C <sub>κ</sub> -ABD
pASK107	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H-hum</sub> C <sub>H1</sub> -strep, phoA-V <sub>κ-hum</sub> C <sub>κ</sub>
pASK109	wie pASK75; mit ompA-V <sub>H-hum</sub> C <sub>H1</sub> (C <sub>244</sub> →S)-strep, phoA-V <sub>κ-hum</sub> C <sub>κ</sub>
pASK111	<i>tet<sup>P/O</sup></i> , ompA-MCS-strep, <i>cam/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK116	wie pASK111; mit ompA-V <sub>H-hum</sub> C <sub>H1</sub> -strep, phoA-V <sub>κ-hum</sub> C <sub>κ</sub>
pMF1	wie pASK75; mit <i>cat(-)</i> vor <i>tet<sup>P/O</sup></i> (Cm <sup>r</sup> ), <i>tetR</i> unter direkter Kontrolle von <i>bla<sup>P</sup></i> , <i>proBA(-)</i> vor <i>bla<sup>P</sup></i>
pMF88	wie pMF1; mit ompA-V <sub>H-hu</sub> C <sub>H1</sub> -his <sub>6</sub> , phoA-V <sub>κ-hu</sub> C <sub>κ</sub>

<sup>l</sup> (+): Orientierung im Uhrzeigersinn; (-): Orientierung entgegen dem Uhrzeigersinn (vgl. Abb. 7)

**2.1.3 Oligodesoxynukleotide**Sequenzierungsprimer:

D12:	5' -AAC TGC TCA TCA GAT GGC
F55:	5' -CAC TGG CAC TCT TAC CG
MFck:	5' -CTT CTA TCC CAG AGA GGC
PR1:	5' -CGC AGT AGC GGT AAA CG
PR3:	5' -TGG GTG AGC TCG ATG TC
pro1:	5' -GCG ATC TTG ACG ATG CCA

Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR:

MF-1:	5' -CTG ATA CCA ATT TAA GAA ACC GTA AAT ATT CTC
MF-2:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT TAA CGG AGT ACT TAA CAC A
MF-3:	5' -TCT CCA TGG TTA TTA TTT TTC GAA CTG CGG
MF-4:	5' -CAC AGG TCA AGC TTA TTA GCA AGG CGG GCA CTC TCC GCG GTT GAA G
MF-5:	5' -CTG ATA CCA ATT TAA GTA ACC GTA AAT ATT CTC
MF-6:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT GAA AGG GGT ACT TAA CAC ATT
MF-7:	5' -CTG ATA CCA ATT TAA MNN ACC GTA AAT ATT CTC
MF-8:	5' -CCG AGG AGT ACT TAA MNN ATT TTG ACA GTA ATA CG
MF-9:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT MNN AGG AGT ACT TAA CAC A
MF-10:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT AGC CGG CAC CCG TAA CAC A
MF-11:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT TAA CGG CAC CCG TAA CAC A
MF-12:	5' -GAA CGT ACA AGG CAC ACT TAA CAC ATT TTG ACA G
MF-13:	5' -GAA CGT ACA AGG CAC GTT TAA CAC ATT TTG ACA G
MF-14:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT AAC CGG CAC CCG TAA CAC A
MF-15:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT GAT CGG CAC CCG TAA CAC A
MF-16:	5' -CCC AGC TCC GAA CGT CAT CGG CAC CCG TAA CAC A
MF-II6VL3/1:	5' -GCG CTT CAG CTC GAG CTT GGT CCC AGC TCC GAA CGT AAC CGG CAC CCG MNN MNN ATT TTG ACA GTA ATA CGT TGC
MF-bla1:	5' -CTT CCT GTT GCT AGC CAC CCA GAA ACG CTG G
MF-bla2:	5' -CGA GAC ATC AAA GCT TCC TAC CAA TGC TTA ATC
MF-bla3:	5' -GCT GGT GGC GGT CAC CCA GAA ACG CTG p(S)G
MF-bla4:	5' -CT CCA ATG CTT AAT CAG Tp(S)G
MF-blaMUT1:	5' -CTT CAG CAT CTT TTA CTG CAG CCA GCG TTT CTG GGT GGC
MF-blaMUT2:	5' -CTT CAG CAT CTT TTA CTT TAC CCA GCG TCC CAC CGC CGC TAG CTG GAC ACT CTC C
MF-blaMUT3:	5' -CTT CAG CAT CTT TTA CTT TAG GCA GCG TCC CAC CGC CGC TAG CTG GAC ACT CTC C
MF-blaStrep:	5' -GCG GGT GAG ACC AAG CGC TCC AAT GCT TAA TCA GTG
MF-BstBI:	5' -TTC CCC GAA AAG TGC CAT TCG AAA TTG GCG TTA A
MF-DELbla2:	5' -CTA AAC GAG ACA TCA TTA ATT CCT AAC GGA AAT GTT GAA TAC TCA TAC TC

MF-L3/1: 5' -GCG CTT CAG CTC GAG CTT GGT CCC AGC TCC GAA  
CGT MNN AGG MNN MNN TAA CACATT TTG ACA GTA

MF-NiFr: 5' -GGT ATC CAT GTT CTT TAA AAG AGG CCT GCG CTA  
CGG TAG C

MF-NheI: 5' -TTC ACA GGT CAA GCT TAT TAG CTA GCT GGA CAC  
TCT CCG CGG TT

MF-proA: 5' -CTA AAC GAG ACA TCA TTA ATT CCT ACG CAC GAA  
TGG TGT AAT C

MF-VHx: 5' -GAA GTT AAG CTG CAG GAA CAA AGC GGG GCA GAA  
GTA AAA AAA CCT GGA GCA AGC GT

MF-VHy: 5' -GCT GCT AAC GGT GAC CAG CGT GCC TTG ACC CCA  
AAC GTC GAA GTA CCA GTA GCT CGA ACC GTA GTA  
GAA ACG TGC

MF-VHa: 5' -AAA AAA ACC TGG AGC AAG CGT AAA AGT AAG CTG  
CAA AGC GAG CGG ATA CAC CTT CAC TAA CTA CTG  
GTT AGG ATG GGT CCG CC

MF-VHb: 5' -GTA GTT GGT GTA ACC GCC CCC AGG GTA AAT GTC  
GCC CAT CCA TTC GAG GCG TTG CCC TGG TGC TTG  
GCG GAC CCA TCC TAA CC

MF-VHc: 5' -GGG GGC GGT TAC ACC AAC TAC AAC GAA AAA TTC  
AAA GGT CGC GTA ACC TTC ACC GCA GAC ACT TCG  
GCA ACC ACT GCT TAC A

MF-VHd: 5' -CGA ACC GTA GTA GAA ACG TGC ACA GTA GTA AAC  
AGC AGT GTC TTC CGG ACG GAG CGA TGA GAG GCC  
CAT GTA AGC AGT GGT TGC CG

MF-Vkx: 5' -GAC ATC GAG CTC ACC CAA AGC CCA AGC TCA CTC  
TCT GCA TCG GTC GGG GAT CGT GTT A

MF-Vky: 5' -TTT GAT CTC GAG TTT GAT CTC TAC CTT AGT GCC  
ACC TCC GAA AGT TAC AGG TAC GCG GTT GAT G

MF-Vka: 5' -CGG TCG GGG ATC GTG TTA ACA TCG CAT GTG GTG  
CTT CTG AAA ACA TTT ACG GTG CTC TCA ACT GGT  
ATC AGC AAA AAC C

MF-Vkb: 5' -CAG CGA GGT TCG TGG CGC CGT AGA TCA GTA AGC  
GAG GAG CCT TGC CAG GTT TTT GCT GAT ACC AGT  
TGA

MF-Vkc: 5' -ACG GCG CCA CGA ACC TCG CTG ATG GTG TAC CTT  
CTC GTT TCT CAG GCA GCG GTT CCG GTC GCG ATT  
ACA CTC TCA CCA TCA GCT CCC

MF-V<sub>kd</sub>: 5' -ACA GGT ACG CGG TTG ATG TTT TGG CAA TAG TAG  
ATA GCG AAG TCT TCC GGC TGC AGG GAG CTG ATG  
GTG AGA G

NiHis6(Kunkel): 5' -CAC TTC ACA GGT CAA GCT TAT TAA TGG TGA TGG  
TGA TGG TGA GCG CTT TTA ACT ATG CTG CCC

ProB1: 5' -GCA ACC GAC GAC AGT CCT Gp(S)C

ProB2: 5' -CCA ATA AAA AAC GCC CGG CGG CAA CCG AGC GTT  
AAC TTA ACG GGT AAT CAT GTC ATC ACp(S)G

ProB2x 5' -CCA TTA ACG GGT AAT CAT GTC ATC ACG

ProA3: 5' -CCA TGT TCA CGA ACG TGA ATC ACG C

VkC2: 5' -GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG  
KCT GC

#### 2.1.4 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Digoxigenin F <sub>ab</sub> Alkalische Phosphatase Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Human C <sub>κ</sub> -Antikörper Alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-Kaninchen Serum aus Schwein Alkalische Phosphatase Konjugat	Dako GmbH, Hamburg
Anti-TetR Serum aus Kaninchen	Mobitech, Göttingen
Benzonase®	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Humanes Serum Albumin (HSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ni-NTA Alkalische Phosphatase Konjugat	Qiagen GmbH, Hilden
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagen, Amsterdam, Niederlande
Proteinase K	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Shrimp Alkalische Phosphatase	USB, Cleveland, Ohio, USA
Streptavidin Alkalische Phosphatase Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase (3 Units/ $\mu$ l)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

### 2.1.5 Chemikalien

Acetonitril	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff-Gele (Sequagel Concentrate & Diluent)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na <sub>2</sub> -Salz (ATP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agarose (low melting point), electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ammoniak	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
Ammoniumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt

Ammoniummolybdat Tetrahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetracyclin (aTc)	Acros Organics direct, Geel, Belgien
Antifoam A-Stammlösung	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
D-Biotinoyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Betain-Monohydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Borsäure	E. Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) > 99 %, DNase-, RNase-frei	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]dATP, 37-55 TBq/mmol	NEN Life Science Products, Belgien
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dichlordimethylsilan (2 % v/v in 1,1,1-Trichlorethan)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	Biacore, Uppsala, Schweden

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz Biacore, Uppsala, Schweden
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dioxan	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure (p.a., technisch)	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Ethanol (p.a., technisch)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt Biacore, Uppsala, Schweden
Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Fluorescein-5-maleimid	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
D(+)-Glucose Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Pufferan <sup>®</sup> für die Gewebezucht (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol (spektroskopisch indifferent bei 280 nm)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol (p.a., technisch)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin A Monosulfat (Kan)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kobaltchlorid Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kupferchlorid Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid Tetrahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	E. Merck KGaA, Darmstadt
$\gamma$ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan (Silan A 174)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mineralöl (Heavy White Oil; für die PCR)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Nickelsulfat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Nitrocephin	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Amresco, Solon, Ohio, USA
P-20 Detergenz	Biacore, Uppsala, Schweden
Phenol, $\geq 99$ %, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Dr. Th. Schuchardt & Co., Hohenbrunn



Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trinatrium-Citrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Ultra Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Xylencyanol FF	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

### 2.1.6 Standards und Kits

#### DNA-Größenstandards:

$\lambda$ /BstEII-Verdau	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
$\phi$ X174 RF/HaeIII-Verdau	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

#### Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard, „ <i>Low Range</i> ”	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
„ <i>Prestained</i> ” SDS-PAGE Standard, “ <i>Low Range</i> ”	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

#### Kits zur DNA-Isolierung:

JETsorb Gel Extraction Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
QIAprep Plasmid Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit      Qiagen GmbH, Hilden

Kits zur DNA-Sequenzierung:

ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator  
CycleSequencing Ready  
Reaction Kit      Perkin Elmer, Applied Biosystems  
Weiterstadt

T7-Sequencing<sup>™</sup> Kit      Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, Freiburg

sonstige Kits:

„Fast Red“ (PhoA-Substrat)      Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 2.1.7 Geräte

ABI-Prism<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer      Perkin Elmer, Applied Biosystems,  
Weiterstadt

Autoklaven:

Varioklav<sup>®</sup> Typ 500      H & P Labortechnik GmbH,  
Oberschleißheim

Sanoclav Typ LaS-201      Wolf, Geislingen

BIACORE X und BIACORE 2000      Biacore, Uppsala, Schweden

Bio-Mag 10 Magnetrührer      BCC Spezialgeräte, Göttingen

Brutschränke:

B 5060 EK CO<sub>2</sub>      Heraeus Christ GmbH, Osterode

BM800      Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Pelion      Bayer, Frankfurt/Main

Drehtisch zum Ausplattieren      Gesellschaft für Laborbedarf mbH,  
Würzburg

Durchflußdetektoren:

UV/VIS Filter Photometer      Knauer, Berlin

Variable Wavelength Monitor      Knauer, Berlin

2138 Uvicord S      LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

ELISA-Photometer SpectraMax 250	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Elektroblot-Apparatur	Eigenbau
Elektrophoresekammern	Eigenbau
Färbetrog für Objektträger	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Fraktionssammler:	
Redi Frac	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Ultrorac 7000	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Geltrockner:	
2003 Slab Gel Dryer	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
Glasspritze 50 µl	Hamilton Company, Reno, USA
Heizrührer:	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RET	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
HPLC:	
Dynamax® SD-300 (Pumpe) mit Dynamax® UV-1 (Detektor)	Rainin, Woburn, MA, USA
MALDI-TOF-Massenspektro- meter Biflex III	Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten
Metallblockthermostate:	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Netzgeräte:	
TN 300-120	Heinzinger, West Germany
Power Pack P25	Biometra, Göttingen

Power Pack P30	Biometra, Göttingen
LKB 2197 Power Supply 500/500	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing Renner GmbH, Dannstadt
PCR-Gerät UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Peristaltische Pumpen:	
Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
pH-Meter:	
E512	Metrohm, Herisau
pH 526 und pH 531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin
Pipettierhilfen:	
Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
accu-jet®	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipetten:	
Gilson P10, P20, P100, P200 P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Multipette 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Polaroid-Kamera MP4	Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA
Rollenmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen
Schreiber:	
REC 112	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
SE 120	ABB Goerz AG, Wien, Österreich
2210	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Knauer	Knauer, Berlin
Schüttelgeräte:	
Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen

Typ 3012 und Typ 3017	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttelinkubatoren:	
Modell G25	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA
Modell TR-125/ITE-K	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Speed-Vac-Konzentrator Univapo UVC 150H	UniEquip, Martinsried
Tischfermentersystem:	
C Flow Durchfluß-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO <sub>2</sub> Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
5 u. 10 L-Fermenter mit Umwurfzylinder	Schütt Labortechnik, Göttingen
O <sub>2</sub> -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Meßtechnik, Steinbach
UV/VIS-Spektralphotometer:	
Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV/VIS-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpen:	
Drehschieberpumpe RD4	Vacubrand GmbH & Co, Wertheim
Drehschieberpumpe RD15	Vacubrand GmbH & Co, Wertheim
Membranpumpe MZ2C	Vacubrand GmbH & Co, Wertheim
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waagen:	
Micro m3p	Sartorius GmbH, Göttingen

PAG Oerlikon PJ Precisa junior  
2000 C W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt

PAG Oerlikon Precisa 125 A W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt

R160P-\*D1 Sartorius GmbH, Göttingen

U5000D Sartorius GmbH, Göttingen

#### Wasserbäder:

Haake F6/C25 Thermo Haake, Karlsruhe

Julabo PC/8A Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Julabo UC/5B Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Thermomix 1460 Braun Melsungen AG, Melsungen

#### Zentrifugen:

Biofuge A Heraeus Christ GmbH, Osterode

J-21C und J2-21 mit Rotoren  
JA-10 und JA-20 Beckman Instruments, München

Labofuge 6000 Heraeus Christ GmbH, Osterode

Sigma 4K10 Sigma GmbH, Osterode

Sorvall RC 3B Plus mit Rotor  
H-6000A/HBB-6 Kendro Laboratory Products GmbH,  
München

Sorvall RC 5B und RC 5C Plus  
mit Rotoren SS-34  
und SLA-3000 Kendro Laboratory Products GmbH,  
München

Sorvall RMC 14 Sorvall Instruments, Bad Nauheim

Eppendorf 5415 C Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

### 2.1.8 Verbrauchsmaterial

Chromatographie-Säulen Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

#### Dialyseschläuche:

Spectra/Por<sup>®</sup>, MWCO: 6-8 kDa Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Typ 27, MWCO: 12-16 kDa Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg

Dispenser-Tips 2,5 und 5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen Dispomed Witt oHG, Gelnhausen Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Falcon Micro Test III Flexible Assay-Plates	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
Glasplatten für die SDS-PAGE	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konzentratoren:	
Makrosep™ 30K	Pall GmbH, Dreieich
Mikrosep™ 30K	Pall GmbH, Dreieich
Vivaspin 4, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 15, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Kunststoffröhrchen:	
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
PP-Röhrchen, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Membranfilter:	
Immobilon™-P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrozellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
PD-10-Gelfiltrationssäulen	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Petrischalen, Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

## Pipetten-Spitzen:

blau (200-1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

## Polaroidfilm 667

Polaroid Deutschland, Offenbach

## Röntgenfilm X-OMAT DS

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

## Reaktionsgefäße

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)

Schwan-Stabilo<sup>®</sup>-Klarsichtfolie aus PP

Müller &amp; Nemecek GmbH, Frankfurt/Main

## Säulenmaterialien:

Fraktogel EMD TA 650 S	E. Merck KGaA, Darmstadt
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
CH Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
POROS MC/M	PerSeptive Biosystems GmbH, Wiesbaden
Streptavidin-Sepharose	eigene Herstellung

Sensor-*Chips* (CM5, SA, NTA)

Biacore, Uppsala, Schweden

## Sterilfilter:

Filtropur (0,45 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex <sup>®</sup> HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn

## Whatman-Filterpapier 3MM

Bender &amp; Hobein AG, München

## Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren

Nalgene Company, New York, USA

JA-10 und JA-20, sowie Sorvall-  
Rotoren SS-34 und SLA-3000



### 2.1.9 Puffer, Medien und Stammlösungen

Alle Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden entweder im Autoklaven oder durch Filtration sterilisiert. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem bzw. Milli-Q<sup>50</sup>-gereinigtem Wasser hergestellt. Nährmedien für Bakterienkulturen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt. Kulturplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt und Lösungen, sofern nicht anders angegeben, wurden bei Raumtemperatur gelagert.

#### Antibiotika- und Induktorlösungen:

Folgende Antibiotika-Stammlösungen wurden verwendet (Lagerung bei -20 °C, wäßrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 µm Filter):

Ampicillin (Amp):	100,0 mg/ml in H <sub>2</sub> O, 1 : 1.000 zum Medium
Anhydrotetracyclin (aTc):	2,0 mg/ml in DMF
	5,0 mg/ml in DMF
Chloramphenicol (Cam)	70,0 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol p. a., 1 : 1.000 zum Medium
Kanamycin (Kan)	35,0 mg/ml in H <sub>2</sub> O, 1 : 500 zum Medium

#### Glucose-Minimalmedium:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0 g/l
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g/l
Bacto Agar	15,0 g/l (nur für Kulturplatten)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren und anschließend Zugabe folgender steriler Lösungen:

1 M MgSO <sub>4</sub>	2,0 ml/l
1 M CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml/l
20 % (w/v) Glucose	10,0 ml/l
10 mg/ml Thiamin • HCl	1,0 ml/l

LB Medium:

Bacto Trypton	10,0 g/l
Bacto Yeast Extract	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Bacto Agar	15,0 g/l (nur für Kulturplatten)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren

Lösungen für die Fermentation:Mineralsalzlösung:

31 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	5,51 g/l
19 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,58 g/l
25 mM NH <sub>4</sub> Cl	1,33 g/l
5 mM Na <sub>3</sub> -Citrat • 2 H <sub>2</sub> O	0,47 g/l

Die Mineralsalzlösung weist bereits pH 7,0 auf und wird getrennt von den folgenden Komponenten sterilisiert. Der pH-Wert beträgt anschließend ca. 6,9.

<u>Glucose-Lösungen:</u>	20 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)
	50 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)

<u>MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung:</u>	1 M MgSO <sub>4</sub> (separat autoklavieren)
--------------------------------------	---

<u>Thiamin-Hydrochlorid-Stammlsg:</u>	10,0 mg/ml Thiamin • HCl (sterilfiltriert)
---------------------------------------	--

<u>FeCl<sub>3</sub>-Stammlösung:</u>	35,0 g/l, FeCl <sub>3</sub> • 6 H <sub>2</sub> O (mit HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert, sterilfiltriert)
--------------------------------------	--

<u>Zn(OAc)<sub>2</sub>-Stammlösung:</u>	8,0 g/l, Zn(OAc) <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert)
---	--

Spurenelement-Stammlösung, sterilfiltriert:

MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	3,0 g/l
CuCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,3 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,6 g/l
CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	1,2 g/l
EDTA	4 mM

Weitere Lösungen:

12,5 % (w/v) NH<sub>3</sub> zur pH-Wert-Regulierung und als Stickstoffquelle

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:TAE-Puffer:

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	89 mM
EDTA	2 mM

10x Auftragspuffer für Agarosegele:

Bromphenolblau	1,0 mg/ml
Xylencyanol	1,0 mg/ml
Glycerin	50 % (v/v)

Puffer für SDS-PAGE:Aufbewahrungslösung:

Essigsäure	7 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)

5x Auftragspuffer:

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
SDS	7,5 % (w/v)
Glycerin	25 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
β-Mercaptoethanol	12,5 % (v/v) (nur bei reduzierendem Auftragspuffer)

Entfärbelösung:

Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)

Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blau R-250	0,25 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)

Fling & Gregerson Laufpuffer (pH 8,8):

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1,0 g/l

4x Lower Tris:

Tris/HCl pH 8,85	3 M
SDS	4,0 g/l

4x Upper Tris:

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	4,0 g/l

Lösungen für die Phenol/Chloroform Extraktion:Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24 : 1

Phenol (mit Wasser gesättigt):

Kristallines Phenol  $\geq 99$  % (redestilliert) wird bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit 1/2 Volumen Wasser gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform:

Mit Wasser gesättigtes Phenol (s.o.) wird im Verhältnis 1 : 1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und bei 4 °C aufbewahrt.

sonstige Lösungen:Benzonase-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

PBS (pH 7,4):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 mM
NaCl	115 mM

RNase-Lösung:

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	15 mM
RNase A	10,0 mg/ml

Zur Inaktivierung von DNase 20 min im siedenden Wasser erhitzen und bei -20 °C aufbewahren.

TE-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*-Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf einer Petrischale mit Agar-Medium und Inkubation im Brutschrank über Nacht bei 37 °C erhalten. Bei plasmidtragenden *E. coli*-Stämmen wurde ein mit einem geeigneten Antibiotikum versetztes LB-Selektivmedium verwendet. Die bebrüteten Agar-Platten wurden zur Konservierung bei 4 °C gelagert und waren für mehrere Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendbar.

Flüssigkulturen wurden in der Regel mit LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Antibiotikums angesetzt. Verwendete Volumina waren 4 ml im 13 ml Plastik-Kulturröhrchen sowie 50 ml und 2.000 ml im 100 ml- bzw. 5.000 ml-Erlenmeyerkolben, jeweils mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie. Die kleineren Kulturen (4 und 50 ml) wurden direkt mit jeweils einer Kolonie von der Agar-Platte, die größeren Kulturen mit einer stationären Übernachtskultur im Verhältnis 1 : 50 angeimpft.

Vorkulturen für die Proteinproduktion wurden bei 30 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht inkubiert. Bei den 2 L-Kulturen fand die Inkubation bei 22 °C ebenfalls unter Schütteln bei 200 rpm statt. Zelldichten wurden durch Messung der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD<sub>550</sub>) mit einem Spektral-Photometer (Ultrospec 2.000) bestimmt.

Die *E. coli*-Stämme wurden als Glycerinkulturen dauerhaft konserviert, indem 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur mit 1,5 ml 85 % (v/v) Glycerin (steril) gemischt und bei -20 °C aufbewahrt wurden.

## 2.2.2 Isolierung von DNA aus *E. coli*

### 2.2.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus *E. coli* (Schmidt, 1994) wurden 1,5 ml einer stationären Übernacht-Kultur sedimentiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 2 min, 14.000 rpm). Das Medium wurde sorgfältig entfernt, die Zellen in 567 µl TE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 30 µl 10 % (w/v) SDS, 2 µl RNase (10 mg/ml) und 3 µl Proteinase K (20 µg/ml) durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und dann mit 100 µl 5 M NaCl sowie anschließend mit 80 µl 0.7 M NaCl, 10 % (w/v) CTAB versetzt. Nach jeder Zugabe wurde gemischt (Vortex) und der Ansatz schließlich für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Zur Abtrennung der Proteine wurde zunächst mit 1 ml Phenol/Chloroform und danach mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol unter kräftigem Mischen (Vortex) extrahiert. Die obere wässrige Phase, die die chromosomale DNA enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol (p. a.) versetzt. Nach Inkubation für 90 min bei -20 °C wurde zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 10 min, 14.000 rpm), das Präzipitat mit 500 µl eiskaltem 70 % (v/v) EtOH gewaschen und in der Speed-Vac getrocknet. Die präzipitierte chromosomale DNA wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmid-Isolierungskits der Firmen Qiagen oder Genomed verwendet. Diese beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim und Doly, 1979), gefolgt von der Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA bei niedriger Ionenstärke.

Für die Analyse von Transformanten nach der Neukonstruktion von Plasmiden sowie Umklonierungen erfolgte die Isolierung im Mini-Maßstab. Dazu wurde eine stationäre 4 ml Übernachtskultur verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet. Die Plasmid-DNA wurde im letzten Schritt in 75 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Die Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA betrug bei diesem Präparationsverfahren 5 - 10 µg DNA. Diese konnte direkt zur Hydrolyse mit Restriktionsenzymen im analytischen Maßstab eingesetzt werden. Für die Verwendung in einem präparativen Restriktionsverdau wurde die isolierte Plasmid-DNA zunächst einer Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-fällung unterzogen, um eventuell kontaminierende Exonukleasen zu entfernen.

### 2.2.2.3 Isolierung von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Für die ortsgerichtete Mutagenese (Kap. 2.2.7.4) wurde zirkuläre einzelsträngige Plasmid-DNA benötigt. Die entsprechenden Plasmide trugen den Replikationsursprung (intergenische Region) des Phagen  $\phi$ 1. Die Präparation erfolgte ausgehend von transformierten *E. coli* CJ236i-Zellen nach der Methode von Geisselsoder *et al.*, (1987). Dem ursprünglichen Stamm CJ236 (Geisselsoder *et al.*, 1987) war das zur Infizierbarkeit durch filamentöse Bakteriophagen des Typs M13 notwendige F'-Plasmid durch Konjugation mit dem Stamm XL1-Blue übertragen worden (Fiedler und Skerra, 1999). Nach Infektion transformierter CJ236i-Zellen mit dem Helferphagen VCS-M13 wurde die entsprechende Plasmid-DNA daher in einzelsträngiger Form als Phagemid verpackt und sezerniert. CJ236i weist zudem die chromosomalen Mutationen *dut* und *ung* auf, die einen partiellen Einbau von Desoxyuracil anstelle von Desoxythymidin bewirken und somit einen Selektionsmechanismus gegen den parentalen Strang liefert.

20 ml LB-Medium mit einem Antibiotikum gegen welches das zu präparierende Plasmid eine Resistenz verlieh wurden im Verhältnis 1 : 100 mit einer stationären Übernacht-Kultur von entsprechend transformierte CJ236i-Zellen angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer Zelldichte von ca.  $OD_{550} = 0,26$  (entsprechend ca.  $1,6 \times 10^8$  Zellen pro ml) inkubiert. Dann wurde 1 ml der Bakterienkultur abgenommen, in ein 13 ml Kulturröhrchen überführt und die Zellen durch Zugabe von 16  $\mu$ l VCS-M13 Helferphagen ( $10^{11}$  pfu/ml) infiziert. Nach einer weiteren Inkubation für 1 h bei 37 ° und 220 rpm wurde die infizierte Kultur in 20 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum aufgenommen. Durch zusätzliche Zugabe von Kanamycin wurde auf infizierte Zellen selektiert. Die Kultur wurde dann über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Die in das Medium sezernierten Phagemide wurden von den Zellen durch Zentrifugation getrennt (SS34-Rotor, 4 °C, 10 min, 10.000 rpm), mit 10  $\mu$ l RNaseA (10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagemidpartikel wurden dann durch Zugabe von 1/4 Volumen 3,5 M  $NH_4Ac$ , 20 % PEG 8.000 und Inkubation auf Eis für 30 min gefällt und anschließend durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 4 °C, 15 min, 12.000 rpm) präzipitiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, das Präzipitat in 200  $\mu$ l Hochsalzpuffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Ungelöste Bestandteile wurden in einer weiteren Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 2 min, 14.000 rpm) abgetrennt und der Überstand mit den darin enthaltenen Phagemiden abgenommen.

Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde je zweimal mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die jeweils erhaltenen organischen Phasen wurden zur Erhöhung der Ausbeute mit 100  $\mu$ l TE-Puffer zurückextrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zur Fällung der DNA mit 1/10 Volumen 7,8 M  $NH_4Ac$  und 2,5



Volumen eiskaltem Ethanol p. a. versetzt und bei -20 °C für mindestens 2 h inkubiert. Nach Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 4 °C, 30 min, 14.000 rpm) wurde das Präzipitat mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol p. a. gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Reinheit der erhaltenen einzelsträngigen Plasmid-DNA sowie die Ausbeute (ca. 10 µg) wurden durch analytische Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt und die DNA-Lösung schließlich bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Aufnahme von Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen in eine transformationskompetente Form überführt. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Cohen *et al.*, 1972, Sambrook *et al.*, 1989) vorgegangen, die typischerweise 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> Transformanden pro µg Plasmid-DNA liefert.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

50 ml LB-Medium werden mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes im Verhältnis 1 : 100 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>550</sub> = 0,5 bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert.

Die Kultur wird in ein 50 ml Sarstedt-Röhrchen überführt, zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge Sigma 4K10, 4 °C, 10 min, 4.000 rpm) und das Zellsediment nach sorgfältiger Trennung vom Medium in 40 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> (auf 4 °C vorgekühlt) resuspendiert.

Die Zellen werden erneut zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge Sigma 4K10, 4 °C, 10 min, 4.000 rpm), in 20 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> (auf 4 °C vorgekühlt) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert.

Anschließend werden die Zellen sedimentiert (Tischkühlzentrifuge Sigma 4K10, 4 °C, 10 min, 4.000 rpm) und in 2 ml CaCl<sub>2</sub>/Glycerin-Lösung (50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Die Zellsuspension wird in Aliquots von 200 µl auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation werden 200 µl der frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten Zellsuspension mit 5 µl der DNA-Lösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Nach Inkubation von 5 min bei 37 °C wird die gesamte Suspension in ein mit 2 ml LB-Medium gefülltes 13 ml Kulturröhrchen überführt und für 45 min bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert.

100 µl der Zellsuspension werden auf einer mit Antibiotikum versetzten LB-Agar-Kulturplatte ausgestrichen. Die übrige Kultur wird kurz abzentrifugiert (Tischkühlzentrifuge Sigma 4K10, 4 °C, 2 min, 4.000 rpm), das Medium abgezogen, die Zellen im verbleibenden

Flüssigkeitsrest resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Beide Platten werden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA**

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Dieses Verfahren wurde im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden und im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt.

Zur Auftrennung von Oligodesoxynukleotiden zum Zweck der Reinigung bzw. von DNA-Fragmenten bei der DNA-Sequenzierung wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

##### **2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese**

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurden im allgemeinen Gele mit 1 % (w/v) Agarose verwendet. Dazu wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer suspendiert und erhitzt. Die unter Sieden entstandene klare Lösung wurde zum Abkühlen stehengelassen. Zu der noch handwarmen Lösung wurde 1/10.000 Volumen 1 % (w/v), also 5 µl Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Die Flüssigkeit wurde zum Durchmischen kurz geschwenkt und sofort in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformern gegossen. Die Abmessungen des Gels betragen 10,5 cm in der Länge, 7,5 cm in der Breite und 0,5 cm in der Dicke.

Das erstarrte Agarose-Gel wurde nach Entfernen des Geltaschenformers in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Beladung erfolgte mit 10 µl der jeweiligen DNA-Lösung je Tasche. Die Proben wurden vorher mit 1/10 Volumen Agarose-Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V für eine Dauer von 50 min betrieben. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation unter Verwendung eines Rotfilters mit einer Polaroidkamera photographiert.

##### **2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten**

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden zur Herstellung des Gels 0,6 g *Low Melting Point*-Agarose und 60 ml TAE-Puffer verwendet. Nach Erhitzen und Zugabe von 1/10.000 Volumen 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung wurde die Suspension in die Gelkammer gegossen und bei 4 °C bis zum vollständigen Erstarren gelagert. Das Gel wurde dabei mit

breiteren Taschen versehen, die schließlich mit dem gesamten Ansatz aus DNA und Restriktionsenzym unter Zugabe von 1/10 Volumen Agarose-Auftragspuffer gefüllt wurden (typischerweise 55 µl). Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 V für ca. 80 min durchgeführt. Das Sichtbarmachen der aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht erfolgte zur Vermeidung von Strahlenschäden bei 312 nm mit verminderter Intensität. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Abtrennung der DNA von der Agarose wurde unter Verwendung des JETsorb Gel Extraction 150<sup>TM</sup> Kits der Firma Genomed nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurde die DNA vorübergehend an ein Anionenaustauschermaterial gebunden, gewaschen und anschließend mit 20 µl TE-Puffer eluiert.

Die Konzentration der isolierten DNA-Fragmente wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese anhand eines mitlaufenden Standards abgeschätzt. Die Lösung der DNA-Fragmente wurden bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese**

Zur radioaktiven DNA-Sequenzierung (Kap. 2.2.8.1) wurden 6 %ige, keilförmige Polyacrylamid-Harnstoffgels verwendet. Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten (20 x 60 cm) zunächst mit Ethanol gereinigt und dann derart vorbereitet, daß nach Durchführung der Elektrophorese das Gel an nur einer der beiden Platten haften blieb. Eine der Platten wurde dazu zweimal mit 5 ml einer Lösung aus Ethanol, 17,5 µl Essigsäure und 17,5 µl  $\gamma$ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan behandelt, während die andere Platte zweimal mit 1,1,1-Trichlorethan versiegelt wurde. Beide Platten wurden dann mit einem Stapel aus drei Abstandshaltern von 60 cm, 40 cm und 12,5 cm Länge derart zusammengeklemt, daß das resultierende Gel am oberen Ende eine Dicke von 0,2 mm und am unteren Ende von 0,6 mm besaß.

Für das Gel wurden 50 ml einer Lösung von 6 % (w/v) Acrylamid (Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 19 : 1), 8,3 M Harnstoff und 1/10 Volumen 10x TBE zubereitet. Die erhaltene Lösung wurde nach Zugabe von 1/100 Volumen 10 % (w/v) APS und 1/2.500 Volumen TEMED sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und am oberen kurzzeitigen Ende des Gels ein Geltaschenformer für 36 Taschen angebracht.

Das polymerisierte Gel wurde in vertikaler Position einer Vorelektrophorese bei 60 W mit TBE-Laufpuffer unterworfen, dann wurden die Proben aufgetragen und die eigentliche Elektrophorese bei derselben konstanten Leistung durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Platten getrennt und die Glasplatte mit dem anhaftenden

Gel zur Entfernung des Harnstoffs für 30 min in 10 % (v/v) Essigsäure und anschließend für 10 min in H<sub>2</sub>O geschwenkt. Schließlich wurde das Gel auf der Glasplatte für 1 h bei 80 °C getrocknet und durch Auflegen eines Röntgenfilmes eine Autoradiographie hergestellt.

Oligodesoxynukleotide der Firma NAPS wurden vor Gebrauch einer präparativen elektrophoretischen Auftrennung in einem 12 %igen Polyacrylamidgel (20 x 40 cm) unter denaturierenden Bedingungen unterworfen. Hierfür wurden 100 ml einer Lösung unter Verwendung von 12 % (w/v) Acrylamid (Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 19 : 1), 8,3 M Harnstoff und 1/10 Volumen 10x TBE hergestellt. Die erhaltene Lösung wurde nach Zugabe von 1/100 Volumen 10 % (w/v) APS und 1/2.500 Volumen TEMED sofort zwischen zwei Glasplatten, die diesmal durch 1,5 mm starke Abstandshalter getrennt waren, gegossen und am oberen kurzzeitigen Ende des Gels ein Geltaschenformer für sechs Taschen angebracht. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in vertikaler Position in einer mit TBE-Puffer befüllten Gelkammer fixiert und einer 30 minütigen Vorelektrophorese bei einer Leistung von 40 W unterzogen. Nach dem Auftragen der Proben wurde die eigentliche Elektrophorese ebenfalls bei 40 W durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### 2.2.5 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

Fanden Oligodesoxynukleotide der Firma NAPS Verwendung, wurden die Rohprodukte der DNA-Synthese vor Gebrauch durch präparative Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.3) gereinigt. Dazu wurde die Hälfte des lyophilisierten Produkts eines 50 nmol Syntheseansatzes nach folgendem Protokoll gereinigt (Skerra, 1989):

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Das lyophilisierte Rohprodukt wird in 40 µl H<sub>2</sub>O gelöst, wovon 20 µl entnommen und die andere Hälfte bei -20 °C gelagert wird. Zu den 20 µl DNA-Lösung werden 20 µl Formamid-Auftragspuffer (98 % (v/v) entionisiertes Formamid, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau) gegeben, woraufhin die Mischung für 5 min auf 80 °C erhitzt wird und einer präparative Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese unterworfen wird. Nach dem Abschluß der Elektrophorese wird das Gel auf einer UV-durchlässigen Folie platziert, auf eine DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) gelegt und die DNA-Banden durch Bestrahlen mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm als dunkle Banden vor dem fluoreszierenden Hintergrund sichtbar gemacht. Die Gelbande mit dem Hauptprodukt wird mit einem Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert. Dazu wird eine 1 ml-Kunststoffspritze verwendet, die am vorderen Ende zugeschmolzen und nach dem Erkalten mit einer gelben Kanüle aufgebohrt wurde. Die Gelstücke werden unter Zugabe von

1 ml TE-Puffer in zwei Portionen in die vorbereitete Spritze gegeben, durch die Bohrung gepreßt und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Das Gelmaterial wird anschließend mit Hilfe einer „Spin-X“ Filtereinheit abgetrennt (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 5 min, 14.000 rpm) und das Filtrat dreimal mit je 1 ml 1-Butanol (p. a.) extrahiert, wobei die wässrige Phase auf ca. 0,4 ml eingengt wird. Die DNA wird dann durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 4,8, 1/100 Volumen MgCl<sub>2</sub> und 2,5 Volumen Ethanol (p. a.) für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 4 °C, 30 min, 14.000 rpm) wird das Präzipitat mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol p. a. gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und schließlich in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Zur Bestimmung der molaren Konzentration des gereinigten Oligodesoxynukleotids in der erhaltenen Lösung wird die Absorption nach Verdünnung in TE-Puffer (1 : 200) bei 260 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{260}$ ) des Oligonukleotides wird dabei als Summe der Beiträge der einzelnen Basen (A: 15 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, C: 7,4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, G: 11,8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, T: 8,8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) berechnet.

### **2.2.6 Abtrennung von Enzymen (Phenol-Extraktion, Ethanol-Fällung)**

Die Phenol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung erfolgte, um isolierte Plasmid-DNA von Zellproteinen, insbesondere von Nukleasen, abzutrennen.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Für die Phenol-Extraktion werden 90 bis 100 µl DNA-Lösung zunächst mit 10 µl 3 M NaAc, pH 4,8 versetzt. Dann werden 100 µl Phenol/Chloroform zugegeben, geschüttelt, bis sich eine homogene weiße Suspension gebildet hat, und schließlich zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 5 min, 14.000 rpm). Die obere, wässrige Phase wird abgenommen, mit 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, geschüttelt und abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 5 min, 14.000 rpm).

Für die Ethanol-Fällung wird die obere, wässrige Phase erneut abgenommen, mit 250 µl Ethanol p. a. versetzt und für mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Anschließend wird die Mischung zentrifugiert (Kühlzentrifuge RMC14, 4 °C, 30 min, 14.000 rpm) und das Präzipitat mit 250 µl eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol p. a. gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Kühlzentrifuge RMC14, 4 °C, 5 min, 10.000 rpm) wird der Überstand abgezogen, das Präzipitat für 2 bis 3 min unter Vakuum getrocknet (Speed-Vac) und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

## 2.2.7 Enzymatische Modifizierung von DNA

### 2.2.7.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionsanalyse (Sambrook *et al.*, 1989) von Plasmiden und für die Präparation von DNA-Fragmenten wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurde das Puffersystem der Firma New England Biolabs verwendet (NEB 1 bis 4, jeweils als zehnfach konzentrierte Stammlösung vorliegend). Die Wahl des entsprechenden Puffers für ein Restriktionsenzym erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Wenn vom Hersteller gefordert, wurde zusätzlich eine BSA-Konzentration von 0,1 mg/ml in der Reaktionslösung eingestellt.

Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab wurde mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA und je 2 bis 5 U einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Puffer und BSA-Lösung wurden jeweils als zehnfach konzentrierte Stammlösungen zugefügt. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 1 - 2 h bei der für die optimale Reaktion des Enzyms empfohlene Temperatur.

Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in ähnlicher Weise durchgeführt, jedoch in Reaktionsvolumina von 50 µl mit 1 bis 3 µg Plasmid-DNA und jeweils 20 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease.

Spaltungen mit mehreren Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Reaktionstemperaturen benötigten, wurden schrittweise durchgeführt. Zunächst wurde mit dem entsprechenden Enzym bei der höheren Temperatur inkubiert, der Ansatz dann kurz auf Eis abgekühlt, mit dem nächsten Enzym versetzt und bei dessen Reaktionstemperatur weiterinkubiert. Vor der Spaltung im präparativen Maßstab wurden die isolierten Plasmide (Kap. 2.2.2.2) durch Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung von eventuell kontaminierenden Proteinen (z. B. Exonukleasen) befreit.

### 2.2.7.2 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die Ligierungsreaktion wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei einer Temperatur von 16 °C durchgeführt, wobei in der Regel über Nacht inkubiert wurde. Die DNA-Menge im Reaktionsansatz betrug typischerweise jeweils 50 fmol des Vektorfragments (mit Replikationsursprung und Antibiotika-Resistenzgen) und 50 fmol jedes anderen (Gen-) Fragments. Im Ansatz befanden sich außerdem 3 U T4 DNA-Ligase sowie der vom Hersteller mitgelieferte Puffer. Als Negativkontrolle wurden 50 fmol des Vektorfragments in Abwesenheit von Insert einer Ligierungsreaktion unterworfen.

5 µl des Ansatzes bzw. der Kontrolle wurden jeweils für eine Transformation eines geeigneten kompetenten *E. coli*-Stammes eingesetzt.

### 2.2.7.3 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Sollte ein Oligodesoxynukleotid zur ortsgerichteten Mutagenese eingesetzt oder ein PCR-Produkt, das zuvor keinem Restriktionsverdau unterworfen worden war, direkt ligiert werden, wurden die jeweiligen 5'-Termini zunächst phosphoryliert. Dies erlaubte die kovalente Verknüpfung des DNA-Fragments mit dem 3'-Ende eines anderen DNA-Moleküls. Die Phosphorylierung erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Polynukleotid-Kinase.

Oligodesoxynukleotide (200 pmol) wurden hierzu in 30 µl des mitgelieferten Puffers unter Zusatz von ATP (0,4 mM) und 5 U Polynukleotid-Kinase inkubiert. Die Phosphorylierung von gereinigten PCR-Produkten fand in 25 µl des Polynukleotid-Kinase-Puffers mit ATP (1 mM) und 10 U T4 DNA-Polynukleotid-Kinase statt. Die Inkubationsdauer betrug 45 min bei 37 °C, woraufhin das Enzym für 20 min bei 65 °C durch Hitze inaktiviert wurde.

Sollte ein linearisiertes DNA-Fragment mit glatten Enden (*Blunt End*) während einer Plasmidkonstruktion als Empfängervektor dienen, wurden seine 5'-Enden dephosphoryliert, um eine intramolekulare Ligierung zu verhindern. Hierfür wurde die Alkalische Phosphatase aus Shrimp (*Pandalus borealis*) verwendet.

Für die Dephosphorylierung wurde eine Lösung (0,1 U) der Alkalischen Phosphatase in dem mitgelieferten Puffer hergestellt und 5 µl davon zum präparativen Restriktionsansatz direkt hinzupipettiert. Die Mischung wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und die darin enthaltenen Enzyme dann mit Hilfe eines QIAquick Säulchens oder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt.

### 2.2.7.4 Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel

Zur Einführung von Mutationen (Substitution, Deletion, Insertion) in definierte DNA-Sequenzabschnitte wurde die Methode nach Kunkel (1987) bzw. die Arbeitsvorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987) verwendet. Hierbei hybridisiert ein Oligodesoxynukleotid, welches die gewünschte mutagene Nukleotidsequenz trägt, an die einzelsträngige DNA des Vektors, an dem die Veränderung vorgenommen werden soll. Dieser parentale Strang weist aufgrund seiner Herkunft aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i (Kap. 2.2.2.3) eine teilweise Substitution von Desoxythymine durch Desoxyuridine auf.

Ausgehend von dem hybridisierten, mutagenen Oligodesoxynukleotid wird der noch fehlende komplementäre Strang *in vitro* synthetisiert. Nach der Transformation eines *ung*<sup>+</sup> Stammes

mit dem entstandenen doppelsträngigen Hybrid werden die Desoxyuridin-Bausteine im parentalen Strang durch die Uracil-N-Glycosidase und zelleigene Reparaturenzyme entfernt und dieser dadurch bevorzugt repariert. Auf diese Weise wird auf die erwünschte Mutation selektiert.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

200 pmol des mutagenen Oligodesoxynukleotides werden mit Hilfe der T4 DNA-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert (Kapitel 2.2.7.3). Zur Hybridisierung werden 0,5 µl des Phosphorylierungsansatzes und 0,5 µl einzelsträngige Plamid-DNA in 10 µl (Endvolumen) Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 80 mM NaCl) aufgenommen und wie folgt inkubiert: Der Ansatz wird für 5 min auf 80 °C erhitzt, dann über mehrere Stunden hinweg im Heizblock auf 25 °C abgekühlt und schließlich auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz werden 1 µl 10x Synthesepuffer (je 5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10 mM ATP; 0,1 mM Tris/HCl pH 7,4; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM DTT), 3 U T4 DNA-Ligase sowie 1,5 U T4 DNA-Polymerase gegeben. Dann wird die Reaktionslösung zunächst für 5 min auf Eis, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37 °C inkubiert.

5 µl dieses Reaktionsansatzes werden im Verhältnis 1 : 10 mit TE-Puffer verdünnt und bei -20 °C gelagert. Die restliche Lösung wird zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen. Von der Verdünnung werden 5 µl für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt.

Um die nachfolgende Identifizierung von Klonen, die die gewünschte Mutation trugen, zu erleichtern, wurde – wenn möglich – mit Hilfe des Oligodesoxynukleotids durch stille Mutation zusätzlich eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease eingeführt oder, wenn vorhanden, deletiert.

#### **2.2.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung bzw. Synthese von Genen**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) wurde zu drei verschiedenen Zwecken verwendet: zur selektiven Amplifizierung von Genen oder deren Fragmenten, zur konzertierten Zufalls-Mutagenese an mehreren Aminosäurepositionen und zur Synthese künstlicher Gene (*Assembly-PCR*). Die in der PCR eingesetzten Oligodesoxynukleotide (*Primer*) flankierten den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Sollten an definierten Positionen der Matrizen-DNA zufällige Veränderungen der Sequenz erreicht werden, wurden solche *Primer* verwendet, bei deren Synthese dort Mischungen aller vier Nukleotidbausteine eingesetzt worden waren.



Wurde für die PCR die *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) eingesetzt, die sich aufgrund ihrer *Proofreading*-Aktivität durch niedrige Fehlerrate auszeichnet, wurden die eingesetzten *Primer* vor der 3' zu 5' Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt. In diesem Fall wurden modifizierte *Primer* verwendet, die an ihrem 3'-Terminus eine einzelne Phosphorthioatbindung trugen (Skerra, 1992).

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl zwischen 0,01 und 1 ng Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µl 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), 3 µl MgCl<sub>2</sub> und 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Wurde die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, wurden 5 µl des mitgelieferten 10x *Pfu*-Puffers (200 mM Tris/HCl, pH 8,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA) verwendet, in dem bereits MgCl<sub>2</sub> enthalten war. Nach Auffüllen mit H<sub>2</sub>O wurde der Reaktionsansatz mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und im Thermozykler zwecks Denaturierung für 2 min auf 94 °C erhitzt. Dann wurden 2,5 U der entsprechenden Polymerase in der Hitze zugegeben (*Hot Start*) und das PCR-Programm gestartet. In typischerweise 25 Zyklen wurde für je 1 min bei 94 °C (Denaturierung des DNA-Doppelstranges), für 1 min bei 60 °C (Hybridisierung der *Primer* an die DNA-Matrix) und für 1,5 min bei 72 °C inkubiert (Polymerasereaktion). Eine abschließende Inkubation erfolgte für 5 min bei 60 °C (Komplettierung der Syntheseprodukte). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

Die *Assembly*-PCR wurde nach einem Protokoll von Essen und Skerra (1994) in einem Reaktionsansatz von 50 µl mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase und unter den Pufferbedingungen der Standard-PCR durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich zu den zwei flankierenden *Primern* vier Oligodesoxynukleotide als *Templates* verwendet, die in ihrer Basenpaarabfolge insgesamt das zu synthetisierende Gen repräsentierten (Kap. 3.5.1). Die Sequenzen der eingesetzten Oligodesoxynukleotide entsprachen jeweils 70 bis 80 Basenpaar langen Abschnitten des kodierenden bzw. nicht-kodierenden DNA-Stranges des künstlichen Gens und überlappten alternierend an ihren 3'- und 5'-Enden mit ca. 20 Basen. Von den flankierenden *Primern* (10 µM) und den *Template*-Oligodesoxynukleotiden (0,1 µM) wurden jeweils 2,5 µl zu dem Reaktionsansatz pipettiert und mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde gemeinsam mit einem Kontrollansatz, der lediglich die flankierenden *Primer* enthielt, dem Programm der Standard-PCR unterworfen, wobei die Temperatur der Hybridisierungsreaktion 55 °C betrug.

Die Produkte der PCR-Reaktion wurden grundsätzlich durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und soweit notwendig mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten.

### **2.2.8 Sequenzierung doppelsträngiger DNA**

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte wurden der Sequenzanalyse unterworfen. Dazu wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Chen und Seeburg, 1985) nach zwei verschiedenen Methoden, die beide auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977) basierten, verwendet.

#### **2.2.8.1 Radioaktive Sequenzanalyse**

Die radioaktive Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T7 DNA-Polymerase (Tabor und Richardson, 1987) durchgeführt. Dabei wurde der T7-Sequencing<sup>TM</sup> Kit nach Angaben des Herstellers sowie 1,5 - 2 µg alkalisch denaturierte Plasmid-DNA und 1 pmol des entsprechenden *Primers* verwendet. Der dabei neusynthetisierte DNA-Strang wurde während der Polymerasereaktion mit [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP markiert und durch den Einbau von Didesoxynukleotiden statistisch, aber basenspezifisch terminiert. Die entstandenen radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden anschließend durch Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Exposition auf einem Autoradiogramm als Bandenmuster für A, C, G, T in benachbarten Spuren sichtbar gemacht.

#### **2.2.8.2 Automatisierte Sequenzanalyse unter Verwendung fluoreszierender Terminatoren**

Für die Analyse von DNA-Abschnitten mit Hilfe des ABI PRISM<sup>®</sup> 310-Sequenzierautomaten fand der ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Verwendung. Dieser enthält eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (Ampli<sup>®</sup>Taq<sup>®</sup>; Tabor und Richardson, 1995) sowie Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern gekoppelt sind (Rosenblum *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die neusynthetisierte DNA-Kette während der Polymerasereaktion statistisch terminiert und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechendem Fluorophor markiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden im Sequenzierautomaten mittels Kapillarelektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6<sup>TM</sup>) aufgetrennt und ihre Fluoreszenzgruppen am Ende der Laufstrecke durch einen Argonionen-Laser angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-

Kamera detektiert und als digitales Signal an einen Power Macintosh G3 Computer weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (ABI PRISM<sup>®</sup> DNA Sequencing Analysis 3.3) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Zu 4 µl BigDye<sup>™</sup> Ready Reaction Mix werden je 2 µl Plasmid-DNA (ca. 1 µg), 2 µl eines geeigneten *Primers* (1 µM) und 2 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Die Mischung wird mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und 25 PCR-Zyklen wie folgt unterworfen: 96 °C, 30 s; 55 °C, 15 s; 60 °C, 4 min. Danach wird das PCR-Produkt durch Zugabe von 1 µl 3 M NaOAc, pH 4,8 und 25 µl Ethanol p. a. für 20 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wird durch Zentrifugieren präzipitiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 20 min, 14.000 rpm), mit 70 % (v/v) Ethanol (p. a.) gewaschen, unter Vakuum (Speed-Vac) getrocknet und in 12 µl des mitgelieferten TSR-Puffers resuspendiert. Nach Inkubation für 2 min bei 95 °C zur Denaturierung der Probe wird diese in ein dafür vorgesehenes Reaktionsgefäß überführt und im ABI PRISM<sup>®</sup> 310-Sequenziergerät plaziert. Dieses wurde zuvor durch den Einbau der Kapillare, Befüllung des Pumpblocks mit Polymer und Bereitstellung des Elektrophoresepuffers nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Sequenzanalyse wird schließlich mit Hilfe der Kontroll-Software (ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Data Collection) gestartet.

## **2.3 Gentechnische Methoden**

### **2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli***

Durch die Verwendung von Expressionsvektoren, auf denen die Strukturgene der im Rahmen dieser Arbeit zu produzierenden Proteine jeweils als Fusion mit den Genen für die bakteriellen Signalsequenzen OmpA bzw. PhoA vorlagen, erfolgte die Sekretion der synthetisierten Polypeptidketten in den periplasmatischen Raum von *E. coli* (Skerra und Plückthun, 1988). Die Expression des Fremdgens wurde dabei durch den mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet* Promotor/Operator (Skerra, 1994b) kontrolliert. Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression konnte anschließend die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

#### **2.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben**

##### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Zur Anzucht werden 2 L LB-Medium, die mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt sind, in einem 5 L-Erlenmeyerkolben mit 40 ml einer stationären Übernachtskultur des mit dem

entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft. Die Inkubation erfolgt bei 22 °C, wobei die Kultur mit 200 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch regelmäßige Probenentnahme zur Messung der Optischen Dichte verfolgt wird. Bei  $OD_{550} = 0,5$  wird mit 200 µl Anhydrotetracyclin-Lösung in DMF (2 mg/ml) induziert. Die Induktionsdauer beträgt, abhängig von Protein, Stamm und Vektor, 2 bis 3 h. Die Kultur wird dann zügig auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (Beckmann- oder Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 15 min, 4.200 g). Der Medienüberstand wird durch Abpipettieren vollständig entfernt und die sedimentierten Zellen sofort bei 4 °C weiterverarbeitet.

Der Periplasmaaufschluß erfolgt durch die Destabilisierung der äußeren *E. coli*-Zellmembran in Gegenwart von EDTA unter hypertonen Bedingungen, wodurch die löslichen periplasmatischen Proteine von den Sphäroplasten mit den cytoplasmatischen Proteinen abgetrennt werden. Durch die Komplexbildung der die Zellwand stabilisierenden zweiwertigen Kationen kommt es (verbunden mit einem milden osmotischen Schock) zum Austritt der periplasmatischen Proteine. Im Fall mancher Proteine wird dies durch Einstellen der Suspension auf 200 µg/ml Lysozym (Lysozym-Stammlösung: 10 mg/ml in Aufschlußpuffer, frisch angesetzt) unter Abbau des Peptidoglycans forciert.

Für den Periplasmaaufschluß wird das Zellsediment von 2 l *E. coli*-Kultur (s. o.) in insgesamt 20 ml vorgekühltem Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) bei 4 °C resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Sphäroplasten werden dann abzentrifugiert (Sigma 4K10 4 °C, 15 min, 4.420 g) und der Überstand in einen geeigneten Zentrifugenbecher überführt. Die Sphäroplasten werden verworfen und der Überstand zur Klärung erneut zentrifugiert (Beckmann- oder Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 15 min, 27.200 g). Die klare Proteinlösung wird über Nacht gegen 2 l des bei der darauffolgenden Affinitätschromatographie verwendeten Puffers dialysiert.

### 2.3.1.2 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Laborfermenter

Da für die *In vivo*-Applikation des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments große Proteinmengen benötigt wurden, wurde dieses Antikörperfragment nach einer von Schiweck und Skerra (1995) entwickelten Methode durch Fermentation von *E. coli* hergestellt. Es handelte sich dabei um ein diskontinuierliches Fermentationsverfahren, d. h. die Zellen eines Ansatzes wurden zu hohen Zelldichten angezogen und nach der Induktion der Fremdgenexpression geerntet und aufgearbeitet.

Die Bakterienzellen wurden dazu in einem 4 L- bzw. 10 L-Fermentergefäß in einem synthetischen Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (mittels Ammoniak) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische

Bedingungen über den gesamten Verlauf der Fermentation gewährleistet. Als Expressionsstamm wurde dabei neben dem *E. coli* K12 Wildtyp W3110 erstmals auch der Stamm JM83 eingesetzt (Kap. 3.1.1.2).

Für die Vorvorkultur wurden 2 ml mit dem entsprechenden Antibiotikum versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6 - 8 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 180 (360) ml Mineralsalzlösung (Angaben in Klammern gelten für den 8 L-Maßstab), denen 20 (40) ml 20 % (w/v) Glucose, 2 (4) ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 200 (400) µl Antibiotika-Stammlösung und 200 (400) µl Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1 : 1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug üblicherweise OD<sub>550</sub> = 1,5 - 2,0. Zur Bestimmung der Optischen Dichte wurden der Kultur entnommene Proben im Verhältnis 1 : 10 mit Mineralsalzlösung verdünnt und im Spektrometer bei 550 nm vermessen.

Das Kulturgefäß wurde mit 3,5 L (7 L) Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnetrührer festgezurr. Vor dem Animpfen der Fermenterkultur wurde auf 30 °C temperiert und über einen Trichter folgende sterile Lösungen zugegeben: 400 (800) ml 20 % (w/v) Glucose, 40 (80) ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, je 4 (8) ml entsprechende Antibiotika-Stammlösung bzw. Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung, je 2 (4) ml FeCl<sub>3</sub>- bzw. Zn(OAc)<sub>2</sub>-Lösung, 5 (10) ml Spurenelement-Lösung, 100 (200) µl 30%ige Antifoam A-Lösung. Die Belüftung fand zu Beginn mit Druckluft statt, woraufhin dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert „100 %“ zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. später reinem Sauerstoff auf einen Wert  $\geq 30$  % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts).

Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur (200 bzw. 400 ml) angeimpft und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Dann wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und erneut 300 (600) µl Antifoam A zugegeben. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 % (w/v) Glucose nach folgendem Protokoll zugegeben:

Ab einer Zelldichte von OD <sub>550</sub> = 7,5	Zugabe von 14 ml/h
= 12,5	" von 20 ml/h
= 18,5	" von 30 ml/h
= 22,5	" von 40 ml/h

Weiterhin wurden der Kultur bei  $OD_{550} = 13$  nochmals je 2 (4) ml Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 5 (10) ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von  $OD_{550} = 20$  durch Zugabe von 0,5 mg Anhydrotetracyclin/L Kultur (aus Stammlösung 5 mg/ml Anhydrotetracyclin in DMF) induziert, die Kultivierung für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge mit H-6000 A- Rotor, 4 °C, 20 min, 5.000 rpm) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden mit Hilfe eines Spatels in ein kaltes 600 (1000) ml-Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) für 10 min auf einem Magnetrührer (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug  $2 \text{ ml L}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ . Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (500 mM EDTA-Stammlösung, pH 8,0) und 250  $\mu\text{g}$  Lysozym/ml (Lysozym-Stammlösung: 20 mg/ml in Aufschlußpuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min auf Eis inkubiert, um einen vollständigen Periplasmaaufschluß zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (Beckman- bzw. Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 20 min, 21.500 g) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) wurde der Extrakt von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt und anschließend dreimal gegen jeweils 5 (10) L 50 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7,5 dialysiert. Durch Zugabe von festem Betain-Monohydrat wurde eine Konzentration von 500 mM Betain eingestellt, was der Stabilisierung der Antikörperfragmente und der Anpassung des Proteinextraktes an die Bedingungen der nachfolgenden IMAC diente. Ausgefallenes Protein und Partikel wurden durch Zentrifugation (Beckman- bzw. Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 30 min, 21.500 g) und Sterilfiltrieren abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung entweder sofort zur Chromatographie eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 Kolonie-Filterstapel-Assay zur Selektion von Varianten des IN-1 $F_{ab}$ -Fragments

Für den Filterstapel-Assay wurde der Vektor pASK106-IN1 ausgehend vom Expressionsplasmid pASK88-IN1 (Fiedler, 1997) entsprechend zu der Vorgehensweise von König und Skerra (1998) konstruiert. pASK106-IN1 trägt die Gensequenzen für das IN-1  $F_{ab}$ -Fragment mit konstanten humanen Domänen, einem  $\text{His}_6$ -Affinitätsanhängsel am Carboxyterminus der schweren und die Albuminbindende Domäne (ABD) des *Streptococcus*-Proteins G am Carboxyterminus der leichten Kette. Für den *Filter Sandwich Colony Screening Assay* (Skerra *et al.*, 1991; Schlehuber *et al.*, 2000) wurde das PCR-Produkt einer mutagenen Genamplifizierung der  $V_L$ -Domäne des Antikörpers IN-1 in pASK106-IN1 inseriert und kompetente *E. coli* JM83 Zellen mit 5  $\mu\text{l}$  des Ligierungsansatzes transformiert (Kap. 3.3.3).

Die Transformanten wurden anschließend auf die Produktion von Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit verbesserter Bindungsaktivität für rekombinantes Nogo-A Fragment untersucht. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-Membran aufgelegt. Auf dieser Membran wurden 150 µl der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz (Kap. 2.2.3) gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 8 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurechtgeschnittene, hydrophobe Membran zunächst nacheinander für je 5 min in 20 ml Methanol, in 20 ml Wasser und anschließend in 20 ml PBS geschwenkt. Danach wurde sie für 4 h bei Raumtemperatur in 10 ml einer Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit dem gleichen Volumen 3 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS für 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 µg/l Anhydrotetracyclin zugesetzt worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der zusätzlich 200 µg/l Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

Die zuvor erhaltene, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin so auf die hydrophobe Membran gelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 15 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und aufgrund der Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

Die obere Membran mit den Kolonien wurde auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde dreimal für jeweils 10 min mit 10 ml PBST 0,1 gewaschen und die fixierten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragmente anschließend auf die Bindung an Nogo-A Fragment untersucht. Dazu wurde rekombinantes Nogo-A Fragment unter Verwendung von Digoxigenin-3-O-Methylcarbonyl-ε-Aminocaprinsäure-N-Hydroxy-Succinimidester in einem molaren Verhältnis von 5 : 1 nach Angaben des Herstellers markiert und die Membran für eine Stunde in 10 ml dieser Lösung (40 - 60 µg/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST 0,1 erfolgte eine Inkubation für eine Stunde mit Anti-Digoxigenin F<sub>ab</sub>-Fragment Alkalische Phosphatase Konjugat (0,75 U/ml), woraufhin die Membran erneut je zweimal mit PBST 0,1 und PBS gewaschen wurde.

Für die anschließende chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984) wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, 50 µg/ml in Dimethylformamid) und 5 µl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, 75 µg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der

Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Kolonien, die für eine besondere Signalintensität oder -morphologie verantwortlich waren, wurden zur Kultivierung ausgewählt, ihre DNA isoliert und der Sequenzanalyse unterzogen.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Chromatographische Verfahren

Bakteriell produzierte Proteine oder deren Fragmente wurden üblicherweise mit Hilfe von Affinitätspeptiden an ihrem Amino- oder Carboxyterminus aus der Periplasmafraktion von *E. coli* isoliert. Proteine, die das *Strep*-Tag trugen, wurden dabei in einem Schritt mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt (Schmidt und Skerra, 1994). Für die Reinigung von Proteinen mit dem His<sub>6</sub>-Anhängsel wurde die Metallchelate-Affinitätschromatographie (Hochuli *et al.*, 1988) verwendet. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Reinigung von F<sub>ab</sub>-Fragmenten mit Hilfe der Thiophilen Adsorptions-Chromatographie (TAC) etabliert (Fiedler und Skerra, 1999).

