

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Zellbiologie

**Optimierung eines Expressionssystems zur
Hochzell-dichtefermentation
von Maus- und Kaninchen-Antikörperfragmenten**

Julia Charlotte Wiebe

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 (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

Vorsitzende: Univ.-Prof. Angelika Schnieke, Ph.D. (Univ. of Edinburgh/UK)

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Bertold Hock, em
2. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra
3. Priv.-Doz. Dr. Karl Kramer

Die Dissertation wurde am 16.10.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.02. 2008 angenommen.

1	Summary	IX
2	Zusammenfassung	XI
3	Einleitung	1
3.1	Antikörper, Antikörperfragmente und alternative Proteinstrukturen	1
3.1.1	Rekombinante Antikörper in der Umweltanalytik	5
3.1.2	Kaninchen-Antikörper	6
3.1.3	Aufbau der Kaninchen-Immunglobuline	8
3.1.3.1	Die schwere Immunglobulinkette	8
3.1.3.2	Die leichte Immunglobulinkette	10
3.1.4	Die B-Zell-Reifung	11
3.2	Die Proteinsekretion in das Periplasma	14
3.2.1	Der Sec-Translokationsweg	15
3.2.2	Der TAT-Translokationsweg	16
3.3	Die Faltung der Immunglobulinketten.....	17
3.3.1	Die Bildung von Disulfidbrücken und Einschlusskörpern.....	17
3.3.2	Die Faltungshelferproteine.....	18
3.4	Hochzellichtefermentation	20
3.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
4	Material und Methoden	24
4.1	Material.....	24
4.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	24
4.1.2	Oligodesoxynukleotide	26
4.1.3	Enzyme und Proteine	30
4.1.4	Chemikalien	30
4.1.5	Standards und Kits	33
4.1.6	Geräte	34
4.1.7	Sonstige Materialien.....	35
4.1.8	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	36
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	44
4.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen	44
4.2.2	Transformation und Elektroporation von <i>E. coli</i>	44
4.2.2.1	Chemisch kompetente Zellen	44
4.2.2.2	Elektrokompetente Zellen	45

4.2.3	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	46
4.2.3.1	Präparation chromosomaler DNA.....	46
4.2.3.2	Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA.....	46
4.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	46
4.2.4	<i>In vitro</i> Modifizierung von DNA.....	47
4.2.4.1	Ortsspezifische Mutagenese.....	47
4.2.4.2	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	47
4.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	47
4.2.4.4	Dephosphorylierung von DNA.....	48
4.2.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	49
4.2.4.6	mRNA-Isolierung aus Blut.....	49
4.2.4.7	Reverse Transkription.....	49
4.3	Gentechnische Methoden.....	50
4.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	50
4.3.1.1	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben.....	50
4.3.1.2	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter.....	51
4.3.1.3	Berechnung der Wachstumsrate und Glukosezufuhr.....	53
4.3.1.4	Nachweis von Glukose und Acetat.....	54
4.3.2	Proteinchemische Methoden.....	55
4.3.2.1	Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	55
4.3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
4.3.2.3	Konzentrierung von Proteinen.....	56
4.3.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	57
4.3.3	Immunochemische Methoden.....	57
4.3.3.1	Western-Blot.....	57
4.3.3.2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	58
4.4	Computerprogramme und Datenbanken.....	59
5	Ergebnisse.....	60
5.1	Bakterielle Produktion und Reinigung des murinen Antikörpers K411B.....	60
5.1.1	Expression des murinen Antikörpers K411B, inseriert in pASK85-K411B.....	60
5.1.2	Konstruktion des Expressionsvektors pASK85-pro-K411B.....	63
5.1.3	Expression des Antikörper-Fragments K411B inseriert in pASK85-pro-K411B.....	65
5.1.3.1	Expression im Schüttelkolben und im Fermenter.....	65
5.1.3.2	Reinigung und Analyse des Antikörpers K411B.....	66

5.2	Kaninchen-spezifische Expressionsvektoren und Phagemide	70
5.2.1	Bestandteile der Kaninchen-spezifischen Klonierungsstelle	70
5.2.2	Konstruktion der Phagemide pASK85Rab-p3 und pASK111Rab-p3	73
5.2.3	Konstruktion und Expression des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-K411B	75
5.2.3.1	Konstruktion des Phagemids pASK111Rab-p3-K411B	76
5.2.3.2	Konstruktion des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-K411B	77
5.2.3.3	Expression des Antikörpers K411B inseriert in pASK85Rab-pro-K411B.....	79
5.2.3.4	Reinigung und Analyse des Antikörpers K411B	80
5.2.4	Konstruktion des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-WR13	83
5.2.4.1	Konstruktion der Phagemide pASK111Rab-p3-WR2, 5 und 13	83
5.2.4.2	Konstruktion des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-WR13	86
5.2.5	Koexpression des Kaninchen-AK mit Faltungshelferproteinen	88
5.2.5.1	Expression der Faltungshelferproteine kodiert auf pTUM4	89
5.2.5.2	Koexpression in Schüttelkolben und Fermenter	90
5.2.5.3	Reinigung und Nachweis des Kaninchen-AK.....	91
5.3	Konstruktion und Expression eines Phagemids zur Selektion von F_{ab}- Fragmenten	94
5.3.1	Expression des murinen Antikörpers K411B, inseriert in das Phagemid pASK111Rab-p3-K411B	94
5.3.2	Konstruktion des Phagemids pASK85Rab-p3-WR13 und Koexpression des Kaninchen-AK mit den Faltungshelferproteinen kodiert auf pTUM4.....	97
5.3.2.1	Konstruktion des Phagemids pASK85Rab-p3-WR13	97
5.3.2.2	Koexpression des Kaninchen-AK inseriert in pASK85Rab-p3-WR13 mit Faltungshelferproteinen.....	98
5.3.2.3	Koexpression eines Kaninchen-F _{ab} -g3p-Fusionsproteins kodiert auf pASK85Rab-p3-WR13 mit Faltungshelferproteinen.....	99
6	Diskussion.....	101
6.1	Murine rekombinante Antikörper.....	102
6.1.1	Der rekombinante Antikörper K411B.....	102
6.1.2	Der Expressionsvektor pASK85-pro-K411B.....	104
6.1.3	Produktion des Antikörpers K411B inseriert in pASK85-pro-K411B in der Hochzelllichtfermentation	107
6.1.3.1	Adaptierung des Fermentationsprotokolls	107
6.1.3.2	Produktion des murinen AK K411B im Fermenter	108

6.2	Vektoren zur Produktion von Kaninchen-Antikörpern.....	109
6.2.1	Selektion und Produktion von Kaninchen-Antikörpern.....	109
6.2.2	Konstruktion Kaninchen-spezifischer Expressionsvektoren und Phagemide.....	111
6.2.3	Funktionalität des Kaninchen-spezifischen Expressionsvektors pASK85Rab-pro-K411B	115
6.3	Rekombinante Kaninchen-Antikörper	117
6.3.1	Expression des Kaninchen-Antikörpers inseriert in pASK85Rab-pro-WR13	117
6.3.2	Koexpression des Kaninchen-Antikörpers, inseriert in pASK85Rab-pro-WR13 mit Faltungshelferproteinen	120
6.4	Konstruktion von Phagemiden, Expression von Proteinen und Fusionsproteinen	127
6.4.1	Expression des murinen Antikörpers K411B inseriert in das Phagemid pASK111Rab-p3-K411B	127
6.4.2	Expression des Kaninchen-Antikörpers inseriert in die Phagemide pASK111Rab-p3-WR13 und pASK85Rab-p3-WR13.....	128
6.4.3	Koexpression des Kaninchen-Antikörpers inseriert in das Phagemid pASK85Rab-p3-WR13 mit Faltungshelfern.....	130
7	Literatur	132
8	Anhang	154
9	Danksagung.....	162

Abkürzungsverzeichnis

A	Nukleobase Adenin
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazole
AK	Antikörper
Ala	Aminosäure Alanin
Amp	Ampicillin
aTc	Anhydrotetracyclin
bla	β -Lactamase
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Nukleobase Cytosin
Cam	Chloramphenicol
Cat	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CDR	Complementarity Determining Region
C _H (1)	(Erste) konstante Domäne der schweren Kette eines AK
C _L	Konstante Domäne der leichten Kette eines AK
CR	Linker
Cys	Aminosäure Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
(k)Da	(kilo)-Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
Σx	Molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
F _{ab} -Fragment	Antigenbindendes Fragment aus den variablen und ersten konstanten Domänen eines Antikörpers
FR	Framework Region
Fv-Fragment	Antigenbindendes Fragment aus den beiden variablen Domänen eines Antikörpers (<i>Fragment variable</i>)
G	Nukleobase Guanin
g3p	das große Hüllprotein filamentöser Phagen

Gln	Aminosäure Glutamin
HC	Schwere Immunglobulinkette aus variabler und erster konstanter (C _H 1) Domäne
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettich (<i>Horseradish</i>) -Peroxidase
IB	Inclusion bodies
Ig	Immunglobulin
Ile	Aminosäure Isoleucin
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
LC	Leichte Immunglobulinkette
M	Molar
mA	Milli-Ampere
mAK	Monoklonaler Antikörper
mM	Millimolar
MMP	Magermilchpulver
mRNA	Messenger RNA
OD	Optische Dichte
OmpA	Outer Membrane Protein A
p3	Gen des großen Hüllproteins filamentöser Phagen (g3p)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	Polyklonaler Antikörper
PBL	Periphere B-Lymphozyten
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pelB	Pectate Lyase B
PhoA	Bakterielle Alkalische Phosphatase
pmol	Pikomol
Pro	Aminosäure Prolin
Rab	Kaninchen-spezifische Klonierungsstelle
rAK	Rekombinanter Antikörper

RBP	Ribose-Binding Protein
RBS	Ribosomen-Bindungsstelle (<i>ribosome binding site</i>)
Rpm	Drehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
scAb	Single-chain Antibody
scFv	Single-chain Fv
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Nukleobase Thymin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trihydroxyaminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Nukleobase Uracil
V	Volt
V _H	Variable Domäne der schweren Kette
v/v	Volumen pro Volumen
V _L	Variable Domäne der leichten Kette
w/v	Weight per volume

1 Summary

Antibody fragments are used for the detection of molecules, for example in immunochemical assays, preclinical diagnostic and therapy. The murine antibody F_{ab} fragment K411B against atrazine is successfully utilised in immunochemical assays for environmental analysis. To enable the production of the required high protein yields the expression vector pASK85-K411B was adapted to high cell density fermentation in glucose/mineral salt medium. The introduction of the *proBA* locus into the vector permitted the use of the prolin auxotrophic *E. coli* strain JM83, known for his superior functional expression behaviour in high cell density fermentation. By optimising the feeding protocol a growth rate of $\mu = 0,19$ was realized and a protein yield of 14 mg ($240 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$) could be reached. Expression of F_{ab} fragment was shown by western blotting. Functional expression of F_{ab} fragment K411B was verified by ELISA.

A rabbit specific system was developed for the selection of F_{ab} fragments and the production of high yields of rabbit antibodies which are required for almost all applications. The system contains an expression vector suitable for high cell density fermentation and a phagemid for selection of specific antibodies in phage display. It incorporates a rabbit specific cloning site with the signal peptides RBP and OmpA fused to the light and the heavy chain of the rabbit F_{ab} fragment WR13. The *tet^{p/o}* promoter/operator system induces protein expression and a His₆-tag facilitates soluble F_{ab} fragment purification. The expression vector pASK85Rab-pro-WR13 contains the additional *proBA* locus, the phagemid pASK85Rab-p3 WR13 is equipped with the gene of the minor coat protein (g3p) of filamentous phage, p3. To analyse the functionality of the expression vector, murine light and heavy chain genes of F_{ab} fragment K411B were subcloned from pASK85-K411B into pASK85Rab-pro-K411B and K411B was successfully expressed.

Most rabbit have an extra intrachain disulfide bridge linking the variable and constant domains of kappa light chains in addition to the two intrachain disulfide bridges shared with human and mouse kappa light chains. To avoid difficulties with the folding of the recombinant rabbit gene products, frequently encountered in prokaryotic protein expression, the four periplasmic chaperones and folding catalysts, SurA, FkpA, DsbA and DsbC, encoded on the helper plasmid pTUM4, were overexpressed. Expression of a rabbit F_{ab} fragment with and without pTUM4 demonstrated that the main reason for low yield of functional rabbit F_{ab} fragment expression seems to be inefficient folding and/or assembly of the polypeptides in the periplasm. This is in part due to the additional intradomain disulfide chain and was also valid

for the expression of a fusion protein which is composed of F_{ab} fragment and g3p and was encoded on the phagemid. Optimising the feeding protocol resulted in a lower growth rate. Supported by the overexpression of peptidyl-prolyl cis/trans-isomerases SurA und FkpA and thiol-disulfide oxidoreductases DsbA and DsbC a protein yield of 50 µg l⁻¹ • OD₆₀₀ could be realised in high cell density fermentation. Periplasm was analysed in SDS-PAGE and on a Western blot where F_{ab} fragments as well as single chains were shown.

The successful expression of fusion proteins assisted by pTUM4 helperproteins is a promising fundament for the selection of specific antibodies by phage display. It should be preceded by cloning of a rabbit immune repertoire which already exists in our laboratory into the constructed Phagemid. The improvement of protein folding might furthermore reduce the selective effect of phage display against insufficiently folded but possibly highly specific antibodies.

2 Zusammenfassung

Antikörper (AK) sind wichtige Hilfsmittel für die Immunanalytik und werden zu Therapie Zwecken eingesetzt. Das hochaffine rekombinante murine F_{ab}-Fragment K411B wurde bereits erfolgreich zum Nachweis von s-Triazinen in der Umweltanalytik verwendet. Aufgrund seiner Stabilität und Langlebigkeit ist es prädestiniert für die Immobilisierung auf Immunosensoren. Um die hierzu notwendigen Mengen löslichen F_{ab}-Fragments herstellen zu können, wurde der Expressionsvektor pASK85-K411B optimiert. Durch Insertion des *proBA*-Genlocus in das Plasmid wurde die Expression im Prolin-auxotrophen *E. coli*-Stamm JM83 in Minimalmedium möglich. JM83 zeichnet sich durch einen positiven Einfluss auf die Faltung von Proteinen im Periplasma aus. Durch Optimierung des Fermentationsprotokolls konnte in der Hochzellichtefermentation eine Proteinausbeute von bis zu 14 mg (240 µg l⁻¹ • OD₆₀₀) realisiert werden. Der Nachweis des F_{ab}-Fragments erfolgte im Western-Blot, die Spezifität wurde im ELISA bestätigt.

Kaninchen-AK sind für ihre hohe Variabilität, Affinität und Stabilität bekannt. Aufgrund ihrer Kreuzreaktivität mit murinen und humanen Antigenen sind sie für die vorklinische Untersuchung therapeutischer AK im Maus-Modell von Bedeutung. Sie lassen sich nahezu ohne Verluste an Spezifität und Affinität humanisieren und dienen dem Nachweis einer ganzen Reihe von Epitopen. Um die Selektion hochaffiner leporider AK und die Produktion großer Proteinmengen zu ermöglichen, wurde ein Kaninchen-spezifisches System, bestehend aus Phagemid und Expressionsvektor, entwickelt. Die Vektoren enthielten neben der Kaninchen-spezifischen Klonierungsstelle mit den Signalsequenzen RBP und OmpA das *ter*^{p/o} Promotor/Operator-System und ein His₆-tag zur Aufreinigung der Proteine. Der Expressionsvektor enthielt zusätzlich den *proBA*-Genlocus, das Phagemid wurde mit dem Gen des großen Hüllproteins (g3p) filamentöser Phagen, p3, ausgestattet.

Die Expression des Kaninchen-F_{ab}-Fragments, kodiert auf dem Expressionsvektor pASK85Rab-pro-WR13, wurde mit und ohne zusätzliche Überexpression der Faltungshelferproteine SurA, FkpA, DsbA und DsbC, kodiert auf pTUM4, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das entscheidende Problem bei der Produktion von Kaninchen-AK die Faltung und Zusammenlagerung von LC und HC im Periplasma ist. Dieses Ergebnis galt gleichermaßen für die Expression von Fusionsproteinen, exprimiert mittels des Phagemids pASK85Rab-p3-WR13 mit und ohne Unterstützung der Faltungshelferproteine. Durch Reduktion der Glukosezufuhr wurde die Wachstumsrate, verglichen mit der Expression des murinen AK K411B, reduziert und das Fermentationsprotokoll an die Koexpression von

Kaninchen-AK mit Faltungshelferproteinen angepasst. Die Unterstützung der Disulfidbrückenbildung durch Koexpression der Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen SurA und FkpA sowie der Proteindisulfidisomerasen DsbA und DsbC ermöglichte in der Hochzelllichtfermentation eine Ausbeute von 3,3 mg ($50 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$) leporidem F_{ab}-Fragment. Auch die Produktion von Fusionsproteinen, bestehend aus F_{ab}-Fragment und g3p, als Voraussetzung für das *Phage Display*, war in der Koexpression erfolgreich, was im Western-Blot nachgewiesen werden konnte.

Diese Resultate sprechen für gute Chancen auf eine erfolgreiche Selektion eines spezifischen Kaninchen-AK im *Phage Display* und anschließend daran eine hohe Proteinausbeute des selektierten F_{ab}-Fragments. Zu diesem Zweck müsste das in unserem Labor bereits vorliegende leporide Immunrepertoire in das hier konstruierte Phagemid pASK85Rab-p3-WR13 inseriert werden. Die Eigenschaften des *Phage Display* haben oftmals eine Selektion auf hohe Expressionsraten und gute Faltungseigenschaften, aber gegen schlecht faltende, möglicherweise hoch affine AK zur Folge. Durch die verbesserte Proteinfaltung im Periplasma, bedingt durch die Koexpression, hat das *Phage Display* vermutlich eine weniger limitierende Wirkung auf das AK-Repertoire, wodurch hoch affine leporide AK in kürzerer Zeit gewonnen und produziert werden könnten.

3 Einleitung

3.1 Antikörper, Antikörperfragmente und alternative Proteinstrukturen

Antikörper (AK) sind Plasmaproteine, die von den B-Zellen von Wirbeltieren als Reaktion auf den Kontakt mit Antigenen gebildet werden und als Funktionsträger der humoralen Immunantwort agieren. Sie binden spezifisch an immunogene Moleküle und lösen dadurch Effektormechanismen zur Beseitigung von Antigenen aus. Hierzu zählen beispielsweise die Neutralisierung oder Markierung von Pathogenen zur anschließenden Eliminierung durch Phagozyten sowie die Aktivierung des Komplementsystems (Janeway und Travers, 1997). Obwohl sich alle Immunglobuline (Ig) in ihrer Gesamtstruktur gleichen, besitzt jedes AK-Molekül eine einzigartige Struktur, die es ihm ermöglicht, strukturell unterschiedliche Antigene bzw. Epitope zu erkennen. Die funktionelle Vielfalt der Ig, die beim Menschen ca. 10^{11} beträgt (Janeway und Travers, 1997), wird bedingt durch die hohe strukturelle Variabilität eines sehr begrenzten Bereichs der Proteinstruktur, die die Antigenbindungsstelle, das Paratop, bildet.

Ein AK fñgt sich aus vier Untereinheiten, bestehend aus jeweils zwei identischen leichten (*light chain*, LC) und zwei identischen schweren (*heavy chain*, HC) Ig-Ketten, zusammen (Abb. 1). Dabei falten sich die einzelnen Ketten repetitiv in kompakte Ig-Domänen mit antiparalleler β -Faltblattstruktur. Die LC besteht aus zwei solcher Domänen mit jeweils ca. 120 Aminosäuren, der variablen (*variable light*, V_L) und der konstanten (*constant light*, C_L) Domäne. Die HC besteht aus einer variablen Domäne (*variable heavy*, V_H) und den konstanten Domänen (*constant heavy*, C_H). Je nach Ig-Klasse handelt es sich um drei oder vier C_H -Domänen (C_{H1} - C_{H3} bzw. C_{H1} - C_{H4}) (Janeway und Travers, 1997). Die konstanten Ig-Domänen bestehen aus sieben β -Faltblattsträngen, während bei den variablen Domänen neun β -Faltblattstränge vier konservierte Bereiche (Gerüstregionen oder *Framework Regions*, FR) bilden, die durch drei hypervariable Schleifen (*Complementarity Determining Regions*, CDRs) miteinander verbunden sind. Die Aminosäuren der insgesamt sechs hypervariablen Schleifen der variablen Region von HC und LC formen das Paratop. Zwischen der LC und der HC sorgt eine interchenare Disulfidbrücke für die Verbindung der F_{ab} -Fragmente. Zwischen C_{H1} - und C_{H2} -Domäne befindet sich die Scharnier (*Hinge*)-Region, innerhalb derer die HC über zwei interchenare Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden werden (Abb. 1). Eine zentrale intrachenare Disulfidbrücke innerhalb einer jeden Domäne ist von

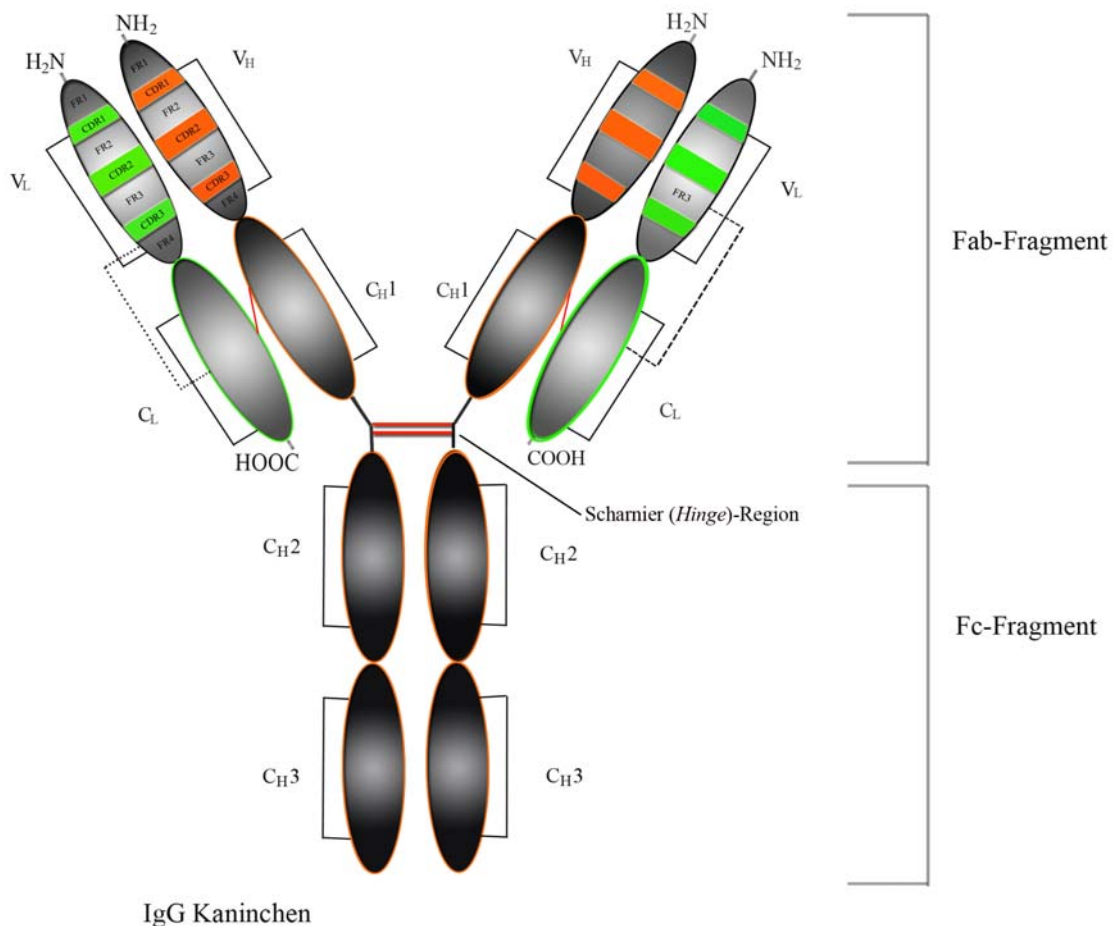


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Kaninchen-IgG.

Das IgG besteht aus *Fragment Crystallizable* (Fc)-Fragment und *Fragment Antigen Binding* (F_{ab})-Fragment mit den FR-Regionen und den CDRs der LC (grün) und der HC (orange), verbunden durch interchenare Disulfidbrücken (rot). Das linke F_{ab}-Fragment zeigt die LC des Allotyps C_Lκ1 b9 und der *Basilea*-Mutanten (Kelus und Weiss, 1977) mit den intrachenaren Disulfidbrücken (schwarze Klammer) und der zusätzlichen intrachenaren Disulfidbrücke (schwarz gepunktet) (McCartney-Francis *et al.*, 1984; Popkov *et al.*, 2003). Das rechte F_{ab}-Fragment zeigt die LC des Allotyps C_Lκ1 b4, b5, b6 oder bbas mit den intrachenaren Disulfidbrücken (schwarze Klammer) und der zusätzlichen intrachenaren Disulfidbrücke (schwarz gestrichelt, Rejnek *et al.*, 1969).

entscheidender Bedeutung für die Stabilität des AK (Glockshuber *et al.*, 1992).

Die Entwicklung der Hybridomtechnik ermöglichte erstmals die *in vitro* Produktion monoklonaler AK (mAK) beliebiger Affinität und Spezifität und ihrer Fragmente durch Fusion von B-Lymphozyten mit immortalen Myelomzellen (Köhler und Milstein, 1975). Durch proteolytische Spaltung des AK mit Papain können antigenbindende F_{ab}-Fragmente und das die Effektorfunktion vermittelnde Fc-Fragment gewonnen werden; durch

Pepsinverdau am C-terminalen Ende der Scharnier-Region können wiederum die HC so gespalten werden, dass ein $F(ab')_2$ -Fragment und ein Fc-Fragment entstehen. Gezielte Spaltung der Disulfidbrücken des $F(ab')_2$ -Fragments kann schließlich aus einem $F(ab')_2$ -Fragment zwei F_{ab} -Fragmente machen.

Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), die zur Familie der Hasenartigen (*Leporidae*) und der Ordnung der Hasentier (*Lagomorphen*) gehören, werden seit Jahrzehnten für ihre hervorragenden Eigenschaften als Produzenten polyklonaler AK gegen eine Vielzahl von Antigenen und Haptenen geschätzt. Trotz der Entwicklung der Myelomtechnik wurde das Potential des Kaninchens aus Mangel an einem stabilen Fusionspartner für die B-Zellen lange Zeit nur in Form der relativ heterogenen polyklonalen AK genutzt. Nachteile waren die begrenzte Produktionsspanne des AK-produzierenden Tieres, schlecht zu definierende Spezifität und Affinität und wenig konstante AK-Qualität. Erst seit etwa 10 Jahren ist die Herstellung monoklonaler Kaninchen-AK möglich (Spieker-Polet *et al.*, 1995). Der Vorteil dieses Verfahrens ist die theoretisch unbegrenzte Ausbeute und die definierte Spezifität und Affinität des produzierten AK. Schwachstellen der Technologie sind die lange Entwicklungszeit, die Instabilität und aufwendige Pflege der Hybridomlinien und die eingeschränkten Möglichkeiten zur Modifikation von Affinität und Spezifität der produzierten AK-Fragmente.

Diese Probleme konnte durch die Biosynthese funktioneller AK-Fragmente in *Escherichia coli* behoben werden (Better *et al.*, 1988; Skerra und Plückthun, 1988). Mit Hilfe der gentechnisch einfach zu handhabenden Bakterienzellen werden hierbei AK-Fragmente in löslicher Form produziert, indem LC und ein Teil der HC (V_H-C_H1) mit Signalsequenzen versehen und getrennt voneinander in das oxidierende Milieu des Periplasmas sekretiert werden. Dort findet gleichzeitig die Faltung der Proteine und die Ausbildung der strukturellen Disulfidbrücken statt, gefolgt von der Assoziation zum funktionellen F_{ab} -Molekül (Skerra und Plückthun, 1988; Plückthun und Skerra, 1989).

Das *Antibody-Engineering* (Hayden *et al.*, 1997; Kontermann und Dübel, 2001) erlaubt schließlich die Optimierung der AK-Fragmente hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und -spezifität (Jackson *et al.*, 1992). Dabei können die vektorkodierten AK-Gene mit molekularbiologischen Methoden nahezu beliebig verändert werden. Neben der Produktion von F_{ab} -Fragmenten, die bereits weniger effektiv mit klassischen proteinbiochemischen Verfahren hergestellt wurden, ist durch *Protein-Engineering* basierend auf dem modularen Aufbau der Ig die Gewinnung einer ganzen Reihe künstlicher Fragmente möglich (Plückthun, 1992). Zu diesen Fragmenten gehören die *single-chain Fragments variable* (scFv, Bird *et al.*,

1988), *disulfide-stabilized variable Fragments* (dsFv, Brinkmann *et al.*, 1993), bivalente und bispezifische AK-Fragmente (Carter *et al.*, 1992) und die *single-chain Antibodies* (scAb, einzelsträngige AK). Ein besonders thermo- und chemostabiler einzelsträngiger AK ist das V_{HH}-Fragment, die von dem HC-Homodimer der Kameliden abstammende V_H-Domäne. Es zeichnet sich durch eine besonders lange CDR3 aus und ist, da es nicht zu spontaner Dimerisierung neigt, relativ homogen und eine Alternative zu den instabilen scFv-Fragmenten (De Genst *et al.*, 2006). Die Homodimere der Kameliden bestehen aus zwei HC ohne C_{H1}.

Durch Selektionsverfahren wie dem *Phage Display*, bei dem das AK-Fragment als Fusionsprotein meistens zusammen mit dem großen Hüllprotein (g3p) filamentöser Phagen exprimiert und auf der Oberfläche von Phagen präsentiert wird (Barbas *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991), können spezifische AK-Fragmente mit hoher Affinität aus DNA-Bibliotheken isoliert werden. Ihre Affinität kann durch die Einführung von Zufallsmutationen oder die Neukombination der einzelnen Ketten (*Shuffling*) weiter verbessert werden (Hoogenboom *et al.*, 1998; Winter, 1998). Zur Produktion rekombinanter Kaninchen-AK (rAK) wurde die *Phage Display*-Technik erstmals von Ridder *et al.* (1995) genutzt. Chimäre, die die hohe Spezifität der variablen Domänen des Kaninchen mit den für den Menschen nicht immunogenen humanen konstanten Domänen kombinieren, wurden vor wenigen Jahren erstmals hergestellt (Rader *et al.*, 2000).

Die Eigenschaften der *Phage Display*-Methode führen zu einer Selektion auf hohe Expressionsraten und gute Faltungseigenschaften, auf Kosten von Varianten mit niedriger Expressionsrate oder toxischem Effekt auf den Wirtsorganismus (Holt *et al.*, 2000). Um hochspezifische aber toxische oder ungefaltete AK im *screening* nicht zu verlieren, finden zellfreie Selektionssysteme wie das *Ribosome Display* (He und Taussig, 1997; Hanes und Plückthun, 1997) Anwendung. Dabei wird eine Verknüpfung von Genotyp 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 der gesamten AK-DNA umgangen.

Die Therapie mit AK ist aufgrund der Kosten für Herstellung, *engineering* und Humanisierung teuer. Gill und Damle (2006) gehen von über 50 000 \$ jährlich pro behandelter Person aus. Um diese Kosten zu umgehen, wird an Alternativen geforscht, die sowohl AK-Fragmente als auch andere Proteinstrukturen einbeziehen. Ein Beispiel für alternative AK-Fragmente sind die stabilen single-chain AK der Kameliden. Ihr Vorteil ist die verglichen mit einem mAK geringe Größe und die Möglichkeit, bispezifische, bifunktionelle

Dimere zu bilden. Dadurch können sie gleichzeitig unterschiedliche Epitope des Antigens binden (Gill und Damle, 2006). Allerdings müssen sie vor Verwendung in der Therapie humanisiert werden. Alternative Proteingerüst-Strukturen, die wie AK neben einer stabilen FR-Region eine variierbare Binderegion aufweisen, werden als „Protein-Scaffolds“ bezeichnet (Nygren und Skerra, 2004). Durch billige Produktionsmethoden sollen sie langfristig günstigere Therapien ermöglichen. Eine solche Alternative zu den AK sind beispielsweise die „*Anticaline*“ (Skerra, 2001, 2007b). Dabei handelt es sich um Proteine, die auf gezielter Mutation der Loop-Region der im menschlichen Körper natürlich vorkommenden Transportvehikel, den Lipocalinen, basieren. Sie bestehen aus nur einer Polypeptidkette, die einen dem AK ähnlichen Aufbau aus Rahmenregionen und hypervariablen Schleifen aufweist, zeichnen sich aber durch eine robustere Struktur aus und sind stabil und langlebig. Aufgrund ihrer geringen Größe gelangen die billig zu produzierenden *Anticaline* schnell in das Zielgewebe und binden sowohl große Moleküle als auch Haptene spezifisch. Sie können dem Entfernen toxischer Substanzen aus dem Körper sowie dem Blockieren von Rezeptoren und als Transportvehikel dienen (Schlehuber und Skerra, 2005a, 2005b). Neben den Lipocalinen existiert eine ganze Reihe weiterer Scaffolds als mögliche Alternative zu den AK, über die Gill und Damle (2006) und Skerra (2007a) eine Übersicht geben. Entscheidende Kriterien für die Wahl eines dieser Scaffolds für die Produktion eines Therapeutikums sind Stabilität, Löslichkeit, Langlebigkeit und die Produktionskosten. Außerdem müssen Selektivität und Affinität durch Mutation einfach verändert werden können. Trotz der vielen alternativen Scaffolds sind derzeit die AK noch immer, ungeachtet einiger Rückschläge (anti-DC28 AK TGN1412), die am schnellsten wachsende Gruppe der Biopharmazeutika, sowohl im Hinblick auf ihre Anzahl als auch auf den Marktanteil. Die Zahl der getesteten AK für therapeutische Zwecke ist inzwischen auf 20 gestiegen. An die 400 derzeit laufende vorklinische Studien lassen darauf schließen, dass die Zahl weiter steigen wird (Dübel, 2007).

3.1.1 Rekombinante Antikörper in der Umweltanalytik

Die Herbizidgruppe der s-Triazine spielt seit den letzten Jahrzehnten eine bedeutende Rolle in der Bekämpfung breitblättriger Unkräuter. Besonders beim Anbau von Mais (*Zea mays*) kommen diese selektiv systemischen Photosynthesehemmer zum Einsatz. Sie werden aber auch zur Unterstützung der Kultur von Sorghum (*Sorghum bicolor*), Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) und Rispenhirse (*Panicum miliaceum*) verwendet (Kramer, 2002; Rau, 2002). Der intensive Einsatz dieser Herbizide hat eine Kontamination von Grundwasser, Flüssen und Böden zur Folge (Guzzella *et al.*, 2006) und birgt gesundheitliche Risiken für

Mensch (Meisner *et al.*, 1993) und Tier (Simic *et al.*, 1991). Immunchemische Analysemethoden ermöglichen die Überwachung der Umweltkontamination mit s-Triazinen. Das zeigen die von Kramer *et al.* (2001) entwickelten und in Langzeitstudien validierten *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA). Der erste Einsatz immunchemischer Analysemethoden in der Umweltanalytik basierte auf polyklonalen AK (Haas und Guardia, 1968). Dunbar *et al.* (1990) ergänzten durch die Herstellung eines monoklonalen Kaninchen-AK gegen Atrazin die klassischen Methoden der Pestizidanalytik (Gaschromatographie, Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) durch den schnelleren und billigeren ELISA. Die Hybridomtechnik ermöglichte Giersch (1993) die Herstellung einer Triazin-spezifischen Hybridomzelllinie zur Produktion hoch affiner mAK, während erste Klonierungsexperimente zur Herstellung von rAK gegen s-Triazine durchgeführt wurden (Ward *et al.*, 1993; Kramer und Hock, 1996; Byrne *et al.*, 1996). Durch die Isolierung hoch affiner scFv- und F_{ab}-Fragmente gegen Herbizide aus DNA-Bibliotheken, deren Bindungseigenschaften mittels zufälliger Mutationen verbessert werden konnten, entstanden schließlich rekombinante s-Triazin-AK für die Verwendung in Kombination mit Biosensoren (Kramer und Hock, 1996; Hock *et al.*, 2002). Basierend auf einer der mRNA-Isolierung vorausgehenden Selektion spezifischer B-Zellen konnte Kramer (2002) eine Hapten-AK-Bibliothek generieren. Mittlerweile existieren kommerzielle AK-Bibliotheken (z.B. HuCAL, Knappik *et al.*, 2000), die für die Umweltanalytik und andere Zwecke einsetzbar sind. Neben den erfolgreich in der Umweltanalytik verwendeten murinen rAK wurde auch die Produktion rekombinanter AK aus Kaninchen erfolgreich realisiert. Mittels Phage-Display konnten Li *et al.* (1999; 2000) aus einer Kaninchen-AK-Bibliothek scFv-Fragmente gegen Atrazin isolieren.

3.1.2 Kaninchen-Antikörper

Kaninchen-AK sind eine interessante Ergänzung muriner Ig. Da die *Lagomorphen*, die bereits als Modellorganismen für eine ganze Reihe von Krankheiten dienen (Mage, 1998a), bezüglich DNA und Proteinsequenz näher mit den Primaten verwandt sind als die Nagetiere (*Rodentia*), zu denen die Maus gehört, wirken leporide AK beim Einsatz in der Humantherapie weniger immunogen als beispielsweise murine AK (Graur *et al.*, 1996; Novacek, 1996). Die Variabilität ihres Paratops lässt sowohl eine planare Oberfläche zur Erkennung nativer Proteinantigene als auch eine mulden- bzw. rinnenförmige Topographie zur Erkennung von Peptiden und an Trägerproteine gekoppelten Haptenen zu (Foti *et al.*, 1998). Dadurch tragen sie zur Erweiterung des bereits bestehenden Epitoprepertoires bei (Hofer *et al.*, 2007) und können sowohl zum Nachweis von Pestiziden, Antibiotika und Drogen als auch in der Diagnose und zur Entwicklung humanisierter AK zum Einsatz in der

Therapie verwendet werden (Mage *et al.*, 2006). Zwischen Mensch und Nagetieren konservierte Epitope, die von humanisierten murinen und in transgenen Mäusen hergestellten humanen AK nicht erkannt werden, wirken auf Kaninchen-AK immunogen und werden erkannt (Hofer *et al.*, 2007). Dazu gehören beispielsweise die Phosphopeptide, die in der Zellkommunikation eine wichtige Rolle spielen.

Die Eigenschaft, mit menschlichen und murinen Antigenen kreuzzureagieren (Popkov *et al.*, 2004), die humane und humanisierte AK oft verloren haben (Rader, 2001), sind für die vorklinische Untersuchung therapeutischer AK für humane Erkrankungen im Maus-Modell unverzichtbar (Popkov *et al.*, 2004; Hofer *et al.*, 2007). Kaninchen-AK (Abb. 1, 2) können außerdem mit geringem Verlust von Spezifität und Affinität humanisiert werden, was ein weiterer Vorteil für den Einsatz in der Therapie ist (Rader *et al.*, 2000; Steinberger *et al.*, 2000).

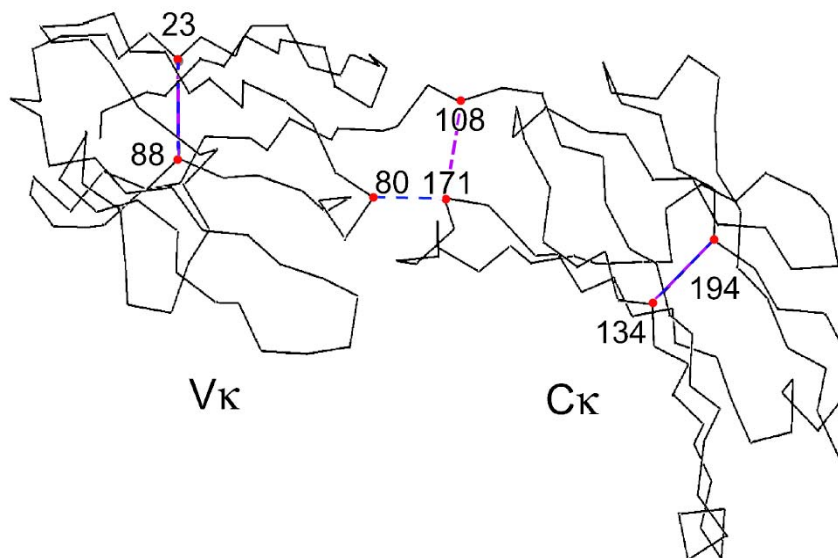


Abbildung 2: Kristallstruktur der κ -LC (V κ -C κ)-Domänen eines humanisiert F_{ab}-Fragments.

Die Cysteine des humanisierten Kaninchen-F_{ab}-Fragments D3h44 (Cys, rot) stabilisieren die V_Lκ1-(Cys23-Cys88) und die C_Lκ1-Domäne (Cys134-Cys194) durch Bildung intrachenerer Disulfidbrücken. Eine zusätzliche intrachener Disulfidbrücke verbindet V_Lκ1 mit C_Lκ1 (bei den Allotypen b4, b5 und b6: Cys80-Cys171 (blau), beim Allotyp b9: Cys108-Cys171 (violett)), (nach Faelber *et al.*, 2001).

Die Entwicklung des AK-Repertoires des Kaninchens unterscheidet sich von der B-Zell-Entwicklung von Mensch und Maus und weist eine Reihe von Besonderheiten auf. Diese bilden die Grundlage für die hohe Variabilität der AK und müssen bei deren Produktion berücksichtigt werden. Das anfänglich relativ kleine neonatale AK-Repertoire wird durch Genkonversion (*gene conversion*)-ähnliche Vorgänge und somatische Hypermutation des

primären und sekundären AK-Repertoires derart erweitert, dass sich Kaninchen-AK schließlich durch ein besonders hohe Variabilität, Spezifität und Affinität auszeichnen (Winstead *et al.*, 1999). V_L und C_L werden beim Kaninchen jeweils durch eine intrachenare Disulfidbrücke stabilisiert, die die Cysteine an Position 23 und 88 bzw. an Position 134 und 194 verbindet. Eine Besonderheit des häufig auftretenden $\kappa 1$ -Allotyps der LC ist eine zusätzliche, bei Mensch und Maus bisher nicht beobachtete intrachenare Disulfidbrücke (Rejnek *et al.*, 1969), die $V_{L\kappa 1}$ (Cystein 80, FR3) mit $C_{L\kappa 1}$ (Cystein 171) verbindet (McCartney-Francis *et al.*, 1984). Beim Allotyp b9 und beim *Basielea*-Stamm befindet sich das Cystein der zusätzlichen intrachenaren Disulfidbrücke nicht an Position 80 sondern an Position 108 (FR4) (McCartney-Francis *et al.*, 1984; Popkov *et al.*, 2003). Die zusätzliche intrachenare Disulfidbrücke der κ -LC hat eine hohe Stabilität und lange Halbwertszeit des AK zur Folge (Mage *et al.*, 2006).

3.1.3 Aufbau der Kaninchen-Immunglobuline

3.1.3.1 Die schwere Immunglobulinkette

Beim Kaninchen kodieren verschiedene Gene, deren Loci sich dicht hintereinander auf der DNA befinden, für die C_H , die den Isotyp des AK bestimmt (Abb 3). Das einzige IgG-Gen des Kaninchens (Mensch und Maus haben jeweils 4 IgG-Gene) kann in drei allelen Formen auftreten, wohingegen für IgM und IgE jeweils nur eine Form existiert. Für IgA stehen 13 nicht-allelische Keimbahngene ($C\alpha 1-5$, $C\alpha 7-14$) einem einzigen Gen bei Mensch und Maus gegenüber (Knight *et al.*, 1985; Mage *et al.*, 2006). IgD konnte beim Kaninchen bisher nicht nachgewiesen werden (Lanning *et al.*, 2003).

Die V_H setzt sich wie bei Mensch und Maus aus jeweils einem der mehrfach vorhandenen Gensegmente für V_H , D und J_H zusammen. Die zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten, beim Menschen basierend auf 50 V_H -, 23 D_H - und 6 J_H -Gensegmenten, sind bei den meisten Spezies Ursache für die Variabilität des AK-Repertoires (Lai *et al.*, 1989). Trotz der großen Vielfalt der V_H -Gensegmente gilt dies für das Kaninchen nur in eingeschränkter Form. Die variable Region (V_H) kann theoretisch aus einem der 100-200 V_H -Gensegmente generiert werden, von denen nur etwa die Hälfte funktionell ist. Sie stimmen in ihrer Aminosäuresequenzen zu 80 % überein und gehören zu einer großen Genfamilie (Knight und Becker, 1990). Bei Mensch und Maus sind die V_H -Gensegmente dagegen in 10 bzw. 6 Genfamilien unterteilt. Die V_H -Gensegmente des Kaninchens können basierend auf ihren allotypischen Motiven in 4 V_H -Hauptgruppen (a, x, y und z) unterteilt werden, zu denen die meisten der V_H -Gensegmente gehören (Kim und Dray, 1972, 1973; Mage *et al.*, 1974; Kelus

und Weiss, 1986; Tunyaplin und Knight, 1995). Die Gensegmente der „a“-Gruppe treten in Form von 3 Allelen auf (a1, a2, a3) und werden als „a-positiv“ bezeichnet (Oudin, 1956; Mage *et al.*, 1984). Im Gegensatz dazu werden die V_{Hn} -Gensegmente V_{HX} , V_{HY} und V_{HZ} , die 50 kb upstream der V_{HA} -Gensegmente liegen, als „a-negativ“ bezeichnet (Dray *et al.*, 1963; Stemke und Fischer, 1965; Kelus und Weiss, 1986).

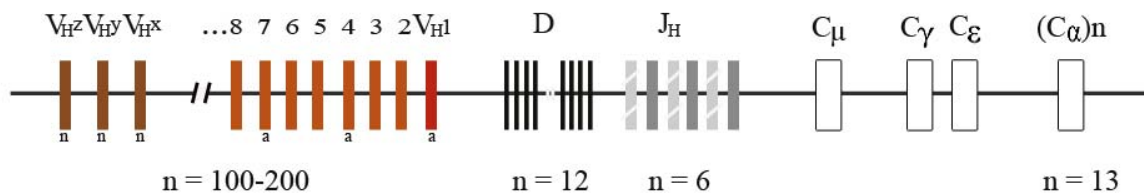


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gensegmente der HC des Kaninchens.

Die variable Domäne der schweren Kette des Kaninchen-AK setzt sich aus den Gensegmenten V_H (orange), D (schwarz) und J_H (grau) zusammen. Einige der J_H -Gensegmente sind nicht funktionell (schraffiert). Trotz der über 100 funktionellen a-positiven (a) und a-negativen (n) V_H -Gensegmente wird zu 90 % das V_{H1} -Gensegment in die variable Domäne eingebaut (rot). Die konstante Region besteht je nach Isotyp aus einem der C-Gensegmente (weiß) (nach Mage *et al.*, 2006).

Trotz der Vielzahl der V_H -Gensegmente ist die Variabilität der HC stark eingeschränkt, da bei der Entstehung des neonatalen AK-Repertoires zu 80-90 % das zu den a-positiven Gensegmenten gehörende V_{H1} -Gensegment in Form einer seiner drei Allotypen a1, a2 oder a3 in die variable Region eingebaut wird (Becker und Knight, 1990; Allegrucci *et al.*, 1991; Knight, 1992). Die a-negativen Allotypen spielen neben den V_{H1a} -Gensegmenten und wenigen anderen Gensegmenten eine Rolle von nur 10-30 %. Sie werden insbesondere dann exprimiert, wenn die a-positiven Gensegmente mutiert oder unterdrückt sind (DiPietro *et al.*, 1990; Short *et al.*, 1991; Friedman *et al.*, 1994) und dienen hauptsächlich als Donor für die Genkonversion (Weinstein *et al.*, 1994). Die molekularen Grundlagen für den überwiegenden Einbau von V_{H1a} sind nicht bekannt. Eine verstärkte Transkriptionsaktivität des V_{H1} -Promotors als Ursache wurde von Tunyaplin und Knight (1995) ausgeschlossen. Allerdings vermuten Mage *et al.* (2006) eine leichtere Zugänglichkeit des Chromatins an dieser Stelle. Die Variabilität der variablen Region der HC wird zusätzlich durch die vergleichsweise geringe Zahl an D- und J_H -Gensegmenten, von denen nur einige wenige Verwendung finden, beschränkt. So findet sich in 80 % der HC das Gensegment J_{H4} und in 20 % das Gensegment J_{H2} . Von den 12 D-Gensegmenten werden vorwiegend D2a, D2b, D3 oder D5 verwendet (Mage *et al.*, 2006). Für die D- und J_H -Gensegmente, die die CDR3 Region bilden, sind keine Genkonversions-Donoren bekannt. Sie erhöhen ihre limitierte

Variabilität stattdessen durch N-Nukleotid-Einbau mittels der Terminalen-Desoxynukleotidyltransferase (Benedict *et al.*, 2000) an den Schnittstellen zwischen den Gensegmenten sowie durch somatische Hypermutation (Sehgal *et al.*, 1999; Sehgal *et al.*, 2002). Dadurch entsteht letztlich ein größeres neonatales AK-Repertoire, als aufgrund der vielen Einschränkungen zu erwarten wäre (Tunyaplin und Knight, 1995; Sehgal *et al.*, 2002). Diese Erweiterungstaktik des Repertoires wurde beim Menschen ebenfalls nachgewiesen (Pascual *et al.*, 1993), jedoch nicht bei der Maus (Feeney, 1990).

3.1.3.2 Die leichte Immunglobulinkette

Bei der Rekombination der LC können wahlweise die Gensegmente $C_L\lambda$ und $C_L\kappa$ in das Strukturgen der LC eingebaut werden. Dabei ist eine Besonderheit des Kaninchens die Verdopplung des $C_L\kappa$ -Locus (Benammar und Cazenave, 1982; Akimenko *et al.*, 1984; Hole *et al.*, 1991b) (Abb. 4). Die zwei Isotypen $C_L\kappa1$ und $C_L\kappa2$ finden sich im Abstand von ca. 1 Mb auf der DNA, aufgrund seines stärkeren Enhancers kommt jedoch bei bis zu 90 % der Ig $C_L\kappa1$ zum Einsatz. $C_L\kappa1$ kann in Form verschiedener Allotypen auftreten (b4, b5, b6, b9 und bbas), die als $\kappa1$ -Isotypen bezeichnet werden, und sich in bis zu 35 % der Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden (Heidmann *et al.*, 1981). Bei heterozygoten Kaninchen dominieren die Allotypen b4 und b5 (Dubiski und Muller, 1967; Heidmann und Rougeon, 1983). Nur 10 % der Ig weisen in der konstanten Region das Gensegment $C_L\lambda$ oder eines der beiden allotypischen Gensegmente von $C_L\kappa2$, bas1 und bas2, auf (Mage, 1998b). Meistens kommen diese Gensegmente zum Einsatz, wenn $C_L\kappa1$ nicht funktionsfähig ist. Beim Mutanten-Stamm *Basilea* (Kelus und Weiss, 1977) beispielsweise liegt eine Mutation in $C_L\kappa1$ vor, wodurch $C_L\kappa2$ oder $C_L\lambda$ exprimiert werden (Mage *et al.*, 1984).

Die Diversität der V_L mit ihren über 30 $V_L\kappa$ - und bis zu fünf $J_L\kappa$ -Gensegmenten entspricht mit Einschränkungen der des Menschen (über 30 $V_L\kappa$) und kompensiert teilweise die reduzierte Variabilität der HC (Sehgal *et al.*, 1999; Sehgal *et al.*, 2000). Die Häufigkeit der verschiedenen V_L -Gensegmente wurde bisher nicht untersucht (Mage *et al.*, 2006). Die Funktionalität der einem jeden $C_L\kappa$ -Isotyp zugeordneten $J_L\kappa$ -Gensegmente ist eingeschränkt (Hole *et al.*, 1991a) (Abb. 4). Für das am häufigsten vorkommende $C_L\kappa$ -Allel b4 ist nur eines der 5 $J_L\kappa$ -Gene funktionell (Emorine *et al.*, 1983), das seltenere Allel b9 verwendet immerhin 2 von 5 Gensegmenten der $J_L\kappa$ -Region (Akimenko *et al.*, 1986). Kaninchen vergrößern ihre hierdurch reduzierte Variabilität der LC über Deletionen und Insertionen der so genannten „P-Nukleotide“, kurzer „*inverted repeats*“, die an den Verbindungsstellen zwischen V_L und J_L auftreten (Sehgal *et al.*, 1999). Die auf der DNA ebenfalls vorhandenen $V_L\lambda$ und $J_L\lambda$

Gensegmente machen wie bei der konstanten Region nur 10 % der rekombinierten Gene aus.

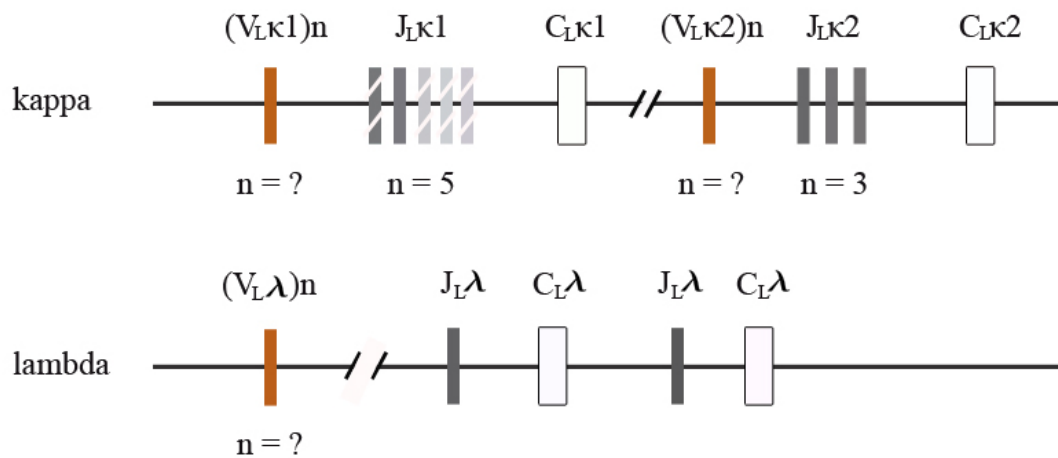


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gensegmente der LC des Kaninchens.

Die variable Domäne der beiden Allotypen der leichten Kette, V_{κ} und V_{λ} . Der V_{κ} -Allotyp ist beim Kaninchen verdoppelt ($\kappa 1$ - bzw. $\kappa 2$ -Isotyp). Die variable Domäne des $\kappa 1$ -Isotyps setzt sich aus einer unbekanntem Zahl an V_L - (orange) und 1-2 funktionellen (grau) J_L -Gensegmenten zusammen. Einige J_L -Gensegmente sind nicht (hellgrau schraffiert) bzw. nur beim Allotyp b9 funktionell (grau schraffiert). Für $C_{L\kappa 1}$ existiert ein C_L -Gen. Die variable Region des $\kappa 2$ -Isotyps setzt sich aus einer unbekanntem Zahl V_L - (orange), 3 funktionellen J_L - (grau) und dem $C_{L\kappa 2}$ - Gensegment (weiß) zusammen. Der λ -Isotyp und setzt sich aus einer unbekanntem Zahl $V_{L\lambda}$ - (orange) sowie jeweils zwei J_L (grau) und zwei $C_{L\lambda}$ -Gensegmenten (weiß) zusammen (nach Mage *et al.*, 2006).

3.1.4 Die B-Zell-Reifung

Kaninchen unterscheiden sich, ähnlich wie Rind (Zhao *et al.*, 2006), Schaf (Craig *et al.*, 2006) und Huhn (Ratcliffe, 2006), in der Entstehung und Entwicklung ihres AK-Repertoires deutlich von Mensch und Maus. Ihr relativ kleines neonatales Repertoire entsteht bereits in der fetalen Leber und im Knochenmark durch Rekombination der Gensegmente von HC und LC und durch Einbau und Austausch von N-Nukleotiden (Tunyaplin und Knight, 1995). Zwischen der 4. und 8. Lebenswoche entwickelt sich das primäre AK-Repertoire als nicht spezifische Immunantwort auf die unspezifische Stimulierung durch intestinale Antigene. Neu entstandene B-Zellen wandern aus Knochenmark und fetaler Leber in die primären Lymphorgane ein, wo als Reaktion auf Mikroorganismen eine B-Zell-Expansion stattfindet. Die wichtigsten Orte der Diversifizierung des primären AK-Repertoires sind die primären Lymphorgane Appendix (Wurmfortsatz des Blinddarms, *Appendix vermiformis*), Sacculus rotundus ilei (*ampulla ilei*) und Peyer'sche Plaques (Peyer-Drüsen, *Folliculi lymphatici aggregati*), die zusammenfassend als GALT (*Gut-associated-lymphoid tissue*) bezeichnet

werden (Knight und Crane, 1994; Schiaffella *et al.*, 1999; Sehgal *et al.*, 2002).

Cooper *et al.* (1968) und Perey *et al.* (1968) postulierten erstmals die Relevanz der intestinalen Mikroflora für die Entwicklung des GALT, die durch Stepankova *et al.* (1980) anhand von keimfrei gehaltenen Kaninchen bestätigt wurde. Ohne Mikroflora entwickelt sich der GALT unzureichend und es kommt zu B-Zell-Mangel und Reduktion der AK-Repertoireerweiterung (Vajdy *et al.*, 1998; Lanning *et al.*, 2000a; 2000b). Ziel der gleichzeitig ablaufenden somatischen Hypermutation und Genkonversion (Becker und Knight, 1990) ist die Ausbildung eines breiten B-Zell-Repertoires (Weinstein *et al.*, 1994; Schiaffella *et al.*, 1999; Mage *et al.*, 1999). Der Vorgang der Genkonversion, der nicht reziproke Austausch von DNA-Sequenzen, wurde zuerst beim Huhn beschrieben (Smithies, 1967). Dabei werden in der Bursa (*bursa of Fabricius*) in 5'-Richtung (upstream) von V_H liegende homologe Donor-Gensegmente gegen bereits rekombinierte V_H-Gensegmente ausgetauscht. Der Donor bleibt unverändert und es kann keinerlei äußerer Einfluss nachgewiesen werden (Weill und Reynaud, 1987; Carlson *et al.*, 1990). Anders als beim Huhn findet die Genkonversion beim Kaninchen erst während der ersten Lebenswochen statt und wird daher auch als Genkonversion-ähnlicher Vorgang bezeichnet. Dabei wird die zu 90 % in der HC vorhandene V_H1a Region durch Teile eines der 100-200 bis dahin ungenutzten V_H-Gensegmente ersetzt. Durch Umgestaltungen der CDR1- und CDR2-Regionen entstehen unter Beibehaltung der Rahmenregionen (Foti *et al.*, 1998) AK mit neuer Spezifität (Becker und Knight, 1990). Als somatische Hypermutation, deren Ursache beim Kaninchen nicht bekannt ist, wird die gezielte Akkumulierung von Punktmutationen bezeichnet (Short *et al.*, 1991; Lanning und Knight, 1997), die besonders in den CDRs der V_H auftritt (Crane *et al.*, 1996). Nach 3-4 Monaten befinden sich in den B-Zellen aus Knochen, Blut und Appendix keine unreifen B-Zellen mit nicht rekombinierten Gensegmenten mehr (McElroy *et al.*, 1981; Jasper *et al.*, 2003). Das spricht dafür, dass wenige Monate nach der Geburt die B-Zell-Reifung zu 99 % abgeschlossen ist (Crane *et al.*, 1996). Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass beim Kaninchen im Gegensatz zur Maus bereits im Alter von 5 Monaten keine so genannten „Signal Joints“ (Abb. 5), ringförmige DNA, die bei der Rekombination entsteht, mehr vorhanden sind (Crane *et al.*, 1996).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass nach Abschluss der Entwicklung des peripheren B-Zell-Pools so gut wie keine *de-novo*-Reifung von B-Zellen mehr stattfindet (Crane *et al.*, 1996). Kaninchen B-Zellen müssen daher langlebig und selbst erneuernd sein, wofür laut Lanning *et al.* (2000b) das Vorhandensein des Oberflächen-Glykoproteins CD5 auf Kaninchen-B-Zellen spricht. Bei Mäusen und Menschen wird CD5 auf fetalen B-Zellen

exprimiert, ist in adulten Tieren aber nur auf wenigen B-Zellen nachweisbar und wird durch Selbsterneuerung lebenslang erhalten (Raman und Knight, 1992). Lediglich in den Keimzentren (*germinal centers*) der Milz wurden einige wenige unveränderte V_HDJ_H - und V_LJ_L -Keimbahngene nachgewiesen, die auf gelegentliche B-Zell-Reifung auch in adulten Kaninchen hinweisen (Sehgal *et al.*, 1998).

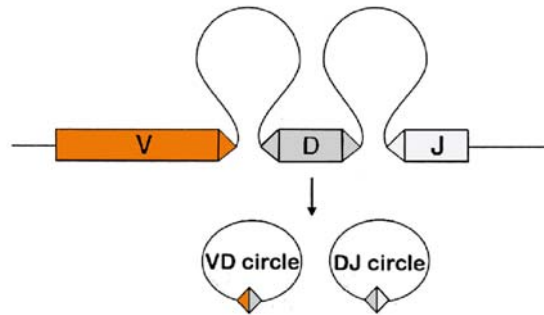


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signal Joints.

Bei Rekombination der Gensegmente entstehen ringförmige VD (orange/grau) und DJ (grau/weiß)-DNA-Strukturen (nach Crane *et al.*, 1996).

Eine Möglichkeit des Kaninchens, nachträglich sein AK-Repertoire durch Sequenzänderung zu erweitern, ist das *receptor editing*. B-Zellen mit geringer Antigenaffinität werden entweder durch Apoptose zerstört oder lösen durch eine Reexpression der die Rekombination aktivierenden Proteine RAG1 und RAG2 das *receptor editing* aus (Schatz *et al.*, 1992; Fuschiotti *et al.*, 1997). Sie entkommen dadurch der Apoptose und erhalten quasi eine zweite Chance (Gay *et al.*, 1993; Hertz und Nemazee, 1998). Die Zellen kehren in die dunkle Zone der Milz zurück und durchlaufen eine weitere Rekombination (Schiaffella *et al.*, 1999). Die Hochregulierung der *rag*-Gene wurde ebenfalls bei der Maus in den Keimzentren der Milz beobachtet, wo *receptor editing* mit dem Ziel einer erneuten Rekombination der Gene bereits reifer B-Zellen stattfindet (Hikida *et al.*, 1996; Papavasiliou *et al.*, 1997).

Durch somatische Hypermutation und somatische Genkonversion der V_HDJ_H - und V_LJ_L -Gensegmente entsteht schließlich während der spezifischen Immunreaktion in der Milz und teilweise auch in den peripheren Lymphknoten das sekundäre AK-Repertoire (Winstead *et al.*, 1999; Schiaffella *et al.*, 1999; Sehgal *et al.*, 2000). Dabei steht die Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation im Vordergrund. Die meisten Mutationen sind Nukleotid-Substitutionen der Purine an den so genannten *Hotspots* der DNA. Dabei handelt es sich um Bereiche, deren Mutation zur Affinitätsreifung beiträgt, also im Wesentlichen um die CDRs (Sehgal *et al.*, 2002). Die Genkonversion kann zu diesem Zeitpunkt ganze

Aminosäure-Bereiche verändern und statt zu höherer Affinität zu einer Veränderung der Spezifität des B-Zell-Rezeptors führen. Obwohl die B-Zell-Reifung bereits abgeschlossen ist, kann dies ähnlich dem *receptor editing* eine Erweiterung des Repertoires bedingen (Lanning *et al.*, 2000b).

3.2 Die Proteinsekretion in das Periplasma

Die Herstellung löslicher AK kann nicht nur im Tier selbst oder in Hybridomzellen erfolgen, sondern auch in *E. coli*. Zum Zweck der bakteriellen Produktion werden die Polypeptide vom Cytoplasma, dem Ort der Translation, in das Periplasma sekretiert. Die Sekretion in das Periplasma von *E. coli* oder direkt in das Medium kann über unterschiedliche Sekretionswege erfolgen. Sie hat gegenüber der Produktion im Cytoplasma den Vorteil, dass die Proteine in relativ reiner Form vorliegen, biologisch aktiv, stabil und N-terminal unverändert sind (Makrides, 1996). Dies gilt besonders für Proteine, die direkt in das Medium gelangen und dadurch weniger der Kontamination mit zelleigenen Proteinen und dem Angriff durch Proteasen ausgesetzt sind (Shokri *et al.*, 2003). Besonders toxische oder pathogene Proteine werden gezielt in das Medium transportiert, allerdings kann es aufgrund undichter Periplasmamembranen auch zur Sekretion periplasmatischer Proteine in das Medium kommen (Mergulhao *et al.*, 2005).

Von den in der Literatur beschriebenen Sekretionswegen Gram-negativer Bakterien ist Typ II der von *E. coli* K-12 häufigst genutzte (Choi und Lee, 2004). Die Proteine werden dazu an eine Signalsequenz fusioniert exprimiert und, wie im folgenden Kapitel genauer beschrieben, über die SecYEG-Translokationspore in das Periplasma sekretiert (Valent *et al.*, 1998). Eine weitere Strategie zur Sekretion heterologer Proteine in das Periplasma ist der Sec-unabhängige *twin-arginine translocation* (TAT)-Translokationsweg (Santini *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998). Der zweite Schritt, die Sekretion vom Periplasma in das Medium über die äußere Bakterienmembran, kann passiv durch Permeabilisierung der äußeren Zellmembran erfolgen oder aktiv über spezifische Sekretionsmechanismen. Die aktive Sekretion ist allerdings in *E. coli* K-12 nicht möglich, da die notwendigen Sekretionsmechanismen fehlen (Shokri *et al.*, 2003). Obwohl rekombinante Proteine erfolgreich über die Sekretionsmechanismen in das Periplasma gelangen, konnte bislang nicht mit Sicherheit festgestellt werden, über welchen Sekretionsweg sie sekretiert wurden. Es wurde zudem nachgewiesen, dass Proteine gleichzeitig über zwei verschiedene Wege sekretiert werden können. Es kann somit zur Überlappung zwischen diesen kommen (Froderberg *et al.*, 2003). Beispielsweise können Bedingungen, die die Sekretion über den

Sec-Weg stören, zur Sekretion des Polypeptids über den TAT-Weg führen (Pradel *et al.*, 2003). Das spricht dafür, dass im Falle einer Überschreitung der maximalen Kapazität des Sekretionswegs die Proteinsekretion auf alternative Wege ausweichen kann (Mergulhao *et al.*, 2004).

3.2.1 Der Sec-Translokationsweg

Der Transport der meisten neusynthetisierten ungefalteten Polypeptidketten (90 %) durch die Cytoplasmamembran in das Periplasma von *E. coli* wird durch das Sec-System vermittelt. Dabei handelt es sich um eine integrale Membranproteinkomponente bestehend aus SecY, SecE, SecG, YajC, den peripher assoziierten Proteinen SecD und SecF sowie einem SecA-Homodimer mit ATPase-Aktivität. Die Translokation findet entweder posttranslational statt, wobei der Transport zur Translokationspore SecB-abhängig oder unabhängig erfolgt (Driessen *et al.*, 1998). Der Transport zur Sec-Translokationspore und die Translokation selbst können aber auch kotranslational mit Hilfe von *signal recognition particle* (SRP) stattfinden (Valent *et al.*, 1998; Collinson, 2005). Für die Translokation ist eine Signalsequenz mit dem 5'-3' Aufbau aus positiv geladener n-Region, hydrophober h-(core) Region und polarer c-Region notwendig (Choi und Lee, 2004). Die N-terminale n-Region und die hydrophobe h-Region sind an der Bindung des Präproteins an das Chaperon SecB und dem Transport zur Translokationspore sowie an der Translokation selbst beteiligt. Dabei sind die hydrophoben Aminosäuren wichtig für die Translokation (Pugsley, 1993). Die C-terminale c-Region kodiert für die Schnittstelle der Signalpeptidase I, die im Periplasma die Signalsequenz vom Polypeptid abspaltet (Tuteja, 2005). Ihre Sekundärstruktur hat Einfluss auf die richtige Spaltung und die Prozessierung des Proteins (Pratap und Dikshit, 1998). Sobald das Polypeptid versehen mit der SRP-Signalsequenz das Ribosom verlässt, bindet die Signalsequenz an SRP und wird von diesen, abgesehen von Ausnahmen (Cristobal *et al.*, 1999a), zur SecYEG-Pore transportiert. Die Energie für die Translokation kommt aus der GTP-Hydrolyse (Georgiou und Segatori, 2005). Meistens handelt es sich bei den Polypeptiden, die mittels SRP zur Membran gelangen, um integrale Membranproteine, die aufgrund ihrer stark hydrophoben Signalsequenzen erkannt werden (Valent *et al.*, 1998). Bei der SecB-abhängigen Sekretion bindet das Chaperon SecB das Präprotein und verhindert dessen vorzeitige Faltung. Es transportiert das Präprotein zu SecA, das an den Membranproteinkomplex SecYEG gebunden vorliegt und übergibt es quasi an dieses (Georgiou und Segatori, 2005). Die Translokationsrate kann durch zunehmende positive Ladung der n-Region und durch Länge und Hydrophobizität der h-Region gesteigert werden (Wang *et al.*, 2000). Der Komplex aus Präproteinen und SecB bindet an SecA, das das Protein

schließlich mit der Energie aus wiederholter ATP-Hydrolyse durch den Translokations-Kanal der Membran, den Proteinkomplex SecYEG, schiebt (Pugsley, 1993). Die *proton motive force* (PMF) kann bei der Translokation unterstützend wirken, wobei der genaue Mechanismus ungeklärt ist (Mergulhao *et al.*, 2005). Obwohl für die Sekretion rekombinanter Proteine hauptsächlich der Sec-Sekretionsweg verwendet wird, hat er den Nachteil, dass gefaltetes Protein nicht sekretiert werden kann und auf anderem Wege ins Periplasma gelangen muss.

Von Heijne (1986) verglich 36 prokaryontische Signalsequenzen, die von der Signalpeptidase I gespalten werden und berechnete anhand einer aus seinen Untersuchungen entwickelten Matrix die Häufigkeit der an den verschiedenen Positionen auftretenden Aminosäuren. Anhand der Ergebnisse konnte die -1, -3-Regel aufgestellt werden, nach der sich an Position -1 vom Protein aus betrachtet eine kleine ungeladene Aminosäure befinden muss. Die Aminosäure an Position -3 darf weder aromatisch, geladen, polar noch groß und kein Prolin sein. In Bakterien handelt es sich dabei meist um Alanin, Glycin oder Serin (Von Heijne, 1984; Pugsley, 1993). An Position -2 ist eine große Aminosäure-Variabilität möglich (Pratap und Dikshit, 1998).

3.2.2 Der TAT-Translokationsweg

Über den Sec-unabhängigen TAT-Sekretionsweg werden Fusionsproteine bestehend aus Präprotein und Signalsequenz, die bereits im Cytoplasma gefaltet werden, mittels der PMF aber ohne ATP in das Periplasma transportiert (Santini *et al.*, 1998). Der weniger effiziente und langsamere TAT-Weg wurde bereits für den Transport rekombinanter Proteine einschließlich AK-Fragmente verwendet (DeLisa *et al.*, 2003). Häufig handelt es sich um Proteine, deren Signalsequenz zwei aufeinander folgende Arginine (*twin-Arginin*) enthält. Aber auch die Hydrophobizität der Signalsequenz kann über Sec-Translokation oder TAT-Translokation entscheiden (Cristobal *et al.*, 1999b). Das cytoplasmatische Chaperon Dnak stabilisiert das bereits gefalteten Proteine und fördert die Sekretion, wenn die TAT-Translokase aufgrund von hoher Expressionsrate an ihre Grenzen stößt. Dnak ermöglicht außerdem die Translokation von Proteinen über den TAT-Sekretionsweg, deren Signalsequenz kein doppeltes Arginin enthält (Perez-Rodriguez *et al.*, 2007). Damit werden Ergebnisse von Stanley *et al.* (2000) bestätigt, die postulierten, dass das Vorhandensein der Arginine zwar von Vorteil, aber nicht unbedingt notwendig ist. Der TAT-Sekretionsweg ist besonders für Proteine, die gefaltet wurden, bevor sie von einem SecB-Chaperon erreicht wurden, und Proteine mit komplexen Disulfidbrücken von Vorteil (Choi und Lee, 2004).

3.3 Die Faltung der Immunglobulinketten

3.3.1 Die Bildung von Disulfidbrücken und Einschlusskörpern

Probleme bei der Disulfidbrückenbildung oder der Zusammenlagerung der rekombinanten Polypeptidketten durch fehlende Untereinheiten führen zu einer hohen Konzentration ungefalteter Proteine im Periplasma (Baneyx und Mujacic, 2004). Grund hierfür können Spontanmutationen, Stress - beispielsweise durch erhöhte Temperatur oder Hyperosmolarität - und Überexpression vektorkodierter Proteine in *E. coli* sein (Knappik und Plückthun, 1995). Außerdem spielen spezifische Eigenschaften der Proteine, wie beispielsweise die Anzahl der auszubildenden Disulfidbrücken und die Zahl ungepaarter Cysteine, eine Rolle (Humphreys *et al.*, 1997). Entgehen falsch gefaltete Polypeptide der Proteinqualitätskontrolle, lagern sie sich in Form von Einschlusskörpern, den so genannten *Inclusion bodies*, erstmals beschrieben von Williams *et al.* (1982), zusammen (Wickner *et al.*, 1999; Miot und Betton, 2004). Dabei werden die polymeren Komplexe aus falsch oder nicht gefalteten Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Faltungsintermediaten unspezifisch zusammengehalten (Dill, 1990; Fink, 1998). Durch ihre exponierten hydrophoben Peptidsequenzen üben die Aggregate eine permeabilisierende Wirkung auf die äußere Zellmembran aus (Skerra, 1989). Dadurch kann es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembran und damit verbunden zu Proteinverlust, aber auch zur kompletten Zellyse kommen, wie der anscheinend besonders toxische Effekt aggregierter AK-Fragmente auf die Zellen zeigte (Plückthun und Skerra, 1989).

Die Aggregatbildung ist wahrscheinlich kein passiver und irreversibler Prozess zur Lagerung falsch gefalteter Proteine, wie lange vermutet wurde, sondern ein reversibler Übergangszustand. Die missgefalteten Proteine werden quasi zwischengelagert und später entweder neu gefaltet oder abgebaut (Villaverde und Carrio, 2003). Ventura und Villaverde (2006) gehen davon aus, dass die Aggregatbildung auf einem spezifischeren molekularen Mechanismus beruht als bisher angenommen. Experimentelle Ansätze zur Gewinnung von korrekt gefalteten, funktionellen Ig-Fragmenten direkt aus dem Cytoplasma waren in Einzelfällen zwar erfolgreich (Martineau *et al.*, 1998), die Aggregate aus denaturierten Polypeptidketten lassen sich jedoch nur unter großem Aufwand wieder renaturieren (Skerra, 1989; Baneyx und Mujacic, 2004). Da sie aber große Mengen relativ reinen Proteins enthalten, werden cytoplasmatische Einschlusskörper für die Produktion toxischer, instabiler oder leicht zu renaturierender Proteine genutzt (Baneyx und Mujacic, 2004). Einschlusskörper können sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma entstehen (Georgiou *et al.*, 1986),

wobei die Tendenz zur Aggregatbildung und die genauen Gründe hierfür vom einzelnen Protein abhängig sind. Bei Überexpression vektorkodierter Fremdproteine kann es bedingt durch die metabolische Bürde zu einer stark erhöhten Permeabilität der Membran kommen. Das führt zum Verlust periplasmatischer Fremdproteine in das Medium. Das Phänomen wird als „induzierbare Exkretion“ bezeichnet und kann der Produktion großer Mengen sekretierten Proteins dienen (Georgiou *et al.*, 1988; Skare *et al.*, 1989; Glick, 1995).

3.3.2 Die Faltungshelferproteine

Die Disulfidbrückenbildung in *E. coli* findet unter normalen Umständen im oxidierenden Milieu des Periplasmas, nicht jedoch im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas statt (Rietsch und Beckwith, 1998). Dabei spielt das Vorhandensein der entsprechenden Faltungshelferproteine, ohne die die Disulfidbrückenbildung auch im Periplasma nur sehr langsam vonstatten geht, eine entscheidende Rolle (Bardwell *et al.*, 1991; Wulfing und Plückthun, 1994a; Bader und Bardwell, 2001; Duguay und Silhavy, 2004). Im Cytoplasma wurde eine Reihe von Proteinen nachgewiesen, die durch Bindung hervorstehender hydrophober Ketten die Aggregierung von Polypeptidketten verhindern (Baneyx und Mujacic, 2004). Diese Proteine werden als Chaperone bezeichnet. Hierzu gehört beispielsweise SecB, das die vorzeitige Faltung von mit bestimmten Signalsequenzen versehenen Proteinen im Cytoplasma verhindert. GroEL und Dank stabilisieren Proteine und geben sie teils in gefalteter Form, teils als Intermediate in das Periplasma ab. Dass im Periplasma bisher nur wenige solcher Chaperone zum Schutz der Proteine vor Aggregatbildung nachgewiesen werden konnten, erklärt der Mangel an ATP im Periplasma (Wulfing und Plückthun, 1994a), das zumindest für die cytoplasmatischen Chaperonen unverzichtbar ist (Missiakas und Raina, 1997). Ein Beispiel für ein periplasmatisches ATP-unabhängiges Chaperon ist Skp (Walton und Sousa, 2004; Korndörfer *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die im Periplasma vorhandenen Faltungshelferproteine zusätzlich die Funktion von Chaperonen übernehmen und so die Proteine vor Aggregierung schützen (Abb. 6). Zwei im Periplasma vorhandene Faltungshelfer-Klassen sind die Disulfidisomerasen (Dsb Proteine, Hiniker und Bardwell, 2003), welche die Disulfidbrückenbildung katalysieren (Bardwell, 1994; Collet und Bardwell, 2002; Kadokura *et al.*, 2003) und die Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen), die die cis/trans-Isomerisierung der Peptidbindungen unterstützen (Fanghanel und Fischer, 2004). Vier solche in *E. coli* vorkommende PPIasen sind FkpA, PpiA, PpiD und SurA (Justice *et al.*, 2005).

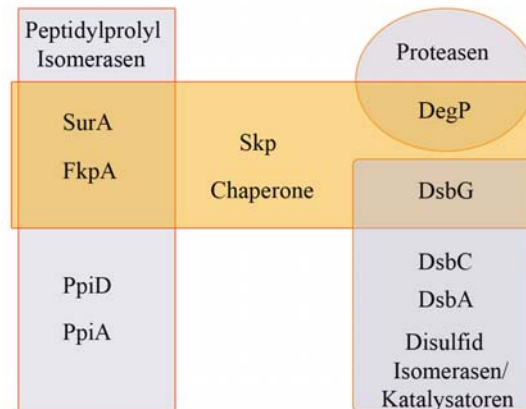


Abbildung 6: Funktion der periplasmatischen Faltungshelferproteine.

Die im Periplasma vorhandenen PPIasen (SurA, FkpA), das Dsb-Protein DsbG sowie DegP übernehmen zusätzlich zu ihrer eigentlichen Funktion die Funktion von Chaperonen (orange). Einziges bekanntes Chaperon im Periplasma ist Skp. Die Disulfidisomerasen DsbC und DsbA katalysieren die Bildung von Disulfidbrücken (nach Duguay und Silhavy, 2004).