#### 2.4.1.1 Proteinreinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie

In *E. coli* produzierte Proteine, die C-terminal mit dem *Strep*-Tag (Schmidt und Skerra, 1993) fusioniert waren, wurden durch Affinitätschromatographie mit an Sepharose gekoppeltem Streptavidin gereinigt. Dabei wurde das rekombinante Protein über das *Strep*-Tag reversibel an das Streptavidin der Säulenmatrix gebunden, während Proteine ohne Affinitätsanhängsel die Säule passierten und durch Waschen entfernt wurden. Das Zielprotein wurde daraufhin mit D-Desthiobiotin kompetitiv eluiert. Die Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mittels eines UV/VIS-Durchflußphotometers bei 280 nm dokumentiert.

##### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Üblicherweise werden 2 ml kovalent an Sepharose gekoppelte „Streptavidin-Mutante 1“ (Voss und Skerra, 1997) mit einem Beladungsgrad von 5 mg pro ml Gelmaterial verwendet. Die Säule wird mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flußrate von 20 ml/h betrieben und zunächst mit SA-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie äquilibriert. Anschließend wird der gegen SA-Puffer dialysierte und sterilfiltrierte periplasmatische Proteinextrakt aus einer 2 L-Kultur von *E. coli* auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen.

Nach dem Waschen mit SA-Puffer bis zum erneuten Erreichen der Basislinie wird das über das *Strep*-Tag an die Säule gebundene Protein mit 2,5 mM D-Desthiobiotin in SA-Puffer



eluiert. Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen á 1,5 ml aufgefangen. Die Elutionsfraktionen werden auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein und dessen Reinheit durch SDS-PAGE analysiert. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt, zur Entfernung des D-Desthiobiotins dreimal gegen PBS, 0,1 mM EDTA dialysiert und dann bei 4 °C gelagert.

Zur Regenerierung der Säule wird diese mit 5 mM HABA in SA-Puffer gespült, um so das D-Desthiobiotin zu eluieren. Das Säulenmaterial wird dabei tieforange gefärbt. Das HABA wird dann durch Spülen mit SA-Puffer ausgewaschen.

#### **2.4.1.2 Proteinreinigung durch Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)**

In *E. coli* produzierte Proteine, die mit dem His<sub>6</sub>-Tag fusioniert waren, wurden durch Metallchelate-Chromatographie gereinigt (Skerra, 1994a; Fiedler und Skerra, 2001). Als Säulenmaterial diente dabei an Sepharose gebundene Iminodiessigsäure, als Übergangsmetallion wurde Zn<sup>2+</sup> verwendet. Als spezifische Metallbindungsstelle des rekombinanten Proteins fungierte das C-terminale His<sub>6</sub>-Tag das mit den freien Koordinationsstellen der vermutlich oktaedrisch koordinierten Zn<sup>2+</sup>-Ionen in Wechselwirkung tritt.

##### **2.4.1.2.1 IMAC unter Verwendung einer Zn(II)/IDA-Sepharosematrix**

Zur Proteinreinigung wurden üblicherweise Säulen mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet. Für die Reinigung von Proteinen aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von Fermentationsansätzen wurde eine 30 ml-Säule verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflußphotometers bei 280 nm dokumentiert. Der Proteinextrakt wurde zur Entfernung des aus dem Periplasmaaufschluß herrührenden Chelatbildners EDTA (Kap. 2.3.1) vor dem Auftragen auf die Säule gegen den Chromatographiepuffer (0,5 M Betain Monohydrat, 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5) dialysiert und anschließend sterilfiltriert.

##### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Säule wird mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flußrate von 20 ml/h (210 ml/h) mit 10 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O bis zum Erreichen der Basislinie gespült (Angaben in Klammern gelten für 30 ml Säulenvolumen). Dann wird mit 10 ml 10 mM ZnSO<sub>4</sub> (50 ml 100 mM ZnSO<sub>4</sub>) beladen, mit 10 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O nachgespült und schließlich mit 10 Säulenvolumen Chromatographiepuffer äquilibriert.

Anschließend wird die dialysierte und sterilfiltrierte periplasmatische Proteinfraktion aufgetragen, der Durchlauf aufgefangen und wiederum bis zum Erreichen der Basislinie mit Chromatographiepuffer nachgespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgt mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM Imidazol in Chromatographiepuffer bei einer verringerten Flußrate von 10 ml/h (90 ml/h). Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 1,6 ml (5 ml) aufgefangen. Nach der Elution wird die Säule zur Entfernung der  $Zn^{2+}$ -Ionen mit 10 Säulenvolumen Regenerierungspuffer (50 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8,0) und anschließend für mehrere Stunden mit Wasser gespült.

Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen und deren Reinheit wird mittels SDS-PAGE bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an gereinigtem rekombinantem Protein werden vereinigt. Im Fall der fermentativen Proteinproduktion wird eine Rechromatographie durchgeführt, um verbleibende Wirtsproteine abzutrennen. Die letztendlich erhaltene Lösung des reinen rekombinanten Proteins wird dreimal gegen PBS, 0,1 mM EDTA dialysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

#### **2.4.1.2.2 IMAC an einer Zn(II)/POROS-Matrix unter FPLC-Bedingungen**

Die Verwendung einer POROS MC/M Säule (Durchmesser: 4,6 mm; Länge: 100 mm; Säulenvolumen: 1,7 ml) erlaubte die Durchführung der IMAC bei erhöhtem Druck und hoher Flußgeschwindigkeit. Dazu wurde eine programmierbare Dynamax HPLC-Anlage mit zwei biokompatiblen PEEK (Polyether-Ether-Keton) Pumpenköpfen, einem Hochdruck-Gradientenmischer und einer 3 ml-Probenschleife verwendet. Die verwendeten Puffer waren identisch mit denen des herkömmlichen Verfahrens (s. o.), wurden jedoch vor dem Gebrauch sterilfiltriert und im Ultraschallbad entgast. Der Chromatographieverlauf wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflußphotometers bei 280 nm dokumentiert.

Die Säule wurde zunächst mit einer Flußrate von 4 ml/min betrieben, mit 20 Säulenvolumen 10 mM  $ZnSO_4$  beladen und anschließend mit  $H_2O$  gespült. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 20 Säulenvolumen Chromatographiepuffer wurden 15 ml des periplasmatischen Proteinextraktes in Portionen á 3 ml aufgetragen und anschließend erneut mit Chromatographiepuffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm auf die Basislinie zurückfiel. Danach wurde die Flußrate auf 2 ml/min vermindert und die Elution durch Anlegen eines kontinuierlichen Gradienten von 20 ml Chromatographiepuffer gegen 20 ml 300 mM Imidazol/HCl in Chromatographiepuffer gestartet. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen und die Säule schließlich mit 1 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 regeneriert. Mit den erhaltenen Fraktionen wurde wie in Kapitel 2.4.1.2.1 beschrieben weiterverfahren.

### 2.4.1.3 Proteinreinigung durch Thiophile Adsorptions-Chromatographie (TAC)

Die Thiophile Adsorptions-Chromatographie (Porath *et al.*, 1985) wurde zur Isolierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner Varianten aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* angewandt. Die selektive Adsorption des Immunglobulinfragments an die thioethersubstituierten Sulfongruppen der Gelmatrix (Fractogel<sup>®</sup> EMD TA 650 S) erfolgte aufgrund der sogenannten „thiophilen“ Interaktion (Porath *et al.*, 1987).

Zur Proteinreinigung wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml und ein peristaltisches Pumpensystem verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch kontinuierliche Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflußphotometers bei 280 nm dokumentiert.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Der periplasmatische Proteinextrakt einer 2 L-Kultur von *E. coli* wird gegen 2 L 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5, 1 mM EDTA dialysiert, mit 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5 auf 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt und sterilfiltriert. Die Säule wird mit einer Flußrate von 20 ml/h betrieben und zunächst mit 10 Säulenvolumen Chromatographiepuffer (1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5) gespült, bis sich am angeschlossenen Schreiber eine Basislinie eingestellt hat. Dann wird die Proteinlösung aufgetragen, nicht gebundenes Protein aufgefangen und die Säule mit Chromatographiepuffer gespült, bis die Basislinie wieder erreicht ist. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines absteigenden Gradienten von 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5 gegen 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5 in einem Gesamtvolumen von 40 ml. Nach einem Waschschrift mit 5 Säulenvolumen 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5 wird die Elution mit einem aufsteigendem Gradienten von 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5 gegen 1 M NaCl, 40 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5 in einem Gesamtvolumen von 40 ml fortgesetzt. Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 1,6 ml aufgefangen. Diese werden auf ihren Gehalt an F<sub>ab</sub>-Fragment und dessen Reinheit untersucht. Fraktionen mit reinem F<sub>ab</sub>-Fragment werden vereinigt, dreimal gegen PBS, 0,1 mM EDTA dialysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

### 2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgte durch die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluß an die Elektrophorese durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau R250 sichtbar gemacht.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurde unter Hochsalzbedingungen mit dem Puffersystem von Fling und Gregerson (1986) durchgeführt. Proteine wurden je nach

ihrer Größe in 10 %igen oder 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Trenngelen nach ihrer Molmasse aufgetrennt. Bei rekombinanten Antikörperfragmenten wurden, wenn nötig, zur Trennung 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet, denen 6 M Harnstoff zugesetzt war, um eine Auftrennung der beiden Ketten zu ermöglichen (Skerra, 1994a).

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden zwei sorgfältig gesäuberte Glasplatten (10 cm x 8 cm) mit Abstandhaltern (Dicke: 0,75 mm) mit Hilfe von Metallklammern zusammengeheftet und mit 1 %iger Agaroselösung an den Rändern abgedichtet. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 ml bestand aus 1,25 ml 4x Lower-Tris und einem der gewünschten Prozentigkeit des Gels entsprechenden Anteil einer 30 %igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung. Zur Herstellung von 12 %igen Gelen wurden 2 ml und für 15 %ige Gele 2,5 ml Acrylamid-Stammlösung verwendet. Für ein 12 %iges SDS-Harnstoffgel enthielt die Trenngelmischung zusätzlich 1,8 g Harnstoff. Mit Wasser wurde zum Endvolumen von 5 ml aufgefüllt. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 1,3 µl TEMED und 25 µl 10 % (w/v) APS wurden 3,6 ml bis 4 ml der Trenngelmischung zwischen die abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit 1 ml Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und mit Hilfe von 0,5 ml Acrylamid-Stammlösung und 0,75 ml 4x Upper-Tris 3 ml eine 5 %igen Sammelgelmischung hergestellt. Für SDS-Harnstoffgele enthielt die Sammelgelmischung zusätzlich 1,08 g Harnstoff. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 1,5 µl TEMED und 18 µl 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Taschenformer mit zehn Zähnen eingesetzt. Nach Erstarren des Sammelgels wurden die Metallklammern sowie der untere Abstandhalter vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit Laufpuffer gefüllt wurde.

Zur Auftrennung wurden jeweils 20 µl Probenvolumen der Proteinlösungen mit 5 µl reduzierendem oder nicht reduzierendem 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Entfernen des Taschenformers aus dem erstarrten Sammelgel wurde das Gel mit Hilfe einer 50 µl Glasspritze mit 20 µl Probe pro Tasche beladen. Zusätzlich wurde ein Protein-Größenstandard, der – soweit möglich – mit demselben Puffer wie die Proteinproben verdünnt und ebenfalls mit 5x Auftragspuffer versetzt worden war, aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei einer begrenzenden Stromstärke von 30 mA und einer begrenzenden Spannung von 120 V solange betrieben, bis der Bromphenolblau-Marker nach ca. 2 Stunden aus dem unteren Ende des Trenngeles austrat. Anschließend wurde das Gel entnommen und das Sammelgel mit einem Skalpell abgeschnitten. Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau R250 wurde das Gel zunächst für 30 min in Färbelösung und dann bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung

geschwenkt. Das Gel wurde in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert und schließlich zur Konservierung im Gelrockner getrocknet.

### 2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Die Konzentration ( $c$ ) von Proteinlösungen wurde nach dreimaliger Dialyse gegen PBS, 0,1 mM EDTA durch die Messung der Absorption bei 280 nm ( $A$ ) – in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke  $d = 1$  cm und unter Korrektur der Absorption des Puffers – mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $A = \epsilon * c * d$ ) bestimmt. Hierzu wurde der jeweilige Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) des Proteins nach der Methode von Gill und von Hippel (1989) mit Hilfe des Computerprogrammes GCG (Wisconsin Software Package, Genetics Computer Group; Devereux *et al.*, 1984) ermittelt. Dabei werden die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette (Gill und von Hippel, 1989) summiert.

### 2.4.4 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Anwendungen – insbesondere für *In vivo*-Experimente mit dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment – war es notwendig, Lösungen mit hoher Proteinkonzentration herzustellen. Dazu wurde das Protein zunächst dreimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert und die Lösung mittels einer Konzentratoreinheit (Vivaspin oder Makrosep) mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4 °C, 3.000 g) auf ein der gewünschten Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 4 °C, 5 min, 14.000 rpm) abgetrennt und der Überstand entnommen. Die Konzentration einer 1 : 10 verdünnten Probe wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Um Undichtigkeiten in der Konzentratormembran auszuschließen, wurde der Proteingehalt des Filtrats UV-spektrometrisch überprüft. Durch Fermentation und präparative IMAC erhaltenes IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment lag in großen Volumina (60 - 80 ml) vor und wurde daher mit Hilfe einer Druckzelle unter 3 bar Stickstoff an einer Amicon YM10-Membran auf 5,0 mg/ml konzentriert.

Um die Verträglichkeit des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Tierexperiment an der Ratte zu verbessern, wurde es vor der Konzentrierung gegen Cerebrospinal-Puffer (CSP: 110 mM NaCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM KCl, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM Citrat, pH 7,2) dialysiert. Dessen Konzentration an Elektrolyten richtete sich nach der Zusammensetzung des menschlichen Liquors (Schmidt, 1987). Citrat wurde als milder physiologischer Komplexbildner in geringer Konzentration zugesetzt, um durch kontaminierende Übergangsmetallionen induzierte

Präzipitation des mit dem His<sub>6</sub>-Tag versehenen rekombinanten Proteins zu vermeiden. War die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt, wurde die Lösung sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### 2.4.5 Ortsgerichtete Kopplung von F<sub>ab</sub>-Fragmenten mit Fluorescein-5-maleimid

Für die ortsgerichtete Kopplung wurde ausgehend von dem Expressionsplasmid pASK88-IN1 (Fiedler, 1997) der Vektor pASK109-IN1 konstruiert. Dieser trägt die Gensequenzen für das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment mit konstanten humanen Domänen, einem *Strep*-Tag am Carboxyterminus der schweren und einem reaktiven Cysteinrest am Carboxyterminus der leichten Kette. Die Umsetzung von Fluorescein-5-Maleimid (Curtis und Cowden, 1980) erfolgte selektiv mit dieser freien Thiolgruppe.

Für die Kopplung wurde das gereinigte und gegen PBS, 0,1 mM EDTA dialysierte F<sub>ab</sub>-Fragment aus einer 2 L-Kultur auf ein Volumen von 700 µl eingengt (entspricht typischerweise einer Konzentration von zwischen 1,5 und 2,0 mg/ml) und zur selektiven Reduktion der freien Thiolgruppe auf 10 mM β-Mercaptoethanol in einem Gesamtvolumen von 1 ml eingestellt. Die Lösung wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert. Durch Gelfiltration an einer Pharmacia PD-10 Säule mit PBS als Puffer wurde das β-Mercaptoethanol abgetrennt. Die Proteinkonzentration der erhaltenen Lösung wurde auf 1 mg/ml verdünnt, 50 µl 10 mM Fluorescein-5-maleimid in DMF hinzugegeben und für 4 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Überschüssiges Fluorescein-5-maleimid wurde durch erneute Gelfiltration an einer Pharmacia PD-10 Säule abgetrennt und die erhaltenen Fraktionen einer Analyse durch SDS-PAGE unterzogen. Das erhaltene 15 %ige Gel wurde auf eine UV-durchlässigen Folie gelegt und die markierte leichte Kette des F<sub>ab</sub>-Fragments durch Anregung bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht.

## 2.5 Immunchemische Methoden

### 2.5.1 Western-Blotting

Für die immunchemische Analyse von Proteinen auf dem Western-Blot (Blake *et al.*, 1984) wurden diese zunächst mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Elektrottransfer auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Rekombinante Proteine wurden meist über ihr Affinitätsanhängsel mit Hilfe geeigneter Nachweisreagenzien detektiert. Im Fall des *Strep*-Tags diente hierzu ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat, während im Fall des Hexahistidin-Peptids ein Nickel-NTA (Nitrilo-Tri-Essigsäure) Alkalische Phosphatase Konjugat verwendet wurde. Darüber hinaus wurden Proteine mit entsprechenden

Antiseren, deren Immunglobuline ebenfalls mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt waren, nachgewiesen. Die Entwicklung des Signals erfolgte durch enzymatische Umsetzung des chromogenen Substrates BCIP der Alkalischen Phosphatase in Gegenwart von NBT (Blake *et al.*, 1984).

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Für den anschließenden Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden vier Whatman-Filterpapiere (8,5 cm x 5,5 cm) mit Blot-Puffer (SDS-PAGE-Laufpuffer mit 20 % (v/v) Methanol) getränkt und auf die Graphit-Kathode der Elektrobplot-Apparatur geschichtet. Auf diesen Stapel wurde das für 20 min in Blot-Puffer inkubierte Trenngel gelegt und darauf Nitrozellulosemembran sowie vier weitere Filterpapiere geschichtet. Der Proteintransfer wurde nach Auflegen der Graphit-Anodenplatte für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Anschließend wurde der Nitrozellulosefilter entnommen, in eine Petrischale (94 mm) gelegt und für 30 min mit viermaligem Wechseln in PBST 0,1 geschwenkt. Dann wurde die Membran für 1 h mit 10 ml Lösung des jeweiligen Nachweisreagenz (Verdünnung 1:500 bzw. 1:1000 nach Angaben des Herstellers) in PBST 0,1 auf einem Taumel-Schüttler inkubiert und anschließend zweimal für 5 min mit PBST 0,1 und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 20 ml Alkalische Phosphatase Puffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) mit 10 µl NBT (75 mg/ml in 70 % (v/v) DMF) und 60 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) gestartet und nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität durch mehrfaches Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Der Filter wurde abschließend an der Luft getrocknet.

### **2.5.2 Bindungsnachweis mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

Die Bindungsaktivität von rekombinanten Antikörperfragmenten gegenüber ihrem Antigen wurde mit Hilfe von ELISA Experimenten nachgewiesen. Dazu wurde das Antigen an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert und nach Inkubation mit dem Antikörperfragment dessen Bindung durch chromogene Enzymreaktion detektiert.

#### Enzymatischer Bindungsnachweis mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase:

Die Bindung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner Varianten an rekombinantes Nogo-A Fragment wurde mit Hilfe eines affinitätsgereinigten Anti-Human-C<sub>κ</sub>-Antikörpers, der mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelt war, nachgewiesen. Zur chromogenen Nachweisreaktion diente die enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenolat. Diese Reaktion wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Photometer Spectra-Max 250 quantifiziert.

Zur Durchführung des Assays wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte jeweils 50 µl Antigenlösung (180 - 200 µg/ml in PBS) gegeben und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Antigenlösung ausgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen an der Plastikoberfläche wurde jede Vertiefung für 2 Stunden mit jeweils 200 µl einer Blockierungslösung (2 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween in PBS) inkubiert. Gleichzeitig wurden zuvor nichtbelegte Vertiefungen mit derselben Lösung inkubiert und dienten im weiteren Verfahren als Negativkontrolle. Die Vertiefungen wurden danach dreimal mit PBST 0,1 gespült und ausgeklopft. Anschließend wurde je 50 µl der Lösung des jeweiligen gereinigten Antikörperfragments in PBST 0,1 in Konzentrationsabstufungen (von unverdünnt bis zur Verdünnung 1:16) in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Die Verdünnungsreihe wurde ausgehend von der unverdünnten Proteinlösung aus der ersten Vertiefung einer Spalte bzw. Reihe der Mikrotiterplatte durch Überführen von jeweils 50 µl in die nächste Vertiefung, in der 50 µl PBST 0,1 vorgelegt waren, und anschließendes Mischen erstellt. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden wurde dreimal mit PBST 0,1 gespült.

Für den Nachweis des gebundenen F<sub>ab</sub>-Fragments wurde das Antikörper-Alkalische Phosphatase Konjugat im Verhältnis 1:1000 in PBST 0,1 verdünnt und je 50 µl davon jeder Vertiefung zugesetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen zweimal mit PBST 0,1, dann zweimal mit PBS gespült. Schließlich wurden jeweils 50 µl 0,5 mg/ml p-Nitrophenolphosphat gelöst in Alkalische-Phosphatase-Puffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) zupipettiert. Die Platte wurde in das auf 25 °C temperierte SpectraMax 250 ELISA-Photometer eingesetzt, und nach fünfminütiger Äquilibration wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm für 30 min in minütlichen Abständen aufgezeichnet.

#### Enzymatischer Bindungsnachweis mit Hilfe der β-Lactamase:

Zum direkten Nachweis von Fusionsproteinen aus rekombinanten F<sub>ab</sub>-Fragmenten und der β-Lactamase (Kap. 3.6) diente die enzymkatalysierte chromogene Umsetzung von 3-(2,4-Dinitrostyryl)-(6R,7R)-7-(2-Thienylacetamido)-Ceph-3-Em-4-Carboxysäure, E-Isomer (Nitrocephin) als Farbreaktion (O'Callaghan *et al.*, 1972). Die Vorgehensweise ist hier beispielhaft für den lysozymbindenden Antikörper D1.3 (Boulot *et al.*, 1990) beschrieben.

Zunächst wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit je 50 µl 3 mg/ml Lysozym in NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6 für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und unbelegte Bindungsstellen mit jeweils 200 µl einer Blockierungslösung (2 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween in PBS) für 2 h abgesättigt. Gleichzeitig wurden zuvor nichtbelegte Vertiefungen mit derselben Lösung inkubiert und dienten im weiteren Verfahren als Negativkontrolle. Nach dreimaligem Waschen mit PBST 0,1 wurde verbliebene Flüssigkeit ausgeklopft und das D1.3 F<sub>ab</sub>-Fragment/β-Lactamase-Konjugat zugegeben. Dazu wurden je



50 µl der Lösung des gereinigten Fusionsproteins in PBST 0,1 in Konzentrationsabstufungen (von unverdünnt bis zur Verdünnung 1:16) in die Vertiefungen der Platte pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde wiederum dreimal mit PBST 0,1 gespült und jeweils 50 µl 100 mM Nitrocephin in 100 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,0, 0,5 % (v/v) DMSO in jede Vertiefung pipettiert. Die Umsetzung des Substrates wurde unmittelbar danach anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 486 nm bei 25 °C für 10 min in einem SpectraMax 250 ELISA-Photometer aufgezeichnet.

Die aus ELISA-Experimenten erhaltenen Werte der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit (mOD/min) wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ ausgewertet. Dazu wurde die jeweils gemessene Reaktionsgeschwindigkeit gegen die entsprechende eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und die erhaltene Kurve mit Hilfe der Formel (1) durch nicht-lineare Regression angepaßt (Voss und Skerra, 1997).

$$(1) \quad y = \frac{a * x}{(b + x)}$$

Unter der Annahme eines Assoziations/Dissoziations-Gleichgewichtes zwischen dem immobilisierten Antigen und dem F<sub>ab</sub>-Fragment ist dabei:

x = Konzentration des eingesetzten F<sub>ab</sub>-Fragments

y = Konzentration des Antigen/F<sub>ab</sub>-Fragment-Komplexes (hier indirekt über die enzymatische Aktivität des Reporterenzym gemessen)

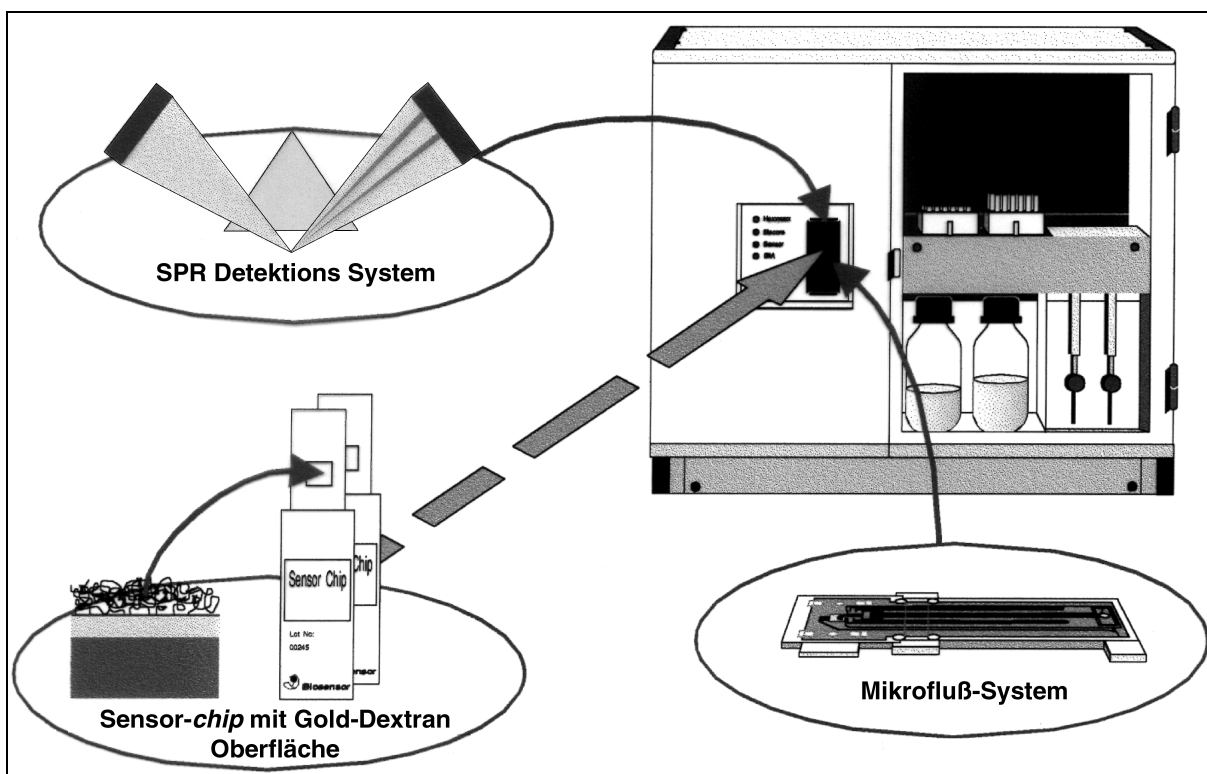
a = Gesamtkonzentration des immobilisierten Antigens

b = Dissoziationskonstanten (K<sub>D</sub>)

### 2.5.3 Nachweis von Bindungsaktivität durch Oberflächen-Plasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) mit dem BIACORE-System

Für die quantitative Analyse der Bindung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments bzw. seiner Varianten an das rekombinante Nogo-A Fragment wurden ein BIACORE-System und ein NTA Sensor *Chip* verwendet (Nieba *et al.*, 1997). Die Carboxydextran-Matrix dieses kommerziell erhältlichen Probenträgers war mit Nitrilo-Tri-Essigsäure derivatisiert und daher zur Metallkomplexierung befähigt. NiFr<sub>4</sub> (Kap. 3.2.2) konnte so in aufeinanderfolgenden Messungen mit Hilfe seines carboxyterminalen Hexahistidin-Anhäsels in Gegenwart von Ni(II)-Ionen an der *Chip*-Oberfläche immobilisiert und die Interaktion mit dem F<sub>ab</sub>-Fragment in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen untersucht werden.

Für SPR-Messungen wurde ein zur Analytimmobilisierung befähigter Träger (Sensor-Chip) in dem Gerät positioniert und mit dem darin integrierten Mikrofluß-System (*Integrated  $\mu$ -Fluidic Cartridge, IFC*) gekoppelt (Abb. 5). Dies erlaubte einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom aus dem Pufferreservoir oder der Probenauftragsschleife durch vier (BIACORE 2000) bzw. zwei (BIACORE X) voneinander unabhängige Kanäle über die *Chip*-Oberfläche. Die Detektion der Bindung erfolgte dabei am Analytträger demnach quasi in Lösung.

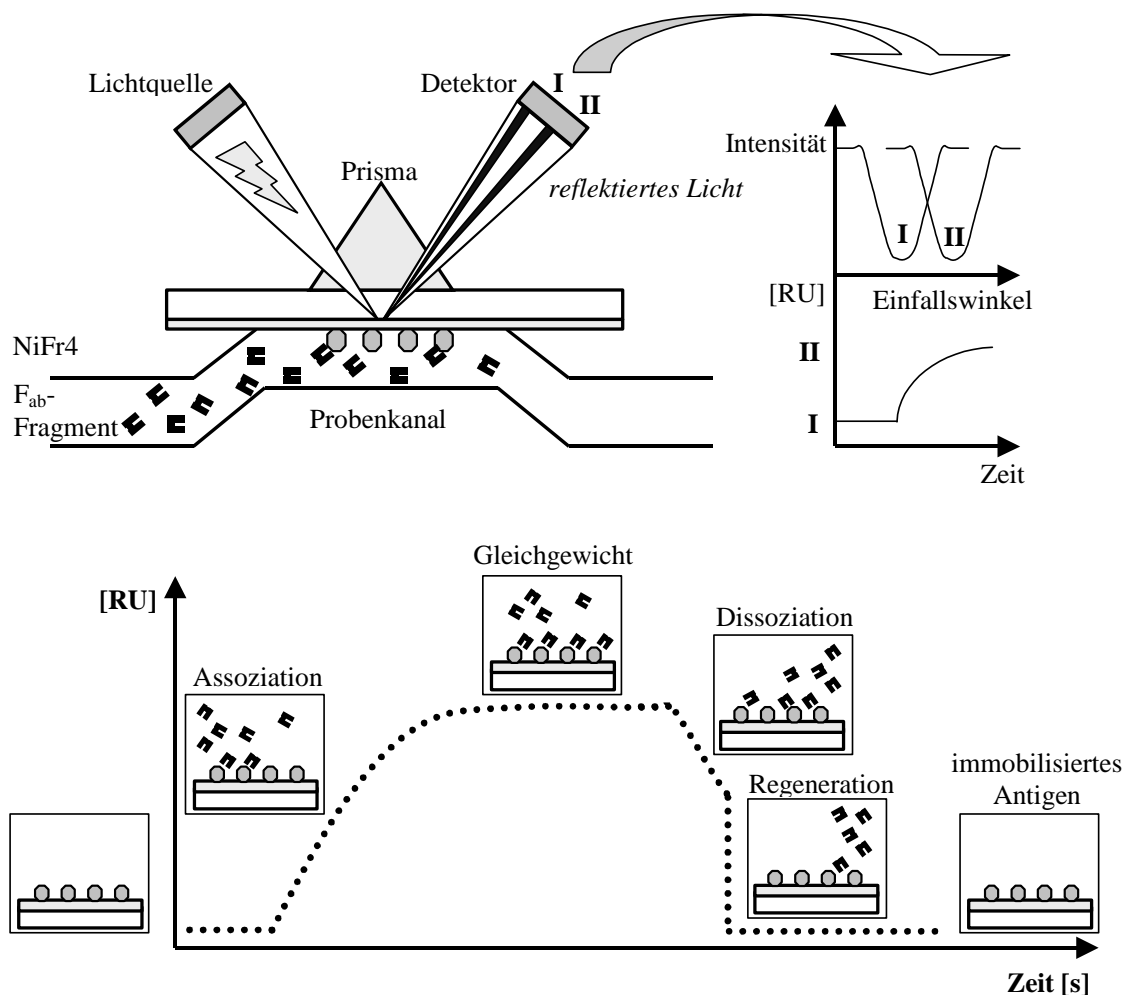


**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau eines BIACORE 2000 Gerätes zur *Real Time*-Analyse molekularer Bindungsphänomene durch *Surface Plasmon Resonance*-Messung (SPR). Als wichtigste Elemente sind das Mikrofluß-System (*Integrated  $\mu$ -Fluidic Cartridge, IFC*), die optische Meßeinheit zur Detektion des SPR-Signals und die Vorrichtung zur Positionierung des *Sensor-Chips*, der eine Gold-Dextran Oberfläche trägt, hervorgehoben (Abbildung entnommen aus: <http://www.biocore.com/technology>; modifiziert).

Die Wechselwirkung des immobilisierten Proteins mit dem Bindungspartner, der über die Probenschleife injiziert wurde, wurde aufgrund des generierten Oberflächen-Plasmon-Resonanzsignals detektiert (Abb. 6). Das Signal wurde als sogenannte Resonanzeinheiten (*Resonance Units, RU*) quantifiziert, wobei  $\Delta 1.000$  RU einer Veränderung der Proteinkonzentration an der *Chip*-Oberfläche von  $1 \text{ ng/mm}^2$  entsprach.

Durch das Auftragen dieses maximalen RU-Wertes gegen die Analytenkonzentration und die Prozessierung der Daten durch non-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogrammes „Kaleida-Graph“ konnte der entsprechende  $K_D$ -Wert erhalten werden.

Die Messungen wurden bei 25 °C und einem kontinuierlichen Pufferfluß von 35  $\mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt. Als Laufpuffer und Lösungsmittel der verwendeten Proteine wurde PBS (sterilfiltriert und entgast) unter Zusatz von 0.005 % Detergenz P-20 benutzt.



**Abbildung 6:** Grundlage für das sich ändernde SPR-Signal bei der Wechselwirkung zwischen immobilisiertem und appliziertem Bindungspartnern an der Gold-Dextran Oberfläche des Sensor-Chips. Trifft polarisiertes Licht auf dessen Oberfläche kommt es zur Totalreflexion der eingestrahnten optischen Wellen. Abhängig vom Einstrahlungswinkel und dem Brechungsindex des hinter der Goldschicht befindlichen Mediums durchdringt jedoch ein kleiner Energieanteil der elektromagnetischen Welle die Grenzfläche über eine kurze Distanz von wenigen hundert nm („Emaneszentes Feld“). Aufgrund des Resonanzeffektes wird eine verminderte Intensität des reflektierten Lichts bei einem definierten Austrittswinkel („SPR-Winkel“) beobachtet. Dieser Winkel wird mit zunehmender effektiver Konzentration des Analyten, insbesondere aufgrund einer Bindungswechselwirkung mit dem immobilisierten Protein an der Sensor-Chip-Oberfläche – im Bereich des dünnen „Dextran-Kissens“ – verschoben. Die relative Verschiebung wird als *Resonance Units* quantifiziert und in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.

Das mittels eines Rechners und der *BIAcore X Control Software* (Version 2.1) gesteuerte System ermöglichte den kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch anwählbare Kanäle über die *Chip*-Oberfläche. Dabei wurde entweder Laufpuffer aus einem Reservoir oder die Proteinlösungen über die Probenschleife appliziert.

Für jede Messung wurden die beiden vorhandenen Kanäle auf dem *Chip* – einen davon zur Ermittlung des Vergleichsignals – durch Injektion von 70 µl 0,5 mM NiSO<sub>4</sub> zunächst mit Ni(II)-Kationen beladen. Anschließend wurde durch die Injektion von 70 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml gereinigtes NiFr4 auf einem Probenkanal immobilisiert. Das F<sub>ab</sub>-Fragment wurde daraufhin mit einer definierten Konzentration für zwei Minuten über beide Kanäle injiziert und anschließend durch kontinuierlichen Pufferfluß für vier Minuten nachgewaschen. Durch Injektion von 70 µl 0,35 M EDTA wurde die Oberfläche des *Chips* schließlich regeneriert und es konnte eine erneute Messung unter Verwendung einer anderen Konzentration des F<sub>ab</sub>-Fragments erfolgen.

Das gemessene stationäre Bindungssignal (in *Resonance Units*, RU) des mit NiFr4 belegten Kanals wurde durch Subtraktion des Signals von dem unbelegten Kanal mit Hilfe der *BIAevaluation Software* (Version 3.0) korrigiert. Die jeweilige Änderung der Resonanzeinheiten bei Bindung des F<sub>ab</sub>-Fragments wurde dann gegen dessen eingesetzte Konzentration aufgetragen und die erhaltene Kurve durch nicht-lineare Regression unter Verwendung von Formel (1) angepaßt (Voss und Skerra, 1997). Auf diese Weise wurde die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) für die Bindung des jeweiligen F<sub>ab</sub>-Fragments an NiFr4 unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt.

## 2.6 Histologische Methoden

Für den Nachweis des natürlichen Nogo-A in Gewebeschnitten des ZNS von Ratten unter Verwendung von Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Neben der immunhistochemischen Anfärbung durch enzymatische Nachweisreaktion (Bandtlow *et al.*, 1996; Broesamle *et al.*, 2000) wurde die Detektion mit fluoreszenzmarkierten F<sub>ab</sub>-Fragmenten durchgeführt (Immunfluoreszenz).

Kryoschnitte (10 - 15 µm, transversal) von Rattenhirn oder -rückenmark wurden aus frischpräpariertem und in flüssigem Stickstoff schockgefrorenem Gewebe von ca. 4 Wochen alten Tieren mit einem Gefriermikrotom angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger transferiert und bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

### Immunhistologische Anfärbung:

Die Schnitte wurden vor der Verwendung an der Luft getrocknet (RT, 15 min) und dann in einem Färbetrog für 15 min entweder in eiskaltem Ethanol (p. a.) oder in eiskaltem Aceton (p.

a.) fixiert. Danach wurden auf jeden Gewebeschnitt 100  $\mu\text{l}$  4 % (w/v) BSA in PBS pipettiert und für eine Stunde inkubiert (Feuchte Kammer, RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS im Färbetrog (RT, jeweils 5 min) wurden 100  $\mu\text{l}$  der  $F_{\text{ab}}$ -Fragment-Lösung mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  in PBS auf jede Gewebesektion gegeben und für eine Stunde inkubiert (Feuchte Kammer, RT). Gebundenes  $F_{\text{ab}}$ -Fragment wurde nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS (Färbetrog, RT, jeweils 5 min) durch Aufpipettieren von jeweils 100  $\mu\text{l}$  Anti-Human- $C_{\kappa}$ -Antikörper Alkalische Phosphatase Konjugat (Verdünnung 1:100 in PBS) und einstündige Inkubation (Feuchte Kammer, RT) detektiert. Vor der Entwicklung wurden die Schnitte dreimal mit TBS (25 mM Tris, 145 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,4) gewaschen (Färbetrog, RT, jeweils 5 min). Für die chromogene Nachweisreaktion wurde der *Fast Red*-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (Tablette in 2 ml 0,1 M Tris, pH 8,2 gelöst, sterilfiltriert, 100  $\mu\text{l}$  pro Schnitt).

Die entwickelten Schnitte wurden eingedeckelt, unter einem Mikroskop bei 10 bis 30facher Vergrößerung analysiert und photographiert. Ausgehend von Diapositiven wurden digitalisierte Abbildungen durch Scannen erhalten, die mit einem geeigneten Grafikverarbeitungsprogramm hinsichtlich Helligkeit und Kontrast justiert wurden.

#### Immunfluoreszenz:

Für den Nachweis von Nogo-A im ZNS-Gewebe wurde ein mit Fluorescein-5-maleimid markiertes  $F_{\text{ab}}$ -Fragment verwendet (Kap. 2.4.5). Bis zum Blockieren mit BSA wurde analog der oben angegebenen Vorschrift vorgegangen. Alle folgenden Schritte fanden bei Dunkelheit statt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzmarkierung zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen mit PBS im Färbetrog (RT, jeweils 5 min) wurden 100  $\mu\text{l}$  der Lösung des markierten  $F_{\text{ab}}$ -Fragments mit einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  auf jeden Schnitt gegeben und für eine Stunde inkubiert (Feuchte Kammer, RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS (Färbetrog, RT, jeweils 5 min) wurden die Schnitte eingedeckelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop bei Vergrößerungen von 10 bis 30fach und einer Anregungswellenlänge von 490 nm analysiert.

## **2.7 Enzymkinetische Methoden**

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die  $\beta$ -Lactamase als Fusionprotein mit einem  $F_{\text{ab}}$ -Fragment erfolgte nach dem Formalismus von Michaelis und Menten (1913). Die  $K_{\text{M}}$ -Werte für Nitrocephin (O'Callaghan *et al.*, 1972) wurden durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit für die enzymatisch katalysierte Umsetzung in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates ermittelt.

Die Messungen wurden bei 25 °C mit Hilfe eines SpectraMAX 250 Instruments und des entsprechenden Kontrollprogrammes (*SoftmaxPro* Version 1.1.) in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 105 µl bei einer konstanten Konzentration des Fusionsproteins von 25 nM mit 0,1 M NaP<sub>i</sub>, pH 7,0, 0,5 % DMSO als Reaktionspuffer. Die verwendeten Substratkonzentrationen betragen zwischen 10 und 600 µM ausgehend von einer frischen 10 mM Stammlösung von Nitrocephin in DMSO, die entsprechend verdünnt wurde. Die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolysereaktion von Nitrocephin erfolgte durch Messung der Absorptionänderung bei 486 nm über 5 min, wobei die Absorption alle 20 Sekunden gemessen wurde.

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeit innerhalb einer Meßreihe wurden gegen die jeweils eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen und die  $K_M$ - und  $v_{\max}$ -Werte unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (2) mit Hilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ durch nicht-lineare Regression bestimmt.

$$(2) \quad V = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M}$$

mit:

$V$  = stationäre Anfangsgeschwindigkeit

$V_{\max}$  = maximale stationäre Anfangsgeschwindigkeit (bei Substratsättigung)  $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]_t$

$[S]$  = Substratkonzentration

$K_M$  = Michaelis-Menten Konstante

$k_{\text{cat}}$  = Wechselzahl

$[E]_t$  = Gesamt-Enzymkonzentration

## 2.8 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese oder die PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, BESTFIT, TRANSLATE, BACKTRANSLATE, PEPTIDESORT sowie der Sequenz-Editor SEQED aus dem „GCG“-Programmpaket (Devereux *et al.*, 1984) verwendet.

Zur Visualisierung dreidimensionaler Strukturmodelle von Proteinen und zur Modellierung von Aminosäuresubstitutionen wurde das Programm „Insight II“ (Version 95.0.3, Biosym/MSI, San Diego, USA) an einer Indigo 2-Workstation der Firma Silicon Graphics (Mountain View, USA) verwendet.

Die graphische Auswertung von Experimenten zur Bindungsanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms „Kaleidagraph“ (Abelbeck Software, Reading, USA). Gele aus der SDS-PAGE Analyse wurden mit Hilfe des Programms „Adobe Photoshop 5.0“ (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) digitalisiert und das erhaltene Bild hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen wurden von folgenden Datenbanken über das *World Wide Web* erhalten:

Protein Data Bank™ (Berman <i>et al.</i> , 2000)	<a href="http://www.rcsb.org/pdb">http://www.rcsb.org/pdb</a>
ExpASy Molecular Biology Server (Appel <i>et al.</i> , 1994)	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
KabatMan (Martin, 1996)	<a href="http://www.bioinf.org.uk/abs">http://www.bioinf.org.uk/abs</a>
The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest (Johnson und Wu, 2001)	<a href="http://immuno.bme.nwu.edu">http://immuno.bme.nwu.edu</a>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bakterielle Produktion, Reinigung und *In vivo*-Einsatz des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments

Im Vorfeld dieser Arbeit waren die Gene für die variablen Domänen des Antikörpers IN-1 kloniert und in den Expressionsvektor pASK85 inseriert worden (Bandtlow *et al.*, 1996). Damit konnte sein rekombinantes F<sub>ab</sub>-Fragment in großer Menge und mit hoher Reinheit erhalten werden. Die Produktion erfolgte in *E. coli* durch separate Sekretion beider Polypeptidketten in den periplasmatischen Raum des Gram-negativen Bakteriums. In dem dort herrschendem oxidierenden Milieu konnte die Faltung, die Ausbildung der intra- und interchenaren Disulphidbrücken sowie die Assoziation beider Ketten zum Heterodimer stattfinden. Das funktionelle IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment konnte mit Hilfe eines an den Carboxy-Terminus der C<sub>H</sub>1-Domäne fusionierten Hexahistidin-Anhängsels in einem Schritt durch IMAC aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* isoliert werden (Skerra, 1994a).

Nachdem die neutralisierende Aktivität des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments auf neuronale Wachstumsinhibitoren *in vitro* nachgewiesen worden war (Bandtlow *et al.*, 1996), sollten *In vivo*-Experimente an adulten Ratten folgen, bei denen im Bereich des thoracalen Rückenmarks eine Hemisektion vorgenommen worden war. Hierbei sollte die inhibitorische Wirkung des adulten, zentralnervösen Myelins durch direkte Applikation des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments analog zur Behandlung mit dem IgM/κ Antikörper (Schnell und Schwab, 1990) neutralisiert und die neuronale Regeneration im Bereich der Rückenmarksläsion ermöglicht werden.

Die für diese Experimente erforderlichen großen Mengen des IN-1 Antikörperfragments (1,5 bis 2 mg pro Tier) sollten mit Hilfe eines im Prinzip bereits etablierten Fermentationsverfahrens in *E. coli* gentechnisch hergestellt werden. Hierfür wurde ein Laborfermenter-System, das homöostatische Wachstumsbedingungen gewährleistet, sowie ein synthetisches Glucose/Mineralsalzmedium verwendet (Schiweck und Skerra, 1995). Als Wirtsorganismus wurde dabei der *E. coli* Stamm W3110 eingesetzt. Die Regulation der Fremdgenexpression beruhte auf dem dicht reprimierten Tetracyclin-Promotorsystem, das eine besonders niedrige Basalsynthese der auf die *E. coli*-Zelle toxisch wirkenden Immunglobulinfragmente gewährleistete und ein frühes Absterben der Zellen in der Expressionskultur verhinderte (Skerra, 1994b). Mit diesem Verfahren konnten reproduzierbare Ausbeuten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Milligramm-Maßstab erhalten werden (0,35 mg L<sup>-1</sup> OD<sub>550</sub><sup>-1</sup>), was neben der hohen Faltungseffizienz des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments vor allem auf das Erreichen hoher Zelldichten mit OD<sub>550</sub> ≥ 20 zum Zeitpunkt der Induktion zurückzuführen war (Bandtlow *et al.*, 1996).



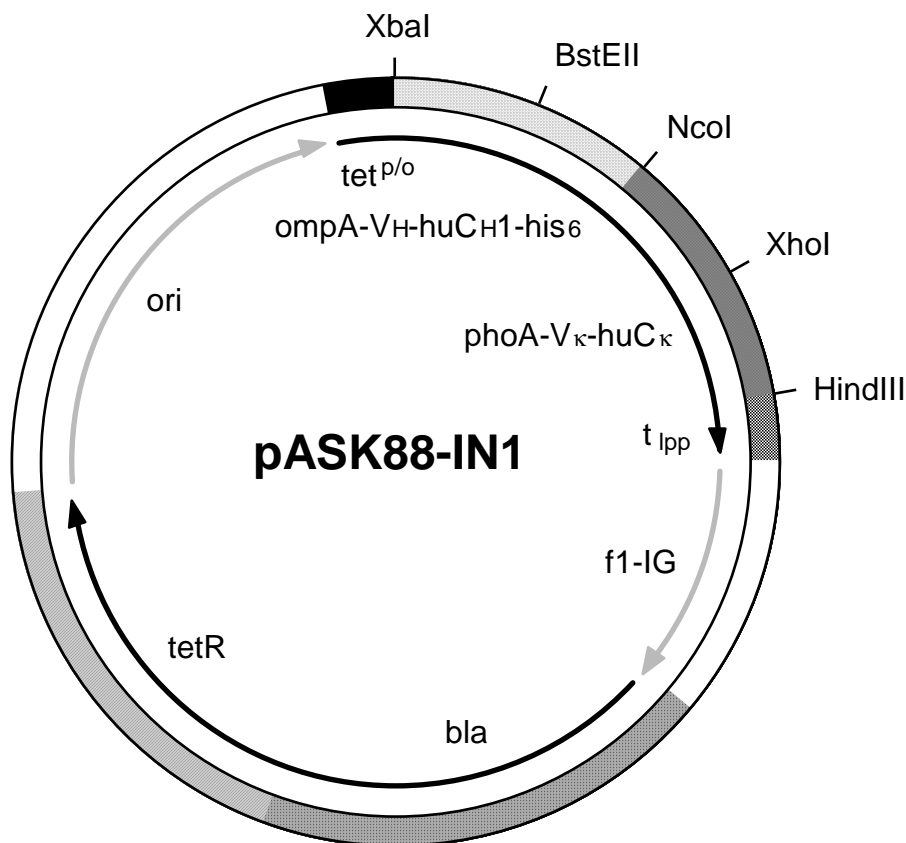
### 3.1.1 Optimierung des Fermentationsverfahrens zur Herstellung eines partiell humanisierten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments in *E. coli* unter Minimierung des Plasmidverlustes in der Fermentationskultur

In einem ersten Schritt zur Humanisierung des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (vom Typ IgG1 der Maus) war der Expressionsvektor pASK88-IN1 (Abb. 7) hergestellt worden (Fiedler, 1997), der für ein IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment mit menschlichen konstanten Domänen der Subklasse IgG1/κ kodiert. Dieses chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment konnte in Schüttelkultur von *E. coli* produziert und mit Hilfe eines Hexahistidin-Anhängsels am Carboxy-Terminus der schweren Kette in einem Schritt gereinigt werden. Dabei war die Ausbeute mit 0,8 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> im Vergleich zur Produktion des ursprünglichen IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments um den Faktor 2,5 erhöht (Fiedler, 1997).

Die Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Fermenter wurde mit Hilfe eines Benchtop-Systems der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen) im sogenannten *Fed Batch*-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurde nach exponentiellem Wachstum zu hoher Zelldichte (OD<sub>550</sub> ≥ 20) und Induktion der Fremdgen-Expression die gesamte Bakterienkultur durch Zentrifugation geerntet und weiterverarbeitet (Yee und Blanch, 1992). Für die Kultivierung der Bakterien wurden Reaktionsgefäße von 5 oder 10 L Nutzvolumen und einsetzbarem Rührwerk mit Umwurfzylinder verwendet.

Während des Fermentationsverlaufs wurden durch die integrierte Meß- und Regeltechnik die Temperatur bei 25 °C, der pH-Wert bei 7,5 und der pO<sub>2</sub>-Wert bei mindestens 30 % relativer Luftsättigung konstant gehalten. Als Medium wurde ein Mineralsalz-Medium mit 20 % (w/v) Glucose als einziger Kohlenstoffquelle und essentiellen Spurenelementen sowie Ampicillin (100 mg/L) als Antibiotikum verwendet. Dabei diente die zur pH-Regelung zugesetzte 12,5 %ige (w/v) Ammoniaklösung als Stickstoffquelle. Da der *E. coli* K12 Stamm JM83, der für die gentechnische Proteinproduktion in Schüttelkultur aufgrund der hohen erzielten Ausbeuten besonders geeignet war, wegen seiner Auxotrophie für Prolin nicht für das Wachstum in Minimalmedium verwendet werden konnte, wurde der *E. coli* Wildtyp-Stamm W3110 für die Fermentation herangezogen. Als Expressionsvektor wurde pASK88-IN1 (Abb. 7) verwendet.

Die Zellen zeigten reproduzierbar exponentielles Wachstum und hatten typischerweise nach ca. 19 Stunden eine OD<sub>550</sub> von 20 erreicht, woraufhin die Induktion mit 0,5 mg/L Anhydrotetracyclin erfolgte. Nach 1,5 bis 2 Stunden kam es im allgemeinen zur verstärkten Lyse der Zellen, was sich durch starke Schaumbildung manifestierte. Der Schaumbildung wurde durch portionierte Zugabe von Antifoam A entgegengewirkt.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pASK88-IN1, das für ein chimäres IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen des Antikörpers IN-1 (Maus, IgM/κ) sowie der C<sub>H1γ1</sub>- und der C<sub>κ</sub>-Domäne des Menschen, kodiert. Die Strukturgene V<sub>H</sub>-C<sub>H1γ1</sub> und V<sub>κ</sub>-C<sub>κ</sub> wurden an ihren 5'-Enden mit den bakteriellen Signalsequenzen des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) bzw. der alkalischen Phosphatase (PhoA) fusioniert. Am 3'-Ende des Gens der schweren Kette befindet sich eine für das Hexahistidin-Affinitätsanhängsel kodierende Sequenz (his<sub>6</sub>). Das dicistronische Gen steht unter der Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet* Promotor/Operators (tet<sup>p/o</sup>) und wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t<sub>Ipp</sub>) abgeschlossen. Die Repression des Promotors ist durch die konstitutive Expression des *tet*-Repressor-Gens (tetR) gewährleistet, das als Transkriptionsfusion hinter dem Gen der β-Lactamase (bla; Ampicillin-Resistenz) angeordnet ist. ori und f1-IG bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1. Mit Hilfe der DNA-Restriktionsendonukleasen *PstI/BstEII* (V<sub>H</sub>) und *SstI/XhoI* (V<sub>L</sub>) können die Gene für die variablen Domänen ausgetauscht werden. Über die *BstEII/NcoI*- bzw. *XhoI/HindIII*-Schnittstellen wird der Austausch der konstanten Domäne der schweren (inklusive Affinitätsanhängsel) und leichten Kette möglich (Skerra, 1994a).

Nach 2,5 Stunden wurden die Zellen bei einer OD<sub>550</sub> von ca. 40 geerntet und die periplasmatische Proteinfraktion präpariert. Nach Proteinreinigung mit Hilfe von IMAC und Bestimmung der Ausbeute zeigte der Vergleich mehrerer identisch durchgeführten Fermentationen mit W3110/pASK88-IN1 starke Schwankungen bei der Ausbeute des produzierten Proteins. So wurden in fünf aufeinanderfolgenden Experimenten im 4 L-Kulturmaßstab 9,5 mg, 36,0 mg, 23,5 mg, 20,0 mg bzw. 6,0 mg IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment produziert (Tab. 1). Zudem zeigte sich, daß das erzielte Produktionsergebnis weit unter den erwarteten Mengen für das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment lag. Ausgehend von der 2,5fach höheren

Ausbeute gegenüber dem ursprünglichen F<sub>ab</sub>-Fragment in Schüttelkultur, wären bei einer Fermentation im 4 L-Kulturmaßstab ca. 100 mg zu erwarten gewesen.

Als Kontrollexperiment wurde die Produktion des ursprünglichen IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit Hilfe von W3110/pASK85-IN1 durchgeführt. Diese Fermentation im 4 L-Maßstab ergab 35,0 mg gereinigtes Protein. Mit diesem Ergebnis konnte die Ausbeute von vorher von W. Schiweck durchgeführten Fermentationsexperimenten exakt reproduziert werden, was den Grund für die niedrigen und variierenden Ausbeuten an chimärem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment im System W3110/pASK88-IN1 vermuten ließ. Eine daraufhin erfolgte Analyse der Plasmidstabilität in der Expressionskultur mit Hilfe von Replika-Platten mit und ohne Antibiotikum, auf denen Proben der Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation (Vorkultur vor dem Überimpfen, Hauptkultur vor der Induktion, Hauptkultur vor der Ernte) ausplattiert wurden, ergab einen drastischen Verlust des Expressionsvektors pASK88-IN1 im Verlauf der Fermentation. So lag der Anteil von plasmidtragenden Zellen zum Zeitpunkt der Ernte unter den beschriebenen Bedingungen unter 50 %.

Dies deutete darauf hin, daß das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment trotz der erwiesenermaßen niedrigen Basalaktivität des *tet<sup>P/O</sup>*-Systems in der Wirtszelle in ausreichendem Maß produziert wurde, um einen Selektionsdruck gegen plasmidtragende Zellen bzw. um teilweise die Lyse der äußeren Zellmembran zu bewirken. Auf diese Weise ins Medium gelangte  $\beta$ -Lactamase hydrolysierte das dort vorhandene Ampicillin und verminderte damit den Selektionsdruck gegen plasmidfreie Zellen. Ohne diesen Selektionsdruck wuchs die Population der plasmidfreien Zellen, die zudem die vektorvermittelte Last von Replikation und Proteinsynthese nicht trug, viel rascher als plasmidtragende Zellen. Ein Beleg hierfür waren die hohen OD<sub>550</sub>-Werte zum Ende der Fermentation im Fall W3110/pASK88-IN1, die mit bis zu 45 im Gegensatz zu den niedrigen Ausbeuten standen.

### **3.1.1.1 Erhöhung der Selektionsstringenz mittels Ersatz des Ampicillin- durch ein Chloramphenicol-Resistenzgen**

Als Fazit dieser Beobachtungen wurde in darauffolgenden Fermentationen statt Ampicillin der Translationsinhibitor Chloramphenicol verwendet, der aufgrund seines Wirkungsmechanismus als stringenteres Selektionssubstrat angesehen wurde. Chloramphenicol wirkt im Gegensatz zu Ampicillin im Cytoplasma, wo es an die ribosomale 50 S-Untereinheit bindet. Auf diese Weise wird die bakterielle Peptidyltransferase gehemmt und die Proteinbiosynthese nicht-resistenter Zellen blockiert. Resistenz wird durch das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase vermittelt, welches die Acetylierung und damit die Inaktivierung des Antibiotikums katalysiert. Da das Enzym als Kosubstrat Acetyl-CoA

benötigt, sollte es selbst bei Freisetzung in das Kulturmedium infolge vollständiger Zellyse die antibiotische Wirksamkeit des Chloramphenicols kaum beeinträchtigen.

Für die Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG1/κ) im Fermenter unter Verwendung von Chloramphenicol zur Selektion mußte zunächst ein geeigneter Expressionsvektor hergestellt werden. Hierzu wurde das Plasmid pASK75cat(-), ein Derivat von pASK75 (Skerra, 1994a), welches stromaufwärts des *tet*-Promotors zusätzlich das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*) – in entgegen dem Replikationsursprung gerichteter Orientierung – trägt, verwendet. Die Genkassette für das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment wurde mit Hilfe der DNA-Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III aus pASK88-IN1 herausgeschnitten und in pASK75cat(-) inseriert.

Mit dem erhaltenen Vektor pASK88cat(-)-IN1 transformierte *E. coli* W3110-Zellen wurden zur Fermentation verwendet. Die Kultur wies das bekannte exponentielle Wachstumsverhalten auf und erreichte nach 17 Stunden eine OD<sub>550</sub> von 20. Nach Induktion der Genexpression war nur schwache Schaumbildung zu erkennen. Der OD<sub>550</sub>-Wert zum Zeitpunkt der Ernte betrug 39. Die Analyse der Vektorstabilität während der Fermentation ergab zum Zeitpunkt der Ernte – trotz der Verwendung von Chloramphenicol – einen Anteil von 15 % plasmidfreien Zellen in der Kultur. In drei unabhängigen Fermentationsexperimenten im 4 L-Maßstab wurden jedoch reproduzierbare Ausbeuten von jeweils ca. 45 mg erzielt (Tab. 1), was auf die Stabilisierung der Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG1/κ) durch Verwendung von W3110/pASK88cat(-)-IN1 schließen ließ.

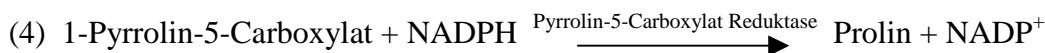
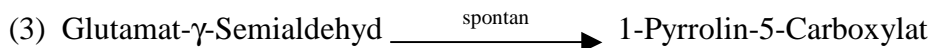
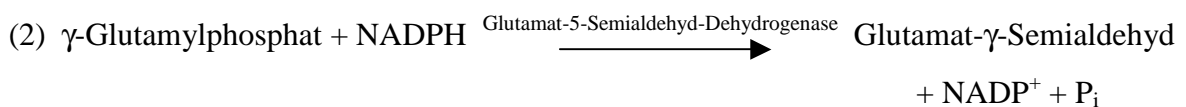
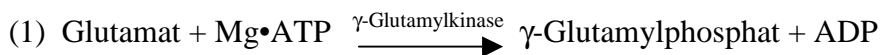
### 3.1.1.2 Konstruktion und Verwendung des Vektors pMF1 zur *proBA*-Komplementierung von *E. coli* JM83

Trotz der verbesserten Ausbeute bei der Fermenter-Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG1/κ) unter Verwendung von W3110/pASK88cat(-)-IN1 lag die zellbezogene Ausbeute an Protein mit 0,3 mg L<sup>-1</sup> OD<sub>550</sub><sup>-1</sup> noch um den Faktor 2,5 niedriger, als bei Experimenten mit JM83/pASK88-IN1 im Schüttelkolben. Ein Grund dafür wurde in der Wahl des Expressionsstammes *E. coli* W3110 vermutet.

Einzelne *E. coli* Stämme können gravierende Unterschiede bei der Produktion von heterologen Proteinen zeigen. Diese Unterschiede können sich im Wachstumsverhalten äußern oder auch in der Effizienz, mit der sich das Fremdprotein in dem jeweiligen Stamm korrekt faltet (Sambrook *et al.*, 1989). Der *E. coli* K12 Stamm JM83, der im Labor von Prof. Skerra seit längerem für die gentechnische Produktion von Proteinen im Schüttelkolben verwendet wird, ist bekannt dafür, daß er die synthetisierten Immunglobulin-Polypeptidketten mit vergleichsweise hoher Effizienz in den periplasmatischen Raum sekretiert bzw. korrekt

faltet. Aufgrund seiner Auxotrophie für Prolin, die auf einer chromosomalen Deletion des *proBA*-Operons beruht und sein Wachstum in Minimalmedium verhindert, konnten die Vorzüge dieses Stammes bislang allerdings nicht für die Fermentation genutzt werden.

Der *proBA*-Locus kodiert für die Enzyme  $\gamma$ -Glutamykinase (ProB) und Glutamat-5-Semialdehyd-Dehydrogenase (ProA), die in der Prolin-Biosynthese eine essentielle Rolle spielen (Baich, 1969; Baich, 1971):

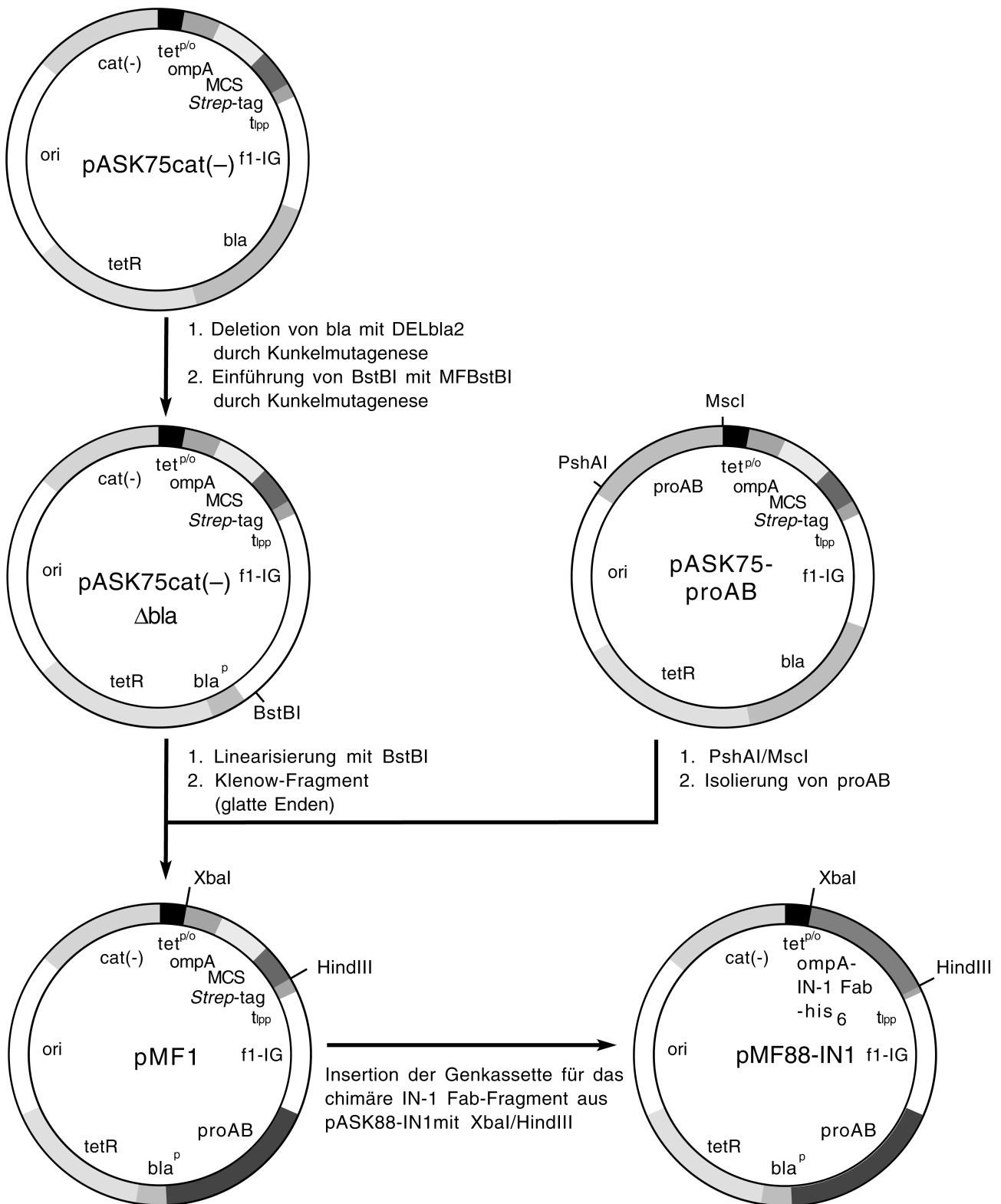


Um JM83 für die Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Fermenter nutzbar zu machen und dabei gleichzeitig den Selektionsdruck gegen plasmidfreie Zellen in der Expressionskultur weiter zu erhöhen, wurde ein Expressionsvektor konstruiert, der das *proBA*-Operon von *E. coli* trug. Von mehreren Klonierungsstrategien, die hierzu verfolgt wurden, war letztlich die Konstruktion von pMF88-IN1 erfolgreich (Abb. 8).

pMF88-IN1 wurde ausgehend von pASK75cat(-) und pASK75proAB in drei Schritten konstruiert. pASK75proAB war bereits im Vorfeld hergestellt worden und trug das gesamte durch PCR aus chromosomaler *E. coli*-DNA amplifizierte *proBA*-Operon stromaufwärts des *tet*-Promoters. In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe des Oligodesoxynukleotides MF-DELbla2 durch ortsgerichtete Mutagenese von pASK75cat(-) das Gen für die  $\beta$ -Lactamase (*bla*) größtenteils deletiert, um die Vektorgröße zu minimieren.

Um die effiziente Transkription des Gens für das Tet-Repressorprotein, das in pASK75cat(-) ein dicistronisches Operon mit *bla* bildet (Skerra, 1994b), zu gewährleisten, wurden die ribosomale Bindungsstelle (RBS), die ersten sieben Codons des  $\beta$ -Lactamase-Gens und das Stop-Codon beibehalten. Auf diese Art wurde gemeinsam mit dem *tetR*-Transkriptionsstart eine „Tandem-RBS“ gebildet. Gleichzeitig wurde eine *Bst*BI-Schnittstelle (Oligodesoxynukleotid MF-BstBI) oberhalb des *bla*-Promotors eingeführt (Abb. 8).

A)



## B)

```

-35          -10          +1          ****
TACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAG

          ****
TATGAGTATTCAACATTTCCGTTAGGAATTAATGATGTCTCGTTTAGATAAAAAGT
MetSerIleGlnHisPheArgEnd          MetSerArgLeuAspLysSer
bla ⇒                               tetR ⇒

```

## C)

```

(↓)          -35          -10          ****
CCATTcAGTCCTGCTAAAAACGTTTCGTTTGATATCATTTCCTAAAAATTGAATGGCAGAGAATCATGAGTGAC
MetSerAsp
⇐⇐ blaP                                     proB ⇒

          [ . . . ]
          >>>>>>> >>>>> > > >>> > >>> <<<< < <<<< < < <<<<<<<<<<<<
CGTGCCTAAATAAAAACCGGGTGATGCAAAAGTAGCCATTTGATTACACAAGGCCATTGACGCATCGCCCGGTTA
ArgAlaEnd
⇐ proA

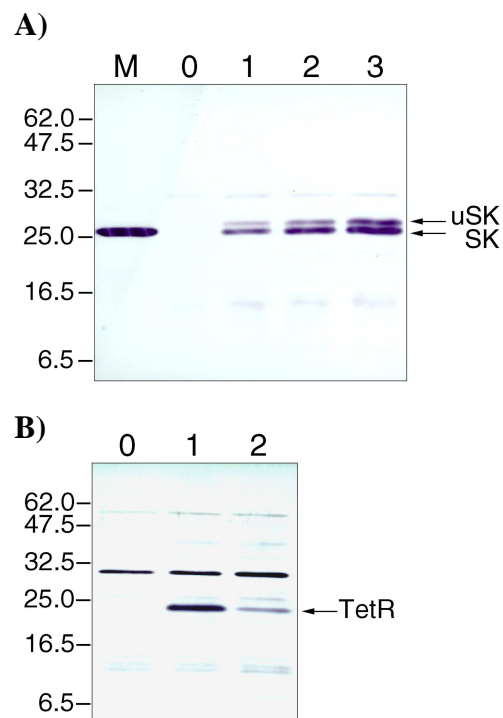
          (↓)
GTTTTAACCTTGTCACCGTGATTCACGTTTCGTGAACATGgCGAAATTGTAA
          ⇒⇒ f1-IG

```

**Abbildung 8:** Konstruktion des Expressionsvektors pMF88-IN1. DNA-Sequenz der doppelten ribosomalen Bindungsstelle und der transkriptionsregulierenden Elemente des *proBA*-Operons (Deucht *et al.*, 1984) auf dem resultierenden Vektor. **A)** Klonierungsschema. Die Ausgangsvektoren pASK75cat(-) und pASK75proAB sind Derivate von pASK75 (Skerra, 1994b) und tragen dessen *Multiple Cloning Site* (MCS) sowie die DNA-Sequenz für das *Strep*-Tag. cat(-) und proBA bezeichnen das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (Chloramphenicol-Resistenz) und das *proBA*-Operon jeweils in der dem Replikationsursprung (*ori*) entgegengesetzten Orientierung (weitere Erläuterungen s. Abb. 7). Es sind nur die für die Klonierung verwendeten Restriktions-Schnittstellen angegeben. **B)** Tandem-RBS stromabwärts des *bla*<sup>P</sup>-Promotors (*bla*<sup>P</sup>). Die „-35“ und „-10“ Konsensussequenzen von *bla*<sup>P</sup> sowie der Startpunkt der Transkription (+1) sind unterstrichen (Stüber und Bujard, 1981). Nach den ersten sieben Codons wird der *bla*-Leserahmen durch ein Stop-Codon terminiert, dem seinerseits das *tetR*-Gen folgt. Die jeweiligen Shine-Dalgarno-Sequenzen sind durch Sterne markiert. **C)** Transkriptionskontrolle von *proBA* (Deucht, 1984). Die „-35“ und „-10“ Konsensussequenzen des *proBA*-Promotors sind unterstrichen. Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist durch Sterne markiert. Die palindrome Sequenz des *proBA*-Terminators liegt abwärts von f1-IG und ist zusammen mit dem Symmetriezentrum markiert. Die Positionen des Übergangsvektors pASK75cat(-)Δbla, zwischen denen die Insertion des *proBA*-Operons erfolgte, sind durch senkrechte Pfeile angegeben.

Um die konstitutive Synthese der  $\gamma$ -Glutamylkinase (ProB) und der Glutamat-5-Semialdehyd Dehydrogenase (ProA) zu erreichen, wurde anschließend das komplette *proBA*-Operon aus pASK75proAB herausgeschnitten und in das durch die neu eingeführte *Bst*BI-Schnittstelle linearisierte Übergangsplasmid pASK75cat(-)Δbla inseriert (Abb. 8). Aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie, die die Ligierung glatter DNA-Enden beinhaltet, waren grundsätzlich zwei Orientierungen des inserierten Operons relativ zum Replikationsursprung (*ori*) möglich. Interessanterweise wiesen alle zehn analysierten Klone eine entgegen der Orientierung des *ori* gerichtete Lage von *proBA* auf. In einem letzten Schritt wurde die Genkassette für das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment (Mensch IgG1/ $\kappa$ ) mit Hilfe von *Xba*I und *Hind*III in pMF1 inseriert und so der Vektor pMF88-IN1 erhalten.

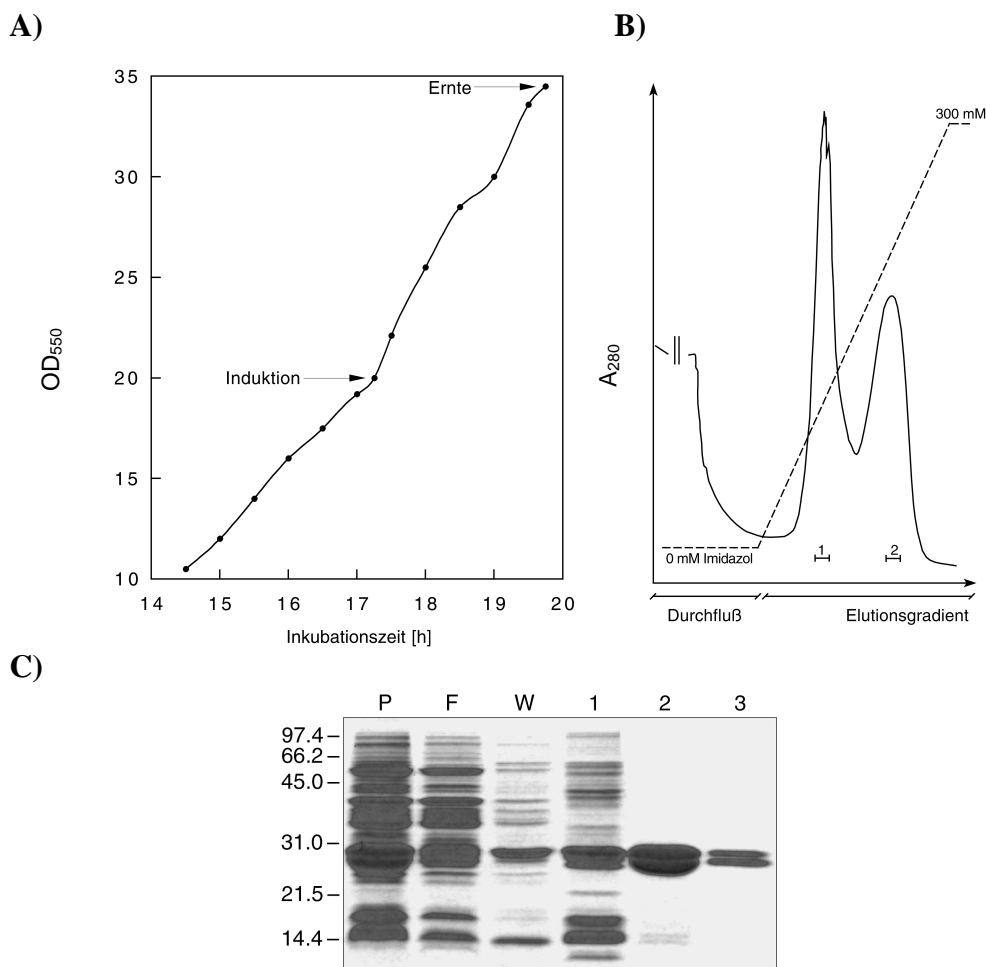
Die Funktionalität von pMF1 bzw. pMF88-IN1 hinsichtlich der Komplementierung der  $\Delta proBA$ -Mutation von *E. coli* JM83 wurde durch Anzucht entsprechender Transformanden auf Agar-Platten mit Glucose-Minimalmedium oder in 100 ml des synthetischen Fermentationsmediums nachgewiesen. Für die Analyse der Fremdgen-Regulation durch das  $tet^{p/o}$ -System auf pMF88-IN1 wurde durch Western-Blotting einerseits der Gehalt an F<sub>ab</sub>-Fragment im Gesamtzellprotein zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Induktion sowie andererseits die Menge an Tet-Repressorprotein untersucht (Abb. 9). In Abwesenheit des Induktors konnte kein rekombinantes IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment detektiert werden. Nach der Aktivierung des Tet-Promotors durch Anhydrotetracyclin nahm die Menge des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Gesamtzellprotein kontinuierlich zu.



**Abbildung 9:** Analyse der Fremdgen-Regulation auf dem Expressionsvektor pMF88-IN1. **A)** Nachweis der schweren Kette des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (SK) und seines unprozessierten Vorläufer-Proteins (uSK) auf einem Western-Blot von Gesamtzellprotein der Expressionskultur. Der Nachweis erfolgte über das Hexahistidin-Affinitätsanhängsel mit Hilfe eines Ni-NTA/Alkalische Phosphatase-Konjugats. Aufgetragen wurden 1 µg gereinigtes chimäres IN-1 F<sub>ab</sub> Fragment (M) sowie jeweils 10 µl des Gesamtprotein-Extraktes aus 0,5 ml Kultur von JM83/pMF88-IN1 direkt vor (0) sowie eine bis drei Stunden nach der Induktion (1 - 3). Molmassen des Elektrophorese-Standards sind am linken Gelrand in kDa angegeben. **B)** Vergleich der Synthese des Tet-Repressorproteins in JM83/pASK88-IN1 und JM83/pMF88-IN1. TetR wurde auf einem Western-Blot von je 20 µl Gesamtzellprotein aus jeweils 0.5 ml Kultur (OD<sub>550</sub> = 0,5) mit Hilfe eines Anti-TetR-Serums aus Kaninchen detektiert. Als Zweitantikörper diente ein Anti-Kaninchen/Alkalische Phosphatase-Konjugat. Aufgetragen wurde Gesamtzellprotein von nicht transformierten JM83-Zellen (0), von JM83/pASK88-IN1 (1) und JM83/pMF88-IN1 (2). Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben.



Die Kontrolle der Genexpression des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments war dementsprechend für pMF88-IN1 ähnlich gut, wie sie für das pASK75-System nachgewiesen worden war (Skerra, 1994b). Überraschenderweise war die Menge an Tet-Repressorprotein im Gesamtprotein von JM83/pMF88-IN1 im Vergleich zu Transformanden von pASK88-IN1 um ca. 75 % vermindert. Die weitere Analyse dieses Phänomens ergab eine um 1/3 niedrigere Plasmid-Kopienzahl pro Zelle im pMF-System, was offenbar eine verringerte Gendosis bewirkte.



**Abbildung 10:** Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG/κ) durch JM83/pMF88-IN1 im 4 L-Fermenter unter Verwendung eines Glucose/Mineralsalz-Mediums mit Chloramphenicol als Antibiotikum. **A)** Das Wachstum der Kultur wurde durch halbstündliche Messung der optischen Dichte bei 550 nm dokumentiert. Die Expression der Gene für das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment wurde bei OD<sub>550</sub> = 20 induziert und die Zellen nach 2,5 Stunden nach Induktion mittels Zentrifugation geerntet. **B)** Die Reinigung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von (A) erfolgte durch IMAC. Die ansteigende Imidazolkonzentration im Elutionsgradienten von 0 bis 300 mM ist markiert. **C)** Analyse der IMAC-Fractionen aus (B) durch SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl des periplasmatischen Proteinextraktes (P), des nicht an die Säule gebundenen Proteins (F), der Waschfraktion vor Anlegen des Elutionsgradienten (W) sowie die Elutionsfraktionen von schwach an die Säule gebundenem Wirtspolypeptid (1) und kompetitiv eluiertem, rekombinantem Protein (2). In Spur 3 wurde 1 µg des durch Rechromatographie (IMAC) nochmals gereinigten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments aufgetragen. Alle Proben wurden mit β-Mercaptoethanol-haltigem Auftragspuffer versetzt, was zur Trennung von schwerer und leichter Kette bei der Elektrophorese führte.

Zur Fermenterproduktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG1/κ) mit Hilfe von JM83/pMF88-IN1 wurde chloramphenicolhaltiges Glucose-Minimalmedium (4 L) angeimpft. Bei exponentiellem Wachstum erreichte die Hauptkultur nach 17 Stunden eine OD<sub>550</sub> von 20, woraufhin die Induktion der Fremdgen-Expression erfolgte (Abb. 10). Während der Synthese des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments war nur schwache Schaumbildung zu erkennen. Der OD<sub>550</sub>-Wert zum Zeitpunkt der Ernte betrug 34. Die Analyse der Vektorstabilität ergab über den gesamten Zeitraum der Fermentation keinerlei Plasmidverlust, und selbst zum Zeitpunkt der Ernte konnten keine plasmidfreien Zellen in der Kultur nachgewiesen werden. Das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment wurde wie zuvor mittels IMAC gereinigt und Reinheit sowie Ausbeute bestimmt (Abb. 10). Als Resultat konnten 80,0 mg gereinigtes chimäres IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment (Mensch IgG1/κ) aus einer 4 L-Fermentationskultur gewonnen werden (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Wachstumsverhalten und Proteinausbeuten von *E. coli* W3110 bzw. JM83 bei der Fermenterproduktion (4 L) des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG1/κ) unter Verwendung von unterschiedlichen Expressionsvektoren und Selektionssystemen.

	W3110	W3110	JM83
	pASK88-IN1	pASK88 cat(-)-IN1	pMF88-IN1
Selektion	Ampicillin (Ap <sup>r</sup> )	Chloramphenicol (Cm <sup>r</sup> )	Chloramphenicol (Cm <sup>r</sup> ) Minimalmedium ( <i>proBA</i> )
Wachstumsdauer bis Indukt. [h] <sup>a,b</sup>	19	17	17
Plasmidverlust bei Induktion [%]	10	10	0
Zelldichte bei Ernte [OD <sub>550</sub> ] <sup>c</sup>	42	39	34
Plasmidverlust bei Ernte [%]	50	15	0
Ausbeute an IN-1 F <sub>ab</sub> [mg]	20 <sup>d</sup>	45	80
relative Ausbeute [mg L <sup>-1</sup> OD <sup>-1</sup> ]	0,15	0,3	0,6

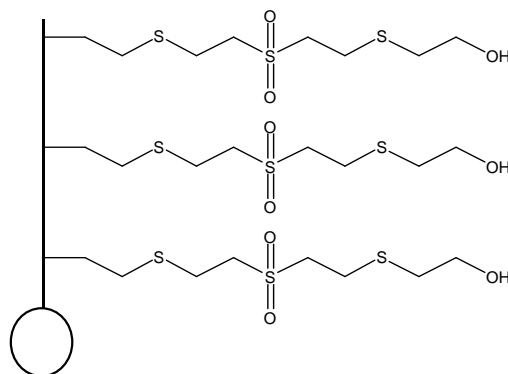
<sup>a</sup> Die Fermentations-Hauptkultur wurde mit 200 ml einer stationären Vorkultur, welche in Fermentationsmedium bei 37 °C in die stationäre Phase (OD<sub>550</sub> = 2,0) gewachsen war, angeimpft. <sup>b</sup> Die Induktion erfolgte bei OD<sub>550</sub> = 20 durch Zugabe von 500 µg aTc pro L. <sup>c</sup> Die Zellernte erfolgte 2,5 h nach Induktion. <sup>d</sup> Mittelwert aus fünf Fermentationsexperimenten.

Die Ausbeute lag damit viermal höher als bei den Fermentationen, bei denen W3110 als Expressionsstamm und Ampicillin zur Selektion benutzt worden waren. Im Vergleich zur Fermentation mit W3110 und Chloramphenicol konnte immer noch eine Verdopplung der erzielten Menge an Fremdprotein erreicht werden. Bemerkenswerterweise lag die relative Ausbeute des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments bei der Verwendung von JM83/pMF88-IN1 im Fermenter bei 0,6 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> und damit ähnlich hoch wie bei JM83/pASK88-IN1 (0,8 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>) im Schüttelkolben mit Vollmedium (Tab. 1).

### 3.1.2 Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für rekombinante F<sub>ab</sub>-Fragmente ohne die Notwendigkeit eines Affinitätsanhängsels

Im Zusammenhang mit der gentechnischen Produktion zur Bereitstellung des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG/κ) für vorklinische *In vivo*-Experimente wurde eine Reinigungsmethode entwickelt, die unabhängig von einem Affinitätsanhängsel angewendet werden kann. Eine eventuelle immunogene Wirkung z. B. des His<sub>6</sub>-Tags bei der Anwendung am Versuchstier oder am Patienten sollte so vermieden werden.

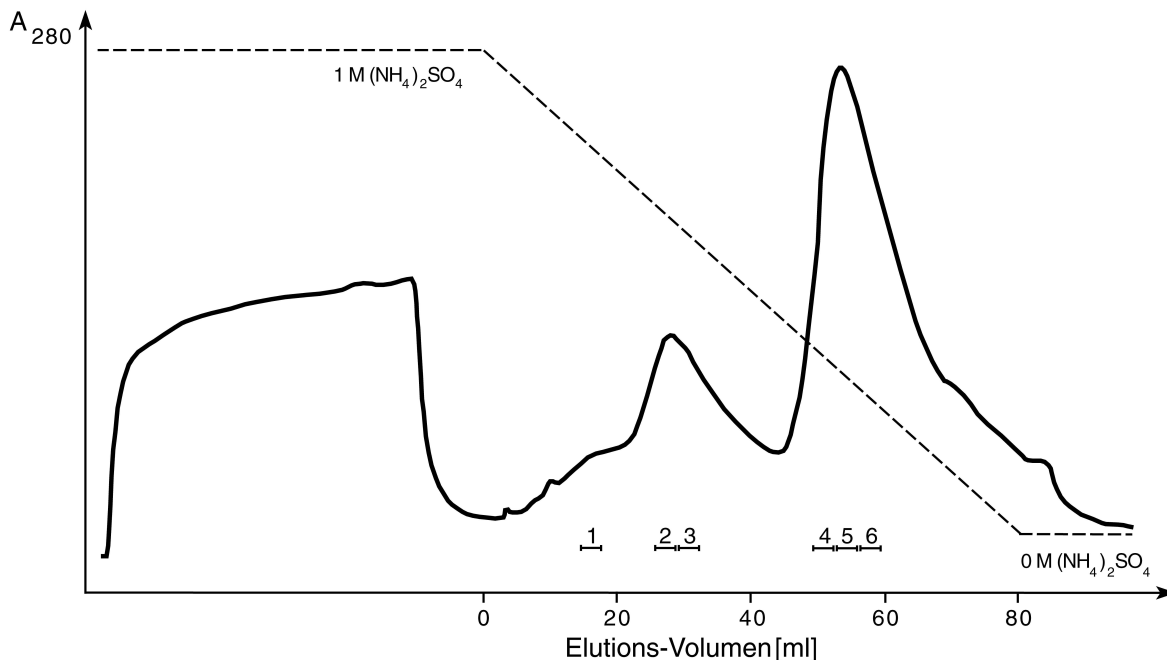
Als vielversprechende allgemeine Reinigungsmethode für rekombinante F<sub>ab</sub>-Fragmente bot sich die Thiophile Adsorptionschromatographie (TAC) an. Die Affinität von thioether-substituierten Sulfongruppen (Abb. 11), die gruppenspezifisch für Immunglobuline ist, zu definierten hydrophoben Bereichen dieser Proteinklasse ist als „thiophile“ Interaktion bezeichnet worden (Porath und Belew, 1987). Die Wechselwirkung zwischen dem Schwefel-Ligand und dem Immunglobulin scheint hauptsächlich von dem Vorkommen aromatischer Aminosäuren auf der Proteinoberfläche abzuhängen. Vermutlich erfolgt die thiophile Interaktion hauptsächlich durch Elektronenübertragungsprozesse (Porath und Belew, 1987). Praktisch nutzbar sind diese Wechselwirkung in Gegenwart eines kosmotropen Salzes in molarer Konzentration.



**Abbildung 11:** Struktur des schwefelhaltigen Liganden an Fraktogel<sup>®</sup> EMD TA 650 (S) für die thiophile Interaktion mit Immunglobulinen.

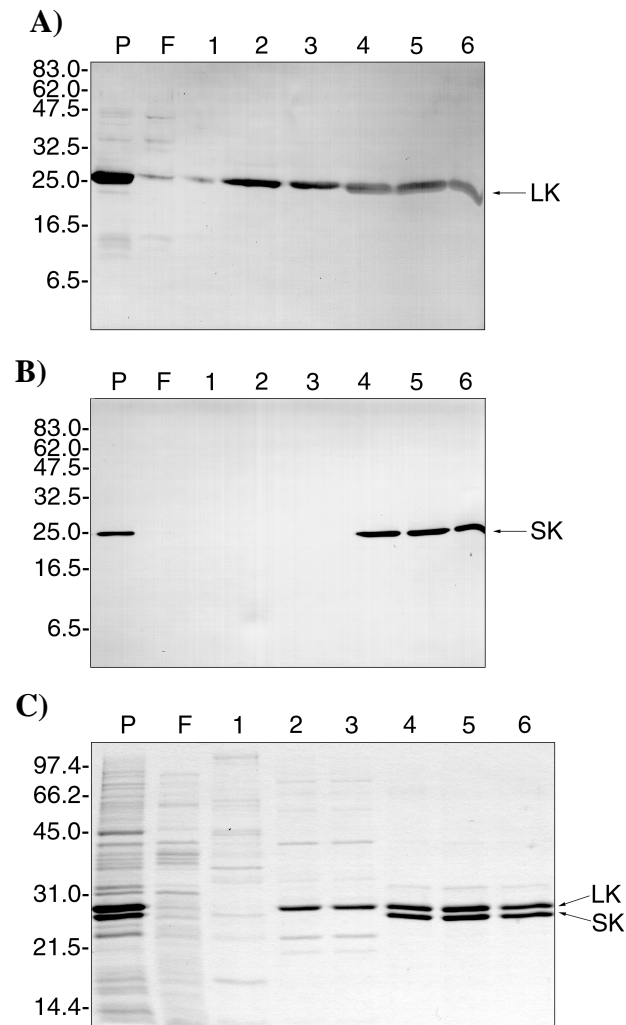
Unter Ausnutzung dieses Prinzips konnten bisher intakte Immunglobuline aus verschiedenen Zell- und Gewebefractionen mit Hilfe sogenannter T-Gele (Porath *et al.*, 1985) gereinigt werden. Im Fall bakteriell produzierter Antikörperfragmente war die Thiophile Adsorptionschromatographie bislang lediglich zur Anreicherung eines scF<sub>v</sub>-Fragments aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* verwendet worden (Schulze *et al.*, 1994).

Für die vorliegende Arbeit wurde das Säulenmaterial Fraktogel<sup>®</sup> EMD TA 650 (S) der Firma Merck verwendet (Abb. 11). Die periplasmatische Proteinfraction von JM83/pASK88-IN1 aus einer 2 L LB/Amp-Kultur wurde präpariert, gegen 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5 dialysiert und auf 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt. Diese Proteinlösung wurde direkt auf die Säule mit dem T-Gel gegeben (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Elutionsprofil für die Reinigung des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Mensch IgG/κ) aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* mittels Thiophiler Adsorptionschromatographie (TAC). Der Verlauf der Chromatographie wurde durch kontinuierliche Absorptionsmessung bei 280 nm ( $A_{280}$ ) verfolgt. Der abfallende Elutionsgradient von 1,0 bis 0,0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Fraktionen, die mittels SDS-PAGE analysiert wurden (Abb. 13), sind angegeben.

Das Adsorptions- und Elutionsverhalten, bei abfallendem (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gradienten, des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments wurde durch SDS-PAGE und Western Blotting untersucht (Abb. 13). Dabei zeigte sich, daß beide Ketten des Immunglobulinfragments offenbar quantitativ an die Säulenmatrix adsorbierten und im Durchlauf nicht nachzuweisen waren.



**Abbildung 13:** Analyse der mittels TAC gewonnenen Fraktionen aus Abbildung 12 durch SDS-PAGE. Die leichte (A) und schwere (B) Kette des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments wurden mit Hilfe eines Anti-Human-C<sub>κ</sub> Antikörper/Alkalische Phosphatase-Konjugat bzw. eines Ni-NTA/Alkalische Phosphatase-Konjugates auf separaten Western Blots detektiert. In (C) ist das entsprechende SDS-Gel nach Färbung mit Coomassie gezeigt. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl der periplasmatischen Proteinfraktion von JM83/pASK88-IN1 (P), nicht an die Säule gebundenes Protein (F) sowie die in Abbildung 12 angegebenen Elutionsfraktionen (1 - 6). LK, leichte Kette; SK, schwere Kette. Molmassen sind jeweils am linken Gelrand in kDa angegeben.

Der größte Teil der bakterieneigenen Proteine passierte die Säule hingegen bereits beim Beladen oder wurde zu Beginn des abfallenden Elutionsgradienten bis ca. 0,8 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ausgewaschen. Interessanterweise wurde daraufhin zunächst das Homodimer der leichten Kette – quasi als rekombinantes Bence-Jones Protein (Stevens *et al.*, 1991) – von der Säule gewaschen. Das Protein aus den vermutlich gepaarten leichten Ketten wurde bei einer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,7 M eluiert, während schließlich am Ende des Gradienten (0,25 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) reines IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment – also das korrekt assemblierte Heterodimer aus schwerer und leichter Kette – in einem symmetrischen Peak eluiert wurde.

Das auf diese Weise gewonnene Protein wies einen hohen Reinheitsgrad auf (> 95 %) und ein stöchiometrisches Verhältnis von schwerer und leichter Kette. Der Reinigungsverlauf des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments durch TAC ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. Der niedrig erscheinende Wert für die relative Ausbeute und beruht darauf, daß typischerweise ein erheblicher Teil des Ig-Fragments als nichtfunktionelles Aggregat im Periplasma vorliegt (Skerra und Plückthun, 1991) und zudem ein Überschuß an löslicher leichter Kette im periplasmatischen Extrakt vorhanden ist.

**Tabelle 2:** Reinigung von rekombinatem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment mittels TAC.

	Masse [g]	Volumen [ml]	Gesamtprotein [mg]	IN-1 Ig [mg]	Ig Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
Nassgewicht der Zellen <sup>a</sup>	4,0	—	660 <sup>b</sup>	40 <sup>c,d</sup>	100 <sup>c</sup>	1
Periplasmaextrakt	—	20,0	10,0 <sup>e</sup>	4,0 <sup>d</sup>	10,0	6,6
TAC-Eluat	—	14,0	1,7 <sup>e</sup>	1,6 <sup>f</sup>	4,0	15,4

<sup>a</sup> Aus 2 L Kultur (OD<sub>550</sub> = 0,85); <sup>b</sup> Berechnet nach Neidhardt *et al.* (1990); <sup>c</sup> Beinhaltet die aggregierte Fraktion des rekombinanten Proteins; <sup>d</sup> Abschätzung mittels Western Blot mit Hilfe einer Verdünnungsreihe gereinigten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments als internem Standard; <sup>e</sup> Proteinkonzentration durch BCA-Test bestimmt; <sup>f</sup> Proteinkonzentration durch Absorptionmessung bei 280 nm mit Hilfe eines kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten von 1,8 ml mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bestimmt.

Das Elutionsverhalten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments erwies sich als unabhängig von der Herkunft seiner konstanten Domänen, wie durch Vergleich mit der Reinigung des ursprünglichen IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Maus IgG/κ) aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von JM83/pASK85-IN1 nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Auch die Substitution des Hexahistidin-Anhängsels durch das *Strep*-Tag (Expressionsvektor pASK107-IN1) zeigte keine Auswirkung auf die Reinigung des Ig-Fragments mittels TAC, was in Einklang mit der Funktion dieser Reinigungsmethode unabhängig von einem Affinitätsanhängsel steht.

Für die variablen Domänen konnte hingegen ein Einfluß auf das Elutionsverhalten während der TAC nachgewiesen werden. Bei der Reinigung der Mutante A<sup>L32</sup>→F des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Kap. 3.3.2) wurde eine dramatische Verlängerung der Retentionszeit beobachtet. Die Elution des Homodimers der leichten Kette fand erst bei einer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,25 M statt. Die Elution des Heterodimers begann dagegen erst am Ende des abfallenden Gradienten, und zu seiner vollständigen Auswaschung war es notwendig, mit einem Puffer schwacher Ionenstärke (50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5) nachzuspülen.

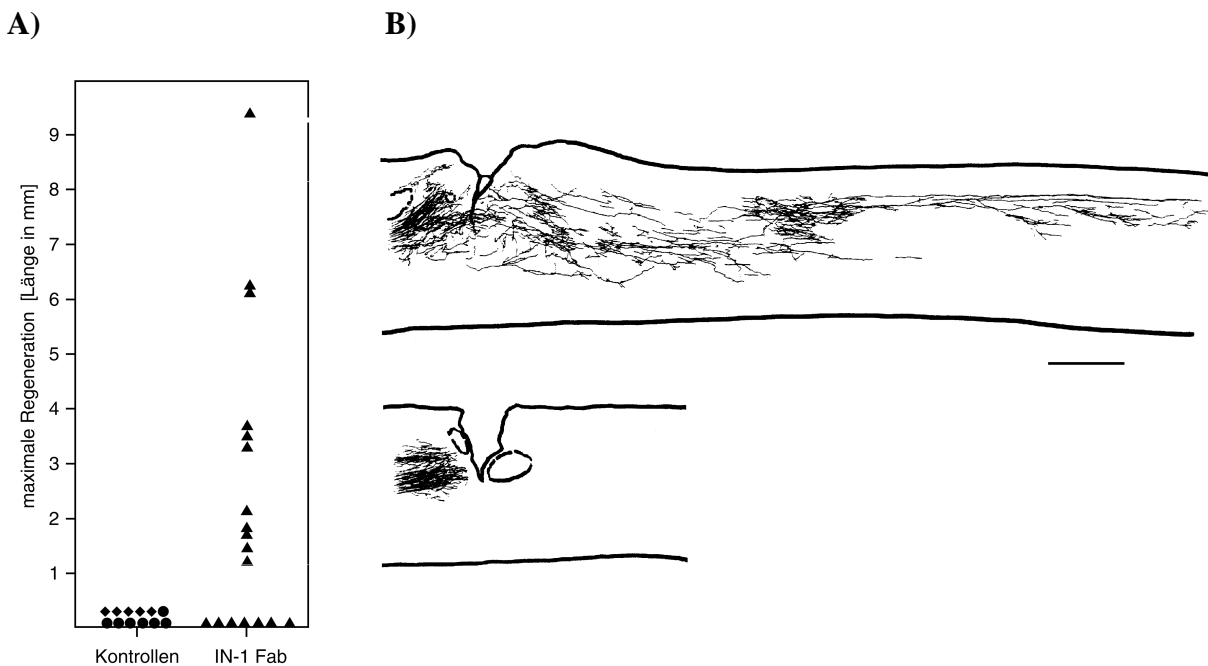
Weiterhin wurde das chimäre F<sub>ab</sub>-Fragment (Mensch IgG/κ) des Anti-Lysozym-Antikörpers D1.3 durch das T-Gel offenbar nicht ausreichend retardiert und im Durchfluß detektiert. Hingegen adsorbierten die rekombinanten F<sub>ab</sub>-Fragmente der Anti-CD30 und Anti-CD16 Antikörper HRS3 und A9 an die Säule und konnten – nach individueller Optimierung von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentration und Gradientenvolumen – erfolgreich gereinigt werden (M. Schlapschy, persönliche Mitteilung).

### 3.1.3 Einsatz des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments zum Studium der neuronalen Regeneration *in vivo*

Nach der Optimierung von Produktion und Reinigung des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und der Bereitstellung einer inaktiven Mutante A<sup>L32</sup>→F (siehe Kapitel 3.3.2) wurden *In vivo*-Experimente an adulten Ratten durchgeführt, denen im Bereich des thoracalen Rückenmarks eine Hemisektion zugefügt worden war. Im Gegensatz zur Behandlung mit dem IgM/κ-Antikörper, bei der den Versuchstieren ein antikörperproduzierender Tumor in den Ventrikel implantiert worden war (Schnell und Schwab, 1990), konnten die rekombinanten F<sub>ab</sub>-Fragmente durch Verwendung von subkutan implantierten osmotischen Minipumpen lokal appliziert werden.

Für diese Anwendung wurden die durch Fermentation von *E. coli* W3110/pASK88cat(-)-IN1 gewonnenen und zweifach durch IMAC gereinigten F<sub>ab</sub>-Fragmente in den eigens hierfür entwickelten *Cerebrospinal Buffer* (CSB) überführt, der hinsichtlich seiner Ionenzusammensetzung dem Liquor entspricht (Schmidt, 1987). Ein Zusatz von Citrat mit geringer Konzentration (Kap. 2.4.4) diente als milder physiologischer Komplexbildner, um einer schwermetallvermittelten Präzipitation über das His<sub>6</sub>-Tag entgegenzuwirken. Die Proteinlösungen wurden auf 5,0 mg/ml konzentriert und sterilfiltriert.

Die *In vivo*-Experimente zur Regeneration der corticospinalen Nervenstränge von Ratten wurden im Labor von Prof. Schwab an der ETH Zürich durchgeführt (Broesamle *et al.*, 2000). Dabei konnte gezeigt werden, daß das infundierte IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment in 11 von 18 Tieren ein Wiederauswachsen der Nervenfasern um zum Teil mehr als 9 mm caudal der Läsion ermöglichte (Abb. 14). Die regenerierten Neuronen zeigten distale Arborisierung und die Ausbildung von Präsynapsen, was auf ihre Funktionalität hinwies. Im Gegensatz dazu ergab die Behandlung von Kontrolltieren mit dem IN-1 (<sup>L32</sup>F) F<sub>ab</sub>-Fragment oder mit BSA keinerlei Anzeichen für neuronale Regeneration. Mit diesen Experimenten konnte die biologische Aktivität des rekombinanten, chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments erstmals *in vivo* nachgewiesen werden.



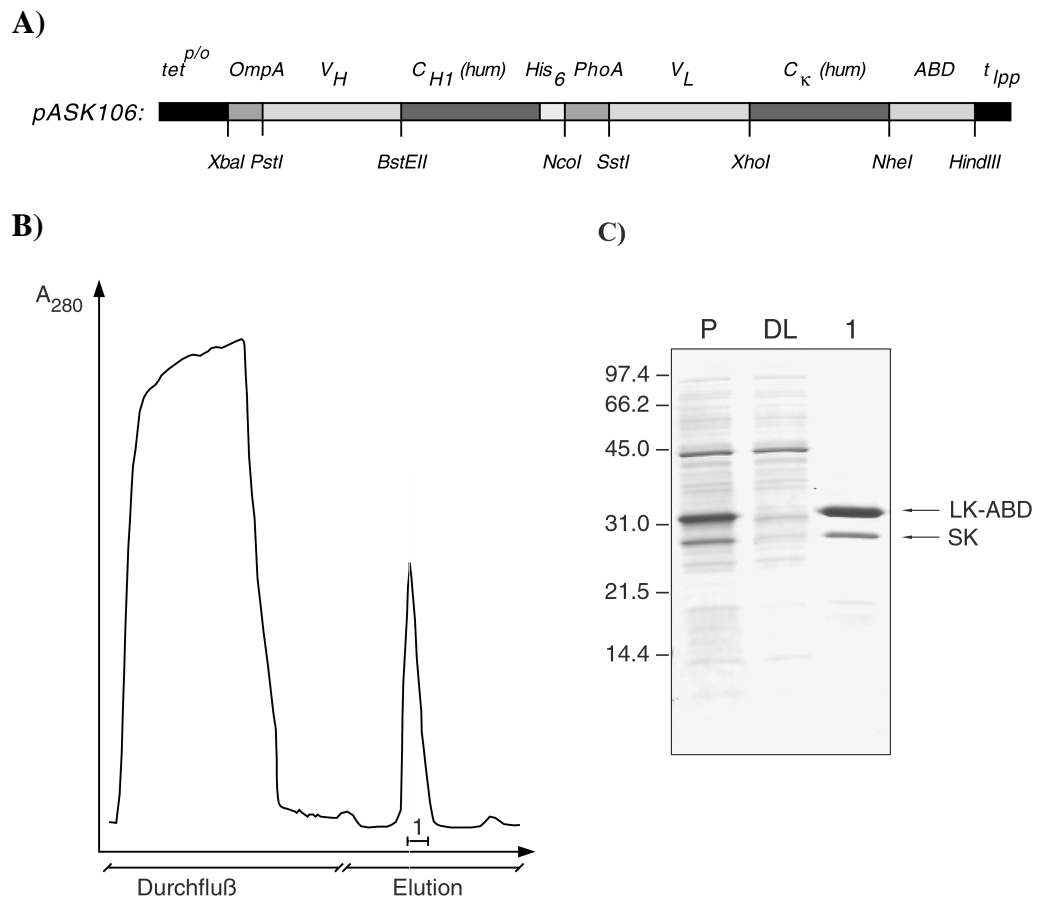
**Abbildung 14:** Axonale Regeneration nach Applikation des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments. **A)** Maximale Länge der regenerierten Axone in mit IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment behandelten Tieren (gefüllte Dreiecke) oder in Kontrolltieren (BSA, gefüllte Kreise; IN-1 (<sup>L32F</sup>) F<sub>ab</sub>-Fragment, gefüllte Rauten). **B)** Camera lucida-Rekonstruktion von parasagittalen Schnitten des thoracalen Rückenmarks eines mit dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment behandelten Tieres (oben) und eines Kontrolltieres (unten). Maßstab = 1 mm; Abbildungen aus Broesamle et al. 2000.

### 3.1.4 Konstruktion von pASK106-IN1 und Herstellung einer Fusion aus dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und der albuminbindenden Domäne von *Streptococcus* Protein G

Für die im Rahmen der beabsichtigten Affinitätsmaturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments zu verwendenden Selektionstechnik des *Filter Sandwich Colony Screening Assays* (Schlehuber et al., 2000) war es notwendig, das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment (Mensch IgG/κ) als Fusion mit der albuminbindenden Domäne (ABD) von *Streptococcus* Protein G herzustellen.

Bei der Konstruktion des entsprechenden Expressionsplasmids, das die bakterielle Produktion des Ig-Fragments als Fusionprotein seiner leichten Kette mit der ABD ermöglichte, wurde analog zu König und Skerra (1998) vorgegangen. Dazu wurden durch ortsgerichtete Mutagenese von pASK88-IN1 drei zusätzliche Codons an das 3'-Ende des Strukturgens für die leichte Kette angefügt, die für ein Pro-Ala-Ser-Tripeptid als Linker kodierten. Gleichzeitig wurde damit eine singuläre *NheI*-Schnittstelle innerhalb dieser Sequenz eingefügt, durch die eine präzise Insertion des ABD-Gens aus pASK105-D1.3 (König und Skerra, 1998) ermöglicht wurde. Die Umklonierung erfolgte mittels der neu eingeführten *NheI*-Schnittstelle und der *HindIII*-Schnittstelle am 3'-Ende der Genkassette für das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und resultierte in dem Vektor pASK106-IN1.





**Abbildung 15:** Herstellung eines Fusionsproteins aus dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und der Albuminbindenden Domäne (ABD) von *Streptococcus* Protein G. **A)** Genkassette für das Fusionsprotein auf dem Expressionsplasmid pASK106-IN1. Die Strukturgene V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> $\gamma$ <sub>1</sub>, und V<sub>κ</sub>-C<sub>κ</sub>-ABD sind an ihren 5'-Enden mit den bakteriellen Signalsequenzen des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) bzw. der Alkalischen Phosphatase (PhoA) fusioniert, welche die Sekretion der Polypeptidketten in den periplasmatischen Raum von *E. coli* vermitteln. Am 3'-Ende des Gens der leichten Kette befindet sich die DNA-Sequenz des ProAlaSer-Linkers sowie der Albuminbindenden Domäne (ABD). Am 3'-Terminus der schweren Kette ist die Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (His<sub>6</sub>) kodiert. Das dicistronische Operon steht unter der Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet* Promotor/Operators (*tet*<sup>p/o</sup>) und wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*t*<sub>ipp</sub>) an seinem 3'-Ende beendet. Die angegebenen Schnittstellen der DNA-Endonukleasen ermöglichen den Austausch der Immunglobulin-domänen des F<sub>ab</sub>-Fragments. Mit Hilfe der *Nhe*I- und der *Hind*III-Schnittstelle können kodierende Sequenzen für andere Fusionspartner eingefügt werden. **B)** Reinigung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment/ABD-Fusionsproteins aus der periplasmatischen Proteinfraktion von JM83/pASK106-IN1 mittels HSA-Affinitätschromatographie. Die Säule mit 2 ml HSA-Sepharose wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 15 ml/h betrieben und mit PBST 0,5 äquilibriert. Nach Auftrag der periplasmatischen Proteinfraktion wurde zunächst mit PBST 0,5, dann mit 5 mM NH<sub>4</sub>OAc gewaschen. Die Elution erfolgte durch Absenken des pH-Werts mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,8. **C)** Analyse der mittels HSA-Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktion „1“ aus (B) durch SDS-PAGE (15 %iges Gel). Aufgetragen wurden jeweils 20 µl des periplasmatischen Proteinextraktes von JM83/pASK106-IN1 (P), des nicht an die Säule gebundenes Protein (DL) sowie die Elutionsfraktion „1“ aus (B). SK, schwere Kette; LK-ABD, leichte Kette mit AB-Domäne. Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben.

Die Funktionalität der ABD in Fusion mit dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment wurde durch Affinitätschromatographie des Fusionsproteins aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von

JM83/pASK106-IN1 nachgewiesen. Hierzu wurde Humanes Serumalbumin an CH-aktivierte Sepharose 4B immobilisiert und die Proteinlösung aufgetragen. Dabei wurde die vollständige Bindung des rekombinanten Proteins aus der bakteriellen Proteinfraction beobachtet (Abb. 15). Die bei der Elution unter saurem pH erhaltenen Fraktion wies einen überproportionalen Gehalt an leichter Kette des F<sub>ab</sub>-Fragments auf. Offensichtlich wurde durch die ABD-vermittelte Reinigung neben dem Heterodimer aus schwerer und leichter Kette auch das rekombinante „Bence-Jones Protein“ – ein Homodimer der leichten Kette (Stevens *et al.*, 1991) – isoliert.

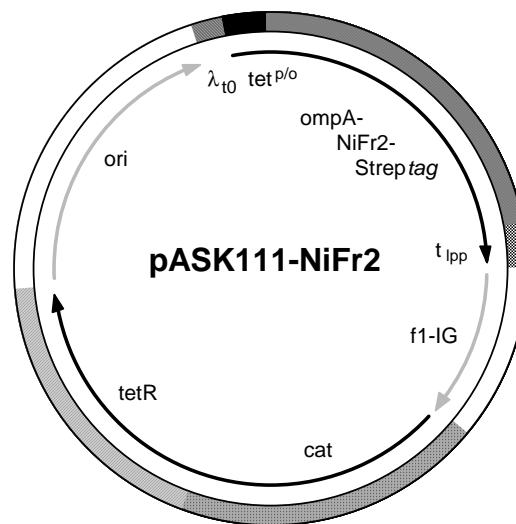
### **3.2 Herstellung funktioneller Fragmente des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A in *E. coli***

Die Voraussetzung für Bindungsstudien und die Affinitätsmaturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Rahmen dieser Arbeit war die Bereitstellung von ausreichend homogenen Präparationen von rekombinanten Fragmenten von Nogo-A in genügender Menge. Zum Zweck der gentechnischen Produktion der vermutlich extrazellulären Domäne von Nogo-A wurde von dem Vektor pASK111-NI220 (Horn, 1998) ausgegangen. Die Sekretion des zentralen Fragments aus dem nativen Nogo-A Protein (Aminosäuren 174 bis 940) in den periplasmatischen Raum von *E. coli* wurde dabei durch die an den Aminoterminus fusionierte OmpA-Signalsequenz vermittelt. Die Reinigung erfolgte durch Streptavidin-Affinitätschromatographie mit Hilfe des *Strep*-Tags am Carboxyterminus des rekombinanten Proteins. Dieses gestattete die Isolierung des löslichen Nogo-A Fragments NiFr1 (siehe Abbildung 3 in Kapitel 1.3) und bildete den Ausgangspunkt für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Verbesserungen hinsichtlich Ausbeute, Reinheit und Homogenität des rekombinanten Inhibitor-Fragments.

#### **3.2.1 Konstruktion von pASK111-NiFr2 und Gewinnung eines verkürzten Fragments der zentralen globulären Domäne von Nogo-A**

Bei der gentechnischen Herstellung von NiFr1 mit JM83/pASK111-NI220 kam es zu einem gravierenden proteolytischen Abbau des rekombinanten Proteins, aufgrunddessen der Anteil des intakten Genprodukts lediglich 50 % der Präparation ausmachte (Horn, 1998). Dies ließ sich in erster Linie auf eine Spaltung des rekombinanten Proteins zwischen Valin 59 und Serin 60 (entsprechend den Positionen 233 und 234 im nativen Nogo-A) durch eine Wirtsprotease zurückzuführen. Um von vorneherein eine homogenere Proteinpräparation zu erhalten, wurde das Strukturgen für ein verkürztes Nogo-A Fragment hergestellt, welches nur noch die Aminosäuren 234 bis 940 des nativen Proteins umfasste (nach wie vor mit der N-terminalen OmpA-Signalsequenz und dem *Strep*-Tag am C-Terminus). Für die gentechnische

Herstellung des sogenannten Fragments NiFr2 wurde der Vektor pASK111-NiFr2 ausgehend von Einzelstrang-DNA von pASK111-NI220 konstruiert (Abb. 16). Hierzu wurden die Kodons für die ersten 59 Aminosäuren (also Nr. 174 bis 233) mit Hilfe des Oligodesoxynukleotids MF-NiFr durch ortsgerichtete Mutagenese deletiert.



```

165                                     227
ATGAAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTTTTTCTGTCGATACCGCTAACGTCACCGTGACCGACCAAAGCGATGGCATCGCGTCCGG
MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAla
=> OmpA -1

```

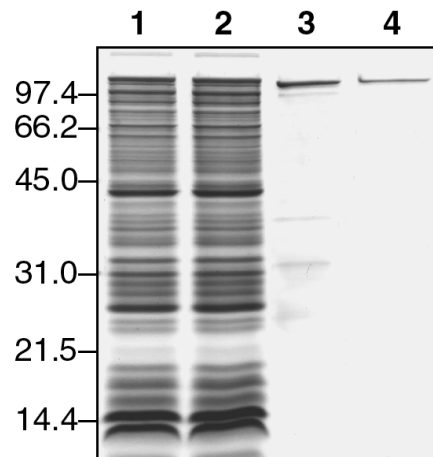
```

405
TCTTTTAAAGAACATGGATACCTTGGTAACTTATCAGCAGTGTCATCCTCA...
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAAAAATTTCTTTGTACCTATGGAACCATTGAATAGTCGTCACAGTAGGAGT...
SerPheLysGluHisGlyTyrLeuGlyAsnLeuSerAlaValSerSerSer...
=> NiFr2 (Nogo-A 234-940)

```

**Abbildung 16:** Der Expressionsvektor pASK111-NiFr2 zur Biosynthese des löslichen Nogo-A Fragments in *E. coli*. Die fettgedruckte DNA-Sequenz zeigt die Lage des Oligodesoxynukleotids MF-NiFr für die Deletion der Basenpaare 228 bis 404 aus pASK111-NI220 durch ortsgerichtete Mutagenese, was zu einer exakten Verknüpfung der Aminosäure Serin 234 des nativen Nogo-A mit der OmpA-Signalsequenz führte. Die Transkription des resultierenden Fusionsgens bestehend aus OmpA-Signalsequenz (ompA), NiFr2 und dem *Strep*-Tag steht unter der Kontrolle des *tet* Promotor/Operators ( $tet^{p/o}$ ) und wird durch den Lipoprotein-Terminator beendet ( $t_{lpp}$ ). Der Promotor wird im nicht-induzierten Zustand durch das konstitutiv exprimierte *tet*-Repressor-Gen (*tetR*) reprimiert, das als zweites Element in einem dicistronischen Operon mit dem Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*, Chloramphenicol-Resistenz) angeordnet ist. *ori*, *f1-IG* und  $\lambda_{t0}$  bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie, die intergenische Region des filamentösen Phagen *f1* sowie den Transkriptionsterminator des Bakteriophagen  $\lambda$ , welcher die Transkription durch den bidirektionalen  $tet^{p/o}$  in Richtung auf den Replikationsursprung terminiert.

Die Produktion und Reinigung von NiFr2 mit Hilfe von JM83/pASK111-NiFr2 erfolgte wie bereits oben beschrieben. Zusätzlich wurde ein Gelfiltrations-Schritt an einer Superdex™ 200 *Prep Grade*-Säule durchgeführt, wobei eine relative Ausbeute von  $120 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}^{-1}$  (NiFr1:  $100 \mu\text{g L}^{-1} \text{OD}^{-1}$ ) erzielt wurde. Die berechnete molare Masse des rekombinanten Nogo-A Fragments betrug 78,7 kDa und der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280} = 0,41 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (zum Vergleich NiFr1: 85,0 kDa bzw.  $\epsilon_{280} = 0,38 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 17:** Isolierung von NiFr2 aus der periplasmatischen Proteinfraktion von JM83/pASK111-NiFr2 mittels SDS-PAGE (10 %iges Gel). Der gegen SA-Puffer dialysierte Periplasmaextrakt einer 2 L Kultur wurde auf eine Streptavidin-Affinitätssäule aufgetragen, nicht gebundenes Protein ausgewaschen und gebundenes rekombinantes Protein mit 2,5 mM D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und der Gelfiltration an einer Superdex™ 200 *Prep Grade*-Säule unterzogen, wobei 50 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7,5 mit 150 mM NaCl, 1 mM EDTA als Chromatographiepuffer verwendet wurde. Dieser zweite Reinigungsschritt diente der Abtrennung größerer Protein-Aggregate und verbliebener proteolytischer Fragmente. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  der periplasmatischen Proteinfraktion (1), nicht an die Streptavidin-Affinitätssäule gebundenes Protein (2), von der Streptavidinsäule eluiertes Protein (3) und nach der Gelfiltration erhaltenes Protein (4). Molmassen sind in kDa angegeben.

Die Präparationen von NiFr2 wiesen bei der Analyse durch SDS-PAGE einen im Hinblick auf die Größe der Polypeptidkette zufriedenstellenden Reinheitsgrad von etwa 90 % auf (Abb. 17), der für die nachfolgend beschriebenen Experimente vorläufig als ausreichend betrachtet wurde. Bei detaillierten Analysen mittels Gelfiltration sowie SDS-PAGE, bei der die Proben vor der Elektrophorese nicht reduziert worden waren, wurde jedoch eine erhebliche Heterogenität der Proteinpräparation festgestellt (nicht gezeigt). Diese war vor allem auf die Ausbildung intermolekularer Disulphidbrücken zurückzuführen, was zur teilweisen Multimerisierung des Proteins führte. Zudem wurde das Vorhandensein von Disulphidisomeren innerhalb der monomeren Polypeptidkette festgestellt. Von C. Horn und R. Kammermaier wurden daher – ausgehend von pASK111-NiFr2 – Vektoren für die Produktion von Varianten hergestellt, in denen Cysteinreste durch Serin substituiert waren.

Die Präparationen der entsprechenden Proteine NiFr2(Cys91/658→Ser) und NiFr2(Cys342/444→Ser) wiesen bessere Homogenität auf und wurden im Rahmen dieser Arbeit teilweise ebenfalls verwendet.

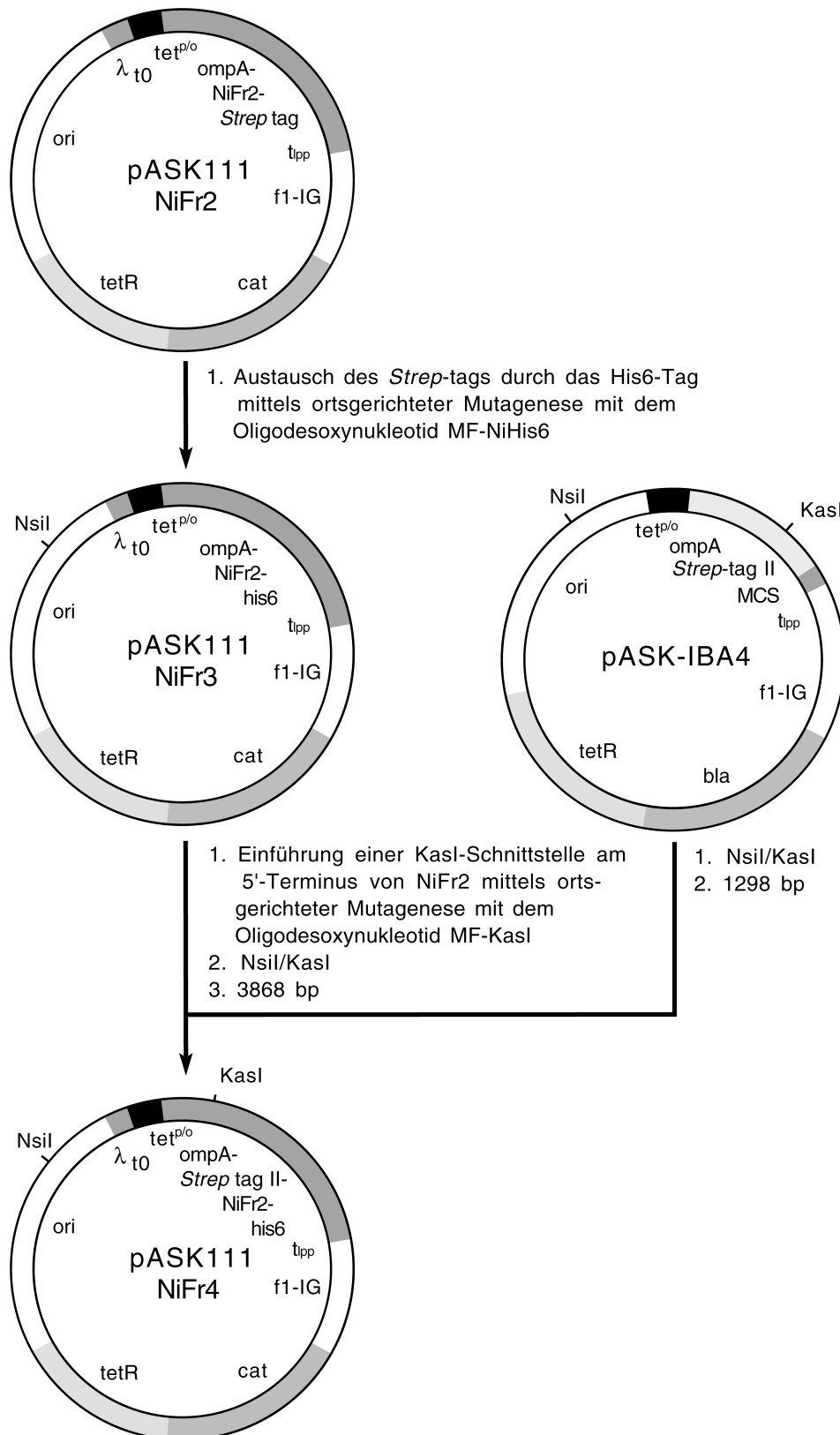
Die biologische Aktivität des bakteriell produzierten NiFr2 im Hinblick auf die Fähigkeit die Aussprossung von Zellen zu inhibieren, konnte im Labor von Prof. Dr. Christine Bandtlow mit Hilfe des 3T3 Fibroblasten-Standardtests (Spillman *et al.*, 1997) nachgewiesen werden (C. Bandtlow, persönliche Mitteilung).

### 3.2.2 Optimierung der gentechnischen Produktion und Reinigung des löslichen Nogo-A Fragments

Um die Reinigungseffizienz weiter zu steigern – sowohl im Hinblick auf die Aggregatbildung, als auch auf die nach wie vor bestehende Tendenz zur Bildung proteolytischer Abbauprodukte – wurde ein alternatives Reinigungsverfahren angestrebt. Hierfür wurde das *Strep*-Tag am Carboxyterminus von NiFr2 durch ein Hexahistidin-Peptid ersetzt, wodurch eine Reinigung mit Hilfe der IMAC ermöglicht werden sollte.

Der entsprechende Expressionsvektor pASK111-NiFr3 wurde ausgehend von pASK111-NiFr2 mit Hilfe des Oligodesoxynukleotids MF-NiHis6 durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt (Abb. 18). Dabei wurde die Sekretion des entsprechenden Nogo-A Fragments (NiFr3) nach wie vor in den periplasmatischen Raum von *E. coli* ermöglicht. Bei der nachfolgenden Reinigung von NiFr3 durch IMAC zeigte sich, daß das rekombinante Protein bereits bei einer sehr niedrigen Imidazolkonzentration kompetitiv von der Säule eluiert wurde. Mit dem standardisierten Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM Imidazol (Skerra, 1994a) war es somit nicht möglich, das rekombinante NiFr3 vollständig von denjenigen bakterieneigenen Proteinen, welche ihrerseits eine schwache Affinität zur Säulenmatrix aufwiesen, zu trennen. Die Abflachung des Imidazolgradienten auf 0 bis 75 mM führte schließlich zu einer weitgehenden Abtrennung der Wirtsproteine wie auch von oligomerem Nogo-A Fragment.

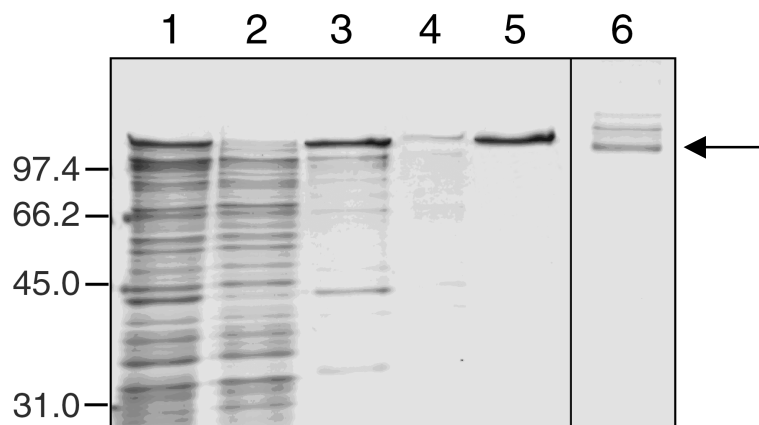
Schließlich wurde der Vektor pASK111-NiFr4 konstruiert, um das Nogo-A Fragment zusätzlich am Aminoterminus mit dem *Strep*-Tag II-Affinitätsanhängsel auszustatten und so durch zweifache Affinitätschromatographie proteolytisch verkürzte Produkte noch effizienter abzutrennen. Hierzu wurde zunächst durch ortsgerichtete Mutagenese eine singuläre *KasI*-Schnittstelle zu Beginn des Leserahmens für das Nogo-A Fragment in pASK111-NiFr3 eingeführt. Diese ermöglichte (zusammen mit *NsiI*) die Insertion eines kompatiblen Genabschnittes aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pASK-IBA4, wodurch die kodierende Sequenz für das OmpA-Signalpeptid gefolgt vom *Strep*-Tag II (Skerra und Schmidt, 2000) präzise an das 5'-Ende des NiFr3-Gens fusioniert wurde (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Konstruktion der Expressionsvektoren pASK111-NiFr3 und pASK111-NiFr4 zur gentechnischen Herstellung von löslichen Nogo-A Fragmenten in *E. coli*.

Die Reinigung von NiFr4 aus der periplasmatischen Proteinfraktion von JM83/pASK111-NiFr4 erfolgte dementsprechend in zwei Schritten: Zunächst wurde eine IMAC mit einem Elutionsgradienten von 0 bis 75 mM Imidazol durchgeführt. Die späten Elutionsfraktionen (60 bis 75 mM Imidazol) enthielten das monomere Protein, wie mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen bestätigt wurde. Danach wurden diese Fraktionen einer Streptavidin-Affinitätschromatographie unterzogen. Mit dieser Strategie konnte die Homogenität des rekombinanten NogoA-Fragments deutlich gesteigert werden (Abb. 19).

Interessanterweise erhöhte sich aufgrund der Einführung des aminoterminalen *Strep*-Tag II-Affinitätsanhängsels in NiFr4 die relative Ausbeute des rekombinanten Proteins im Vergleich zu NiFr2 um den Faktor 2,5, d. h. auf  $300 \text{ mg L}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ . Das so gewonnene NiFr4 lag nach vollständiger Abtrennung der disulphidverbrückten Oligomere homogen als Monomer vor und wies bei Analyse mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen offensichtlich eine dominante Disulphid-Isoform auf.



**Abbildung 19:** Isolierung von NiFr4 aus der periplasmatischen Proteinfraktion von JM83/pASK111-NiFr4 mittels SDS-PAGE (10 %iges Gel). Das rekombinante Protein wurde aus dem Periplasmaextrakt einer 2 L-Kultur in LB/Cam in zwei Schritten gereinigt: Nach einer IMAC mit einem flachem Elutionsgradienten (0 bis 75 mM Imidazol) wurden die Fraktionen, die monomeres Protein enthielten, vereinigt und auf eine Streptavidin-Affinitätssäule aufgetragen. Dabei wurden carboxyterminale Fragmente abgetrennt. Aufgetragen wurden jeweils  $20 \mu\text{l}$  der periplasmatischen Proteinfraktion (1), des nicht an die Metall-Chelatsäule gebundenen Proteins (2), durch IMAC gereinigtes NiFr4 (3), nicht an die Streptavidin-Affinitätssäule gebundenes Protein (4) und von der Streptavidin-Affinitätssäule eluiertes Protein im reduzierten (5) sowie im nicht-reduzierten Zustand (6). Der Pfeil markiert die dominante Proteinbande unter nicht-reduzierten Bedingungen in Spur 6. Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben.