Die Proteindisulfidisomerasen DsbA und DsbB sind Thiol-Oxidanzien, die die Oxidation der Cysteine von zu faltenden Proteinen katalysieren. Die instabile Oxidoreduktase DsbA ist ein stark oxidierendes Protein, das in oxidiertem Form im Periplasma vorliegt. Wird ein ungefaltetes Protein dorthin sekretiert, reagiert DsbA, indem es zwischen sich und dem Protein eine Disulfidbrücke bildet und diese dann auf das Protein transferiert. Dadurch wird DsbA reduziert, fällt vom Protein ab und muss vom Membranprotein DsbB reoxidiert werden (Baneyx und Mujacic, 2004). Je mehr freie Cysteine in der Polypeptidkette vorhanden sind, desto eher baut DsbA auch falsche, so genannte nicht-native Disulfidbrücken ein. Das führt zu einem instabilen, oftmals nicht aktiven Protein (Missiakas und Raina, 1997). Die periplasmatischen Thiolisomerasen oder Proteindisulfidisomerasen DsbC und DsbD sind Enzyme, die Disulfidbrücken „verschieben“ und so für die Umlagerung falsch gefalteter Disulfidbrücken sorgen. Um als Disulfidisomerase aktiv zu sein, muss das periplasmatische Protein DsbC (Missiakas und Raina, 1997) im Gegensatz zu DsbA in reduzierter Form vorliegen. Das membranständige Protein DsbD ist im Gegensatz zur Thioldisulfidoxidase DsbA eine Thioldisulfidreduktase. Es gibt somit einen oxidativen und einen reduktiven Weg, um ein Protein mit der richtigen Disulfidbrücke zu versehen (Collet und Bardwell, 2002).

FkpA und SurA gehören zu den PPIasen (oder Rotamasen) mit Chaperonaktivität. Sie sorgen dafür, dass die für die richtige Faltung notwendige, energetisch weniger vorteilhafte *cis*-Konformation der Xaa-Pro-Bindung zustande kommt. Die *trans*-nach-*cis* Isomerisierung ist oft ein limitierender Schritt bei der Faltung von Proteinen (Baneyx, 1999). FkpA kombiniert

PPIase- und Chaperon-Aktivität (Abb. 6), indem es die Proteinfaltung fördert und zusätzlich die Bildung unlöslicher Aggregate unterdrückt. SurA, dessen Ausschalten zu höherer Zellyserate führt (Rouviere und Gross, 1996), unterstützt die Reifung der Proteine der äußeren Membran hauptsächlich durch seine Chaperonaktivität (Arie *et al.*, 2001; Behrens *et al.*, 2001) und fördert die Faltung ansonsten instabiler Proteine (Choi und Lee, 2004). Um die Faltung von Proteinen im Periplasma zu optimieren, wurden die Überexpression verschiedener Faltungshelfer im Periplasma zusammen mit den zu faltenden Proteinen bereits mehrfach erfolgreich durchgeführt (Wunderlich und Glockshuber, 1993; Wulfiging und Plückthun, 1994b). Besonders relevant in diesem Zusammenhang ist der Vektor pTUM4, der vier Faltungshelferproteine gleichzeitig exprimiert (Schlapschy *et al.*, 2006).

3.4 Hochzellichtefermentation

Unter unlimitierten Bedingungen wachsen Mikroorganismen mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate. Im Minimalmedium ist die Wachstumsrate niedriger, ihr Verlauf entspricht jedoch der maximalen Wachstumsrate (Hoffmann, 1999). Eine wesentliche Regulationsgröße bei der Expression vektorkodierter Fremdproteine im Fermenter ist die Temperatur, deren Herabsetzung die Wachstumsrate reduziert und dadurch zur Vermeidung von Einschlusskörpern, zur korrekten Faltung der Fremdproteine und nachhaltiger Proteinproduktion beiträgt (Surek *et al.*, 1991). Die Satzkultivierung (*batch*) ist das einfachste Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen. Dabei wird das vorgelegte Substrat der unlimitiert und mit maximaler spezifischer Wachstumsrate wachsenden Mikroorganismen verbraucht. Allerdings ist die vorgelegte Substratkonzentration und damit die Zelldichte und Produktmenge am Ende der Satzkultivierung begrenzt. Das liegt daran, dass Glukose das Wachstum von *E. coli* ab einer Konzentration von 50 g l^{-1} vollständig inhibiert und die Konzentration der Salze durch ihre Löslichkeit beschränkt ist (Hoffmann, 1999). Zur Steigerung der Produktivität werden Hochzellichteverfahren angewandt, in denen sich der *batch*-Phase eine Zufütterungsphase (*fed-batch*) anschließt, die sich durch eine regelmäßige Kohlenstoffzufuhr von der Satzkultivierung unterscheidet. Die Fütterung im *fed-batch* kann mit direkter oder indirekter *feedback*-Kontrolle stattfinden. Bei direkter *feedback*-Kontrolle bestimmt die Konzentration des limitierenden Nährstoffs die Fütterungsrate. Bei indirekter *feedback*-Kontrolle werden Parameter wie beispielsweise der verfügbare Sauerstoff im Medium oder der pH-Wert, die einen Rückschluss auf die im Medium vorhandene Substratkonzentration zulassen, gemessen und die Fütterung daran ausgerichtet (Riesenberg und Guthke, 1999).

Um eine effektive Produktion löslicher periplasmatischer Fremdproteine sicherzustellen, muss sowohl Hungerstress durch Kohlenstoffmangel als auch die Entstehung von Acetat durch Glukoseüberschuss und eine Überproduktion der vektorkodierten Proteine verhindert werden, die zu Wachstumshemmung, Rückgang der Proteinausbeute und Entstehung unlöslicher Einschlusskörper führt (Han *et al.*, 1991; Hellmuth *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1997). Zu Hungerstress kommt es, sobald die Glukose-Konzentration im Medium unter $0,05 \text{ g l}^{-1}$ sinkt. Dadurch werden zahlreiche physiologische Veränderungen der Zellen, die schließlich Proteine zur Verwendung alternativer Substrate und zur Förderung der Gluconeogenese bilden, hervorgerufen. Durch Aminosäuremangel entsteht Guanosin $3',5'$ -bis(diphosphat), welches als Regulator der stringenten Antwort die RNA-Synthese und während der Induktionsphase auch die Plasmidreplikation und die bakterielle Produktion des Fremdproteins bis zu 91 % inhibiert (Svitol *et al.*, 1993; Cashel *et al.*, 1996). Bei zu geringer Wachstumsrate ($\mu < 0,06$, Andersson *et al.*, 1996) sinkt schließlich die Vitalität der Zellen, die Faltungseffizienz geht zurück, der Erhaltungsenergiebedarf steigt und die Sauerstoffaufnahme wird reduziert (Hellmuth *et al.*, 1994). Eine Überproduktion der Fremdproteine und die daraus resultierende metabolische Last bedeuten Stress für die Zelle und führen zu einer Reduktion des Wachstums und der Proteinproduktion bis hin zum frühen Zelltod. Der exzessive Aminosäureverbrauch kann die Akkumulation unbeladener tRNA verursachen, die mit RNA I und RNA II, den Schlüsselenzymen des Replikationsmechanismus, interagiert. Die Regulation der Plasmidreplikation wird dadurch gestört und die unkontrollierte Zunahme der Plasmidzahl (*Plasmid copy number*, PCN) kann wiederum zu einer erheblichen Steigerung des metabolischen Stresses der Zellen führen (Wrobel und Wegrzyn, 1998; Grabherr *et al.*, 2002). Bei dem 1929 erstmals an Tumorzellen beobachteten Effekt des Überflussmetabolismus (Crabtree, 1929) entsteht Acetat aus überschüssigem Pyruvat durch die Pyruvatoxidase und aus überschüssigem Acetyl-CoA durch die Phosphotransacetylase und die Acetatkinase (Han *et al.*, 1991; Eiteman und Altman, 2006). Dieser so genannte „Crabtree“-Effekt tritt auf, sobald Zellen, die mit Glukose als limitierendem Faktor wachsen, in der *fed-batch*-Phase eine Glukoseaufnahmerate überschreiten, bei der die Sauerstoffaufnahme nicht weiter gesteigert werden kann. Acetat beeinflusst verschiedene Proteine (Blankenhorn *et al.*, 1999) und Gene (Arnold *et al.*, 2001), besonders solche, die an der *E. coli*-Transkriptions- und Translationsmaschinerie und an der Stressantwort und -regulation beteiligt sind. Außerdem greift es in die Methionin-Biosynthese ein, was zur Akkumulation inhibitorischer Homocysteine führt (Roe *et al.*, 2002). Da die Acetatproduktion nicht mit der Sauerstoffverfügbarkeit, sondern mit der limitierten

Sauerstoffaufnahme gekoppelt ist, kann die Acetatbildung nicht durch eine gesteigerte Sauerstoffzufuhr verhindert werden (Eiteman und Altman, 2006). Trotz langjähriger Forschung auf diesem Gebiet ist nicht klar, ob der *Crabtree*-Effekt letztlich durch limitierte Atmungsaktivität oder Repression des Atmungsmetabolismus durch Glukoseüberschuss entsteht (Vemuri *et al.*, 2007).

Um bei der Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle Acetatbildung zu vermeiden, muss die für den verwendeten Bakterienstamm optimale Wachstumsrate in Abhängigkeit von den spezifischen Eigenschaften des zu produzierenden Proteins und des Expressionssystems durch Messung direkter und indirekter Parameter im Medium ermittelt und durch gezielte Fütterung sichergestellt werden.

3.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung eines Expressionssystems für die Hochzelldichtfermentation des murinen F_{ab} -Fragments K411B gegen Atrazin und die anschließende Übertragung des Systems auf die Expression rekombinanter Kaninchen-AK. Da das murine F_{ab} -Fragment K411B (Kramer und Hock, 1996) für die Entwicklung eines immunomagnetisch-elektrochemischen Sensors zur Verwendung in der Umweltanalytik vorgesehen war, wurde der Vektor für das hoch affine (Rader *et al.*, 2000), stabile (Kramer *et al.*, 2002) und verglichen mit dem scFv weniger von Konformationsänderungen betroffenen F_{ab} -Fragmente (Kramer und Hock, 2003) konstruiert. Diese eignet sich aufgrund oben genannter Eigenschaften besonders gut zur Immobilisierung auf Biosensoren und für langfristige Studien im Rahmen der Umweltanalytik (Kramer *et al.*, 2002).

Die Etablierung des Expressionssystems sollte zunächst mittels des murinen AK-Fragments, dessen erfolgreiche periplasmatische Faltung bereits nachgewiesen worden war, erfolgen. Der funktionelle Expressionsvektor sollte anschließend an die Besonderheiten, die die Expression leporider AK mit sich bringt, adaptiert und die Proteinausbeute in der Hochzelldichtfermentation durch die Adaptierung des Fermentationsprotokolls und die zusätzliche Expression von Faltungshelferproteinen optimiert werden.

Zusätzlich war die Entwicklung eines zum Expressionssystem komplementären Kaninchen-spezifischen Phagemids vorgesehen. Dadurch sollte die Selektion spezifischer leporider AK im *Phage Display* und die anschließende Produktion im großen Maßstab in aufeinander abgestimmten Vektor-Systemen mit wenigen Klonierungsschritten ermöglicht werden. Die Konstruktion des Phagemids, bestehend aus F_{ab} -Fragment und g3p, beinhaltete die Überprüfung der Funktionalität des konstruierten Vektors anhand der Expression des murinen F_{ab} -Fragments K411B. Anschließend sollte an Stelle des murinen ein leporides F_{ab} -Fragment bzw. ein Fusionsprotein exprimiert und so ein erster großer Schritt in Richtung *Phage Display* realisiert werden. Dabei sollte der Einfluss von zusätzlich koexprimierten Faltungshelferproteinen auf die Faltung der Fusionsproteine im Periplasma untersucht werden. Ein aus Phagemid und Expressionsvektor bestehendes Kaninchen-spezifisches Vektorsystem kann langfristig zur Selektion und Produktion hoch affiner F_{ab} -Fragmente für den Einsatz in der Umweltanalytik, aber auch zur Produktion großer Mengen hochaffiner therapeutischer Antikörper eingesetzt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 1: *E. coli* K-12 Stämme

JM83	<i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>rpsL</i> (=strA), $\phi 80$, <i>lacZ</i> Δ M15 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), von PD Dr. Karl Kramer, Lehrstuhl für Zellbiologie, TUM, Freising
TG1	$\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(mcrb-hsdSM)5$ (rk ⁻ mk ⁻) thi-1 supE [F ['] traD36 proAB <i>lac1</i> ^q Z Δ M15), von Stratagene
XL1-blue	<i>endA1</i> supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 <i>lac</i> [F ['] proAB <i>lac1</i> ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)], von Stratagene
W3110	Wildtyp, F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE), von Stratagene

Tabelle 2: Plasmide

K411B: murines F_{ab}-Fragment gegen Atrazin.

pASK85-K411B	von PD Dr. Karl Kramer, Lehrstuhl für Zellbiologie, TUM, Freising (Kramer und Hock, 1996)
pASK111	von Prof. A. Skerra, Lehrstuhl für Biochemie, TUM, Freising (Vogt und Skerra, 2001)
pTUM4	von Prof. A. Skerra, Lehrstuhl für Biochemie, TUM, Freising (Schlapschy <i>et al.</i> , 2006)
pCANTAB5 E	Pharmacia (Malone, 1994)

Tabelle 3: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide.

Die folgenden Abkürzungen wurden verwendet: *bla*: Ampicillin-Resistenz, *cat*: Chloramphenicol-Resistenz, CS: Klonierungsstelle, HC: schwere Kette, his₆: Hexahistidin-Affinitätsanhängsel, K411B: murines Fab-Fragment gegen Atrazin, LC: leichte Kette, ompA: Signalpeptid des *Outer Membrane Protein A*, pIII/p3: großes Hüllprotein filamentöser Phagen, p15a: Replikationsursprung, pelB: Signalpeptid der *Pectate lyase B*, phoA: Signalpeptid der *Alkalischen Phosphatase*, pro: *proBA*-Operon, Rab: Kaninchen-spezifische Klonierungsstelle, rbp: Signalpeptid des *Ribose-Binding Protein*, *tet*^{p/o}: *tet*-Promotor/Operator, *tetR*: *tet*-Repressor, V_L-C_L: variable (V) und konstante (C) Region der leichten Ig-Kette, V_H-C_H: variable und erste konstante Region der schweren Ig-Kette, WR: Kaninchen AK-DNA, WR2, WR5, WR13: Kaninchen Fab-Fragmente IgG2, IgG5 und IgG13.

pASK85	<i>tet</i> ^{p/o} , ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ ; phoA-V _L -C _{Lκ} , <i>bla/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK85-K411B	Rückgrat wie pASK85; mit ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ ; phoA-V _L -C _{Lκ} (V _L und V _H des mAK K4E7 inseriert in pASK85)
pASK85-pro-K411B	Rückgrat wie pASK85; mit ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ ; phoA-V _L -C _{Lκ} , <i>proBA</i> (-) ¹ nach <i>tetR</i>
pASK85Rab-pro-K411B	Rückgrat wie pASK85; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ , <i>proBA</i> (-) ¹ nach <i>tetR</i>
pASK85Rab-pro-WR13	Rückgrat wie pASK85; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ , <i>proBA</i> (-) ¹ nach <i>tetR</i>
pASK85-p3-K411B	Rückgrat wie pASK85; mit ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ ; phoA-V _L -C _{Lκ} -pIII
pASK85Rab-p3	Rückgrat wie pASK85; CS: rbp; ompA-his ₆ -pIII
pASK85Rab-p3-WR13	Rückgrat wie pASK85; rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ -pIII
pASK111	<i>tet</i> ^{p/o} ; ompA-PL-strep; <i>cat/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK111Rab-p3	Rückgrat wie pASK111; CS: rbp; ompA-his ₆ -pIII
pASK111Rab-p3-WR(LC)	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-his ₆ -pIII
pASK111Rab-p3-WR2	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ -pIII
pASK111Rab-p3-	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ 1-his ₆ -pIII

WR5	
pASK111Rab-p3- WR13	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ -his ₆ -pIII
pASK111Rab-p3- WR13.1	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ -his ₆ -pIII (mit diagnostischer Schnittstelle <i>NheI</i> in LC)
pASK111Rab-p3- WR13.12	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _γ -his ₆ -pIII (mit diagnostischen Schnittstellen <i>NheI</i> in LC, <i>SacI</i> in HC)
pASK111Rab-p3- K411B (LC)	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-his ₆ -pIII
pASK111Rab-p3- K411B	Rückgrat wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{Lκ} ; ompA-V _H -C _H 1 _{γ1} -his ₆ -pIII

¹(-): Orientierung entgegen dem Uhrzeigersinn

4.1.2 Oligodesoxynukleotide

Die Primer für die Sequenzierung wurden von der biomers.net GmbH in Ulm, der metabion international AG in Planegg-Martinsried und der Invitrogen GmbH in Karlsruhe synthetisiert.

Tabelle 4: Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung.

Primer	Sequenz 5' – 3'
pASK Iba5'	TTT ACC ACT CCC TAT CAG TG (Standardprimer, Sequiserve)
pASK Iba3'	TAG CGG TAA ACG GCA GAC (Standardprimer, Sequiserve)
proAforneu	CCA CTC GCA AGA AAT TGA TGC
proBrevneu	CCA GCA TCA GCC TGC TCC
ColE/TetRrev	GGC CTA ACT ACG GCT ACA CTA
tetRrevneu	GCA CAC TGG TGC CGA GTT TTA CC
TetRepfor	AAT TAT TTG ATC ACC AAG G
ColE1for	CGT TCC ACT GAG CGT CAG ACC
blaMitterev	CCA TTG CTA CAG GCA TCG

blaMittefor	GGG ATC ATG TAA CTC GC
fIori5'rev	GCG AGA AAG GAA GGG AAG (Standardprimer, Sequiserve)
pBRforHind	GGT CTG GTT ATA GGT ACA TTG (Standardprimer, Sequiserve)
gIIIInrev	AAA TGA ATT TTC TGT ATG AGG (Standardprimer, Sequiserve)
AmberStopfor	CCG CGG TAG ACT GTT GAA AG
fIorineu	CCT TAT GTC TTT GGC GCT GG
fIori3'for	GGA TTT TGC CGA TTT CG (Standardprimer, Sequiserve)

Tabelle 5: Oligodesoxynukleotide für die Amplifizierung der LC.

V_L: variable Region der leichten Kette, C_L: konstante Region der leichten Kette

Primer	Sequenz 5' – 3' mit Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz (unterstrichen)
V _L K1	GCC AGC <u>CCA TGG</u> CAG CSC TTG TGA TGA CCC AGA C
V _L K2	GCC GCG <u>GCC ATG</u> GCA TAT GTC ATG ATG ACC CAG AC
V _L K3	GCT ACT <u>CCA TGG</u> CAG CAG CCG TGC TGA CCC AGA C
V _L K4	GCC GCG <u>CCA TGG</u> CAG ATG TYG TGA TGA CCC AGA C
V _L K5	GCT CAG <u>CCA TGG</u> CAG ACC CTR TGC TGA CCC AGA C
C _L K1	GCC GAG <u>GCG GTA CCT</u> TAR CAG TCA CCC CTR TTG AAG C
C _L K2	GCC GCG <u>GCG GTA CCT</u> TAA CAG YTC TTC CTA YTG AAG C
C _L K3	GCC GCG <u>GCG GTA CCT</u> TAA CAG TYA TTC CTA YTG AAG C

Tabelle 6: Oligodesoxynukleotide für die Amplifizierung der HC.V_H: variable Region der schweren Kette

Primer	Sequenz 5' – 3' mit Restriktionsendonuklease-Erkennungssequen (unterstrichen)
V _{H1}	GCT ATA <u>GCG ATC GCC</u> CAG GAG CAG CTG RWG GAG TCC
V _{H2}	GTT ATA <u>GCG ATC GCC</u> SAG TCC GGA GGA GGA GCC GG
V _{H3}	GTT ATA <u>GCG ATC GCC</u> CAG BCG TTG GAG GAG TCC GGG
V _{H4}	GTT ATA <u>GCG ATC GCC</u> CAG TSG CTG GAG GAG TCC RGG
V _{H5}	GCT ACT <u>GCG ATC GCC</u> CAG TCG GTG GAG GAG TCC RG
V _{H6}	GCT ACT <u>GCG ATC GCC</u> CAG TCG GTG AAG GAG TCC GAG
V _{H7}	GCT ACT <u>GCG ATC GCC</u> CAG TCR ATG AAG GAG TCC GAG
V _{H8}	GCT ATA <u>GCG ATC GCC</u> CAG TCR TTG GAG GAG TCC GGG
V _{H9}	GTT ATA <u>GCG ATC GCC</u> CAG TCC CTG GAG GAG TCG GGG
V _{H10}	GTT ATA <u>GCG ATC GCC</u> CAG TCG CTG GTG GAG TCC GGG
V _{H11}	GCT CAG <u>GCG ATC GCC</u> CAG TCA GTG AAG GAG TCC GAG
V _{H12}	GCT CAG <u>GCGATCGCC</u> CAGTCGGTGAAGGAATCCGAG
V _{H13}	GCT ATA <u>GCG ATC GCC</u> CAG CAG CTG GAG CAG TCC GG
V _{H14}	GCT ACT <u>GCG ATC GCC</u> CAG GAG CAG CTG GTG GAG TAC
IgG	GCC AGC <u>ACG CGT CGT</u> GGG CTT GCT GCA TGT CG

Tabelle 7: Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR, 5'-3'.

Primer	Sequenz 5' – 3' mit Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz (unterstrichen)
NheIfor	GGC ACA GTC ACC ATC AAT TGC CAG <u>GCT AGC</u> GAG GAC ATT TAT AGC AAT TTA GCC
NheIrev	GGC TAA ATT GCT ATA AAT GTC CTC <u>GCT AGC</u> CTG GCA ATT GAT GGT GAC TGT GCC
SacIfor	GCT GCG GGG ACA CAC <u>CGA GCT CCA</u> CGG TGA CC
SacIreve	GGT CAC CGT <u>GGA GCT</u> <u>CGG</u> TGT GTC CCC GCA GC
TAAfor	CGC GTC ATC ACC ACC ATC ACC ATC CGC GGT AAC TTG ACC TGT G
TAArev	CAC AGG TCA AGT TAC CGC GGA TGG TGA TGG TGG TGA TGA CGC G
SacIIfor	GGC TTG CCG TGC GGG TAT CGA CAC CAT TAT TGC GGC GGG CAG CAA GCC GGG CG
SacIIrev	CGC CCG GCT TGC TGC CCG CCG CAA TAA TGG TGT CGA TAC CCT CAC GGC AAG CC
revpABSpeI	CGG <u>ACT AGT</u> CAT GTT CAC GAA CGT GAA TCA CGG
forpABSpeI	CGG <u>ACT AGT</u> GCA ACC GAC GAC AGT CCT G
revproAB	GGA CTA GTT TAC GCA CGA ATG GTG
forproAB	GAC TAG TAT GAG TGA CAG CCA GAC
K411B- LCfor	GAA <u>TGC CAT</u> <u>GGC</u> AGA CAT CGA GCT CAC
K411B- LCrev	CGC <u>CAG GTA</u> <u>CCT</u> TAA CAC TCA TTC CTG TTG
K411B- HCfor	CAG GCA <u>GCG ATC</u> <u>GCC</u> GAA GTT AAA CTG CAG
K411B- HCrev	GAA TAT <u>ACG CGT</u> GCA GTC GCG CGG TAC G

4.1.3 Enzyme und Proteine

Antarktische Phosphatase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main
Benzonase	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich GmbH, Seelze
Lysozym	Sigma Aldrich GmbH, Seelze
Pfu DNA Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Molzym GmbH & Co.KG, Bremen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main
Maus-anti His ₆ -HRP, A-7085	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Maus-anti-Kaninchen-LC-HRP	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP, A-0545	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP, A-6154	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Anti-Rabbit HRP Conjugate W4011	Promega GmbH, Mannheim
Maus-anti-M13 coat protein g3p	MoBiTec GmbH, Göttingen
Ziege-anti-Maus-IgG-HRP, A-2554	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ziege-anti-Maus-IgG, M-5899	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Atrazin-Tracer (4-Chlor-6- Isopropylamino- 1,3,5-Triazin-2-Aminohehexan)-HRP	Dr. K. Kramer, LS für Zellbiologie, Freising

4.1.4 Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung 30%ig	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (AEC)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
0,8% Bisacylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agar für LB Medium	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agar für 2YT Medium	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agar für SOC Medium	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose TopVision™ LE GQ Low elektroendosmosis	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Atrazin	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
Ammoniak, 25%	Merck KGaA, Darmstadt

Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ammoniumheptamolybdän Tetrahydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	ACROS Organics
Antifoam A-Stammlösung	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Bacto Agar	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bacto Tryptone	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bacto Yeast Extract	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Betain-Monohydrat	Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Borsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Cyprofloxacin Hydrochlorid	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
dNTP-Set (dATP, dCTP, DGTP, dTTP)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogen-phosphat Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Eisen-III-Chlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Essigsäure, 99,9%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol p.a., 99,9%	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol technisch	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen
Ethidiumbromid (1%w/v in Wasser)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
D(+)-Glukose, Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Imidazol	Merck KGaA, Darmstadt
IPTG (Isoproyl- β -D-Thiogalaktopyranosid)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Kobalt-II-chlorid, Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt

Magermilchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Manganchlorid, Hexahydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat, Dihydrat	Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natirumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natirumhydrogenphosphat, Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
PageBlue™ Protein Staining Solution R0571 für Coomassiefärbung	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
L-Prolin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure conc. (HCl)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Sauerstoffgas (O ₂)	Linde AG, München
3,3',5,5-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, (Tris)	Merck KGaA, Darmstadt
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt
Urea (Harnstoff)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Zinkacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Zinksulfat, Heptahydrat	Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze

4.1.5 Standards und Kits

DNA-Marker

100bp DNA ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main
1kb DNA ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main
Mass ruler DNA ladder, mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler™ Express	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PCR ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main
50 kb ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main

Protein-Marker

Prestained molecular weight marker	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Prestained molecular weight marker	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Page ruler™prestained protein ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Page ruler™prestained protein ladder plus	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Page ruler™unstained protein ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Kits

D-Glucose UV-Test	R-Biopharm AG, Darmstadt
Essigsäure UV-Test	R-Biopharm AG, Darmstadt
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
mRNA Isolation kit for Blood/Bone Marrow	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Presto-SpinD	Molzym GmbH & Co.KG, Bremen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Plasmid Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Plasmid Midiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg
RNA/DNA Stabilization Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

4.1.6 Geräte

Agarosegel-Apparatur	BioRad, München
Durchflussdetektor	Biorad, München
Elektroblot-Apparatur	Amersham Pharmacia GmbH, Freiburg
Elektrophoresekammer	Biorad, München
ELISA-Reader Sunrise remote	Tecan GmbH, Crailsheim
Fermenter	Braun Biostat, Sartorius Göttingen
Filtertips, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Fraktionssammler	Amersham Pharmacia GmbH, Freiburg
Magnetrührer	KM02 electronic, IKA- WERK Janke und Kunkel
PCR-Cycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Photometer	WPA biowave C08000 Cell density meter GeneQuant pro, Amersham Bioscience
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pippettierhilfe	Easypet, Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Innova 4200, G24 und G25 environmental incubator, Newbrunswick Scientific, Edison, USA
Signalschreiber	DESAGA, Heidelberg
Tank Blot Spannungsversorgung	Bio Rad, München
Tank Blot System Tran Blot™Cell	Bio Rad, München
Power Supply Model 250/2.5	
Wasserbäder	Thermostat 2761 Eppendorf Thermo, Haake DC10
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5403 Sorvall RC-5B Superspeed peqlab Centrifuge/Vortex combi-spin FVL-2400

4.1.7 Sonstige Materialien

Dialyseschläuche Spectra Por [®]	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
MWCO: 12 000-14 000	
Elektroporationsküvetten, 0,2 cm	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Halb-Micro-Küvetten (Polystyrol, 280 nm und 600 nm)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Konzentratoren	
Amicon Ultra-15, 10 kDa	Millipore GmbH, Schwalbach
Amicon 10 kDa, 50 kDa	Millipore GmbH, Schwalbach
Kunststoffröhrchen, Polystyrol	
Kulturröhrchen 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Kulturröhrchen 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Kulturröhrchen 50 ml	Renner GmbH, Dannstadt
Micropure-EZ Enzyme Removers	Millipore GmbH, Schwalbach
Microtiterplatten	Greiner Biochemica GmbH, Fracht
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten-Spitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PVDF Membran	Millipore GmbH, Schwalbach
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße PCR	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Säulenmaterial	
Chelating Sepharose Fast Flow	GE, München
SDS-PAGE Apparaturen, Glasplatten, Spacer, Kämme	BioRad, München
Steril Filter	
Millex (0,45µm)	Millipore GmbH, Schwalbach
Membransterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm Ø 5 cm)	Schleicher & Schuell, PerkinElmer LAS GmbH Rodgau - Jügesheim
Spritzen 10 ml, 20 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, PerkinElmer LAS GmbH Rodgau - Jügesheim

4.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Lösungen und Medien für die Arbeit mit Bakterien und Proteinen wurden unter Verwendung von destilliertem Wasser entweder sterilfiltriert oder autoklaviert. Kulturplatten und Medien wurden bei 4 °C aufbewahrt, Lösungen, soweit nicht anders angegeben, bei RT. Das Hinzufügen der Antibiotika erfolgte direkt vor der Verwendung.

Antibiotika-Stammlösungen

Die Lagerung der für die Herstellung von Selektivmedien verwendeten Antibiotika-Stammlösungen erfolgte bei -20 °C. Wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45µm).

Ampicillin (Amp)	100 mg ml ⁻¹ in H ₂ O (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	34 mg ml ⁻¹ in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)

Induktor-Stammlösung

Die Induktor-Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg ml ⁻¹ in DMF (1:10 000 zum Medium)
	5 mg ml ⁻¹ in DMF (1:10 000 zum Medium)

Medien

LB-Medium

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Bacto Agar	15 g (für Kulturplatten)
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5	

2YT-Medium

Bacto Tryptone	16 g
Bacto Yeast Extract	10 g
NaCl	5 g
Bacto Agar	15 g (für Kulturplatten)
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5	

SOB-Medium

Bacto Tryptone	20 g
Bacto Yeast Extract	5 g
MgSO ₄	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5	

SOC-Medium

Bacto Tryptone	20 g
Bacto Yeast Extract	5 g
MgSO ₄	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,0	
Glukose 25 % sterilfiltriert	1,9 ml

Lösungen für die Fermentation

Mineralsalzlösung

31 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	5,51g
19 mM KH ₂ PO ₄	2,58g
25 mM NH ₄ Cl	1,33g
5 mM Na ₃ -Citrat • 2 H ₂ O	0,47g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 6,9	

Glukoselösungen

Glukose	20 % (w/v) (sterilfiltriert, 0,45µm)
Glukose	50 % (w/v) (sterilfiltriert, 0,45µm)

MgSO₄-Stammlösung

MgSO ₄	1 M (separat autoklaviert)
-------------------	----------------------------

Thiamin-Stammlösung

Thiamin Hydrochlorid 10 mg ml⁻¹ (sterilfiltriert)

FeCl₃-Stammlösung

FeCl₃ • 6 H₂O 35,0 g l⁻¹ (sterilfiltriert)

Zn-Acetat-Stammlösung

Zn-Acetat • 2 H₂O 8,0 g (sterilfiltriert)

Spurenelement-Stammlösung

MnCl₂ • 4 H₂O 3,0 g

CuCl₂ • 6 H₂O 0,3 g

H₃BO₃ 0,6 g

CoCl₂ • 6 H₂O 0,5 g

(NH₄)₆Mo₇O₂₄ • 4 H₂O 1,2 g

EDTA 4 mM

H₂O ad 1000 ml

Ammoniak zur pH-Regulierung

NH₃ 12,5 % (w/v)

Antifoam A zur Unterdrückung von Schaumbildung

wässrige Lösung 30 %

Periplasma-Aufschlusspuffer (Skerra)

Saccharose 171 g

Tris/HCl pH 8,0 12,1 g

EDTA 0,5 M, pH 8,0 2 ml

H₂O ad 1000 ml

Dialyse-Puffer

Na₂HPO₄ 8,9 g

H₂O ad 1000 ml

pH 7,5

Chromatographie-Puffer für IMAC

Na ₂ HPO ₄	8,9 g
Betain	67,58 g
H ₂ O	ad 1000 ml
Imidazol	20,4 g (für Gradienten)
pH 7,5	

Regenerierungspuffer für Säulen

NaCl	29 g
EDTA	74 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 8,0	

Benzonase-Puffer

Tris/HCl	16 g
NaCl	1,16 g
MgCl ₂	0,19 g
H ₂ O	ad 1000 ml

PBS

Na ₂ HPO ₄	12,5 g
NaH ₂ PO ₄	1,39 g
NaCl	8,5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5, 80 mM	

PBST-Waschpuffer

PBS	100 ml
H ₂ O dest.	900 ml
Tween 20	0,5 ml

EB-Puffer von Qiagen

Tris/HCl	10 mM
pH 8,5	

Puffer für ELISA

Carbonatpuffer für ELISA

NaHCO ₃	2,86 g
Na ₂ CO ₃	1,7g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 9,6	

Substratpuffer für ELISA

Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	1,15 g
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	18,2 g
H ₂ NCONH ₂ • H ₂ O ₂	0,282 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 5,5	

TMB-Chromogenlösung

H ₃ PO ₄ 85 %	500 µl
TMB	0,288 g
DMSO	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 2,6	

Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer, 50-fach konzentriert, für die Agarose-Gelelektrophorese

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA 0,5 M, pH 8	100 ml

6 x Fermentas Auftragspuffer für Agarosegele

Loading Dye (R0611)

Tris/HCl (pH 7,6)	10 mM
Bromophenolblau	0,03 %
Xylene Cyanol FF	0,03 %
Glycerol	60 %
EDTA	60 mM

Orange Loading Dye R0631)

Tris/HCl (pH 7,6)	10 mM
Orange G	0.15 %
Xylene Cyanol FF	0,03 %
Glycerol	60 %
EDTA	60 mM

Puffer für SDS-PAGE und Western-Blot

SDS-Laufpuffer

Tris	3 g
Glycin	14 g
SDS	1,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 8,3	

Blockierpuffer für Western-Blot

3 % w/v Magermilchpulver in PBS

Transferpuffer für Western-Blot

1 x SDS-Laufpuffer	400 ml
Methanol	100 ml
pH 8,3	

Lower-Tris

Tris/HCl	1,5 M
pH 8,8	

Upper-Tris

Tris/HCl	0,5 M
pH 6,8	

SDS-Polyacrylamid-Gel

Trenngel 14 %

Acrylamid 30 %	9,4 ml
H ₂ O dest.	5,4 ml
Low Tris	5,0 ml
SDS (10 %)	200 µl
APS (20 %)	50 µl
TEMED	10µl

Sammelgel 5 %

Acrylamid 30 %	3,4 ml
H ₂ O dest.	11,4 ml
Upper Tris	5,0 ml
SDS (10 %)	200 µl
APS (20 %)	50 µl
TEMED	20µl

5 x Auftragspuffer für SDS-PAGE (Fermentas R0891)

Tris-HCl (pH 6,8)	0,313 M
SDS	10 %
Bromphenolblau	0,05 %
Glycerol	50 %
β-Mercaptoethanol	12,5 % v/v (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Silberstaining-Färbelösungen

1) Fixierlösung

Eisessig	100 ml
EtOH	400 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

2) Thiosulfatlösung

Na ₂ S ₂ O ₃	200 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

3) Silbernitratlösung

AgNO ₃	2 g
CH ₂ O (37%)	200 µl
H ₂ O	ad 1000 ml

4) Entwicklerlösung

Na ₂ CO ₃	30 g
Na ₂ S ₂ O ₃	~ 40 µg
CH ₂ O (37 %)	500 µl
H ₂ O	ad 1000 ml

5) Stopplösung

Glycin	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Western-Blot-Entwicklerlösung

AEC	0,0125 g
DMF	1 ml
H ₂ O ₂ 30 %	20 µl
NaH ₃ (CO) ₂ 50mM	49 ml
pH 5,0	

4.2 Molekularbiologische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden etablierte Standardtechniken der Molekularbiologie für unterschiedliche Zielsetzungen benutzt. Sofern die einzelnen Methoden nicht näher aufgeführt sind, wird auf die in Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Techniken verwiesen.

4.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli* Stämmen

Durch Ausstreichen auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Einzelkolonien gewonnen. Eine Ausnahme bildete der *E. coli*-Stamm K12 TG1, der bei 30 °C inkubiert wurde. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika bzw. durch die Wahl des Nährmediums. Die mit Bakterienkolonien bewachsenen Kulturplatten wurden bei 4 °C gelagert und maximal 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit LB-Medium zuzüglich des entsprechenden Antibiotikums angesetzt. Kulturen bis zu 100 ml wurden direkt mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Bei einem Kulturvolumen von 2 l wurde mit einer Übernachtskultur von 50 ml im Verhältnis von 1:40, bei Kulturvolumen von 500 ml mit 10 ml im Verhältnis 1:50 angeimpft. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei 30 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator. Anhand der Messung der Absorption, im Folgenden als optische Dichte bezeichnet, mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen das entsprechende Kulturmedium erfolgte die Bestimmung der Zelldichte. Ab einer OD_{600} größer 1,0 wurde die Zellsuspension vor der Messung in 1 cm-Halbmikroküvetten mit Kulturmedium verdünnt. Mit Plasmiden transformierte *E. coli*-Stämme wurden zur Lagerung in Selektivmedium mit 30 % Glycerol (v/v) resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

4.2.2 Transformation und Elektroporation von *E. coli*

4.2.2.1 Chemisch kompetente Zellen

Um für die Aufnahme von Plasmid-DNA vorbereitet zu sein, müssen *E. coli*-Zellen in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde die $CaCl_2$ -Methode zur Gewinnung chemisch kompetenter Zellen eingesetzt. Abhängig vom jeweiligen Stamm kann mit 10^5 - 10^6 Transformanden pro μ g Plasmid DNA gerechnet werden. Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte ohne Zusatz von Antibiotika und mit autoklavierten Medien. Die Schüttelinkubation erfolgte bei 37 °C, mit Ausnahme von TG1, die bei 30 °C

inkubiert wurden. Der Herstellung chemisch kompetenter Bakterien ging eine Übernachtskultur voraus, mit der 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C inkubiert wurden. Nach Erreichen einer $OD_{600} = 0,5$ wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 4000 rpm) in gekühlten 50 ml Kulturröhrchen sedimentiert und das Sediment in 20 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Sediment in 20 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Der dritten Zentrifugation folgte die Resuspendierung des Sediments in 4 ml eiskalter Lösung (0,1 M $CaCl_2$ und 15 % v/v Glycerol) und die Lagerung bei -80 °C in Aliquots à 200 µl.

Die Transformation chemisch kompetenter Zellen erfolgte mit 0,5 ng Plasmid-DNA oder 1-2 µl eines gereinigten Ligationsansatzes, der mit 100 µl Zellsuspension gemischt und 30 min auf Eis inkubiert wurde. Der Ansatz wurde für 45 s auf 42 °C erwärmt, für weitere 3 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 900 µl 42 °C warmem SOC-Medium 1 h (Plasmid mit Amp-Resistenz-Marker) bzw. 2 h (Plasmid mit Cam-Resistenz-Marker) bei 37 °C geschüttelt. Von der Zellsuspension wurden 100 µl direkt auf LB-Agarkulturplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Der Rest der Zellsuspension wurde abzentrifugiert (Eppendorf, 4 °C, 10 min, 4000 rpm) und ebenfalls ausplattiert. Die Kulturplatten wurden über Nacht bei 37 °C (TG1 bei 30 °C) inkubiert.