### 3.3 Optimierung der Antigenbindung des rekombinanten IN-1 $F_{ab}$ -Fragments durch *Molecular Modelling* und evolutives Protein-Design

Der ursprüngliche monoklonale Antikörper IN-1 zeigt in seiner Eigenschaft als Immunglobulin der Klasse M/ $\kappa$  eine relativ schwache Antigen-Bindungsaktivität. Daß bei *In*

*vitro*-Experimente für einen mit dem intakten IgM vergleichbaren Neutralisierungseffekt eine ungefähr zehnfachen Menge an rekombinantem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment eingesetzt werden mußte (Bandtlow *et al.*, 1996), wies darauf hin, daß die Verwendung des monovalenten Antikörperfragments zudem einen zusätzlichen deutlichen Affinitätsverlust mit sich brachte. Primäres Ziel dieser Arbeit war daher, durch eine zu entwickelnde Maturierungsstrategie Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments zu erhalten, mit denen die Wechselwirkungen mit dem postulierten Antigen Nogo-A mittels standardisierter Bindungsassays nachgewiesen und analysiert werden konnten.

### 3.3.1 Modellierung des IN-1 Paratops auf Grundlage der 3D-Strukturen der F<sub>ab</sub>-Fragmente TR1.9 und 36-71

Als Grundlage für eine rationale Strategie zur Verbesserung der Antigen-Bindungsaffinität des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments wurde ein Strukturmodell seines Paratops erstellt. Dazu wurden aus der *Protein Data Bank* (PDB; Berman *et al.*, 2000) vorhandene Kristallstrukturen solcher Antikörper (bzw. ihrer Fragmente) ausgewählt, die hinsichtlich der Primärsequenz der variablen Domänen sowie der Länge und kanonischen Struktur ihrer CDRs optimale Homologie zu IN-1 aufwiesen. Diese Auswahl wurde mit Hilfe der *Kabat Antibody Sequence Database* (Johnson und Wu, 2001) sowie des Programms *Kabatman* (Martin, 1996) getroffen und führte zu fünf Sequenzen unterschiedlicher F<sub>v</sub>-Fragmente, deren CDRs 24 bis 43 % Sequenzidentität mit IN-1 zeigten (Tab. 3). Die Definition der CDRs erfolgte dabei nach Kabat *et al.* (1991) (siehe Anhang).

**Tabelle 3:** Relative Aminosäureidentität der *Complementarity Determining Regions* (CDRs) von Antikörpern mit bekannter Kristallstruktur und dem Antikörper IN-1.

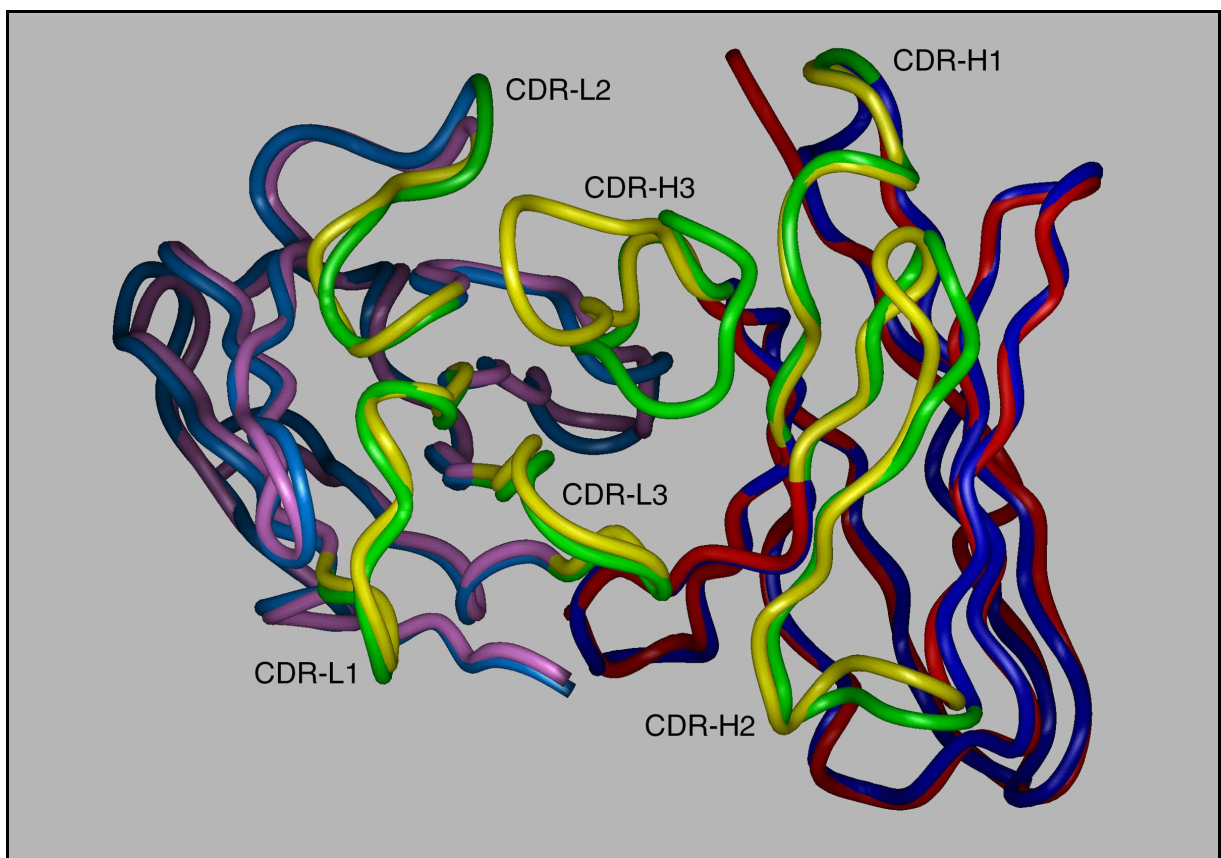
PDB Code	CDR H1 (10 AS)	CDR H2 (17 AS)	CDR H3 (12 AS)	CDR L1 (11 AS)	CDR L2 (7 AS)	CDR L3 (9 AS)	∅ (66 AS)
liai	70 %	35 %	25 %	27 %	14 %	44 %	36 %
ligm	30 %	35 %	16 %	36 %	42 %	33 %	31 %
lvge	60 %	47 %	33 %	45 %	42 %	44 %	43 %
6fab	50 %	64 %	25 %	45 %	0 %	44 %	42 %
8fab	50 %	35 %	16 %	9 %	14 %	11 %	24 %

Aufgrund der größeren Übereinstimmung wurden letztlich die Strukturen des humanen Anti-Thyroidperoxidase Autoantikörpers TR1.9 (lvge; Chacko *et al.*, 1996) – mit einer Auflösung



von 2,0 Å – und des Anti-Phenylarsonat Antikörpers 36-71 aus der Maus (6fab; Rose *et al.*, 1990) – mit einer Auflösung von 1,9 Å – für das dreidimensionale Modell verwendet. Dazu wurden sie mit Hilfe einer SGI Workstation und des Modellier-Programms *InsightII* visualisiert und anhand des C<sub>α</sub>-Rückgrates ihrer *Framework*-Regionen superpositioniert.

Die Überlagerung beider Strukturen, welche ihrerseits 53 % Sequenzhomologie hinsichtlich der CDRs zueinander aufwiesen, ergab eine weitgehende Übereinstimmung ihrer Tertiärstrukturen (Abb. 20). Mit Ausnahme von CDR-H3 und kurzen Abschnitten von CDR-H1 und CDR-H2 wiesen die variablen Domänen beider Antikörper eine nahezu identische Struktur des Peptidrückgrates auf. Daher konnte angenommen werden, daß dieser Zusammenhang zwischen Sequenz- und Strukturähnlichkeit sich auch auf den Antikörper IN-1 erstrecken sollte und die 1vge/6fab-Superposition daher ein geeignetes Modell für das IN-1 Paratop darstellt.



**Abbildung 20:** Hypothetisches Strukturmodell des IN-1 Paratops. Die Antigen-Bindungsstelle wurde durch die Überlagerung der variablen Domänen zweier Antikörper erstellt, die im Bereich ihrer CDRs hohe Sequenzhomologie zu IN-1 aufweisen. Die CDRs des humanen Anti-Thyroidperoxidase Antikörpers TR1.9 (IgG1/κ; PDB-Code: 1vge; Chacko *et al.*, 1996) sind in grün, die des Anti-Phenylarsonat Antikörpers 36-71 aus der Maus (IgG1/κ; PDB-Kode: 6fab; Rose *et al.*, 1990) in gelb dargestellt. Die entsprechenden Gerüststrukturen beider Antikörper sind in blau bzw. rot für V<sub>H</sub> und in hellblau bzw. rosa für V<sub>L</sub> wiedergegeben.

Das Modell weist darauf hin, daß das Paratop des IN-1 Antikörpers aus einer relativ flachen Furche besteht. Diese wird aus dem Aminoterminus von CDR-L1 und der gesamten CDR-L2 einerseits sowie vom Aminoterminus von CDR-H1 und der CDR-L2 andererseits gebildet. CDR-L3 und CDR-H3 haben demnach eine zentrale Lage am Boden der Furche und scheinen sowohl direkt über exponierte Seitenketten als auch durch den Kontakt mit fast allen anderen CDRs einen Einfluß auf die Bindung des Antigens zu haben.

### 3.3.2 Verifizierung der Gültigkeit des 1vge/6fab Modells durch ortsgerichtete Mutagenese in der IN-1 Antigen-Bindungsstelle

Die Experimente zur Affinitätsmaturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments richteten sich zunächst auf die V<sub>L</sub>-Domäne des Antikörpers. Da deren Gensequenz offensichtlich – im Gegensatz zu V<sub>H</sub> – keiner somatischen Hypermutation im Zuge der B-Zellreifung unterlegen hat (Bandlow *et al.*, 1996), bot sie das größere Optimierungspotential. Durch Analyse der Seitenkettenorientierungen derjenigen Reste, die die CDRs der V<sub>L</sub>-Domäne im 1vge/6fab-Modell bildeten, wurden solche Aminosäuren identifiziert, die höchstwahrscheinlich im Zentrum der Bindungstasche des Antikörpers IN-1 an Wechselwirkungen mit dem Antigen beiteiligt sind (Tab. 4).

**Tabelle 4:** Positionen in den CDRs der V<sub>L</sub>-Domäne des Antikörpers IN-1 mit Seitenkettenausrichtung zum Lösungsmittel und mit vermuteter Wechselwirkung mit dem Antigen.

CDR-L1 (Positionen 24 –34 <sup>a</sup> ; Kanonische Klasse 2 <sup>b</sup> )	CDR-L2 (Positionen 50 – 56; Kanonische Klasse 1)	CDR-L3 (Positionen 89 – 97; Kanonische Klasse 1)
Ile 29 <sup>c</sup>	Gly 50	Gln 89
Tyr 30	Leu 54	Asn 90
Ala 32	Asp 56	Val 91
Asn 34		Leu 92
		Thr 94
		Arg 96

<sup>a</sup> Die Definition der CDRs folgt Kabat *et al.* (1991) (siehe Anhang). <sup>b</sup> Die Definition der Kanonischen Klassen richtet sich nach Chotia und Lesk (1987). <sup>c</sup> Die Numerierung folgt der Primärsequenz (Bandlow *et al.*, 1996).

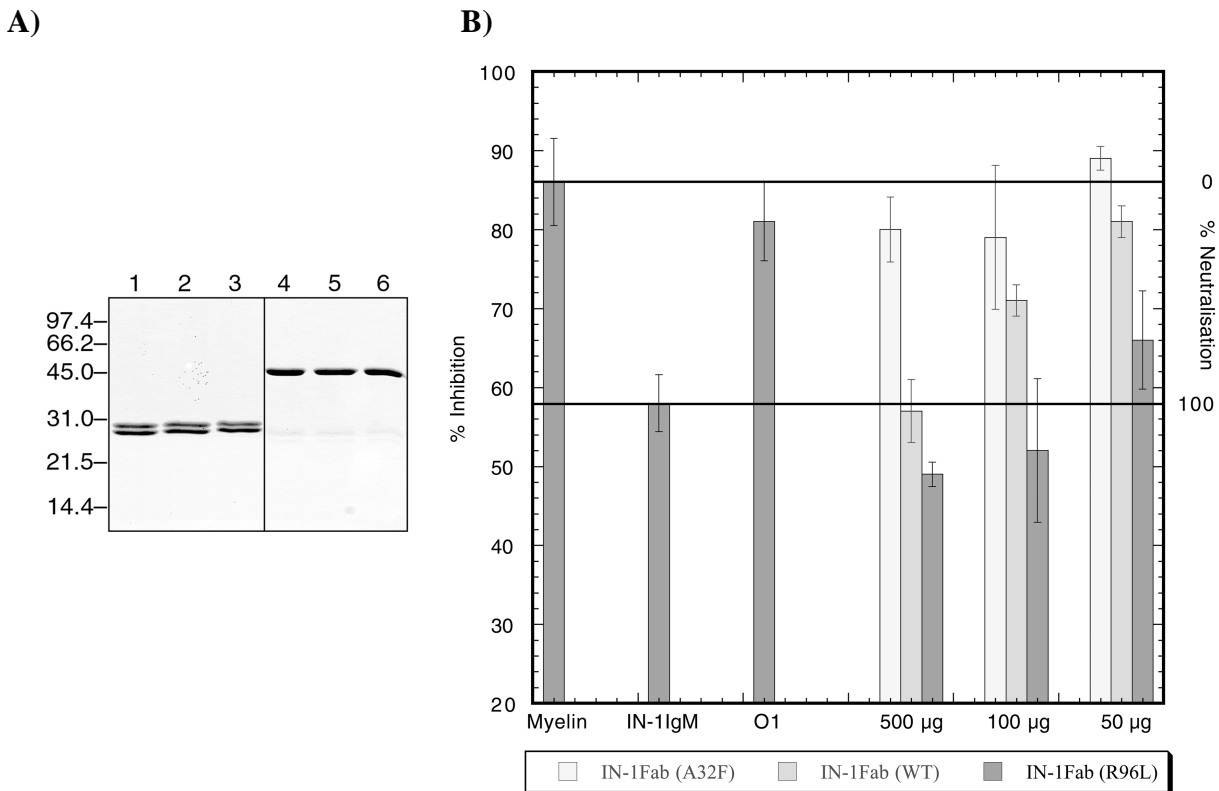
Die Geometrie des Paratops des IN-1 Antikörpers ließ vor allem für die im Zentrum der Bindungstasche gelegenen CDR-L3 und CDR-H3 einen Kontakt zum Antigen vermuten. Aufgrund der fehlenden somatischen Hypermutationen in der V<sub>L</sub>-Domäne (s. o.) und da

zudem der Bereich von CDR-H3 in dem hypothetischen Strukturmodell nicht aussagekräftig dargestellt werden konnte (Abb. 20), wurde vor allem CDR-L3 untersucht. Für fast alle der in CDR-L3 liegenden Reste schien dabei aufgrund der exponierten Ausrichtung ihrer Seitenketten ein möglicher Kontakt zum Antigen gegeben. Das Gleiche galt für Reste, die den Aminoterminus der flankierenden CDR-L1 bildeten. Da dieser Befund weitgehend auch im Einklang mit allgemeinen Beobachtungen von Antikörper-Antigenwechselwirkungen stand (Padlan, 1994; MacCallum *et al.*, 1996), wurden aus diesen Bereichen Positionen ausgewählt, deren Substitution im IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment die Gültigkeit des 1vge/6fab Modelles experimentell bestätigen sollten.

Die Aminosäuren Alanin an Position L32 und Arginin an L96 erschienen hierfür besonders geeignet, da im 1vge/6fab Modell beide Positionen jeweils einmal mit demselben Rest wie in IN-1 besetzt waren: Während TR1.9 (1vge) wie IN-1 an L32 Alanin aufwies, trug 36-71 (6fab) dort Phenylalanin. Weiterhin war 36-71 wie IN-1 an L96 mit Arginin besetzt, während TR1.9 dort ein Leucin trug. Der strukturelle Effekt der Substitutionen A<sub>L32</sub>→F in CDR-L1 und R<sub>L96</sub>→L in CDR-L3 war im Modell also bereits simuliert. Dabei zeigte sich, daß am Peptidrückgrat des CDRs keine nennenswerte Konformationsänderung auftrat, und daß auch die Einführung des sterisch anspruchsvollen und hydrophoben Phenylalanins nur lokale Wirkung haben sollte. Dagegen sollte der Austausch des Arginins an L96 gegen Leucin weniger durch sterische Effekte als vielmehr durch die Eliminierung der positiven Ladung von Bedeutung für die Antigenbindung sein.

Durch ortsgerichtete Mutagenese von pASK88-IN1 mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide MF-1 und MF-2 wurde die bakterielle Produktion der entsprechenden Mutanten (A<sub>L32</sub>→F) und (R<sub>L96</sub>→L) des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments ermöglicht. Beide F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden durch IMAC aus der periplasmatischen Proteinfraction von entsprechend transformierten *E. coli* JM83 Zellen isoliert, wobei die relativen Ausbeuten niedriger lagen als die des Wildtyp IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments: IN-1 (<sup>L32</sup>F) F<sub>ab</sub>-Fragment: 0,5 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>; IN-1 (<sup>L96</sup>L) F<sub>ab</sub>-Fragment: 0,33 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>; IN-1 (WT) F<sub>ab</sub>-Fragment: 0,8 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>.

Da zu diesem Zeitpunkt ein proteinchemischer Bindungstest noch nicht etabliert war, erfolgte die funktionelle Analyse der Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments in einem Zellkultur-Assay im Labor von Prof. M. Schwab an der ETH Zürich. Dabei zeigten beide Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment eine veränderte neutralisierende Aktivität gegenüber dem inhibitorischen Effekt von Myelin-Proteinextrakt aus Rinderrückenmark auf das Wachstum von Fibroblasten (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Analyse der Bindungsaktivität des IN-1 (WT)  $F_{ab}$ -Fragments sowie der Mutanten  $A_{L32} \rightarrow F$  und  $R_{L96} \rightarrow L$ . **A)** Analyse der verwendeten  $F_{ab}$ -Fragments mittels SDS-PAGE. Das Gel (15 %ig) zeigt die bakteriell produzierten und durch IMAC gereinigten  $F_{ab}$ -Fragments des Wildtyp IN-1 (Spuren 1, 4) und der Mutanten  $A_{L32} \rightarrow F$  (Spuren 2, 5) und  $R_{L96} \rightarrow L$  (Spuren 3, 6). Aufgetragen wurde jeweils 1 µg reduziertes (1 - 3) bzw. nicht-reduziertes (4 - 6) Protein. Alle  $F_{ab}$ -Fragments erscheinen homogen und in stöchiometrischer Zusammensetzung der leichten und schweren Ketten, welche quantitativ durch die interchenare Disulphidbindung miteinander verknüpft sind. Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben. **B)** Effekt der  $F_{ab}$ -Fragments auf das Auswachsen von 3T3-Fibroblasten auf inhibitorisch aktivem Substrat (Myelin-Proteinextrakt aus Rinderrückenmark). Aufgeführt ist der relative Anteil inhibierter (d. h. nichtaussprossender) Zellen in Abhängigkeit von Art und Konzentration der eingesetzten  $F_{ab}$ -Fragments, des IN-1 IgM-Antikörpers sowie des oligodendrozytspezifischen anti-Galactocerebroside Antikörpers O1 (Sommer und Schachner, 1981) als Kontrolle (vgl. Bandtlow *et al.*, 1996).

Während das IN-1 ( $L96$ )  $F_{ab}$ -Fragment auch bei niedrigen Konzentrationen eine deutlich bessere neutralisierende Aktivität als der Wildtyp aufwies, verschlechterte sich diese bei dem IN-1 ( $L32$ )  $F_{ab}$ -Fragment drastisch. Die neutralisierende Aktivität des IN-1 ( $L32$ )  $F_{ab}$ -Fragments ging auch bei hoher Konzentration nicht über die des als Negativkontrolle eingesetzten Antikörper O1 hinaus. Der vollständige Aktivitätsverlust des IN-1 ( $L32$ )  $F_{ab}$ -Fragments wurde bei *In vivo*-Experimenten bestätigt, bei denen es im Gegensatz zum IN-1 (WT)  $F_{ab}$ -Fragment keine neuronale Regeneration im läsierten Rattenrückenmark bewirkte (Broesamle *et al.*, 2000; Kap. 3.1.3).

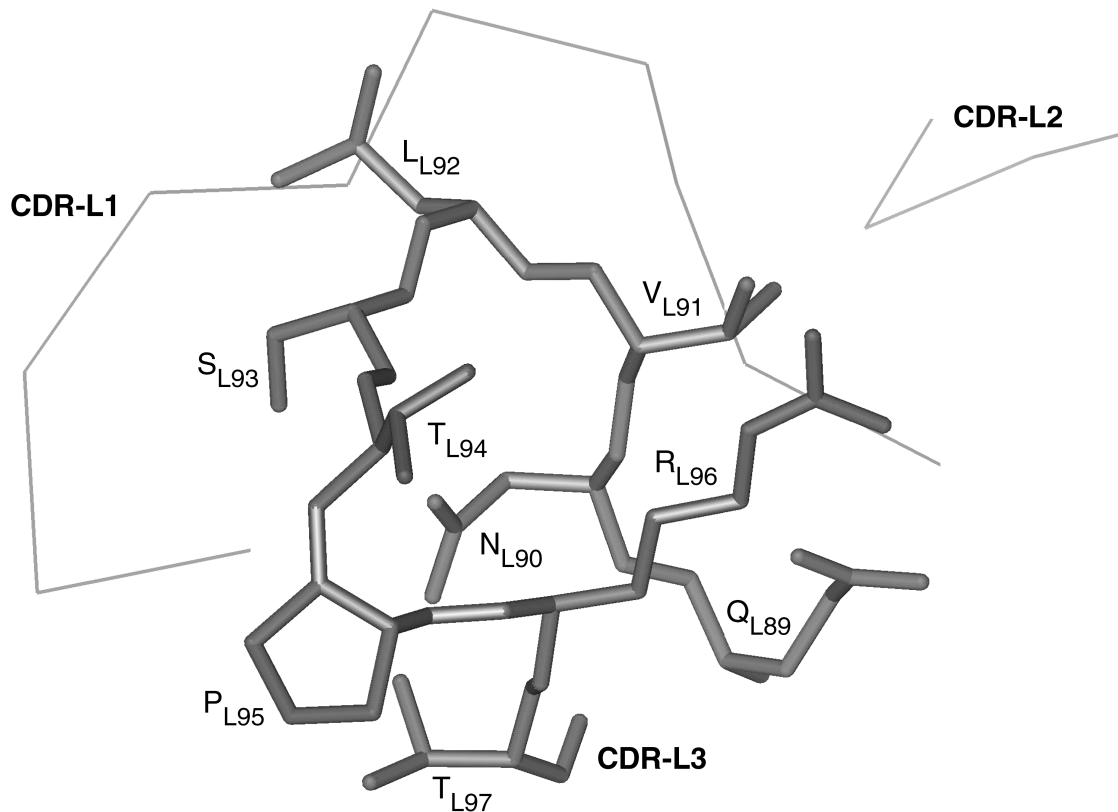
Die Aminosäurereste an den beiden Positionen schienen demnach direkt an der Antigenbindung beteiligt. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Überlagerung der

Strukturen 1vge/6fab als valides Modell für das Paratop des Antikörpers IN-1 dienen. Weiterhin wurde im Prinzip gezeigt, daß durch gezielte Modifikation der CDRs der IN-1 V<sub>L</sub>-Domäne eine schrittweise Verbesserung der Antigenbindung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments möglich sein sollte.

### 3.3.3 Schrittweise Affinitätsmaturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments durch Zufallsmutagenese des CDR-L3

Trotz des positiven Effekts, den die Aminosäuresubstitution R<sub>L96</sub>→L auf die biologische Aktivität des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Zellkultur-Experiment hatte, konnte nach wie vor im schließlich etablierten ELISA (s. u.; vgl. Abb. 25) gegenüber dem rekombinanten Fragment von Nogo-A (NiFr2) kein Bindungssignal erhalten werden. Auch weitere gezielte Substitutionen des Alanins an Position L32 oder des Arginins an Position L96 führten nicht zum Erfolg. Daraus wurde geschlossen, daß zur weiteren Erhöhung der Affinität tiefgreifendere strukturelle Veränderungen im Paratop des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments nötig waren.

Dazu wurde ein Abschnitt von drei Positionen in CDR-L3 der V<sub>L</sub>-Domäne des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments, welcher die Aminosäurereste Serin L93, Threonin L94 und Arginin L96 umfaßte, parallel der Zufallsmutagenese unterzogen. Die Analyse des 1vge/6fab Modells in diesem Bereich deutete auf eine Lage aller entsprechenden Seitenketten an der Proteinoberfläche hin. Die Reste waren dabei am oberen Ende der hypervariablen Schleifenstruktur lokalisiert, die sich über die Positionen L92 bis L97 erstreckte und deren wesentliches strukturelles Element Prolin L95 war (Abb. 22). Diese Position wurde nicht verändert, um eine Konformationsänderung im Peptidrückgrat zu vermeiden. Während im Falle von Position L94 die Substitution der hydrophilen Aminosäure Threonin einen Einfluß auf die Antigenbindung haben sollte, war diese für Position L96 bereits durch die vorhergehenden Experimente nachgewiesen worden (siehe Kapitel 3.3.1). Der Beweggrund für den Austausch an Position L93 war ein vermuteter Kontakt zu CDR-L1 und damit ein indirekter Effekt auf die Antigenbindung.



**Abbildung 22:** Hypothetische Struktur der CDR-L3 des Antikörpers IN-1 anhand der Überlagerung 1vge/6fab. Das  $C_{\alpha}$ -Rückgrat von TR1.9 (1vge) ist im Bereich des CDR-L3 hervorgehoben. Die Seitenketten in CDR-L3 wurden mit Hilfe des Programms *InsightII* durch die im Antikörper IN-1 vorliegenden ersetzt und sind zusammen mit den Rückgrat-Atomen als Stabmodell dargestellt (Carbonylgruppen und Sauerstoffatome wurden zur besseren Übersicht ausgeblendet).

Die entsprechende DNA-Bibliothek zur Produktion von Varianten des IN-1  $F_{ab}$ -Fragments mit zufälliger Substitution der Positionen L93, L94 und L96 wurde durch PCR hergestellt. Dazu wurde das Gen für die  $V_L$ -Domäne von IN-1 ausgehend von pASK88-IN1 mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase sowie der *Primer* Vkc2 und MF-13/1 amplifiziert. Der mutagene Rückwärts-*Primer* MF-13/1 wies dabei an den entsprechenden Positionen das Codon NNK auf, wodurch jede der 20 Aminosäuren kodiert, Ocker- und Opal-Stopcodons jedoch ausgeschlossen wurden (Abb. 23).

```

VkC2→ SstI
GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGGCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTGGA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGTAGCTCGAGTGGGTGAGAGGTCGTTAGTACCGACGTAGACACCCTCTTTGACAGTGGTAGGTACACCT
AspIleGluLeuThrGlnSerProAlaIleMetAlaAlaSerValGlyGluThrValThrIleThrCysGly
1                                                                                       ===

GCAAGTGAGAATATTTACGGTGCTTTAAATTGGTATCAGCGGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGATC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTTCACTCTTATAAATGCCACGAAATTTAACCATAGTCGCCTTTGTCCCTTTTAGAGGAGTGCAGGACTAG
AlaSerGluAsnIleTyrGlyAlaLeuAsnTrpTyrGlnArgLysGlnGlyLysSerProGlnLeuLeuIle
=====CDR-L1=====

TATGGTGCAACCAACTTGGCAGATGGCATGTCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATACCACGTTGGTTGAACCGTCTACCGTACAGTAGCTCCAAGTCACCGTCACCTAGACCATCTGTCATAAGA
TyrGlyAlaThrAsnLeuAlaAspGlyMetSerSerArgPheSerGlySerGlySerGlyArgGlnTyrSer
=====CDR-L2=====

CTCAAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTATTACTGTCAAAATGTGTTAAGTACTCCTCGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGTTCTAGTCATCGGACGTAGGACTGCTACAACGTTGCATAATGACAGTTTTACACAATNNMNNMGGANNM
LeuLysIleSerSerLeuHisProAspAspValAlaThrTyrTyrCysGlnAsnValLeuSerThrProArg
                                                                                       93 94 96
=====CDR-L3=====

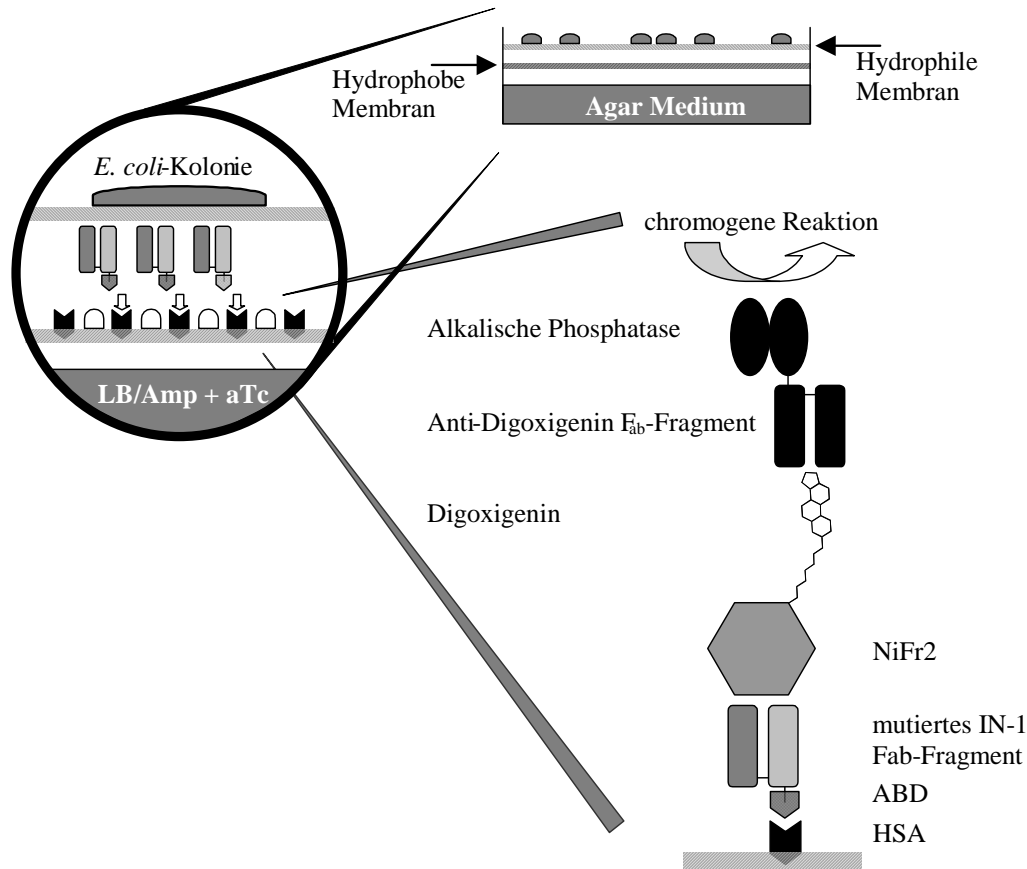
                XhoI
ACGTTTCGGAGCTGGGACCAAGCTCGAG
+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCAAGCCTCGACCCTGGTTCGAGCTCGACTTCGCG
                                  ←MF13/1

ThrPheGlyAlaGlyThrLysLeuGlu
===                               105

```

**Abbildung 23:** PCR-Strategie zur Mutagenese und Amplifizierung der  $V_L$ -Domäne von IN-1. Die Sequenzen des Vorwärts-Primers VkC2 (Bandtlow *et al.*, 1996) mit der Erkennungssequenz für *SstI* (unterstrichen) und des Rückwärts-Primers MF-13/1 mit der Erkennungssequenz für *XhoI* (unterstrichen) sind durch fette Schrägschrift gekennzeichnet. Die CDRs L1, L2 und L3 sind fett gedruckt und beschriftet. Die auszutauschenden Aminosäuren sind zusätzlich unterstrichen.

Das amplifizierte DNA-Fragment, das für die mutierte  $V_L$ -Domänen kodierte, wurde mit *SstI* und *XhoI* geschnitten und in den analog geschnittenen Vektor pASK106-IN1 (Kap. 3.1.4) inseriert. Dieses Expressionsplasmid ermöglichte die bakterielle Produktion des chimären IN-1  $F_{ab}$ -Fragments (konstante Domänen der Subklasse Mensch IgG1/ $\kappa$ ), dessen leichte Kette an ihrem Carboxyterminus mit der albuminbindenden Domäne des *Streptococcus* Protein G fusioniert war (Kap. 3.1.4; König und Skerra, 1998) und damit die Durchführung des *Filter Sandwich Colony Screening Assays* als Selektionsverfahren (Abb. 24; Schlehuber *et al.*, 2000). Hierfür wurden kompetente *E. coli* JM83 Zellen mit dem Ligierungsansatz transformiert und auf vier Filtern ausplattiert, so daß ca. 2.000 Klone parallel analysiert werden konnten.



**Abbildung 24:** Funktionsprinzip des *Filter Sandwich Colony Screening Assays* zur Identifizierung einzelner Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit verbesserter Affinität zu NiFr2 (in verschiedenen Ausschnittsvergrößerungen). Nach der Transformation von *E. coli* JM83 mit dem Ligierungsansatz von mutiertem Gen und dem Vektorrückgrat von pASK106-IN1 wird die Zellsuspension auf einer hydrophilen Membran auf LB/Amp-Agar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Kolonien eine Größe von ca. 0,5 mm erreicht haben, wird die Membran auf einer hydrophoben und zuvor mit HSA beschichteten zweiten Membran plaziert. Diese liegt zur Induktion der Genexpression auf einer LB/Amp-Agarplatte mit Anhydrotetracyclin. Während einer Induktionsperiode von ca. 15 h wird das Fusionsprotein aus dem F<sub>ab</sub>-Fragment und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) zunächst mittels der bakteriellen OmpA-Signalsequenz in das Periplasma von *E. coli* sekretiert und partiell von den Kolonien freigesetzt. Das Protein diffundiert durch die hydrophile Membran und wird schließlich durch Komplexbildung zwischen ABD und HSA funktionell am Ort der *E. coli*-Kolonie auf der Oberfläche der darunterliegenden hydrophoben Membran immobilisiert, welche dann entnommen und mit Puffer gespült wird. Die hydrophile Membran mit den Bakterienkolonien wird bei 4 °C gelagert. Die Liganden-Bindungseigenschaften der immobilisierten Mutanten kann durch Inkubation der hydrophoben Membran mit digoxigeniertem NiFr2 und einem Anti-Digoxigenin F<sub>ab</sub>-Fragment, gefolgt von einer chromogener Nachweisreaktion, detektiert werden. (Mit freundlicher Genehmigung von S. Schlehuber, modifiziert.)

Auf diese Weise (Abb. 24) wurde die Antigenbindungsaktivität der funktionell auf einer Filtermembran immobilisierten Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments durch Inkubation mit rekombinantem, digoxigeninmarkiertem NiFr2 (50 µg/ml) analysiert. Die Kopplung des Digoxigenins an primäre Amingruppen des Antigens war dabei im Verhältnis 5 : 1 erfolgt.



Kolonien, deren zugehöriges Bindungssignal hervortrat, wurden von der ursprünglichen Membran auf eine frische LB/Amp Agarplatte überimpft und bebrütet. Überraschenderweise zeigten von insgesamt 58 isolierten Klonen nach dem Überimpfen nur noch 45 Koloniebildung. Von 31 dieser Klone wurde die Plasmid-DNA präpariert und der mutierte Genabschnitt der V<sub>L</sub>-Domäne sequenziert. Lediglich 13 der so analysierten Klone wiesen ein funktionelles IN-1 V<sub>L</sub>-Gen auf (siehe Anhang), während die anderen 18 Klone eine Verschiebung des Leserasters oder ein internes Amber-Stopcodon trugen. Offensichtlich gaben in Konkurrenz zu Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit möglicherweise verbesserter Antigenbindung auch nicht-funktionelle bzw. toxische Varianten Signale im *Filter Sandwich Colony Screening Assay* und wurden daher ebenfalls selektiert.

**Tabelle 5:** Aminosäuresubstitutionen an den Positionen L93, L94 und L96 in der V<sub>L</sub>-Domäne des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments nach Zufallsmutagenese und Affinitätsselektion.

	<i>Ser</i> <sup>a</sup> 93	<i>Thr</i> 94	<b>Arg</b> <sup>b</sup> 96
Mutante I.1.4	Pro	<u>Val</u> <sup>c</sup>	<u>Trp</u> <sup>d</sup>
Mutante I.1.6	<i>Asn</i>	<u>Leu</u>	Cys
Mutante I.1.11	<u>Tyr</u>	<i>Thr</i>	Cys
Mutante I.1.16	<u>Met</u>	Cys	<i>Asn</i>
Mutante I.2.2	<b>Arg</b>	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>
Mutante I.2.4	<u>Gly</u>	<i>Thr</i>	<u>Phe</u>
Mutante I.2.5	Pro	Cys	<u>Val</u>
Mutante I.2.6	<b>Arg</b>	<u>Val</u>	Cys
Mutante I.2.8	<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	<u>Gly</u>
Mutante I.2.9	<b>Arg</b>	Pro	Pro
Mutante I.2.10 (C <sup>23</sup> -S)	<u>Tyr</u>	<b>Arg</b>	<u>Ile</u>
Mutante I.3.7	<u>Phe</u>	<b>Arg</b>	<u>Leu</u>
Mutante I.4.4	<b>Asp</b>	<b>Arg</b>	<u>Leu</u>

<sup>a</sup> *kursiv*: polar, ungeladen; <sup>b</sup> **fett**: polar, geladen; <sup>c</sup> unterstrichen: unpolar; <sup>d</sup> doppelt unterstrichen: aromatisch. Nomenklatur: 1. (römische) Ziffer: Zyklus der Affinitätsmaturierung; 2. (arabische) Ziffer: Numerierung des Filters; 3. (arabische) Ziffer: Numerierung der Kolonie.

Die Analyse der funktionellen Varianten ergab keine Präferenz für bestimmte Aminosäurefunktionen an den einzelnen Positionen L93, L94 und L96 (Tab. 5). So traten statt

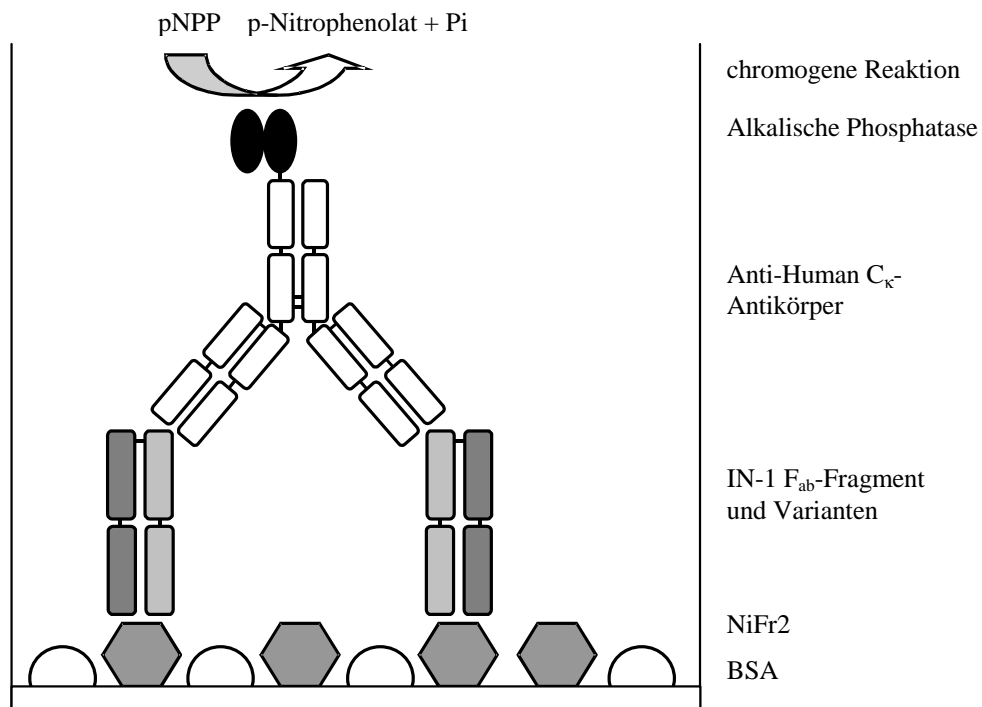
Serin L93 sowohl Arginin als auch aromatische Aminosäuren mit etwa gleicher Häufigkeit auf. Threonin L94 war bei drei der Klone konserviert, ebensohäufig aber auch durch Valin oder Arginin ersetzt. Arginin L96 war in allen Fällen substituiert und zwar entweder durch Cystein oder durch unpolare oder zumindest ungeladene Reste.

Zur bakteriellen Produktion des mutierten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments wurden schließlich acht verschiedene Klone (I.1.4, I.1.16, I.2.2, I.2.6, I.2.8, I.2.9, I.2.10 und I.3.7) ausgewählt. Dabei wurde der Vektor pASK106 direkt eingesetzt, d. h. die F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden als Fusion mit der ABD hergestellt. Von jeweils einer 2 L-Kultur wurde die periplasmatische Proteinfraction präpariert und das F<sub>ab</sub>-Fragment mit Hilfe der IMAC in einem Schritt isoliert. Durch Verwendung einer POROS MC-Säule war es dabei möglich, die Ig-Fragmente unter FPLC-Bedingungen in einem Schritt zu reinigen. Dies erlaubte – bei vergleichbarem Reinheitsgrad der Proteinpräparation zur herkömmlichen Chromatographiemethode (Kap. 2.4.1.2) – eine fünffache Beschleunigung des Reinigungsverfahrens.

Im Verlaufe von Produktion und Reinigung sowie nach daraufhin erfolgter erneuter DNA-Sequenzierung stellte sich heraus, daß die Variante I.2.10 eine zusätzliche Substitution von Cystein L23 durch Serin aufwies, was aus der ersten Sequenzanalyse nicht zu ersehen gewesen war. Das entsprechende F<sub>ab</sub>-Fragment konnte nicht isoliert werden, was in Einklang mit der essentiellen Rolle der intrachenen Disulphidbrücke zwischen C<sub>L23</sub> und C<sub>L88</sub> bei der effizienten Faltung der V<sub>L</sub>-Domäne stand (Glockshuber *et al.*, 1992).

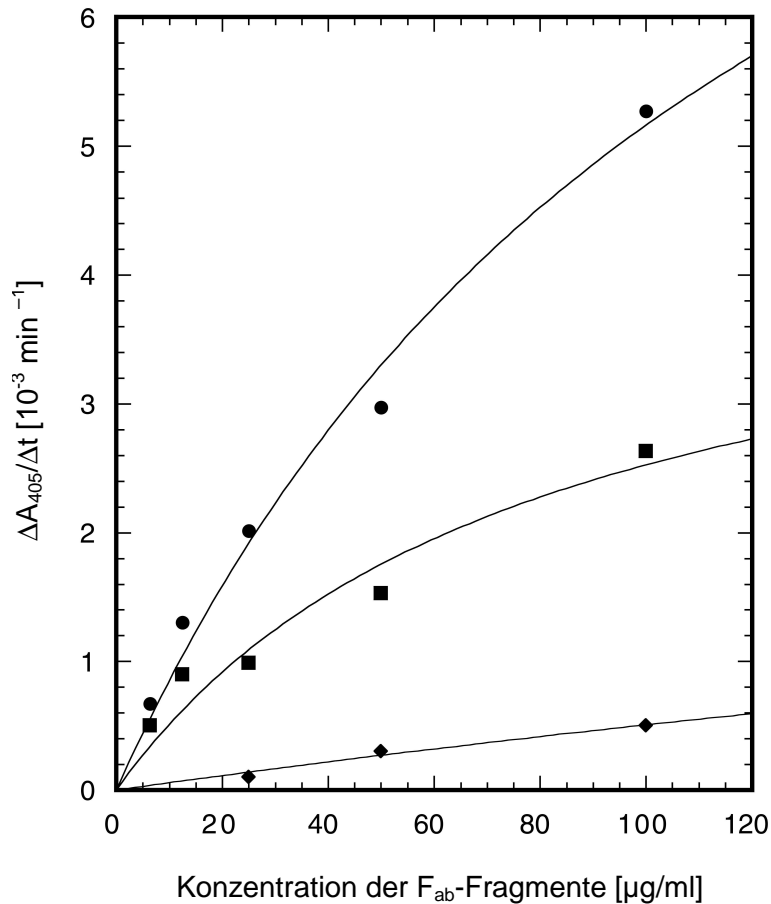
Die Antigenbindungsaktivität der gereinigten Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments wurde in einem hierfür entwickelten ELISA überprüft. Dazu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit rekombinantem NiFr2 beladen. Die rekombinanten F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden in einer Konzentrationsreihe appliziert und mit Hilfe eines Anti-Human C<sub>κ</sub>-Antikörpers, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, nachgewiesen (Abb. 25).

In diesem Experiment konnte mit den Mutanten I.1.4 und I.2.6 erstmals eine Wechselwirkung zwischen (modifiziertem) IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und rekombinantem Nogo-A Fragment in einem immunchemischen Nachweisverfahren detektiert werden (Abb. 26). Für nachfolgende Experimente wurden die Genkassetten für die V<sub>L</sub>-Domäne der Mutanten I.1.4 und I.2.6 in pASK88-IN1 inseriert, um die bakterielle Produktion der entsprechenden F<sub>ab</sub>-Fragmente ohne die albuminbindende Domäne zu ermöglichen.



**Abbildung 25:** Schematische Darstellung des ELISA zur Detektion der Bindung der mutierten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragmente an NiFr2. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit 50 µl einer Lösung des rekombinanten Antigens (180 – 200 µg/ml NiFr2) inkubiert und überschüssige Bindestellen mit 2 % (w/v) BSA abgesättigt. Nur mit BSA blockierte Vertiefungen dienen im weiteren Verfahren als Negativkontrolle. Die F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden jeweils in einer Konzentrationsreihe (s. entsprechende Abb.) appliziert und gebundenes Ig-Fragment mit Hilfe eines Anti-Human C<sub>κ</sub>-Antikörpers, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, nachgewiesen. Als chromogenes Substrat für die enzymatische Nachweisreaktion wurde p-Nitrophenylphosphat verwendet.

Im Gegensatz zu ihrem positiven Bindungsverhalten zeigte die Mutante I.2.6 allerdings jedoch eine drastisch verminderte relative Ausbeute an löslichem F<sub>ab</sub>-Fragment (ca. 0.04 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>). Dies war offensichtlich auf den ungepaarte Cysteinrest an Position L96 zurückzuführen (Schmiedl *et al.*, 2000). Vor einem weiteren Maturierungszyklus auf der Grundlage von I.2.6 war daher zu klären, ob der freie Cysteinrest gegebenenfalls durch eine hydrophobe aliphatische Aminosäure funktionell ersetzt werden und dadurch eine Erhöhung der Ausbeute erzielt werden konnte. Ein Indiz hierfür war das bevorzugte Auftreten solcher Reste an dieser Position in den selektierten Varianten (Tab. 5) sowie der positive Effekt, den der gezielte Austausch R<sub>L96</sub>→L im IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment auf dessen Bindungsaktivität hatte (siehe Kapitel 3.3.2).

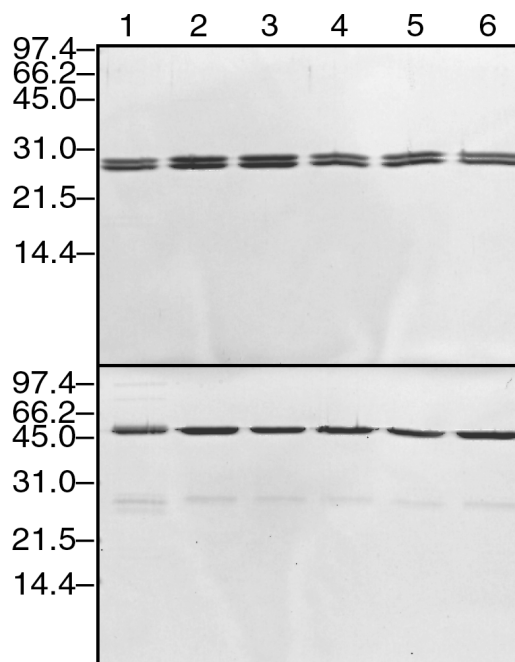


**Abbildung 26:** Bindungsnachweis der Mutanten I.1.4 und I.2.6 aus der Affinitätsmaturierung an das rekombinante Nogo-A Fragment (NiFr2) im ELISA. Die jeweils gegen die Proteinkonzentration aufgetragenen Signalintensitäten wurden vorher mittels Substraktion der entsprechenden Kontrollwerte (BSA) korrigiert. Dargestellt sind die Signale folgender rekombinanter F<sub>ab</sub>-Fragmente: IN-1 (Wildtyp) (◆); Mutante I.1.4 (■); Mutante I.2.6 (●).

Die Substitution des Cystein an Position L96 in I.2.6 erfolgte daraufhin in parallelen Experimenten durch die Aminosäuren Alanin, Valin, Methionin, Leucin und Isoleucin. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden ausgehend von pASK88-IN1(I.2.6) und den Oligodesoxynukleotiden MF-10, MF-11, MF-14, MF-15, MF-16 durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt. Die bakterielle Produktion der F<sub>ab</sub>-Fragmente (nun ohne ABD) erfolgte im 2 L-Schüttelkolben, und die anschließende Isolierung aus der periplasmatischen Proteinfraction gelang durch IMAC unter FPLC-Bedingungen an einer POROS MC Säule. Tatsächlich lagen die relativen Proteinausbeuten fast aller Mutanten nach Substitution des Cysteinrestes wieder im Bereich des Wildtyp IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Tab. 6).

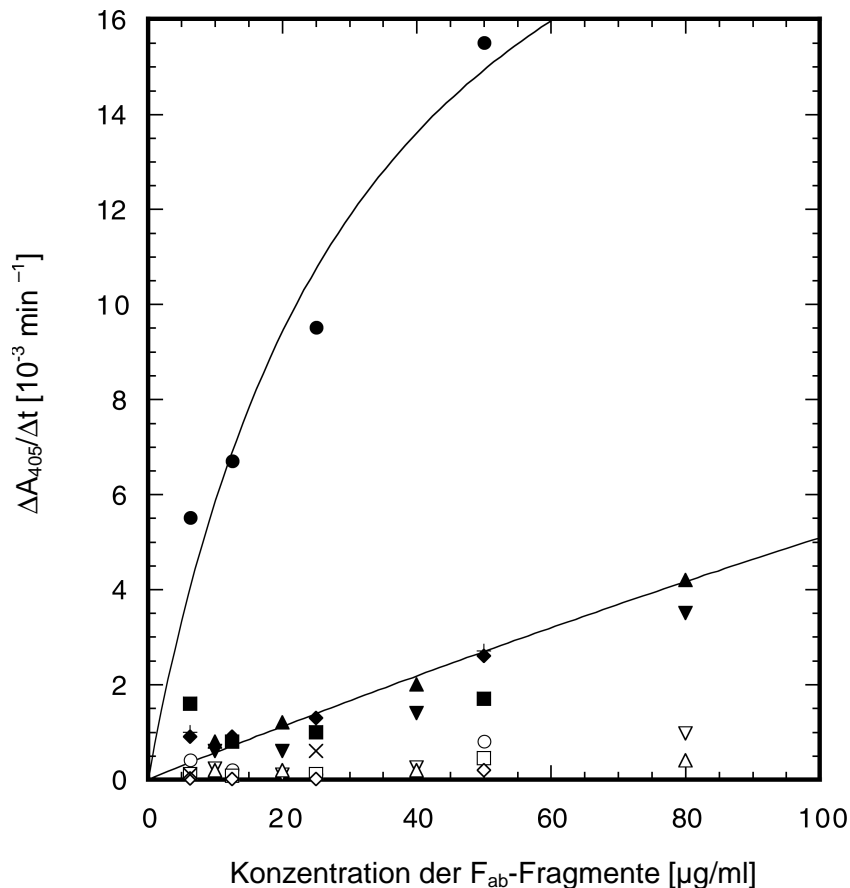
**Tabelle 6:** Proteinausbeuten des I.2.6 F<sub>ab</sub>-Fragments und dessen Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment.

	IN-1	I.2.6	I.2.6 C <sub>L96</sub> →A	I.2.6 C <sub>L96</sub> →V	I.2.6 C <sub>L96</sub> →M	I.2.6 C <sub>L96</sub> →L	I.2.6 C <sub>L96</sub> →I
rel. Ausbeute [mg L <sup>-1</sup> OD <sup>-1</sup> ]	0,8	0,04	0,75	0,6	0,35	0,55	0,35

**Abbildung 27:** Analyse des gereinigten I.2.6 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner Mutanten durch SDS-PAGE (15 %iges Gel). Die Proben im oberen Gel wurden vor der Elektrophorese mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert, die Proben im unteren Gel nicht. Aufgetragen wurden jeweils 2  $\mu$ g gereinigtes Protein. Spur 1: I.2.6; Spur 2: I.2.6 C<sub>L96</sub>→A; Spur 3: I.2.6 C<sub>L96</sub>→V; Spur 4: I.2.6 C<sub>L96</sub>→M; Spur 5: I.2.6 C<sub>L96</sub>→L; Spur 6: I.2.6 C<sub>L96</sub>→I. Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben.

Die Analyse der gereinigten Ig-Fragmente durch SDS-PAGE ergab jeweils ein stöchiometrisches Verhältnis von schwerer und leichter Kette sowie die quantitative Ausbildung der interchenaren Disulphidbrücke zwischen den beiden Polypeptidketten (Abb. 27). Die Antigen-Bindungsaktivität der gereinigten Mutanten des I.2.6 F<sub>ab</sub>-Fragments wurde in einem ELISA überprüft. Dabei zeigten alle Mutanten deutlich schwächere Bindung an NiFr2 als das ursprüngliche I.2.6 F<sub>ab</sub>-Fragment (Abb. 28). Dieses Resultat deutete darauf

hin, daß die Alkylthiol-Seitenkette an einer spezifischen Wechselwirkung mit dem Antigen beteiligt war.



**Abbildung 28:** Analyse der Mutanten des I.2.6 F<sub>ab</sub>-Fragments nach Substitution von Cystein L96 hinsichtlich Bindung des rekombinanten Nogo-A Fragments (NiFr2) mittels ELISA. Folgende F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden appliziert: Mutante I.2.6 (●); Mutante I.2.6(C<sub>L96</sub>→A) (▼); Mutante I.2.6(C<sub>L96</sub>→V) (▲); Mutante I.2.6(C<sub>L96</sub>→M) (■); Mutante I.2.6(C<sub>L96</sub>→L) (◆); Mutante I.2.6(C<sub>L96</sub>→I) (+). Die Signale der jeweiligen F<sub>ab</sub>-Fragmente in der Negativkontrolle (BSA) sind als entsprechende nicht-gefüllte Symbole angegeben.

Vor allem die Mutante I.2.6(C<sub>L96</sub>→V) (kurz: I.2.6(<sup>L96</sup>V)) wies jedoch eine gut meßbare Bindungsaktivität auf und schien damit als Ausgangspunkt für eine zweite Affinitätsmaturierung durch Zufallsmutagenese und Selektion geeignet. Hierfür wurden die Positionen L91 und L92 in der V<sub>L</sub>-Domäne – in räumlicher Nachbarschaft zur Position L96 (vgl. Abb. 22) – einer zufälligen Aminosäuresubstitution unterworfen. Dazu wurde das Gen der V<sub>L</sub>-Domäne von I.2.6(<sup>L96</sup>V) durch PCR amplifiziert, wobei die *Taq* DNA-Polymerase, der *Primer* Vkc2 und der degenerierte *Primer* MF-II6V13/1 verwendet wurden (Abb. 29).

```

                                                                 XhoI
GCAACGTATTACTGTCAAAATGTGTTAcGggtgCCggttACGTTCCGAGCTGGGACCAAGCTCGAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTTGCATAATGACAGTTTTANMNMNMGCCCACGGCCAATGCAAGCCTCGACCCCTGGTTCGAGCTCGACTTCGCG
                                                                 ← MFII6V13/1
AlaThrTyrTyrCysGlnAsnValLeuArgValProValThrPheGlyAlaGlyThrLysLeuGlu
 84                               91 92                               105

```

**Abbildung 29:** Die Lage des *Primers* MF-II6V13/1 zur mutagenen Amplifizierung der V<sub>L</sub>-Domäne der Mutante I.2.6 (<sup>L96</sup>V). Gezeigt ist der carboxyterminale Teil der V<sub>L</sub>-Domäne (Aminosäuren 84 bis 105) mit CDR-L3 (fett). Im oberen kodierenden Strang sind die Basenpaaraustausche im Vergleich zum IN-1 Wildtyp durch kleine Buchstaben gekennzeichnet. Der *Primer* MF-II6V13/1 mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *XhoI* (unterstrichen) ist durch fette Schrägschrift gekennzeichnet. Die auszutauschenden Aminosäuren sind zusätzlich unterstrichen.

Die Inserierung des PCR-Produkts in pASK106-IN1 und die Durchführung des *Filter Sandwich Colony Screening Assays* als Selektionsverfahren wurde im Prinzip wie oben beschrieben durchgeführt. Die Detektion von Bindungssignalen fand unter stringenteren Bedingungen durch Verringerung der Konzentration von markiertem NiFr2 (25 µg/ml) statt. Insgesamt wurden ca. 1.000 Klone auf zwei Filtern analysiert, von denen 25 isoliert und auf einer frischen LB/Amp Agarplatte regeneriert werden konnten. Alle 17 hiervon durch DNA-Sequenzierung analysierten Klone wiesen ein funktionelles Gen der V<sub>L</sub>-Domäne auf.

Der Vergleich der Aminosäuren an den beiden zufällig mutierten Positionen ergab ein deutlicheres Muster als bei dem ersten Maturierungszyklus (Tab. 7). So wurde das ursprüngliche Valin L91 bevorzugt durch ebenfalls hydrophobe Reste (7 von 17 Klonen) und weniger durch polares Threonin (3 Klone) oder Asparagin (1 Klon) ersetzt. Geladene Aminosäuren traten nur zweimal auf. Für Leucin L92 wurden häufig polare ungeladene Reste (5 Klone) oder sogar solche mit positiver Ladung (sechsmal Lysin, einmal Arginin) gefunden. Aromatische Aminosäuren sowie Cystein und Prolin traten an beiden Positionen nur selten auf.

**Tabelle 7:** Aminosäuresubstitutionen an den Positionen L91 und L92 in der V<sub>L</sub>-Domäne von Mutanten des I.2.6 (<sup>L96V</sup>) F<sub>ab</sub>-Fragments nach dem zweiten Zyklus der Affinitätsmaturierung.

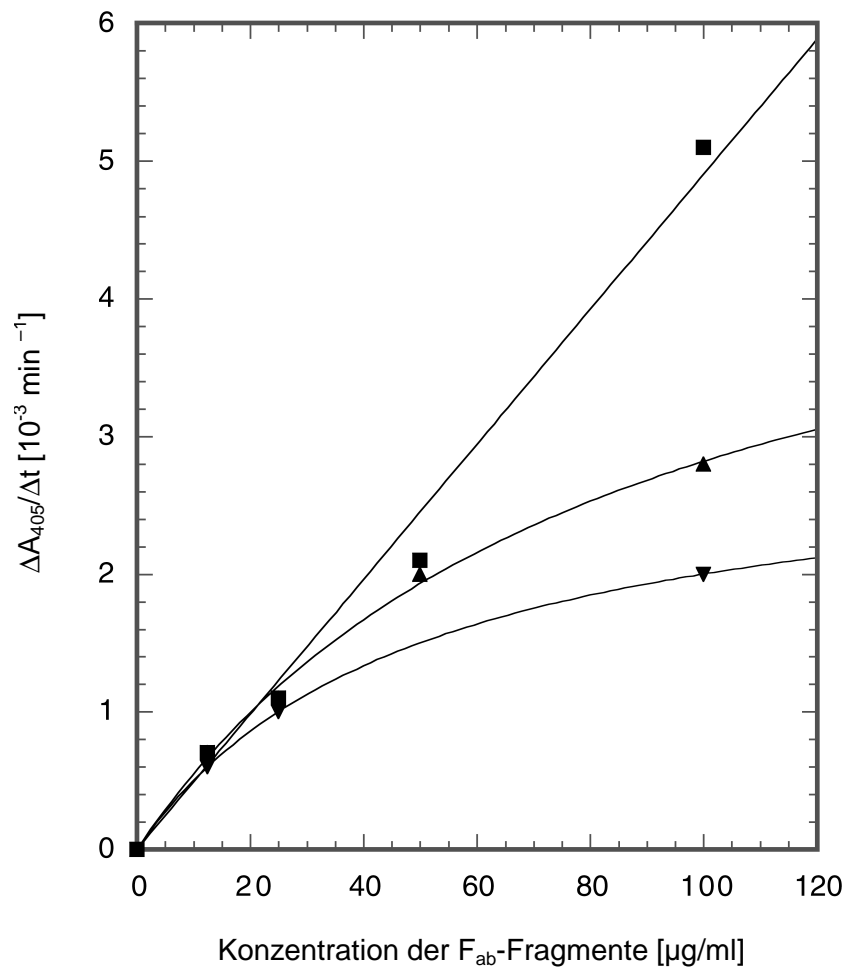
	<u>Val</u> <sup>a</sup> 91	<u>Leu</u> 92
Mutante II.1.1	<b>Arg</b> <sup>b</sup>	<b>Lys</b>
Mutante II.1.2	Cys	<u>Gly</u>
Mutante II.1.3	<u>Met</u>	<b>Lys</b>
Mutante II.1.4	<u>Ile</u>	<i>Thr</i> <sup>b</sup>
Mutante II.1.5	<u>Val</u>	<i>Ser</i>
Mutante II.1.6	<i>Thr</i>	<b>Lys</b>
Mutante II.1.7	<u>Leu</u>	<b>Lys</b>
Mutante II.1.8	<u>Ile</u>	<i>Asn</i>
Mutante II.1.9	<u>Leu</u>	<b>Lys</b>
Mutante II.1.10	<b>Lys</b>	<b>Lys</b>
Mutante II.1.12	<u>Ile</u>	<i>Gln</i>
Mutante II.1.13	<i>Thr</i>	<u>Gly</u>
Mutante III.15	<u>Trp</u> <sup>d</sup>	<b>Arg</b>
Mutante II.2.1	<u>Phe</u>	<u>Trp</u>
Mutante II.2.2	<i>Thr</i>	<u>Leu</u>
Mutante II.2.3	<i>Asn</i>	<u>Trp</u>

<sup>a</sup> unterstrichen: unpolar, ungeladen; <sup>b</sup> *kursiv*: polar, ungeladen; <sup>c</sup> **fett**: polar, geladen; <sup>d</sup> doppelt unterstrichen: aromatisch. Nomenklatur: 1. (römische) Ziffer: Zyklus der Affinitätsmaturierung; 2. (arabische) Ziffer: Numerierung des Filters; 3. (arabische) Ziffer: Numerierung der Kolonie.

Vier der Mutanten (II.1.1, II.1.3, II.1.7, II.1.8) mit funktionell mutagenisierter Genkassette für die V<sub>L</sub>-Domäne wurden im Hinblick auf eine möglichst repräsentative Auswahl der Substitutionen bestimmt. Die bakterielle Produktion der F<sub>ab</sub>-Fragmente (mit ABD) erfolgte ausgehend von dem Vektor pASK106 im 2 L-Schüttelkolben und deren Reinigung wiederum durch IMAC unter FPLC-Bedingungen. Die Antigen-Bindungsaktivität der gereinigten Mutanten wurde mit Hilfe des etablierten ELISAs analysiert. Dabei konnte für die Mutanten II.1.1 und II.1.8 ein Bindungssignal detektiert werden, welches über dem des ursprünglichen I.2.6 (<sup>L96V</sup>) F<sub>ab</sub>-Fragments lag. Für nachfolgende Experimente wurden die Genkassetten für die V<sub>L</sub>-Domäne der Mutanten II.1.1 und II.1.8 in pASK88-IN1 subkloniert, um die entsprechenden F<sub>ab</sub>-Fragmente ohne die albuminbindende Domäne zu produzieren. Mit diesen Ig-



Fragmenten wurden erneute ELISA-Experimente durchgeführt. Dabei erwies sich das Bindungssignal des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments als etwa doppelt so stark, wie das des I.2.6(L<sup>96</sup>V) F<sub>ab</sub>-Fragments. Das II.1.1 F<sub>ab</sub>-Fragment zeigte hingegen keine wesentlich verbesserte Bindung (Abb. 29).

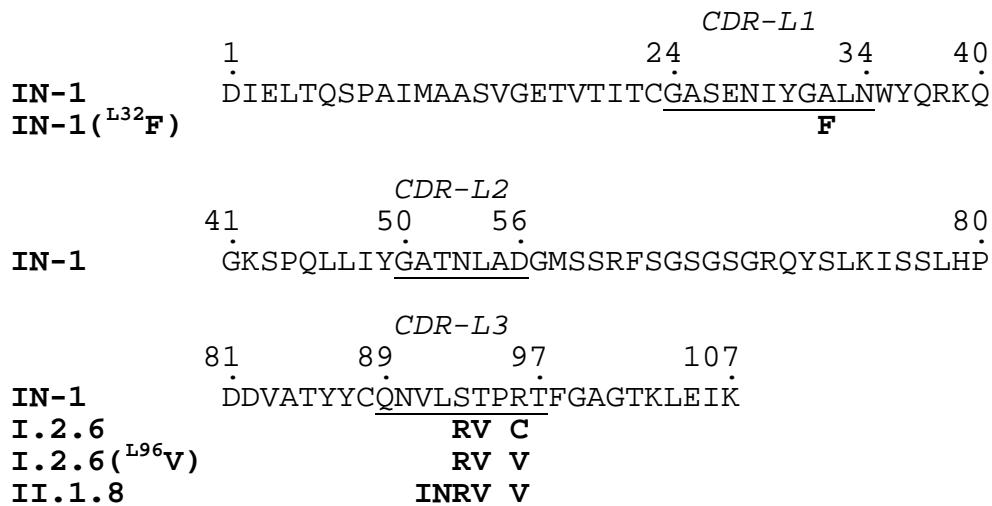


**Abbildung 29:** Analyse der Antigenbindung der Mutanten II.1.1 und II.1.8 aus der zweiten Runde der Affinitätsmaturierung an rekombinantes Nogo-A Fragment (NiFr2) mittels ELISA. Die jeweils gegen die Proteinkonzentration aufgetragenen Signalintensitäten wurden vorher durch Substraktion der entsprechenden Werte der Kontrollen (BSA) korrigiert. Folgende F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden analysiert: Mutante I.2.6(L<sup>96</sup>V) (▲); Mutante II.1.1 (▼); Mutante II.1.8 (■).

Durch die beschriebene Vorgehensweise konnte mit II.1.8 eine Mutante des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments gewonnen werden, die einerseits nachweisbare Wechselwirkung mit dem rekombinanten Nogo-A Fragment (NiFr2) in einem immunchemischen Standardtest zeigte und andererseits in ausreichender Menge für nachfolgende proteinchemische und funktionelle Analysen in *E. coli* produziert werden konnte.

### 3.3.4 Funktionelle Analyse der affinitätsmaturierten Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments

Die durch ortsgerichtete oder Zufallsmutagenese erhaltenen Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit interessanten funktionellen Eigenschaften sind in Abbildung 30 gegenübergestellt.



**Abbildung 30:** Primärsequenz der jeweiligen V<sub>L</sub>-Domäne (Kabat-ID 029919) von Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments. Die Aminosäuren der CDRs sind unterstrichen und deren Beginn und Ende durchlaufend nummeriert. Die Substitutionen, die im Vergleich zum IN-1 Wildtyp eingeführt wurden, sind fett gedruckt und unterhalb der Sequenz angegeben.

Zur weiteren Charakterisierung wurden diese Mutanten (IN-1(L<sup>32</sup>F), I.2.6, I.2.6(L<sup>96</sup>L), II.1.8) als lösliche chimäre F<sub>ab</sub>-Fragmente (Mensch IgG1/κ) in *E. coli* hergestellt. Dazu wurde wie zuvor der Expressionsvektor pASK88 eingesetzt, auf dem das Gen für die schwere Kette des F<sub>ab</sub>-Fragments am Carboxyterminus mit einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel fusioniert war und die Reinigung durch IMAC ermöglichte. Alternativ wurde pASK107 verwendet, der anstelle dessen für das *Strep*-Tag II kodierte, was die Reinigung des produzierten F<sub>ab</sub>-Fragments mittels der Streptavidin-Affinitätschromatographie gestattete.

pASK107 war zuvor ausgehend von pASK102 (Gresch, 1997) und dem Oligodesoxynukleotid MF-3 mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese durch Deletion des Codons für einen freien Cysteinrestes am carboxyterminalen Ende des *Strep*-Tags II hergestellt worden. Zusätzlich wurden einige der F<sub>ab</sub>-Fragmente mit dem Vektor pASK109 (freundlicherweise von M. Schlapschy zur Verfügung gestellt) hergestellt, was die ortsgerichtete Kopplung mit Fluorescein-5-maleimid über einen ungepaarten Cysteinrest am Carboxyterminus der leichten Kette zuließ. Die schwere Kette dieser F<sub>ab</sub>-Fragmente trug das *Strep*-Tag II, was deren die Reinigung mittels der Streptavidin-Affinitätschromatographie

ermöglichte (Detaillierter Überblick über Eigenschaften der verwendeten Vektoren: Siehe Kap. 2.1.2).

**Tabelle 8:** Relative Ausbeuten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner Mutanten bei der Produktion in *E. coli* JM83 im 2 L Schüttelkolben-Maßstab mit den Vektoren pASK88, pASK107 sowie pASK109 und anschließender Einschrittreinigung.

F <sub>ab</sub> -Fragment	Expressionsvektor	rel. Ausbeute [mg L <sup>-1</sup> OD <sup>-1</sup> ]	F <sub>ab</sub> -Fragment	Expressionsvektor	rel. Ausbeute [mg L <sup>-1</sup> OD <sup>-1</sup> ]
IN-1	pASK88 <sup>a</sup>	0,8	IN-1	pASK107 <sup>b</sup>	0,7
IN-1(L <sup>32</sup> F)	pASK88	0,5	IN-1 (Cys <sup>c</sup> )	pASK109 <sup>b</sup>	0,9
I.2.6	pASK88	0,04	II.1.8	pASK107	0,38
I.2.6(L <sup>96</sup> V)	pASK88	0,6	II.1.8 (Cys)	pASK109	0,6
II.1.8	pASK88	0,5			

<sup>a</sup> Reinigung mittels IMAC; <sup>b</sup> Reinigung mittels Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie; <sup>c</sup> Cys = freier Cysteinrest am Carboxyterminus der leichten Kette

Alle gereinigten Ig-Fragmente wurden durch SDS-PAGE analysiert und wiesen jeweils einen Reinheitsgrad von  $\geq 95$  % auf (s. u.). In keinem Fall war eine Ausbildung von Disulphid-isomeren oder nicht-stöchiometrische Zusammensetzung der Polypeptidketten zu erkennen. Die relative Ausbeute an funktionellem F<sub>ab</sub>-Fragment betrug zwischen 0.04 und 0.8 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> (Tab. 8).

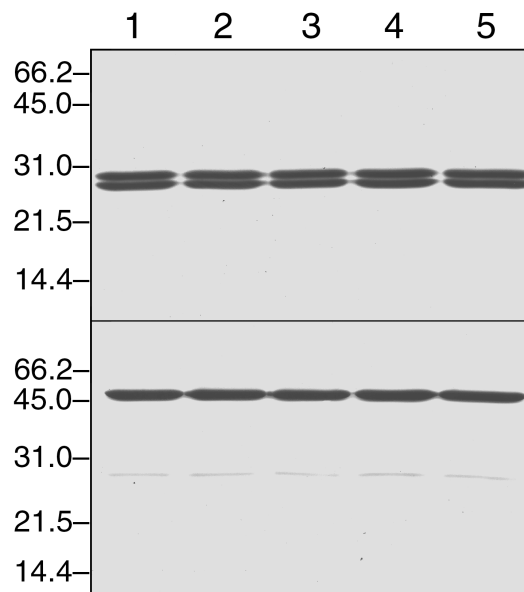
**Tabelle 9:** Massenspektroskopische Analyse des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner Mutanten mittels MALDI-TOF-Messung.

	M [kD] <sub>berechnet</sub> <sup>a</sup>	M [kD] <sub>MALDI-TOF</sub> <sup>b</sup>
IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragment	47.960	48.000
IN-1(L <sup>32</sup> F) F <sub>ab</sub> -Fragment	48.036	48.104
I.2.6 F <sub>ab</sub> -Fragment	47.974	48.023
I.2.6(L <sup>96</sup> V) F <sub>ab</sub> -Fragment	47.970	48.083
II.1.8 F <sub>ab</sub> -Fragment	47.985	48.067

<sup>a</sup> Mit „PEPTIDESCAN“ berechnete Molekulargewichte unter Berücksichtigung von jeweils 5 Disulphidbrücken.

<sup>b</sup> F<sub>ab</sub>-Fragmente (100 µg/ml in PBS), gegen H<sub>2</sub>O dialysiert, mit TFA versetzt und im MALDI-TOF vermessen (Gerät: Biflex III (Bruker Analytik, Rheinstetten); Matrix: α-Cyano-4-hydroxymizsäure; Wellenlänge: 337 nm; Eichprotein: bovines Serumalbumin (BSA), kalkulierte Masse: 66.432.9 Da)

Präparationen der Ig-Fragmente IN-1, IN-1(<sup>L32</sup>F), I.2.6, I.2.6(<sup>L96</sup>V) sowie II.1.8, die mittels IMAC gereinigt worden waren, wurden mittels Massenspektroskopie analysiert (freundlicherweise durchgeführt von Dr. F. J. Winkler). Durch diese Messungen wurden die zuvor mit Hilfe des Computerprogrammes „PEPTIDESCAN“ berechneten Molmassen (Tab. 9) im Rahmen der Meßgenauigkeit bestätigt. Der hohe Reinheitsgrad der Proteinpräparationen wurde durch SDS-PAGE nachgewiesen (Abb. 31).



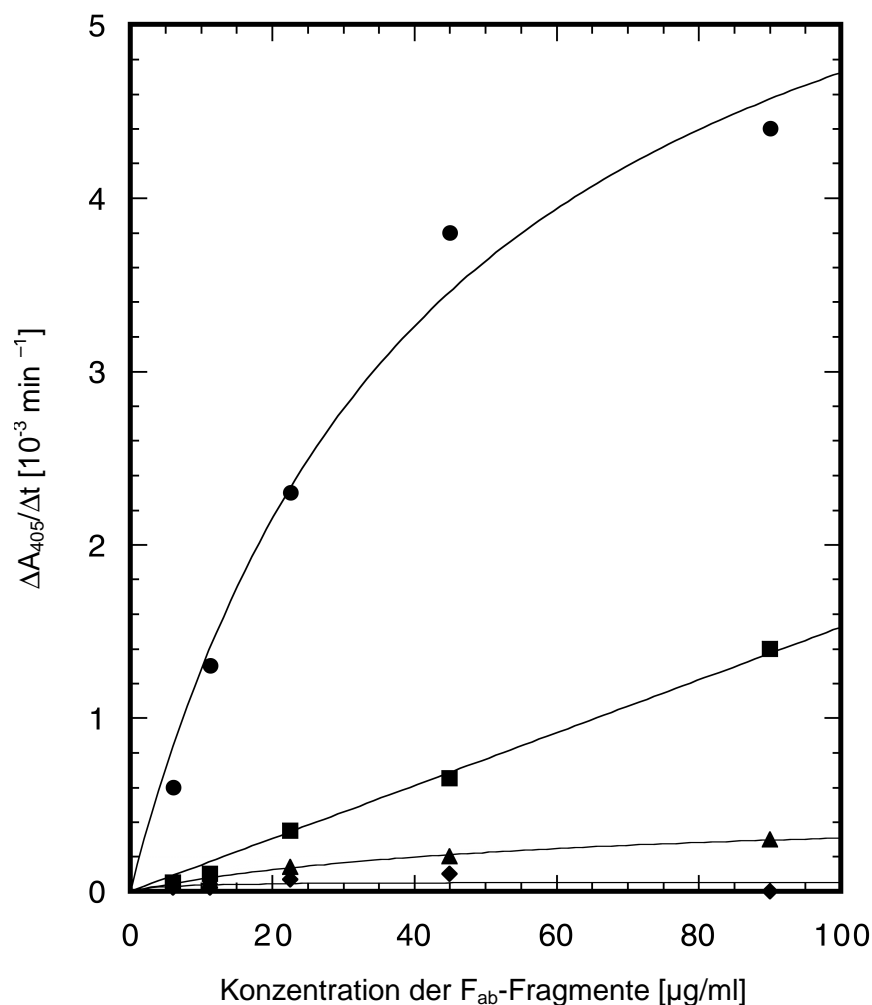
**Abbildung 31:** Analyse des gereinigten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner in CDR-L1 bzw. L3 modifizierten Mutanten durch SDS-PAGE (15 %iges Gel). Die Proben im oberen Gel wurden vor der Elektrophorese mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert, die Proben im unteren Gel nicht. Aufgetragen wurden jeweils 2  $\mu$ g gereinigtes Protein. Spur 1: IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment; Spur 2: IN-1(<sup>L32</sup>F) F<sub>ab</sub>-Fragment; Spur 3: I.2.6 F<sub>ab</sub>-Fragment; Spur 4: I.2.6(<sup>L96</sup>V) F<sub>ab</sub>-Fragment; Spur 5: II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment. Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben.

### 3.4 Nachweis der Bindungs- und Neutralisierungsaktivität der affinitätsmaturierten Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments gegenüber Nogo-A

Die erhaltenen Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit verbesserter Antigenbindung wurden in Verbindung mit den rekombinanten Fragmenten des Nogo-A Proteins im folgenden zur Analyse der Antikörper-Inhibitor Wechselwirkung auf proteinchemischer Ebene eingesetzt. Weiterhin wurden die neuen Mutanten für die Lokalisierung von Nogo-A in Gewebeschnitten des Rattenhirns bzw. -rückenmarks sowie zur Neutralisierung der inhibitorischen Aktivität von Nogo-A in Zellkultur-Experimenten verwendet.

### 3.4.1 Affinitätsanalyse der mutierten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragmente mit Nogo-A und dessen rekombinanten Fragmenten im ELISA

Zum direkten Vergleich der Antigen-Bindungsaktivität der vielversprechendsten Mutanten, die im Verlauf der mehrstufigen Affinitätsmaturierung gewonnen worden waren, wurde ein ELISA mit dem zuvor beschriebenen Aufbau (vgl. Abb. 25) durchgeführt (Abb. 32). Eingesetzt wurden die chimären F<sub>ab</sub>-Fragmente des IN-1 Wildtyps sowie der Mutanten I.2.6, I.2.6<sup>(L96V)</sup> und II.1.8, die mit Hilfe des Vektors pASK88 in *E. coli* JM83 produziert und durch IMAC gereinigt worden waren.



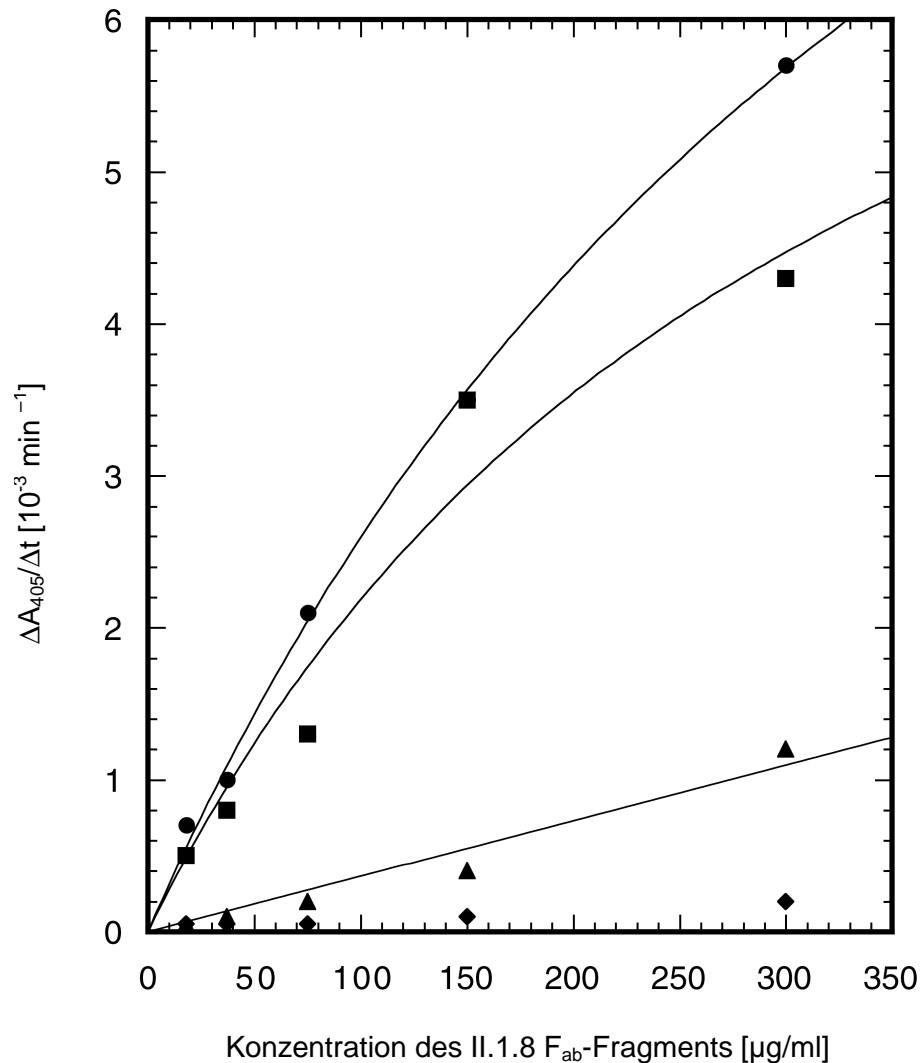
**Abbildung 32:** Qualitative Analyse der Antigen-Bindungsaktivität von affinitätsmaturierten Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments aus JM83/pASK88 gegenüber rekombinatem Nogo-A Fragment (NiFr2; 10 μg/Vertiefung). Die jeweils gegen die Proteinkonzentration aufgetragenen Signalintensitäten wurden vorher durch Subtraktion der entsprechenden Werte der Kontrollen (BSA) korrigiert. Folgende F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden eingesetzt: IN-1 (◆); I.2.6 (●); I.2.6<sup>(L96V)</sup> (▲); II.1.8 (■).

Wie erwartet, zeigte das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment kein nennenswertes Bindungssignal für das rekombinante Antigen im Vergleich zu dem Hintergrundsignal gegenüber BSA. Die stärksten Signale für die Bindung des Antigens lieferte dagegen die Mutante I.2.6, deren Bindungskurve bereits in dem eingesetzten Konzentrationsbereich eine Sättigung anstrebte. Die Mutante II.1.8 zeigte demgegenüber etwa viermal schwächere Signalintensitäten für die Antigenbindung. Die Mutante I.2.6(L<sup>96</sup>V) wies noch nachweisbare Antigenbindung über dem Hintergrundsignal auf. Hier zeigte sich jedoch wiederum, daß die Bindungsaktivität durch die Substitution des Cystein L96 in der Mutante I.2.6 dramatisch verringert worden war (ca. 20 fach).

Zusammenfassend zeigte das I.2.6 F<sub>ab</sub>-Fragment in dieser Reihe die stärkste Antigenbindung, welche über das II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment zum I.2.6(L<sup>96</sup>V) F<sub>ab</sub>-Fragment abnahm. Jedoch erschien die Mutante I.2.6 aufgrund des freien Cysteinrestes für weitere analytische Experimente und längerfristig geplante *In vivo*-Anwendungen als ungeeignet. Neben der sehr geringen Produktionsausbeute bestanden Bedenken hinsichtlich der oxidativen chemischen Modifizierung des freien, reaktiven Cysteinrestes, die einen möglichen Aktivitätsverlust zur Folge hätte. Weitere Experimente wurden dementsprechend mit dem II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment durchgeführt.

In Vorbereitung auf nachfolgende Zellkultur-Experimente, die im Labor von Prof. M. Schwab an der ETH Zürich durchgeführt wurden, wurde die Bindungsaktivität des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments an das dort hergestellte rekombinante Nogo-A Fragment („NiExt“) sowie an angereichertes, natives Nogo-A aus dem Myelin-Proteinextrakt des Rinderrückenmarks (*q-pool*, Spillmann *et al.*, 1998) im ELISA überprüft (Abb. 33). Bei NiExt handelte es sich um ein im Cytosol von *E. coli* produziertes rekombinantes Fragment, welches das gesamte Nogo-A Polypeptid bis auf die deletierten Reste 943 bis 1298 umfaßt. Es wurde aus Einschlußkörpern zurückgefaltet und mittels eines Hexahistidin-Anhängsels durch IMAC gereinigt (Dr. M. Chen, persönliche Mitteilung). Der ELISA, bei dem zum Vergleich ebenfalls mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigtes NiFr2 eingesetzt wurde, hatte den zuvor beschriebenen Aufbau (vgl. Abb. 25).

Das II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment zeigte dabei vergleichbare konzentrationsabhängige Bindungssignale für die beiden unterschiedlichen rekombinanten Nogo-A Fragmente. Das niedrigere Signal, welches gegenüber dem *q-pool* – im Vergleich zur BSA-Kontrolle – erhalten wurde, deutet auf die Erkennung des in dieser Myelin-Proteinfraktion angereicherten nativen Nogo-A hin.



**Abbildung 33:** Bindungsaktivität des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments gegenüber rekombinatem (NiFr2, NiExt) und nativem Nogo-A (in Myelin-Proteinextrakt; *q-pool*). Rekombinantes NiFr2 wurde sekretorisch in *E. coli* produziert und mit Hilfe des *Strep*-Tags gereinigt, während die Produktion von NiExt im Cytosol von *E. coli* erfolgte und das Protein nach Rückfaltung durch IMAC gewonnen wurde. Die Vertiefungen der Mikrotiter-Platte wurden mit folgenden Proteinen belegt: NiFr2 (■); NiExt (●); *q-pool* (▲); BSA (◆). Die Antigenmenge betrug ca. 10 μg pro Vertiefung für NiFr2 und NiExt, während von *q-pool* (gesamter Proteingehalt: 0.8 mg/ml) 50 μl pro Vertiefung eingesetzt wurden. Die maximale Konzentration des eingesetzten II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments betrug 300 μg/ml bzw. 6 μM.

### 3.4.2 Bestimmung der Bindungskonstante des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner Mutante II.1.8 für das Nogo-A Fragment NiFr4 mittels Oberflächen-Plasmonresonanz

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für den Komplex zwischen dem IN-1 bzw. II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment einerseits und dem rekombinanten Nogo-A Fragment – in Form von NiFr4 (vgl. Kapitel 3.2.2) – andererseits erfolgte mit Hilfe eines BIACORE 2000 bzw. eines BIACORE X-Gerätes (vgl. Kapitel 2.5.3). Hierfür wurde zunächst ein auf das BIACORE-System adaptierter, experimenteller Aufbau entwickelt. Für die Immobilisierung des Antigens

stand zunächst NiFr2 (C-terminales *Strep*-Tag; siehe Kapitel 3.2.1) und später NiFr4 (N-terminales *Strep*-Tag II, C-terminales His<sub>6</sub>-Tag; siehe Kapitel 3.2.2) zur Verfügung. Die im Verlaufe der verschiedenen Experimente eingesetzten F<sub>ab</sub>-Fragmente sind in Tabelle 8 (siehe Kapitel 3.3.3) aufgeführt.

Zur Immobilisierung des rekombinanten Nogo-A Fragments an die Sensor-*Chip*-Oberfläche standen mehrere Alternativen zur Auswahl:

- (i) NHS/EDC-Kopplung über primäre Amingruppen an die Carboxy-Methyldextran-Oberfläche im Falle des Sensor-*Chips* CM5 (O'Shannessy *et al.*, 1992),
- (ii) Derivatisierung mit D-Biotinyl- $\epsilon$ -Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester in Lösung und Immobilisierung über Streptavidin an der Oberfläche eines SA-Sensor-*Chips* (O'Shannessy *et al.*, 1992),
- (iii) genetische Fusion mit einem (Hexa-)Histidinhängsel und Ni<sup>2+</sup>-vermittelte Immobilisierung an Nitrilotriacetatgruppen eines NTA-*Chips* (Nieba *et al.*, 1997).

Zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorangegangenen ELISA-Experimenten, – aber auch aufgrund ökonomischer Überlegungen – erschien es sinnvoll, zunächst das rekombinante Nogo-A Fragment an der Oberfläche eines CM5-*Chips*, welcher allgemein als Standardträger verwendet wird, zu immobilisieren. Dies sollte die Analyse unterschiedlicher Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments an demselben Sensor-*Chip* ermöglichen.

Die NHS/EDC-Kopplung von NiFr2 an die Oberfläche des CM5-Sensor-*Chips* gelang jedoch trotz intensive Optimierungsversuche, bei denen u. a. Proteinkonzentration, Pufferzusammensetzung und pH-Wert variiert wurden, nicht. Bei keinem dieser Experimente konnte vor der eigentlichen Immobilisierung eine Anreicherung des zu koppelnden Antigens durch elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Oberfläche des CM5-*Chips* erzielt werden („Präkonzentrations-Effekt“), was für eine effiziente NHS/EDC-Kopplung unerlässlich ist. Der Grund für das Mißlingen dieser Strategie lag offensichtlich im niedrigen isoelektrischen Punkt (kalkulatorischer  $pI_{NiFr} \approx 4,0$ ) des rekombinanten Nogo-A Fragments und der damit negativen Ladung des Proteins bei zugänglichen pH-Werten begründet, was zu einer Abstoßung von der Sensor-*Chip*-Oberfläche führen muß. Eine weitere Absenkung des pH-Wertes auf 3,0 während der Immobilisierungsreaktion erwies sich als nicht geeignet, da unter diesen Bedingungen die Carboxylatgruppen protoniert sind und es vermutlich zudem zu einer schnellen Hydrolyse der aktivierten NHS-Ester an der Trägeroberfläche kommt. Damit erwies sich – trotz wiederholter Versuche – die direkte Immobilisierung von NiFr2 an den CM5-Sensor-*Chip* mittels NHS/EDC-Kopplung als nicht durchführbar.

Dagegen war die Immobilisierung von NiFr2 an einen kommerziell erhältlichen SA-Sensor-*Chip* mittels dem carboxyterminalen *Strep*-Tag mit  $\Delta RU = 100$  im Prinzip erfolgreich. Auch wenn Streptavidin (Wildtyp oder Mutante „1“; Voss und Skerra, 1997) selbst mittels

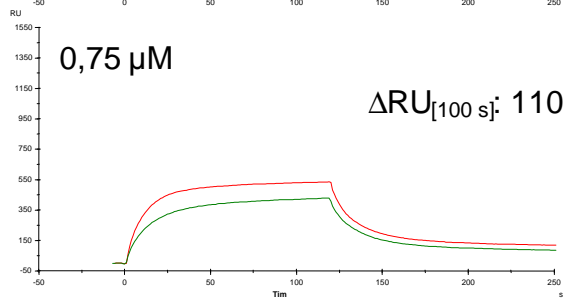
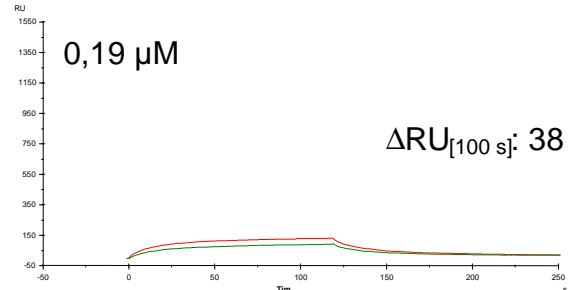
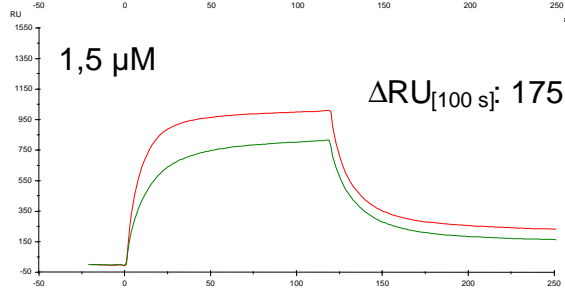
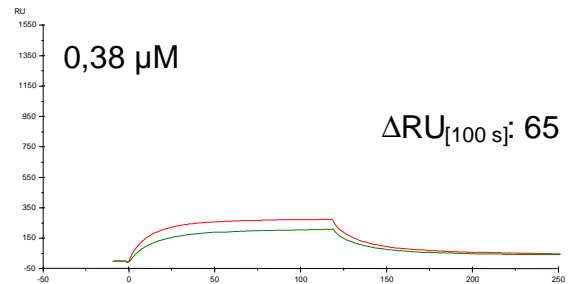
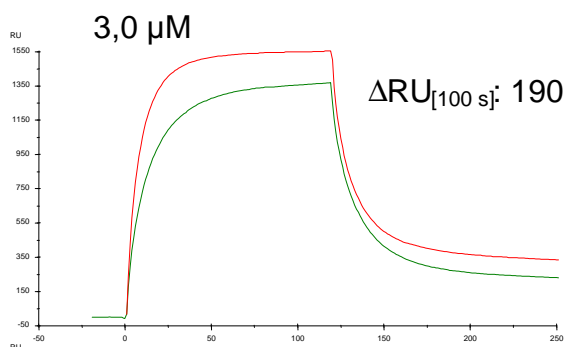
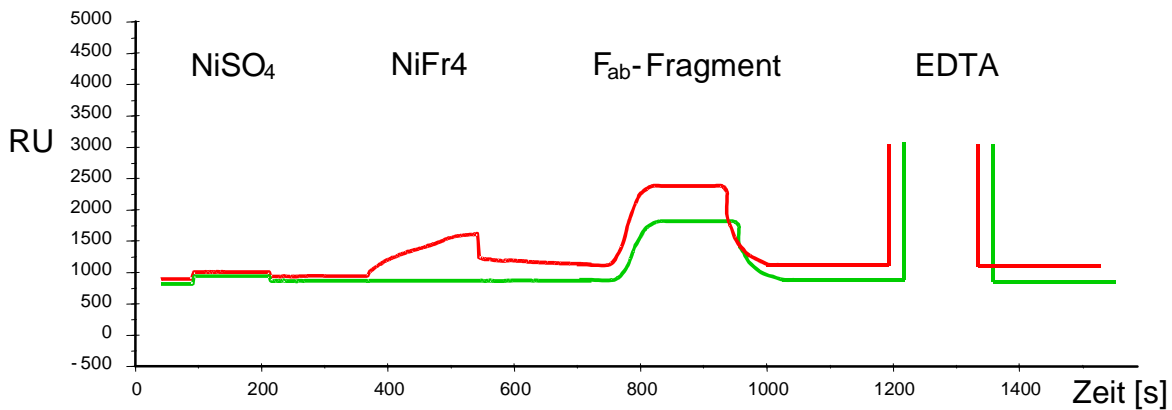


NHS/EDC-Kopplung an der Oberfläche eines CM5-Sensor-Chips fixiert wurde war, konnte NiFr2 über das *Strep*-Tag immobilisiert werden. Dabei mußte jedoch in allen Fällen ein rasches Auswaschen des Nogo-A Fragments festgestellt werden.

Durch Derivatisierung von NiFr2 mit D-Biotinyl- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure-N-Hydroxy-succinimidester in Lösung konnte das Nogo-A Fragment allerdings mit  $\Delta\text{RU} = 200$  stabil an der Oberfläche von SA-Sensor-Chips immobilisiert werden. Bei der anschließenden Applikation von verschiedenen,  $F_{\text{ab}}$ -Fragmenten – IN-1 (Wildtyp), IN-1(<sup>L32</sup>F), IN-1(<sup>L96</sup>L), – zeigten diese jedoch jeweils erhebliche unspezifische Wechselwirkung mit der mit Streptavidin beladenen Trägeroberfläche. Die analysierten  $F_{\text{ab}}$ -Fragmente waren als His<sub>6</sub>-Fusion mit Hilfe von JM83/pASK88 produziert, mittels IMAC gereinigt worden und besaßen menschlichen konstanten Domänen. Um einen eventuellen negativen Effekt der humanen konstanten Domänen in diesem Zusammenhang auszuschließen, wurden die entsprechenden  $F_{\text{ab}}$ -Fragmente, die mit Hilfe des Vektors pASK85 hergestellt worden waren und konstante Domänen der Maus trugen, ebenfalls analysiert. Jedoch war auch hierbei ausschließlich eine starke unspezifische Wechselwirkung mit der *Chip*-Oberfläche zu beobachten. Auch durch Veränderung der Pufferbedingungen konnte diese unspezifische Interaktion nicht eliminiert werden.

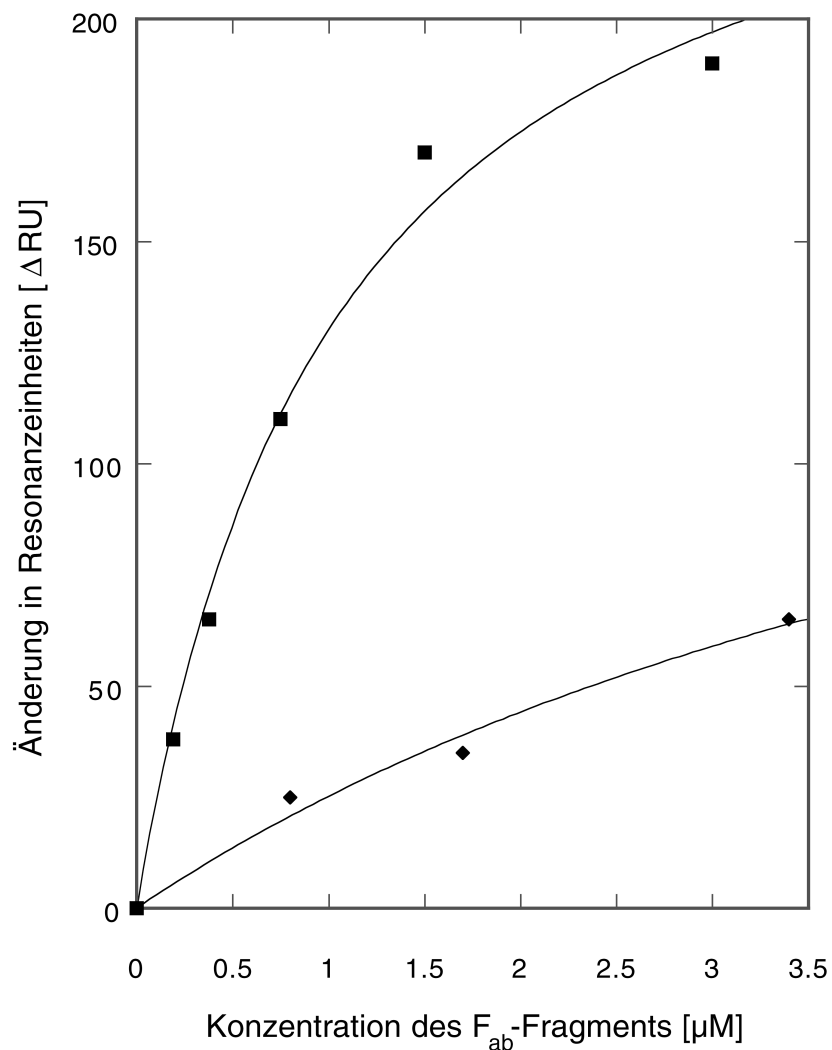
Letztendlich war die Verwendung von NiFr4, das am Caroxyterminus mit einem Hexahistidin-Anhängsel ausgestattet war (vgl. Kapitel 3.2.2), in Verbindung mit einem Ni/NTA-Sensor-Chip erfolgreich. Hierbei konnte die einem  $\Delta\text{RU}$ -Wert von 300 entsprechende Konzentration des rekombinanten Nogo-A Fragments an der Oberfläche des Sensor-Chips relativ stabil immobilisiert werden. Bei der nachfolgenden Injektion der  $F_{\text{ab}}$ -Fragmente, welche mit Hilfe von JM83/pASK107 produziert worden waren und das *Strep*-Tag anstelle des His<sub>6</sub>-Peptids trugen, wurde zwar ein relativ hohes, aber konstantes Hintergrundsignal festgestellt. Ein darüberliegendes Signal, welches in konzentrationsabhängiger Weise nur in dem mit NiFr4 belegten Kanal auftrat, konnte hiervon gut separiert werden (Abb. 34).

Wurde eine vergleichbare Menge rekombinantes Cystatin-His<sub>6</sub> (freundlicherweise von M. Paschke zur Verfügung gestellt) anstelle von NiFr4 an der *Chip*-Oberfläche immobilisiert, war mit keinem der verwendeten Ig-Fragmente ein Bindungssignal zu detektieren. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurden die Konzentrationen an immobilisiertem NiFr4 und appliziertem  $F_{\text{ab}}$ -Fragment so gewählt, daß während der Messung ein detektierbares Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Bindungspartner erreicht wurde. Das entsprechende Bindungssignal zeigte ein Sättigungsverhalten bei einem RU-Wert, der abhängig von der eingesetzten Konzentration des IN-1  $F_{\text{ab}}$ -Fragments bzw. des II.1.8  $F_{\text{ab}}$ -Fragments war.



**Abbildung 34:** Quantitative Analyse der Bindungsaffinität des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments bzw. der Mutante II.1.8 zu rekombinantem NiFr4 durch SPR-Messung am BIACORE-X Gerät. Im oberen Teil ist die Immobilisierungs- und Meßstrategie an einem Ni/NTA-Sensor-Chip dargestellt. Die Trägeroberfläche von zwei Kanälen wurde zunächst mit Ni<sup>2+</sup> beladen, woraufhin in einem der Kanäle NiFr4 immobilisiert wurde. Nach der Applikation des F<sub>ab</sub>-Fragments wurde das System mit EDTA regeneriert. Die Injektionsdauer für alle Lösungen betrug 2 min bei einer Flußgeschwindigkeit von 35 µl/min. NiFr4 wurde lediglich an der Oberfläche eines der beiden zur Verfügung stehenden Kanäle immobilisiert, der andere diente als Kontrolle für das unspezifische Bindungssignal. Die Signale bei der Applikation verschiedener Konzentrationen des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments sind für die beiden Spuren im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Der angenäherte Differenz-Gleichgewichtswert ΔRU ist jeweils angegeben.

Das Differenzsignal nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts im Vergleich zur unbeladenen Sensor-*Chip*-Oberfläche wurde gegen die jeweilige Konzentration der injizierten  $F_{ab}$ -Fragmente aufgetragen. Die entsprechenden Wertepaare führten nach der Anpassung durch nicht-lineare Regression zu den in Abbildung 35 dargestellten Bindungsisothermen. Für das IN-1  $F_{ab}$ -Fragment ergab sich ein  $K_D$ -Wert von ca. 8,0  $\mu\text{M}$  und für das II.1.8  $F_{ab}$ -Fragments ein Wert von ca. 1,0  $\mu\text{M}$ .



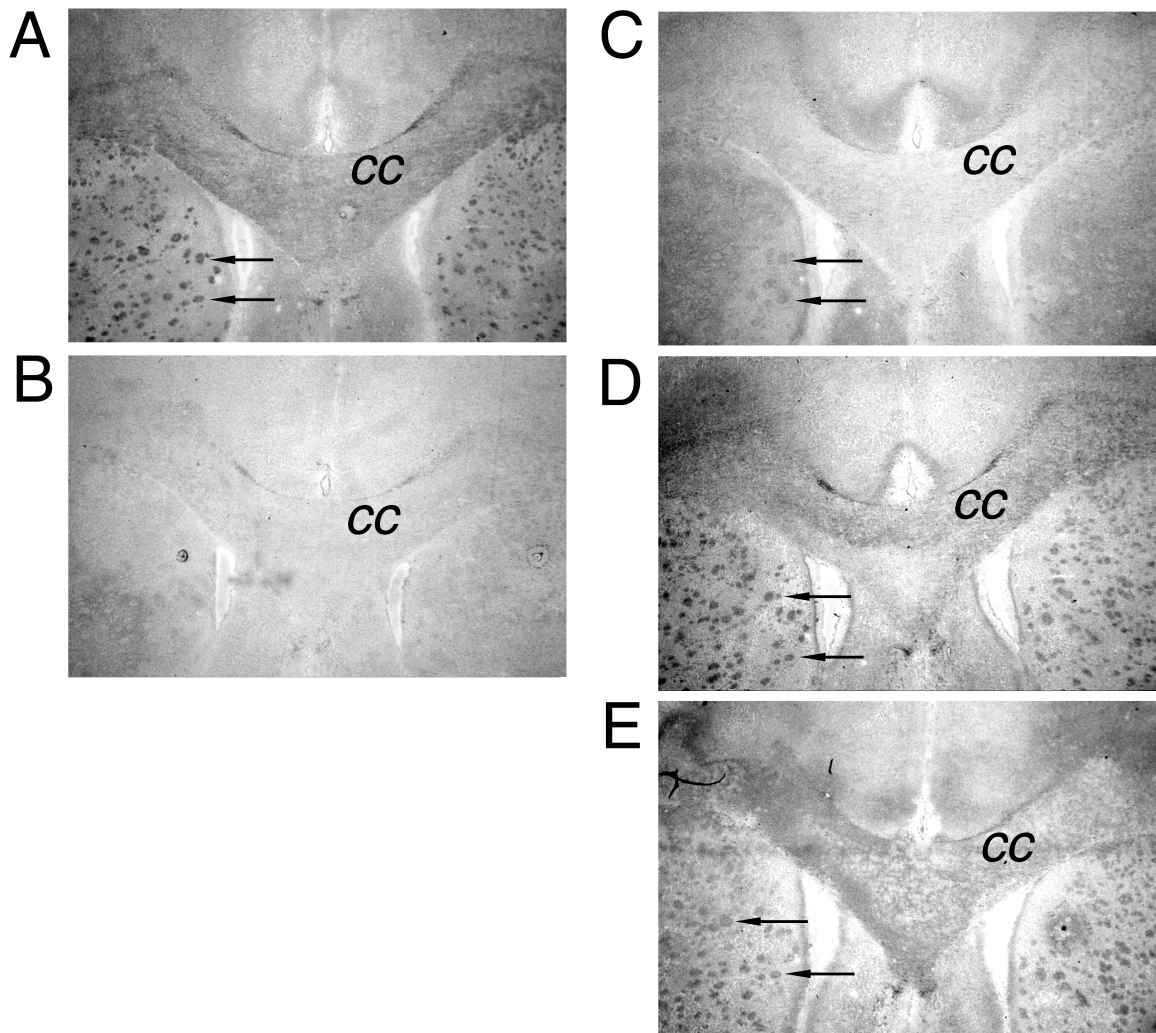
**Abbildung 35:** Quantitative Analyse der Bindungsaffinität des IN-1  $F_{ab}$ -Fragments und der Mutante II.1.8 zu rekombinantem NiFr4 durch SPR-Messung am BIACORE-X Gerät (vgl. Abb. 34). Aufgetragen ist das spezifische Bindungssignal gegen die jeweilige Konzentration des IN-1  $F_{ab}$ -Fragments ( $\blacklozenge$ ) und des II.1.8  $F_{ab}$ -Fragments ( $\blacksquare$ ). Die Auswertung erfolgte durch nicht-lineare Regression und ergab einen  $K_D$ -Wert von  $7,8 \pm 1,9$  für das IN-1  $F_{ab}$ -Fragment und  $1,04 \pm 0,18$  für das II.1.8  $F_{ab}$ -Fragment.

### 3.4.3 Analyse der Antigenerkennung durch das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und seiner Mutanten an Gewebeschnitten adulter Ratten

Für das neuronale Inhibitorprotein Nogo-A ist eine integrale Verankerung in der Membran von Oligodendrozyten wahrscheinlich (Huber und Schwab, 2000). Diese Zellen bilden die Myelinscheide der axonalen Zellfortsätze und mit ihnen die sogenannten Bahnen des zentralnervösen Gewebes. Die Bahnen oder die „Weiße Substanz“ verbinden die Kerngebiete („Graue Substanz“) des ZNS, in denen die Perikaryen der Neuronen lokalisiert sind. Zu der besonders myelinhaltigen Weißen Substanz des Gehirns gehören u. a. der Balken (*Corpus callosum*) sowie die Nervenbahnen des Striatums (*Corpus striatum*) und der *Commissura anterior*.

Zum Nachweis von Nogo-A in myelinisierten Bereichen des ZNS der Ratte durch das rekombinante F<sub>ab</sub>-Fragment mit immunhistochemischen Methoden wurden Kryoschnitte des Hirns verwendet. Die eingesetzten chimären F<sub>ab</sub>-Fragmente (Mensch IgG1/κ) trugen jeweils ein Hexahistidin-Peptid am Carboxyterminus der schweren Kette (vgl. Kapitel 3.3.4). Gebundenes F<sub>ab</sub>-Fragment wurde mit einem Anti-Human C<sub>κ</sub>-Antikörper, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, nachgewiesen.

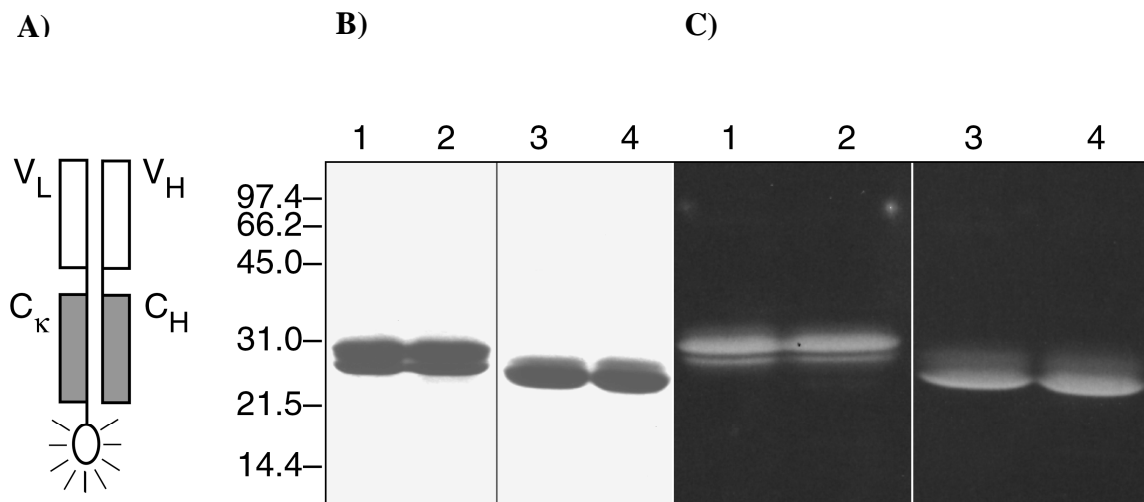
Die Analyse der entwickelten Schnitte unter dem Mikroskop ergab eine spezifische Anfärbung der myelinisierten Bereiche – insbesondere der Region des *Corpus callosum* und der Nervenbahnen der *Capsula interna* des Striatum – durch die Mutante II.1.8 (Abb. 36). Die Färbung war hinsichtlich Morphologie und Intensität mit der des F<sub>ab</sub>-Fragments des anti-MOG Antikörpers 8-18C5 vergleichbar, der als Positivkontrolle gegen das *Major Oligodendrocyte Glycoprotein* (MOG) gerichtet ist (Linington *et al.*, 1984). Die Färbung durch die Mutante I.2.6<sup>(L96V)</sup> war ähnlich spezifisch, jedoch weniger intensiv. Hingegen färbte das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment – ebenso wie das als Negativkontrolle verwendete F<sub>ab</sub>-Fragment des anti-CD30 Antikörpers HRS3 (Engert *et al.*, 1990) – die myelinisierten Bereiche nicht bzw. nur sehr schwach an.



**Abbildung 36:** Spezifische Anfärbung von myelinhaltigen Regionen im Hirn der Ratte mit Hilfe des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und seiner Varianten. Der Bereich um den *Corpus callosum* (cc) ist mit 20facher Vergrößerung gezeigt. Die Pfeile markieren die von rostral nach caudal verlaufenden Nervenbahnen der *Capsula interna* des *Corpus striatum*. Verwendet wurden folgende bakteriell produzierten F<sub>ab</sub>-Fragmente: A, Anti-MOG F<sub>ab</sub>-Fragment (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Zander); B, Anti-CD30 F<sub>ab</sub>-Fragment (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Schlapschy); C, IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment; D, I.2.6(L<sup>96</sup>V) F<sub>ab</sub>-Fragment; E, II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment.

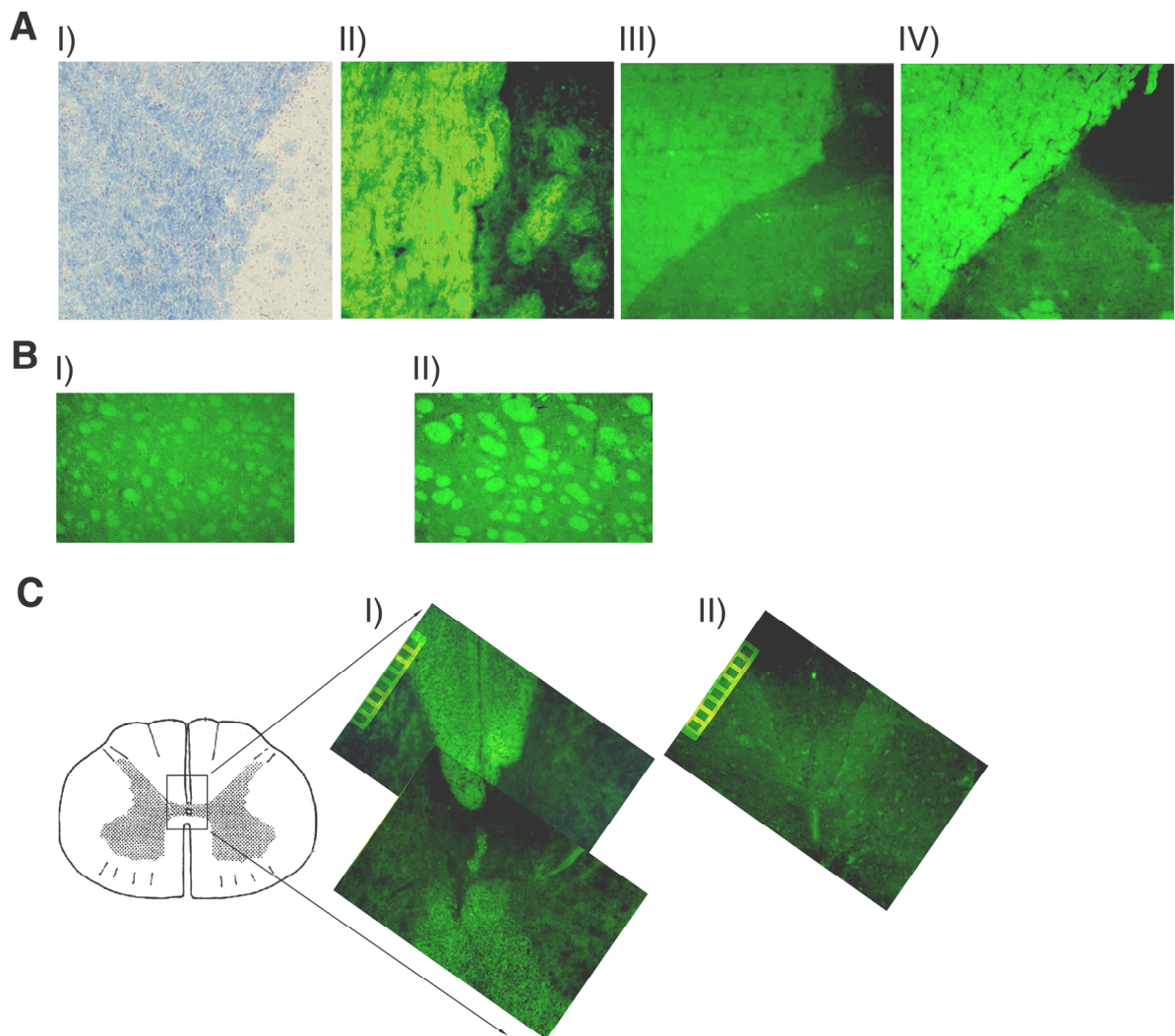
Darüber hinaus wurde Nogo-A in der Weißen Substanz des ZNS der Ratte durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierzu wurden Kryoschnitte des Hirns sowie des Rückenmarks verwendet. Für diesen Zweck wurden das IN-1 und das II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment unter Verwendung des Vektors pASK109 mit einem freien Cysteinrest am Carboxyterminus der leichten Kette in *E. coli* hergestellt (vgl. Kapitel 3.3.4). Die Reinigung der Ig-Fragmente wurde mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Danach erfolgte die

ortsspezifische Markierung des Antikörperfragments am reaktiven Cysteinrest durch Umsetzung mit Fluorescein-5-maleimid (Abb. 37).



**Abbildung 37:** Ortsgerichtete Derivatisierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments mit Fluorescein-5-maleimid. (A) Schematische Darstellung des fluoreszenzmarkierten F<sub>ab</sub>-Fragments. Das Fluoresceinmolekül wurde an einen freien Cysteinrest am Carboxyterminus der leichten Kette gekoppelt. Der Cysteinrest, der normalerweise an der Ausbildung der interchenaren Disulphidbrücke beteiligt ist, stand nach der Substitution C<sub>H224</sub>→S innerhalb der schweren Kette für die Kopplungsreaktion zur Verfügung. Die Assoziation von schwerer und leichter Kette fand mit ausreichender Stabilität durch nicht-kovalente Wechselwirkung statt. (B) Kopplungsanalyse durch SDS-PAGE (15 %iges Gel) nach Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau. (C) Bestahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm und Photographieren mit einem Gelbfilter. Die selektive Markierung der leichten Kette, welche die langsamere Mobilität aufweist, ist deutlich zu erkennen. Aufgrund der Deletion der interchenaren Disulphidbrücke zeigen die Fragmente unter nicht-reduzierenden Bedingungen keine Verschiebung zu höheren Molmassen, sondern nur die typische Mobilitätszunahme aufgrund der intrachenaren Disulphidbindungen in den Immunglobulinomänen. Spur 1: mit β-Mercaptoethanol reduziertes IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment; Spur 2: mit β-Mercaptoethanol reduziertes II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment; Spur 3: IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment, nicht reduziert; Spur 4: II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment, nicht reduziert.

Die fluoreszenzmarkierten chimären F<sub>ab</sub>-Fragmente (Mensch IgG1/κ) wurden direkt auf die Schnitte appliziert und gebundenes F<sub>ab</sub>-Fragment mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops durch Anregung sichtbar gemacht. Die Analyse der Schnitte am Mikroskop ergab insgesamt nur schwache Markierung der myelinhaltigen Regionen, die im Falle des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments kaum über dem Hintergrundsignal lag. Bei starker Vergrößerung (50 bis 100fach) war insbesondere im Falle des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments jedoch eine spezifische Fluoreszenzmarkierung der Weißen Substanz des Gehirns (*Corpus callosum*, Nervenbahnen des *Corpus striatum*) wie auch des Rückenmarks (Vorder- und Hinterstrang) zu erkennen (Abb. 38).



**Abbildung 38:** Spezifischer Nachweis myelinhaltiger Regionen im ZNS der Ratte durch Immunfluoreszenz mit Hilfe von fluoresceinmarkiertem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und seiner Mutante II.1.8. Dargestellt sind Ausschnitte aus folgenden Regionen der Weißen Substanz: **(A)** *Corpus callosum*: I, selektive Anfärbung von Myelin; II, Anti-MOG F<sub>ab</sub>-Fragment; III, IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment; IV, II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment; **(B)** *Corpus striatum*: I, IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment; II, II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment; **(C)** Hinterstrang des Rückenmarks: I, II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment; II, IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment.

#### 3.4.4 Untersuchungen zur Neutralisierung der inhibitorischen Wirkung von Nogo-A durch die Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mittels Zellkultur-Assay

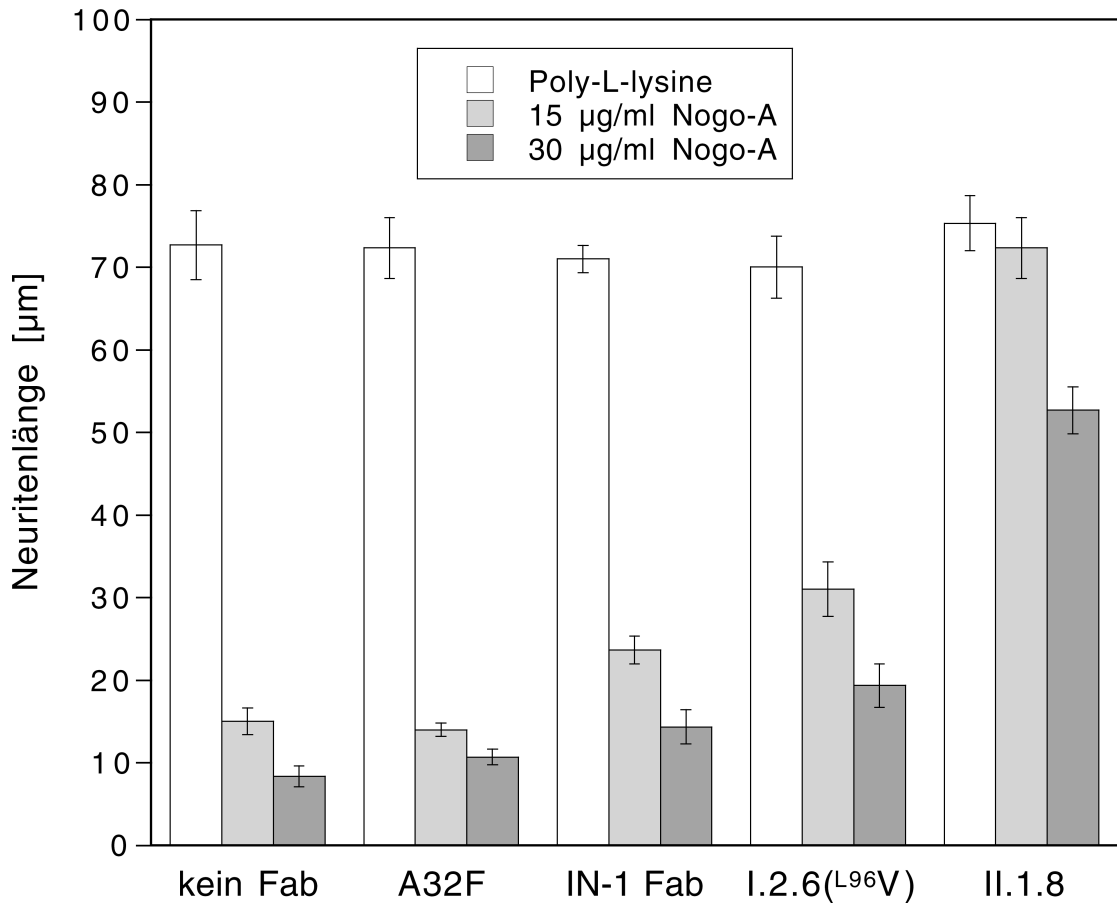
Nach Zugabe des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments können bestimmten Zellen wie Neuronen oder Fibroblasten auch in Gegenwart von inhibitorisch aktivem Myelin-Proteinextrakt oder von gereinigtem Nogo-A aussprossen und Fortsätze bilden (Bandtlow *et al.*, 1996; Broesamle *et al.*, 2000). Mittels des hierauf basierenden 3T3-Fibroblasten-*Spreading*-Tests wurde bereits die neutralisierende Aktivität der Mutanten R<sub>L96</sub>→L und A<sub>L32</sub>→F des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments untersucht (siehe Kapitel 3.3.2). Im folgenden wurde

überprüft, inwiefern die verbesserte Bindungsaktivität der Mutanten I.2.6(<sup>L96V</sup>) und II.1.8 zu einer Steigerung ihrer wachstumsfördernden Eigenschaften führte.

Die beschriebenen Zellkultur-Tests zum Vergleich der Inhibitor-neutralisierenden Aktivität der IN-1 Mutanten wurden im Labor von Prof. Dr. C. Bandtlow an der Universität Innsbruck mit Neuronen durchgeführt. Dazu wurden die Vertiefungen einer Kulturplatte mit NiExt (rekombinantes Nogo-A Fragment, rückgefaltet aus bakteriellen *Inclusion bodies*; vgl. Kapitel 3.4.1) belegt und danach mit den zu analysierenden chimären F<sub>ab</sub>-Fragmenten – IN-1, IN-1(<sup>L32F</sup>), I.2.6(<sup>L96V</sup>) und II.1.8, – die jeweils ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel trugen, inkubiert. Schließlich wurden Granulazellen aus dem Cerebellum siebentägiger Ratten in die so vorbehandelten Vertiefungen transferiert und Anzahl bzw. Länge der sich ausbildenden Fortsätze im Vergleich zum Wachstum auf Poly-L-Lysin als Kontrolle quantifiziert.

Das Neuritenwachstum der Granulazellen war dabei auf der mit Nogo-A belegten Oberfläche deutlich eingeschränkt, während in Gegenwart von Poly-L-Lysin Anheftung der Zellen und Wachstum der Fortsätze über eine Distanz von 70 µm (bei 70 % der angehefteten Zellen) stattfand. Die inhibitorische Aktivität des Nogo-A Fragments wurde in unterschiedlichem Ausmaß von dem eingesetzten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und seiner Mutanten neutralisiert (Abb. 39). Während das rekombinante Wildtyp IN-1 F<sub>ab</sub> Fragment die inhibitorische Wirkung des Substrates moderat neutralisierte, war dieser Effekt durch die Mutation A<sub>L32</sub>→F komplett aufgehoben (vgl. Kapitel 3.3.2). Dagegen wiesen die Mutanten I.2.6(<sup>L96V</sup>) und besonders II.1.8 eine jeweils deutlich stärkere neutralisierende Aktivität auf. Auch im Falle einer Konzentrationserhöhung des inhibitorischen Materials ermöglichte insbesondere die Mutante II.1.8 immer noch ein Neuritenwachstum über eine Distanz von 50 µm bei 70 % der Granulazellen. Ein Effekt der F<sub>ab</sub>-Fragmente auf das Neuritenwachstum in Abwesenheit des rekombinanten Nogo-A Fragments war in keinem Fall nachzuweisen. Die in diesem Experiment beobachtete Verbesserung der biologischen Aktivität im Vergleich zu dem Wildtyp IN-1 stand demzufolge im Einklang mit der Erhöhung der proteinchemischen Bindungsaktivität der Mutanten I.2.6(<sup>L96V</sup>) und II.1.8 (vgl. Kapitel 3.4.2).





**Abbildung 39:** Vergleich der biologischen Aktivität von affinitätsmaturierten Mutanten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Zellkultur-Test. Die quantitative Bestimmung der Neuritenlänge von Granulazellen aus dem Cerebellum juveniler Ratten, die in Gegenwart der rekombinanten F<sub>ab</sub>-Fragmente kultiviert wurden, wurde bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem Nogo-A Fragment („NiExt“, vgl. Kapitel 3.4.1) durchgeführt. Die Konzentration der F<sub>ab</sub>-Fragmente betrug jeweils 100 µg/ml. Aufgeführt ist die durchschnittliche Neuritenlänge im Vergleich mit nichtinhibiertem Wachstum auf Poly-L-Lysin.