4.2.2.2 Elektrokompetente Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch zweifaches Waschen mit eiskaltem Wasser und Resuspendierung des Sediments in 10 % Glycerol. Hierbei kann mit bis zu 10^8 Transformanten pro µg DNA gerechnet werden. 100 ml LB Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer $OD_{600} = 0,5-0,6$ wurden die Bakterien durch Zentrifugation (Eppendorf, 4 °C, 10 min, 4000 rpm) in gekühlten 50 ml Kulturröhrchen sedimentiert und das Sediment in 100 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation fanden eine erneute Resuspendierung des Sediments in 50 ml eiskaltem Wasser und eine weitere Zentrifugation statt. Das Sediment wurde in 2 ml eiskaltem 10 % v/v Glycerol resuspendiert und in Aliquots à 200 µl bei -80 °C gelagert.

Die Transformation elektrokompetenter Zellen mit entsalzener Plasmid-DNA erfolgte wie bei Kramer (1998) beschrieben. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 50 µl in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette gegeben, 2 µl des Ligieransatzes zugegeben und der Ansatz 1 min auf Eis inkubiert. Nach Einsetzen der Küvette in die Elektroporationskammer erfolgte der Puls bei 2500 V. Sofort wurde 1 ml SOC Medium

(37 °C) zugegeben und die Zellen in ein 13 ml Kulturröhrchen überführt. Abhängig von der auf dem Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz folgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C im Schüttelinkubator, die übrigen Schritte erfolgten wie unter 4.2.2.1 beschrieben.

4.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

4.2.3.1 Präparation chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli* W3110 aus 5 ml über Nacht-Kultur wurde das *PrestoSpin* D-Kit der Firma Molzym verwendet und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die sedimentierten Zellen wurden dazu einer 15-minütigen Lysozym-Behandlung unterzogen und anschließend in hoch-chaotropem Milieu lysiert, um den Abbau der Nukleinsäuren durch zelluläre Nukleasen zu verhindern. Durch Binden der DNA an das Trägermaterial der Säulen, bei dem es sich um Tonminerale handelte, konnte diese mehrfach gewaschen, in EB-Puffer eluiert und schließlich bei -20 °C gelagert werden.

4.2.3.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben und beruhte auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen (Birnboim und Doly, 1979). Die Plasmid-DNA wurde an ein Trägermaterial, in diesem Fall eine Silica-Membran, immobilisiert, mehrfach gewaschen und schließlich in EB-Puffer eluiert. Die Plasmid-DNA wurde entweder aus 5 ml Übernachtskultur (Minipräparation) oder 50 ml Übernachtskultur (Midipräparation) gewonnen, abhängig davon, ob es sich um DNA zur Analyse eines einzelnen Transformanten oder um die Gewinnung größerer Plasmid-DNA Mengen für den präparativen Restriktionsverdau handelte. Die Ausbeute aus 5 ml Bakterienkultur betrug 20 µg DNA in 50 µl EB-Puffer, aus 50 ml konnten ca. 100 µg DNA in 100 µl EB-Puffer isoliert werden. Die DNA wurde bei 4 °C gelagert.

4.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese und Reinigung von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente im Bereich von 90 bp-10 kb konnte mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese größenabhängig in Gegenwart von Ethidiumbromid aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu reinigenden DNA-Fragmente wurde eine 0,7 % - 5 % w/v Suspension von Agarose in TAE-Puffer durch Sieden homogenisiert, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Das Beladen einer jeden Tasche erfolgte abhängig von ihrer Größe mit 10 µl bzw. 30 µl DNA-Lösung versetzt mit 1/6 Volumen 6 x Auftragspuffer. Die Elektrophorese betrug bei analytischen Gelen ca. 60 min bei 100 V.

Die DNA konnte aufgrund der interkalierenden Eigenschaft des Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Bei präparativen Gelen dauerte die Elektrophorese bei 70 V abhängig von der Größe des DNA-Fragments 1-2 h und wurde bei verminderter UV-Intensität sichtbar gemacht. Zur Isolierung der aufgetrennten DNA wurde das Gel-Stück der gewünschten Größe ausgeschnitten und mittels eines Gel-Extraktion Kits von Qiagen oder Promega entsprechend dem Herstellerprotokoll aus der Agarose isoliert. Zur Reinigung wurde die DNA unter Hochsalzbedingungen an das Silica-Material der Säulen gebunden, mehrfach gewaschen und schließlich bei geringer Salzkonzentration in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die Bestimmung der im Puffer vorhandenen DNA-Menge erfolgte anhand eines analytischen Agarosegels unter Verwendung eines DNA-Größenmarkers mit Mengenangabe (Mass ruler) sowie spektroskopisch.

4.2.4 *In vitro* Modifizierung von DNA

4.2.4.1 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese erfolgte mit dem QuickChange Kit von Stratagene gemäß den Herstellerangaben. Dabei wurden die gewünschten Punktmutationen über zwei komplementäre Primer mittels weniger PCR-Zyklen und mit Hilfe einer *Proofreading* Polymerase (*Pfu*) in die Plasmid-DNA eingeführt und das PCR Produkt anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I verdaut. Dadurch wurde die methylierte und hemimethylierte Template-DNA zerstört, und doppelsträngiges Plasmid konnte isoliert werden.

4.2.4.2 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Präparation von DNA-Fragmenten für die Ligation sowie zur Restriktionsanalyse von Plasmiden wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Auswahl des Puffers erfolgte nach Herstellerangaben. Ein analytischer Verdau erfolgte mit ca. 1 µg Plasmid-DNA und 10 U der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10-30 µl bei einer Dauer zwischen 10 min und 1 h. Endvolumen und Dauer waren abhängig von der Neigung zur *Star-Aktivität* der verschiedenen Enzyme und den Herstellerangaben zur Spaltungsdauer. Bei einem präparativen Verdau wurden 5-10 µg Plasmid-DNA mit 20 U einer jeden Restriktionsendonuklease in 50 µl Endvolumen gespalten.

4.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR; Saiki *et al.* (1988)) wurde in dieser Arbeit zur Amplifizierung von Genen, zur Einführung von Punktmutationen und zur Kontrolle von Klonierungserfolgen verwendet. Ein Standard-PCR-Ansatz mit *Taq-*

DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) oder der *Pfu*-DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) zur Amplifizierung eines Gens enthielt jeweils 20 pmol der Primer, 0,015-1 µg Matrizen-DNA, 5 µl des mitgelieferten 10 x *Taq*-Puffers, 5 µl dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 1,25 µl Formamid (2,5 % v/v, nur für Touch Down PCR). Das Gesamtvolumen von 50 µl wurde durch Auffüllen mit H₂O erreicht. Der Ansatz wurde 2 min auf 95 °C erhitzt (Hotstart), 1 - 5 U der entsprechenden DNA-Polymerase zugegeben und 30 Zyklen folgender Schritte durchgeführt: Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 30 s, Hybridisierung (*Annealing*) der Primer an die DNA-Matrix bei 55 °C für 30 s und Synthese der DNA bei 72 °C für 3 min. Zur Amplifizierung der Kaninchen-DNA ging eine Touchdown-PCR der modifizierten Standard-PCR voraus. Die Touchdown-PCR bestand aus 20 Zyklen mit abnehmender Annealing-Temperatur von 70 °C auf 50 °C mit einer Temperaturabnahme um 1 °C pro Zyklus: 94 °C für 10 s, 70 °C für 20 s -1 °C/Zyklus, 72 °C für 30 s. Daran schlossen sich 25 Zyklen mit 94 °C für 10 s, 50 °C für 30 s und 72 °C für 1 min an. Tabelle 8 zeigt die für die Amplifizierung der Kaninchen-DNA verwendeten Primerkombinationen.

Tabelle 8: Primerkombinationen zur Amplifizierung der Kaninchen-DNA.

V_H: variable Region der schweren Kette, V_L: variable Region der leichten Kette, C_L: konstante Region der leichten Kette, IgG: Immunglobulin G.

Primerkombinationen für PCR	variable Region	konstante Region
1	V _H 1, V _H 5	IgG
2	V _H 2, V _H 3, V _H 4, V _H 11, V _H 13	IgG
3	V _H 7, V _H 8, V _H 9, V _H 10, V _H 12, V _H 14	IgG
13	V _L K1, V _L K2, V _L K3, V _L K4	C _L K1, C _L K2, C _L K3
14	V _L K5	C _L K1, C _L K2, C _L K3

4.2.4.4 Dephosphorylierung von DNA

Durch Dephosphorylierung der Enden des Vektorfragments mit der antarktischen Phosphatase wurde durch Religation gespaltener Vektoren die Ausbeute an korrektem Ligationsprodukt erhöht. Dazu wurde zur Plasmid-DNA anschließend an die Restriktionsspaltung 1 U antarktische Phosphatase zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für 10 min fand eine Reinigung der DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese statt.

4.2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden die isolierten und gereinigten DNA-Fragmente mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. Um ein optimales Verhältnis der beiden Fragmente zueinander sicherzustellen, wurden die pmol-Enden berechnet und ein molares Verhältnis von Plasmid-DNA:DNA-Fragment von 1:2 eingestellt. Für einen Standard-Ligationsansatz mit 10 µl Endvolumen wurden zu 25-50 ng Plasmid der entsprechenden DNA-Fragmentmenge 1 µl 10 x Puffer vom Hersteller und 0,3-1 µl T4-DNA-Ligase (NEB: 400 U µl⁻¹) gegeben und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Zur Kontrolle wurden parallel 25 ng des Vektorfragments ohne DNA-Insert ligiert. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase über EZ-Säulen und die Puffersalze über Amicon-Filter entfernt. 1-2 µl Ligationsansatz wurden in chemisch kompetente oder elektrokompente *E. coli* Zellen transformiert (4.2.2).

4.2.4.6 mRNA-Isolierung aus Blut

Die Isolierung der mRNA aus dem Blut eines Kaninchens erfolgte mit dem „mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow“ von Roche gemäß den Herstellerangaben. Dazu wurde das Blut zunächst im „RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow“ von Roche 1:10 verdünnt, um die roten Blutkörperchen zu lysieren und die RNA zu stabilisieren. In dieser Form konnten die Blutproben bei -20 °C gelagert werden. Die mRNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe magnetischer Perlen. Durch deren Zugabe wurde die gesamte Nukleinsäure gebunden und durch Zentrifugation sedimentiert. Die Perlen wurden mehrfach gewaschen und nach jedem Waschschrift mittels eines Magneten vereint. Mit einem speziellen Puffer wurde die Nukleinsäure von den Perlen gelöst und anschließend die mRNA mit biotinylierten oligo(dT)s an magnetischen Streptavidin-Perlen immobilisiert. Die Perlen mit der gebundenen mRNA wurden mit einem Magneten vereint, mehrfach gewaschen und schließlich die mRNA von den Perlen eluiert. Die gewonnene mRNA wurde mit RNase versetzt, kurzfristig bei -20 °C bzw. langfristig bei -80 °C gelagert oder aber direkt in die reverse Transkription eingesetzt.

4.2.4.7 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA wurde mit dem „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ von Roche gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Verwendung der AMV RT (*avian myeloblastis virus reverse transcriptase*) ermöglichte aufgrund ihrer hohen Thermostabilität eine Reaktionstemperatur von 42 °C und sicherte damit eine spezifischere Reaktion, als sie bei 37 °C möglich wäre. Aufgrund der Verwendung der

Random Primer p(dN)₆ startete die AMV RT die Synthese des neuen cDNA-Strangs mitten in der Template-mRNA. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert und diente als Template für die Amplifizierung der IgG-DNA.

4.3 Gentechnische Methoden

4.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Sekretion synthetisierter Polypeptidketten in den periplasmatischen Raum von *E. coli* erfolgt mit Hilfe bakterieller Signalsequenzen, die mit den zu sekretierenden Proteinen ein Fusionsprotein bilden (Skerra und Plückthun, 1988). Die Expression des Fremdgens wurde dabei durch das durch Anhydrotetracyclin (aTc) induzierbare *tet*-Promotor/Operator-System (Skerra, 1994a) kontrolliert. Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran konnte nach Induktion der Genexpression die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

4.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

Die Anzucht erfolgte im 2 l bzw. im 5 l-Erlenmeyerkolben in 500 ml oder 2 l LB-Medium, versetzt mit einem geeigneten Antibiotikum und angeimpft mit 10 ml bzw. 50 ml einer stationären Übernachtskultur des mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stamms. Während der Inkubation der Kultur bei 25 °C und 150 rpm wurde das Wachstum durch regelmäßige Messung der optischen Dichte überprüft. Bei OD₆₀₀ = 0,5 wurde die Expression mit 200 µl aTc-Lösung (2 mg ml⁻¹ Stammlösung in DMF) gestartet und anschließend 2,5-3,5 h bei 25 °C induziert, abhängig von Stamm, Vektor und zu exprimierendem Protein. Die Kultur wurde nach der Induktion zügig auf vorgekühlte Sorvall-Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 4 °C, 15 min, 5000 rpm). Der Medienüberstand wurde entfernt und das Zellsediment der 500 ml / 2 l *E. coli*-Kultur (s. o.) in 5 ml/ 20 ml 4 °C kaltem Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) auf Eis resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Periplasmaaufschluss führt in Gegenwart von EDTA und Saccharose unter hypertonen Bedingungen zur Destabilisierung der äußeren *E. coli*-Zellmembran durch einen osmotischen Schock. Durch Komplexbildung der die Zellwand stabilisierenden zweiwertigen Kationen kommt es zum Austritt der löslichen periplasmatischen Proteine, die von den Sphäroplasten durch Zentrifugation getrennt werden. Durch Einstellen der Suspension auf 200 µg ml⁻¹ Lysozym wurde der Abbau des Peptidoglycans unterstützt und der Periplasmaaufschluss forciert. Die Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, SS-

34 Rotor, 4 °C, 15 min, 5000 rpm) und der Überstand in einen Sorvall-Zentrifugenbecher überführt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (Sorvall RC-5B, SS-34 Rotor, 4 °C, 20 min, 12 500 rpm). Die klare Proteinlösung wurde über Nacht bei 4 °C im Spectra-Por-Schlauch mit einer Ausschlussgröße von 12 000-14 000 MWCO gegen 1 l bzw. 3 l Dialyse-Puffer (50 mM Na₂HPO₄) dialysiert.

4.3.1.2 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Für die Produktion der zur Beschichtung von Immunosensoren notwendigen großen Proteinmengen wurde ein von Schiweck und Skerra (1995) entwickeltes diskontinuierliches Fermentationsverfahren an die hier vorliegenden Bedingungen adaptiert. Die Bakterienzellen des Stamms *E. coli* JM83 wurden im 2 l-Fermenter Biostat von Braun mit 1,6 l Nutzvolumen in einem synthetischen Mineralsalzmedium kultiviert, dem NH₃ (Ammoniak) als Stickstoff- und Glukose als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurden. Temperatur, pH-Wert (mittels Ammoniaklösung) und Sauerstoffpartialdruck wurden über Elektroden und Regeleinheiten konstant gehalten. Dadurch wurden über den gesamten Verlauf der Fermentation homöostatische Bedingungen gewährleistet. Für die Vorvorkultur wurden 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6-8 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 72 ml Mineralsalzlösung, der 8 ml 20 % (w/v) Glukose, 1 ml 1 M MgSO₄, 80 µl Stammlösung eines geeigneten Antibiotikums und 80 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 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 2-2,5 inkubiert. Die Kalibration der pH-Elektrode und der Pumpen für Ammoniaklösung und Glukose erfolgte nach dem Befüllen des Kulturgefäß mit 1,5 l Mineralsalzlösung gemäß den Herstellerangaben, anschließend fand eine Autoklavierung des Kulturgefäßes statt. Vor Beginn der Fermentation wurde die pO₂-Elektrode nach 6-stündiger Vorlaufzeit nach den Herstellerangaben kalibriert. Dabei wurde dem bei Begasung mit reinem O₂ herrschenden Druck der Wert von „100 %“ zugeordnet. Die Kultur wurde auf 25 °C temperiert und die gesamte stationäre Vorkultur und folgende sterile Lösungen über eine Pumpe zugeführt: 160 ml 20 % (w/v) Glukose, 16 ml 1 M MgSO₄, 1,6 ml der Stammlösung des entsprechenden Antibiotikums und der Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung, je 0,8 ml FeCl₃- und Zn-Acetat-Lösung, 2 ml Spurenelement-Lösung und 40 µl 30 %ige Antifoam A-Lösung. Die Belüftung fand zu Beginn durch gesteuerte Begasung mit Druckluft statt. Im Verlauf der Fermentation wurde Begasung durch reinen Sauerstoff notwendig, um einen Sauerstoffpartialdruck von ≥ 30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks sichern zu können. Die Einstellung des

pH-Werts auf pH 6,9 erfolgte durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak. Die Rührgeschwindigkeit betrug mit 700 rpm 35 % der Maximalleistung des Geräts. Nach 2-stündiger Inkubation bei 25 °C wurden 100 µl 30 % Antifoam A-Lösung zugegeben. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 % (w/v) Glukose gemäß dem Protokoll aus Tab. 9 zugegeben.

Tabelle 9: Fütterungsprotokolle für die Expression des AK K411B und die für Koexpression des Kaninchen F_{ab}-Fragments mit Faltungshelferproteinen im Fermenter.

Expression des K411B-F _{ab} -Fragments			Koexpression des Kaninchen F _{ab} -Fragments		
OD ₆₀₀	Glukose ml h ⁻¹	Glukose g h ⁻¹	OD ₆₀₀	Glukose ml h ⁻¹	Glukose g h ⁻¹
9	9,2	4,6	12	7,8	3,9
16	12,4	6,2	16	10,6	5,3
20	19,0	9,5	20	13,2	6,6
30	28,4	14,2	30	15,8	7,9
38	33,6	16,8	38	18,4	9,2

Der Kultur wurden bei einer OD₆₀₀ von 13 nochmals je 0,8 ml Fe- und Zn-Stammlösung und 1,6 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Bei einer OD₆₀₀ von 20 fand die Induktion der Expression durch Zugabe von aTc-Stammlösung (Endkonzentration 0,5 mg l⁻¹) statt. Die Kultivierung wurde abhängig vom Plasmid und dem zu exprimierenden Protein für weitere 2,5 - 3,5 h bei 25 °C fortgesetzt und die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B im GSA-Rotor 4 °C, 20 min, 5000 rpm) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in ein kaltes Becherglas überführt und in 4 °C kaltem Periplasma-Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) für 30 min bei 4 °C auf einem Magnetrührer vorsichtig resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen wurde folgendermaßen berechnet:

$$1) \quad 2 \times \text{Endvolumen (l)} \times \text{End-OD}_{600}$$

Der Puffer wurde vor Zugabe zu den sedimentierten Zellen auf 15 mM EDTA und 250 µg ml⁻¹ Lysozym eingestellt. Der periplasmatische Proteinextakt wurde durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 4 °C, 20 min, 5000 rpm) von den Sphäroplasten zunächst nur grob getrennt und in einem zweiten Zentrifugationsschritt (Sorvall RC-5B SS34, 4 °C,

40 min, 12 500 rpm) geklärt. Anschließend erfolgte die Dialyse bei 4 °C im Spectra-Por-Schlauch mit einer Ausschlussgröße von 12 000-14 000 MWCO dreimal jeweils 3 h gegen 5 l Dialyse-Puffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7,5), wodurch der Chelatbildner EDTA entfernt wurde. Die Abtrennung ausgefallener Partikel und Proteine erfolgte durch Sterilfiltrierung (0,45 µm); die so erhaltene Lösung mit löslichen Proteinen wurde entweder sofort in der Chromatographie gereinigt oder bei -20 °C gelagert.

Um für die spätere Analyse durch SDS-PAGE eine cytoplasmatische Probe der Kultur zur Verfügung zu haben, wurde 1 ml der Kultur sedimentiert (Eppendorf, 4 °C, 5 min, 14 000 rpm), der Überstand verworfen und nach 30-minütiger Inkubation des Sediments bei 4 °C in Periplasma-Aufschlußpuffer die Sphäroplasten abzentrifugiert. Für die Herstellung einer Gesamtzellprobe fand ebenfalls eine Sedimentierung von 1 ml der Kultur durch Zentrifugation (Eppendorf, 4 °C, 5 min, 14 000 rpm) statt. Der Überstand beider Proben wurde verworfen und die Zellen in 80 µl Benzonaselösung (12,5 U ml⁻¹ in Benzonasepuffer) resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 5 x Auftragspuffer (ggf. reduzierend) für SDS-PAGE erfolgte die Lyse der Zellen unter vorsichtigem Mischen. Im Verlauf einer 1-stündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonase hydrolysiert und das Lysat anschließend bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

4.3.1.3 Berechnung der Wachstumsrate und Glukosezufuhr

Die Wachstumsrate μ der Fermentationskultur ließ sich folgendermaßen berechnen:

$$2) \quad \mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$$

Dabei ist $\ln x$ die OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t und $\ln x_0$ die OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t_0

Während der Fermentation erfolgte im Abstand von 30 min die Entnahme von jeweils 2 ml Kultur zur Bestimmung der Trockenzellmasse. Zu diesem Zweck fand eine Trocknung des Zellsediments über Nacht bei 104 °C und ein anschließendes Einwiegen der Probe statt. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{x/s}$ wurde durch das Verhältnis der gesamten Biomasse zu verbrauchter Glukose bestimmt und lag im Bereich von 0,45 - 0,5.

Die nötige Glukosemenge zum Erreichen einer gewünschten Wachstumsrate μ wurde nach Korz *et al.* (1995) berechnet:

$$ms(t) = F(t)S_F(t) = \frac{\mu(t) + m}{Y_{X/S}} V(t) X(t)$$

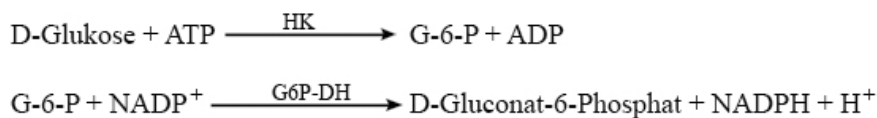
3)

Dabei ist m_s die zugeführte Substratmenge ($g\ h^{-1}$), F das Volumen der Fütterungsrate ($l\ h^{-1}$), S_F die Substratkonzentration ($g\ l^{-1}$), μ die spezifische Wachstumsrate (h^{-1}), $Y_{X/S}$ der Biomasse/Substrat Ausbeutekoeffizient von 0,5 für Glukose ($g\ g^{-1}$), m der spezifische Erhaltungskoeffizient von 0,025 für *E. coli* ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$), X die Biomassekonzentration ($g\ l^{-1}$) und V das Kulturvolumen (l).

4.3.1.4 Nachweis von Glukose und Acetat

Glukose und Acetatkonzentration wurden mit einem Kit von R-Biopharm nach den Herstellerangaben gemessen. Dazu wurden im Abstand von 30 min 1 ml Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde 1:10 und 1:100 verdünnt und photometrisch bei 340 nm gemessen.

Das Prinzip des Glukosenachweis beruhte dabei auf folgender Reaktion:



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glukose-Menge äquivalent und wird aufgrund ihrer Absorption bei 340 nm bestimmt.

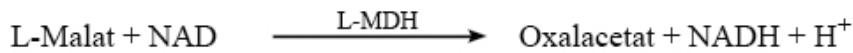
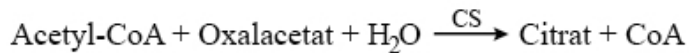
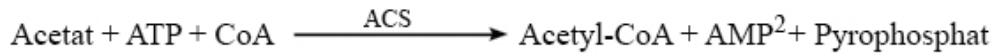
Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E (g/l)$$

4)

Dabei ist V das Testvolumen [ml], v das Probevolumen [ml], MG das Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol], d die Schichtdicke [cm] und ϵ der Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm.

Das für diese Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Indikatorreaktion aus L-Malat und Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) gebildet. Hierbei wird NAD zu NADH reduziert, wobei das Prinzip des Essigsäurenachweis auf der Umwandlung von L-Malat und NAD in Oxalacetat und NADH beruht, wie die hier dargestellte Formel zeigt.



Der Bestimmung liegt die NADH-Bildung, gemessen an der Extinktionszunahme bei 340 nm, zugrunde. Da bei der vorgeschalteten Indikatorreaktion ein Gleichgewicht vorliegt, ist die NADH-Menge der Essigsäure-Konzentration nicht direkt proportional. Zur Berechnung der $\Delta E_{\text{Essigsäure}}$ dient folgende Formel:

$$5) \quad \Delta E_{\text{Essigsäure}} = \left[(E_2 - E_0)_{\text{Probe}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Probe}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Probe}}} \right] - \left[(E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Leerwert}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}}} \right]$$

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt auch hier Formel 4.

4.3.2 Proteinchemische Methoden

4.3.2.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie

In *E. coli* produzierte und mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhänger (His₆-tag) fusionierte Proteine wurden durch Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt (Hochuli *et al.*, 1987; 1988; Skerra, 1994b). Als Säulenmaterial diente dabei an Sepharose gebundene Iminodiessigsäure, als Übergangsmetallion wurde Zn²⁺ verwendet. Als spezifische Metallbindungsstelle des rekombinanten Proteins fungierte das C-terminale His₆-tag. Zur Proteinreinigung wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet, für die Reinigung von Proteinen aus Fermentationsansätzen wurde eine 5 ml-Säule verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV-Durchflussphotometers von Biorad bei 280 nm dokumentiert. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die Probe auf 0,5 M Betain entsprechend dem Chromatographiepuffer (0,5 M Betain Monohydrat, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) eingestellt und anschließend sterilfiltriert. Die Säule wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flussrate von 20 ml/h mit 10 Säulenvolumina H₂O bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Dann wurde sie mit 10 ml (40 ml) (Angaben in Klammern gelten für 5 ml Säulenvolumina) 10 mM ZnSO₄ beladen, mit 10 Säulenvolumina H₂O nachgespült und schließlich mit 10 Säulenvolumina Chromatographiepuffer äquilibriert. Anschließend wurde die dialysierte und sterilfiltrierte periplasmatische Proteinfraktion mit einer Durchflussrate von 20 ml/h

(34 ml/h) aufgetragen, der Durchfluss aufgefangen und wiederum bis zum Erreichen der Basislinie mit Chromatographiepuffer nachgespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM Imidazol in Chromatographiepuffer bei einer Flussrate von 10 ml/h (24 ml/h). Das Eluat wurde in Fraktionen von 1,6 ml aufgefangen. Nach der Elution wurden die Zn^{2+} -Ionen mit 10 Säulenvolumina Regenerierungspuffer (50 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8,0) von der Säule entfernt und mit 100 (300) ml H_2O gespült. Die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft und das Vorhandensein und die Funktionalität des gewünschten F_{ab} -Fragments mittels Western-Blot und ELISA nachgewiesen. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an gereinigtem rekombinantem Protein wurden vereinigt.

4.3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgte unter Hochsalzbedingungen durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) nach den Angaben von Sambrook *et al.* (1989). Zur besseren Auftrennung wurde, wenn nötig, 6 M Harnstoff zum Trenngel zugesetzt (Skerra, 1994b). Es wurden jeweils 15 μ l Probenvolumen der Proteinlösungen mit reduzierendem oder nicht reduzierendem 5 x Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Beladung des Gels mit den Proben und einem Protein-Größenstandard erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 110 V solange, bis der Bromphenolblau-Marker nach ca. 2 h aus dem unteren Ende des Trenngels austrat. Die über 12 %ige bzw. 14 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese mit PageBlue™ Protein Staining Solution von Fermentas Coomassie gefärbt oder in der Silberfärbung sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel zur Entfärbung des Hintergrundes in H_2O gewaschen und schließlich zur Dokumentation gescannt.

4.3.2.3 Konzentrierung von Proteinen

Vor der Lyophilisierung wurden die Proben mittels einer Konzentratoreinheit mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Amicon) durch Zentrifugation (Eppendorf, 4 °C, 2000 rpm) gewaschen, in H_2O umgepuffert und auf das gewünschte Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein durch Zentrifugation bei 14 000 rpm abgetrennt und der Überstand entnommen. Das Protein wurde bei 4 °C gelagert oder lyophilisiert.

4.3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration (c) der Proteinlösungen wurde durch die Messung der Absorption (A) bei 280 nm in einer Polystyrolküvette mit der Schichtdicke $d = 1$ cm nach dem Lambert-Beerschen Gesetze bestimmt:

$$A_{280nm} = \epsilon_{280nm} \cdot c \cdot d$$

6)

Der spezifische molare Absorptionskoeffizient, früher Extinktionskoeffizient, ϵ bei 280 nm (ϵ_{280nm}) des F_{ab} -Fragments von $70\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ergibt sich aus der Summe der Absorptionen von Tryptophan (5690), Tyrosin (1280) und Cystein (120) (Gill und von Hippel, 1989).

4.3.3 Immunochemische Methoden

4.3.3.1 Western-Blot

Für die immunochemische Analyse im Western-Blot wurden die Proben zunächst mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt (4.3.2.2). Anschließend wurden sie mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran überführt und in immunochemischen Verfahren selektiv gefärbt. Die Immunreaktion fand entweder durch Inkubationen mit einem HRP-gekoppelten Primär-AK bzw. Tracer statt, oder aber ein zunächst an die Probe gebundener Primär-AK wurde mittels eines HRP-gekoppelten Sekundär-AK nachgewiesen. Durch Inkubation in Western-Blot-Entwicklerlösung konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Für den anschließenden Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran wurden Whatman-Filterpapiere mit Blot-Puffer (SDS-PAGE-Laufpuffer mit 20 % (v/v) Methanol) getränkt und auf die Graphit-Anode der Elektroblot-Apparatur geschichtet. Auf diesen Stapel wurde die mit Methanol aktivierte und anschließend für 15 min in Blot-Puffer inkubierte PVDF-Membran und auf diese das Trenngel gelegt und mit weiteren Filterpapieren überschichtet. Der Proteintransfer erfolgte nach Auflegen der Graphit-Kathodenplatte für 1,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA. Anschließend wurde die Membran entnommen und für 30 min in PBS geschwenkt. Die Inkubation der Membran fand über Nacht bei 4 °C in Blockierpuffer (3 % Magermilchpulver in PBS) statt. Die Immunreaktionen mit Primär- und ggf. Sekundär-AK erfolgte bei RT und dauerten jeweils 2 h.

Das F_{ab} -Fragment K411B wurde entweder über das His₆-tag (1:2500) mit Hilfe eines HRP-gekoppelten 1:2500 verdünnten Maus-anti-His₆-tag-AK, eines HRP-gekoppelten Atrazin-Tracers (1,5 mg ml⁻¹) in der Verdünnung 1:2500 oder eines HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-AK (1:2500 verdünnt) detektiert. Das Kaninchen F_{ab} -Fragment, die HC und die LC wurden sowohl über den HRP-gekoppelten 1:2500 verdünnten Maus-anti-His₆-tag-AK als

auch über einen 1:2500 verdünnten HRP-gekoppelten Anti-Kaninchen-AK gegen die LC bzw. einen 1:2500 verdünnten HRP-gekoppelten Anti-Kaninchen-AK gegen IgG detektiert. Das große Hüllprotein (g3p) filamentöser Phagen wurde mit einem Maus-anti-g3p-AK in einer Verdünnung von 1:2500 und einem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG AK (1:2500 verdünnt) detektiert. Bei Immunreaktionen mit Primär-AK folgte auf drei Waschschritte in PBS eine zweite, 2-stündige Immunreaktion mit dem HRP-gekoppelten Sekundär-AK. Die Substratreaktion erfolgte nach 3 x 10-minütigem Waschen in PBS in Western-Blot-Entwicklerlösung und wurde nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität durch mehrfaches Waschen mit H₂O gestoppt. Die Membran wurde abschließend an der Luft getrocknet.

4.3.3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Atrazin-ELISAs zum Nachweis des AK K411B handelt es sich um kompetitive Verfahren, bei denen eine Mikrotiterplatte mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtet wurde. Die Zugabe verschiedener Verdünnungen der periplasmatischen Proteinfraction des murinen F_{ab}-Fragments K411B und Detektion mit einem HRP-gekoppelten Atrazin-Tracer bzw. dem Atrazin-Tracer und zusätzlich Atrazin zur Verdrängung der AK-Antigenbindung ließ Rückschlüsse auf die Spezifität der Bindung des F_{ab}-Fragments zu.

Zur Durchführung des Assays wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte jeweils 200 µl 50 mM Carbonatpuffer mit 5 µg ml⁻¹ Ziege-Anti-Maus-AK gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle folgenden Schritte fanden bei RT statt. Die Mikrotiterplatte wurde dreimal im Mikrotiterplattenwaschautomat mit PBST gewaschen und zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen an der Oberfläche der Mikrotiterplatte erfolgte eine Inkubierung jeder Vertiefung für 1 h mit jeweils 300 µl einer Blockierungslösung (2 % MMP (w/v) in PBST). Nach dem Blockieren wurden die Vertiefungen dreimal mit PBST gewaschen und ausgeklopft. Anschließend wurden zur Detektion der Antikörper entweder 50 µl des 1:5000 verdünnten HRP-gekoppelten Atrazin-Tracers (1,5 mg ml⁻¹) (Kramer *et al.*, 2002) in jede Vertiefung pipettiert oder zur Analyse der Spezifität der Bindung zusätzlich je 200 µl Atrazin in einer Konzentration von 1 mg l⁻¹ und 50 µl des verdünnten Tracers in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h wurde erneut gespült. Schließlich wurden 200 µl einer Lösung bestehend aus 1 Teil TMB-Chromogenlösung und 2 Teilen Substratpuffer in jede Vertiefung gegeben und der Assay 20 min bei Dunkelheit inkubiert.

Für alle hier beschriebenen ELISA-Assays gilt, dass sich an die Farbreaktion kein

Waschschritt anschloss. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl 4 N H₂SO₄ pro Vertiefung beendet. Die Farbreaktion würde ohne die Beendigung mit H₂SO₄ bis zum Zerfall des entstandenen lichtempfindlichen, blauen Charge-Transfer-Komplex fortgesetzt. Dieser Komplex entsteht durch die POD-katalysierte radikalische Oxidation von TMB. H₂SO₄ wandelt den Charge-Transfer-Komplex in das stabile 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion um (Gallati und Pracht, 1985). Die Absorption wurde bei 450 nm photometrisch gemessen.

4.4 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Darstellung der Primär- und Sekundärstruktur der Plasmide sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurde das Programm Vector NTI von Stratagene, der im World Wide Web zugängliche NCBI-Blast von pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und das ebenfalls im World Wide Web zugängliche Programm Oligocalc (<http://basic.nwu.edu/biotools/oligocalc>) verwendet.

Agarosegele und Gele aus der SDS-PAGE sowie die PVDF Membranen des Western-Blot wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 9.0 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert.

Die Funktionalität der Signalpeptidase-Schnittstellen wurde mit dem im World Wide Web zugänglichen Programm SIGNAL P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) überprüft. Diagramme wurden mit Excel (Office XP) erstellt. Die Verwaltung der Literatur erfolgte mit EndNote 9.0 (Thomson).

5 Ergebnisse

Die Etablierung des Expressionssystems zur Hochzelllichtfermentation rekombinanter AK erfolgte mittels des murinen AK-Fragments K411B, dessen korrekte periplasmatische Faltung bereits überprüft worden war (5.1). Anschließend wurde der Expressionsvektor entsprechend den Besonderheiten verändert, die die Expression leporider AK mit sich bringt. Die Proteinausbeute der Hochzelllichtfermentation konnte durch die zusätzliche Expression von Faltungshelferproteinen und Adaptierung des Fermentationsprotokolls schrittweise gesteigert werden (5.2). Die Konstruktion der Phagemide zur Expression von Fusionsproteinen, bestehend aus F_{ab}-Fragment und g3p, mit dem Ziel, ein zur Selektion spezifischer Kaninchen-AK geeignetes *Phage Display*-System zu entwickeln, erfolgte ebenfalls stufenweise (5.3). Der Konstruktion des Kaninchen-spezifischen Phagemids folgte die Expression des F_{ab}-Fragments bzw. des Fusionsproteins zusammen mit Faltungshelferproteinen als erster Schritt auf dem Weg zum *Phage Display*. Abb. 47 (S.103) zeigt eine Übersicht über alle hier verwendeten und hergestellten Expressionsvektoren und Phagemide.

5.1 Bakterielle Produktion und Reinigung des murinen Antikörpers K411B

5.1.1 Expression des murinen Antikörpers K411B, inseriert in pASK85-K411B

Der rekombinante murine AK K411B gegen Atrazin, näher beschrieben in Kap. 6.1.1, besteht aus leichter Kette (*light chain*, LC) und schwerer Kette (*heavy chain*, HC), die über Cysteinreste miteinander verbunden ein F_{ab}-Fragment von ca. 45 kDa ergeben (Abb. 1, 2). In allen verwendeten und hier konstruierten Vektoren (Übersicht Abb. 47) stehen die Strukturgene für LC und HC unter der Kontrolle des dicht reprimierten *tet*-Promotor/Operator-Systems. Die Genexpression wird durch Anhydrotetracyclin (aTc) induziert. Die Ketten werden nach der Expression mittels ihrer Signalsequenz separat durch die Periplasmamembran in den periplasmatischen Raum sekretiert. Dort werden die Signalsequenzen abgespalten, und die Polypeptide können im oxidierenden Milieu des Periplasma gefaltet werden. Dabei bilden sich die inter- und intrachenen Disulfidbrücken, und LC und HC lagern sich zum F_{ab}-Fragment zusammen (Skerra, 1989).

Im Plasmid pASK85-K411B (Abb. 8, Skerra, 1994a; Kramer und Hock, 1996; Kramer *et al.*, 2002) liegt das Strukturgen für die HC des F_{ab}-Fragments K411B am 5'-Ende fusioniert

an die bakterielle Signalsequenz des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) vor (Movva *et al.*, 1980), die der Sekretion in das Periplasma dient (Abb. 7). Am 3'-Ende trägt es die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (His₆-tag) (Skerra, 1994b). Das Strukturgen für die LC liegt am 5'-Ende fusioniert an die bakterielle Signalsequenz der *Alkalischen Phosphatase* (PhoA) vor (Kikuchi *et al.*, 1981).

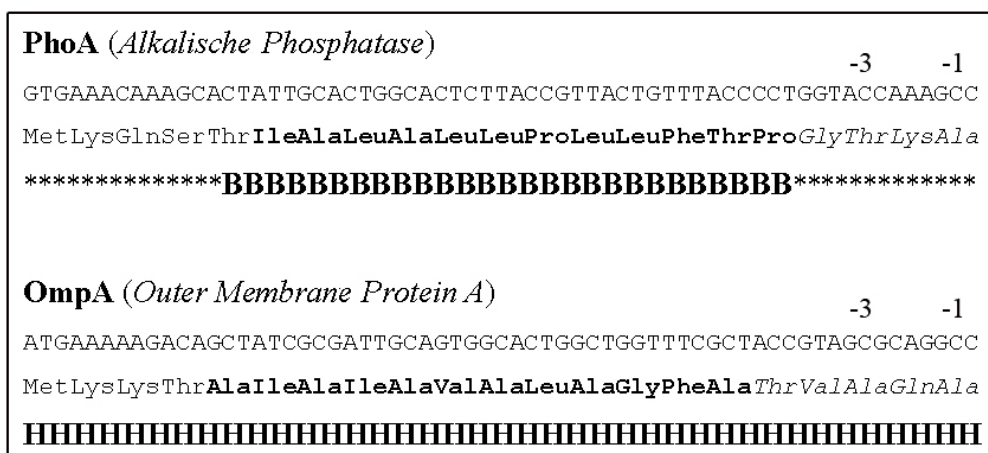


Abbildung 7: Primär- und Sekundärsequenz der Signalsequenzen OmpA und PhoA.

PhoA und OmpA folgen dem klassischen Aufbau aus positiv geladener, N-terminaler n-Region und hydrophober h-Region (fettgedruckt), die an der Sekretion beteiligt sind, gefolgt von der C-terminalen c-Region (kursiv) mit der Signalpeptidase I-Erkennungssequenz (Position -3 und -1 AS gezeigt). Für OmpA besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer α -Helix-Konformation (H), für PhoA eher einer β -Faltblattstruktur (B) bzw. zufälliger coil-Strukturen (Asterisk) (Collier, 1994).