### 3.5 Humanisierung der Variante II.1.8 des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments durch CDR-Transplantation auf der Grundlage des menschlichen Anti-Thyroidperoxidase Autoantikörpers TR1.9

Aufgrund seiner neuroregenerativen Eigenschaften bietet der Antikörper IN-1 und sein bakteriell hergestelltes F<sub>ab</sub>-Fragment einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung von Läsionen des humanen ZNS wie z. B. von Rückenmarksverletzungen, welche zur Querschnittslähmung führen (Horner und Gage, 2000). Die Optimierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments hinsichtlich seiner biologischen Aktivität, die im Rahmen dieser Arbeit zu der aktiveren Mutante II.1.8 führten, konnte als ein Schritt in Richtung zur Bereitstellung eines Therapeutikums gelten. Konsequenterweise mußte als nächster Schritt die Verbesserung der Verträglichkeit durch den menschlichen Organismus folgen, da eine Immunreaktion auf die variablen Domänen des chimären II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments nicht ausgeschlossen werden konnte

(Queen *et al.*, 1989). Besonders bei der Langzeitbehandlungen von Patienten mit artfremdem Immunglobulin werden starke Immunantworten – selbst bei entsprechender Immunsuppression – allgemein beobachtet (Shawler *et al.*, 1985; Jaffers *et al.*, 1986). Um die Gefahr einer Immunantwort zu minimieren, sollte das II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment durch Transplantation seiner CDRs auf eine humane Gerüstregion (sogenanntes CDR-*Grafting*, Riechmann *et al.*, 1988) in seiner Aminosäureabfolge weitestgehend an ein natürliches menschliches Antikörperfragment angepaßt werden. Die generelle Vorgehensweise dazu verläuft in folgenden Schritten (Bending und Jones, 1996):

- 1.) Analyse der Primärsequenz der variablen Domänen des Ausgangsantikörpers (Subtyp, Länge der CDRs und der Gerüstregionen, kanonische Strukturen, Positionen in der V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>-Kontaktregion, CDR-flankierende Aminosäuren);
- 2.) Auswahl humaner variabler Domänen mit größtmöglicher Sequenzhomologie und Übereinstimmung in den unter 1.) genannten Kriterien mit dem Ausgangsantikörper;
- 3.) Design der Aminosäuresequenzen für die humanisierten variablen Domänen aus den CDR-Sequenzen des ursprünglichen monoklonalen und den Gerüstsequenzen des humanen Antikörpers unter Belassung von Resten an kritischen Positionen (V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>-Kontaktregion, CDR-flankierende Aminosäuren);
- 4.) Planung der Oligodesoxynukleotide für die Gensynthese der künstlichen variablen Domänen des humanisierten Antikörpers; Gensynthese mittels *Assembly*-PCR;
- 5.) Inserierung der Gene für die V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>-Domänen in einen geeigneten Vektor, Analyse mittels DNA-Sequenzierung;
- 6.) Bakterielle Produktion und Reinigung des künstlichen humanisierten Antikörperfragments;
- 7.) Proteinchemische und funktionelle Analyse des humanisierten Antikörperfragments.

### **3.5.1 Auswahl der zu humanisierenden Positionen und Synthese der Gene für die V<sub>L</sub>- und die V<sub>H</sub>-Domäne durch *Assembly*-PCR**

Zur Herstellung des sogenannten humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments, das aus der Humanisierung der Mutante II.1.8 durch CDR-*Grafting* resultierten sollte, wurde in einem ersten Schritt eine Datenbank-Recherche (*The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest*; Johnson und Wu, 2001) zur Identifizierung von humanen variablen Domänen mit größtmöglicher Homologie zu IN-1 (bzw. II.1.8) durchgeführt. Dabei zeigte der Anti-Thyroidperoxidase Autoantikörpers TR1.9 (Portlando *et al.*, 1993), der bereits als Strukturmodell für das IN-1 Paratop gedient hatte, (Kap. 3.3.1) eine Sequenzidentität mit IN-1 im Bereich der Gerüstregionen von 65 % für die V<sub>H</sub>- und 60 % für die V<sub>L</sub>-Domäne.

Weiterhin wiesen die CDRs sowie die Abschnitte der Gerüstregionen (bis auf FR-H1) dieselben Längen wie die von IN-1 auf. Des weiteren ergab sich für die als besonders kritisch angesehenen CDR-flankierenden Positionen, die ebenfalls an der Antigen-Bindung beteiligt sein können (Bending und Jones, 1996), nur im Falle der auf CDR-H2 folgenden Aminosäure eine Abweichung (Lys<sup>H67</sup> in IN-1 gegenüber Arg<sup>H68</sup> in TR1.9; Abb. 40). Diese wurde jedoch aufgrund der Ähnlichkeit dieser Reste als unkritisch angesehen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Gerüststruktur von TR1.9 als Grundlage zur Humanisierung von II.1.8 ausgewählt.

Bei der Planung der zu synthetisierenden Primärsequenz der künstlichen V<sub>H</sub>-Domäne von humII.1.8 wurden zunächst die von Chothia *et al.* (1985) definierten Positionen, die die V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>-Kontaktfläche ausmachen, angepaßt. Diese waren in TR1.9 bis auf Position H95 identisch mit II.1.8 (Val<sup>H37</sup>, Gln<sup>H39</sup>, Leu<sup>H45</sup>, Trp<sup>H47</sup>, Ala<sup>H93</sup> und Trp<sup>H103</sup>). An jener Position wurde für die humII.1.8 Sequenz Tyr<sup>H96</sup> aus TR1.9 anstelle von Phe<sup>H95</sup> aus II.1.8 verwendet, um die stabile Assoziation der beiden variablen Domänen zu gewährleisten. Des weiteren wurde nach Prüfung der Raumstruktur von TR1.9 (PDB-Code 1vge; Chacko und Padlan, 1996) der Rest Ala<sup>H72</sup> aus II.1.8 (entspricht Arg<sup>H73</sup> in TR1.9) beibehalten, da dieser offensichtlich einen direkten Kontakt zur CDR-H2 eingeht. Diese Vorgehensweise deckte sich mit Angaben von Bending und Jones (1996), die die Bedeutung (unter anderem) dieser Position für die Konformation der CDRs hervorheben. Alle anderen von diesen Autoren genannten Positionen waren in der V<sub>H</sub>-Domäne von II.1.8 und TR1.9 mit identischen Aminosäureresten besetzt.

Weiterhin mußte ein zusätzlicher Rest (Leucin), der im Unterschied zu II.1.8 nach Leu<sup>H4</sup> am Aminoterminus der V<sub>H</sub>-Domäne von TR1.9 auftrat, eingeführt werden. Dies geschah durch Insertion von Glutamin an dieser Position in der V<sub>H</sub>-Domäne von humII.1.8, um damit gleichzeitig auf DNA-Ebene eine *Pst*I-Schnittstelle, welche Kompatibilität mit dem Expressionsvektor pASK88 herstellte, einzuführen. Als zweite Schnittstelle wurde am 3'-Ende des Gens die Erkennungssequenz von *Bst*EII eingeplant (s. u.). An sämtlichen weiteren Positionen in der Gerüststruktur der V<sub>H</sub>-Domäne, an denen sich die beiden Primärsequenzen unterschieden, wurden die entsprechenden Aminosäuren von TR1.9 eingeplant. Für den Bereich der drei CDRs wurde die Aminosäuresequenz von II.1.8 jeweils vollständig beibehalten (Abb. 40).

Für die künstliche V<sub>L</sub>-Domäne von humII.1.8 wurde an Position L38, welche an einem wesentlichen V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>-Kontakt beteiligt ist (Essen und Skerra, 1994), Gln<sup>L38</sup> aus TR1.9 anstelle von Arg<sup>L38</sup> aus II.1.8 gewählt. Die anderen entsprechenden Reste waren alle identisch (Tyr<sup>L36</sup>, Pro<sup>L44</sup>, Leu<sup>L46</sup>, Tyr<sup>L87</sup> und Phe<sup>L98</sup>). Analog zu der Planung der V<sub>H</sub>-Domäne wurde an L69 Arginin und an L71 Tyrosin aus II.1.8 eingeplant, nachdem die Raumstruktur von TR1.9 einen möglichen Kontakt dieser Positionen zur CDR-L1 nahelegte. Die ursprünglichen

Aminosäuresequenzen der Amino- und Carboxytermini der V<sub>L</sub>-Domäne (jeweils vier Positionen) von II.1.8 wurden beibehalten, um auf DNA-Ebene Kompatibilität mit den Standardschnittstellen *SacI* und *XhoI* auf dem Expressionsvektor pASK88 herzustellen. An allen anderen Positionen des Gerüstbereichs der V<sub>L</sub>-Domäne wurden wiederum die entsprechenden Aminosäuren aus TR1.9, an denen der CDRs dagegen die aus II.1.8 verwendet (Abb. 40).

**(VH) :**

	CDR-H1											
	1	10	20	26	35	40	50					
II.1.8	EVKL	HESG	PGLVR	PGTS	SVKIS	CKAS	GYTFTNYWLG	WVKQR	PGHGLE	WIG	DIY	PG
TR1.9	<u>Q</u> VKL	<u>LE</u> EQ	<u>SG</u> <u>AE</u> VK	<u>PK</u> PG	<u>AS</u> VK	<u>V</u> SCKAS	<u>GYS</u> FTSYGLH	<u>WVR</u> QA	<u>PG</u> QR	<u>LE</u> W	<u>W</u> IS	<u>A</u> G
humII.1.8	<u>E</u> VKL	<u>Q</u> EQ	<u>SG</u> <u>AE</u> VK	<u>PK</u> PG	<u>AS</u> VK	<u>V</u> SCKAS	<u>GYT</u> FFTNYWLG	<u>WVR</u> QA	<u>PG</u> QR	<u>LE</u> W	<u>W</u> IS	<u>A</u> G

	CDR-H2			CDR-H3								
	60	66	70	80	90	99	110					
II.1.8	GGYTNYNEK	FKG	KATLT	ADTSS	SSTAY	MLSS	LTSEDS	AVYFCAR	FYYG	SSY	WY	FDV
TR1.9	<u>TG</u> NTKY	<u>S</u> QK	<u>F</u> RG	<u>R</u> VT	<u>F</u> TR	<u>D</u> TS	<u>A</u> T	<u>T</u> AY	<u>M</u> GL	<u>S</u> SL	<u>R</u> P	<u>E</u> D
humII.1.8	<u>TG</u> NTKY	<u>S</u> QK	<u>F</u> RG	<u>R</u> VT	<u>F</u> TR	<u>D</u> TS	<u>A</u> T	<u>T</u> AY	<u>M</u> GL	<u>S</u> SL	<u>R</u> P	<u>E</u> D

II.1.8	WGQ	T	T	V	T	V	S
TR1.9	<u>W</u> GQ	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>
humII.1.8	<u>W</u> GQ	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>

**(VL) :**

	CDR-L1					CDR-L2																						
	1	10	20	24	34	40	50	56																				
II.1.8	DIEL	TQSP	AIMA	ASV	GET	V	T	T	I	T	C	G	A	S	E	N	I	Y	G	A	L	N						
TR1.9	<u>E</u> L	<u>V</u> M	<u>T</u> Q	<u>S</u> P	<u>S</u> S	<u>L</u> S	<u>A</u> S	<u>V</u> G	<u>D</u> R	<u>V</u> N	<u>I</u> A	<u>R</u> A	<u>S</u> O	<u>G</u> I	<u>S</u> S	<u>A</u> L	<u>W</u> Y	<u>Q</u> R	<u>K</u> O	<u>G</u> K	<u>S</u> P	<u>Q</u> L	<u>L</u> I	<u>Y</u>	<u>D</u> A	<u>S</u> N	<u>L</u> E	<u>S</u>
humII.1.8	<u>E</u> L	<u>V</u> M	<u>T</u> Q	<u>S</u> P	<u>S</u> S	<u>L</u> S	<u>A</u> S	<u>V</u> G	<u>D</u> R	<u>V</u> N	<u>I</u> A	<u>R</u> A	<u>S</u> O	<u>G</u> I	<u>S</u> S	<u>A</u> L	<u>W</u> Y	<u>Q</u> R	<u>K</u> O	<u>G</u> K	<u>S</u> P	<u>Q</u> L	<u>L</u> I	<u>Y</u>	<u>D</u> A	<u>S</u> N	<u>L</u> E	<u>S</u>

	CDR-L3																																																						
	60	70	80	89	97	100	107																																																
II.1.8	GMS	R	F	S	G	S	G	R	Q	Y	S	L	K	I	S	S	L	H	P	D	D	V	A	T	Y	Y	Q	N	I	N	R	V	P	V	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K										
TR1.9	<u>G</u> V	<u>P</u> S	<u>R</u> F	<u>S</u> G	<u>S</u> G	<u>S</u> G	<u>T</u> DF	<u>T</u> LT	<u>I</u> S	<u>S</u> L	<u>Q</u> P	<u>E</u> DF	<u>A</u> I	<u>Y</u> Y	<u>Q</u> QF	<u>N</u> S	<u>Y</u> P	<u>L</u> T	<u>F</u> G	<u>G</u> G	<u>T</u> K	<u>V</u> E	<u>I</u> K	<u>R</u> T																															
humII.1.8	<u>G</u> V	<u>P</u> S	<u>R</u> F	<u>S</u> G	<u>S</u> G	<u>S</u> G	<u>R</u> DY	<u>T</u> LT	<u>I</u> S	<u>S</u> L	<u>Q</u> P	<u>E</u> DF	<u>A</u> I	<u>Y</u> Y	<u>Q</u> QF	<u>N</u> S	<u>Y</u> P	<u>L</u> T	<u>F</u> G	<u>G</u> G	<u>T</u> K	<u>V</u> E	<u>I</u> K	<u>R</u> T																															

**Abbildung 40:** Vergleich der Primärsequenzen der variablen Domänen des mutierten F<sub>ab</sub>-Fragments II.1.8 mit dem humanen Autoantikörper TR1.9 und Angabe der Aminosäuresequenz für die humanisierten II.1.8 Domänen (humII.1.8). Die Reste aus TR1.9, die in Abweichungen von der ursprünglichen II.1.8-Sequenz, in humII.1.8 eingeplant wurden, sind durch Fettdruck markiert. Positionen, an denen Aminosäuren aus II.1.8 beibehalten und von der TR1.9-Sequenz abweichen, sind unterstrichen. Das zusätzlich eingeführte Gln<sup>H4</sup> in humII.1.8 ist kursiv dargestellt. Die CDRs, die jeweils komplett aus II.1.8 übernommen wurden, sind eingerahmt. Die Numerierung der Positionen erfolgte sequentiell.

Die V<sub>L</sub>- und V<sub>H</sub>-Domänen des humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments wurden durch *Assembly*-PCR getrennt synthetisiert. Dazu wurden Oligodesoxynukleotide, die alternierende Abschnitte der





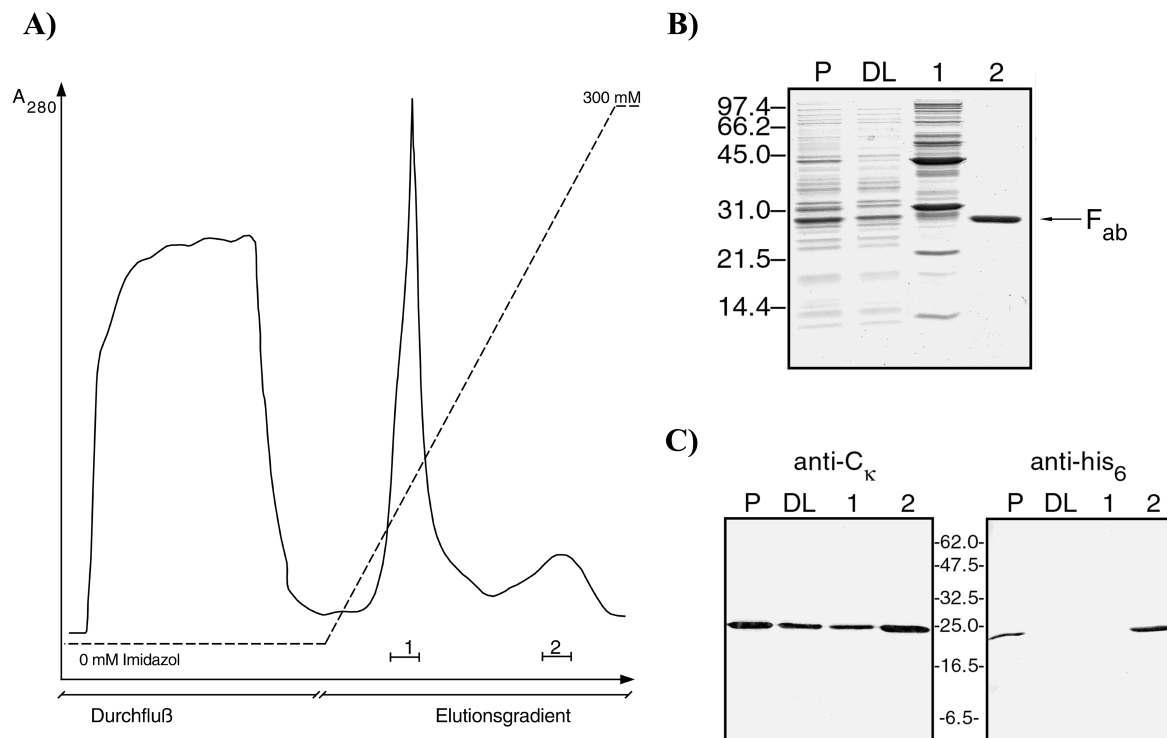
Die Hybridisierung im Verlauf der *Assembly*-PCR wurde durch Überlappungen von jeweils ca. 20 Basenpaaren (bp) gewährleistet. Die internen Oligodesoxynukleotide sowie die flankierenden PCR-*Primer*, mit denen während der PCR die kompatiblen Schnittstellen zu dem Expressionsvektor pASK88 eingeführt wurden, wurden mit Hilfe der Programme BACKTRANSLATE, REPEAT und SEQUED aus dem „GCG“-Programmpaket (Devereux *et al.*, 1984) geplant. Dabei wurden in Abständen von etwa 50 bp singuläre Schnittstellen eingeführt (nicht gezeigt), um später einen eventuellen Austausch von Genfragmenten zu vereinfachen. Um eine Behinderung der Synthese durch das Anhängen von Adeninresten aufgrund der Terminalen-Transferaseaktivität der verwendeten *Taq* DNA-Polymerase einzuschränken, wurde die Lage der Oligodesoxynukleotide, die den Hauptstrang kodierten, so gewählt, daß ihrem 5'-Ende stets Thymin vorausging.

Die Assemblierung der Gene für die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen erfolgte in getrennten Ansätzen durch PCR mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase (Kap. 2.2.7.5). Dabei wurde jeweils ein einzelnes Produkt erhalten, isoliert und mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die beiden erhaltenen DNA-Fragmente wurden separat in den jeweils analog geschnittenen Vektor pASK88-D1.3 inseriert und zehn Klone durch DNA-Sequenzierung analysiert. Jeweils ein Klon davon wies die gewünschte fehlerfreie DNA-Sequenz auf. In einem abschließenden Klonierungsschritt wurde die korrekte Sequenz der  $V_H$ -Domäne in den Übergangsvektor mit der fehlerfreien  $V_L$ -Domäne mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Pst*I und *Bst*EII inseriert und auf diese Weise der Expressionsvektor pASK88-humII.1.8 erhalten.

### 3.5.2 Herstellung und funktionelle Analyse des humII.1.8 $F_{ab}$ -Fragments

Der Vektor pASK88-humII.1.8 wurde im folgenden zur bakteriellen Produktion und anschließenden Reinigung mittels IMAC (Skerra, 1994a,b) des humanisierten II.1.8  $F_{ab}$ -Fragments verwendet. Das erhaltene Ig-Fragment wurde anschließend hinsichtlich seiner proteinchemischen Eigenschaften und seiner Antigenbindungsaktivität mittels ELISA untersucht.

Bei den Versuchen zur Produktion des löslichen humII.1.8  $F_{ab}$ -Fragments in *E. coli* JM83 setzte bereits nach einer Induktionsdauer von drei Stunden eine Lyse der Bakterien ein. In nachfolgenden Experimenten wurden die Zellen daher 2,5 Stunden nach der Induktion geerntet. Bei der anschließenden Reinigung des  $F_{ab}$ -Fragments aus der periplasmatischen Proteinfraction mittels IMAC erfolgte die Elution des rekombinanten Proteins bei einer relativ hohen Imidazolkonzentration (250 mM) (zum Vergleich: II.1.8 und IN-1  $F_{ab}$ -Fragment: ca. 150 mM; Abb. 43).



**Abbildung 43:** Reinigung des humII.1.8  $F_{ab}$ -Fragments aus der periplasmatischen Proteinfraktion von JM83/pASK88-humII.1.8. **A)** Die Isolierung des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe seines His<sub>6</sub>-Affinitätsanhängsels durch IMAC. Die für die Analyse in **B)** gesammelten Fraktionen sind markiert. **B)** Analyse der IMAC-Fractionen aus **A)** durch SDS-PAGE (15 %iges Gel). Aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu$ l des periplasmatischen Proteinextraktes (P), des nicht an die Säule gebundenen Proteins (DL) sowie die Elutionsfraktion von schwach an die Säule gebundenem Wirtspolypeptid (1) sowie des kompetitiv eluierten, rekombinanten Proteins (2). Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben. **C)** Analyse der IMAC-Fractionen aus **A)** durch Western Blotting. Aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu$ l der Proben wie in **B)**. Der selektive Nachweis der leichten Kette des Ig-Fragments erfolgte mit einem Anti-Human C <sub>$\kappa$</sub> -Antikörper/Alkalische Phosphatase Konjugat, der der schweren Kette mit einem Ni/NTA-Alkalische Phosphatase Konjugat, wobei sich die beiden Konjugate bezüglich ihrer Nachweisempfindlichkeit vermutlich unterscheiden.

Die Ausbeute erwies sich mit 0,3 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> im Vergleich zum II.1.8 bzw. IN-1  $F_{ab}$ -Fragment als deutlich niedriger (Tab. 10).

**Tabelle 10:** Eigenschaften des in *E. coli* produzierten humII.1.8  $F_{ab}$ -Fragments.

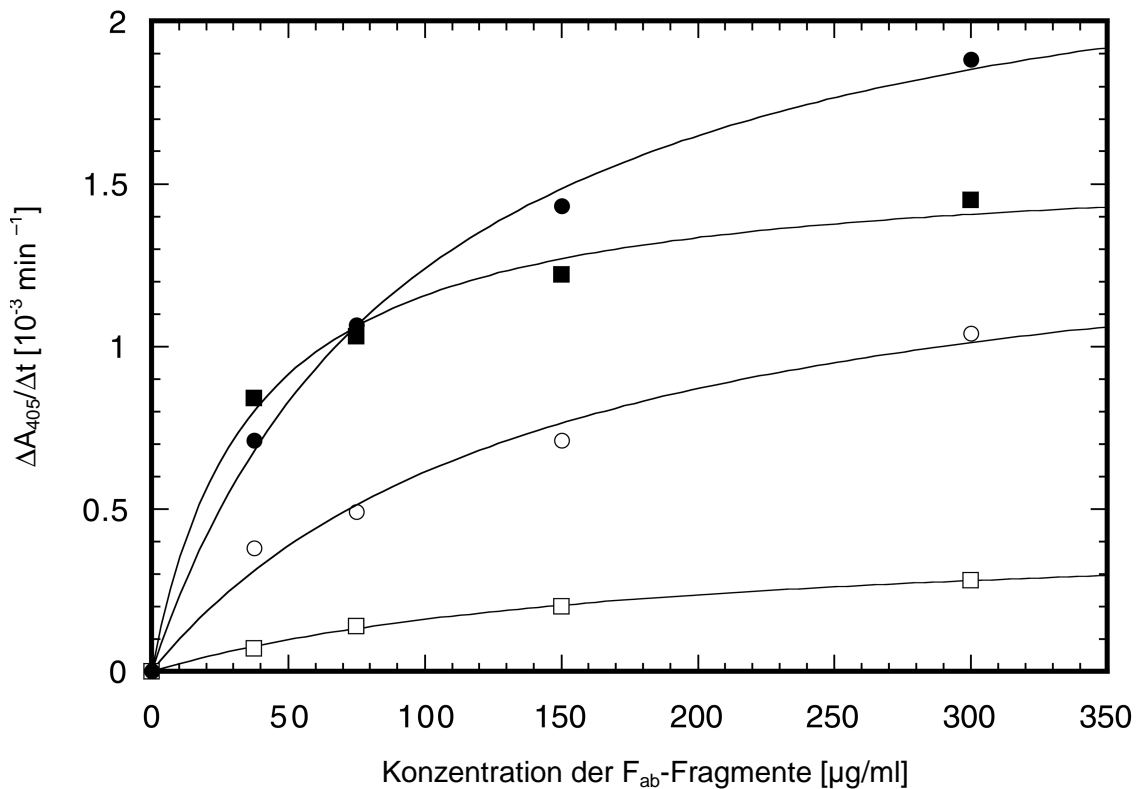
Molmasse [Da]	Isoelektrischer Punkt	Extinktionskoeffizient [L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	relative Ausbeute [mg L <sup>-1</sup> OD <sup>-1</sup> ]
48.706 <sup>a</sup>	8,3 <sup>b</sup>	781.202 <sup>c</sup>	0,33 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Berechnet mit PEPTIDESORT (unter Berücksichtigung der 5 Disulphidbindungen), <sup>b</sup> Berechnet mit PEPTIDESORT, <sup>c</sup> Berechnet mit PEPTIDESORT nach Gill und von Hippel (1989), <sup>d</sup> Produziert mit JM83/pASK88-humII.1.8.



Die Analyse der Reinigung durch SDS-PAGE ergab – im Gegensatz zum II.1.8 oder dem IN-1 F<sub>ab</sub> Fragment – eine identische elektrophoretische Mobilität der beiden Polypeptidketten des F<sub>ab</sub>-Fragments. Durch Western Blotting konnte allerdings das Vorhandensein beider Ketten in der entsprechenden IMAC-Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 43). In den beiden Chromatographiefraktionen des Durchlaufs sowie des nur schwach an die Säule gebundenen Proteins wurden dagegen relativ große Mengen der leichten Kette detektiert, die vermutlich ein Homodimer („Bence-Jones Protein“; Stevens *et al.*, 1991) ausbilden kann.

Zur funktionellen Analyse der Bindung des humanisierten Antikörperfragments an das rekombinante Nogo-A Fragment wurden ELISA-Experimente mit dem zuvor etablierten Aufbau (vgl. Abb. 25) durchgeführt. Dazu wurde das mittels IMAC gereinigte humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment parallel mit dem ursprünglichen chimären II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment eingesetzt (Abb. 44).



**Abbildung 44:** Analyse der Antigen-Bindungsaktivität des humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments gegenüber dem rekombinanten Nogo-A Fragment (NiFr2, 10 µg/Vertiefung). Nach der Immobilisierung des NiFr2 erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen mit 3 % BSA (200 µl/Vertiefung). Daraufhin wurden folgende F<sub>ab</sub>-Fragmente appliziert: II.1.8 (■); humII.1.8 (●). Die entsprechenden offenen Symbole zeigen die unspezifische Bindung der F<sub>ab</sub>-Fragmente an BSA in Abwesenheit des Antigens.

Interessanterweise zeigte das humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment trotz der umfangreichen Aminosäuresubstitutionen, die in seinem Gerüstbereich vorgenommen worden waren, eine Antigen-Bindungsaktivität, die nahezu identisch mit der des ursprünglichen Ig-Fragments war. Im Kontrollexperiment ergab sich allerdings eine erhöhte unspezifische Bindung des humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments an BSA. Im Endeffekt konnte jedoch bei der Humanisierung des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments die Bindungsaktivität zum rekombinanten Nogo-A Fragment im wesentlichen erhalten werden. Dies ging jedoch offensichtlich mit einem teilweisen Verlust der Spezifität einher.

### 3.6 Fusionsproteine aus F<sub>ab</sub>-Fragmenten und der TEM1 $\beta$ -Lactamase

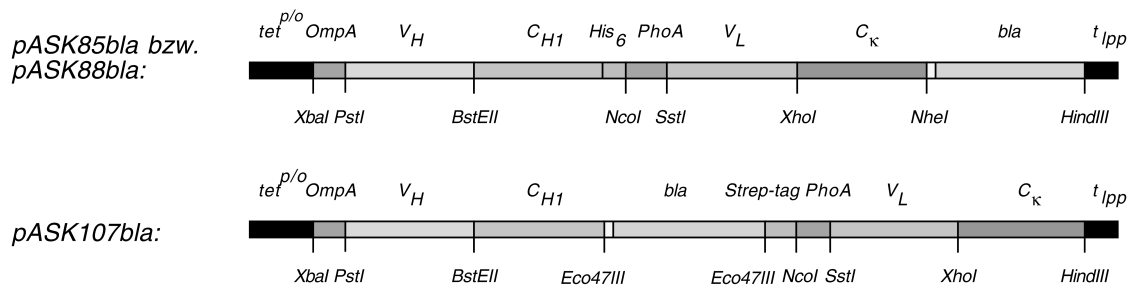
Zur Herstellung eines Reagens für den bioanalytischen Nachweis von Antigenen wie z. B. Nogo-A wurde ein neuartiges Fusionsprotein aus einem F<sub>ab</sub>-Fragment und dem Enzym TEM1  $\beta$ -Lactamase (EC 3.5.2.6) konstruiert. Die  $\beta$ -Lactamase wurde ausgewählt, da sie bereits Gegenstand verschiedener Arbeiten zum *Protein Engineering* (Huang *et al.*, 1996; Iwai and Plückthun, 1999) wie auch der Strukturaufklärung (Jeltsch *et al.*, 1993) war. Die enzymatische Aktivität kann zudem mittels kommerziell erhältlicher Substrate einfach nachgewiesen werden (O'Callaghan *et al.*, 1972).

#### 3.6.1 Konstruktion von Expressionsvektoren und gentechnische Herstellung von Fusionsproteinen eines F<sub>ab</sub>-Fragments mit der TEM1 $\beta$ -Lactamase

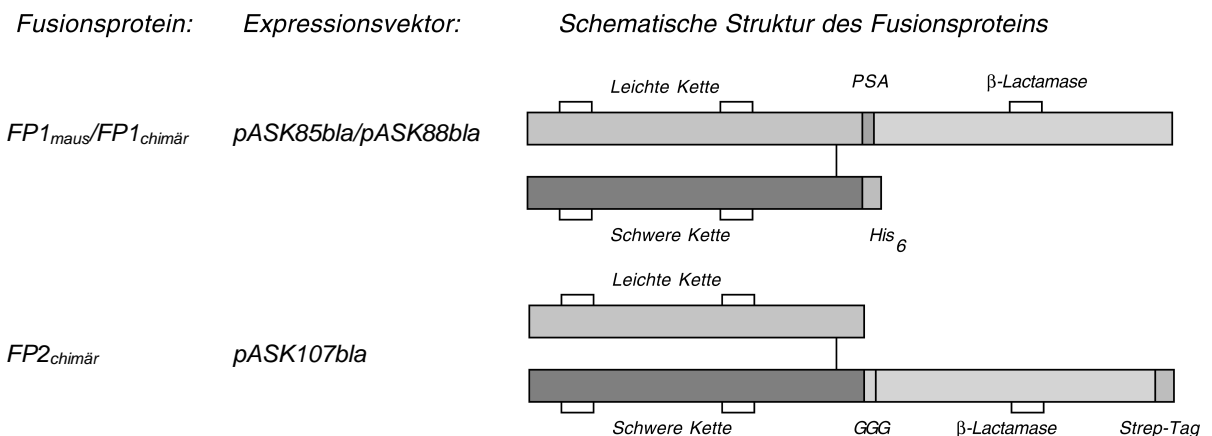
Hinsichtlich der Anordnung von F<sub>ab</sub>-Fragment und Enzym im Fusionsprotein wurden zwei Möglichkeiten realisiert. Dabei wurde zum einen der Carboxyterminus der leichten Kette und zum anderen der Carboxyterminus der schweren Kette des F<sub>ab</sub>-Fragments mit jeweils dem Aminoterminal der  $\beta$ -Lactamase verknüpft.

Die Konstruktion des Expressionsplasmids für die Fusion der leichten Kette mit der  $\beta$ -Lactamase ging von pASK106-IN1 (Kap. 3.1.4) aus, indem der Genabschnitt für die ABD mittels der Schnittstellen *NheI* und *HindIII* ersetzt wurde. Das Strukturgen für die  $\beta$ -Lactamase (*bla*) wurde mittels PCR aus Plasmid-DNA des Vektors pASK85, der das Gen für durch die  $\beta$ -Lactamase vermittelte Ampicillin-Resistenz trägt, amplifiziert. Mit Hilfe der verwendeten Oligodesoxynukleotide MF-*bla*1 und MF-*bla*2 wurden dabei die Schnittstellen an geeigneter Position eingeführt. Die Inserierung des mit *NheI* und *HindIII* geschnittenen PCR-Produkts in pASK106-IN1 führte zu dem Expressionsvektor pASK88*bla*-IN1 (Abb. 45).

A)



B)



**Abbildung 45:** Fusionsproteine aus  $F_{ab}$ -Fragment und der  $\beta$ -Lactamase. **A)** Schematische Darstellung der Genkassetten auf den Expressionsplasmiden pASK85bla, pASK88bla und pASK107bla für die Herstellung von Fusionsproteinen aus einem  $F_{ab}$ -Fragment und der  $\beta$ -Lactamase in *E. coli*. Die Strukturgene  $V_H$ - $C_{H1}$  und  $V_\kappa$ - $C_\kappa$  sind für die Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* an ihren 5'-Enden mit den bakteriellen Signalsequenzen des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) bzw. der Alkalischen Phosphatase (PhoA) verknüpft. Das Strukturgen für die  $\beta$ -Lactamase (bla) ist auf pASK85bla wie auch auf pASK88bla mit dem 3'-Ende des  $C_\kappa$ -Gens fusioniert, während sich am 3'-Ende des Gens der schweren Kette die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhänger (His<sub>6</sub>) befindet. Auf pASK107bla ist das Gen für die  $\beta$ -Lactamase anstelle dessen mit dem 3'-Ende des  $C_{H1}$ -Gens fusioniert, gefolgt von der Sequenz für das *Strep*-tag. Die so gebildeten Strukturgene stehen unter der Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*<sup>p/o</sup>-Promotor/Operators (*tet*<sup>p/o</sup>) und enden am Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*t*<sub>Ipp</sub>). Mit Hilfe der DNA-Endonucleasen *XbaI/BstEII* ( $V_H$ ) und *NcoI/XhoI* ( $V_L$ ) können die Gene der variablen Domänen ausgetauscht werden. **B)** Anordnung der Fusionspartner in den resultierenden, bifunktionellen Fusionsproteinen FP1<sub>chimär</sub>, FP1<sub>maus</sub>, und FP2<sub>chimär</sub>. In FP1<sub>chimär</sub> und FP1<sub>maus</sub> ist die leichte Kette des chimären bzw. des Maus- $F_{ab}$ -Fragments mit der  $\beta$ -Lactamase verknüpft. In FP2<sub>chimär</sub> erfolgt hingegen die Verknüpfung der schweren Kette des chimären  $F_{ab}$ -Fragments mit dem Enzym. PSA: Peptid-Linker Pro-Ser-Ala; GGG: Peptid-Linker Gly-Gly-Gly.

Die Konstruktion des Expressionsplasmids für die Fusion der schweren Kette mit der  $\beta$ -Lactamase ging von pASK107-IN1 aus, der zur Produktion des chimären IN-1  $F_{ab}$ -Fragments (Mensch IgG/ $\kappa$ ) mit dem *Strep*-Tag II am C-Terminus der schweren Kette dient. Dazu wurde die DNA-Sequenz für die  $\beta$ -Lactamase aus pASK85 durch PCR mit Hilfe der Primer MF-bla3 und MF-bla4 sowie der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wies aufgrund der Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase glatte 3'- und 5'-Enden (*Blunt*

*Ends*) auf und wurde direkt in den mit *Eco47III* linearisierten Vektor pASK107-IN1 inseriert. Der erhaltene Expressionsvektor wurde pASK107bla-IN1 genannt (Abb. 45).

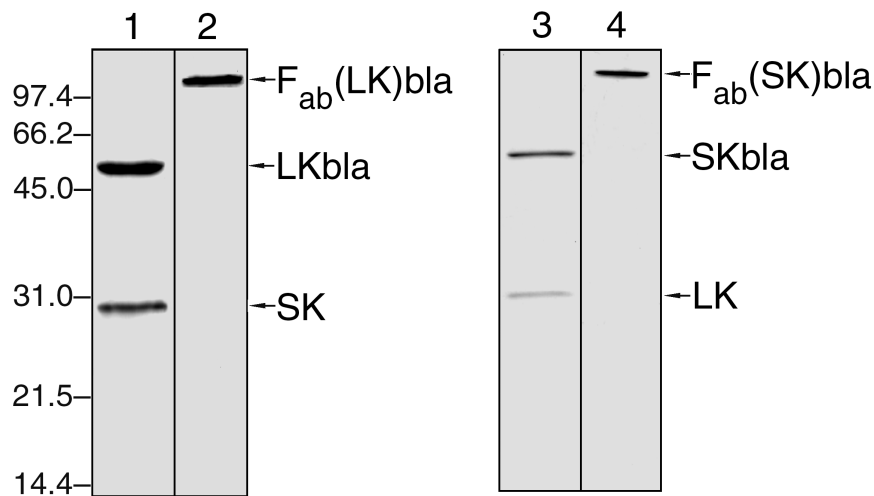
Durch den Austausch der Gene für die variablen Domänen innerhalb der  $F_{ab}$ -Genkassette mit Hilfe von singulären Standardschnittstellen (*XbaI*, *BstEII* für  $V_H$ ; *NcoI*, *XhoI* für  $V_L$ ; vgl. Abb. 5) wurde die Antigenpezifität der kodierten Fusionsproteine variiert. Dies führte zu den Vektoren pASK88bla-D1.3 und pASK107bla-D1.3, die jeweils die Gene der variablen Domänen des Anti-Lysomzym Antikörpers D1.3 (Boulot *et al.*, 1990) trugen.

Durch den Austausch der Gene für die konstanten Domänen in pASK88bla-IN1 und pASK88bla-D1.3 mit Hilfe der singulären Standardschnittstellen *BstEII* und *NcoI* für die  $C_{H1}$ - sowie *XhoI* und *NheI* für die  $C_{\kappa}$ -Domänen wurden die Vektoren pASK85bla-IN1 und pASK85-D1.3 erhalten. Diese trugen die Gene für die konstanten Domänen vom Maus-Typ.

Damit standen Expressionsvektoren zur Herstellung folgender Fusionsproteine (FP) zur Verfügung (vgl. auch Abb. 45):

- FP1<sub>chimär</sub>: Verknüpfung von leichter Kette und  $\beta$ -Lactamase,  $F_{ab}$ -Fragment mit humanen konstanten Domänen
- FP1<sub>maus</sub>: Verknüpfung von leichter Kette und  $\beta$ -Lactamase,  $F_{ab}$ -Fragment mit konstanten Domänen der Maus
- FP2<sub>chimär</sub>: Verknüpfung von schwerer Kette und  $\beta$ -Lactamase,  $F_{ab}$ -Fragment mit humanen konstanten Domänen

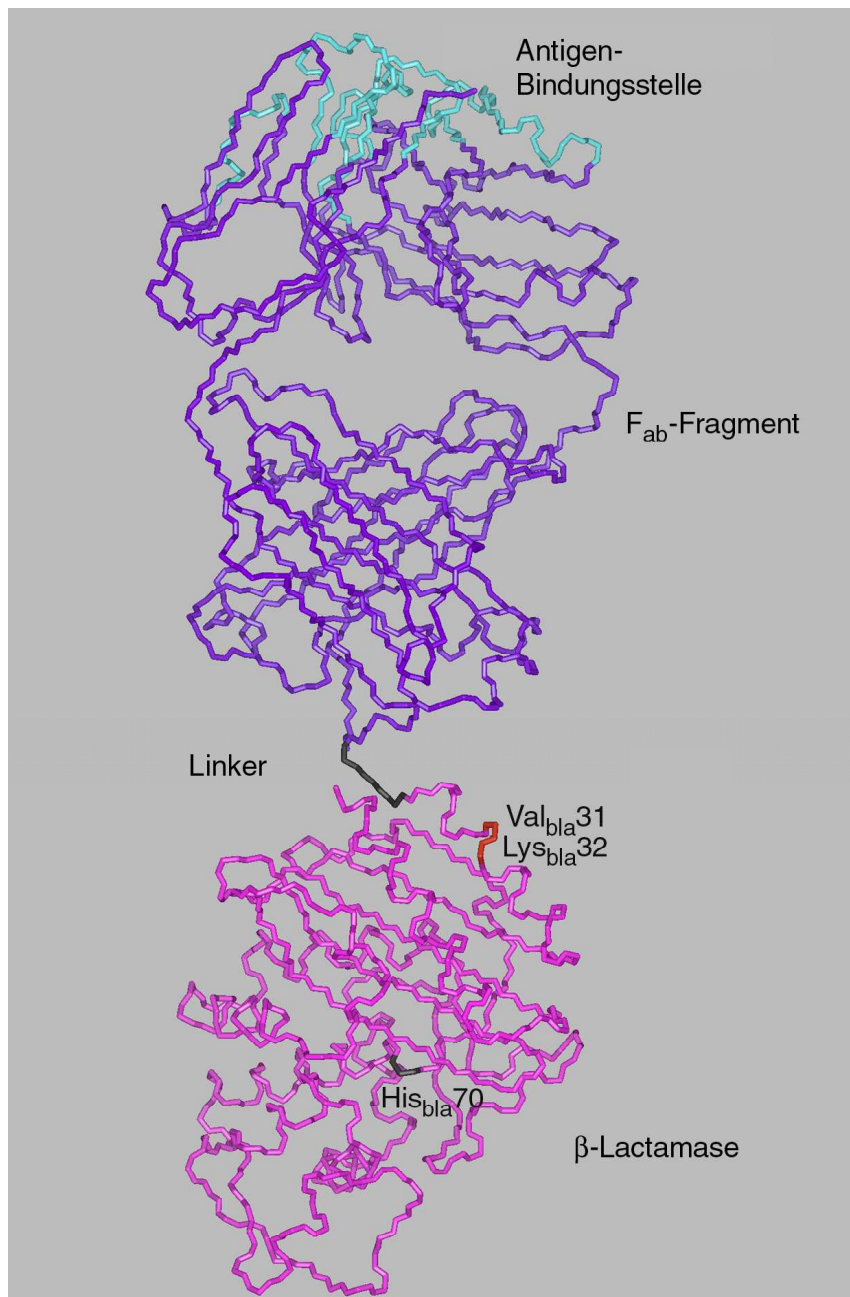
Für die Proteinproduktion der Fusionsproteine im 2 L-Schüttelkolben wurde wie bisher der *E. coli*-Stamm JM83 verwendet und nach einem Standardprotokoll vorgegangen (Skerra, 1994a). Die rekombinanten Fusionproteine wurden aus der periplasmatischen Proteinfraction mittels des jeweiligen Reinigungsanhängsels isoliert. Hierbei wurde die IMAC für die Fusionsproteine FP1<sub>chimär</sub> und FP1<sub>maus</sub> sowie die Streptavidin-Affinitätschromatographie für FP2<sub>chimär</sub> verwendet. Die Reinheit der bakteriell produzierten Fusionsproteine wurde durch SDS-PAGE Analyse nachgewiesen (Abb. 46).



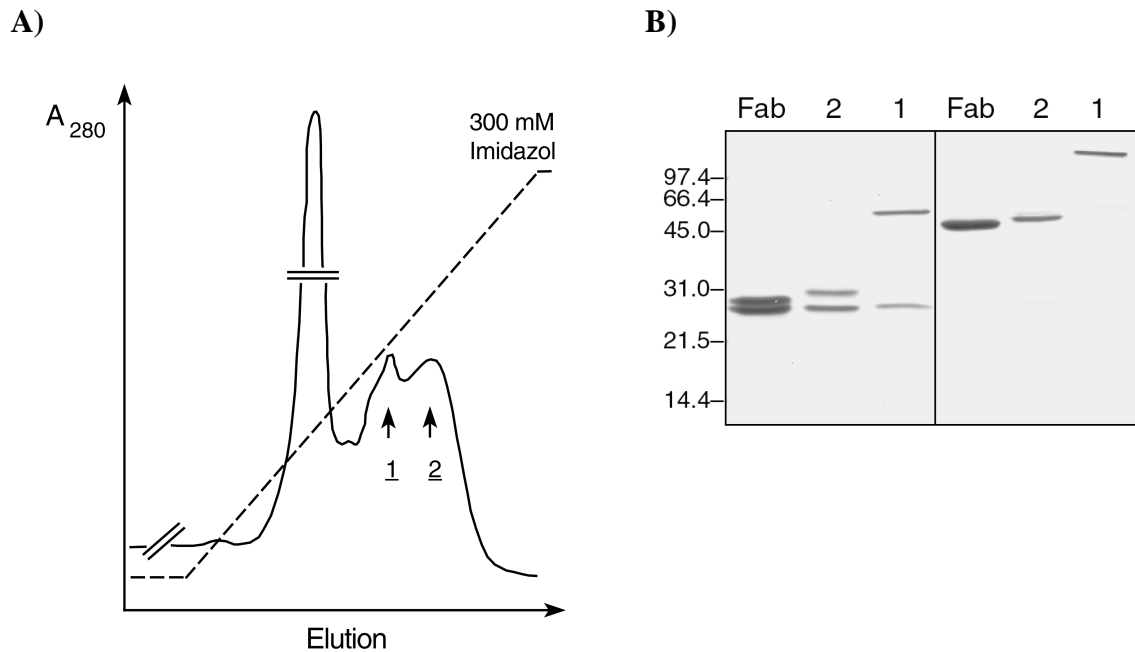
**Abbildung 46:** Analyse der bakteriell produzierten Fusionsproteine aus IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und der  $\beta$ -Lactamase mittels SDS-PAGE (15 %iges Gel). Auf der linken Seite (1, 2) ist das durch IMAC gereinigte Fusionsprotein IN-1 FP1<sub>maus</sub> mit den konstanten Domänen der Maus gezeigt. Auf der rechten Seite (3, 4) ist das Fusionsprotein IN-1 FP2<sub>chimär</sub> mit humanen konstanten Domänen, das mit Hilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt wurde, gezeigt. Die Proben wurden vor der Elektrophorese reduziert (Spuren 1 und 3) oder nicht reduziert (Spuren 2 und 4). LKbla, leichte Kette in Fusion mit der  $\beta$ -Lactamase; SKbla, schwere Kette in Fusion mit der  $\beta$ -Lactamase; SK, schwere Kette; LK leichte Kette. Molmassen für beide Gele sind links in kDa angegeben.

Bei allen Fusionsproteinen (jeweils IN-1 und D1.3 FP1<sub>maus</sub> und FP2<sub>chimär</sub>) lagen beide Ketten des F<sub>ab</sub>-Fragments – von denen in jedem Fall eine mit der  $\beta$ -Lactamase verknüpft war – in angenähert stöchiometrischem Verhältnis vor und waren quantitativ durch die interchenare Disulphid-Brücke miteinander verknüpft. Die relativen Ausbeuten der gereinigten rekombinanten Proteine hingen offensichtlich von den variablen Domänen des jeweiligen F<sub>ab</sub>-Fragments ab und betrug zwischen 0,05 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> für die D1.3 Fusionsproteine und 0,3 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> für die IN-1 Fusionsproteine.

Bei der Reinigung des Fusionsproteins IN-1 FP1<sub>chimär</sub> (Abb. 47) mittels IMAC aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von JM83/pASK88bla-IN1 wurde dagegen ein heterogenes Elutionsverhalten festgestellt. Die Analyse durch SDS-PAGE ergab, daß neben dem intakten Fusionsprotein ein verkürztes Fragment isoliert wurde, welches ca. 50 % des insgesamt eluierten Proteins ausmachte (Abb. 48).



**Abbildung 47:** Modell für das Fusionsprotein  $FpI_{\text{chimär}}$ . Das Modell wurde mit Hilfe des Programms InsightII (BIOSYM/MSI) aus den Strukturen des humanen Anti-Thyroidperoxidase  $F_{\text{ab}}$ -Fragments (blau; PDB-Datei: 1vge; Chacko *et al.*, 1996) und der murenen TEM-1  $\beta$ -Lactamase (rosa; PDB-Datei: 1btl; Jeltsch *et al.*, 1993) konstruiert. Die Verknüpfung der beiden Module erfolgte über ein Pro-Ser-Ala-Verbindungssegment (schwarz). Eine proteolytische Spaltstelle (rot) wurde innerhalb der aminoterminalen  $\alpha$ -Helix der  $\beta$ -Lactamase zwischen den Resten  $\text{Val}_{\text{bla}31}$  und  $\text{Lys}_{\text{bla}32}$  identifiziert (Numerierung nach Jeltsch *et al.* (1993) für das nicht prozessierte Enzym). Die *Complementarity Determining Regions* (CDRs), die das Paratop des  $F_{\text{ab}}$ -Fragments repräsentieren, sind hellblau wiedergegeben. Der katalytische Rest  $\text{His}_{\text{bla}70}$  ist schwarz gefärbt, um die Lage des aktiven Zentrums der  $\beta$ -Lactamase anzudeuten.



**Abbildung 48:** Proteolytischer Abbau des Fusionsproteins IN-1 FP1<sub>chimär</sub> aus einem F<sub>ab</sub>-Fragment mit menschlichen konstanten Domänen und der  $\beta$ -Lactamase. **A)** Die Reinigung des Fusionsproteins IN-1 FP1<sub>chimär</sub> durch IMAC ist durch heterogene Elution charakterisiert. Der ansteigende Imidazolgradient (0 to 300 mM) zur kompetitiven Elution ist durch die gestrichelte Linie angezeigt. Schwach gebundenes bakterielles Wirtsp Protein wird bei niedriger Imidazolkonzentration (ca. 75 mM) eluiert. **B)** Die Fraktionen 1 und 2, die bei höherer Imidazolkonzentration eluierten, wurden durch SDS-PAGE (15 %iges Gel) analysiert. Die Proben auf der linken Seite des SDS-Gels wurden vor der Elektrophorese mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. Aufgetragen wurde 1  $\mu$ g gereinigtes IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment (Fab) sowie 20  $\mu$ l der Elutionsfraktion 1 und 2 aus der IMAC.

Die Größenabschätzung des vermutlich durch Proteolyse entstandenen Fragments durch SDS-PAGE ließ auf eine selektive Spaltung im Bereich der aminoterminalen Aminosäuren der  $\beta$ -Lactamase, mit denen sie an die humane leichte Kette des F<sub>ab</sub>-Fragments fusioniert war, schließen. Durch präzise Massenbestimmung des Fragments mittels MALDI-MS konnte die Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Val<sub>bla</sub>31 und Lys<sub>bla</sub>32 der  $\beta$ -Lactamase (Numerierung erfolgte nach Jeltsch *et al.* (1993) für das nicht prozessierte Enzym) lokalisiert werden (Fig. 49).

Die Fragmentierung des Fusionsproteins IN-1 FP1<sub>chimär</sub> wurde auf die proteolytische Aktivität einer periplasmatischen Protease zurückgeführt. Um dem Abbau entgegenzuwirken, wurde in einem ersten Versuch die mögliche Erkennungssequenz der bakteriellen Protease im Bereich der Spaltstelle durch Einführung der Substitutionen Val<sub>bla</sub>31 $\rightarrow$ Ala und Lys<sub>bla</sub>32 $\rightarrow$ Ala mutiert. Hierzu wurde mit Hilfe des Oligodesoxynukleotids MF-blaMUT1 eine ortsgerichtete Mutagenese von pASK88bla-IN1 vorgenommen. Die erhaltene Variante MUT1 wurde jedoch nach wie vor zu ca. 50 % und diesmal selektiv zwischen den Resten Leu<sub>Mut1</sub>30 und Ala<sub>Mut1</sub>31 gespalten (Abb. 49). Dies führte zu dem Schluß, daß die Erkennungsstelle der Protease dreidimensionaler, d. h. diskontinuierlicher Natur ist.

	hhhhhh	hhhhhhht	bbbb	
AS <sub>bla</sub>	26	32	42	47
		↓		
FP1 <sub>chimär</sub>	- <u>PAS</u> HPETLVK	VKDAEDQLGÄ	RVGYI	<b>MS:</b> 48.914
		↓		
MUT1	- <u>PAS</u> HPETLAA	VKDAEDQLGÄ	RVGYI	48.805
		↓		
MUT2	- <u>PAS</u> GGGTLGK	VKDAEDQLGÄ	RVGYI	48.298
			↓	
MUT2	- <u>PAS</u> GGGTLGK	VKDAEDQLGÄ	RVGYI	49.947
		↓		
MUT3	- <u>PAS</u> GGGTLPK	VKDAEDQLGÄ	RVGYI	48.931
			↓	
MUT3	- <u>PAS</u> GGGTLPK	VKDAEDQLGÄ	RVGYI	49.963

**Abbildung 49:** Darstellung der Aminosäure-Substitutionen zur Eliminierung von Spaltstellen im Fusionsprotein IN-1 FP1<sub>chimär</sub> und dessen Mutanten. Die Sekundärstruktur jedes Restes ist in der obersten Zeile angegeben (h,  $\alpha$ -Helix; t, turn; b,  $\beta$ -Faltblattstrang; aus PDB-Datei 1bt1; Jeltsch *et al.*, 1993). Die Numerierung der Aminosäuren der  $\beta$ -Lactamase (AS<sub>bla</sub>) folgt der von Jeltsch *et al.* (1993) und entspricht der des unprozessierten Enzyms. Das Pro-Ala-Ser-Vebindungssegment zwischen der leichten Kette des F<sub>ab</sub>-Fragments und der  $\beta$ -Lactamase ist eingerahmt. Die eingeführten Aminosäure-Substitutionen relativ zur Wildtyp-Sequenz der  $\beta$ -Lactamase sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Die jeweiligen Spaltstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet, während die fettgedruckten Zeichen den Rest, hinter welchem die Spaltung erfolgt, markieren. Die Molmassen der Fragmente wurden mittels MALDI-MS bestimmt und sind jeweils rechts aufgeführt.

Durch weitergehende Aminosäure-Substitutionen wurden die Varianten MUT2 (His<sub>bla26</sub>→Gly, Pro<sub>bla27</sub>→Gly, Glu<sub>bla28</sub>→Gly Val<sub>bla31</sub>→Gly) und MUT3 (His<sub>bla26</sub>→Gly, Pro<sub>bla27</sub>→Gly, Glu<sub>bla28</sub>→Gly, Val<sub>bla31</sub>→Pro) erhalten, in denen der aminoterminaler Bereich der  $\beta$ -Lactamase in eine künstliche Glycin-Gelenkregion umgewandelt wurde, die mehr Flexibilität und damit eine bessere Faltung erlauben sollte. Zusätzlich wurde davon ausgegangen, daß die Austausche in MUT2 und MUT3 eine mögliche diskontinuierliche Protease-Erkennungssequenz eliminieren sollten.

Die bakterielle Produktion und Reinigung von MUT2 und MUT3 durch IMAC zeigte jedoch, daß sich die Fragmentierung des Fusionsproteins auf diese Weise nicht verhindern ließ (Abb. 49). Die Analyse durch MALDI-MS ergab sogar jeweils zwei selektive Spaltstellen für MUT2 (zwischen Gly<sub>Mut226</sub> und Gly<sub>Mut227</sub> sowie Val<sub>Mut244</sub> und Gly<sub>Mut245</sub>) und MUT3 (zwischen Val<sub>Mut333</sub> und Lys<sub>Mut334</sub> sowie Val<sub>Mut344</sub> und Gly<sub>Mut345</sub>). Weiterhin ging die Gesamtausbeute an rekombinantem Protein für MUT2 und MUT3 auf jeweils ca. 1/10 im Vergleich zum Fusionsprotein IN-1 FP1<sub>chimär</sub> zurück (nicht gezeigt).



Letztendlich konnte die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins IN-1 FP1<sub>chimär</sub>, in dem die  $\beta$ -Lactamase mit der humanen C<sub>k</sub>-Domäne des F<sub>ab</sub>-Fragments verknüpft ist, durch die Aminosäure-Substitutionen im Bereich der Spaltstelle nicht verhindert werden. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen für die Fusionsproteine FP1<sub>maus</sub> (Verknüpfung von Maus-C<sub>k</sub>-Domäne und  $\beta$ -Lactamase) sowie FP2<sub>chimär</sub> (Verknüpfung von humaner C<sub>H1</sub>-Domäne und  $\beta$ -Lactamase), die keiner erkennbaren Spaltung unterlagen (vgl. Abb. 46), deutet dies auf einen Einfluß der konstanten Domäne des F<sub>ab</sub>-Fragments, mit der die  $\beta$ -Lactamase verknüpft wird, auf den Abbau des Fusionsproteins hin.

### 3.6.2 Funktionelle Analyse von Fusionsproteinen aus $\beta$ -Lactamase und F<sub>ab</sub>-Fragment und ihre praktische Anwendung im ELISA

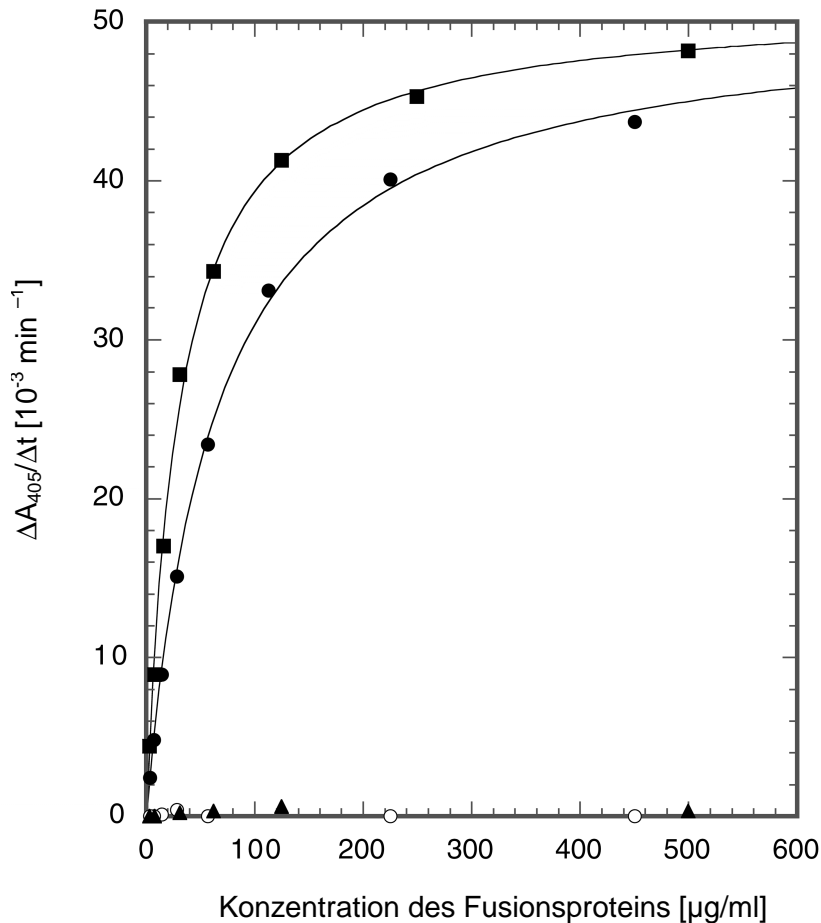
Die katalytische Aktivität der  $\beta$ -Lactamase – als Teil des Fusionsproteins mit dem F<sub>ab</sub>-Fragment – wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Cephalosporin-Derivates Nitrocefin als Substrat nachgewiesen. Die Ermittlung der kinetischen Konstanten für die enzymatische Umsetzung von Nitrocephin durch die Fusionsproteine D1.3 FP1<sub>maus</sub> und D1.3 FP2<sub>chimär</sub> ergab, daß die  $\beta$ -Lactamase in beiden Fällen ihre volle Aktivität beibehält (Tab. 11).

**Tabelle 11:** Charakterisierung der enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Lactamase gegenüber Nitrocephin als Bestandteil der gereinigten Fusionsproteine D1.3 FP1<sub>maus</sub> und D1.3 FP2<sub>chimär</sub>.

	Fusionsprotein D1.3 FP1 <sub>maus</sub>	Fusionsprotein D1.3 FP2 <sub>chimär</sub>	TEM1 $\beta$ -Lactamase (O'Callaghan <i>et al.</i> , 1972)
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	70 ( $\pm$ 16)	123 ( $\pm$ 26)	136
$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	10,0	33,0	—
$k_{\text{kat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	7,5	22,0	—
$k_{\text{kat}}/K_M$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	1,1	1,7	—
Spez. Aktivität ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	6,0	15,8	1,06

Die Fusionsproteine FP1<sub>maus</sub> und FP2<sub>chimär</sub> wurden auf ihre Verwendbarkeit zur Detektion von Antigen in einem ELISA untersucht (Abb. 50). Dabei wurde das gut charakterisierte System der Bindungspartner Lysozym und F<sub>ab</sub>-Fragment des Antikörpers D1.3 verwendet (Boulot *et al.*, 1990), um die erhaltenen Ergebnisse mit Literaturdaten von König und Skerra (1998) vergleichen zu können. Dazu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte mit Lysozym als Antigen beladen und anschließend mit Verdünnungsreihen der rekombinanten

Fusionsproteine inkubiert. Gebundenes Fusionsprotein wurde durch Hydrolyse von Nitrocephin nach mehreren Waschschrinen direkt nachgewiesen.



**Abbildung 50:** ELISA zum Nachweis der funktionellen Aktivität der Fusionsproteine D1.3 FP1<sub>maus</sub> und D1.3 FP2<sub>chimär</sub>. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit 3 mg/ml Lysozym belegt, mit BSA blockiert und mit einer Verdünnungsreihe des jeweils gereinigten rekombinanten Fusionsproteins inkubiert. Die apparenten  $K_D$ -Werte wurden durch nicht-lineare Regression ermittelt und betragen  $30.2 (\pm 1.8)$  nM für D1.3 FP2<sub>chimär</sub> (■) bzw.  $64.1 (\pm 2.7)$  nM für D1.3 FP1<sub>maus</sub> (●). Als Negativkontrolle diente die Belegung der Vertiefungen mit BSA, wiederum gefolgt von der Inkubation mit D1.3 FP1<sub>maus</sub> (○) bzw. die Belegung mit Lysozym gefolgt von der Inkubation mit IN-1 FP1<sub>maus</sub> (▲).

Beide Fusionsproteine zeigten konzentrationsabhängige Bindungssignale, die bei relativ hohen Signalwerten ( $\Delta A/\Delta t_{\max} = 45$  bis  $50 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) Sättigungsverhalten zeigten. In Vertiefungen, die mit BSA belegt worden waren oder bei denen das Fusionsprotein IN-1 FP1<sub>maus</sub> als Negativkontrolle verwendet worden war, wurde kein unspezifisches Bindungssignal beobachtet. Die apparenten  $K_D$ -Werte für die Fusionsproteine D1.3 FP1<sub>maus</sub> ( $64.1 \pm 2.7$  nM) und D1.3 FP2<sub>chimär</sub> ( $30.2 \pm 1.8$  nM) lagen damit in dem gleichen Bereich wie Dissoziationskonstanten, die für das freie rekombinante D1.3 F<sub>ab</sub>-Fragment in ELISA-

Experimenten bestimmt worden waren (König und Skerra, 1998). Hierbei war der Nachweis der Lysozym-Bindung mit Hilfe eines konjugierten Zweitantikörpers sowie der durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat erfolgt.

Sowohl das Fusionsprotein FP1<sub>maus</sub> als auch das Fusionsprotein FP2<sub>chimär</sub> waren demnach hinsichtlich der Antigen-Bindungsaktivität wie auch der enzymatischen Aktivität vollständig funktionell und stehen als Reagenz für immunchemische Nachweismethoden zur Verfügung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Sekretion von eukaryontischen Proteinen in *E. coli*

Die gentechnische Herstellung von Proteinen mit Hilfe von Mikroorganismen macht diese in vielfältiger Form und hoher Qualität verfügbar. Die Widerstandsfähigkeit und die einfache Handhabung eines bakteriellen Wirts erlauben die ökonomische Gewinnung zahlreicher Proteine, die mit klassischen Produktions- und Reinigungsmethoden nicht zu erhalten wären (Baneyx, 1999; Swartz, 2001). Zudem können die Eigenschaften des rekombinanten Proteins durch Veränderung seines vektorkodierten Gens mit molekularbiologischen Standardmethoden in gerichteter Weise modifiziert werden. Nachdem auch die heterologe Sekretion von eukaryontischen Polypeptiden in das Periplasma von *E. coli* demonstriert wurde (Talmadge *et al.*, 1980), können auch Proteine oder Proteinfragmente, die ihre natürliche Funktion normalerweise im extrazellulären Raum haben, in funktioneller Form gewonnen und für Forschung, Diagnostik oder Therapie bereitgestellt werden (Carter *et al.*, 1992). Hierbei kommt neben signalvermittelnden Proteinen (Hormone, Wachstumsfaktoren) und den extrazellulären Domänen membranständiger Rezeptoren vor allem den Antikörpern eine wichtige Rolle zu (Skerra, 1993; Kontermann und Dübel, 2001).

Die erfolgreiche Produktion eukaryontischer Proteine in *E. coli* wird generell von mehreren Faktoren beeinflusst, wie z. B. der geeigneten Anordnung transkriptorischer und translatorischer Regulationssequenzen, der Sekundärstruktur und Stabilität seiner mRNA (Carrier und Keasling, 1999; Stenström *et al.*, 2001) sowie dem Auftreten von in *E. coli* selten verwendeter Kodons (Kane, 1995). Das wichtigste Kriterium bei der Gewinnung von sekretorischen Proteinen ist jedoch die Effizienz, mit der das Präprotein in den periplasmatischen Raum exportiert und dort korrekt prozessiert und gefaltet wird (Plückthun und Skerra, 1989; Kiefhaber *et al.*, 1991; Baneyx, 1999).