Die Expression des AK K411B mittels des Plasmids pASK85-K411B wurde unter Standardbedingungen im Schüttelkolben im *E. coli*-Stamm JM83 in 500 ml LB-Medium durchgeführt (4.3.1.1). Die Induktion der Expression erfolgte durch aTc. Nach 2,5-stündiger Expression wurden die Zellen, die keine Anzeichen von Zelllyse zeigten, durch Zentrifugation geerntet. Untersuchungen zur Toxizität des F_{ab}-Fragments ergaben auch nach 4-stündiger Expression keine Zeichen von Zelllyse. In diesem Expressionssystem geht demnach keine für die Zellen toxische Wirkung von dem F_{ab}-Fragment K411B aus.

Der Nachweis des AK K411B erfolgte im Western-Blot (Abb. 9). Dazu wurde die periplasmatische Fraktion im 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach SDS-PAGE (4.3.2.2) wurde das F_{ab}-Fragment im Western-Blot (4.3.3.1) bei 45 kDa anhand des spezifischen HRP-gekoppelten Atrazin-Tracers nachgewiesen. Dies bestätigte Ergebnisse von Lange *et al.* (2001), die das K411B F_{ab}-Fragment ebenfalls bei 45 kDa detektiert hatten.

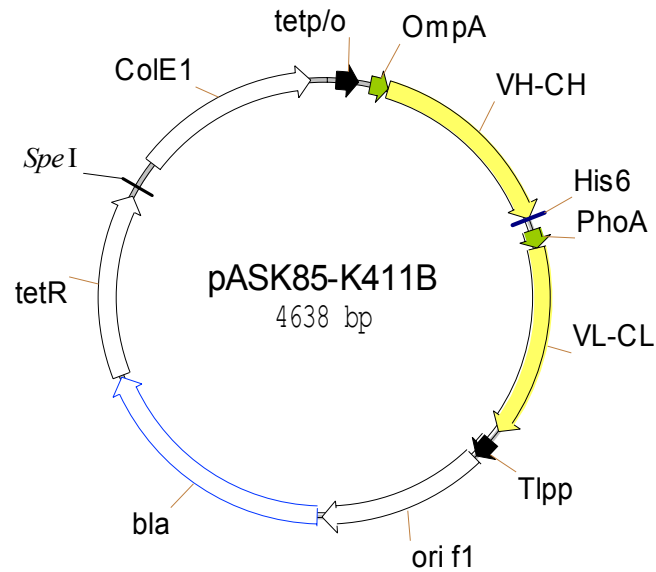


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASK85-K411B.

Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{p/o}$) für ein Fusionsprotein, bestehend aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, der HC (V_H-C_H) des murinen AK K411B und dem His₆-tag und für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen PhoA-Signalsequenz und der LC (V_L-C_L) des AK K411B. Die dicistronische Transkriptionseinheit wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (Tlpp) beendet. In einem weiteren dicistronischen Operon findet sich hinter dem β -Lactamasegen (*bla*), das für die Ampicillin-Resistenz (Amp) sorgt, das Gen des *tet*-Repressors (*tetR*). Durch die konstitutive Expression des *tet*-Repressor-Gens wird die Repression des *tet*-Promotors gewährleistet. ColE1 bezeichnet den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie und *ori f1* die intergenische Region des Phagen f1 (nach Kramer *et al.*, 2002).

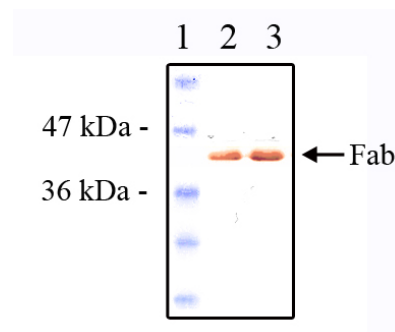


Abbildung 9: Analyse der Expression des AK K411B kodiert auf pASK85-K411B im Western-Blot.

Protein-Marker (Spur 1) und zwei exemplarische, nicht reduzierte Periplasmafraktionen (Spur 2 und 3), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran wurde das F_{ab}-Fragment K411B (45 kDa) im Western-Blot mittels des HRP-gekoppelten Atrazin-Tracers immunchemisch nachgewiesen.

Die Untersuchung der AK-Bindungseigenschaften des murinen Atrazin-F_{ab}-Fragments erfolgte im kompetitiven Atrazin-ELISA (4.2.3.2). Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden dazu mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtet und anschließend mit einer Verdünnungsreihe der Periplasmafraktion inkubiert. HRP-gekoppelter Atrazin-Tracer und parallel dazu Atrazin zur Verdrängung der Bindung wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation fand eine Farbreaktion, ausgelöst durch TMB-Chromogen, statt. Die Ergebnisse der photometrischen Messung bei 450 nm lassen auf eine spezifische Bindung des AK an Atrazin schließen, da die Kontrolle mit der verdrängten Bindung nur vernachlässigbare Signale aufwies (Abb. 10).

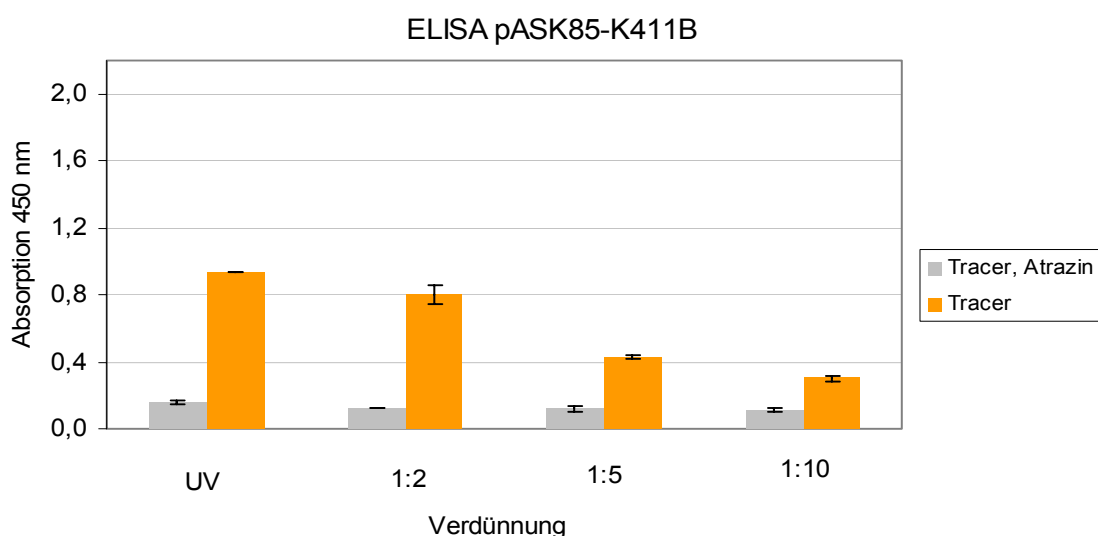


Abbildung 10: Kompetitiver ELISA zum Nachweis der Bindungseigenschaften des AK K411B.

Untersuchung der Spezifität des F_{ab}-Fragments, kodiert auf pASK85-K411B. Eine mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit der unverdünnten Periplasmafraktion (UV) und den Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10 inkubiert. Zum Nachweis des AK wurde der HRP-gekoppelte Atrazin-Tracer eingesetzt (orange). Um die Spezifität des AK K411B für Atrazin zu überprüfen, wurde die AK-Tracer-Bindung durch Hinzufügen von Atrazin verdrängt (grau). Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und die Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Verdrängung der AK-Tracer-Bindung durch Atrazin ist deutlich zu erkennen.

5.1.2 Konstruktion des Expressionsvektors pASK85-pro-K411B

Die Hochzeldichtefermentation des murinen und später auch des leporiden F_{ab}-Fragments sollte im für diese Zwecke bewährten *E. coli*-Stamm K12 JM83 durchgeführt werden. Um den prolinauxotrophen Stamm verwenden zu können, musste zunächst das *proBA*-Gen in den Vektor pASK85-K411B inseriert werden (Fiedler und Skerra, 2001). Dazu war die

Isolierung und Reinigung der genomischen DNA einer 5 ml über Nacht-Kultur des *E. coli*-Stamms K12-W3110 mittels eines Kits von Molzym notwendig (4.2.3.1). Daran anschließend wurde der Genabschnitt *proBA* einschließlich seines Promotors und des Transkriptionsterminators mit den in Anlehnung an Fiedler und Skerra (2001) hergestellten Primern revpABSpeI und forpABSpeI sowie der genomischen DNA als Matrize durch PCR unter Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert (4.2.4.3). Um das Genfragment über die Restriktionsschnittstelle *SpeI* in den Vektor pASK85-K411B inserieren zu können, wurde mit Hilfe der Primer revpABSpeI und forpABSpeI (Tab. 7) am 5'- und am 3'-Ende die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *SpeI* eingeführt.

Die Spaltung des mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigten *proBA*-Amplifikats (Abb. 11 A) und des Vektors pASK85-K411B (Abb. 8) erfolgte im Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *SpeI*. Anschließend wurden die Enden des Plasmids mit antarktischer Phosphatase dephosphoryliert (4.2.4.4) und die gereinigten Fragmente mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft (4.2.4.5). Der Ligationsansatz wurde in elektrokompente *E. coli* JM83 transformiert (4.2.2) und 16 h inkubiert. Aus fünf Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert. Der Klonierungserfolg wurde sowohl durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *SacII* und *HindIII* (Abb. 11 B, Abb. 12) als auch mit Hilfe einer PCR und den hierfür hergestellten Primern revproAB und forproAB, die innerhalb der Amplifizierungsprimer binden, und daran anschließender Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 11 C).

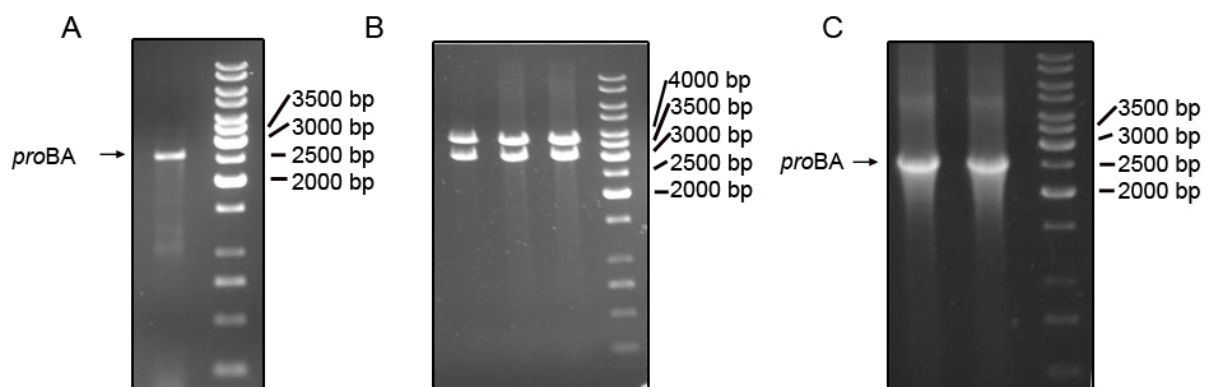


Abbildung 11: Nachweis von *proBA* mittels Agarose -Gelelektrophorese.

(A) *proBA*, amplifiziert aus der genomischen DNA von *E. coli* W3110 mit den Primern revpABSpeI und forpABSpeI. (B) pASK85-pro-K411B nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *SacII* und *HindIII*. (C) *proBA* amplifiziert mit den Primern revproAB und forproAB und pASK85-pro-K411B als Template. Da diese Primer innerhalb der Primer revpABSpeI und forpABSpeI binden, ist das Amplifikat etwas kleiner als in (A).

Das Plasmid wurde als pASK85-pro-K411B bezeichnet (Abb. 12) und der Einbau des *proBA*-Genfragments gegen den Uhrzeigersinn durch Sequenzanalyse mit den Primern seqproAforneu, seqproBrevneu, SeqColETetRrev und TetRfor bestätigt. Die Funktionalität von pASK85-pro-K411B hinsichtlich der Komplementierung der Δ *proBA*-Mutation von *E. coli* JM83 konnte durch Anzucht entsprechender Transformanden auf Glukose-Minimalmedium-Agarplatten mit Amp als Selektionsmarker und anschließender Kultur in 100 ml synthetischem Minimalmedium nachgewiesen werden.

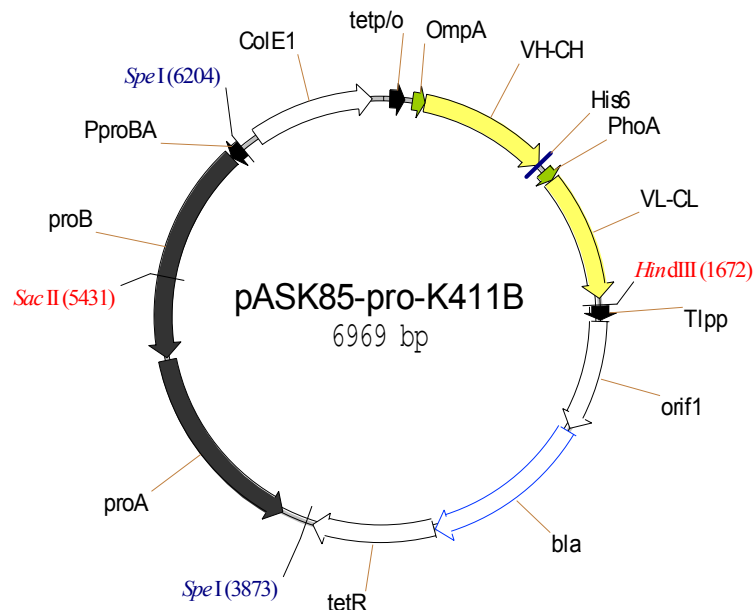


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASK85-pro-K411B.

proBA steht unter der Kontrolle des *proBA*-Promotors (PproBA). *proB* kodiert für die γ -Glutamylkinase, *proA* für die Glutamat-5-Semialdehyd-Dehydrogenase, die restlichen Abkürzungen entsprechen denen von pASK85-K411B (Abb. 8). Die DNA-Sequenz von pASK85-pro-K411B findet sich im Anhang.

5.1.3 Expression des Antikörper-Fragments K411B inseriert in pASK85-pro-K411B

5.1.3.1 Expression im Schüttelkolben und im Fermenter

Die bakterielle Produktion des rekombinanten AK K411B im Schüttelkolben (4.3.1.1) erfolgte im *E. coli*-Stamm JM83 im 500 ml-Maßstab. Nach Induktion der Expression durch aTc folgte eine 2,5-stündige Induktion bei 25 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0, ohne dass dabei Anzeichen von Zellyse auftraten. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation und die periplasmatische Fraktion wurde präpariert (4.3.1.1). Mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung sowie Analyse im Western-Blot konnte das F_{ab}-Fragment (45 kDa) nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Zur Kontrolle des *tet*-Promotors wurden zusätzlich vor der Induktion entnommene Proben auf das Vorhandensein des K411B F_{ab}-Fragments

untersucht. Es wurde keine Expression ohne vorherige Induktion festgestellt. Die Spezifität des F_{ab}-Fragments K411B konnte anschließend im kompetitiven Atrazin-ELISA (4.3.3.2), wie er bereits für pASK85 durchgeführt worden war, bestätigt werden.

Um eine höhere Proteinausbeute zu ermöglichen, wurde ein Fermentationsverfahren, das homöostatische Wachstumsbedingungen mit einem *fed-batch*-Verfahren kombiniert und bereits erfolgreich zur funktionellen Produktion von AK-Fragmenten eingesetzt wurde (Schiweck und Skerra, 1995), an die Expression des AK K411B im 2 l-Fermenter adaptiert. Die Produktion erfolgte im *E. coli*-Stamm JM83 (4.3.1.2), transformiert mit dem Plasmid pASK85-pro-K411B. Durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm im Abstand von 30 min wurde das Wachstum der Kultur dokumentiert. Durch Trocknung der dabei entnommenen Proben über Nacht bei 104 °C im Trockenschrank wurde die Trockenzellmasse bestimmt. Gleichzeitig wurden in regelmäßigen Abständen Glukose- und Acetatkonzentration im Medium mit Kits von Roche (4.3.1.4) sowie pO₂- und pH-Wert über eingebaute Elektroden gemessen und die Wachstumsrate μ berechnet. Basierend auf den Ergebnissen wurde mit Hilfe von Berechnungen von Korz *et al.* (1995) das Glukosefütterungsprotokoll schließlich auf eine Wachstumsrate von $\mu = 0,19$ eingestellt (4.3.1.3) und dadurch eine Glukosekonzentration von durchschnittlich 2,3 g l⁻¹ und eine Acetatkonzentration von 0,8 g l⁻¹ erreicht. Die Zellen zeigten während der *batch*-Phase ein reproduzierbares exponentielles Wachstum und hatten nach ca. 20 h eine OD₆₀₀ von 20 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Genexpression durch aTc induziert. Nach 2,5-stündiger Induktion wurden die Zellen, die keinerlei Anzeichen von Zellyse zeigten, bei einer OD₆₀₀ von 40-45 geerntet und die periplasmatische Fraktion präpariert. Um eventuellen Plasmidverlust zu überprüfen, wurden im Abstand von 30 min Minimalmedium-Kulturplatten mit und ohne Amp mit einer Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension bestrichen. Der Vergleich der Kulturplatten, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden, wies auf keinen signifikanten Plasmidverlust hin.

5.1.3.2 Reinigung und Analyse des Antikörpers K411B

Das F_{ab}-Fragment K411B wurde über Metallchelate-Affinitätschromatographie (4.3.2.1) gereinigt. Die periplasmatische Fraktion wurde mittels eines Elutionsgradienten von 0 mM – 300 mM Imidazol in unspezifisch und spezifisch bindende Fraktion aufgetrennt. In Abb. 13 ist ein für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Chromatographien geltendes, schematisches IMAC-Verlaufsprofil mit dem ansteigenden Imidazolgradienten dargestellt, Abb. 14 zeigt das Elutionsprofil der murinen AK K411B.

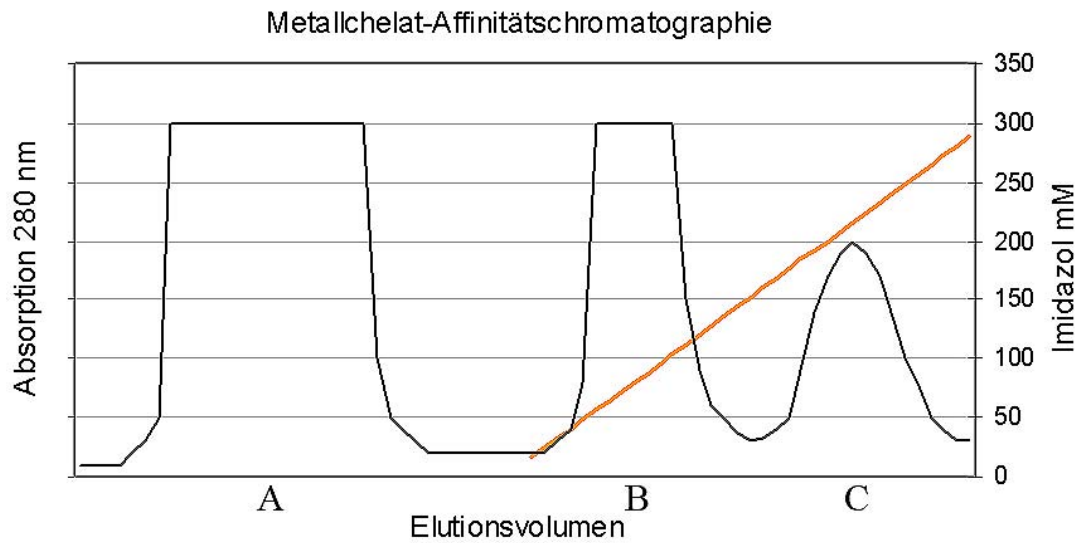


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines IMAC-Verlaufsprofils.

(A) Beladen der Säule. Ein Großteil der bakteriellen Proteine läuft über die Säule, ohne gebunden zu werden. (B) Unspezifisch gebundenes Protein wird ausgewaschen. (C) Elution des über ein His₆-tag spezifisch gebundenen Proteins. Der Elutionsgradient (orange) steigt im Verlauf der IMAC von 0 mM auf 300 mM Imidazol. Die Messung der Absorption erfolgt bei 280 nm.

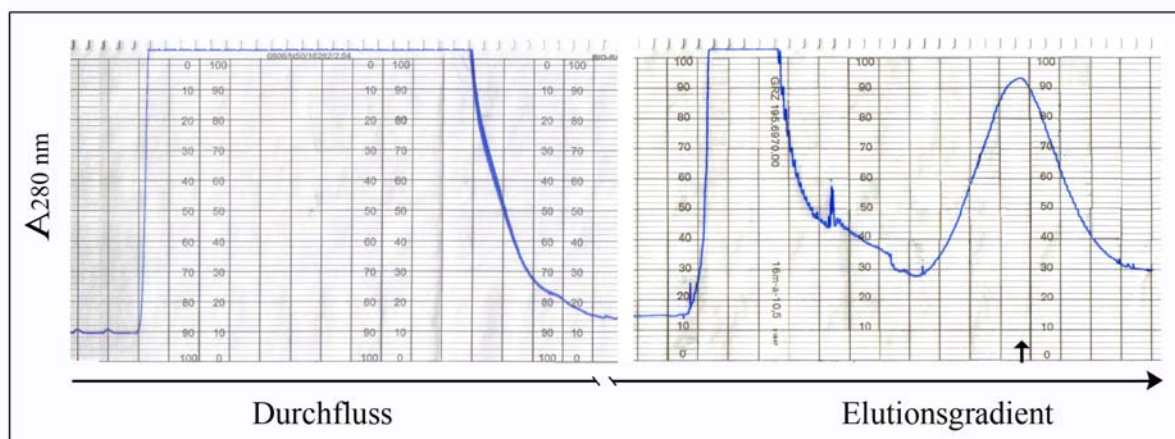


Abbildung 14: IMAC zur Reinigung des AK K411B kodiert auf pASK85-pro-K411B.

Die Trennung in unspezifisch und spezifisch gebundene Fraktion erfolgte über eine 5 ml Fast-Flow Sepharose-Säule. Die Säule wurde mit der periplasmatischen Fraktion beladen. Daran anschließend fand die Elution mittels eines Imidazolgradienten statt, wobei die Einstellung des Schreibers 100mV, 6 cm/h Vorschub und einen Absorptionsbereich von 2,0 betrug. Die photometrische Messung des Proteins erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verlaufsprofil zeigt die nicht gebundene Fraktion, den so genannten Durchfluss, gefolgt von der unspezifisch gebundenen Fraktion, eluiert bei niedriger Imidazolkonzentration und der spezifischen Proteinfraction in einem symmetrischen Peak (Pfeil) bei steigender Imidazolkonzentration. Aufgrund eines Schreiberpapierwechsels nach der Beladung der Säule kam es zu einer kurzen Unterbrechung der Aufzeichnung.

Die Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt (Abb. 15, A, B), vereinigt und über Konzentratoren in H₂O umgepuffert und aufkonzentriert (4.3.2.3). Zum Nachweis des AK K411B wurde ein Western-Blot mit HRP-gekoppeltem Atrazin-Tracer bzw. Maus-anti-His₆-AK durchgeführt (Abb. 15, C, D).

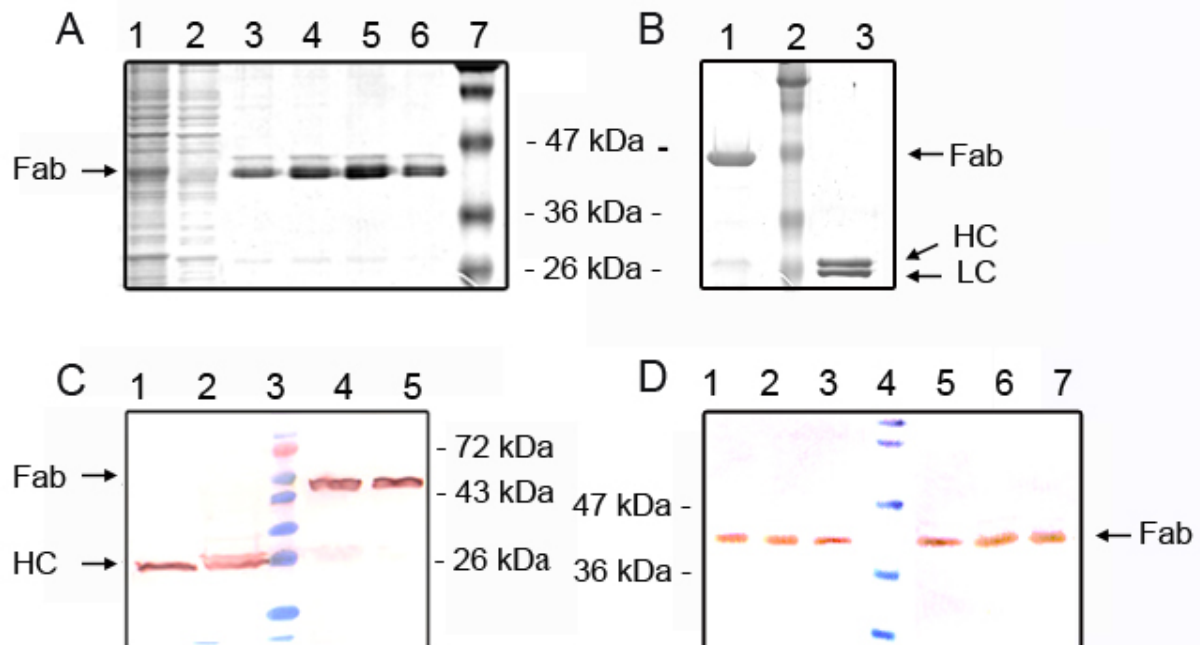


Abbildung 15: Analyse des AK K411B kodiert auf pASK85-pro-K411B in SDS-PAGE und Western-Blot.

Über SDS-PAGE aufgetrennte Fraktionen der IMAC wurden Coomassie-gefärbt (A, B) bzw. im Western-Blot immunchemisch analysiert (C, D). (A) Periplasmatischer Proteinextrakt (Spur 1), Durchfluss (Spur 2), vier exemplarische Eluatfraktionen der IMAC im nicht reduzierten Zustand (Spur 3-6), Protein-Marker (Spur 7), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. (B) Nicht reduzierte (Spur 1) und reduzierte (Spur 3) IMAC-gereinigte Periplasmafraktion, aufgetrennt über ein 14 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Das F_{ab}-Fragment K411B (45 kDa) sowie LC (24 kDa) und die HC (26 kDa) wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Western-Blot zum immunchemischen Nachweis des AK K411B anschließend an die SDS-PAGE (C, D). (C) Zwei exemplarische, IMAC-gereinigte und reduzierte Periplasmafraktionen (Spur 1, 2), Protein-Marker (Spur 3) sowie zwei nicht reduzierte Periplasmafraktionen (Spur 4 und 5). F_{ab}-Fragment (45 kDa) und HC (26 kDa) wurden über das His₆-tag mittels eines HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK nachgewiesen. (D) Nicht reduzierte, IMAC-gereinigte, spezifische Periplasmafraktionen (Spur 1-3, 5-7) und ein Protein-Marker (Spur 4), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Anschließend wurde das F_{ab}-Fragment (45 kDa) mittels eines HRP-gekoppelten Atrazin-Tracers nachgewiesen. Die Molmassen des Protein-Markers sind in kDa angegeben.

Wie in 5.1.1. konnten das gereinigte F_{ab}-Fragment (45 kDa), die LC (24 kDa) und die HC (26 kDa) sowohl mittels SDS-PAGE (4.3.2.2) und anschließender Coomassie-Färbung als auch im Western-Blot (4.3.3.1) mittels des spezifischen Atrazin-Tracers und des Maus-anti-His₆-AK nachgewiesen werden. Das bestätigte Ergebnisse von Kusharyoto (2001) und Lange *et al.* (2001), die K411B ebenfalls exprimiert und das F_{ab}-Fragment bei 45 kDa bzw. die HC bei 26 kDa nachgewiesen hatten.

Die Proteinkonzentration der vereinigten Fraktionen wurde berechnet (4.3.2.4). Die Protein-Ausbeute einer K411B-Expression mittels des Expressionsvektors pASK85-pro-K411B in *E. coli* K-12 im Fermenter konnte durch Adaptierung der Glukosefütterung von 8,9 mg (160 µg l⁻¹ • OD₆₀₀) auf 13,8 mg (240 µg l⁻¹ • OD₆₀₀) gesteigert werden.

Zur Analyse der AK-Bindungseigenschaften des F_{ab}-Fragments K411B wurde ein kompetitiver Atrazin-ELISA durchgeführt (4.3.3.2). Mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit einer Verdünnungsreihe des mittels IMAC gereinigten F_{ab}-Fragments inkubiert. Die Proben wurden mit dem HRP-gekoppelten Atrazin-Tracer bzw. dem Tracer und zusätzlich Atrazin zur Verdrängung der AK-Tracer-Bindung inkubiert (Abb. 16).

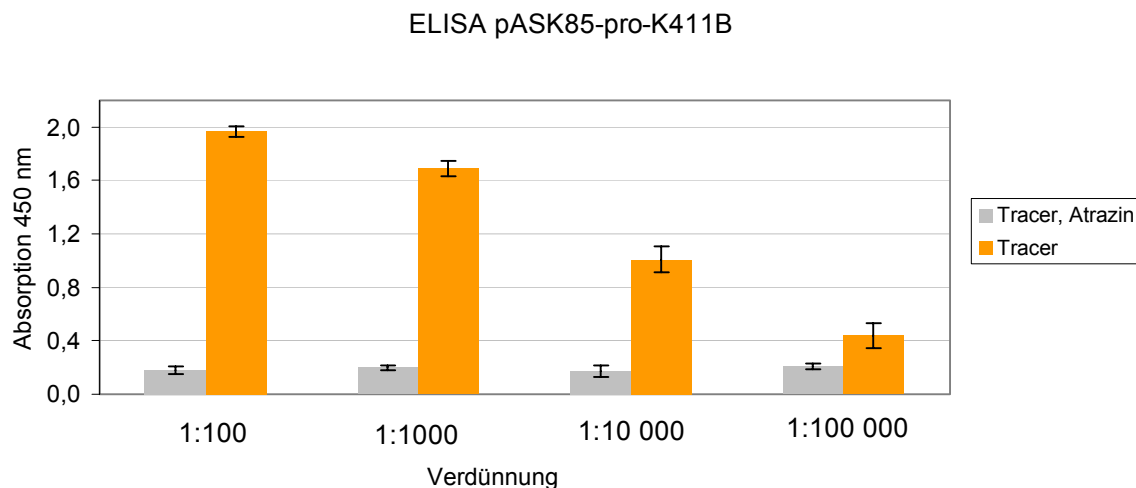


Abbildung 16: Kompetitiver ELISA zum Nachweis der Bindungseigenschaften des AK K411B.

Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtet und die gereinigte periplasmatische Fraktion in den Verdünnungen 1:100, 1:1000, 1:10 000 und 1:100 000 aufgetragen. Nach Inkubation wurde Atrazin-Tracer (orange) bzw. Atrazin-Tracer und Atrazin (grau) zur Verdrängung der AK-Antigenbindung zugegeben. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und ist mit Standardabweichungen (n=3) dargestellt. Die Spezifität des F_{ab}-Fragments für Atrazin wird durch die Verdrängung der AK-Tracer-Bindung durch Atrazin deutlich.

Auch die 1:100 000 verdünnte periplasmatische Fraktion zeigte eine deutliche höhere Absorption als die Kontrolle mit dem freien Atrazin. Dieses Ergebnis weist auf eine spezifische Bindung des K411B-F_{ab}-Fragments, exprimiert mittels pASK85-pro-K411B, hin und bestätigt frühere Ergebnisse (5.1.1).

5.2 Kaninchen-spezifische Expressionsvektoren und Phagemide

Das Expressionssystem zur Produktion muriner F_{ab}-Fragmente im Fermenter sollte auf die Herstellung von Kaninchen-F_{ab}-Fragmenten übertragen und ein zum Expressionsvektor äquivalentes *Phage Display*-System entwickelt und getestet werden. Dazu musste eine Kaninchen-spezifische Klonierungsstelle (Rab) und die entsprechenden Plasmide hergestellt werden. Für die Durchführung der Experimente wurden Expressionsvektoren mit der Rab und den Ig-Strukturgenen der Maus (pASK85Rab-pro-K411B, Abb. 26) bzw. mit der Rab und den Strukturgenen des Kaninchens (pASK85Rab-pro-WR13, Abb. 34) konstruiert. Bei den Strukturgenen des Kaninchens handelte es sich um die leichte κ 1-Kette und die schwere IgG Kette eines F_{ab}-Fragments (Sequenz s. Anhang), kloniert aus der cDNA eines nicht immunisierten Kaninchens (beschrieben in Kap. 5.2.4.1) der Rasse *Deutscher Riese*. Außerdem wurden unterschiedliche Phagemide mit der Rab und p3, dem für das *Phage Display* notwendigen großen Hüllprotein (g3p) des Phagen M13, hergestellt. Diese waren entweder mit dem Selektionsmarker Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (*Cat*) (basierend auf pASK111, Abb. 23) oder mit der β -Lactamase (*bla*) (basierend auf pASK85-K411B, Abb. 8) ausgestattet. Sie enthielten teilweise die Strukturgene der Maus (pASK111Rab-p3-K411B, Abb. 24) und teilweise die des Kaninchens (pASK111Rab-p3-WR13, Abb 32, pASK85Rab-p3-WR13, Abb 43). Dabei dienten die murinen Strukturgene der Überprüfung der Funktionalität der Signalsequenzen in dem jeweiligen System. Eine Übersicht über alle Vektoren zeigt Abb. 47.

5.2.1 Bestandteile der Kaninchen-spezifischen Klonierungsstelle

Um den Vektor für die Expression und das *Phage Display* von Kaninchen-F_{ab}-Fragmenten kompatibel zu machen, wurde eine neue Klonierungsstelle speziell für Kaninchen entwickelt (Abb. 17). Der Konstruktion der Rab ging eine Internetrecherche voraus (Schüller, Lehrstuhl für Zellbiologie, Freising, unveröffentlicht) die ergab, dass die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *KpnI* nicht in den Strukturgenen der über 40 überprüften Kaninchen-LC-Sequenzen auftreten und somit für die Klonierung der LC geeignet sind. In den Strukturgenen der HC sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen

AsiSI und *MluI* nicht vorhanden und bieten sich deshalb zur Klonierung an. Die Restriktionsendonuklease *SacII* konnte lediglich in 1,8 % der überprüften über 40 Strukturgene für $V_{L\kappa}$, nicht aber in der HC nachgewiesen werden. *SacII* und *NcoI* dienen der Umklonierung der gesamten Expressionskassette einschließlich des His₆-tags. *XbaI* und *HindIII* wurden als flankierende Restriktionsschnittstellen zur Insertion der Rab in das Plasmid pASK85-pro-K411B gewählt.

Der Aufbau der Rab sieht eine Umkehr der Reihenfolge der Strukturgene im Vergleich zu pASK85-K411B und pASK85-pro-K411B vor. Das Strukturgen der LC liegt am 5'-Ende fusioniert an die bakterielle hydrophobe Signalsequenz des *Ribose-Binding Proteins* (RBP) (Willis und Furlong, 1974; Groarke *et al.*, 1983) vor und geht dem Strukturgen für die HC voraus (Abb. 18). Letzteres liegt zur Sekretion in das Periplasma am 5'-Ende fusioniert an die bakterielle Signalsequenz des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) (Movva *et al.*, 1980) vor und trägt am 3'-Ende die kodierende Sequenz für ein His₆-tag (Skerra, 1994b).

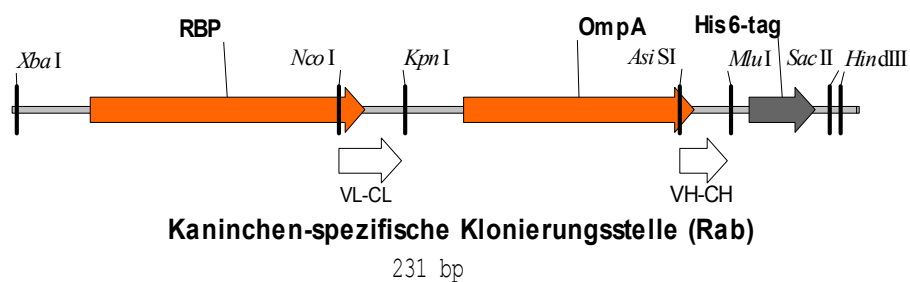


Abbildung 17: Schematische Darstellung und Primärstruktur der Rab.

Schematische Abbildung der Rab mit den Signalsequenzen RBP und OmpA (orange), den Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen für die Insertion der V_{L-C_L} (weiß) zwischen *NcoI* und *KpnI* und der V_{H-C_H} (weiß) zwischen *AsiSI* und *MluI* und dem His₆-tag. Die Basen- und Aminosäuresequenz der Rab mit den Signalsequenzen (rot) und den Restriktionsendonukleasen (blau), den Shine-Dalgarno-Sequenzen (Asterisk) und dem His₆-tag.

Um die Signalsequenz OmpA für die Sekretion der HC benutzen zu können, wurde die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease *AsiSI* in die C-Region eingefügt (Abb. 18). Dafür war der Austausch der Aminosäure Glutamin (Gln) gegen Isoleucin (Ile)

notwendig. Die Erkennungssequenz der Signalpeptidase I (Ala-X-Ala) (Tuteja, 2005) wurde damit von Ala-Gln-Ala zu Ala-Ile-Ala, was ebenfalls einer funktionellen Erkennungssequenz entspricht (Paetzel *et al.*, 2002).

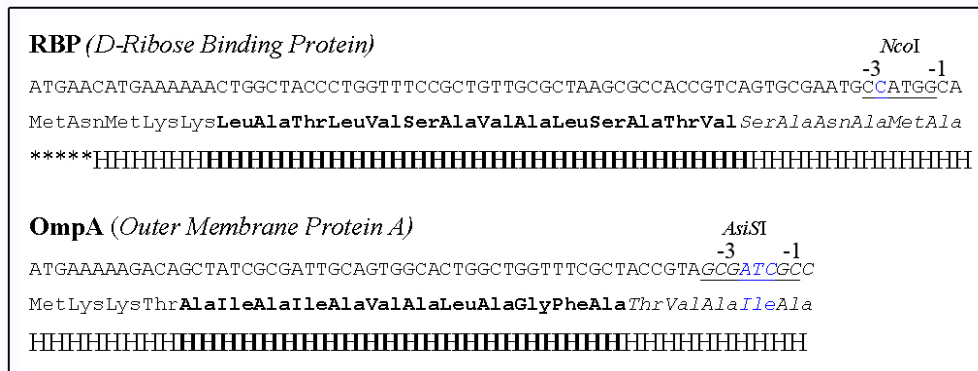


Abbildung 18: Basen- und Aminosäuresequenz von OmpA und RBP.

OmpA und RBP der Rab mit der Erkennungssequenz der Signalpeptidase I (kursiv; Position -3 und -1 gezeigt), den mutierten Basen bzw. Aminosäuren (blau) und den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen (unterstrichen). Beide Signalsequenzen haben eine hohe Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer α -Helix-Konformation (H) der hydrophoben h-Region (fett), die Wahrscheinlichkeit zufälliger coil-Strukturen ist gering (Asterisk)(Collier, 1994).

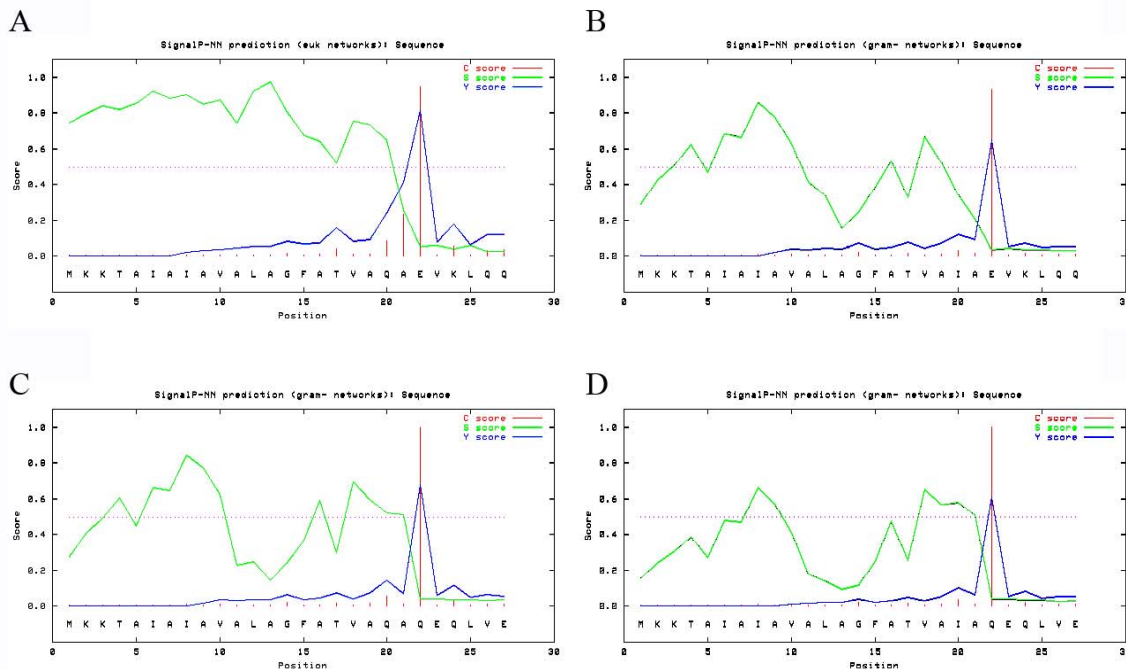


Abbildung 19: Die Signalpeptidase I-Schnittstellen in Verbindung mit OmpA.

Das Computerprogramm SignalP berechnet die Signalpeptidase I – Erkennungssequenz (rot). Um zu überprüfen, ob der Austausch einer AS in der c-Region von OmpA die Erkennung durch die Signalpeptidase I beeinflusst, wurden die beiden Versionen von OmpA jeweils in Verbindung mit der HC von K411B und einer leporiden HC verglichen. Der Vergleich der beiden Signalpeptidase I - Erkennungssequenzen von OmpA (Ala-Gln-Ala (Abb. 7, Abb 19. A, C) und Ala-Ile-Ala (Abb. 18,

Abb. 19 B, D)), zeigt, dass die Signalpeptidase I beide Versionen der Signalsequenz gleichermaßen schneidet, sowohl in Verbindung mit der HC von K411B (A, B) als auch mit der HC des unter 5.2.4 beschriebenen rekombinanten F_{ab}-Fragments IgG-WR13 des Kaninchens (C, D). Daher ist kein Unterschied bei der Abspaltung des reifen Proteins im Periplasma bedingt durch die veränderte c-Region zu erwarten.

In die c-Region der RBP wurde die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *NcoI* durch eine stille Mutation eingefügt (vgl. Abb 7, 18). Dazu wurde ein Guanin (G) der Aminosäure Alanin (Ala) durch Cytosin (C) ersetzt (GCG nach GCC), wobei die Aminosäuresequenz der Signalpeptidase I-Erkennungssequenz unverändert blieb (Ala-Met-Ala, wie bei Francetic und Kumamoto (1996) und Groarke *et al.* (1983)).

Mit dem Programm SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004) wurde bestätigt, dass die Signalpeptidase I die veränderte Erkennungsstelle der c-Region von OmpA schneidet. Dabei wurden beide Versionen von OmpA in Verbindung mit der HC des AK K411B (Abb. 19, A, B) und in Verbindung mit dem Kaninchen-Klon IgG13 (Abb 19., C, D) überprüft. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Signalpeptidase I OmpA zwischen Position -1 der Signalsequenz und +1 des Polypeptids spaltet, lag bei allen verglichenen Sequenzen bei > 99 %.

5.2.2 Konstruktion der Phagemide pASK85Rab-p3 und pASK111Rab-p3

Die Rab wurde in das Phagemid pASK85-p3-K411B (Abb. 21) inseriert, das zuvor von Schüller (Lehrstuhl für Zellbiologie, Freising, unveröffentlicht) durch Insertion einer *SacII*-Erkennungssequenz und der DNA des gesamten p3 aus dem Vektor pCANTAB5 E (Malone, 1994) in das Plasmid pASK85-K411B hergestellt worden war. Das Vorhandensein des p3 war durch Sequenzanalyse des Phagemids pASK85-p3-K411B mit den Primern AmberStoppfor, ColE/TetRrev, ColE1for, pASK-IBA3, pASK-IBA5, florineu, blaMittefor und blaMitterev (Tab. 4) überprüft worden. Zur Insertion der Rab wurde sowohl das Phagemid pASK85-p3-K411B als auch die in dem Plasmid pUC57 vorliegende Rab mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *SacII* im Restriktionsverdau gespalten. Die Enden des Phagemids wurden dephosphoryliert und daran anschließend wurde das gereinigte Fragment pASK85-p3 mit der Rab kovalent verknüpft (4.2.4.5). Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in elektrokompente *E. coli* TG1 (4.2.2). Aus fünf Klonen wurde die Vektor-DNA isoliert und der Klonierungserfolg sowie das Vorhandensein von Rab und p3 durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII*, *SacII* und *XbaI* sowie *MluI* und *KpnI* und anschließende Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (4.2.3.3, Abb. 20). Das Phagemid wurde als pASK85Rab-p3 bezeichnet (Abb. 21).

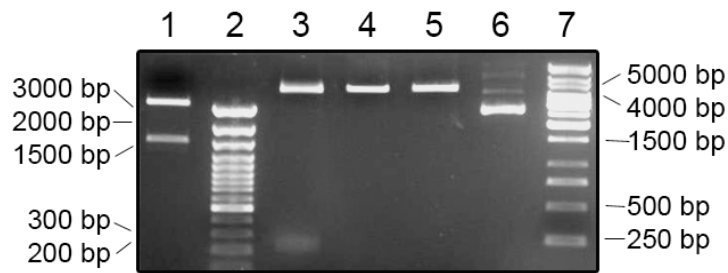


Abbildung 20: Nachweis des Phagemids pASK85Rab-p3 in der Agarose-Gelelektrophorese.

Das Plasmid pASK85Rab-p3 nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III (Spur 1), *Xba*I und *Sac*II (Spur 3), *Kpn*I (Spur 4), *Mlu*I (Spur 4 und 5), das unverdaute Plasmid (Spur 6) und die DNA-Marker (Spur 2, 7), deren Fragmentgrößen in bp angegeben sind.

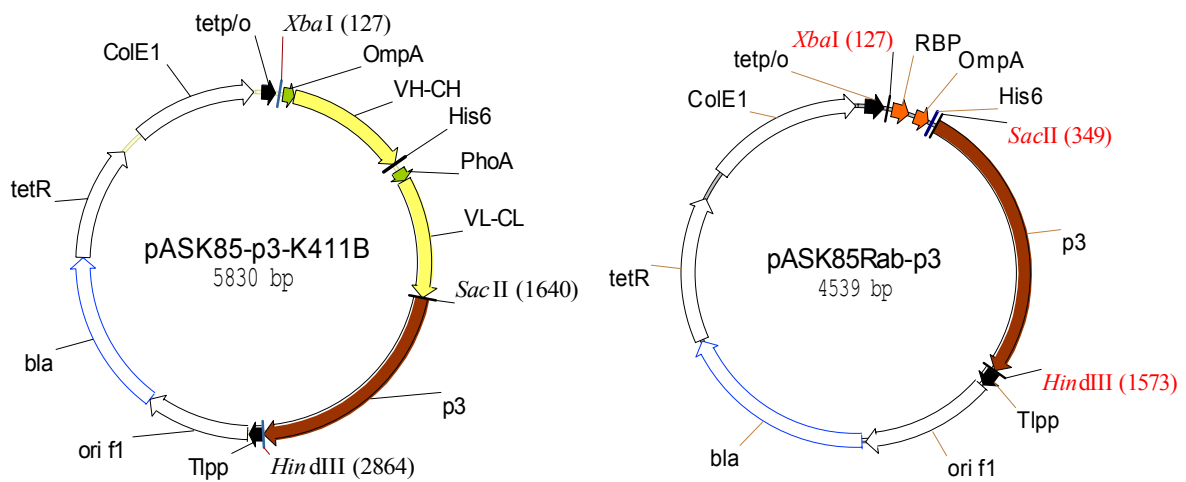


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Phage Display-Vektoren pASK85-p3-K411B und pASK85Rab-p3.

pASK85-p3-K411B kodiert für das murine F_{ab}-Fragment K411B und das Phagen-Hüllprotein g3p (p3, braun). pASK85Rab-p3 kodiert für die Rab mit den bakteriellen Signalsequenzen RBP und OmpA und dem His₆-tag, genauer dargestellt in Abb 17; daran schließt sich p3 an. Die übrigen Abkürzungen entsprechen denen von pASK85-K411B (Abb. 8).

Um während der Reinfektionsphase des *Phage Display* einen stärkeren Selektionsdruck auf nicht transformierte Zellen ausüben zu können, wurde zusätzlich zu pASK85Rab-p3 das Phagemid pASK111Rab-p3 (Abb. 23) konstruiert. Dieses kodiert statt für *bla* für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (*Cat*), die ein Wachstum mit dem stärkeren Selektionsmarker Chloramphenicol (Cam) anstelle von Amp ermöglicht. Dazu wurde die Rab zusammen mit p3 aus pASK85Rab-p3 in pASK111 transferiert. Das Plasmid pASK111 und das Phagemid pASK85Rab-p3 wurden im Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III gespalten. Nach der Dephosphorylierung des

Vektors (4.2.4.4) wurde die Plasmid-DNA gereinigt und mit dem ebenfalls gereinigten DNA-Fragment kovalent verknüpft (4.2.4.5). Das neu entstandene Phagemid pASK111Rab-p3 wurde in elektrokompetente *E. coli* TG1 transformiert (4.2.2). Der Nachweis des Klonierungserfolgs fand im Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Xba*I sowie *Spe*I und *Nco*I und über anschließende Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese statt (Abb. 22).

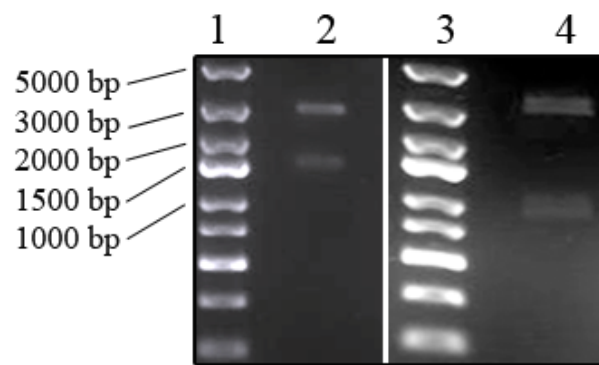


Abbildung 22: Nachweis des Phagemids pASK111Rab-p3 in der Agarose-Gelelektrophorese.

Das Plasmid pASK111Rab-p3 nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III (Spur 2) und *Nco*I und *Spe*I (Spur 4). Die Fragmentgrößen des DNA-Markers (Spur 1 und 3) sind in bp angegeben.

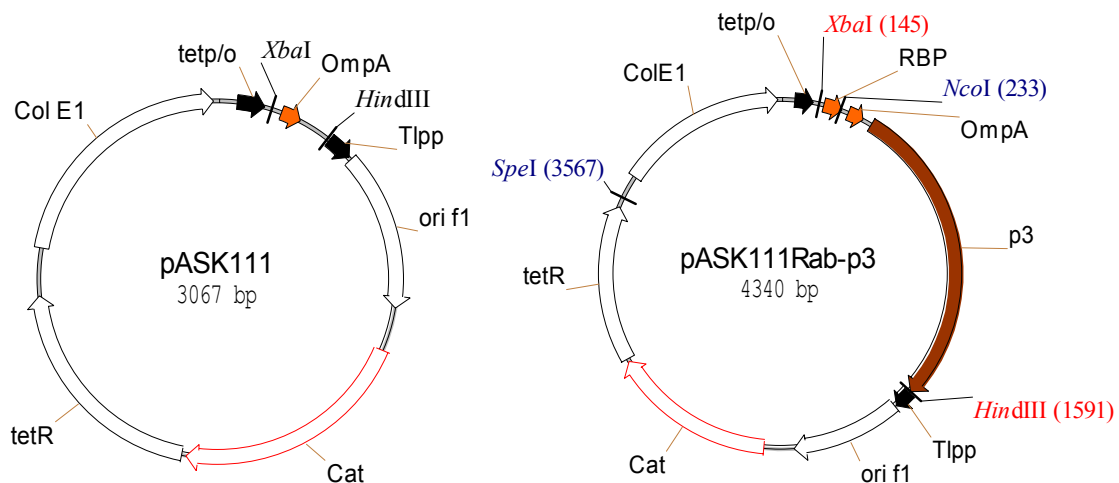


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Vektoren pASK111 und pASK111Rab-p3.

pASK111 kodiert für OmpA und den *Cat/tet*-Repressor (*tetR*) als Transkriptionsfusion. pASK111Rab-p3 kodiert für die Rab mit den Signalsequenzen RBP und OmpA und zusätzlich p3 sowie den *Cat/tet*-Repressor (*tetR*) als Transkriptionsfusion. Ansonsten entsprechen alle Abkürzungen denen von pASK85-K411B (Abb. 8).

5.2.3 Konstruktion und Expression des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-K411B

Um einen Expressionsvektor für die Massenproduktion eines rekombinanten Kaninchen-

AK im Laborfermenter herstellen zu können, wurde zunächst die Sekretionseffizienz der Signalsequenzen RBP und OmpA durch Expression des AK K411B, kodiert auf pASK85Rab-pro-K411B, überprüft (Abb. 26). Durch Insertion der Strukturgene der LC und HC des murinen K411B F_{ab}-Fragments in pASK111Rab-p3 entstand das Phagemid pASK111Rab-p3-K411B (Abb. 24), das der Entwicklung des Kaninchen-spezifischen Phagemids diene. Zunächst wurde jedoch die Expressionskassette aus pASK111Rab-p3-K411B gegen die Expressionskassette von pASK85-pro-K411B ausgetauscht, was zu dem Expressionsvektor pASK85Rab-pro-K411B führte. Dieser enthält die Rab und das erwiesenermaßen funktionelle murine F_{ab}-Fragment K411B. Er unterscheidet sich damit von pASK85-pro-K411B durch die verwendeten Signalsequenzen, die Restriktionsschnittstellen zur Insertion der Ig-Ketten und die Reihenfolge der Strukturgene in der dicistronischen Expressionskassette. An Stelle der Signalsequenz PhoA bildet RBP ein Fusionsprotein mit der LC. OmpA bleibt als Fusionsproteins mit der HC erhalten, allerdings mit veränderter Signalpeptidase I-Erkennungssequenz (vgl. Abb. 7, 18).

5.2.3.1 Konstruktion des Phagemids pASK111Rab-p3-K411B

Im Rahmen eines Praktikums wurden LC und HC des K411B F_{ab}-Fragments von Antje Pegel, Studentin der molekularen Biotechnologie, in die Rab inseriert, die im bereits beschriebenen Phagemid pASK111Rab-p3 vorlag (5.2.2). Die Genabschnitte der LC und HC des Atrazin F_{ab}-Fragments K411B wurden dazu mit den Primern K411B-LCfor, K411B-LCrev, K411B-HCfor, K411B-HCrev (Tab. 7)

sowie dem Plasmid pASK85-K411B als Matrize durch PCR unter Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert. Um das Genfragment der LC anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *KpnI* und das der HC über *MluI* und *AsiSI* in den Vektor pASK111Rab-p3 klonieren zu können, wurde mit Hilfe der Primer an den 5'- und 3'-Enden die Erkennungssequenz der entsprechenden Restriktionsendonukleasen eingeführt. Nach der Spaltung der Genabschnitte der LC und des Vektors pASK111Rab-p3 mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *KpnI* erfolgte die Dephosphorylierung des Plasmids (4.2.4.4). Das Plasmid und die gereinigten Fragmente wurden kovalent verknüpft (4.2.4.5), der Ligationsansatz in elektrokompetente *E. coli* TG1 transformiert und auf Kulturplatten mit Cam selektiert. Die DNA von 5 Klonen des als pASK111Rab-p3-K411B(LC) bezeichneten Vektors wurde isoliert und im Restriktionsverdau überprüft (nicht gezeigt). Anschließend wurde derselbe Vorgang für den Genabschnitt der HC und den Vektor pASK111Rab-p3-K411B(LC) mit den Restriktionsendonukleasen *AsiSI* und *MluI* wiederholt. Aus fünf Klonen wurde die Vektor-DNA isoliert und der Klonierungserfolg im Restriktionsverdau überprüft

(nicht gezeigt). Das entstandene Phagemid wurde als pASK111Rab-p3-K411B bezeichnet (Abb. 24). Die Analyse der Funktionalität von pASK111Rab-p3-K411B erfolgte im Rahmen der Entwicklung des Phagemids (5.3.1).

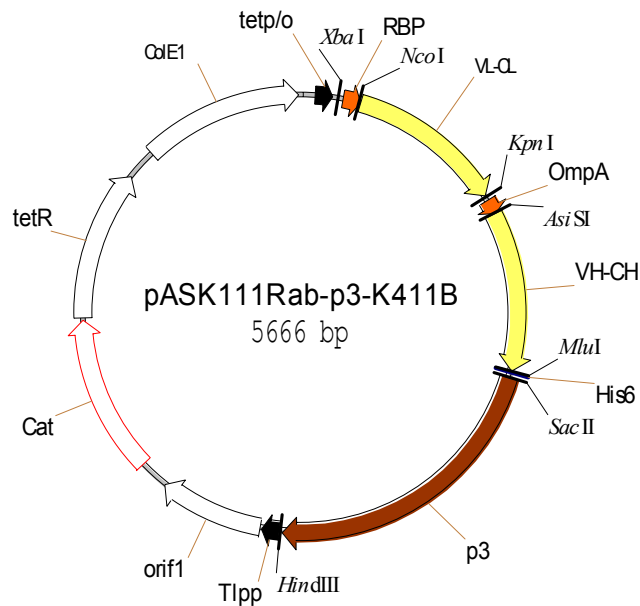


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Phagemids pASK111Rab-p3-K411B.

Das Phagemid kodiert für *Cat* und die Rab mit dem Strukturgen der LC des AK K411B als Fusionsprotein mit RBP, und dem Strukturgen der HC des AK K411B als Fusionsprotein mit OmpA und p3. Alle übrigen Abkürzungen entsprechen denen von pASK85-K411B (Abb. 8).

5.2.3.2 Konstruktion des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-K411B

Um die Expressionskassette, bestehend aus der Rab und den Strukturgenen des AK K411B (und später den Kaninchen-Strukturgenen), aus pASK111Rab-p3-K411B in den Expressionsvektor pASK85-pro transferieren zu können, musste zunächst die Rab gegen die Expressionskassette von pASK85-pro-K411B ausgetauscht werden. Dadurch wurden die für diesen Transfer notwendigen Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen (*NcoI* und *SacII*) eingefügt und der Vektor pASK85Rab-pro hergestellt (Abb. 26). pASK85-pro-K411B und die Rab, die im Vektor pUC57 vorlag, wurden dazu mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII* gespalten und die Enden des Plasmids dephosphoryliert (4.2.4.4). Die gereinigten Fragmente wurden kovalent verknüpft (4.2.4.5), in elektrokompente *E. coli* TG1 transformiert (4.2.2) und auf Kulturplatten mit Amp inkubiert. Aus fünf Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und der Klonierungserfolg im Restriktionsverdau nachgewiesen (nicht gezeigt). Zuvor wurde eine im Strukturgen von *proBA* enthaltene Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SacII* durch gezielte Mutation mit den Primern *SacIIfor* und *SacIIrev* und dem QuickChange[®] Kit von Stratagene entfernt (4.2.4.1, Tab. 4). Damit wurde die Klonierung der Rab-Expressionskassette über *NcoI* und *SacII* ermöglicht. Da die Rab

sowohl für Vektoren zur Expression von F_{ab}-Fragmenten als auch von Fusionsproteinen im *Phage Display* vorgesehen war, enthielt sie statt eines *ochre*-Stopp-Kodons (TAA) ein *amber*-Stopp-Kodon (TAG) im Anschluss an die Expressionskassette. Dies ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus F_{ab}-Fragment und g3p in *E. coli*-Stamm TG1. Da das natürlicherweise am häufigsten vorkommende TAA als die sicherere Variante des Stopp-Kodons gilt (Brenner *et al.*, 1965; Bienz *et al.*, 1981), wurde es durch gezielte Mutation mit den Primern TAArev und TAAfor (Tab. 7) in den Expressionsvektor pASK85Rab-pro eingefügt. Die korrekte Entfernung von *SacII* aus dem *proBA*-Strukturgen und der Einbau von TAA wurden durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (nicht gezeigt) und Sequenzanalyse mit den Primern pASKIba5,' pASKIba3,' proAforneu, proBrevneu, ColE1TetRrev, tetRrevneu, TetRepfor, blaMitterev und blaMittefor bestätigt (4.1.2, Tab. 7). Zur Insertion der Expressionskassette bestehend aus der Rab mit den Strukturgenen des F_{ab}-Fragments K411B in pASK85Rab-pro wurden die Plasmide pASK85Rab-pro und pASK111Rab-p3-K411B mit den Restriktionsendonukleasen *NcoII* und *SacII* gespalten.

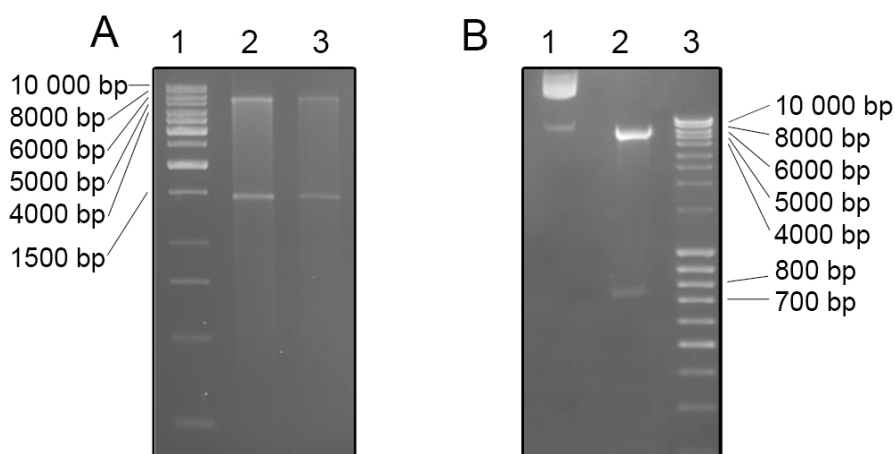


Abbildung 25: Nachweis des Klonierungserfolgs von pASK85Rab-pro-K411B in der Agarose-Gelelektrophorese.

Mittels Restriktionsverdau wurde die erfolgreiche Klonierung von pASK85Rab-pro-K411B nachgewiesen. (A) pASK85Rab-pro-K411B gespalten mit den Restriktionsendonukleasen *SacII* und *XbaI* (Spur 2 und 3) und der DNA-Marker. (B) pASK85Rab-pro-K411B gespalten mit der Restriktionsendonuklease *PstI* (Spur 2), das unverdaute Plasmid (Spur 1) und der DNA-Marker (Spur 3). Die Fragmentgrößen des DNA-Markers sind in bp angegeben.

Die gereinigten Fragmente wurden anschließend mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft, in elektrokompente *E. coli* TG1 transformiert und bei 30 °C auf Kulturplatten mit Amp inkubiert. Aus drei Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und der Klonierungserfolg durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *SacII* sowie *PstI* und

anschließende Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 25). Das Plasmid wurde als pASK85Rab-pro-K411B bezeichnet (Abb. 26).

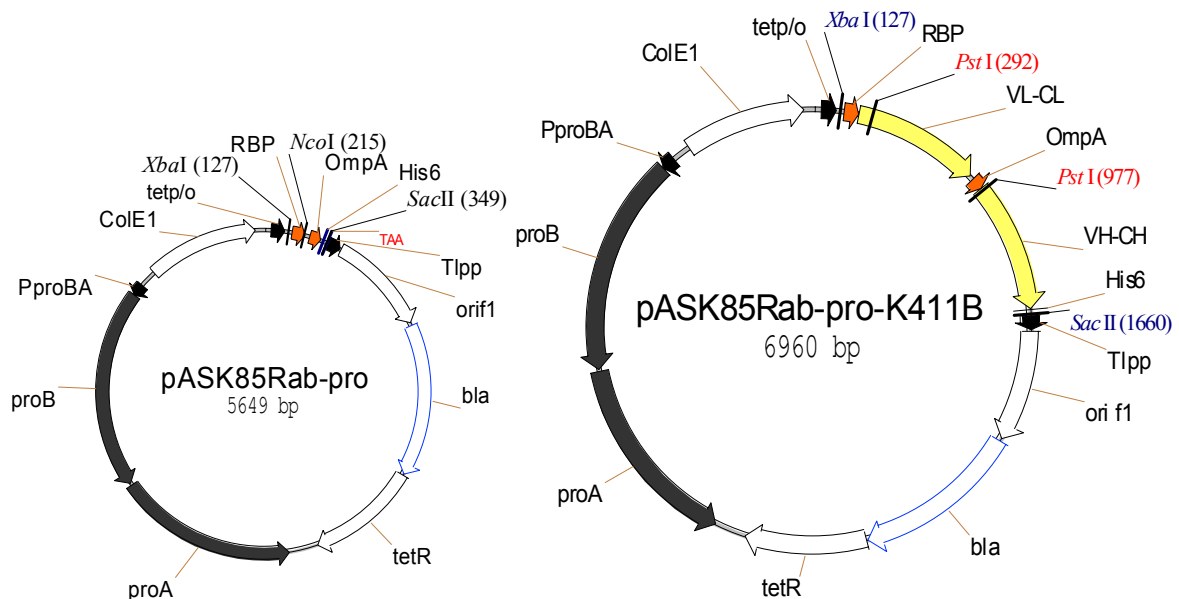


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pASK85Rab-pro und pASK85Rab-pro-K411B.

Die Expressionsvektoren kodieren für *proB* und *proA* unter der Kontrolle des *proBA*-Promotors (P^{proBA}) (vgl. pASK85-pro-K411B, Abb. 12) und die Rab. In pASK85Rab-pro-K411B liegen die Strukturgene des AK K411B als Fusionsproteine mit RBP und OmpA vor. Alle übrigen Abkürzungen entsprechen denen von pASK85-K411B (Abb. 8).

5.2.3.3 Expression des Antikörpers K411B inseriert in pASK85Rab-pro-K411B

Die bakterielle Produktion des murinen AK K411B erfolgte zunächst im *E. coli*-Stamm JM83 im 500 ml-Maßstab im Schüttelkolben (4.3.1.1). Die Genexpression wurde durch aTc induziert. Nach 2,5-stündiger Induktionsdauer hatten die Zellen bei einer OD_{600} von 0,9 die stationäre Phase erreicht, zeigten aber keine Anzeichen von Zelllyse. Durch Zentrifugation wurden die Zellen geerntet und die Periplasmafraktion präpariert. Durch Auftrennen der periplasmatischen Fraktion über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel im SDS-PAGE und anschließenden Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF Membran konnten mittels des HRP-gekoppelten Atrazin-Tracers das K411B F_{ab} -Fragment bei 45 kDa nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um den AK K411B in größerem Maßstab produzieren zu können, wurde das bereits für pASK85-pro-K411B etablierte Fermentationsverfahren (4.3.1.2) angewandt. Die Zellen zeigten im 2 l-Fermenter ein exponentielles Wachstum und hatten nach 20 h eine OD_{600} von 20 erreicht. Die Genexpression wurde durch aTc induziert. Die Glukosezufuhr orientierte sich an dem für die Produktion des AK K411B optimierten Protokoll. Nach 2,5-stündiger

Induktion wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 40 geerntet und die periplasmatische Fraktion präpariert.

5.2.3.4 Reinigung und Analyse des Antikörpers K411B

Über IMAC (4.3.2.1) wurde die Periplasmafraktion des AK K411B mittels seines His₆-tag über eine Sepharose Fast-Flow Säule in unspezifisch und spezifisch bindende Fraktion aufgetrennt (Abb. 27).

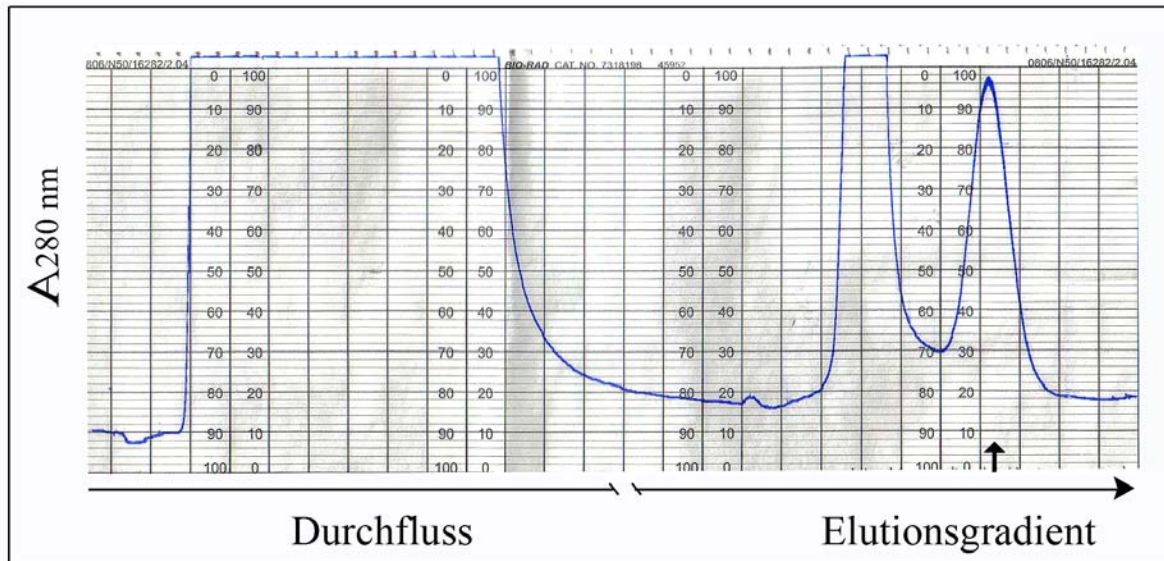


Abbildung 27: IMAC zur Reinigung des AK K411B kodiert auf pASK85Rab-pro-K411B.

Die 5 ml Fast-Flow Sepharose-Säule wurde mit der periplasmatischen Fraktion beladen (4.3.2.1). Die Elution fand mittels eines Imidazolgradienten von 0 mM bis 300 mM statt, wobei die Einstellung des Schreibers 100mV, 6 cm/h Vorschub und einen Absorptionsbereich von 1,0 betrug. Die photometrische Messung des Proteins erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verlaufprofil zeigt die nicht gebundene Faktion (Durchfluss), gefolgt von der unspezifisch gebundenen Faktion, eluiert bei niedriger Imidazolkonzentration. Daran schließt bei steigender Imidazolkonzentration die spezifische Proteinfraction in einem symmetrischen Peak (Pfeil) an.

Die Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden über ein Coomassie-gefärbtes 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel ermittelt (4.3.2.2, Abb. 28, A, B). F_{ab}-Fragment und Einzelketten wurden außerdem im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 28, C, D).

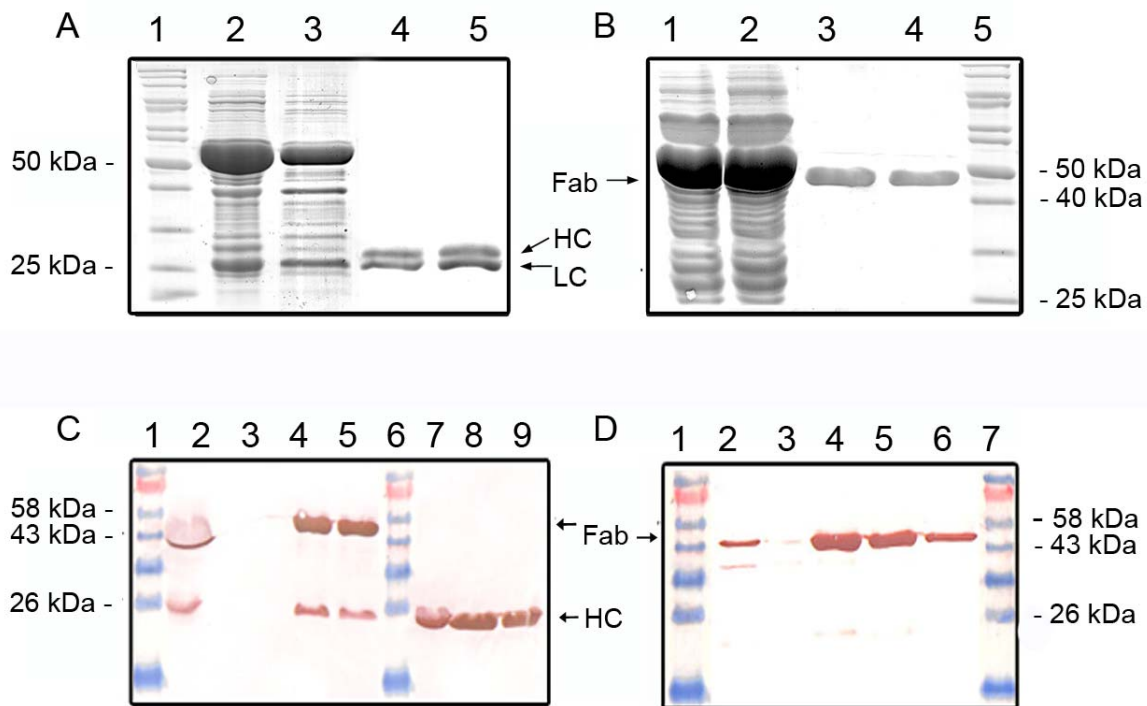


Abbildung 28: Nachweis des murinen AK K411B kodiert auf pASK85Rab-pro-K411B in SDS-PAGE und Western-Blot.

(A) Protein-Marker (Spur 1), reduzierte Cytoplasma- (Spur 2) und Periplasmafraktion (Spur 3), zwei exemplarische Fraktionen des gereinigten periplasmatischen Proteinextrakts (Spur 4, 5), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Durch Coomassie-Färbung wurden HC (26 kDa) und LC (24 kDa) nachgewiesen. (B) Nicht reduzierte Cytoplasma- (Spur 1) und Periplasmafraktion (Spur 2), zwei exemplarische Fraktionen des gereinigten periplasmatischen Proteinextrakts (Spur 3, 4) und ein Protein-Marker (Spur 5), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Durch Coomassie-Färbung wurde das F_{ab} -Fragment bei 45 kDa nachgewiesen. Bei dem nicht reduzierbaren Protein, das im SDS-PAGE in Cytoplasma- und Periplasmafraktion bei ca. 50 kDa zu sehen ist, handelt es sich wahrscheinlich um ein bakterieneigenes Protein. (C) Periplasmatischer Proteinextrakt (Spur 2), Durchfluss (Spur 3), zwei nicht reduzierte exemplarische Eluatfraktionen der IMAC im nicht reduzierten Zustand (Spur 4 und 5), Protein-Marker (Spur 1, 6), periplasmatischer Proteinextrakt im reduzierten Zustand (Spur 7) sowie zwei reduzierte exemplarische periplasmatische Eluatfraktionen der IMAC (Spur 8 und 9), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel und anschließend auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Der Nachweis von F_{ab} -Fragment (45 kDa) und HC (26 kDa) erfolgte immunchemisch im Western-Blot mit einem HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK. Bei den Banden bei 26 kDa (Spur 4, 5) handelt es sich um einzelne HC. (D) Periplasmatischer Proteinextrakt (Spur 2), Durchfluss (Spur 3), drei exemplarische Eluatfraktionen der IMAC im nicht reduzierten Zustand (Spur 4-6) und ein Protein-Marker (Spur 1, 7), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel und elektrotransferiert auf eine PVDF-Membran. Der Nachweis des F_{ab} -Fragments K411B (45 kDa) erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Atrazin-Tracer. Die Molmassen des Protein-Markers sind in kDa angegeben.

Das F_{ab}-Fragment wurde bei 45 kDa sichtbar gemacht. In der reduzierten Probe wurden LC und HC bei 24 kDa und 26 kDa nachgewiesen. Dies entspricht den Analysen der Expression des AK K411B mit pASK85-pro-K411B (5.1.3.2) und Ergebnissen von Kusharyoto (2001) und Lange *et al.* (2001). Die HC konnte außerdem im Western-Blot (4.3.3.1) bei 45 kDa sowohl mittels des His₆-tag und einem HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK als auch mit einem HRP-gekoppelten Atrazin-Tracer nachgewiesen werden (Abb. 28, C, D). Die aus 1,6 l Bakterienkultur resultierenden, gereinigten Periplasmafraktionen, die das F_{ab}-Fragment enthielten, wurden vereinigt und aufkonzentriert (4.3.2.3). Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes (4.3.2.4) und ergab insgesamt 9,8 mg des AK K411B pro Fermentation (150 µg l⁻¹ • OD₆₀₀).

Zur Überprüfung der Funktionalität des K411B F_{ab}-Fragments wurde ein kompetitiver Atrazin-ELISA mit dem HRP-gekoppelten Atrazin-Tracer zur Untersuchung der AK-Bindungseigenschaften durchgeführt (4.3.3.2).

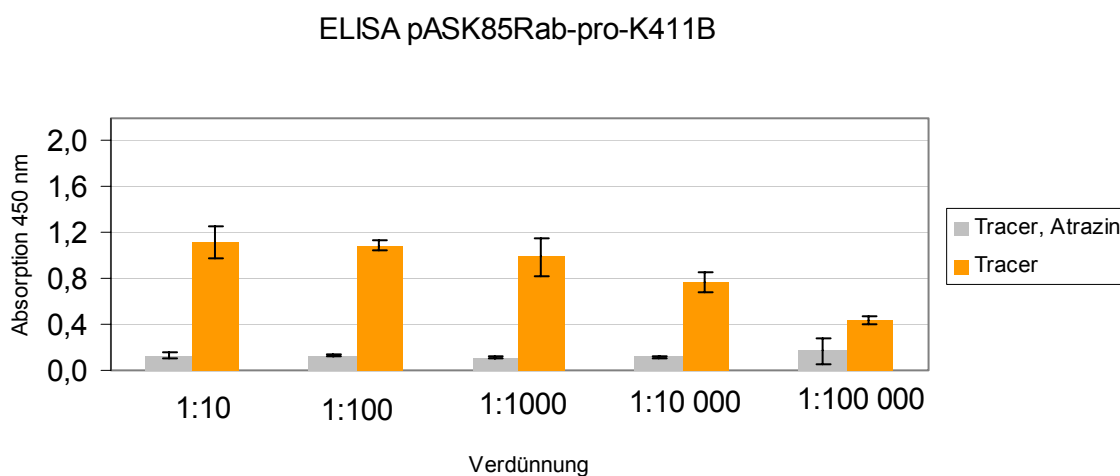


Abbildung 29: Kompetitiver ELISA zum Nachweis der Bindungseigenschaften des AK K411B.