Prinzipiell ähneln sich die Sekretionsmechanismen für Proteine bei Pro- und Eukaryonten. Dabei wird eine N-terminale Signalsequenz von einem Translokationsapparat erkannt und das Präprotein durch die Cytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums geschleust. Dort wird das Präprotein prozessiert, d. h. das Signalpeptid wird von einer Signalpeptidase abgespalten, wodurch das mature Polypeptid entsteht. Zudem finden Prozesse der Proteinfaltung und posttranslatorische Modifikationen, insbesondere die Ausbildung der Disulfidbrücken in dem dort vorherrschenden oxidierenden Milieu, statt. Für die effiziente Sekretion von eukaryontischen Proteinen in den periplasmatischen Raum Gram-negativer Bakterien scheinen prokaryontische Signalsequenzen von Vorteil zu sein (Skerra und Plückthun, 1991; Makrides, 1996).

Der Transport von neusynthetisierten ungefalteten Polypeptidketten durch die Cytoplasmamembran wird in *E. coli* in erster Linie durch das *Sec*-System vermittelt (Schatz und

Dobberstein, 1996; Driessen *et al.*, 1998). Dieses umfaßt einen Translokationskomplex aus einer integralen Membranproteinkomponente mit *SecY*, *SecE*, *SecG* und *YajC*, den peripher assoziierten Proteinen *SecD* und *SecF* sowie einem *SecA*-Homodimer mit ATPase-Aktivität. Da das naszierende Polypeptid im Falle der Fremdgen-Expression meist in großen Mengen im Cytoplasma vorliegt, kann es zur Überlastung des Sekretionsapparates kommen (Perez-Perez *et al.*, 1994). Als Konkurrenzreaktion kann daher die Aggregation nicht prozessierter Polypeptidketten und die Ausbildung cytoplasmatischer Einschlußkörper stattfinden (*Inclusion Bodies*; Plückthun und Skerra, 1989; Kiefhaber *et al.*, 1991). Dies wird begünstigt, wenn das Fremdprotein aufgrund hoher Faltungstabilität bereits zum Teil im Cytoplasma eine Tertiärstruktur annimmt und dann nicht mehr über den *Sec*-Mechanismus transportiert werden kann (Schmidt, 1998).

Die Faltung des exportierten und prozessierten Proteins im Periplasma von *E. coli* wird vor allem von der korrekten Ausbildung seiner Disulfidbrücken bestimmt (Glockshuber *et al.*, 1992). Dieser Prozess wird neueren Erkenntnissen zufolge durch die *Dsb*-Proteine von *E. coli* katalysiert, die Thiol-Disulphid-Oxidoreduktaseaktivität besitzen (Missiakas und Raina, 1997). Auch im periplasmatischen Raum kann es zur Ausbildung von Einschlußkörpern kommen. Im Gegensatz zum Cytoplasma findet die Aggregation hier jedoch vor allem dann statt, wenn die Faltung des Proteins langsam verläuft (Wall und Plückthun, 1995).

Tatsächlich wird in den meisten Fällen der größere Anteil des heterologen Proteins in aggregierter Form produziert (Wall und Plückthun, 1995). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment nachgewiesen werden. Obwohl es im Vergleich zu anderen F<sub>ab</sub>-Fragmenten mit insgesamt hoher Ausbeute in löslicher Form synthetisiert wurde, lag das rekombinante Protein zu etwa 90 % als cytoplasmatisches und zu 6,0 % als periplasmatisches Aggregat vor, so daß nur 4,0 % in funktioneller Form isoliert werden konnten (vgl. Tabelle 2 in Kapitel 3.1.2). Dieses Ergebnis verdeutlicht den Einfluß von effizienter Sekretion und Faltung auf die funktionelle Proteinausbeute.

Gerade im Fall von Antikörperfragmenten scheinen die periplasmatischen Einschlußkörper zudem einen toxischen Effekt auf die Bakterienzelle zu haben (Plückthun und Skerra, 1989). Es wird davon ausgegangen, daß das denaturierte Protein durch seine exponierten hydrophoben Peptidsequenzen eine permeabilisierende Wirkung auf die äußere Zellmembran hat und eine Lyse der Zelle begünstigt (Skerra, 1989). Ferner kann eine ungünstige Wechselwirkung unverbrückter Cysteinreste des ungefalteten Fremdproteins mit bakterieneigenen periplasmatischen oder membranständigen Proteinen nicht ausgeschlossen werden (Schmiedl *et al.*, 2000).

#### 4.1.1 Funktionelle Produktion von Antikörperfragmenten im Fermenter

Sowohl für praktische Anwendungen als auch für bestimmte Fragestellungen in der Grundlagenforschung – z. B. Strukturaufklärung oder Aktivitätsanalyse *in vivo* – sind größere Mengen eines Proteins in reiner Form erforderlich. Dies galt auch für die hier in Kooperation durchgeführten Experimente mit dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment zur neuronalen Regeneration im Rückenmark der Ratte (Kapitel 3.1.3). Die Ausbeute, die im Labormaßstab aus Schüttelkulturen erhalten wurde, lag für das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment (Mensch IgG1/κ) mit 0,8 mg L<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> zwar über denen, die für andere F<sub>ab</sub>-Fragmente erzielt wurden, allerdings lag der Bedarf im höheren Milligramm- bis Grammbereich (Broesamle *et al.*, 2000) und konnte auf diese Weise nicht gedeckt werden.

Größere Proteinmengen können mit dem Verfahren der Fermentation gewonnen werden, bei dem aufgrund der homöostatischen Wachstumsbedingungen und insbesondere der kontrollierten Sauerstoffzufuhr deutlich höhere Zelldichten zu erreichen sind (Carter *et al.*, 1992). Ein generelles Verfahren zur fermentativen Herstellung von Antikörperfragmenten war von Schiweck und Skerra (1995) etabliert worden und bereits früher im Fall des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Maus IgG1/κ) erfolgreich angewandt worden (Bandtlow *et al.*, 1996).

Die auf dem Expressionsvektor pASK85 klonierte dicistronische Genkassette für das Antikörperfragment wurde bei diesen Experimenten durch den dicht reprimierten Tetracyclin-Promotor/Operator (*tet*<sup>P/O</sup>) kontrolliert (Skerra, 1994b). Eine stringente Regulation des Promotors wird allgemein als essentiell für das stabile bakterielle Zellwachstum und das Erreichen hoher Zelldichten (OD<sub>550</sub> > 20) vor der gezielten Induktion der Genexpression angesehen (Carter *et al.*, 1992; Schiweck und Skerra, 1995). Unzureichende Repression des Fremdgens ist dagegen meist nachteilig für die Fermentation, da so ein Selektionsdruck gegen diejenigen Zellen, die den intakten Expressionsvektor tragen, entsteht. Dies kann zum Plasmidverlust in der Fermentationskultur und zum Abbruch des Wachstums bereits bei niedrigen Zelldichten führen (Zabriskie und Arcuri, 1986).

Ein solcher Effekt wurde hier bei den ersten Produktionsversuchen für das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment (Mensch IgG1/κ) im Fermenter beobachtet (Kapitel 3.1.1). Hierbei wurde der *E. coli* K12 Wildtypstamm W3110 sowie Ampicillin als Plasmid-Selektionsmarker eingesetzt. Bei diesen Experimenten wurden schwankende und wesentlich niedrigere Ausbeuten erzielt als aufgrund der Vorversuche im Schüttelkolben erwartet. Im Gegensatz dazu entsprach die zellbezogene Ausbeute des löslichen originalen IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Maus IgG1/κ) derjenigen, die im Labormaßstab aus Schüttelkulturen erhalten wurde. Dies galt übrigens auch für die F<sub>ab</sub>-Fragmente M41 bzw. M44, die mit Hilfe des gleichen Fermentationsverfahrens produziert worden waren (Schiweck, 1998). Die Ausbeute dieser F<sub>ab</sub>-Fragmente war somit nur von der Sekretion und Faltung der rekombinanten Polypeptidkette im Periplasma von *E.*

*coli* limitiert (Schiweck und Skerra, 1995; Bandtlow *et al.*, 1996). Die Diskrepanz im Fall der Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments ließ sich dagegen auf einen starken Plasmidverlust von bis zu 50 % im Verlauf der Fermentation von W3110/pASK88-IN1 zurückführen.

Obwohl – angesichts der besseren Ausbeuten im Schüttelkolbenmaßstab – die Faltungseffizienz des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments im Vergleich zu dem entsprechenden Fragment des Types Maus offensichtlich erhöht war, schien es einen stärkeren toxischen Effekt auf die Wirtszelle auszuüben, was sich letztlich trotz der geringen Basalaktivität des *tet*<sup>P/O</sup>-Systems bei der Fermentation ungünstig auswirkte. Durch Verwendung des Antibiotikums Ampicillin, das bereits durch kleine Mengen der  $\beta$ -Lactamase, die durch Zellyse in das Medium gelangt, abgebaut wird, konnte kein hinreichender Selektionsdruck gegen plasmidfreie Zellen während des langen Kultivierungszeitraums aufrechterhalten werden. Der beobachtete Plasmidverlust kam dabei vermutlich durch Segregation oder strukturelle Instabilität des Vektors zustande (Corchero und Villaverde, 1997). Ein Indiz für das Überwachsen plasmidtragender Zellen in der Fermentationskultur war neben der verminderten Ausbeute an rekombinantem Protein vor allem die ungewöhnlich hohe Zelldichte (OD<sub>550</sub> = 42) am Ende der Fermentation (vgl. Tabelle 1 in Kapitel 3.1.1).

Der Plasmidverlust konnte durch Verwendung von Chloramphenicol als alternatives Selektionsmittel mit dem Vektor pASK88cat(-) zwar eingedämmt werden, was zu erhöhter und besser reproduzierbarer Ausbeute führte; diese erreichte aber immer noch nicht das Niveau der Produktion im Schüttelkolben. Neben der immer noch vorhandenen Plasmidinstabilität wurde der Grund hierfür in der Verwendung von W3110 als Expressionsstamm vermutet. Während die Ausbeuten des ursprünglichen IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments (Maus IgG1/ $\kappa$ ; Bandtlow *et al.*, 1996) sowie der F<sub>ab</sub>-Fragmente M41 und M44 (Schiweck, 1998) unabhängig von dem jeweils verwendeten Expressionsstamm waren, galt dies anscheinend nicht für das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment (Mensch IgG1/ $\kappa$ ).

Die Wahl des geeigneten Wirtsstamms für die Produktion heterologer Proteine – in Schüttel- oder Fermenterkultur – wird in der Literatur als wichtiger Faktor hinsichtlich der erzielbaren Ausbeute diskutiert (Zabrinski und Acuri, 1986; Sambrook *et al.*, 1989). Für das McPC603 F<sub>v</sub>- und auch F<sub>ab</sub>-Fragment wurden die besten Ergebnisse mit dem *E. coli* K12-Stamm JM83 erzielt (Skerra, 1989). Zahn (2000) beschreibt dagegen die höchsten Ausbeuten für das A2A1-scF<sub>v</sub>-Fragment bei der Verwendung des K12-Stammes XL1-Blue. Alle Beobachtungen hierzu sind jedoch empirisch und einer konkreten bakteriellen Eigenschaft oder dem Genotyp noch nicht zuzuordnen.

Die unbefriedigenden Ergebnisse bei der Produktion des chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit dem System W3110/pASK88-IN1 beruhten vermutlich auf dem kombinierten Effekt der Plasmidinstabilität einerseits und der Verwendung eines nicht idealen Expressionsstamms

andererseits. Beides konnte durch die Verwendung des K12-Stammes JM83 und mit dem neu konstruierten Expressionsvektor pMF88-IN1 behoben werden. Dieser basierte auf der tet<sup>p/o</sup>-Regulation von pASK75 (Skerra, 1994b) in Verbindung mit dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen und trug zusätzlich das *proBA*-Operon von *E. coli* (Kapitel 3.1.1). Die vektorvermittelte Komplementierung der chromosomalen  $\Delta$ *proBA* Mutation erlaubte nicht nur die Verwendung des für Prolin auxotrophen Stamms JM83 zur Fermentation in einem Minimalmedium; gleichzeitig bewirkte sie unter diesen Bedingungen – zusätzlich zur Chloramphenicol-Resistenz – einen metabolischen Selektionsdruck gegen plasmidfreie Zellen. Auf diese Weise konnten schließlich ähnlich hohe zellbezogene Ausbeuten bei der fermentativen Herstellung mit JM83/pMF88-IN1 erzielt werden ( $0,6 \text{ mg ml}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ ) wie mit JM83/pASK88-IN1 im Schüttelkolben ( $0,8 \text{ mg ml}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ ).

Interessanterweise war das Wachstum von JM83 mit pMF88-IN1 während der Kultivierung im Fermenter trotz der Verwendung des Glucose/NH<sub>3</sub>-Minimalmediums ähnlich gut wie das des Wildtypstamms W3110. Hingegen war bei ähnlichen Versuchen zur Komplementierung durch ein Derivat des Plasmids pBR322, welches das *proBA*-Operon trug, bei prolin-auxotrophen *E. coli*-Stämmen eine signifikante Reduktion der Wachstumsrate in Minimalmedium beschrieben worden (Mahan und Csonka, 1983). Dies hatte möglicherweise seinen Grund in der geringeren Kopienzahl des Plasmids, die eine verminderte Gendosis von *proBA* zur Folge hatte. Dagegen trägt pMF88-IN1 den verkürzten Replikationsursprung der pUC-Plasmide, bei denen es sich um *High Copy Number*-Vektoren handelt (Viera und Messing, 1982; Skerra, 1989). Im Widerspruch hierzu steht allerdings, daß bei nicht-auxotrophen Stämmen eine einzelne chromosomale Kopie des *proBA*-Operons für ein normales Wachstum in Minimalmedium ausreicht.

#### 4.1.2 Herstellung und Reinigung löslicher Fragmente von Nogo-A in *E. coli*

Die gentechnische Herstellung eines löslichen und biologisch aktiven Fragments des Membranproteins Nogo-A mit neuronaler Inhibitoraktivität war nicht nur für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Affinitätsmaturierung des Antikörpers IN-1 von Bedeutung. Vielmehr wird die gentechnische Verfügbarkeit dieses Effektorproteins – bzw. eines biologisch aktiven Fragments – helfen, tiefere Einblicke in seine biochemischen Eigenschaften sowie seinen Wirkungsmechanismus zu gewinnen. Die früheren Untersuchungen an Nogo-A befaßten sich in erster Linie mit dem biologischen Phänomen seiner inhibitorischen Aktivität, weniger aber mit den molekularen Ursachen (Huber und Schwab, 2000). Ein erster Schritt zu seiner proteinchemischen Analyse war die Etablierung der heterologen Produktion und Reinigung von NiFr1 (Horn; 1998), einem Fragment des von Exon 3 kodierten Proteinabschnitts (vgl. Kapitel 1.3), welcher vermutlich eine zentrale



globuläre Domäne von Nogo-A bildet. Nach Chen *et al.* (2000) handelt es sich dabei um einen extrazellulären Abschnitt des integralen Membranproteins, welcher für die inhibitorische Aktivität hauptsächlich verantwortlich ist. Die gentechnische Produktion von löslichem NiFr1 erfolgte durch Sekretion der Polypeptidkette in das oxidierende Milieu des periplasmatischen Raums von *E. coli*, um die Ausbildung der bis zu vier potentiellen Disulfidbrücken und damit die Faltung des Proteins zu gewährleisten. Die affinitätschromatographische Reinigung wurde mit Hilfe des *Strep*-Tags (Schmidt und Skerra, 1993) am Carboxyterminus des Proteins ermöglicht. Das Fragment NiFr1 zeigte jedoch bei der Produktion eine erhebliche Tendenz zu proteolytischem Abbau, wobei eine prominente Spaltungsstelle zwischen Valin 59 und Serin 60 (bezogen auf den klonierten Leserahmen) bzw. Valin 233 und Serin 234 (bezogen auf das gesamte Nogo-A) nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3 in Kapitel 1.4).

Ausgehend von NiFr1 wurde die Qualität der Proteinpräparation des Nogo-A Fragments im Zuge dieser Arbeit optimiert. Dies war für die erfolgreiche Affinitätsmaturierung des Antikörpers IN-1 sowie für die im Anschluß durchgeführten Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz erforderlich. Die Verkürzung der Sequenz von NiFr1 auf die Aminosäuren 234 bis 940 des nativen Nogo-A in NiFr2 bewirkte eine Verbesserung der Homogenität, da die Spaltung im aminoterminalen Bereich (s. o.) auf diese Weise umgangen wurde. Dies führte auch zu einer Erhöhung der Gesamt-Proteinausbeute. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung von Horn (1998), daß die N-terminalen Aminosäuren des Nogo-A Proteins bis zur Position 233 offensichtlich nicht an der Ausbildung einer wohlstrukturierten extrazellulären Domäne beteiligt sind.

Eine weitere Verbesserung von Ausbeute und Homogenität wurde mit dem Fragment NiFr4 erzielt. Dieses umfaßte ebenfalls die Aminosäuren 234 bis 940 des nativen Nogo-A, trug allerdings das *Strep*-Tag II am Aminoterminal (Skerra und Schmidt, 2000) sowie das Hexahistidin-Peptidanhängsel am Carboxyterminus. Durch zwei aufeinanderfolgende affinitätschromatographische Schritte an Streptavidinsepharose sowie an einer Metallchelatomatrix wurde unfragmentiertes Nogo-A Fragment isoliert. Überraschenderweise erhöhte sich mit der Modifizierung von Amino- und Carboxyterminus die Ausbeute von rekombinantem Protein im Vergleich zu NiFr2 um den Faktor 2,5. Diese Beobachtung kann durch eine erhöhte Transkriptions-/Translationseffizienz aufgrund der Veränderung im 5'-Bereich des Fremdgens erklärt werden. Ebenso ist eine verbesserte Faltung der an Amino- und Carboxyterminus veränderten Polypeptidkette im periplasmatischen Raum von *E. coli* möglich.

Die effiziente Sekretion, Prozessierung und Faltung der beschriebenen Nogo-A Fragmente im periplasmatischen Raum von *E. coli* unterstützen die Annahme, daß es sich bei dem von Exon 3 kodierten Bereich (Kapitel 1.4), welcher die Aminosäuren 172 bis 975 umfaßt, um eine

globuläre extrazelluläre Domäne des in der Oligodendrozytenmembran und damit in der Myelinscheide verankerten Inhibitorproteins handelt. Interessanterweise konnte in der Sequenz des nativen Nogo-A bislang keine konventionelle Signalsequenz, wie sie normalerweise die Translokation einer N-terminalen extrazellulären Domäne eines Typ I Membranproteins vermittelt (von Heijne, 1996), identifiziert werden. Es sind jedoch alternative posttranslationale Mechanismen bekannt, die ebenfalls die Topologie von Membranproteinen determinieren können (Broome-Smith *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1998).

Ein generelles Problem bei der heterologen Synthese von nativen Proteinen in *E. coli* ist die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken während des Faltungsvorganges im periplasmatischen Raum (Wall und Plückthun, 1995). Auch die in den hergestellten Nogo-A Fragmenten vorhandenen acht Cysteinreste, die im nativen Protein möglicherweise vier Disulfidbrücken ausbilden, hatten offensichtlich einen negativen Einfluß auf Ausbeute und Homogenität der erhaltenen Präparationen (Kapitel 3.2). So kam es hierbei zum Teil zur Ausbildung von disulfidverbrückten Oligomeren und Disulfid-Isomeren. Inwiefern die Cysteinreste für die biologische Aktivität des Nogo-A Fragments notwendig sind, wird zur Zeit im Labor von Prof. A. Skerra untersucht.

In diesem Zusammenhang ist die Bereitstellung des menschlichen Analogons von NiFr2, die vor kurzem auf der Grundlage der hier erzielten Befunde möglich wurde (E. Hettich, 2001) ein vielversprechender Ansatz. Das Nogo-A Protein des Menschen weist im Vergleich zu dem der Ratte nur sechs Cysteinreste auf (Goldberg und Barres, 2000), was sich günstig auf die bakterielle Herstellung auswirken sollte. Darüber hinaus ist die Verfügbarkeit eines rekombinanten Fragments des menschlichen Nogo-A Proteins – gerade als das eigentlich relevante Antigen für das in dieser Arbeit konstruierte humanisierte II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment (Kapitel 3.5) – für die weitere Entwicklung eines möglichen therapeutischen Reagenz von großer Bedeutung.

## 4.2 Affinitätsoptimierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mittels Protein-Engineering

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Antigenaffinität des IN-1 Antikörpers. Der experimentelle Ansatz umfaßte die Herstellung einer Bibliothek von an definierten Positionen zufällig mutierten Varianten des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und die Durchmusterung dieser Bibliothek nach Bindungsproteinen mit verbesserter Affinität. Ähnliche Experimente sind in der Literatur mehrfach beschrieben (Vaughan *et al.*, 1996; Hoogenboom, 1997; Vaughan *et al.*, 1998; Winter, 1998), unterscheiden sich aber zumeist in Herstellung und Komplexität der Bibliothek sowie in der Strategie zur Selektion bindungsaktiver Antikörperfragmente.

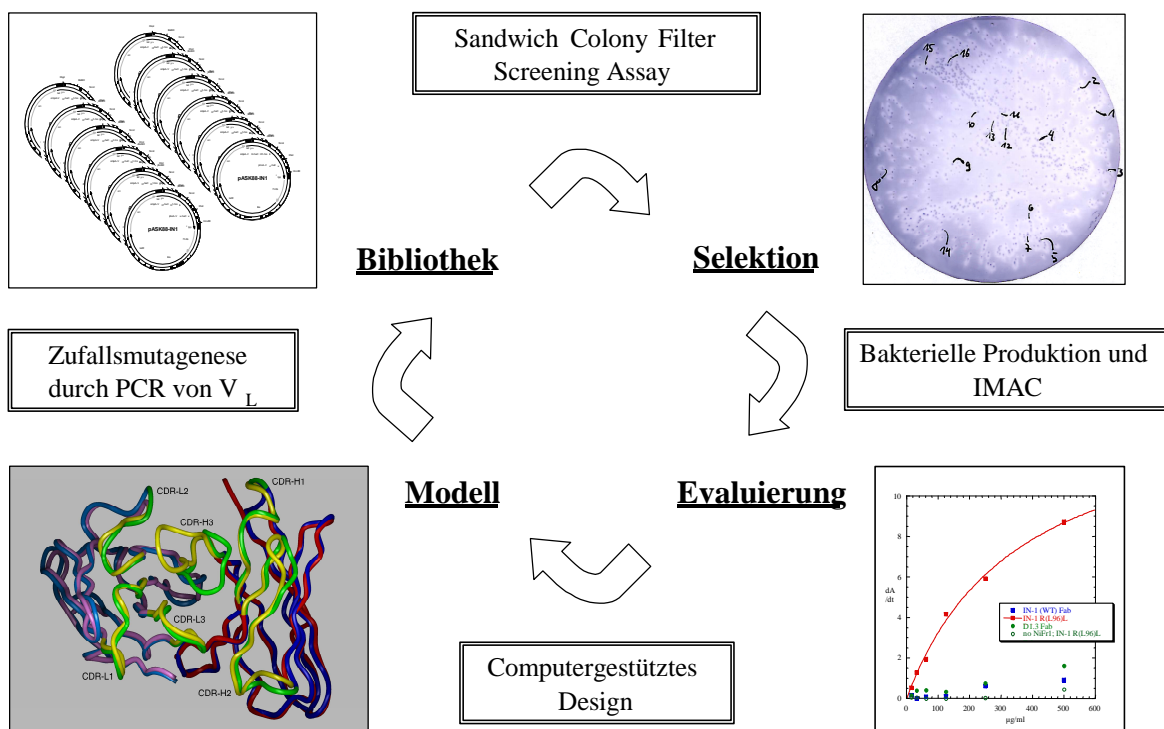
Grundsätzlich ist die *De novo*-Selektion eines neuartigen Antikörpers gegen ein Antigen mittels rekombinanter Antikörper-Technologie von der Affinitätsoptimierung, die von einem bereits charakterisierten Antikörper ausgeht, zu unterscheiden. Im ersten Fall wird eine komplexe *Single Pot*-Bibliothek eingesetzt, die in ihrer genetischen Diversität das menschliche Antikörper-Repertoire widerspiegeln soll. Nach der Art ihrer Herstellung werden in der Literatur naive und synthetische Antikörperbibliotheken unterschieden (Hoogenboom, 1997). Während sich erstere aus den amplifizierten V-Genen von nicht-immunisierten Spendern zusammensetzt (DeHaard *et al.*, 1999), wird die synthetische Bibliothek auf der Grundlage von statistisch modifizierten V-Keimbahngenen (Hoogenboom und Winter, 1992) oder deren optimierten Konsensussequenzen hergestellt (Knappik *et al.*, 2000). Dazu werden die Bereiche einzelner CDRs und eventuell flankierender Positionen einer Zufallsmutagenese unterzogen.

Für die Affinitätsmaturierung eines vorhandenen Antikörpers, der bereits eine gewisse Bindungsaktivität aufweist, werden Bibliotheken mit geringerer Komplexität verwendet, da hierbei die generelle Struktur der Antigenbindungsstelle erhalten bleiben und die Zahl der möglichen Aminosäureaustausche daher begrenzt werden soll. Da umfangreiche Substitutionen zum Verlust der vorhandenen Affinität oder Spezifität führen können, werden diese auf einzelne Positionen (Xiang *et al.*, 1993) oder bestimmte CDRs beschränkt (Schier *et al.*, 1996; Hemminki *et al.*, 1998). Die generelle Vorgehensweise bei der *In vitro*-Affinitätsreifung von Antikörpern simuliert im Prinzip die Maturierung von schwach affinen Antikörpern der frühen Immunantwort durch somatische Hypermutation in der B-Zelle. Interessanterweise hat in früheren Beispielen gerade die Variation der im Zentrum des Paratops gelegenen CDR-L3 und -H3 eine bis zu 1000-fache Verbesserung der Affinität erbracht (Schier *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu werden im Verlauf der Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation vor allem die ersten und zweiten CDRs an der Peripherie der Bindungstasche modifiziert (Tomlinson *et al.*, 1996).

In der Praxis umfaßt die *In vitro*-Affinitätsreifung eines Antikörpers mehrere Zyklen, in denen jeweils die zu substituierenden Reste in der Antigen-Bindungsstelle ausgewählt und eine entsprechende Bibliothek von Mutanten konstruiert wird, aus der dann besser bindende Varianten selektiert und anschließend evaluiert werden. Die dabei verwendeten Antikörperbibliotheken werden zumeist im Format von scF<sub>V</sub>-Fragmenten konstruiert, bei denen die variablen Domänen des Antikörpers über ein Peptid miteinander verbunden sind (Vaughan, 1996; Hoogenboom, 1997; Knappik *et al.*, 2000). Diese Fragmente haben den Vorteil, aus einer einzelnen Polypeptidkette zu bestehen, was zu einer verbesserten Stabilität führt und die einfache genetische Fusion mit Phagenhüllproteinen ermöglicht. Letzteres ist für die als Selektionsmethode gebräuchliche *Phage-Display* Technik von Bedeutung (Hoogenboom, 1997; Rondot *et al.*, 2001). Auf diese Weise wurde z. B. die Affinität des Anti-c-erbB-2 Antikörpers C6.5 durch separate Mutagenese der kodierenden Sequenzen für

CDR-L3 bzw. CDR-H3 optimiert (Schier *et al.*, 1996). Besser bindende Varianten wurden in Form der scFv-Fragmente mittels *Phage-Display* selektiert und die erhaltenen optimierten variablen Domänen schließlich kombiniert. Das affinitätsmaturierte Anti-c-erbB-2 scFv wies schließlich eine 1230-fach niedrigere Dissoziationskonstante ( $K_D = 1.3 \times 10^{-11}$  M) als der ursprüngliche Antikörper ( $K_D = 1.6 \times 10^{-8}$  M) auf.

Die in dieser Arbeit beschriebene Vorgehensweise (Abb. 51) unterscheidet sich von diesem Ansatz vor allem in der Wahl des verwendeten Antikörperfragments sowie in der Selektionstechnik. Hier wurde das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment als Bindungsprotein und der *Filter Sandwich Colony Screening Assay* (Skerra *et al.*, 1991; Schlehuber *et al.*, 2000) als Selektionsverfahren eingesetzt. Ein wesentlicher Unterschied bestand weiterhin in der extrem schlechten Antigenaffinität des ursprünglichen IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments ( $K_D = 8.0 \times 10^{-6}$  M), von der bei der Maturierung ausgegangen wurde. Eine Veränderung der Antigen-Bindungsstelle mußte dementsprechend moderat erfolgen, um die schwache vorhandene Affinität nicht von vornherein zu verlieren. Ebenso war die Evaluierung erhaltener Varianten in einem immunchemischen Standardtest wie ELISA unter diesen Umständen erschwert.



**Abbildung 51:** Schematische Vorgehensweise bei der Affinitätsmaturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments durch evolutives Protein-Engineering.

Die kritischen Schritte bei der *In vitro*-Maturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden, umfassen:

- (a) die Methode zur gerichteten Mutagenese der V<sub>L</sub>-Domäne für die Herstellung einer Bibliothek,
- (b) die Adaptation des Kolonie-Filterstapel-Assays auf das vorliegende System sowie
- (c) die Etablierung eines immunchemischen Standardtests zur Evaluierung der erhaltenen Varianten.

#### 4.2.1 Erzeugung von Mutanten der V<sub>L</sub>-Domäne des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments

Mit Hilfe eines Computer-Strukturmodells und in Übereinstimmung mit der Literatur (Padlan, 1994; MacCallum *et al.*, 1996) wurden in CDR-L3 des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments solche Positionen identifiziert, die für den Kontakt zum Antigen aller Voraussicht nach mitverantwortlich sind. Zunächst vereinzelt durchgeführte gezielte Substitutionen erwiesen sich allerdings – zumindest immunchemisch – als ineffektiv. Die Substitutionen A<sub>L32</sub>→F und R<sub>L96</sub>→L zeigten zwar in Zellkultur-Experimenten einen Effekt (Kapitel 3.3.2) indem sie die neutralisierende Wirkung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments komplett aufgehoben (Substitution A<sub>L32</sub>→F) bzw. um das zwei- bis dreifache verbesserten (Substitution R<sub>L96</sub>→L). Für keine der Varianten wurde jedoch im ELISA – wie auch schon im Falle des Wildtyps – ein Bindungssignal erhalten. Für die Optimierung des IN-1 Antikörpers waren offensichtlich speziellere Substitutionen im Hinblick auf Position, Anzahl und Art der substituierenden Seitenkette notwendig. Die Konstruktion einer geeigneten Bibliothek von mutierten V<sub>L</sub>-Domänen war damit essentiell für die Affinitätsmaturierung.

Für Varianten, die in ersten Experimenten nach einer gezielten Zufallsmutagenese, bei der an der Position L32 bzw. L96 alle Aminosäuren zugelassen waren, selektiert worden waren, war ebenfalls keine Bindung an NiFr2 im ELISA detektierbar (nicht gezeigt). Bei dieser Vorgehensweise wurde das V<sub>L</sub>-Gen von IN-1 mittels komplementären Oligodesoxynukleotiden (Kunkel, 1987), welche durch das Kodon MNN theoretisch den Einbau jeder der 20 Aminosäuren erlauben, mutiert. In der Praxis wurde die beabsichtigte Diversität von Varianten jedoch nicht erzielt. So wiesen die V<sub>L</sub>-Gene der analysierten Varianten entweder das Wildtypkodon oder lediglich den Austausch einer einzelnen Base auf. Im Falle eines Austausches waren Transitionen zudem (G zu A bzw. C zu T) deutlich bevorzugt.

Als Methode der Wahl für die Erzeugung von funktionellen Varianten der IN-1 V<sub>L</sub>-Domäne erwies sich eine auf CDR-L3 gerichtete zufällige Substitution von benachbarten Aminosäuren unter Verwendung von mutagenen PCR-Primern. Dabei wurden Aminosäuren an insgesamt fünf Positionen (L91 bis L94 und L96) in zwei Maturierungszyklen substituiert. Diese

Vorgehensweise stimmte mit Hoogenboom (1997) überein, der die zufällige Substitution von maximal 4 bis 6 Resten und eine unbedingte Konservierung von Aminosäuren, die zur Ausbildung der korrekten Konformation des CDRs beitragen (u. a. L95), empfiehlt. Auch Hemminki *et al.* (1998) fanden im Zuge der Optimierung eines anti-Testosteron Antikörpers insgesamt nur 3 bis 5 Substitutionen in beiden CDR3 von affinitätsmaturierten Ig-Fragmenten, obwohl der experimentelle Ansatz eine größere Anzahl von Austauschen zugelassen hätte. Eine allzu umfassende Veränderung der antigenbindenden Region – wie etwa die von Schier *et al.* (1996) durchgeführte Substitution beider CDR3 – erschien im vorliegenden Fall nicht sinnvoll um die vorhandene, schwache Bindung des monovalenten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments nicht zu verlieren.

Im Falle des IN-1 Antikörpers wurden hier die Aminosäuren an den Positionen L90 (Asn) und L95 (Pro) von der Substitution ausgenommen, da sie für die korrekte Ausbildung der vorhergesagten kanonischen Strukturklasse 1 des CDR-L3 verantwortlich sind (Chotia *et al.*, 1989). Diese moderate Vorgehensweise erwies sich als am besten geeignet, um die Selektivität des Paratops, die bei IgM Antikörpern im Allgemeinen schwach ausgeprägt ist (Janeway und Travers, 1995) beizubehalten. Darauf, daß ein umfassender Austausch von Aminosäuren im Bereich der variablen Domänen eines Antikörperfragments nicht nur dessen Affinität, sondern ebenfalls seine Spezifität negativ beeinflussen kann, weist die erhöhte Reaktivität des humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments gegenüber Rinder-Serumalbumin im ELISA hin (Kapitel 3.5.2).

Die Qualität einer Gen-Bibliothek hängt vor allem davon ab, in wie weit die durch die gewählte Randomisierungsstrategie möglichen Varianten in ihr repräsentiert sind (Diversität) und zu welchem Anteil Gene, die für nicht-funktionellen Varianten kodieren, vorliegen (Knappik *et al.*, 2000). Die primär erzeugte genetische Variabilität einer Bibliothek ist daher nicht mit deren funktionellen Variabilität gleichzusetzen (Knappik *et al.*, 2000), da es im Verlaufe des gentechnischen Herstellungsverfahrens zu Fehlern wie Leserasterverschiebungen, dem Einbau von Stop-Kodons oder der unbeabsichtigten Modifikation von Positionen, die essentiell für die Faltung oder Funktion sind, kommen kann.

Gerade derartige Varianten können aufgrund ihrer geringen Faltungseffizienz einen toxischen Effekt auf die Wirtszelle ausüben und Lyse bewirken sowie im nachfolgenden Selektionsschritt durch unspezifische Wechselwirkung eine Bindung des Antigens vortäuschen. Insbesondere wenn – wie beim Antikörper IN-1 – bei der Affinitätsmaturierung von einer schwachen Antigenbindung ausgegangen wird, besteht daher die Gefahr, nichtfunktionelle Varianten zu isolieren.

Dieser Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeit vor allem bei ersten Versuchen zur Affinitätsmaturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mittels *Error Prone* PCR beobachtet (nicht gezeigt). Die bewußt fehlerhafte Amplifizierung des V<sub>L</sub>-Gens in Gegenwart von Mn<sup>2+</sup> und

Basenpaar-Analoga wie dITP ist in der Literatur als Methode zur Affinitätsmaturierung bereits beschrieben (Casson und Manser, 1995). Mit dieser Methode wurden im Durchschnitt 2 bis 4 zufällige Punktmutationen in das  $V_L$ -Gen von IN-1 eingeführt, wobei auch Positionen der Gerüstregion, die einen indirekten Einfluß auf die Antigenbindung haben (Foote und Winter, 1992), einbezogen waren. Allerdings ist bekannt, daß bei dieser Vorgehensweise ein großer Anteil von nicht-funktionellen Varianten entsteht (Johnson und Hawkins, 1996). Dies mußte auch bei der Analyse der  $V_L$ -Genen von Varianten des IN-1  $F_{ab}$ -Fragments, die durch den Ansatz der *Error Prone* PCR erhalten worden waren, festgestellt werden. Nur bei einem einzigen von insgesamt 14 durch den Kolonie-Filterstapeltest selektierten Klone wurde eine funktionellen Sequenz nachgewiesen, die zudem für eine Variante ohne Bindung im ELISA kodierte. Dieses Ergebnis zeigt nicht nur die Unbrauchbarkeit dieser Methode im vorliegenden Fall auf, sondern verdeutlicht das Problem der Selektion auf nicht-funktionelle oder toxische Varianten während der Durchführung des Kolonie-Filterstapel-Assays (siehe Kapitel 4.2.2).

#### 4.2.2 Die Selektion optimierter $F_{ab}$ -Fragmente mit einem Kolonie-Filterstapeltest

Bei den gängigen *In vitro*-Verfahren werden antigenspezifische Ig-Fragmente aus Antikörper-Bibliotheken durch alternierende Runden von Selektion und Proliferation der dabei erhaltenen Varianten gewonnen. Hierfür wurden Selektionsmethoden etabliert, welche eine physikalische Verknüpfung von proteinchemischer Funktion der untersuchten Bindungsproteine (zumeist  $scF_V$ -Fragmente) und deren genetischer Information gewährleisten. Das grundlegende Prinzip besteht in der Präsentation (*Display*) des potentiellen Bindungsproteins auf der Oberfläche eines zur Replikation befähigten mikrobiellen Organismus, der das für die Variante kodierende Gen trägt.

Für diesen Zweck werden rekombinante Antikörperfragmente auf filamentösen Phagen (*Phage Display*; McCafferty *et al.*, 1990), Bakterien (*Bacterial Surface Display*; Daugherty *et al.*, 1998) oder Hefezellen (*Yeast Surface Display*; Kieke *et al.*, 1997) präsentiert. Dies wird durch genetische Fusion mit einem Hüll- oder Oberflächenprotein des Organismus erreicht und ermöglicht so die Affinitätsanreicherung von Varianten aus einer Bibliothek zusammen mit ihrer genetischen Information. Das robusteste und am weitesten verbreitete System ist hier das *Phage Display*, bei dem die kodierende DNA der präsentierten Variante in einzelsträngiger Form im Phagenkapsid verpackt vorliegt und nach der Selektion durch die Infektion geeigneter Bakterien amplifiziert sowie einem weiteren Anreicherungszyklus zugeführt werden kann. Auf diese Weise konnte eine große Anzahl hochaffiner Antikörperfragmenten gewonnen werden, welche unter anderem gegen zelluläre Oberflächenmarker, Peptidhormone oder krankheitsrelevante menschliche Proteine als

Antigen gerichtet sind (Holt *et al.*, 2000a). Allerdings mußte festgestellt werden, daß bei diesen zellbasierten Verfahren oft primär auf hohe Expressionsraten und gute Faltungseigenschaften selektiert wird (Holt *et al.*, 2000b). Varianten mit niedriger Expressionsrate oder toxischem Effekt auf den Wirtsorganismus haben dabei grundsätzlich einen Nachteil.

Um solche Probleme zu umgehen, finden seit kurzem zellfreie Selektionssysteme wie das *Ribosome Display* (Hanes und Plückthun, 1997; He und Taussig, 1997) Anwendung. Beim *Ribosome Display* wird eine transiente physikalische Verknüpfung von Geno- und Phänotyp durch die Kopplung der Proteinvariante mit der dazugehörigen mRNA über das Ribosom erreicht. Gleichzeitig wird damit der für die Diversität einer Bibliothek im allgemeinen limitierende Schritt der Transformation von Wirtszellen mit dem Genkollektiv (vgl. Kapitel 4.2), umgangen. Durch Affinitätsanreicherungen mit diesem System konnten aus der Antikörperbibliothek einer immunisierten Maus antigenbindende scF<sub>v</sub>-Fragmente mit Dissoziationskonstanten von bis zu  $4 \times 10^{-11}$  M erhalten werden (Hanes *et al.*, 1998).

Als Ergänzung zu den dargestellten Systemen konnte ein von Skerra *et al.*, (1991) für die Durchmusterung kleiner Bibliotheken entwickelter Filterstapeltest (*Filter Sandwich Colony Screening Assay*) bei der Isolierung von neuartigen Bindungsproteinen – sogenannten „Anticalinen“ – erfolgreich eingesetzt werden (Schlehuber *et al.*, 2000). Dieses Verfahren dient der Durchmusterung von plasmidkodierten Bibliotheken anhand von Bakterienkolonien, die auf einer Membran ausplattiert sind. Von diesen werden Proteinvarianten individuell, produziert, sekretiert und auf einem darunterliegenden zweiten Filter durch biospezifische Wechselwirkung in gerichteter Weise immobilisiert. Dieser Membranfilter wird anschließend mit dem markierten Antigen inkubiert, um Bindungssignale ähnlich wie in einem Western Blot sichtbar zu machen (vgl. Abb. 24 in Kapitel 3.3.3).

Der Filterstapeltest wurde ursprünglich für F<sub>ab</sub>-Fragmente entwickelt, deren Immobilisierung auf dem zweiten Membranfilter mittels eines adsorbierten Antikörpers, der gegen die konstante Domäne gerichtet war, erfolgte (Skerra *et al.*, 1991). Bei der Weiterentwicklung durch Schlehuber *et al.* (2000) wurden die Proteinvarianten als genetische Fusion mit der albuminbindenden Domäne (ABD) aus *Streptococcus* Protein G produziert (König und Skerra, 1998) und auf der zweiten Membran mittels zuvor adsorbiertem humanem Serumalbumin (HSA) funktionell immobilisiert. Durch die Herstellung eines analogen Fusionsproteins aus dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und der ABD (Kapitel 3.1.4) wurde hier der Einsatz des Filterstapeltests für die Durchmusterung von Bibliotheken dieses Ig-Fragments möglich.

Im Gegensatz zu Schlehuber *et al.* (2000) lag die Fusion des Bindungsproteins mit der ABD dabei nicht als einzelne Polypeptidkette vor, sondern gemäß der Natur des F<sub>ab</sub>-Fragments als Heterodimer, dessen leichte Kette am Carboxyterminus mit der ABD fusioniert war. Die



grundsätzliche Funktionalität solcher Fusionsproteine war anhand des D1.3 F<sub>ab</sub>-Fragments von König und Skerra (1998) nachgewiesen worden und wurde hier für das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment bestätigt (Kapitel 3.1.4). Als weiterer methodischer Unterschied zu Schlehuber *et al.* (2000), bei dem die Selektion gegen kommerziell erhältliche Hapten-Konjugate stattfand, wurde hier ein wenig charakterisiertes, rekombinantes Protein (NiFr2) als Antigen verwendet.

Da die Ausbeute, mit der das F<sub>ab</sub>-Fragment unter den Bedingungen des Filterstapeltests aus dem bakteriellen Periplasma freigesetzt wird, abhängig von dem verwendeten Bakterienstamm ist (Skerra *et al.*, 1991), wurde in dieser Arbeit *E. coli* JM83 verwendet, mit dem die Produktion des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments in Flüssigkultur am effizientesten war (Kapitel 3.1.1). Da dieser Stamm im Gegensatz zu TG1, der zuvor verwendet wurde (Schlehuber *et al.*, 2000), kein Amber-Supressorstamm ist, wurde in Kauf genommen, daß Amber-Stopsignale, die bei der verwendeten Mutagenesestrategie (Kapitel 3.3.3) auftreten konnten, zu nicht funktionellen Polypeptidketten führten. Interessanterweise wurden vornehmlich bei der Analyse der für den ersten Schritt der Affinitätsmaturierung erstellten Bibliothek Varianten, die ein Stop-Signal aufwiesen, selektiert. Insgesamt wurde bei der Selektion aus dieser Bibliothek eine Konkurrenz zwischen Varianten, die eine verbesserte Antigenbindung aufwiesen, und solchen, die nicht-funktionell oder toxisch waren, festgestellt (Kapitel 3.3.3). Lediglich 22 % der anhand des scheinbaren Bindungssignals selektierten Bakterien trugen dabei ein Plasmid mit einem V<sub>L</sub>-Gen, das für ein intaktes Protein kodierte (d. h.: ohne Insertion, Deletion oder Stop-Kodon). Im Gegensatz dazu wurden in der zweiten Phase der Affinitätsmaturierung, bei dem von dem I.2.6(L<sup>96</sup>V) F<sub>ab</sub>-Fragment mit einer bereits verbesserten Antigenbindung ausgegangen wurde, nur noch funktionelle Bindungsproteine selektiert.

Ein gewisses Hintergrundsignal von Kolonien, die nicht-bindende oder nicht-funktionelle F<sub>ab</sub>-Fragmente produzierten, war bereits von Skerra *et al.* (1991) für den Filterstapeltest beschrieben worden. Dies wurde insbesondere bei der Verwendung von biotinyliertem Antigen in Verbindung mit Streptavidin/Enzym-Konjugaten für den Bindungsnachweis festgestellt und auch bei den ersten Tests im Rahmen dieser Arbeit beobachtet. Es wird davon ausgegangen, daß biotinylierte bakterieneigene Proteine, die im Fall der Sekretion von heterologen Proteinen durch Zellyse teilweise freigesetzt werden und an die zweite Membran adsorbieren, für diese unspezifischen Bindungssignale verantwortlich sind. Dies konnte hier durch die Markierung des Antigens NiFr2 mit Digoxigenin und den Nachweis mit Hilfe eines anti-Digoxigenin F<sub>ab</sub>-Fragments als Konjugat mit Alkalischer Phosphatase vermieden werden.

Insgesamt erwies sich der Filterstapeltest als Selektionssystem zum Zweck der Affinitätsmaturierung als gut geeignet. Dabei scheint allerdings eine gewisse Mindestaffinität – nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im unteren mikromolaren Bereich –, welche das zu optimierende Bindungsprotein von vornherein aufweisen muß, notwendig.

Da in der Praxis ca. 500 Bakterienkolonien auf einem Filter ausplattiert werden können erlaubt dieser Selektionsassay bei parallelem Arbeiten die Analyse von 2.000 Varianten einer Bibliothek. Im Hinblick auf die theoretische Komplexität der Bibliotheken, die im Rahmen dieser Arbeit durchmustert wurden ( $3^{20} = 8.000$  Varianten bzw.  $2^{20} = 400$  Varianten), sollten somit – zumindest annähernd – alle theoretisch möglichen Varianten tatsächlich der Selektion zugeführt werden können. Dadurch war die Selektion derjenigen Variante mit den besten Bindungseigenschaften mit Hilfe des Filterstapeltests im Prinzip möglich.

#### 4.2.3 Quantitative Nachweisverfahren für die molekulare Bindung zwischen mutierten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragmenten und NiFr2 bzw. NiFr4

Die Quantifizierung der Affinität, mit der ein Antikörper(-fragment) sein Antigen bindet, ist ein wichtiger Schritt für seine Charakterisierung (Djavadi-Ohanian *et al.*, 1996). Für solche Affinitätsbestimmungen sind mehrere Techniken beschrieben, unter denen der ELISA (Butler, 2000) und in jüngerer Zeit die Analyse mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (Rich und Myszka, 2000) besonders häufig verwendet werden.

Die Affinität  $K_A = 1/K_D$  eines Antikörpers zu seinem Antigen kann unter Gleichgewichtsbedingungen über das Massenwirkungsgesetz bestimmt werden. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß (a) die Dissoziationskonstante  $K_D$  keine Aussage über die Geschwindigkeit der Assoziation bzw. der Dissoziation der Bindungspartner zuläßt und (b) der durch eine der oben genannten Methoden bestimmte  $K_D$ -Wert aufgrund der Immobilisierung eines der Bindungspartner vom realen, eigentlich nur für die Lösung geltenden Wert abweichen kann (Djavadi-Ohanian *et al.*, 1996). Beide Einschränkungen wurden bei der Interpretation der SPR-basierten Bindungsanalyse zwischen den hier verwendeten F<sub>ab</sub>-Fragmenten und dem rekombinanten Nogo-A Fragment jedoch in Kauf genommen. Im Vordergrund stand zunächst die Etablierung einer Methode, mit der der Nachweis einer sehr schwachen Bindung überhaupt erst möglich wurde (vgl. Kapitel 1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur qualitativen Evaluierung von selektierten Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments nach jedem Schritt der Affinitätsmaturierung ein relativ einfacher ELISA (Abb. 25 Kapitel 3.3.3) etabliert. Dazu wurde an die Mikrotiterplatte adsorbiertes Nogo-A Fragment mit dem jeweiligen F<sub>ab</sub>-Fragment inkubiert und der ggf. gebildete Komplex mit einem anti-C<sub>κ</sub> Antikörper als Konjugat mit Alkalischer Phosphatase detektiert. Die Bestimmung der  $K_D$  mit Hilfe eines solchen ELISA ist im Prinzip möglich (König und Skerra, 1998) und wurde in dieser Arbeit auch für die Quantifizierung der Bindung des D1.3 F<sub>ab</sub>-Fragments als Fusion mit der  $\beta$ -Lactamase gegenüber Lysozym erfolgreich durchgeführt (Kapitel 3.6.2). Im Fall der Bindung zwischen Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments und Nogo-A konnte jedoch aufgrund der insgesamt schwachen Bindung kein reproduzierbares

Sättigungsverhalten beobachtet und entsprechende Bindungskonstanten daher nicht abgeleitet werden.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Bindung zwischen dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment sowie dessen Variante II.1.8 und rekombinantem Nogo-A Fragment gelang durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie unter Verwendung eines BIACORE-Gerätes (Myszka, 1997). Dazu wurde NiFr4, ein rekombinantes Nogo-A Fragment, welches am Carboxyterminus ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel trägt, auf einem mit Ni<sup>2+</sup> beladenen NTA-Chip (Nieba *et al.*, 1997) immobilisiert und für jede zu analysierende Konzentration des F<sub>ab</sub>-Fragments das Gleichgewichts-Bindungssignal im kinetischen Sättigungsbereich detektiert. Wichtig hierbei war die Regenerierung der Chip-Matrix und die Belegung mit frischem Antigen nach jeder Einzelmessung, um definierte Ausgangsbedingungen zu gewährleisten.

Die Eignung der BIACORE-Technologie für die routinemäßige Evaluierung einer Vielzahl von Antikörpern, z. B. auch aus einem Selektionsexperiment, ist in der Literatur ausführlich beschrieben worden (Übersicht in Huber *et al.*, 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse belegen jedoch die Notwendigkeit der individuellen Optimierung der Immobilisierungsmethode für jedes zu analysierende Bindungsprotein/Ligand-System (Rich und Myszka, 2000). Die Strategie der metalchelatvermittelten Immobilisierung von NiFr4 an einen Ni<sup>2+</sup>/NTA-Chip (Nieba *et al.*, 1997) erwies sich gegenüber der klassischen NHS/EDC-Kopplung über primäre Amine (O'Shannessy *et al.*, 1992) bzw. der Immobilisierung von biotyniliertem Antigen an einen Streptavidin-Chip (O'Shannessy *et al.*, 1992) für die Bestimmung der  $K_D$  als einzige als geeignet (vgl. Kapitel 3.4.2).

Die ermittelte monovalente Dissoziationskonstante von ca. 8  $\mu$ M für die Bindung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments an NiFr4 liegt im erwarteten Bereich für Antikörper der Klasse IgM aus der frühen Immunantwort (Ogino *et al.*, 1994; Adib-Conquy *et al.*, 1995). Dieser Wert erklärt das Versagen von ELISA-Messungen (Fiedler, 1997), da ein derart schwach affines Antikörperfragment bereits beim mehrfachen Waschen der Mikrotiterplatte durch schnelle Dissoziation und Gleichgewichtseinstellung verloren geht (Pack und Plückthun, 1992). Im Vergleich dazu konnte mit dem optimierten II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment, für das eine etwa achtfach höhere Affinität im BIACORE-Experiment bestimmt wurde, im ELISA ein deutliches Bindungssignal beobachtet werden.

### 4.3 Neutralisierung von Nogo-A durch Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments

Die erfolgreiche Affinitätsmaturierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments, die im Rahmen dieser Arbeit realisiert wurde, ermöglichte erstmals den qualitativen und quantitativen Nachweis der Antikörper/Antigen-Wechselwirkung mit dem neuronalen Inhibitorprotein Nogo-A. Ein

solcher proteinchemischer Bindungsnachweis, der letztlich den neutralisierenden Effekt des IN-1 Antikörpers auf die inhibitorische Aktivität von Nogo-A begründet (Chen *et al.*, 2000), stand bislang aus. Die hier etablierten, vom biologischen System entkoppelten Komponenten eröffnen neue analytische, diagnostische wie auch therapeutische Ansätze im Zusammenhang mit der Neutralisation von neuronalen Wachstumsinhibitoren. Insbesondere bilden sie die Grundlage für eine weitere Optimierung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments, da der Zusammenhang zwischen einer verbesserten proteinchemischen Bindung und einer Erhöhung der biologische Aktivität durch Zellkulturexperimente im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 3.4.4).

In dieser Arbeit führte der schrittweise Austausch von insgesamt fünf Aminosäuren ( $V_{L91} \rightarrow I$ ,  $L_{L92} \rightarrow N$ ,  $S_{L93} \rightarrow R$ ,  $T_{L94} \rightarrow V$ ,  $R_{L96} \rightarrow V$ ) in der CDR-L3 des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments zu der Variante II.1.8. Diese Mutante weist im Vergleich zum Wildtyp eine Verbesserung der Antigenaffinität um den Faktor 8 auf, während ihre biologische Aktivität, d. h. die Fähigkeit das Neuronale Inhibitorprotein Nogo-A zu neutralisieren, im Zellkulturassay verdreifacht ist (vgl. Kapitel 3.4.4). Die Variante I.2.6, die nach dem ersten Maturierungsversuch erhalten wurde, und die besonders gute Bindung im ELISA zeigte, hätte höchstwahrscheinlich einen noch besseren *In vitro*-Effekt. Wegen des exponierten Cysteinrestes an Position L96, der für die hohe Affinität offenbar essentiell ist, und der damit verbundenen niedrigen Ausbeute an gefaltetem Protein im Periplasma von *E. coli* wurde die Variante I.2.6 jedoch nicht weiterverwendet.

Auf struktureller Ebene lag die Ursache der verbesserten Antigenbindung der Variante II.1.8 in erster Linie in der Eliminierung von polaren bzw. geladenen Resten ( $T_{L94} \rightarrow V$ ,  $R_{L96} \rightarrow V$ ) im Zentrum der Antigen-Bindungsstelle des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments, wohingegen die Form der Bindungstasche wahrscheinlich weitgehend konserviert blieb. Durch die Substitutionen  $L_{L92} \rightarrow N$  und  $S_{L93} \rightarrow R$  an Positionen, die vom Zentrum weg gerichtet waren, wurden dagegen an der Peripherie der Bindungstasche polare bzw. eine positiv geladene Gruppe eingeführt. Dies deutet auf die Ausbildung und Ausweitung eines planaren, unpolaren Bereiches im Zentrum der Bindungstasche hin und läßt auf verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Antigen schließen.

Eine planare Oberfläche des Paratops gilt als Merkmal für Antikörper, die native Proteinantigene binden. Dagegen bilden die CDRs von haptens- und peptidbindenden Antikörpern eine mulden- bzw. rinnenförmige Topographie aus (Webster *et al.*, 1994). Z. B. weisen die Kristallstrukturen der Antikörper/Antigenkomplexe von D1.3 und Lysozym aus Hühnereiweiß (PDB Code: 1vfb) bzw. von NC41 und der Neuramidase des Influenzavirus (PDB Code: 1nca) eine flache, relativ ausgedehnte Kontaktfläche auf (Davies und Cohen, 1996), die von fünf der sechs CDRs gebildet wird. Auch die Kristallstruktur des unkomplexierten, menschlichen anti-Thyroid-Peroxidase Autoantikörpers TR1.9 (PDB Code: 1vge; Chacko *et al.*, 1996), die hier als Modell der Antigenbindungsstelle von IN-1 diente

(Kapitel 3.3.1), zeigt eine weitgehend planare Oberfläche des Paratops. Für Protein/Protein-Interaktionen ist eine starke strukturelle Komplementarität der miteinander wechselwirkenden Oberflächen bekannt, was auch für den Kontakt zwischen Proteinantigen und Antikörper gilt (Davies und Cohen, 1996). Eine detaillierte strukturelle Analyse der Antigenbindungsstelle der Variante II.1.8 anhand eines verfeinerten 1vge/6fab Modells oder der Lösung der Kristallstruktur könnte demnach erste Hinweise auf die Struktur des Epitops auf Nogo-A geben.

Die Oberflächengestalt des Paratops eines Antikörpers hängt von der Konformation seiner CDRs ab. Daher scheint ein Zusammenhang zwischen den kanonischen Strukturen (Chothia und Lesk, 1987), welche die hypervariablen Schleifen H1, H2, H3 (soweit klassifizierbar) sowie L1, L2 und L3 ausbilden, und der Spezifität des Antikörpers für bestimmte Klassen von Antigenen gegeben. Tatsächlich wurden für die Bindung von unterschiedlichen Antigenen wie Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren, Peptiden und Haptenen bei den strukturell analysierten Antikörpern jeweils bestimmte Kombinationen von kanonischen Strukturklassen der CDRs bevorzugt gefunden (Lara-Ochoa *et al.*, 1996). Interessanterweise zeigen die Immunglobuline dabei eine Beschränkung hinsichtlich der Kombinationvielfalt. So weisen 85 % der insgesamt 381 von Vargas-Madrazo *et al.* (1995) analysierten Immunglobulin-Sequenzen eine Kombination der kanonischen Klassen auf, die nur einem Anteil von 3 % der theoretisch 300 möglichen Kombinationen entspricht.

Die Kombination der kanonischen Klassen 1-2-2-1-1 (H1, H2, L1, L2, L3), die gerade auch der Antikörper IN-1 aufweist, ist dabei charakteristisch für Antikörper, die insgesamt ein relativ breites Spektrum von Antigenen binden (zu etwa gleichen Anteilen Proteine, „Oberflächenantigene“, Nukleinsäuren und Haptene; Lara-Ochoa, 1996). Keiner der analysierten Antikörper mit dieser Kombination zeigt jedoch eine Antigenspezifität für Peptide oder Polysaccharide. Dies ist im Zusammenhang mit IN-1 insofern interessant, als zunächst ein glykosyliertes Epitop auf Nogo-A vermutet wurde (Fiedler, 1997).

Die Multispezifität, die sich im Fall von IN-1 aus der vorhandenen Kombination der CDR-Konformationen ergeben könnte, sowie die der Keimbahnsequenz entsprechende, noch nicht somatisch mutierte V<sub>L</sub>-Domäne des IgM Antikörpers IN-1 (Bandtlow *et al.*, 1996) werden allgemein als Merkmale für sogenannte „Physiologische Autoantikörper“ angesehen (Coutinho *et al.*, 1995; Asakura *et al.*, 1996). Für eine Reihe solcher natürlicher Autoantikörper (*Natural Autoantibodies*) ist eine Bindung an körpereigene Antigene im Bereich des ZNS, insbesondere in myelinisierten Regionen (Asakura *et al.*, 1996; Asakura *et al.*, 1998), aber auch eine Reaktivität gegenüber körpereigenen Serumproteinen, Oberflächenstrukturen und auch intrazellulären Antigenen beschrieben (Coutinho *et al.*, 1995).

Bei *Natural Autoantibodies* handelt es sich zumeist um Antikörper der Klassen IgM, IgG oder IgA als Produkte einer physiologischen (d. h. keiner pathologischen) Autoimmunreaktion in gesunden Individuen, die keiner Affinitätsmaturierung unterworfen werden (Coutinho *et al.*, 1995). Die Bindung körpereigener Antigene erfolgt dementsprechend mit niedriger Spezifität und Affinität und dient nach gegenwärtiger Einschätzung in erster Linie der Immunregulation (Terness und Opelz, 1998). Darüber hinaus werden jedoch auch Transporterfunktionen (z. B. für Cytokine; Hansen *et al.*, 1995) und die Vermittlung des Abbaus von geschädigten körpereigenen Proteinen und Zellen postuliert (Ando *et al.*, 1994). Interessanterweise bewirken die natürlichen IgM/ $\kappa$  Autoantikörper SCH94.03 und SCH79.08 durch ihre Bindung an das *Myelin Basic Protein* auf Oligodendrozyten in einem Tiermodell zur Multiplen Sklerose die Remyelinisierung von Axonen (Miller und Rodriguez, 1995; Asakura *et al.*, 1998). Eine Funktion physiologischer Autoantikörper bei der Regeneration von Gewebe aufgrund der Maskierung von körpereigenen Inhibitoren wie z. B. Nogo-A scheint daher ebenfalls denkbar.

Es stellt sich daher beinahe die Frage, ob der monoklonale Antikörper IN-1 ursprünglich überhaupt aufgrund der Immunisierung mit Myelinproteinen der Ratte erhalten wurde (Caroni und Schwab, 1988b), oder ob es sich dabei nicht um einen natürlichen Autoantikörper der Maus handelte, der z. B. bei Verletzungen von zentralnervösen Strukturen bei der Regulation von Plastizität und Konservierung eine Rolle spielt. Letzteres wird durch den Befund gestützt, daß es bisher trotz vielfacher Immunisierungsexperimente nur gelang, Antiseren zu entwickeln, die eine dem Antikörper IN-1 vergleichbare Aktivität aufwiesen (Chen *et al.*, 2000) und die möglicherweise lediglich weitere autoreaktive Antikörper darstellten. In der Praxis wird die Verabreichung von Ig-Fractionen zur Therapie von Multipler Sklerose bereits mit Erfolg an Patienten durchgeführt, wobei von den Autoren explizit auf den möglichen regulativen Effekt von darin enthaltenen natürlichen Autoantikörpern hingewiesen wurde (Miller und Rodriguez, 1995; Fazekas *et al.*, 1997). Als Konsequenz aus der starken Konservierung der Nogo-A-Sequenz über die Artgrenzen (siehe Einleitung) stellen entsprechende monoklonale Antikörper fast zwangsläufig Autoantikörper dar, so daß die Gewinnung von hochaffinen Bindeproteinen möglicherweise nur durch eine *In vitro*-Maturierung des Antikörpers zugänglich ist.

Über den Mechanismus der funktionellen Neutralisation des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A durch den Antikörper IN-1 ist wenig bekannt (siehe Einleitung). Die vorliegenden Ergebnisse erhellen jedoch Teilaspekte diese Problems. So konnte in Vorexperimenten für das rekombinante Nogo-A Fragment NiFr2 ein inhibitorischer Effekt auf das Wachstum von Zellen nachgewiesen werden, der durch das IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment bzw. seine Varianten neutralisierbar war (Prof. C. Bandtlow, persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, daß sowohl eine Determinante der inhibitorischen Aktivität, als auch das IN-1 Epitop auf dem durch Exon Nr. 3 kodierten Abschnitt von Nogo-A liegen.

Im Rahmen einer Diplomarbeit fand Horn (1998) durch Analyse der Erkennung proteolytischer Fragmente von NiFr1 im Western-Blot durch das IN-1(<sup>L96</sup>L) F<sub>ab</sub>-Fragment Hinweise auf die Lage des Epitops zwischen den Aminosäuren 620 bis 690 des Nogo-A Proteins. Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, daß der monoklonale Antikörper IN-1 im Western-Blot zwar intaktes Nogo-A bindet, nicht jedoch zwei carboxyterminale Fragmente, die einerseits die Aminosäuren 685 bis 702 und andererseits die Aminosäuren 709 bis 1163 umfassen (A. Huber und M. van der Haar, persönliche Mitteilung). Experimente, die mit Hilfe der optimierten Variante II.1.8 nicht nur die genauere Lokalisierung des Epitops, sondern auch die Orientierung von Nogo-A in der Membran von Oligodendrozyten ermöglichen, dürften vielversprechend sein.

Interessanterweise konnte mittlerweile auch für den zwischen den vermuteten Transmembran-Domänen gelegenen Abschnitt von Nogo-A, der von GrandPré *et al.* (2000) – entgegen zu der in dieser Arbeit verfolgten Hypothese – als extrazellulär angesehen und „Nogo-66“ genannt wird, eine inhibitorische Aktivität auf neuronales Wachstum nachgewiesen werden (Fournier *et al.*, 2001). Den Autoren gelang es weiterhin, einen ZNS-spezifischen, axonalen Rezeptor zu identifizieren, der Nogo-66 erkennt und dessen Entfernung von der Axon-Oberfläche (durch spezifische Abspaltung aller Membranproteine mit Glycosylphosphatidylinositol-Verankerung) die Aussprossung von Neuronen *in vitro* vermittelt. Welchen Effekt der Antikörper IN-1 auf die inhibitorische Aktivität von Nogo-66 hat, ist bislang unbekannt. Unabhängig von der Orientierung des gesamten Proteins in der Membran erscheint es daher möglich, daß Nogo-A über mehrere inhibitorisch aktive Regionen verfügt.

Die Vermutung, daß das vorherrschende inhibitorisch aktive Zentrum von Nogo-A und das Epitop von IN-1 strukturell weitgehend überlappen und der Mechanismus der Neutralisation durch den Antikörper daher auf einer Maskierung der Bindungsstelle für einen axonalen Rezeptor beruht (Fiedler, 1997), wird bereits durch die erfolgreichen *In vivo*-Experimente mit dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment gestützt (siehe Kapitel 3.1.3). Hierbei hatte die lokale Applikation des rekombinanten IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments eine anatomische Regeneration von durchtrennten Axonen im Rückenmark von Ratten ermöglicht (Broesamle *et al.*, 2000). Demnach spielt weder der F<sub>c</sub>-Teil noch die Fähigkeit des IgM Antikörpers zur Quervernetzung für die biologische Aktivität eine Rolle. Auch der Austausch der konstanten Domänen der Maus durch solche des Menschen im chimären IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment hatte weder *in vitro* noch *in vivo* einen negativen Effekt auf die Neutralisierung (Broesamle *et al.*, 2000), was die biologische Aktivität allein den variablen Domänen bzw. dem Paratop des Antikörpers IN-1 zuweist.

#### 4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit bildet die Grundlage für das Verständnis der molekularen Mechanismen axonaler Regenerationsvorgänge. Insbesondere die Bereitstellung von Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments mit verbesserter Affinität sowie von rekombinanten Fragmenten des Nogo-A Proteins in homogener löslicher Form sollten zur Identifizierung des IN-1 Epitopes und zur Aufklärung des Inhibitionsmechanismus beitragen. Für die proteinkristallographische Strukturaufklärung eines Komplexes aus beispielsweise dem optimierten II.1.8 F<sub>v</sub>-Fragment, welches ebenfalls als funktionelles Protein verfügbar ist (nicht gezeigt), und NiFr4 bestehen bereits günstige Voraussetzungen.

Die Erkenntnis, daß die V<sub>L</sub>-Domäne des Antikörpers IN-1 noch keiner somatischen Hypermutation unterworfen war, birgt nach wie vor Potential für eine weitergehende Affinitätsmaturierung mit der hier etablierten *In vitro*-Strategie. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung, z. B. im Zusammenhang mit Rückenmarksverletzungen, bietet das humanisierte II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment einen günstigen Ausgangspunkt. Sinnvollerweise sollte der nächste Schritt der Affinitätsmaturierung gegen ein gleichfalls menschliches Nogo-A Fragment erfolgen, dessen bakterielle Produktion seit kurzem etabliert ist (Hettich, 2001). Der Beibehaltung der Epitopspezifität gilt dabei besondere Beachtung.

Die fortlaufende Verbesserung von Tiermodellen für Rückenmarkstraumata hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der beigebrachten Verletzung, einer verminderten Narbenbildung und der Applikation potentieller Therapeutika tragen maßgeblich zur Erhöhung der Aussagekraft von *In vivo*-Experimenten zur neuronalen Regeneration bei. Die hier erzielte Optimierung des Fermentationsverfahrens zur bakteriellen Herstellung des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments in großer Menge erlaubt entsprechende Untersuchungen auch mit den verbesserten Varianten. Generell ist bei solchen Experimente nicht nur die anatomische Regeneration der Axone von Interesse, sondern insbesondere die Analyse zur Wiedererlangung von motorischen Funktionen. Für funktionelle Untersuchungen dieser Art steht mittlerweile ein breites Methodenspektrum zur Verfügung (Merkler *et al.*, 2001).

Nach erfolgreichem Abschluß solcher *In vivo*-Studien sollte eine klinische Erprobung von optimierten Antikörper-Fragmenten im Rahmen der Therapie von Rückenmarksläsionen in absehbarer Zeit möglich sein. Denkbar ist eine kombinierte Anwendung von Proteinen, die Inhibitoren wie Nogo-A neutralisieren, Effektoren, die das neuronale Wachstum stimulieren (Neurotrophinen), sowie Substanzen, die die Narbenbildung unterdrücken. Die Verwirklichung einer solchen Strategie im Zusammenhang mit anderen Ansätzen, wie z. B. der Implantierung von neuronalen Vorläuferzellen in geschädigte Bereiche des Nervensystems (Björklund und Lindvall, 2000), ist eine realistische Chance für die Therapie von Läsionen im ZNS des Menschen.



## 5 Zusammenfassung

Axone werden im ZNS von Wirbeltieren durch das Neuronale Inhibitorprotein Nogo-A aktiv am Aussprossen gehindert. Dies beschränkt die Plastizität des adulten ZNS, verhindert allerdings im Fall einer Läsion auch maßgeblich die neuronale Regeneration. Der monoklonale Antikörper IN-1 (IgM/ $\kappa$ ) neutralisiert die inhibitorische Wirkung von Nogo-A und ermöglicht so die axonale Regeneration im ZNS. In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Herstellung und Optimierung rekombinanter Fragmente des Antikörpers IN-1 sowie des neuronalen Inhibitors Nogo-A mittels Protein-Engineering einschließlich der Analyse ihrer Wechselwirkung entwickelt. Auf diese Weise wurden schließlich *in vitro* – im Gegensatz zu konventionellen Immunisierungsversuchen – Antikörper mit verbesserter Affinität und neutralisierender Aktivität erhalten.

Für den IN-1 Antikörper wurde zunächst die bakterielle Produktion eines chimären F<sub>ab</sub>-Fragmentes im Fermenter-Maßstab soweit verbessert, daß es in ausreichender Menge für Zellkultur- und Tierexperimente zur Verfügung stand. Hierzu wurde eine vektorvermittelte Komplementierung der chromosomalen *proBA*-Deletion des prolin-auxotrophen *E. coli* K12-Stamms JM83 realisiert. Diese ermöglichte die Nutzung des überlegenen Sekretionsverhaltens von JM83 bei der Fermentation in einem Minimalmedium und führte zur Stabilisierung des Expressionsvektors durch den zusätzlichen metabolischen Selektionsdruck. Das chimäre IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment, dessen Ausbeute mit diesem Verfahren im Vergleich zu vorherigen Experimenten vervierfacht wurde, wurde mittels IMAC gereinigt und für Regenerations-Experimente verwendet. Im Zusammenhang mit der Behandlung von Rückenmarksläsionen bei Ratten konnte mit dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment eine signifikante Regeneration von verletzten zentralnervösen Neuronen erreicht werden.

Auf der Grundlage des rekombinanten Wildtyp IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments wurde zudem die Reinigung mittels der Thiophilen Adsorptionschromatographie etabliert. Dabei wurde das F<sub>ab</sub>-Fragment unabhängig von einem Affinitätsanhängsel (His<sub>6</sub>- oder *Strep*-Tag) in einem Schritt als löslicher Heterodimer aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* isoliert. Insbesondere für eine eventuelle therapeutische Anwendung von optimierten Varianten des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments ist der Verzicht auf Affinitätsanhängsel vorteilhaft.

Die vermutlich extrazelluläre und inhibitorisch aktive Domäne von Nogo-A wurde als lösliches Protein in *E. coli* hergestellt und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Das erhaltene Fragment NiFr2 war inhibitorisch aktiv und bildete die Grundlage für die *In vitro*-Affinitätsmaturierung des Antikörpers IN-1. Durch Herstellung eines rekombinanten Nogo-A Fragments (NiFr4) mit einem *Strep*-Tag sowie einem His<sub>6</sub>-Tag an den beiden Termini, welches durch IMAC und Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt wurde, konnten Reinheit und Homogenität der Präparationen im Vergleich zu NiFr2 maßgeblich verbessert werden. Dies war die Grundlage für den erstmaligen Nachweis der

Antigen/Antikörper-Komplexbildung aus Nogo-A und dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie.

Bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit war es aufgrund der geringen Affinität von IN-1 gegenüber dem vermuteten Antigen nicht gelungen, die direkte Bindung des Antikörpers an natives oder rekombinantes Nogo-A mit immunchemischen Methoden nachzuweisen und damit auf molekularer Ebene zu begründen. Ausgehend von dem IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment wurde daher ein Verfahren zur Affinitätsmaturierung bezüglich Nogo-A etabliert. Durch wiederholte Zyklen von ortsgerichteter Zufallsmutagenese und Durchmusterung der resultierenden Molekülbibliothek mit Hilfe eines Filterstapel-Tests auf verbesserte Bindung von NiFr2 wurde die Mutante II.1.8 des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments erhalten. Das II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment weist im Vergleich zu IN-1 insgesamt fünf Aminosäure-Substitutionen innerhalb von CDR-L3 auf und zeigt nachweisbare Bindung an natives Nogo-A bzw. an seine bakteriell produzierten Fragmente im ELISA. Die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment und NiFr4 wurde durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie mit 1 µM bestimmt. Das Wildtyp IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment zeigte unter denselben Bedingungen eine achtfach schlechtere Affinität. Damit wurde erstmals mit immunchemischen Methoden demonstriert, daß es sich bei dem Produkt des Nogo-A-Gens um das Antigen des Antikörpers IN-1 handelt.

Im Gegensatz zum Wildtyp IN-1 wurden durch Verwendung des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments bei immunhistochemischen Experimenten myelinreiche Regionen im Hirn und Rückenmark der Ratte spezifisch angefärbt. Darüber hinaus zeigte das II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment in Zellkultur-Experimenten eine konzentrationsabhängige neutralisierende Aktivität gegenüber der inhibitorischen Wirkung von Nogo-A, die deutlich über der des IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragments lag. Damit wurde der Zusammenhang zwischen einer verbesserten proteinchemischen Bindung von Nogo-A durch das optimierte IN-1 F<sub>ab</sub>-Fragment und einer erhöhten neutralisierenden Aktivität gezeigt.

Für eine mögliche therapeutische Anwendung von Nogo-A-bindenden rekombinanten F<sub>ab</sub>-Fragmenten wurden die variablen Domänen des II.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragments humanisiert. Dazu wurden dessen CDRs auf die Gerüststruktur der variablen Domänen des humanen Anti-Thyroidperoxidase-Antikörpers TR1.9 übertragen. Das resultierende humII.1.8 F<sub>ab</sub>-Fragment wurde in *E. coli* produziert und mittels IMAC gereinigt. In ELISA-Experimenten wurde der Erhalt der Bindungsaktivität des humanisierten F<sub>ab</sub>-Fragments gegenüber dem rekombinanten Nogo-A Fragment NiFr2 nachgewiesen.

Schließlich wurde die bakterielle Produktion von neuartigen Fusionsproteinen aus einem F<sub>ab</sub>-Fragment und dem Enzym TEM1 β-Lactamase etabliert. Deren bifunktionelle Eigenschaften im Hinblick auf die Antigenbindung und die Reporteraktivität wurden durch ELISA sowie enzymkinetische Experimente nachgewiesen. Damit wurde eine Grundlage für die Verwendung ähnlicher Fusionsproteine für diagnostische oder auch therapeutische Anwendungen geschaffen.

## 6 Literatur

- Adib-Conquy, M., Gilbert, M., Christodoulou, C. und Avrameas, S. (1995) Bacterial secretion of the Fab fragment of a mouse monoclonal IgM that reacts with IgG variable regions. *Protein Eng.* 8, 859-863.
- Aigner, L., Arber, S., Kapfhammer, J. P., Laux, T., Schneider, C., Botteri, F., Brenner, H. R. und Caroni, P. (1995) Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* 83, 269-278.
- Appel, R. D., Bairoch, A. und Hochstrasser, D. F. (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19, 258-260.
- Ando, K., Kikugawa, K. und Beppu, M. (1994) Involvement of sialylated poly-N-acetyllactosaminyl sugar chains of band 3 glycoprotein on senescent erythrocytes in anti-band 3 autoantibody binding. *J. Biol. Chem.* 269, 19394-19398.
- Asakura, A., Miller, D. J., Pogulis, R. J., Pease, L. R. und Rodriguez, M. (1996) Oligodendrocyte-reactive O1, O4 and HNK-1 monoclonal antibodies are encoded by germline immunoglobulin genes. *Mol. Brain Res.* 34, 283-293.
- Asakura, A., Miller, D. J., Pease, L. R. und Rodriguez, M. (1998) Targeting of IgM $\kappa$  antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J. Neurosci.* 18, 7700-7708.
- Bachmann, B. J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* 36, 525-557.
- Baich, A., (1969) Proline synthesis in *Escherichia coli*. A proline inhibitable-glutamic acid kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 192, 462-467.
- Baich, A., (1971) The biosynthesis of proline in *Escherichia coli*, phosphate-dependent glutamate  $\gamma$ -semialdehyde dehydrogenase (NADP), the second enzyme in the pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 244, 129-134.
- Balbas, P., Soberon, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N. und Bolivar, F. (1986) Plasmid vector pBR322 and its special-purposes derivatives – a review. *Gene* 50, 3-40.
- Bandtlow, C. E., Zachleder, T. und Schwab, M. E. (1990) Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J. Neurosci.* 10, 3837-3848.
- Bandtlow, C., Schiweck, W., Tai, H. H., Schwab, M. E. und Skerra, A. (1996) The *Escherichia coli*-derived Fab fragment of the IgM/kappa antibody IN-1 recognizes and

- neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Eur. J. Biochem.* 241, 468-475.
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 411-421.
- Bendig, M. M. und Jones, T. (1996) Rodent to human antibodies by CDR grafting. In: "Antibody Engineering. A Practical Approach" McCafferty, J., Hoogenboom, H. R. und Chiswell, D. J. (Hrsg.), Oxford University Press. Oxford, NY, Tokio.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res.*, 28, 235-242.
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. und Horwitz, A. H. (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240, 1041-1043.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, R., Lee, S. M., Pope, H. S., Riordan, G. S. und Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- Birnboim, C. und Doly, J. (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Björklund, A. und Lindvall, O. (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* 3, 537-544.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. und Gotschlich, E. C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136, 175-179.
- Boulot, G., Eiselé, J.-L., Bentley, G. A., Bhat, T. N., Ward, E. S., Winter, G. und Poljak, R. J. (1990) Crystallisation and preliminary X-ray diffraction study of the bacterially expressed Fv from the monoclonal anti-lysozyme antibody D1.3 and of its complex with the antigen lysozyme. *J. Mol. Biol.* 213, 617-619.
- Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H. N., Gao, D. und Schwab, M. E. (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378, 498-501.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S. H., Lee, B. und Pastan, I. (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv-Fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7538-7542.
- Brosamle, C., Huber, A. B., Fiedler, M., Skerra, A. und Schwab, M. E. (2000) Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J. Neurosci.* 20, 8061-8068.

- Broome-Smith, J. K., Gnaneshan, S., Hunt, L. A., Mehraein-Ghomi, F., Hashemzadeh-Bonehi, L., Tadayyon, M. und Hennessey, E. S. (1994) Cleavable signal peptides are rarely found in bacterial cytoplasmic membrane proteins. *Mol. Membr. Biol.* 11, 3-8.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Butler, J. E. (2000) Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunosorbent assays. *Methods* 22, 4-23.
- Cabilly, S., Riggs, A. D., Pande, H., Shively, J. E., Holmes, W. E., Rey, M., Perry, L. J., Wetzel, R. und Heyneker, H. L. (1984) Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3273-3277.
- Caroni, P. und Schwab, M. E. (1988a) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties from neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol.* 106, 1281-1288.
- Caroni, P. und Schwab, M. E. (1988b) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1, 85-96.
- Carrier, T. A. und Keasling, J. D. (1999) Library of synthetic 5' secondary structures to manipulate mRNA stability in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 15, 58-64.
- Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M. D., Wong, W. L. T., Rowland, Kotts, C. E., Carver, M. E., Yang, M., Bourell, J. H., Shepard, H. M. und Henner, D. (1992) High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology* 10, 163-167.
- Casson, L. P. und Manser, T. (1995) Evaluation of loss and change of specificity resulting from random mutagenesis of an antibody V<sub>H</sub> region. *J. Immunol.* 155, 5647-5654.
- Chacko, S., Padlan, E. A., Portolano, S., McLachlan, S. M. und Rapoport, B. (1996) Structural studies of human autoantibodies. Crystal structure of a thyroid peroxidase autoantibody Fab. *J. Biol. Chem.* 271, 12191-12198.
- Chaisuksunt, V., Zhang, Y., Anderson, P. N., Campbell, G., Vaudano, E., Schachner, M. und Lieberman, A. R. (2000) Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-jun and growth-associated protein-43. *Neuroscience* 100, 87-108.
- Chen, D. F., Schneider, G. E., Martinou, J.-C., Tonegawa, S. (1997) Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 385, 434-349.

- Chen, E.Y. und Seeburg, P. H. (1985) Supercoil sequencing. A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4, 165-170.
- Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F. und Schwab, M. E. (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403, 434-439.
- Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M. (1976) Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127, 1550-1555.
- Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R. und Karplus, M. (1985) Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J. Mol. Biol.* 186, 651-63.
- Chothia, C. und Lesk, A. M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.
- Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Lavitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M. und Poljak, R. J. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. und Hsu, L. (1972) Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69, 2110-2114.
- Corchero, J. L. und Villaverde, A. (1997) Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 621-632.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. und Avrameas, S. (1995) Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 812-818.
- Curtis, S. K. und Cowden, R. R. (1980) Demonstration of sulfhydryl and disulfide groups by a fluorescent maleimide procedure. *Histochemistry* 68, 23-28.
- Daugherty, P. S., Chen, G., Olsen, M. J., Iverson, B. L. und Georgiou, G. (1998) Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng.* 11, 825-832.
- David, S. und Aguayo, A. J. (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214, 931-933.
- Davies, D. R. und Cohen, G. H. (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7-12.
- DeBellard, M. E., Tang, S., Mukhopadhyay, S., Shen, Y. und Filbin, M. T. (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 89-101.

- DeHaard, H. J., Van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., DeBruine, A. P., Arends, J. W. und Hoogenboom, H. R. (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage display library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high-affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* 274, 18218-18230.
- Deucht, A. H., Rushlow, K. E. und Smith, C. J. (1984) Analysis of the *Escherichia coli proBA* locus by DNA and protein sequencing. *Nucleic Acids Res.* 12, 6337-6355.
- Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M. E. und Friguier, B. (1996) Measuring antibody affinity in solution. In: "Antibody Engineering. A Practical Approach" McCafferty, J., Hoogenboom, H. R. und Chiswell, D. J. (Hrsg.), Oxford University Press. Oxford, NY, Tokio.
- Driessen, A. J. M., Fekkes, V. und van der Wolk, J. P. W. (1998) The Sec system. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1, 216-222.
- Dübel, S. und Kontermann, R. E. (2001) Recombinant Antibodies. In: Kontermann, R. und Dübel, S. (Hrsg.) „Antibody Engineering.“ Springer Verlag, Heidelberg.
- Engert, A., Martin, G., Pfreundschuh, M., Amlot, P., Hsu, S. M., Diehl, V. und Thorpe, P. (1990) Antitumor effects of ricin A chain immunotoxins prepared from intact antibodies and Fab' fragments on solid human Hodgkin's disease tumors in mice. *Cancer Res.* 50, 2929-2935
- Essen, L. O. und Skerra, A. (1994) The *de novo* design of an antibody combining site: Crystallographic analysis of the V<sub>L</sub> domain confirms the structural model. *J. Mol. Biol.* 238, 226-244.
- Fazekas, F. und Deisenhammer, F. (1997) Randomized placebo-controlled trial of monthly intravenous immunoglobulin therapy in relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Lancet* 349, 589-593.
- Fiedler, M. (1997) Protein-Engineering am Fab-Fragment des Antikörpers IN-1 und Untersuchungen zum Nachweis seiner Bindung an das Inhibitorprotein NI-250 aus Myelinscheiden des Rinderrückenmarks. Diplomarbeit. Technische Universität Darmstadt.
- Fiedler, M. und Skerra, A. (1999) Use of Thiophilic Adsorption Chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody Fab fragment without the need for an affinity tag. *Protein Expr. Purif.* 17, 421-427.
- Fiedler, M. und Skerra, A. (2001) Purification and characterisation of His-tagged antibody fragments. In: Kontermann, R. und Dübel, S. (Hrsg.) „Antibody Engineering.“ Springer Verlag, Heidelberg.

- Fling, S. P. und Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris-buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155, 83-88.
- Foote, J. und Winter, G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 224, 487-499.
- Fournier, A. E., GrandPré, T. und Strittmatter, S. M. (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341-346.
- Frey, D., Laux, D., Xu, L., Schneider, C. und Caroni, P. (2000) Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J. Cell Biol.* 26, 1443-1454.
- Geisselsoder, J., Witney, F. und Yuckenberg, P. (1987) Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis. *BioTechniques* 5, 786-791.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Glockshuber, R., Schmidt, T. und Plückthun, A. (1992) The disulfide bonds in antibody variable domains: Effects on stability, folding *in vitro*, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 1270-1279.
- Goldberg, J. L. und Barres, B. A. (2000) Nogo in nerve regeneration. *Nature* 403, 369-370.
- GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T. und Strittmatter, S. M. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature* 403, 439-444.
- Gresch, O. (1997) Gentechnische Herstellung eines bispezifischen (F<sub>ab</sub>)<sub>2</sub>-Fragments für die Zelloberflächenantigene CD16 und CD30. Diplomarbeit. Technische Universität Darmstadt.
- Griep, R. A., van Twisk, C., van der Wolf, J. M. und Schots, A. (1999) Fluobodies: green fluorescent single-chain Fv fusion proteins. *J. Immunol. Methods* 230, 121-130.
- Hanes, J. und Plückthun, A. (1997) *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4937-4942.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R. und Plückthun, A. (1998) Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14130-14135.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A. und Plückthun, A. (2000) Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature Biotechnology* 18, 1287-1292.



- Hansen, M. B., Svenson, M., Abell, K., Yasukawa, K., Diamant, M. und Bendtzen, K. (1995) Influence of Interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur. J. Immunol.* 25, 348-354.
- Harris, L. J., Larson, S. D., Hasel, K. W. und McPherson, A. (1997) Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36, 1581-1597.
- Hayden, M. S., Gilliland, L. K. und Ledbetter, J. A. (1997) Antibody engineering. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 201-212.
- He, M. und Taussig, M. J. (1997) Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res.* 25, 5132-5134.
- Hemminki, A., Niemi, S., Hoffrén, A.-M., Hakalahti, L., Söderlund, H. und Takkinen, K. (1998) Specificity improvement of a recombinant anti-testosterone Fab fragment by CDRIII mutagenesis and phage display selection. *Protein Eng.* 11, 311-319.
- Hettich, E. (2001) Struktur- und Funktionsanalyse an rekombinanten Fragmenten des humanen Neuronalen Inhibitorproteins hNogo-A. Diplomarbeit. Technische Universität München.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, R., Gentz, R. und Stüber, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology* 6, 1321-1325.
- Holliger, P., Prospero, T. und Winter, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibodies. *Proc. Natl. Sci. USA* 90, 6444-6448.
- Holliger, P. und Hoogenboom, H. R. (1998) Antibodies come back from the brink. *Nat. Biotechnol.* 16, 1015-1016.
- Hoogenboom, H. R. und Winter, G. (1992) By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J. Mol. Biol.* 227, 381-388.
- Hoogenboom, H. R. (1997) Designing and optimising library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *TIBTECH* 15, 62-70.
- Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W. und Roovers, R. C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20.
- Horn, C. (1998) Struktur- und Funktionsanalyse an rekombinanten Fragmenten des Neuronalen Inhibitorproteins 220. Diplomarbeit. Technische Universität Darmstadt.
- Horner, P. J. und Gage, F. H. (2000) Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963-970.

- Huang, W., Petrosino, J. F., Hirsch, M., Shenkin, P. S. und Palzkill, T. (1996) Amino acid sequence determinants of  $\beta$ -lactamase structure and activity. *J. Mol. Biol.* 258, 688-703.
- Huber, A., Demartis, S. und Neri, D. (1999) The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *J. Mol. Recognit.* 12, 198-216.
- Huber, A. und Schwab, M. E. (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol. Chem.* 381, 407-419.
- Iwai, H. und Plückthun, A. (1999) Circular  $\beta$ -lactamase: stability enhancement by cyclizing the backbone. *FEBS Lett.* 459, 166-172.
- Jackson, T., Morris, B. A., Martin, A. C. R., Lewis, D. F. V. und Sanders, P. G. (1992) Molecular modelling and site-directed mutagenesis on a bovine anti-testosterone monoclonal antibody. *Protein Eng.*, 5, 343-350.
- Jaffers, G. J., Fuller, T. C., Cosimi, A. B., Russel, P. S., Winn, H. J. und Colvin, R. B. (1986) Monoclonal antibody therapy. Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intensiv immunosuppression. *Transplantation* 41, 572-578.
- Janeway, C. A. und Traves, P. (1995) „Immunologie“ Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J.-M., Samama, J.-P. (1993) Crystal structure of *Escherichia coli* TEM1  $\beta$ -lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 16, 364-383.
- Jensen, K. F. (1993) The *Escherichia coli* K12 “wild-types” W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *J. Bacteriol.* 175, 3401-3407.
- Johnson, K. S. und Hawkins, R. E. (1996) Affinity maturation of antibodies using phage display. In: “Antibody Engineering. A Practical Approach.” McCafferty, J., Hoogenboom, H. R. und Chiswell, D. J. (Hrsg.), Oxford University Press. Oxford, NY, Tokio.
- Johnson, G. und Wu, T. T. (2001) Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Res.* 29, 205-206.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. und Foeller, C. (1991) “Sequences of proteins of immunological interest (5th edn)”. US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office.
- Kane, J. F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 494-500.
- Kapfhammer, J. P. (1997) Axon sprouting in the spinal cord: growth promoting and growth inhibitory mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl.)* 196, 417-426.

- Kapfhammer, J. P. und Schwab, M. E. (1994a) Increased expression of the growth-associated protein GAP-43 in the myelin-free rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 6, 403-411.
- Kapfhammer, J. P. und Schwab, M. E. (1994b) Inverse patterns of myelination and GAP-43 expression in the adult CNS: neurite growth inhibitors as regulators of neuronal plasticity? *J. Comp. Neurol.* 340, 194-206.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H. und Buchner, J. (1991) Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio/Technology* 9, 825-829.
- Kieke, M. C., Cho, B. K., Boder, E. T., Kranz, D. M. und Wittrup, K. D. (1997) Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng.* 10, 1303-1310.
- Knappik, A., Ge, S., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. und Virnekäs, B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.*, 296, 57-86.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- König, T. und Skerra, A. (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J. Immunol. Meth.* 218, 73-83.
- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J. und Goodman, C. S. (1993) The Semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.
- Kontermann, R. und Dübel, S. (Editoren) (2001) „Antibody Engineering“ Springer Verlag, Heidelberg.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. und Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Meth. Enzym.* 154, 367-382.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 329, 268-270.
- Ladner, R. C. (1996) Display and selection of proteins on genetic packages. In: Kay, B. K., Winter, J. und McCafferty J. (Hrsg.) “Phage display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual”, Academic Press, San Diego.
- Lara-Ochoa, F., Almagro, J. C., Vargas-Madrazo, E. und Conrad, M. (1996) Antibody-antigen recognition: A canonical structure paradigm. *J. Mol. Evol.* 43, 678-684.

- Li, G. L., Farooque, M., Holtz, A. und Olsson, Y. (1996) Increased expression of growth-associated protein 43 immunoreactivity in axons following compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1, 19-26.
- Lu, Y., Xiong, X., Helm, A., Kimani, K., Bragin, A. und Skach, W. R. (1998) Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator N-terminus transmembrane assembly. *J. Biol. Chem.* 273, 568-576.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A. und Mathur, E. J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.
- MacCallum, R. M., Martin, A., C., R. und Thornton, J. M. (1996) Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography. *J. Mol. Biol.* 262, 732-745.
- Mahan, M. J. und Csonka, L. N. (1983) Genetic analysis of the *proBA* genes of *Salmonella typhimurium*: Physical and genetic analyses of the cloned *proB*<sup>+</sup>*A*<sup>+</sup> genes of *Escherichia coli* and of a mutant allele that confers proline overproduction and enhanced osmotolerance. *J. Bacteriol.* 156, 1249-1262.
- Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.
- Manser, T., Wysocki, L. J., Margolies, M. N. und Gefter, M. L. (1987) Evolution of antibody variable region structure during the immune response. *Immunol. Rev.* 96, 141-162.
- Martin, A., C., R. (1996) Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 25, 130-133.
- Martineau, P., Jones, P. und Winter, G. (1998) Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 280, 117-127.
- McCafferty, J., Griffith, A. D., Winter, G. und Chiswell, D. J. (1990) Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- Merkler, D., Metz, G. A., Raineteau, O., Dietz, V., Schwab, M. E. und Fouad, K. (2001) Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J. Neurosci.* 21, 3665-3673.
- Michaelis, I. und Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49, 333-369.
- Miller, D. J. und Rodriguez, M. (1995) A monoclonal autoantibody that promotes central nervous system remyelination in a model of Multiple Sclerosis is a natural autoantibody encoded by germline immunoglobulin genes. *J. Immunol.* 154, 2460-2469.

- Missiakas, D. und Raina, S. (1997) Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179, 2465-2471.
- Morea, V., Lesk, A. M. und Tramontano, A. (2000) Antibody modelling: Implications for engineering and design. *Methods* 20, 267-279.
- Muller, B.H., Chevrier, D., Boulain, J.-C und Guesdon, J.-L. (1999) Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J. Immunol. Methods* 227, 177-185.
- Myszka, D. G. (1997) Kinetik analysis of macromolecules interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 50-57.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. und Schaechter, M. (1990) "Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach." Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hämäläinen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F. und Plückthun, A. (1997) BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelator NTA sensor chip. *Anal. Biochem.* 252, 217-228.
- O'Callaghan, C., A., Morris, A. Kirby, S. M. und Shingler, A. H. (1972) Novel method for detection of  $\beta$ -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1, 283-288.
- O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M. und Peck, K. (1992) Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Anal. Biochem.* 205, 132-136.
- Ogino, M., Tatum, A. H. und Latov, N. (1994) Affinity studies of human anti-MAG antibodies in neuropathy. *J. Immunol.* 52, 41-46.
- Pack, P. und Plückthun, A. (1992) Miniantibodies: Use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragment with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 1579-1584.
- Padlan, E. A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31, 169-217.
- Parham, P. (Editor) (1998) "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes" *Immunol. Rev.* Vol. 162.
- Perelson, A. S. (1989) Immune network theory. *Immunol. Rev.* 110, 5-36.
- Perez-Perez, J., Marquez, G., Barbero, J. L. und Gutierrez, J. (1994) Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 12, 178-180.
- Plückthun, A. (1992) Mono- and bivalent antibody fragments produced in *Escherichia coli*: engineering, folding and antigen binding. *Immunol. Rev.* 130, 151-188.

- Plückthun, A. und Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 178, 497-515.
- Porath, J., Maisano, F., and Belew, M. (1985) Thiophilic adsorption - a new method for protein fractionation. *FEBS Lett.* 185, 306-310.
- Porath, J., and Belew, M. (1987) 'Thiophilic' interaction and the selective adsorption of proteins. *TIBTECH* 5, 225-229.
- Portolando, S., McLachlan, S. M. und Rapoport, B. (1993) High affinity, thyroid-specific human autoantibodies displayed on the surface of filamentous phage use V genes similar to other autoantibodies. *J. Immunol.* 151, 2839-2851.
- Proba, K., Wörn, A., Honegger, A. und Plückthun, A. (1998) Antibody scFv fragments without disulphide bonds made by molecular evolution. *J. Mol. Biol.* 275, 245-253.
- Prinjha, R., Moore, S. E., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D. L. und Walsh, F. S. (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403, 383-384.
- Queen, C., Schneider, W. P., Selick, H. E., Payne, P. W., Landolfi, N. F., Duncan, J. F., Avdalovic, N. M., Levitt, M., Junghans, R. P. und Waldmann, T. A. (1989) A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033.
- Ramon y Cajal, S. (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. Hafner, New York, USA.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B. und Pastan, I. (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: Disulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotechnol.* 14, 1239-1245.
- Reiter, Y. und Pastan, I. (1998) Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol.* 16, 513-520.
- Rich, R. L. und Myszka, D. G. (2000) Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 13, 388-407.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. und Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. und Dübel, S. (2001) A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology* 19, 75-78.
- Rose, D. R., Strong, R. K., Margolies, M. N., Macolm, G. L. und Pestko, G. A. (1990) Crystal structure of the antigen-binding fragment of the murine anti arsonate monoclonal antibody 36-71 at 2.9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 338-342.

- Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R. und Chen, S. M. (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res.* 25, 4500-4504.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. Mullis, K. B. und Ehrlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Savio, T. und Schwab, M. E. (1990) Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4130-4133.
- Schatz, G. und Dobbenstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.
- Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C. und Marks, J. D. (1996) Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antigen binding site. *J. Mol. Biol.* 263, 551-567.
- Schiweck, W. and Skerra, A. (1995) Fermenter production of an artificial Fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallisation through constant domain shuffling. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 23, 561-565.
- Schiweck, W. und Skerra, A. (1997) The rational construction of an antibody against cystatin: Lessons from the crystal structure of an artificial Fab fragment. *J. Mol. Biol.* 268, 934-951.
- Schiweck, W., Buxbaum, B., Schätzlein, C., Neiss, H. G. und Skerra, A. (1997) Sequence analysis and bacterial production of the anti-c-myc antibody 9E10: the V<sub>H</sub> domain has an extended CDR-H3 and exhibits unusual solubility. *FEBS Lett.* 414, 33-38.
- Schiweck, W. (1998) "Konstruktion eines künstlichen Antikörpers durch Protein Design in Zyklen." Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt an Main.
- Schlehuber, S., Beste, G. and Skerra, A. (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J. Mol. Biol.* 297, 1105-1120.
- Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C. H., Queitsch, I. und Dübel, S. (2000) Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Meth.* 242, 101-114.
- Schmidt, R. F. (1987) „Grundriss der Neurophysiologie.“ Springer-Verlag, Berlin.

- Schmidt, A. M. (1998) „Untersuchungen zur Proteinfaltung durch Protein Design am Retinol-Bindungsprotein.“ Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Schmidt, T. G. M. und Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Prot. Eng.* 6, 109-122.
- Schmidt, T. G. M. (1994) „Generierung und Charakterisierung künstlicher Peptid-Streptavidinerkennung: Entwicklung eines C-terminalen Affinitätspeptids für den Nachweis und die Reinigung rekombinanter Proteine.“ Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/M.
- Schmidt, T. G. M. und Skerra, A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the “Strep Tag” and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr. A* 676, 337-345.
- Schmitt, A. B., Breuer, S., Voell, M., Schwaiger, F. W., Spitzer, C., Pech, K., Brook, G. A., Noth, J., Kreuzberg, G. W. und Nacimiento, W. (1999) GAP-43 (B-50) and C-Jun are up-regulated in axotomized neurons of Clarke's nucleus after spinal cord injury in the adult rat. *Neurobiol. Dis.* 6, 122-130.
- Schnell, L. und Schwab, M. E. (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343, 269-272.
- Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, Y. A. und Schwab, M. E. (1994) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367, 170-173.
- Schulze, R. A., Kontermann, R. E., Queitsch, I., Dübel, S. und Bautz, E. K. F. (1994) Thiophilic adsorption chromatography of recombinant single-chain antibody fragments. *Anal. Biochem.* 220, 212-214.
- Schwab, M. E. und Caroni, P. (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* 8, 2381-2393.
- Shawler, D. L., Bartholomew, R. M., Smith, L. M. und Dillman, R. O. (1985) Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J. Immunol.* 135, 1530-1535.
- Skerra, A. und Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Skerra, A. (1989) „Funktionelle Expression antigenbindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*.“ Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.



- Skerra, A. und Plückthun, A. (1991) Secretion and *in vivo* folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and *cis*-prolines. *Prot. Eng.* **4**, 971-979.
- Skerra, A., Dreher, M. L. and Winter, G. (1991) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: Specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal. Biochem.* **196**, 151-155.
- Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3551-3554.
- Skerra, A. (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 256-262.
- Skerra, A. (1994a) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* **141**, 79-84.
- Skerra, A. (1994b) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- So, K. F. und Aguayo, A. J. (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res.* **328**, 349-354.
- Sommer, I. und Schachner, M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 and O4) to oligodendrocyte cell surface: an immunological study in the central nervous system. *Dev. Biol.* **83**, 311-327.
- Spillmann, A. A., Amberger, V. R. und Schwab, M. E. (1997) High molecular weight protein of human central nervous system myelin inhibits neurite outgrowth: An effect which can be neutralized by the monoclonal antibody IN-1. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 549-555.
- Spillmann, A. A., Bandtlow, C. E., Lottspeich, F., Keller, F. und Schwab, M. E. (1998) Identification and characterisation of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *J. Biol. Chem.* **273**, 19283-19293.
- Stenström, C. M., Jin, H., Major, L. L., Tate, W. P. und Isaksson, L. A. (2001) Codon bias at the 3'-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*. *Gene* **263**, 273-284.
- Stevens, F. J., Salomon, A. und Schiffer, M. (1991) Bence Jones proteins: A powerful tool for the fundamental study of protein chemistry and pathophysiology. *Biochemistry* **30**, 6803-6805.
- Stüber, D. und Bujard, H., 1981. Organisation of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 167-171.
- Swartz, J. R. (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 195-201.

- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1995) A single residue in DNA polymerase of *Escherichia coli* polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6339-6343.
- Talmadge, K., Stahl, S. und Gilbert, W. (1980) Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3369-3373.
- Taylor, J., Pesheva, P. und Schachner, M. (1993) Influence of janusin and tenascin on growth cone behavior in vitro. *J. Neurosci. Res.* 35, 347-362.
- Tello, F. (1911) La influencia del neurotropismo en la regeneracion de los centros nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 9, 123-159.
- Terness, P. und Opelz, G. (1998) Natural anti-immunoglobulin autoantibodies: Irrelevant by-products or immunoregulatory molecules? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115, 270-277.
- Tessier-Lavigne, M. und Goodman, C. S. (2000) Regeneration in the Nogo Zone. *Science* 287, 813-814.
- Tomlinson, I. A., Walter, G., Jones, P. T., Dear, P. H., Sonnhammer, E. L. L. und Winter, G. (1996) The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256, 813-817.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-583.
- Vargas-Madrado, E., Lara-Ochoa, F. und Almagro, J. C. (1995) Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulins suggests strong geometrical restrictions associated to the mechanism of immune recognition. *J. Mol. Biol.* 254, 497-504.
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., MacCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J. und Johnson, K. S. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnology* 14, 309-314.
- Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. und Tempest, P. R. (1998) Human antibodies by design. *Nature Biotechnology* 16, 535-539.
- Venturi, M., Seifert, C. und Hunte, C. (2002) High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 315, 1-8.
- Viera, J. und Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.
- Viera, J. und Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153, 3-11.

- von Heijne, G (1996) Principles of membrane protein assembly and structure. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 66, 113-139.
- Voss, S. and Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.*, 10, 975-982.
- Wall, J., G. und Plückthun, A. (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 507-516.
- Wang, D., Liao, J., Mitra, D., Akolkar, P. N., Gruezo, F. und Kabat, E. A. (1991) The repertoire of antibodies to a single antigenic determinant. *Mol. Immunol.*, 28, 1386-1397.
- Webster, D. M., Henry, A. H. und Rees, A. R. (1994) Antibody-antigen interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 123-129.
- Winter, G. und Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-299.
- Winter, G. (1998) Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering. *FEBS Lett.* 430, 92-94.
- Xiang, J., Chen, Z., Delbaere, L. T. J. und Liu, E. (1993) Differences in antigen-binding affinity caused by single amino acid substitution in the variable region of the heavy chain. *Immunol. Cell Biol.* 71, 239-247.
- Yanisch-Perron, C., Viera, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC vectors. *Gene*, 33, 103-119.
- Yee, L. und Blanch, H. W. (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology* 10, 1550-1556.
- Zabriskie, D. W. und Arcuri, E. J. (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 706-717.
- Zahn, G., Skerra, A. und Höhne, W. (1999) Investigation of a tetracycline-regulated phage display system. *Protein Eng.* 12, 1031-1034.
- Zahn, G. (2000) "Herstellung, Charakterisierung und Selektion einer Phagenbibliothek am Beispiel der Selektion von Antikörperfragmenten gegen einen Prolylendopeptidase-Inhibitor." Dissertation. Humbolt Universität zu Berlin.

## 7 Abkürzungen

$A_x$	Absorption bei x nm
Amp	Ampicillin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
bla	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaar
Cam	Chloramphenicol
Cam <sup>r</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
C <sub>H1</sub>	erste Konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
Da	Dalton
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
$\epsilon_x$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
F <sub>ab</sub> -Fragment	Antigenbindendes Fragment aus den variablen und konstanten Domänen eines Antikörpers
F <sub>v</sub> -Fragment	Antigenbindendes Fragment aus den variablen Domänen eines Antikörpers
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
$k_{cat}$	Enzymatische Wechselzahl
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD <sub>550</sub>	optische Dichte bei 550 nm
ompA	<i>Outer Membrane Protein A</i> -Gen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
phoA	Alkalische Phosphatase-Gen
PNS	Peripheres Nervensystem
rpm	Runden per Minute
RT	Raumtemperatur
u	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
v/v	Volume per Volume
V <sub>H</sub>	Variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
V <sub>L</sub>	Variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
WT	Wildtyp
w/v	Weight per Volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8 Anhang

### 8.1 Berechnete molare Masse und vorhergesagter molarer Extinktionskoeffizient der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine

	M [kD] <sup>a</sup>	$\epsilon$ [cm M <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>
IN-1 F <sub>ab</sub> -Fragment <sup>c</sup>	47.970,22	76.840
IN-1 ( <sup>L32</sup> F) F <sub>ab</sub> -Fragment <sup>c</sup>	48.046,32	76.840
I.1.6 F <sub>ab</sub> -Fragment <sup>c</sup>	47.984,31	76.900
I.2.6 ( <sup>L96</sup> V) F <sub>ab</sub> -Fragment <sup>c</sup>	47.980,31	76.840
II.1.8 F <sub>ab</sub> -Fragment <sup>c</sup>	47.995,28	76.840
huII.1.8 F <sub>ab</sub> -Fragment <sup>c</sup>	48.716,13	78.120
IN-1 FP1 <sub>chimär</sub>	77.156,00	104.840
IN-1 FP1 <sub>maus</sub>	77.390,10	116.220
IN-1 FP2 <sub>chimär</sub>	77.072,00	104.840
D1.3 FP1 <sub>maus</sub>	77.820,60	111.100
D1.3 FP2 <sub>chimär</sub>	76.853,70	99.720
NiFr2	78.731,99	32.340
NiFr4	79.915,21	32.100

<sup>a</sup> Berechnet mit PEPTIDESORT (ohne Berücksichtigung von Disulfidbrücken). <sup>b</sup> Berechnet mit PEPTIDESORT nach Gill und von Hippel (1989). <sup>c</sup> F<sub>ab</sub>-Fragmente jeweils mit humanen konstanten Domänen und Hexahistidin-Affinitätspeptid.

## 8.2 Aminosäure- und DNA-Sequenzen der variablen Domänen des Antikörpers IN-1

### V<sub>L</sub>-Domäne (Kabat-ID: 029919):

```

1      GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGGCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACC
      AspIleGluLeuThrGlnSerProAlaIleMetAlaAlaSerValGlyGluThrValThr

21     ATCACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTTACGGTGCTTTAAATTGGTATCAGCGGAAACAG
      IleThrCysGlyAlaSerGluAsnIleTyrGlyAlaLeuAsnTrpTyrGlnArgLysGln
      ===== CDR-L1 =====

41     GGAAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAACCAACTTGGCAGATGGCATGTCATCG
      GlyLysSerProGlnLeuLeuIleTyrGlyAlaThrAsnLeuAlaAspGlyMetSerSer
      ===== CDR-L2 =====

61     AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCTCTCAAGATCAGTAGCCTGCATCCT
      ArgPheSerGlySerGlySerGlyArgGlnTyrSerLeuLysIleSerSerLeuHisPro

81     GACGATGTTGCAACGTATTACTGTCAAAATGTGTTAAGTACTCCTCGGACGTTCCGGAGCT
      AspAspValAlaThrTyrTyrCysGlnAsnValLeuSerThrProArgThrPheGlyAla
      ===== CDR-L3 =====

101    GGGACCAAGCTCGAGATCAAA
      GlyThrLysLeuGluIleLys

```

### V<sub>H</sub>-Domäne (Kabat-ID: 029920):

```

1      GAAGTTAAACTGCATGAGTCAGGGCCTGGGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGATA
      GluValLysLeuHisGluSerGlyProGlyLeuValArgProGlyThrSerValLysIle

21     TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTAACTACTGGCTAGGTTGGGTAAAGCAGAGG
      SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrAsnTyrTrpLeuGlyTrpValLysGlnArg
      ===== CDR-H1 =====

41     CCTGGACATGGACTTGAGTGGATTGGAGATATTTACCCTGGAGGTGGTTATACTAACTAC
      ProGlyHisGlyLeuGluTrpIleGlyAspIleTyrProGlyGlyGlyTyrThrAsnTyr
      ===== CDR-H2 =====

61     AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACTGCCTAC
      AsnGluLysPheLysGlyLysAlaThrLeuThrAlaAspThrSerSerSerThrAlaTyr
      =====

81     ATGCAGCTCAGTAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGATTTTAC
      MetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrPheCysAlaArgPheTyr
      =====

101    TACGGTAGTAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCC
      TyrGlySerSerTyrTrpTyrPheAspValTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSer
      ===== CDR-H3 =====

121    TCA
      Ser

```

### 8.3 Aminosäure- und DNA-Sequenz des rekombinanten Nogo-A Fragments NiFr2

Numerierung der Aminosäuren für das auf pASK111-NiFr2 kodierte und prozessierte Protein mit carboxyterminalem *Strep*-Tag:

```

1      TCTTTTAAAGAACATGGATACCTTGGTAACTTATCAGCAGTGTTCATCCTCAGAAGGAACA
      SerPheLysGluHisGlyTyrLeuGlyAsnLeuSerAlaValSerSerSerGluGlyThr
21     ATTGAAGAACTTTAAATGAAGCTTCTAAAGAGTTGCCAGAGAGGGCAACAAATCCATTT
      IleGluGluThrLeuAsnGluAlaSerLysGluLeuProGluArgAlaThrAsnProphe
41     GTAAATAGAGATTTAGCAGAATTTTCAGAATTAGAATATTCAGAAATGGGATCATCTTTT
      ValAsnArgAspLeuAlaGluPheSerGluLeuGluTyrSerGluMetGlySerSerPhe
61     AAAGGCTCCCCAAAAGGAGAGTCAGCCATATTAGTAGAAAACACTAAGGAAGAAGTAATT
      LysGlySerProLysGlyGluSerAlaIleLeuValGluAsnThrLysGluGluValIle
81     GTGAGGAGTAAAGACAAAGAGGATTTAGTTTGTAGTGCAGCCCTTCACAGTCCACAAGAA
      ValArgSerLysAspLysGluAspLeuValCysSerAlaAlaLeuHisSerProGlnGlu
101    TCACCTGTGGGTAAAGAAGACAGAGTTGTGTCTCCAGAAAAGACAATGGACATTTTTAAT
      SerProValGlyLysGluAspArgValValSerProGluLysThrMetAspIlePheAsn
121    GAAATGCAGATGTCAGTAGTAGCACCTGTGAGGGAAGAGTATGCAGACTTTAAGCCATTT
      GluMetGlnMetSerValValAlaProValArgGluGluTyrAlaAspPheLysProphe
141    GAACAAGCATGGGAAGTGAAAGATACTTATGAGGGAAGTAGGGATGTGCTGGCTGCTAGA
      GluGlnAlaTrpGluValLysAspThrTyrGluGlySerArgAspValLeuAlaAlaArg
161    GCTAATGTGGAAAGTAAAGTGGACAGAAAATGCTTGGAAAGATAGCCTGGAGCAAAAAAGT
      AlaAsnValGluSerLysValAspArgLysCysLeuGluAspSerLeuGluGlnLysSer
181    CTTGGGAAGGATAGTGAAGGCAGAAATGAGGATGCTTCTTTCCCAGTACCCCAGAACCT
      LeuGlyLysAspSerGluGlyArgAsnGluAspAlaSerPheProSerThrProGluPro
201    GTGAAGGACAGCTCCAGAGCATATATTACCTGTGCTTCCCTTTACCTCAGCAACCGAAAGC
      ValLysAspSerSerArgAlaTyrIleThrCysAlaSerPheThrSerAlaThrGluSer
221    ACCACAGCAAACACTTTCCCTTTGTTAGAAGATCATACTTCAGAAAATAAAACAGATGAA
      ThrThrAlaAsnThrPheProLeuLeuGluAspHisThrSerGluAsnLysThrAspGlu
241    AAAAAATAGAAGAAAGGAAGGCCCAAATTATAACAGAGAAGACTAGCCCCAAAACGTCA
      LysLysIleGluGluArgLysAlaGlnIleIleThrGluLysThrSerProLysThrSer
261    AATCCTTTCCTTGTAGCAGTACAGGATTCTGAGGCAGATTATGTTACAACAGATACCTTA
      AsnProPheLeuValAlaValGlnAspSerGluAlaAspTyrValThrThrAspThrLeu
281    TCAAAGGTGACTGAGGCAGCAGTGTCAAACATGCCTGAAGGTCTGACGCCAGATTTAGTT
      SerLysValThrGluAlaAlaValSerAsnMetProGluGlyLeuThrProAspLeuVal
301    CAGGAAGCATGTGAAAGTGAAC TGAATGAAGCCACAGGTACAAAGATTGCTTATGAAACA
      GlnGluAlaCysGluSerGluLeuAsnGluAlaThrGlyThrLysIleAlaTyrGluThr
321    AAAGTGGACTTGGTCCAAACATCAGAAGCTATACAAGAATCACTTTACCCACAGCACAG
      LysValAspLeuValGlnThrSerGluAlaIleGlnGluSerLeuTyrProThrAlaGln
341    CTTTGCCCATCATTTGAGGAAGCTGAAGCAACTCCGTCACCAGTTTTGCCTGATATTGTT
      LeuCysProSerPheGluGluAlaGluAlaThrProSerProValLeuProAspIleVal

```



361 ATGGAAGCACCATTAAATTCTCTCCTTCCAAGCGCTGGTGCTTCTGTAGTGCAGCCCAGT  
MetGluAlaProLeuAsnSerLeuLeuProSerAlaGlyAlaSerValValGlnProSer

381 GTATCCCCACTGGAAGCACCTCCTCCAGTTAGTTATGACAGTATAAAGCTTGAGCCTGAA  
ValSerProLeuGluAlaProProProValSerTyrAspSerIleLysLeuGluProGlu

401 AACCCCCACCATATGAAGAAGCCATGAATGTAGCACTAAAAGCTTTGGGAACAAAGGAA  
AsnProProProTyrGluGluAlaMetAsnValAlaLeuLysAlaLeuGlyThrLysGlu

421 GGAATAAAAGAGCCTGAAAGTTTTAATGCAGCTGTTTCAGGAAACAGAAGCTCCTTATATA  
GlyIleLysGluProGluSerPheAsnAlaAlaValGlnGluThrGluAlaProTyrIle

441 TCCATTGCGTGTGATTTAATTAAGAAACAAAGCTCTCCACTGAGCCAAGTCCAGATTTTC  
SerIleAlaCysAspLeuIleLysGluThrLysLeuSerThrGluProSerProAspPhe

461 TCTAATTATTTCAGAAATAGCAAAATTCGAGAAGTCGGTGCCCGAACACGCTGAGCTAGTG  
SerAsnTyrSerGluIleAlaLysPheGluLysSerValProGluHisAlaGluLeuVal

481 GAGGATTCCTCACCTGAATCTGAACCAGTTGACTTATTTAGTGATGATTTCGATTCTCGAA  
GluAspSerSerProGluSerGluProValAspLeuPheSerAspAspSerIleProGlu

501 GTCCACAAAACACAAGAGGAGGCTGTGATGCTCATGAAGGAGAGTCTCACTGAAGTGTCT  
ValProGlnThrGlnGluGluAlaValMetLeuMetLysGluSerLeuThrGluValSer

521 GAGACAGTAGCCCAGCACAAAGAGGAGAGACTTAGTGCCTCACCTCAGGAGCTAGGAAAG  
GluThrValAlaGlnHisLysGluGluArgLeuSerAlaSerProGlnGluLeuGlyLys

541 CCATATTTAGAGTCTTTTCAGCCCAATTTACATAGTACAAAAGATGCTGCATCTAATGAC  
ProTyrLeuGluSerPheGlnProAsnLeuHisSerThrLysAspAlaAlaSerAsnAsp

561 ATTCCAACATTGACCAAAAAGGAGAAAATTTCTTTGCAAATGGAAGAGTTTAATACTGCA  
IleProThrLeuThrLysLysGluLysIleSerLeuGlnMetGluGluPheAsnThrAla

581 ATTTATTCAAATGATGACTTACTTTCTTCTAAGGAAGACAAAATAAAAGAAAGTGAAACA  
IleTyrSerAsnAspAspLeuLeuSerSerLysGluAspLysIleLysGluSerGluThr

601 TTTTCAGATTCATCTCCGATTGAGATAATAGATGAATTTCCACGTTTGTCTAGTGCTAAA  
PheSerAspSerSerProIleGluIleIleAspGluPheProThrPheValSerAlaLys

621 GATGATTCTCCTAAATTAGCCAAGGAGTACACTGATCTAGAAGTATCCGACAAAAGTGAA  
AspAspSerProLysLeuAlaLysGluTyrThrAspLeuGluValSerAspLysSerGlu

641 ATTGCTAATATCCAAAGCGGGGCAGATTCATTGCCTTGCTTAGAATTGCCCTGTGACCTT  
IleAlaAsnIleGlnSerGlyAlaAspSerLeuProCysLeuGluLeuProCysAspLeu

661 TCTTTCAAGAATATATATCCTAAAGATGAAGTACATGTTTCAGATGAATTCCTCCGAAAAT  
SerPheLysAsnIleTyrProLysAspGluValHisValSerAspGluPheSerGluAsn

681 AGGTCAGTGTATCTAAGGCATCCATATCGCCTTCAAATGTCTCTGCTTTGGAACCTCAG  
ArgSerSerValSerLysAlaSerIleSerProSerAsnValSerAlaLeuGluProGln

701 ACAGAAATGGGCAGCATAGTTAAAagcGCTTGGCGTCACCCGCAGTTCGGTGGT  
ThrGluMetGlySerIleValLysSerAlaTrpArgHisProGlnPheGlyGly  
===== Strep-Tag =====

### 8.4 Durch Affinitätsmaturierung erhaltene Varianten der V<sub>L</sub>-Domäne von IN-1

#### 1. Maturierungsrunde:

Gezeigt sind die DNA- und Primärsequenzen der erhaltenen Varianten im Vergleich zum Wildtyp. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme, die für die Insertion des mutierten Genfragments in pASK106-IN1 verwendet wurden, sowie die Lage der PhoA-Signalsequenz zur Sekretion der Polypeptidkette in das Periplasma von *E. coli* sind angegeben. Die Reste der V<sub>L</sub>-Domäne von IN-1 sind numeriert und die CDRs markiert.

		SstI	
WT	GAAAATAAAGTGAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGGCTGCATCTGTGGGA		
	ValLysGlnSerThrIleAlaLeuAlaLeuLeuProLeuLeuPheThrProValThrLysAlaAspIleGluLeuThrGlnSerProAlaIleMetAlaAlaSerValGly		
	=====PhoA=====	1	16
I.1.4	.....T.....		
	.....Ser.....		
I.1.6	.....		
I.1.11	.....T.....		
	.....Ser.....		
I.1.16	.....		
I.2.2	.....T.....		
	.....Ser.....		
I.2.4	.....		
I.2.5	.....		
I.2.6	.....		
I.2.8	.....A.....		
	.....Lys.....		
I.2.9	.....		
I.3.10	.....T.....		
	.....Ser.....		
I.3.7	.....T.....T..		
	.....Ser.....Val		
I.4.4	.....T.....		
	.....Ser.....		
WT	GAAACTGTCACCATCACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTTACGGTGCTTTAAATGGTATCAGCGGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAACCAACTGGCAGAT		
	GluThrValThrIleThrCysGlyAlaSerGluAsnIleTyrGlyAlaLeuAsnTrpTyrGlnArgLysGlnGlyLysSerProGlnLeuLeuIleTyrGlyAlaThrAsnLeuAlaAsp		
	17	CDR-L1	56
I.1.4	.....C.....		
	.....Thr.....		
I.1.6	.....		
I.1.11	.....		
I.1.16	.....		
I.2.2	.....		
I.2.4	.....		
I.2.5	.....		
I.2.6	.....		
I.2.8	.....		
I.2.9	.....		
I.2.10	.....A.....		
	.....Ser.....		
I.3.7	.....		
I.4.4	.....		



**2. Maturationrunde:**

Gezeigt sind die DNA- und Primärsequenzen der erhaltenen Varianten im Vergleich zum Wildtyp und der Variante I.2.6<sup>(196V)</sup>. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme, die für die Insertion des mutierten Genfragments in pASK106-IN1 verwendet wurden, sowie die Lage der PhoA-Signalsequenz zur Sekretion der Polypeptidkette in das Periplasma von *E. coli* sind angegeben. Die Reste der V<sub>L</sub>-Domäne von IN-1 sind nummeriert und die CDRs markiert.

	SstI	
	GAAAATAAAGTGAACAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGGCTGCATCTGTGGGA	
WT	VaLLysGlnSerThrIleAlaLeuAlaLeuLeuProLeuLeuPheThrProValThrLysAlaAspIleGluLeuThrGlnSerProAlaIleMetAlaAlaSerValGly	
	=====PhoA===== 1	16
I.2.6 (C96V)	.....	
II.1.1	.....	
II.1.2	.....T.....	
	Ser	
II.1.3	.....	
II.1.4	.....	
II.1.5	.....	
II.1.6	.....	
II.1.7	.....	
II.1.8	.....	
II.1.9	.....	
II.1.10	.....	
II.1.12	.....T.....	
	Ser	
II.1.13	.....	
II.1.15	.....	
II.2.1	.....	
II.2.2	.....	
II.2.3	.....	



*XhoI*

GGCATGTCATCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCTCTCAAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTATTACTGTCAAATGTGTTAAGTACTCCTCGGACGTTCCGGAGCTGGGACCAAGCTCGAG

WT GlyMetSerSerArgPheSerGlySerGlySerGlyArgGlnTyrSerLeuLysIleSerSerLeuHisProAspAspValAlaThrTyrTyrCys GlnAsnValLeuSerThrProArgThr PheGlyAlaGlyThrLysLeuGlu

**57** **CDR-L3** **107**

I.2.6(C96V).....C.GGTG..GGTT  
ArgVal Val

II.1.1.....CGTAAGC.GGTG..GGTT  
ArgLysArgVal Val

II.1.2.....TGTGGGC.GGTG..GGTT  
CysGlyArgVal Val

II.1.3.....A..AAGC.GGTG..GGTT  
MetLysArgVal Val

II.1.4.....A.TACGC.GGTG..GGTT  
IleThrArgVal Val

II.1.5.....AGTC.GGTG..GGTT  
ValSerArgVal Val

II.1.6.....AC.AAGC.GGTG..GGTT  
ThrLysArgVal Val

II.1.7.....C..AAGC.GGTG..GGTT  
LeuLysArgVal Val

II.1.8.....A.TAATC.GGTG..GGTT  
IleAsnArgVal Val

II.1.9.....C..AAGC.GGTG..GGTT  
LeuLysArgVal Val

II.1.10.....AAGAAGC.GGTG..GGTT  
LysLysArgVal Val

II.1.12.....A.TCAGC.GGTG..GGTT  
IleGlnArgVal Val

II.1.13.....AC.GGTC.GGTG..GGTT  
ThrGlyArgVal Val

II.1.15.....TG.AGGC.GGTG..GGTT  
TrpArgArgVal Val

II.2.1.....T.T.GGC.GGTG..GGTT  
PheTrpArgVal Val

II.2.2.....ACTC.GC.GGTG..GGTT  
ThrLeuArgVal Val

II.2.3.....AAT.GGC.GGTG..GGTT  
AsnTrpArgVal Val

## **Danksagung**

Prof. Dr. A. Skerra danke ich für die Möglichkeit unter seiner Ägide meine Doktorarbeit anzufertigen. Sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft haben mich auf meinem Weg zum wissenschaftlichen Arbeiten ein entscheidendes Stück vorangebracht.

Ich danke allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München sowie der Abteilung Proteinchemie der Technischen Universität Darmstadt für Ihre Kollegialität und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinen langjährigen Mitstreitern Martin Schlapschy, Steffen Schlehner und Martin Vogt für die gemeinsame Zeit inner- und außerhalb des Labors!

Bei Hilke Zander bedanke ich mich für ihre Hilfe bei den histologischen Experimenten sowie bei Dr. F. H. Winkler für die massenspektroskopischen Analysen. Oliver Gresch (Köln) danke ich für die Versorgung mit Artikeln aus exotischen Fachzeitschriften.

Carsten Horn, Karsten Klage, Jan-Peter Meyer und Marc Preuß bin ich dankbar für die wissenschaftlichen Beiträge, die im Rahmen einer Diplomarbeit oder eines Praktikums zu dieser Arbeit geleistet wurden.

Prof. Dr. R. Rudolph und den Mitarbeitern der Scil Proteins GmbH danke ich für die moralische Unterstützung in der Endphase der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit.

Besonders danke ich meiner Jasmin, die mich während meiner Zeit als Doktorand mit dem Labor und dem IN-1 Projekt teilen mußte, für ihre Geduld und liebevolle Unterstützung.

## **Lebenslauf**

Name: Markus Fiedler  
Geburtsdatum: 28. Juni 1970  
Geburtsort: Hannover

## **Schulausbildung**

1977 - 1983 Besuch von Grundschulen in Salvador/Brasilien, Laatzen/Hannover, Oldenburg (Oldb.), von 1981-1983 „Orientierungsstufe“ in Oldenburg (Oldb.)  
1983 - 1984 Altes Gymnasium Oldenburg in Oldenburg (Oldb.)  
1984 - 1987 Instituto Aleman „Carlos Anwandter“ in Valdivia/Chile  
1987 - 1990 Altes Gymnasium Oldenburg in Oldenburg (Oldb.)  
Abschluß: Abitur  
1990 - 1991 Zivildienst in der Kindertagesstätte der Arbeiterwohlfahrt in Oldenburg (Oldb.)

## **Akademischer Werdegang**

Oktober 1991 Aufnahme des Biologiestudiums an der TH Darmstadt  
Oktober 1994 - Januar 1995 Auslandspraktikum am „Instituto de Bioquímica“ der Universidad Austral de Chile in Valdivia/Chile  
bis März 1997 Beendigung des Studiums, Diplomhauptprüfung (Hauptfächer: Zoologie, Biochemie; Nebenfächer: Immunologie, Organische Chemie) und Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Skerra  
Abschluß: Diplom-Biologe  
April 1997 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. A. Skerra am Institut für Biochemie der TH Darmstadt  
Januar 1999 - Juni 2001 Fortführung der Doktorarbeit bei Prof. Dr. A. Skerra am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München  
ab Juli 2001 wissenschaftlicher Projektleiter bei Scil Proteins GmbH in Halle/Saale



## Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Fiedler, M. und Skerra, A. (1999) Use of thiophilic adsorption chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody F(ab) fragment without the need for an affinity tag. *Protein Expr. Purif.* 17, 421-427.

Fiedler, M. und Skerra, A. (2001) Purification and characterisation of His-tagged antibody fragments. In: R. Kontermann and S. Dübel (Eds.) "The Antibody Engineering Lab Manual." Springer-Verlag, Heidelberg, New York.

Fiedler, M. und Skerra, A. (2001) proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene* 274, 111-118.

Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M. E. und Skerra, A. (2002) An engineered IN-1 F<sub>ab</sub> fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng.* 15, 931-941.

Kramer, K., Fiedler, M., Skerra, A. und Hock, B. (2002) A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of F(ab) fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability. *Biosens. Bioelectron.* 17, 305-313.

Broesamle, C., Huber, A. B., Fiedler, M., Skerra, A. und Schwab M. E. (2001) Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J. Neurosci.* 20, 8061-8068.

## **Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit in der Abteilung Proteinchemie der Technischen Universität Darmstadt bzw. am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. A. Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 4 Abs. 5 (Promotionsordnung) angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Markus Fiedler

Halle an der Saale, 15. Nov. 2002