Die Spezifität des F_{ab}-Fragments, kodiert auf pASK85Rab-pro-K411B, wurde untersucht. Eine mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit der IMAC-gereinigten periplasmatischen Fraktion in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 und 1:100 000 inkubiert. Zum Nachweis des AK wurde der HRP-gekoppelte Atrazin-Tracer eingesetzt (orange). Um die Spezifität des AK K411B für Atrazin zu überprüfen, wurde die AK-Tracer-Bindung durch Hinzufügen von Atrazin verdrängt (grau). Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und die Mittelwerte (n = 3) mit Standardabweichung dargestellt. Die Verdrängung der AK-Antigenbindung durch Atrazin ist deutlich zu erkennen.

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden zu diesem Zweck mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtet und mit einer Verdünnungsreihe des mittels IMAC gereinigten F_{ab}-Fragments inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem HRP-gekoppelten Atrazin-Tracer zum Nachweis des AK K411B bzw. dem Tracer und zusätzlich Atrazin zur Verdrängung der AK-Tracer-Bindung inkubiert, um die Spezifität des AK K411B für Atrazin nachweisen zu können. Die Farbreaktion wurde ausgelöst und die Absorption bei 450 nm gemessen. Auch bei einer Verdünnung der gereinigten periplasmatischen Fraktion von 1:100 000 war das Signal noch deutlich höher als das vernachlässigbare Signal der Probe mit der verdrängten AK-Tracer-Bindung (Abb. 29). Daraus lässt sich auf eine spezifische Bindung des F_{ab}-Fragments K411B an Atrazin schließen.

5.2.4 Konstruktion des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-WR13

Zur Herstellung eines Expressionsvektors für die Hochzelllichtfermentation rekombinanter Kaninchen-AK wurden die Strukturgene des Kaninchens in den Vektor pASK85Rab-pro (Abb. 26) inseriert. Der entstandene Expressionsvektor wurde als pASK85Rab-pro-WR13 bezeichnet (Abb. 34). Dazu wurden die Phagemide pASK111Rab-p3-WR2, 5 und 13 (Abb. 32) durch Insertion von Kaninchen-HC und -LC in pASK111Rab-p3 hergestellt (Abb. 23). Anschließend wurde die Expressionskassette bestehend aus der Rab und dem Kaninchen-AK Klon13 in den Expressionsvektor pASK85Rab-pro transferiert. Eine Übersicht über alle Vektoren ist in Abb. 47 zu sehen.

5.2.4.1 Konstruktion der Phagemide pASK111Rab-p3-WR2, 5 und 13

Das Blut eines Kaninchens der Rasse *Deutscher Riese* (Elvira Schecklies, pab productions, Herbertshausen) wurde in RNA/DNA Stabilization Reagent der Firma Roche stabilisiert und anschließend die mRNA aus den peripheren B-Zellen mit einem Kit der Firma Roche isoliert (4.2.4.6). Es folgte eine Reverse-Transkription mit dem 1st Strand cDNA Kit der Firma Roche nach den Herstellerangaben (4.2.4.7). Mit den Primerkombinationen 1, 2 und 3 für das IgG-Gensegment sowie 13 und 14 für die L_κ-Kette (Tab. 8) wurde eine Touch-Down-PCR und daran anschließend eine Standard-PCR durchgeführt (4.2.4.3).

Um die Genfragmente der LC und HC über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *KpnI* bzw. *MluI* und *AsiSI* in das Phagemid pASK111Rab-p3 klonieren zu können, wurde mit Hilfe der Primer am 5'-Ende die Erkennungssequenz der entsprechenden Restriktionsendonuklease eingeführt. Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifizierung mit den unterschiedlichen Primerkombinationen wurden die Amplifikate beider Ketten auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 30).

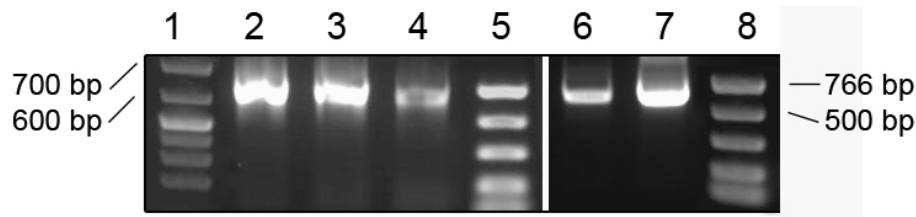


Abbildung 30: Nachweis der Kaninchen Ig-Amplifikate.

PCR-Amplifikate des Kaninchens, aufgetrennt in der Agarose-Gelelektrophorese und amplifiziert mit den Primerkombinationen 1, 2 und 3 für die HC des IgG (Spur 2-4) sowie 13 und 14 für die LC (Spur 6, 7). Fragmentgrößen der DNA-Marker (Spur 1, 5, 8) sind in bp angegeben. Die DNA-Sequenz der Klone findet sich im Anhang.

Die gewonnenen LC-Amplifikate wurden über die Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und ebenso wie pASK111Rab-p3 mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *KpnI* im Restriktionsverdau gespalten. Die Enden des Plasmids wurden dephosphoryliert und die gereinigten Fragmente mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Der Ligationsansatz wurde in elektrokompente *E. coli* TG1 transformiert und über Nacht bei 30 °C auf Kulturplatten mit Cam inkubiert. Die Vektor-DNA wurde aus drei Klonen isoliert und der Klonierungserfolg der LC im Restriktionsverdau nachgewiesen (nicht gezeigt). Der Vektor wurde als pASK111Rab-p3-WR(LC) bezeichnet. Nach der erfolgreichen Klonierung der LC wurden die HC-Amplifikate und der Vektor pASK111Rab-p3-WR(LC) mit den Restriktionsendonukleasen *MluI* und *AsiSI* im Restriktionsverdau gespalten. Der Vektor wurde dephosphoryliert, mit der HC kovalent verknüpft, in elektrokompente *E. coli* TG1 transformiert und über Nacht auf Kulturplatten mit Cam inkubiert. Der Klonierungserfolg wurde durch Spaltung des Plasmids mit *KpnI* und *NcoI* sowie mit *AsiSI* und *MluI* und anschließender Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 31, A). Die LC in Spur 1-3 sind etwas mobiler als die HC in Spur 5-7, was auf die geringere Zahl an bp zurückzuführen ist. Außerdem wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII*, *KpnI* und *HindIII* sowie *XbaI* und *SacII* gespalten und über ein Agarosegel aufgetrennt (Abb. 31, B). Der Vergleich der Ergebnisse der Sequenzanalyse der drei Klone IgG2, IgG5 und IgG13 mit den Primern AmbStopfor, pASKIba3', f1ori3for, ColE/TetRrev, ColE1for und pASK-Iba5' (Tab. 4) ergab, dass bei der Amplifizierung der variablen Region der HC die Primer V_H9 (Klon 2), V_H11 (Klon 5) und V_H14 (Klon 13) zur Amplifizierung der DNA geführt hatten. Für die konstante Region war nur ein einziger IgG-Primer verwendet worden (Tab. 6). Die LC war für die drei Klone identisch, wobei in diesem Fall die Primer C_Lk2 und V_Lk4 zum Einsatz gekommen waren (Tabelle 5).

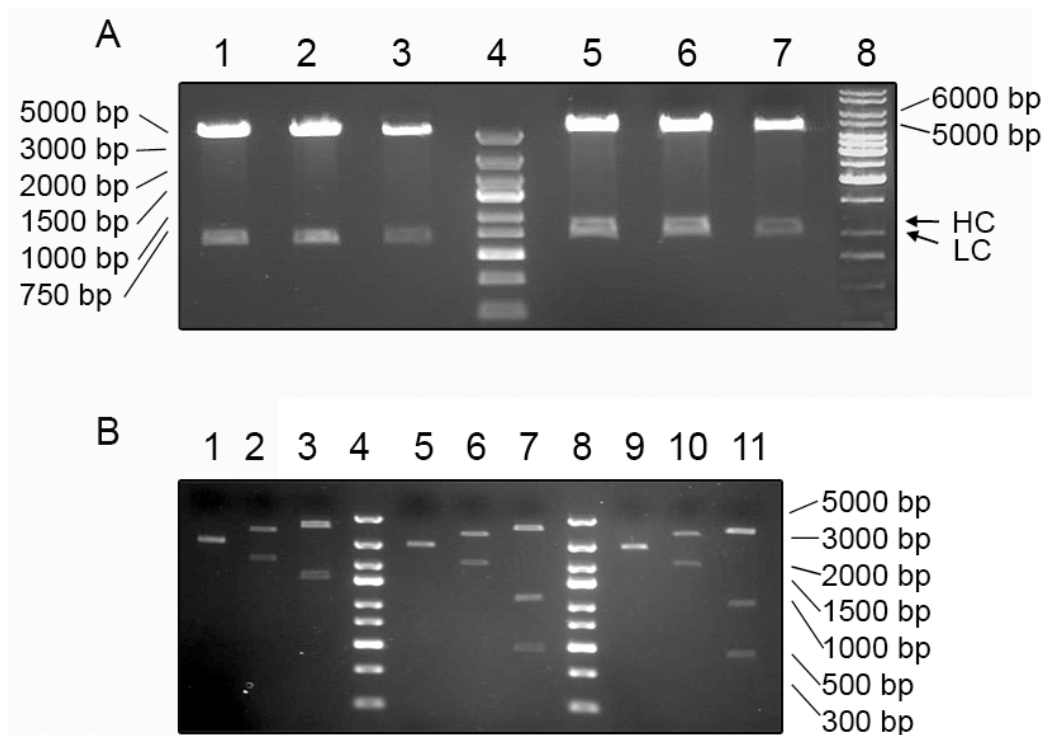


Abbildung 31: Nachweis der Phagemide pASK111Rab-p3-WR-2, 5 und 13

In der Agarose-Gelelektrophorese wurden LC und HC des Kaninchens inseriert in pASK111Rab-p3-WR-2, 5 und 13 nachgewiesen. (A) Die Vektoren pASK111Rab-p3-WR-2 (Spur 3, 7), 5 (Spur 2, 6) und 13 (Spur 1, 5), gespalten mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *KpnI* (Spur 1-3) und *MluI* und *AsiSI* (Spur 5-7). (B) pASK111Rab-p3-WR-2, 5 und 13, gespalten mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII* (Spur 1, 5, 9), *KpnI* und *HindIII* (Spur 2, 6, 10), *XbaI* und *SacII* (Spur 3, 7, 11). IgG13 (Spur 1-3), IgG5 (Spur 5-7) und IgG2 (Spur 9-11). Die zusätzliche Bande bei Spur 7 und 10 ist auf eine *SacII*-Erkennungssequenz im Strukturgen von IgG2 und IgG5 zurückzuführen. Die Fragmentgrößen des DNA-Markers (Spur 4, 8) sind in bp angegeben.

Der Allotyp der resultierenden drei leporiden F_{ab} -Fragmente mit unterschiedlichen Strukturgenen wurde mittels NCBI-Blast anhand der aus der Sequenzanalyse resultierenden Primärstruktur analysiert. Dabei ergab sich für die LC jeweils der Allotyp $\kappa 1$ -b4 und für die HC jeweils der Allotyp V_H1a2 und der Isotyp IgG. Die F_{ab} -Fragmente wurden als pASK111Rab-p3-WR2, 5 und 13 bezeichnet. pASK111Rab-p3-WR13 ist in Abb. 32 dargestellt, die Sequenz findet sich im Anhang.

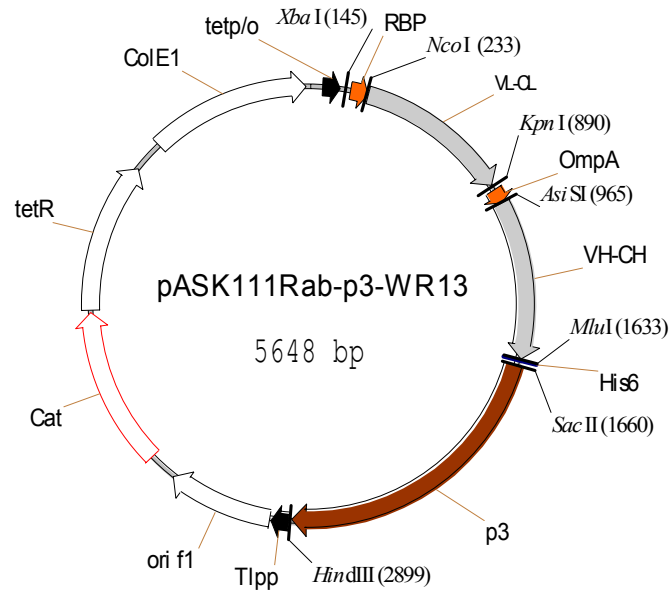


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Phagemids pASK111Rab-p3-WR13.

Die Signalsequenz RBP bildet ein Fusionsprotein mit der LC (V_L-C_L). Die Signalsequenz OmpA liegt als Fusionsprotein mit der HC (V_H-C_H) des Kaninchen-Klons IgG13 und p3 vor. *Cat* ermöglicht die Selektion durch Cam. Die übrigen Abkürzungen entsprechen denen von pASK85-K411B (Abb. 8). Die DNA-Sequenzen von pASK111Rab-p3-WR2, WR5 und WR13 finden sich im Anhang.

5.2.4.2 Konstruktion des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-WR13

Die Expressionskassette bestehend aus der Rab und den darin vorliegenden Kaninchen-Strukturgenen des IgG13 wurde in den Expressionsvektor pASK85Rab-pro inseriert. Dazu wurden das Phagemid pASK111Rab-p3-WR13 (Abb. 32) und der Expressionsvektor pASK85Rab-pro-K411B (Abb. 26) mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *SacII* gespalten. Das gereinigte Genfragment Rab-WR13 wurde mittels der T4 DNA-Ligase kovalent mit dem verdauten und dephosphorylierten Plasmid pASK85Rab-pro verknüpft, in elektrokompente *E. coli* TG1 transformiert und über Nacht bei 30 °C auf Kulturplatten mit Amp inkubiert. Aus fünf Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und der Klonierungserfolg durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *SacII* und *XbaI*, *PstI* und *SalI* sowie *SpeI* und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 33) sowie in der Sequenzanalyse mit den Primern pASK-Iba5' und flori-5rev (Tab. 4) nachgewiesen. Der entstandene Expressionsvektor, für den die DNA-Sequenz der Rab in Abb. 35 dargestellt ist, wurde als pASK85Rab-pro-WR13 bezeichnet (Abb. 34).

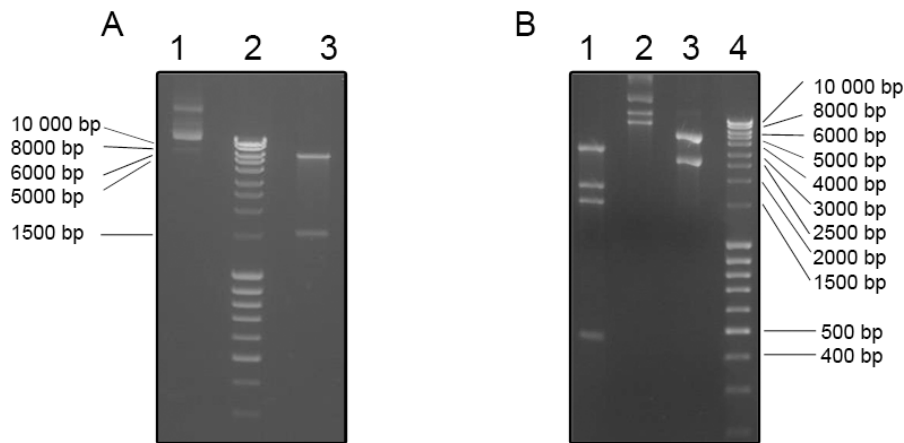


Abbildung 33: Nachweis des Klonierungserfolgs des Plasmids pASK85Rab-pro-WR13.

(A) Das Plasmid pASK85Rab-pro-WR13, gespalten mit den Restriktionsendonukleasen *SacII* und *XbaI* (Spur 3), die unverdaute Probe (Spur 1) und der DNA-Marker (Spur 2). (B) Das Plasmid pASK85Rab-pro-WR13 gespalten mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *SalI* (Spur 1), mit *SpeI* (Spur 3), das unverdaute Plasmid (Spur 2) und der DNA-Marker (Spur 4).

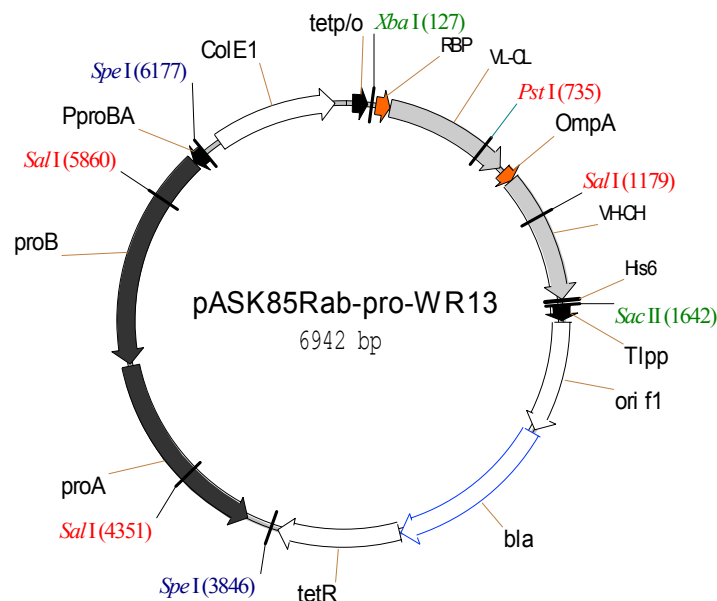


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-WR13.

Der Vektor kodiert für die LC (V_L-C_L) des Klons IgG13 des Kaninchens, die als Fusionsprotein mit RBP vorliegt, und dessen HC (V_H-C_H), die ein Fusionsprotein mit OmpA bildet. *proB* und *proA* stehen unter der Kontrolle des *proBA*-Promotors (P^{proBA}) (vgl. pASK85-pro-K411B, Abb. 12). Alle übrigen Abkürzungen entsprechen denen von pASK85Rab-K411B (Abb. 8).

Abb. 35 zeigt die Primärstruktur der dicistronischen Expressionskassette des Klons IgG13 im Expressionsvektor pASK85Rab-pro-WR13 mit *tet*-Promotor, Signalsequenzen RBP und OmpA, Shine-Dalgarno-Sequenzen, Restriktionsendonukleasen, His₆-tag und Transkriptionsterminator.



Abbildung 35: Primärsequenz der Expressionskassette des Kaninchen-Klons IgG13

Die Primärstruktur der dicistronischen Expressionskassette des Kaninchens im Vektor pASK85Rabpro-WR13 mit den Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen (blau). Die Fusionsproteine bestehend aus der Signalsequenz RBP (rot) und der LC des Kaninchens sowie der Signalsequenz OmpA (rot), der HC des Kaninchens und dem His₆-tag, stehen unter der Kontrolle des tet^{p/o}-Promotors (tet^{p/o}, blau). Der Transkriptionsterminator (Tlpp, grün) bildet aufgrund seiner palindromen Sequenz Loops und stabilisiert dadurch die mRNA, deren Fusionsproteine durch zwei Shine-Dalgarno-Sequenzen (Asterisk) getrennt translatiert werden. Die Translation wird durch ein TAA-Stopp-Signal (rot) beendet.

5.2.5 Koexpression des Kaninchen-AK mit Faltungshelferproteinen

Um die Faltung und Disulfidbrückenbildung der F_{ab}-Fragmente im Periplasma zu unterstützen, wurde die Expression des Kaninchen-AK IgG13 als Koexpression zusammen

mit den Faltungshelferproteinen, kodiert auf dem Plasmid pTUM4 (Abb. 36), durchgeführt. pTUM4 kodiert für zwei dicistronische Operons. Die beiden Proteindisulfidisomerasen DsbA und DsbC stehen unter der Kontrolle des konstitutiven dsbA-Promotors (p^{dsbA}). Die beiden PPIasen mit Chaperon-Aktivität, FkpA und SurA, stehen unter der Kontrolle des konstitutiven fkpA-Promotors (p^{fkpA}). Das Plasmid kodiert für das Cam-Resistenzgen *Cat* und trägt einen zur Familie der ColE1-Plasmide gehörenden p15a-Replikationsstartpunkt. Damit ist pTUM4 kompatibel mit Plasmiden mit einem ColE1-Replikationsstartpunkt (Kues und Stahl, 1989) und einem Amp-Resistenzgen.

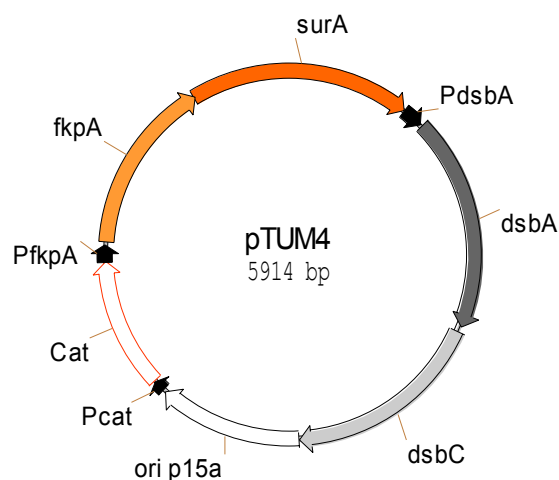


Abbildung 36: Schematische Darstellung des Plasmids pTUM4

Das Plasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) diente der gleichzeitigen Überexpression von DsbC, DsbA, FkpA und SurA. Es trägt einen p15a Replikationsursprung (*ori p15a*) und gehört damit zu den ColE1-Typ Plasmiden. Das Resistenzgen *Cat* hat einen eigenen konstitutiven Promotor (P^{cat}). pTUM4 kodiert für zwei dicistronische Operons: Die beiden Thiol-Oxidantien DsbA und DsbC stehen unter der Kontrolle des konstitutiven dsbA-Promotors (p^{dsbA}), sie gehören zu den Proteindisulfidisomerasen (Dsb-Proteine) und unterstützen die Disulfidbrückenbildung. Die beiden Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) mit Chaperon-Aktivität, FkpA und SurA, stehen unter der Kontrolle des konstitutiven fkpA-Promotors (p^{fkpA}) und katalysieren die cis/trans-Isomerisierung der Peptidbindungen.

5.2.5.1 Expression der Faltungshelferproteine kodiert auf pTUM4

Die auf dem Plasmid pTUM4 kodierten Faltungshelferproteine wurden exprimiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurde *E. coli* JM83 mit pTUM4 transformiert, die Zellen über Nacht kultiviert und in 500 ml LB-Medium mit Cam als Selektionsmarker im Schüttelkolben bis zu einer OD_{600} von 1,0 bei 25 °C inkubiert (4.3.1.1). Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und das Sediment in periplasmatischem Puffer aufgeschlossen.

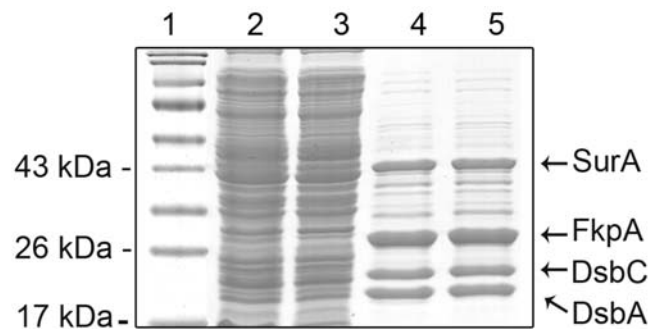


Abbildung 37: Nachweis der Faltungshelferproteine kodiert auf pTUM4 im SDS-PAGE.

Protein-Marker (Spur 1), Cytoplasmafraktion (Spur 2), reduzierte Cytoplasmafraktion (Spur 3), Periplasmafraktion (Spur 4) und reduzierte Periplasmafraktion (Spur 5), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-gefärbt (reproduziert nach Schlapschy *et al.*, 2006).

Die periplasmatische Fraktion wurde über ein 12 %iges SDS-Gel im SDS-PAGE aufgetrennt (4.3.2.2) und anschließend Coomassie-gefärbt (Abb 37). Die exprimierten Proteine verhielten sich wie aufgrund ihres Molekulargewichts zu erwarten: DsbA wurde bei einer Größe von 21,1 kDa, DsbC bei 23,4 kDa, FkpA bei 26,2 kDa und SurA bei 45 kDa nachgewiesen.

5.2.5.2 Koexpression in Schüttelkolben und Fermenter

Der elektrokompente *E. coli*-Stamm JM83 wurde zunächst mit pTUM4 (Abb. 36) transformiert und über Nacht auf LB-Cam-Agarplatten kultiviert. Mit pTUM4 transformierte Zellen wurden erneut kompetent gemacht (4.2.2) und mit dem Plasmid pASK85Rab-pro-WR13 (Abb. 34) transformiert. Die Koexpression der mit pTUM4 und pASK111Rab-pro-WR13 kotransformierten Zellen erfolgte zunächst im 500 ml-Maßstab in LB-Amp-Cam-Medium im Schüttelkolben (4.3.1.1). Induziert wurde die Genexpression durch aTc. Die Induktionsdauer bis zum Erreichen einer OD_{600} von 1,0 betrug 3,5 h, wobei die Zellen keine Anzeichen von Zellyse zeigten, wohl aber die stationäre Phase erreicht hatten und durch Zentrifugation geerntet wurden. Mittels des His₆-tag und eines HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK konnte das F_{ab}-Fragment durch Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE über ein 12 %iges Polyacrylamidgel im anschließenden Western-Blot bei 40 kDa nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Koexpression im Fermenter (4.3.1.2). erfolgte ebenfalls im *E. coli*-Stamm JM83, kotransformiert mit den Plasmiden pASK85Rab-pro-WR13 und pTUM4. Das Fütterungsprotokoll wurde während mehrerer Fermentationsläufe durch Messung von Glukose, Acetat und Biomasse sowie pO_2 und pH-Wert an die Bedingungen der Koexpression angepasst. Die Expression des Fremdproteins wurde durch aTc induziert. Die

laut Schiweck und Skerra (1995) dazu optimale OD_{600} von 20 wurde erst nach 22-24 h erreicht. Nach 3,5 h befanden sich die Zellen bei einer OD_{600} von 40 im Übergang zur stationären Phase. Die Zellen wurden geerntet und die periplasmatische Proteinfraction präpariert.

5.2.5.3 Reinigung und Nachweis des Kaninchen-AK

Die Auftrennung des Proteinextrakts in unspezifische Proteinfraction und spezifisch bindendes Kaninchen- F_{ab} -Fragment erfolgte mittels IMAC (4.3.2.1). Nach dem Durchfluss wurde die unspezifisch gebundene Proteinfraction bereits bei einer geringen Imidazolkonzentration ausgewaschen, gefolgt von einer sehr viel kleineren weiteren Fraction. An diese schloss sich mit einem symmetrischen Peak die über das His₆-tag spezifisch gebundene spezifische Fraction (Pfeil) an (Abb. 38).

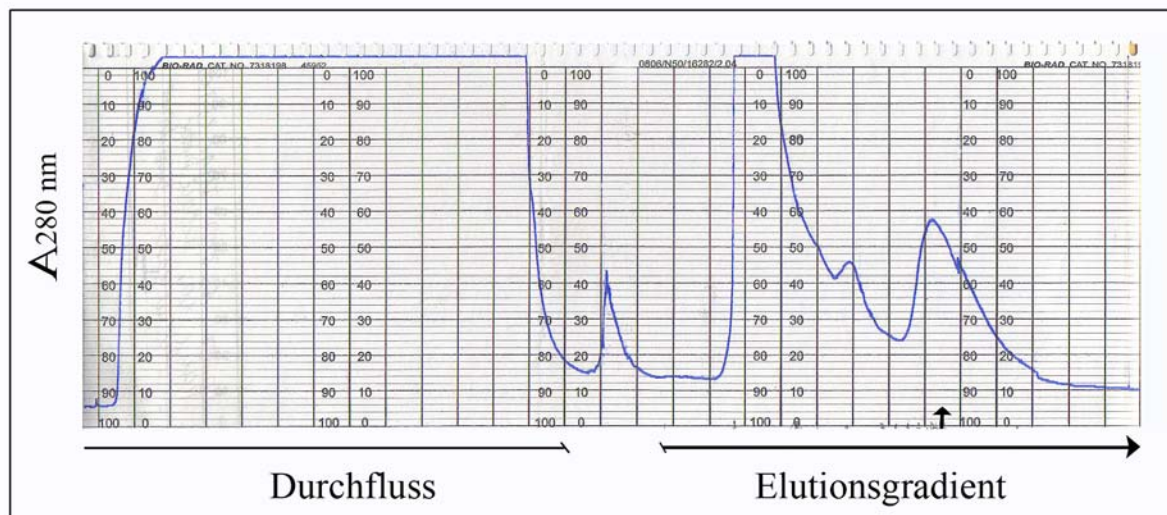


Abbildung 38: Verlaufprofil der IMAC bei der Reinigung des koexprimierten Kaninchen-AK.

Die 5 ml Fast-Flow Sepharose-Säule wurde mit der periplasmatischen Fraction beladen (4.3.2.1). Die Elution fand mittels eines Imidazolgradienten von 0 mM bis 300 mM statt, wobei die Einstellung des Schreibers 100mV, 6 cm/h Vorschub und einen Absorptionsbereich von 2,0 betrug. Die photometrische Messung des Proteins erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verlaufprofil zeigt die nicht gebundene Fraction (Durchfluss), gefolgt von der unspezifisch gebundenen Fraction, die bei niedriger Imidazolkonzentration eluiert wird und der ein sehr viel kleinerer, zweiter Peak folgt. Daran anschließend wird bei steigender Imidazolkonzentration in einem relativ symmetrischen Peak (Pfeil) die spezifische Proteinfraction eluiert. Der kleine, an den Durchfluss anschließende Peak kam beim Einstellen des Elutionsgradienten durch Erschütterung des Photometers zustande. Er enthielt kein Protein und war daher nicht von Bedeutung.

Die Fractionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch Auftrennung der

IMAC-Fractionen im Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff und anschließender Coomassie-Färbung ermittelt (4.3.2.2). Zum Nachweis des Kaninchen-AK wurden die Fraktionen zusätzlich im Western-Blot immunchemisch analysiert (4.3.3.1). Dazu wurden die auf eine PVDF-Membran elektrotransferierten Proteine mit einem HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK bzw. einem Ziege-anti-Kaninchen-AK immunchemisch nachgewiesen. Das F_{ab}-Fragment (40 kDa), die LC (23 kDa) und die HC (25 kDa) konnten sowohl mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Abb. 39, A) als auch im Western-Blot (Abb. 39, B, C) nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Expression ohne pTUM4 ist zum Vergleich in Kapitel 6.3.1 dargestellt (Abb. 51). Das F_{ab}-Fragment zeigt eine etwas größere Mobilität, als aufgrund seines theoretisch errechneten Molekulargewichts (45 kDa) zu erwarten war. Dies ist möglicherweise auf die zusätzliche Disulfidbrücke des Kaninchen-F_{ab}-Fragments zurückzuführen.

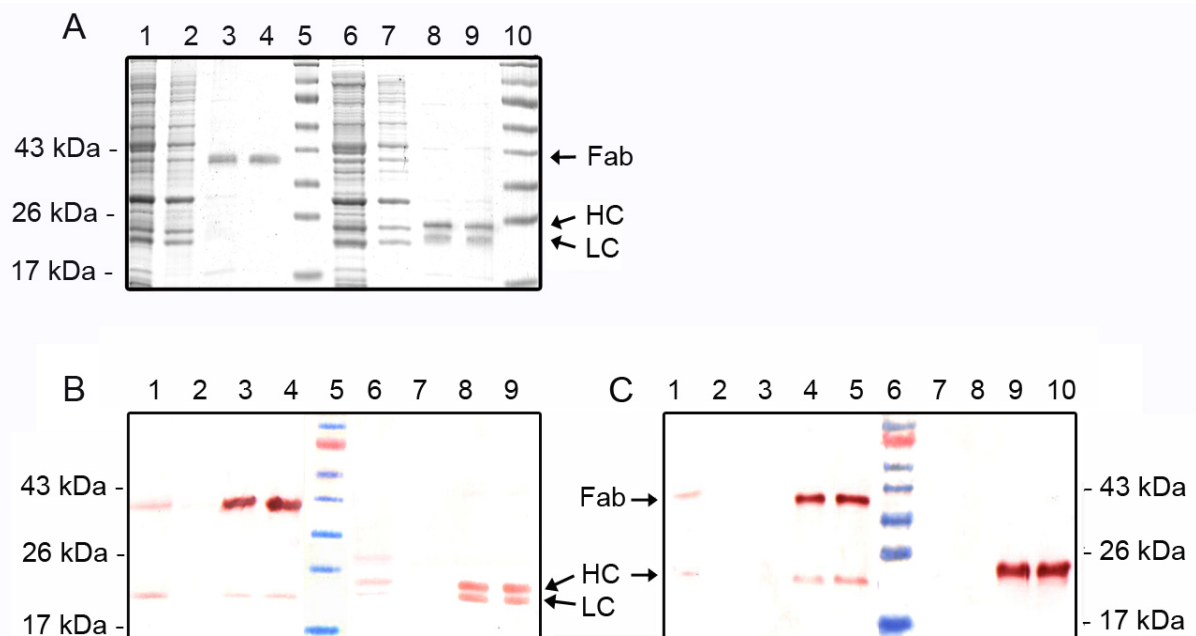


Abbildung 39: Nachweis des koexprimierten Kaninchen-AK in SDS-PAGE und Western-Blot.

Spezifischer Nachweis des Kaninchen F_{ab}-Fragments kodiert auf pASK85Rab-pro-WR13 und koexprimiert mit den Faltungshelferproteinen kodiert auf pTUM4 mittels SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B, C). (A) Periplasmafraktion (Spur 1), Durchfluss (Spur 2), zwei exemplarische, IMAC-gereinigte Periplasmafraktionen (Spur 3, 4), reduzierte Periplasmafraktion (Spur 6), reduzierte Durchflussfraktion (Spur 7), zwei exemplarische reduzierte IMAC-gereinigte Periplasmafraktionen (Spur 8, 9) und ein Protein-Marker (5, 10), aufgetrennt über ein 14 %iges SDS-Polyacrylamidgel, dem 6 M Harnstoff zur bessern Auftrennung zugesetzt worden war. Das Polyacrylamidgel wurde Coomassie-gefärbt und F_{ab}-Fragment (40 kDa), LC (23 kDa) und HC (25 kDa) nachgewiesen. (B) Periplasmafraktion (Spur 1), Durchfluss (Spur 2), zwei nicht reduzierte, IMAC-gereinigte Periplasmafraktionen (Spur 3, 4), Protein-Marker (Spur 5), reduzierte Periplasmafraktion (Spur 6),

reduzierter Durchfluss (Spur 7), und zwei reduzierte, IMAC-gereinigte Periplasmafraktionen (Spur 8 und 9), aufgetrennt über ein 14 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine PVDF Membran elektrotransferiert und F_{ab}-Fragment (40 kDa), LC (23 kDa) und HC (25 kDa) mit einem HRP-gekoppelten polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen-AK immunchemisch nachgewiesen. (C) Periplasmafraktion (Spur 1), Durchfluss (Spur 2), unspezifisch gebundenes Protein (Spur 3), zwei exemplarische IMAC-gereinigte Periplasmafraktionen (Spur 4, 5), Protein-Marker (Spur 6), reduzierter Durchfluss (Spur 7), unspezifisch gebundenes, reduziertes Protein (Spur 8) sowie zwei reduzierte IMAC-gereinigte Periplasmafraktionen (Spur 9, 10), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine PVDF Membran elektrotransferiert und mit einem HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK nachgewiesen. Die Molmassen der Protein-Marker werden in kDa angegeben.

Die Periplasmafraktionen, die das F_{ab}-Fragment enthielten, wurden vereinigt und über Konzentratoren in H₂O umgepuffert und aufkonzentriert (4.3.2.3). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption photometrisch gemessen und eine maximale Proteinmenge von 3,3 mg/1,6 l Fermentationsvolumen bzw. 50 µg l⁻¹ • OD₆₀₀ errechnet (4.3.2.4).

Die Proteinausbeuten unterschiedlicher Glukosezufuhr-Protokolle wurden verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass ein leichtes Absenken der Glukosezufuhr zu einer Steigerung der Proteinausbeute durch Erreichen einer höheren OD₆₀₀ führte (Abb. 40).

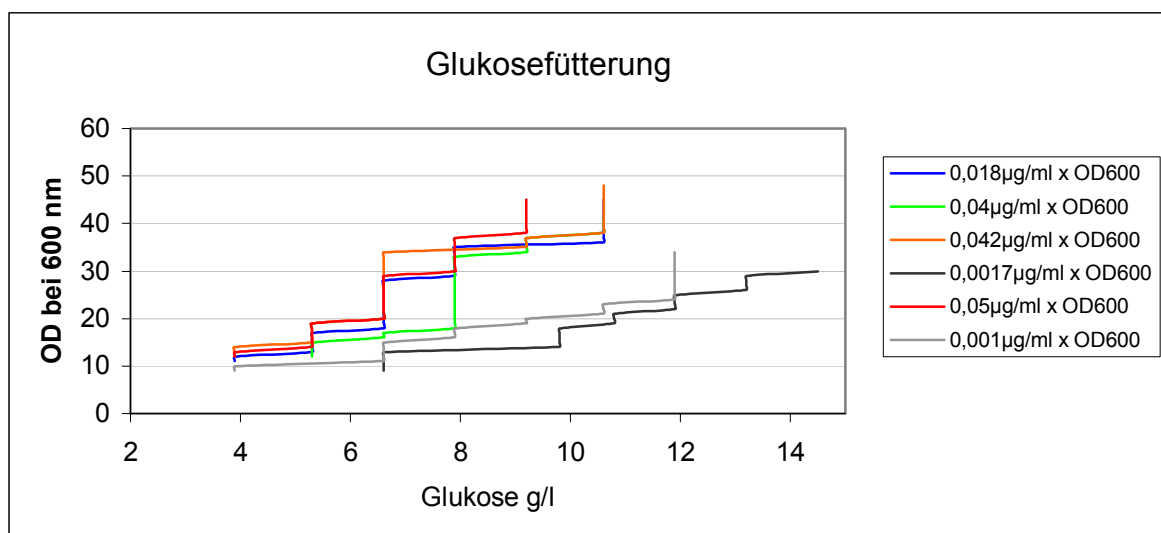


Abbildung 40: Glukosezufuhr in Abhängigkeit von der optischen Dichte bei 600 nm.

Vergleich der Proteinausbeute in Folge unterschiedlicher Glukosezufuhr bei Koexpression des Kaninchen-AK, kodiert auf pASK111Rab-pro-WR13, und der Faltungshelferproteine, kodiert auf pTUM4. Die Grafik zeigt, dass durch Senken der Glukosezufuhr eine höhere OD₆₀₀ und dadurch bedingt eine größere Proteinausbeute realisiert werden konnte.

5.3 Konstruktion und Expression eines Phagemids zur Selektion von F_{ab}-Fragmenten

Zu dem Expressionssystem für die Hochzelllichtfermentation rekombinanter Maus- und Kaninchen-AK wurde ein passendes Phagemid entwickelt. Damit sollte ein System geschaffen werden, das den Transfer der gesamten Expressionskassette vom Phagemid in den Expressionsvektor anschließend an das *Phage Display* in einem einzigen Schritt ermöglicht. Da Cam verglichen mit Amp den Selektionsdruck auf plasmidlose Zellen länger aufrechterhält, wurden die Phagemide, die im Gegensatz zu den Expressionsvektoren keinen *proBA*-Locus zur Unterstützung des Selektionsdrucks enthielten (6.1.2), mit dem Resistenzmarker *Cat* ausgestattet. Zunächst wurde überprüft, inwieweit und unter welchen Bedingungen die konstruierten Phagemide das F_{ab}-Fragment exprimierten. Dazu wurde die Expression des murinen F_{ab}-Fragments K411B, inseriert in die Rab und kodiert auf dem Phagemid pASK111Rab-p3-K411B (Abb. 24), getestet. Anschließend wurden durch Konstruktion der Phagemide pASK111-p3-WR13, 2, 5 die murinen Strukturgene durch die des Kaninchens ersetzt (Abb. 32) und exprimiert. Die Expression zeigte keinen Erfolg, was auf Probleme bei der Faltung und Zusammenlagerung des F_{ab}-Fragments zurückgeführt wurde (6.4.2). Um Faltung und Disulfidbrückenbildung des Kaninchen-AK im Periplasma durch Expression der Faltungshelferproteine, kodiert auf pTUM4, unterstützen zu können, wurde die Kaninchen-Expressionskassette des Klons 13 in den Vektor pASK85Rab-p3 (Abb. 21) inseriert und damit pASK85Rab-p3-WR13 (Abb. 43) hergestellt. Dieses Phagemid kodiert für das Amp-Resistenzgen *bla* und ist daher für die Koexpression mit pTUM4, der für das Cam-Resistenzgen *Cat* kodiert, geeignet. So konnte der Selektionsdruck mittels Amp und Cam auf beide Plasmide aufrechterhalten werden. Um die Tauglichkeit des Koexpressions-Systems für das *Phage Display* zu überprüfen, wurden ein F_{ab}-Fragment und ein Fusionsprotein bestehend aus F_{ab}-Fragment und p3 koexprimiert. Eine Übersicht über die konstruierten Phagemide findet sich in Abb. 47.

5.3.1 Expression des murinen Antikörpers K411B, inseriert in das Phagemid pASK111Rab-p3-K411B

Anhand des bereits beschriebenen Phagemids pASK111Rab-p3-K411B (Abb. 24) wurde die Funktionalität der Signalsequenzen RBP und OmpA in Verbindung mit Cam als Resistenzmarker getestet. Um eine mögliche Toxizität des AK K411B ausschließen zu können, wurde in zwei parallelen Experimenten das Vorhandensein des F_{ab}-Fragments nach

2,5- und 3,5-stündiger Induktion verglichen. K411B wurde dazu im *E. coli*-Stamm JM83, transformiert mit dem Phagemid pASK111Rab-p3-K411B, im 500 ml-Maßstab bei 25 °C in LB-Medium exprimiert (4.3.1.1). Direkt vor der Induktion wurden Proben zur Kontrolle der „Dichte“ des *tet*-Promotors entnommen und anschließend die Expression des Fremdproteins durch aTc induziert. Nach 2,5 h war eine OD₆₀₀ von 1,0 ohne Anzeichen von Zelllyse erreicht und die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet. Auch nach 3,5 h bei einer OD₆₀₀ von 1,2 waren keine Anzeichen von Zelllyse zu erkennen, allerdings befanden sich die Zellen in der stationären Phase. Sie wurden durch Zentrifugation geerntet.

Zum Nachweis des AK K411B wurde die nicht reduzierte periplasmatische Fraktion beider Expressionen über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, auf PVDF Membranen elektrotransferiert und im Western-Blot immunchemisch analysiert (4.3.3.1). Mittels des His₆-tags und des HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK (B) sowie eines monoklonalen HRP-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-AK (Abb. 41, A) wurden das F_{ab}-Fragment (45 kDa) und die HC (26 kDa) nachgewiesen. Die vor der Induktion entnommenen Fraktionen enthielten kein Protein, was die „Dichte“ des *tet*-Promotors in diesem System demonstrierte.

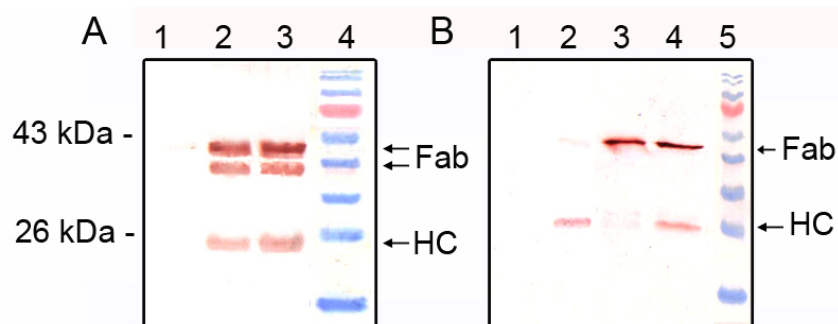


Abbildung 41: Spezifischer Nachweis des AK K411B kodiert auf pASK111Rab-p3-K411B im Western-Blot.

(A) Gesamtzellfraktion vor der Induktion (Spur 1), Periplasmafraktion nach 2,5-stündiger (Spur 2) und 3,5-stündiger Induktion (Spur 3) sowie ein Protein-Marker (Spur 4), aufgetrennt über in 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel und elektrotransferiert auf eine PVDF-Membran. Der Nachweis des F_{ab}-Fragments (45 kDa) und der HC (26 kDa) erfolgte im Western-Blot mittels eines monoklonalen IgG spezifischen Ziege-anti-Maus-AK. Bei dem mobileren Protein, dass mittels des polyklonalen AK, nicht aber durch den Maus-anti-His₆-AK bei 40 kDa nachgewiesen wurde, handelt es sich vermutlich um eine um einen Teil der konstanten Region der HC reduzierte Version des Proteins. (B) Gesamtzellfraktion vor der Induktion (Spur 1), Cytoplasmafraktion (Spur 2), Periplasmafraktion nach 2,5-stündiger (Spur 3) und 3,5-stündiger (Spur 4) Induktion, Protein-Marker (Spur 5), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel und auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Mit Hilfe des His₆-tags und einem HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK wurden F_{ab}-Fragment (45 kDa) und HC (26 kDa) immunchemisch nachgewiesen.

Die Funktionalität des F_{ab}-Fragments K411B, sekretiert mit den Signalsequenzen OmpA und RBP, wurde im kompetitiven Atrazin-ELISA untersucht (4.3.3.2). Die mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtete Mikrotiterplatte wurde dazu mit einer Verdünnungsreihe der ungereinigten Periplasmafraktion von 1:10 bis 1:1000 inkubiert. Den Proben wurde HRP-gekoppelter Atrazin-Tracer bzw. Tracer und zusätzlich freies Atrazin zur Verdrängung der Tracer-AK-Bindung zugesetzt. Bei einer Verdünnung von 1:10 wurde ein deutlich größeres Signal als das der Kontrolle, bei der Atrazin die AK-Antigen-Bindung verdrängt hatte, gemessen (Abb. 42). Daraus kann auf eine spezifische Bindung von K411B an Atrazin geschlossen werden.

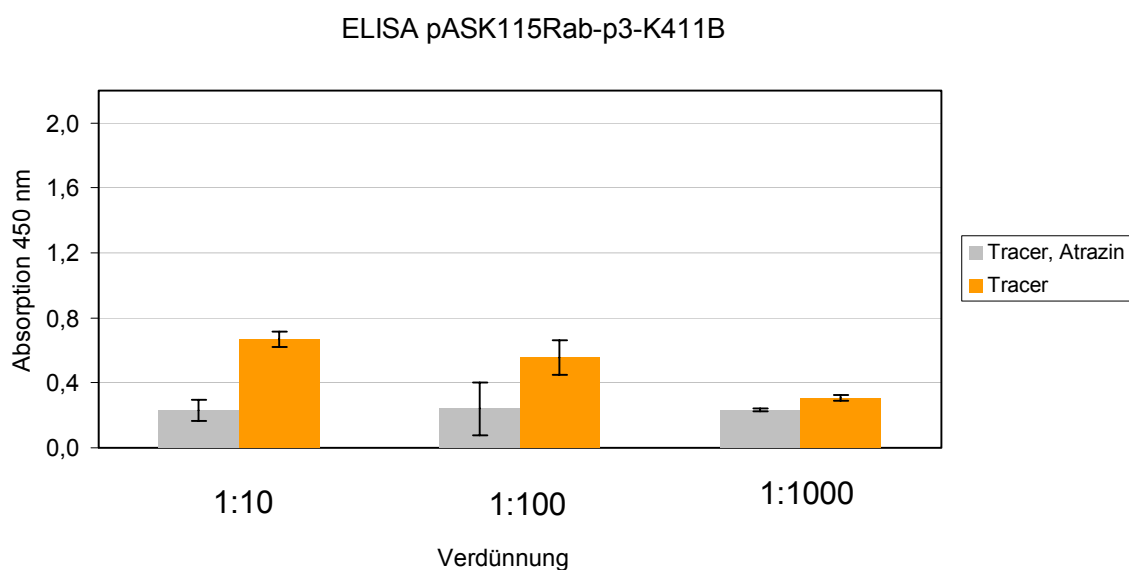


Abbildung 42: Kompetitiver ELISA zum Nachweis der Bindungseigenschaften des AK K411B.

Die Spezifität des F_{ab}-Fragments K411B für Atrazin, kodiert auf pASK111Rab-p3-K411B, wurde untersucht. Eine mit einem Ziege-anti-Maus-AK beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit der periplasmatischen Fraktion in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 inkubiert. Zum Nachweis des AK wurde der HRP-gekoppelte Atrazin-Tracer eingesetzt (orange). Um die Funktionalität des AK K411B für Atrazin zu überprüfen, wurde die AK-Tracer-Bindung durch Atrazin verdrängt (grau). Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und die Mittelwerte (n = 3) mit Standardabweichung dargestellt. Die Verdrängung der AK-Antigenbindung durch Atrazin ist bei einer Verdünnung von 1:10 deutlich zu erkennen.

5.3.2 Konstruktion des Phagemids pASK85Rab-p3-WR13 und Koexpression des Kaninchen-AK mit den Faltungshelferproteinen kodiert auf pTUM4

5.3.2.1 Konstruktion des Phagemids pASK85Rab-p3-WR13

Um den Kaninchen-AK, inseriert in ein Phagemid, mit den Faltungshelferproteinen, kodiert auf pTUM4, koexprimieren zu können, musste die Expressionskassette bestehend aus Rab, LC und HC des Kaninchens in pASK85Rab-p3 (Abb. 21) inseriert werden. pASK85Rab-p3 kodiert für das Amp-Resistenzgen *bla* und ist daher kompatibel mit dem Plasmid pTUM4, der für das Cam-Resistenzgen *Cat* kodiert. pASK85Rab-p3 und pASK111Rab-p3-WR13 (Abb. 32) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *SacII* im Restriktionsverdau gespalten, die Enden des Vektors pASK85Rab-p3 dephosphoryliert (4.2.4.4) und nach der Reinigung mit der Expressionskassette Rab-WR13 kovalent verknüpft (4.2.4.5). Der Ligationsansatz wurde in elektrokompetente *E. coli* TG1 transformiert (4.2.2) und auf Kulturplatten mit Amp inkubiert Aus drei Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und der Klonierungserfolg durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (nicht gezeigt). Das dabei entstandene Phagemid wurde als pASK85Rab-p3-WR13 bezeichnet (Abb. 43).

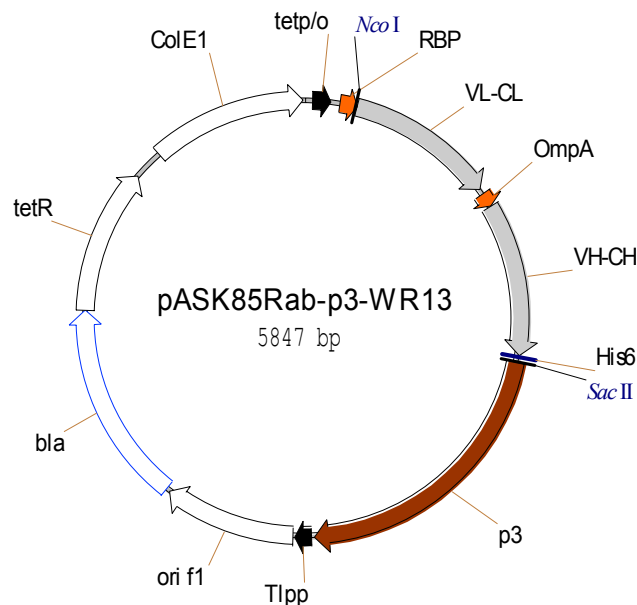


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Phagemids pASK85Rab-p3-WR13.

Der Vektor kodiert für ein Fusionsprotein, bestehend aus der RBP-Signalsequenz und der LC (V_L-C_L) des Kaninchen-Klons IgG13, sowie für ein Fusionsprotein, bestehend aus der OmpA-Signalsequenz, der HC (V_H-C_H) des Kaninchen-AK, dem His₆-tag und dem daran anschließenden p3. Alle übrigen Abkürzungen entsprechen denen von pASK85-K411B (Abb 8).

5.3.2.2 Koexpression des Kaninchen-AK inseriert in pASK85Rab-p3-WR13 mit Faltungshelferproteinen

Die Transformation (4.2.2) des elektrokompetenten *E. coli*-Stamms JM83 erfolgte zunächst mit pTUM4. Anschließend wurden erfolgreich mit pTUM4 transformierte Zellen erneut kompetent gemacht (4.2.2.2) und mit dem Phagemid pASK85Rab-p3-WR13 transformiert. Die Koexpression der sowohl mit pTUM4 als auch mit pASK85Rab-p3-WR13 transformierten Zellen erfolgte im 2 l-Maßstab im Schüttelkolben in LB-Amp-Cam-Medium. Induziert wurde die Genexpression durch aTc. Die Induktionsdauer bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 1,0$ betrug 3,5 h. Die Zellen zeigten ein exponentielles Wachstum (Abb. 44) und keine Anzeichen von Zellyse. Sie wurden durch Zentrifugation geerntet.

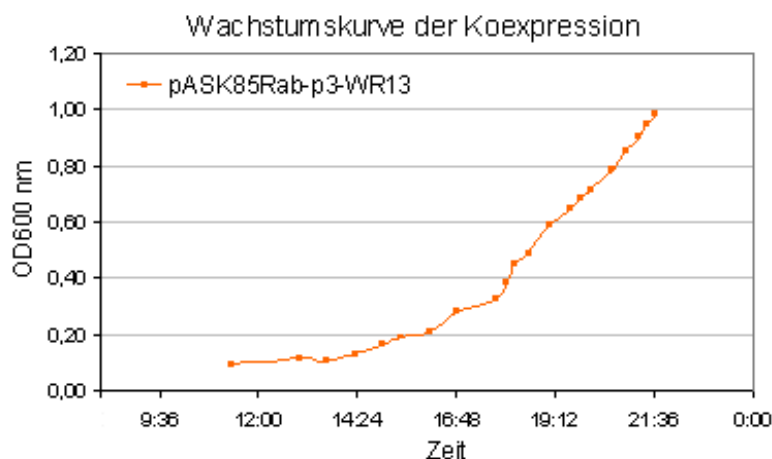


Abbildung 44: Wachstumsrate von *E. coli* JM83 bei Koexpression des Kaninchen-AK.

Das Kaninchen-F_{ab}-Fragment des Klons IgG13, kodiert auf pASK85Rab-p3-WR13, und die Faltungshelferproteine, kodiert auf pTUM4, wurden in 2 l LB-Medium exprimiert. Nach 3,5-stündiger Induktion waren keine Anzeichen von Zellyse zu erkennen.

Der Nachweis des Kaninchen-F_{ab}-Fragments und der beiden Ig-Ketten erfolgte durch Auftrennung der nicht reduzierten und reduzierten periplasmatischen Fraktion über ein 14 %iges SDS-Polyacrylamidgel im SDS-PAGE (4.3.2.2) mit anschließender Coomassie-Färbung. In der Analyse derselben Fraktionen im Western-Blot (4.3.3.1) wurden mittels eines HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK bzw. eines IgG-spezifischen HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-AK die Ergebnisse der SDS-PAGE bestätigt und das Kaninchen F_{ab}-Fragment (40 kDa) und die HC (25 kDa) nachgewiesen (Abb. 45).

5.3.2.3 Koexpression eines Kaninchen-F_{ab}-g3p-Fusionsproteins kodiert auf pASK85Rab-p3-WR13 mit Faltungshelferproteinen

Ein Fusionsprotein, bestehend aus F_{ab}-Fragment und g3p, wurde in Anwesenheit der Faltungshelferproteine im Amber-Suppressorstamm *E. coli* TG1 exprimiert, um die Tauglichkeit des konstruierten Phagemids für das *Phage Display* zu überprüfen. Der elektrokompetente *E. coli*-Stamm TG1 wurde dazu zunächst mit pTUM4 transformiert und über Nacht auf LB-Cam-Kulturplatten kultiviert. Mit pTUM4 transformierte Zellen wurden erneut kompetent gemacht (4.2.2.2) und mit dem Phagemid pASK85Rab-p3-WR13 (Abb. 43) transformiert. Die Koexpression der mit pTUM4 und pASK85Rab-p3-WR13 transformierten Zellen fand im 500 ml-Maßstab im Schüttelkolben in LB-Amp-Cam-Medium statt (4.3.1.1). Die Induktion der Expression erfolgte mit aTc. Nach 3,5-stündiger Induktion war eine OD₆₀₀ = 1,0 erreicht und die Zellen, die keine Anzeichen von Zellyse zeigten, wurden geerntet. Die Periplasmafraktion wurde präpariert und die Fraktionen im Western-Blot analysiert (4.3.3.1).

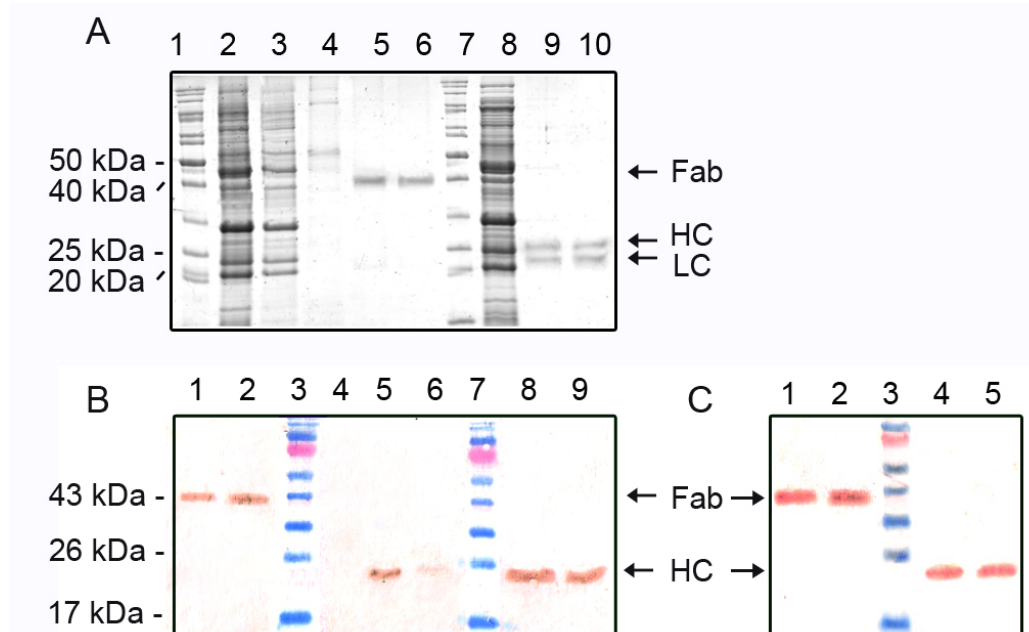


Abbildung 45: Nachweis der Kaninchen-Proteine kodiert auf pASK85Rab-p3-WKR13 in SDS-PAGE und Western-Blot.

Das mit den Faltungshelferproteinen von pTUM4 koexprimierte Kaninchen-F_{ab}-Fragment, kodiert auf dem Vektor pASK85Rab-p3-WKR13, wurde in SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B, C) nachgewiesen. (A) Protein-Marker (Spur 1, 7), Periplasmafraktion (Spur 2), Durchfluss (Spur 3), unspezifische Fraktion (Spur 4), zwei exemplarische nicht reduzierte IMAC-gereinigte Periplasmafraktionen (Spur 5, 6), reduzierte Periplasmafraktion (Spur 8) und zwei exemplarische reduzierte IMAC-gereinigte spezifische Periplasmafraktionen (Spur 9, 10), aufgetrennt über ein 14 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff. Die Gele wurden Coomassie-gefärbt und F_{ab}-Fragment (40 kDa), HC (25 kDa) und LC (23 kDa) nachgewiesen. (B) Zwei exemplarische

Fractionen nicht reduzierter, IMAC-gereinigter spezifischer Periplasmafraktion (Spur 1, 2), Protein-Marker (Spur 3, 7), reduzierte Cytoplasma- (Spur 4) und Periplasmafraktion (Spur 5), reduzierter Durchfluss (Spur 6) sowie zwei reduzierte IMAC-gereinigte spezifische Periplasmafraktionen (Spur 8, 9), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und mittels des His₆-tag und einem HRP-gekoppelten Maus-anti-His₆-AK F_{ab}-Fragment (40 kDa) und HC (26 kDa) im Western-Blot nachgewiesen. (C) Zwei nicht reduzierte Fractionen der IMAC-gereinigten spezifischen Periplasmafraktion (Spur 1, 2), Protein-Marker (Spur 3) und zwei reduzierte Fractionen des spezifischen Peaks aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und das F_{ab}-Fragment (40 kDa) und die HC (26 kDa) im Western-Blot mittels eines IgG-spezifischen Kaninchen-AK nachgewiesen.

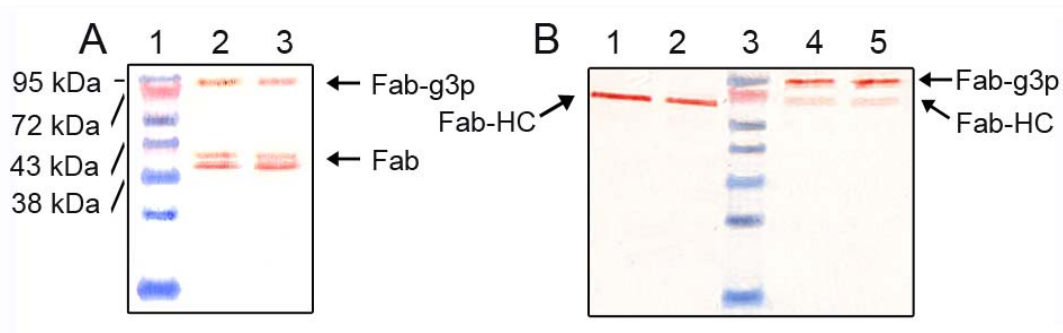


Abbildung 46: Spezifischer Nachweis des Kaninchen-Fusionsproteins im Western-Blot

Das auf pASK85Rab-p3-WR13 kodierte und in *E. coli* TG1 mit den Faltungshelferproteinen koexprimierte Kaninchen-F_{ab}-g3p-Fusionsprotein wurde im Western-Blot nachgewiesen. (A) Zwei exemplarische nicht reduzierte Periplasmafraktionen (Spur 2, 3), aufgetrennt über ein 14 %iges SDS-Polyacrylamidgel, wurden auf eine PVDF Membran elektrotransferiert und mit einem polyklonalen HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-AK F_{ab}-Fragment und Fusionsprotein nachgewiesen. (B) Zwei exemplarische reduzierte Periplasmafraktionen (Spur 1, 2), ein Protein-Marker (Spur 3) und zwei exemplarische nicht reduzierte Periplasmafraktionen (Spur 4, 5), aufgetrennt über ein 14 %iges SDS-Polyacrylamidgel, wurden auf eine PVDF Membran elektrotransferiert. Die Fusionsproteine wurden mittels eines primären Maus-anti-g3p-AK und eines HRP-gekoppelten sekundären Maus-anti-g3p-AK nachgewiesen.

Mittels eines Ziege-anti-Kaninchen-AK konnten das F_{ab}-Fragment und das Fusionsprotein, bestehend aus F_{ab}-Fragment und g3p in der nicht reduzierten Periplasmafraktion nachgewiesen werden. Ein Maus-anti-g3p-AK erlaubte den Nachweis des gesamten Fusionsproteins bei 85 kDa in der nicht reduzierten Fraktion, bestehend aus g3p (45 kDa) und dem Kaninchen F_{ab}-Fragment (40 kDa). Außerdem konnte in der reduzierten Fraktion ein Fusionsprotein, bestehend aus g3p (45 kDa) mit der HC (26 kDa), bei 70 kDa sichtbar gemacht werden (Abb. 46).

6 Diskussion

Molekularbiologische Methoden ermöglichen die Produktion vektorkodierter Proteine und die zielgerichtete Modifikation ihrer Eigenschaften. So können beispielsweise AK-Varianten mit geringerer Immunogenität, höherer Affinität, veränderter Antigenspezifität oder gesteigerter Stabilität gewonnen werden (Krebber *et al.*, 1997). Als Wirtsorganismus dient hierzu insbesondere *Escherichia coli*, deren rasches Wachstum zu hoher Zelldichte in preiswerten Substratmedien, gut charakterisierte Genetik (Koonin, 1997) und steigende Anzahl von Mutanten-Stämmen die Expression zahlreicher Proteine hoher Qualität und Quantität ermöglicht (Baneyx, 1999; Swartz, 2001; Sorensen und Mortensen, 2005a, 2005b). Die erstmal von Talmadge *et al.* (1980) durchgeführte Sekretion eines Fusionsproteins in das Periplasma macht die Produktion extrazellulär aktiver Proteine in nativer Form in Bakterien mittels effizienten Transports über die innere Bakterienmembran möglich. Dabei wird das Polypeptid als Fusionsprotein zusammen mit einer der zahlreichen prokaryontischen Signalsequenzen (z.B. PhoA, OmpA, RBP, PelB) exprimiert und von dieser über die Bakterienmembran geschleust. Das Protein wird im oxidativen Milieu des Periplasmas gefaltet und mit Disulfidbrücken versehen (Baneyx, 1999). Dieses Sekretionsprinzip wurde von Better *et al.* (1988) und Skerra und Plückthun (1988) auf die gentechnische Herstellung von AK-Fragmenten in *E. coli* übertragen und in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es hat den Vorteil, dass die entstandenen Proteine kaum von Proteasen angegriffen werden und im optimalen Fall aktiv, stabil, löslich und N-terminal unverändert sind (Choi und Lee, 2004; Mergulhao *et al.*, 2005). Sie können mit einfachen Methoden in relativ reiner Form aus dem Periplasma, in dem neben den sekretierten Fusionsproteinen nur etwa 4 % der zelleigenen Proteine zu finden sind, isoliert werden (Makrides, 1996).

Viele Faktoren, wie beispielsweise der Bakterienstamm und die Eigenschaften des für die Produktion gewählten Expressionsvektors und des exprimierten Proteins, beeinflussen die erfolgreiche Produktion eukaryontischer Proteine in *E. coli*. Die Anordnung transkriptionischer und translatorischer Regulationssequenzen, die Sekundärstruktur sowie die Stabilität der mRNA spielen eine Rolle (Carrier und Keasling, 1999; Stenstrom *et al.*, 2001). Auch das Auftreten von in *E. coli* selten verwendeten Kodons (codon usage, Kane, 1995) kann sich auf die Proteinausbeute auswirken. Vor allem aber bestimmt die Effizienz, mit der das Präprotein in den periplasmatischen Raum exportiert und dort korrekt von der Signalsequenz abgespalten und gefaltet wird, den Produktionserfolg (Plückthun und Skerra, 1989; Kiefhaber *et al.*, 1991; Baneyx, 1999). Außerdem können einzelne *E. coli*-Stämme gravierenden Einfluss auf die

Produktion heterologer Proteine nehmen, der sich im Wachstumsverhalten manifestiert aber auch in der Effizienz, mit der sich das Fremdprotein in dem jeweiligen Stamm korrekt faltet. Deshalb ist die Wahl des Bakterienstamms für die Produktion von rAK ein für die Ausbeute wichtiger Faktor (Luli und Strohl, 1990). Der Gram-negative Bakterien-Stamm *E. coli* K-12 JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ist aufgrund seiner guten Sekretionseigenschaften in Verbindung mit der effizienten Faltung rekombinanter Proteine in Schüttelkolbenexpression und Fermentation bereits mehrfach erfolgreich verwendet worden (Skerra, 1989; Skerra und Plückthun, 1991; Fiedler und Skerra, 2001; Schlapschy, 2004). Aus diesem Grund wurde *E. coli* JM83 für die Entwicklung eines Expressionsvektors für die Hochzelldichtefermentation des murinen F_{ab}-Fragments K411B und des rekombinanten Kaninchen-AK verwendet. Für die Produktion der Kaninchen-AK war die Wahl des Bakterienstamms aufgrund der zusätzlichen Disulfidbrücke und der großen Anzahl an Cysteinen in den Strukturgenen der LC und der HC (vgl. Abb. 35), die die korrekte Faltung verkomplizieren und zudem toxisch wirken können (Humphreys *et al.*, 1997), von besonderer Bedeutung. Abbildung 47 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

6.1 Murine rekombinante Antikörper

6.1.1 Der rekombinante Antikörper K411B

Das F_{ab}-Fragment K411B leitet sich von dem mAK K4E7 ab. Dieser wurde von Giersch (1993) durch Immunisierung von Mäusen mit dem Hapten 4-Chloro-6-(Ethylamin)-1,3,5-Triazin-2-(6-Aminohexansäure) und anschließende Herstellung der Hybridomzelllinie K4E7 durch Fusion einer B-Zelle mit einer Myelomzelle erzeugt. Der mAK K4E7 mit einem IC₅₀ von 0,1 µg l⁻¹ (ca. 0,9 nmol l⁻¹) gehört dem Isotyp IgG2b mit einer V_{LK}-Domäne der Subgruppe V_K-III und einer V_H-Domäne der Subgruppe V_H-IIIC an (Kusharyoto, 2001). Durch Insertion der variablen Domänen der LC und HC von K4E7 in den Leserahmen der konstanten Regionen von pASK85 (Skerra, 1994a), in dem bereits die C_{H1}-Domäne der Subklasse IgG1 und die C_L-Domäne vorlagen, entstand das F_{ab}-Fragment K411B im Vektor pASK85-K411B (Kramer und Hock, 1996). Durch die Umklonierung kam es durch den Austausch der C_{H1}-Domäne zum Wechsel der Subklasse von IgG2b zu IgG1, was in anderen Studien zur Verbesserung der Expression in *E. coli* führte (Carter *et al.*, 1992; Alftan *et al.*, 1993). Für das in *E. coli* JM101 exprimierte F_{ab}-Fragment K411B ergab ein kompetitiver Atrazin-ELISA allerdings einen um eine Größenordnung höheren IC₅₀-Wert als für den mAK K4E7, (Kusharyoto, 2001; Kusharyoto *et al.*, 2002). Der Grund hierfür wurde nicht publiziert.

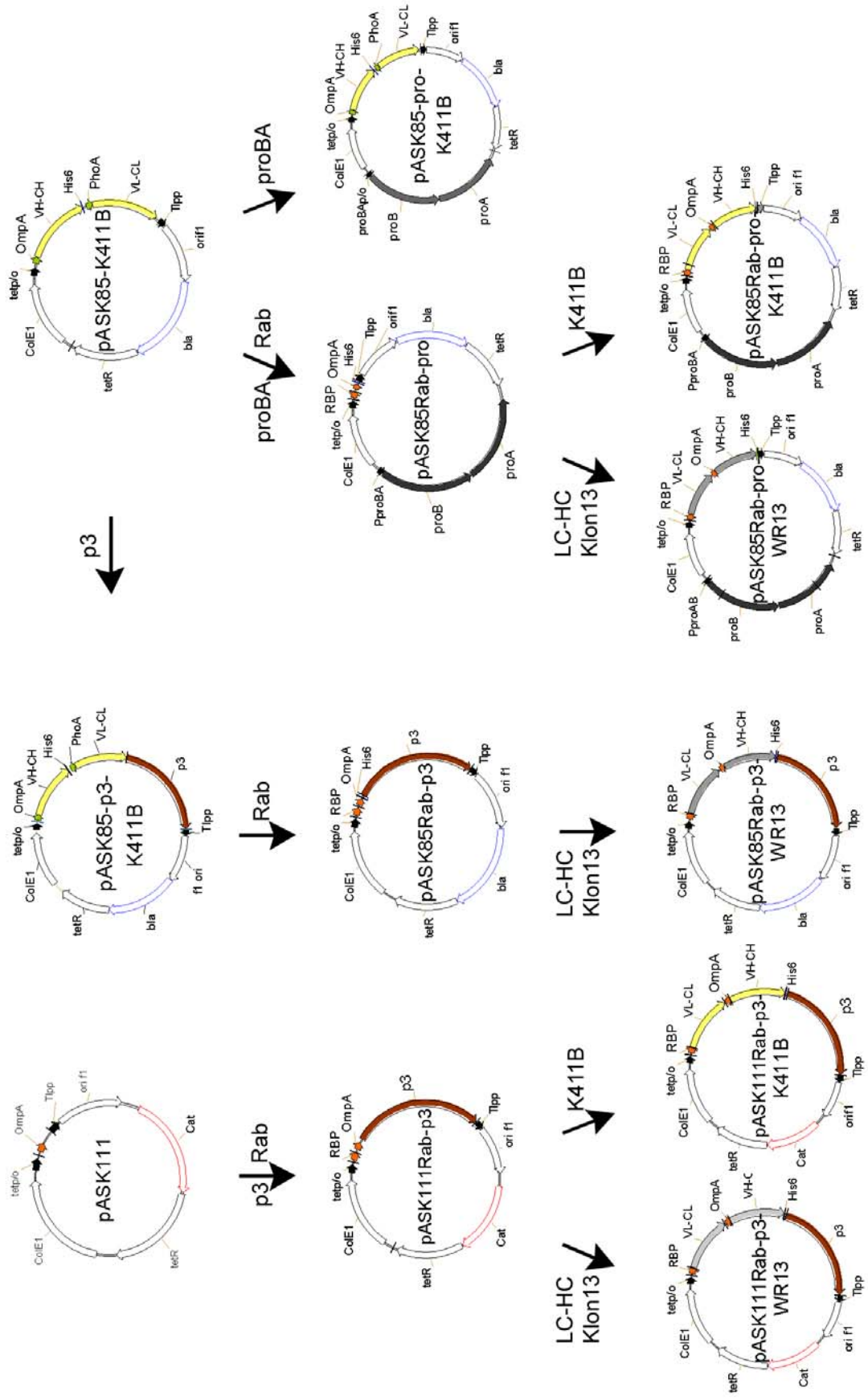


Abbildung 47. Übersicht über alle verwendeten Expressionsvektoren und Phagemide.

Lange *et al.* (2001) exprimierten das F_{ab}-Fragment außerdem im *fed-batch*-Verfahren im 5 l-Fermenter in *Pichia Pastoris*. Untersuchungen der Bindungseigenschaften des produzierten AK ergaben auch hier einen IC₅₀ von 3 µg l⁻¹ bzw. 14 nmol l⁻¹ und entsprachen damit der von Kusharyoto (2001) und Kusharyoto *et al.* (2002) angegebenen Größenordnung des IC₅₀. Es blieb unklar, ob möglicherweise der Austausch der C_{H1}-Domäne zur Verminderung der Sensitivität des F_{ab}-Fragments im Vergleich zum monoklonalen AK geführt hatte. Auch wenn die Bindungseigenschaften des F_{ab}-Fragments nicht die des monoklonalen Antikörpers erreichen, handelt es sich um einen sehr affinen AK. Das stabile F_{ab}-Fragment K411B (Abb. 48) wurde aus diesem Grund im Rahmen des EU-Projekts ELISHA für die Entwicklung eines immunomagnetisch-elektrochemischen Sensors zur Detektion von Pestiziden in der Umweltanalytik eingesetzt. Um die hierfür notwendigen AK-Mengen produzieren zu können, sollte ein Expressionssystem für die Hochzelldichtefermentation etabliert werden.

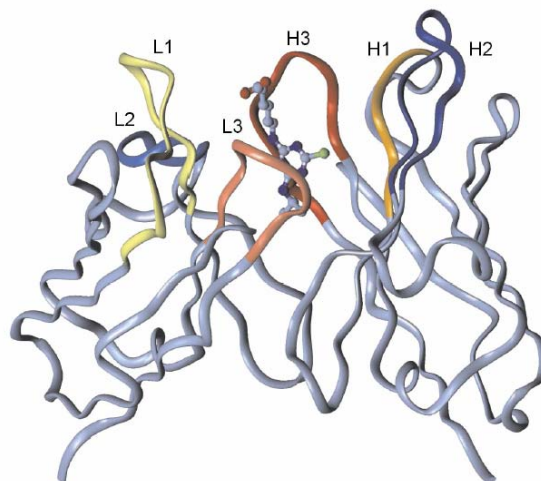


Abbildung 48: Struktur der Bindungsdomäne des F_{ab}-Fragments K411B.

Die Bindungsdomäne des murinen AK K411B wird von den CDRs der LC (L1, L2, L3) und der HC (H1, H2, H3) geformt. Die Darstellung zeigt die Position des s-Triazin-Haptens in der Bindungsdomäne von K411B, nach Kusharyoto (2001).

6.1.2 Der Expressionsvektor pASK85-pro-K411B

Da der Stamm *E. coli* JM83 aufgrund seiner Auxotrophie für die Aminosäure Prolin, die auf einer chromosomalen Deletion des *proBA*-Operons beruht, nicht in Minimalmedium wächst, wurde die Komplementierung des Minimalmediums für die Hochzelldichtefermentation des rAK K411B mit verschiedenen Prolin-Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse bestätigten frühere Experimente, die ebenfalls zu keinem verbesserten Wachstum der Zellen durch Ergänzung des Mediums mit Prolin geführt hatten (Fiedler und Skerra, 2001). Grund hierfür ist vermutlich die Nutzung der Aminosäure Prolin

als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle durch die Zellen (Neidhardt *et al.*, 1990). Abb 49 zeigt die Beteiligung des für die Enzyme γ -Glutamylkinase (*proB*) und Glutamat-5-Semialdehyd-Dehydrogenase (*proA*) kodierenden *proBA* Locus (Mahan und Csonka, 1983; Deutch *et al.*, 1984) an der Prolinsynthese (Baich, 1969, 1971).

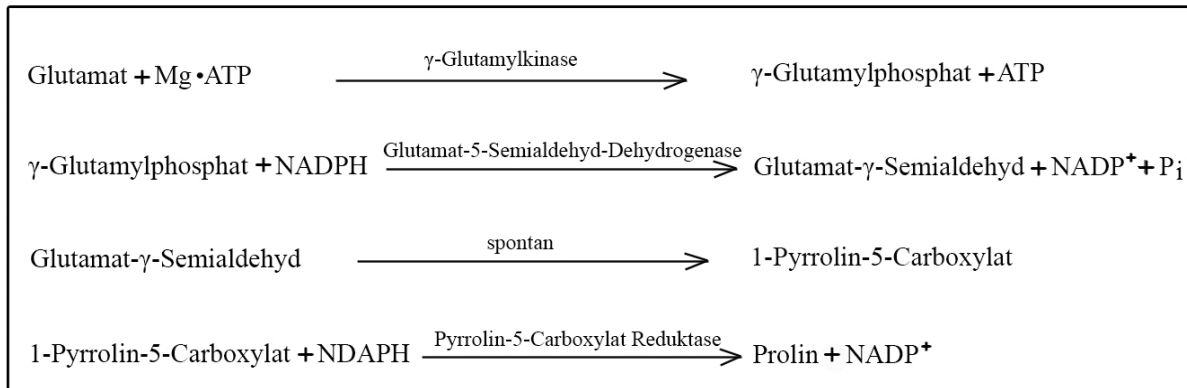


Abbildung 49: Beteiligung der Gene *proB* und *proA* an der Prolinsynthese.

Der *proBA* Locus kodiert für die Enzyme γ -Glutamylkinase (*proB*) und Glutamat-5-Semialdehyd-Dehydrogenase (*proA*), die für die Prolin-Biosynthese von entscheidender Bedeutung sind.

Um die Problematik der Prolin-Auxotrophie zu umgehen, hatten Kramer *et al.* (2002) den s-Triazin-AK, kodiert auf pASK85-K4H7, erfolgreich im Bakterienstamm *E. coli* W3110 exprimiert. Das F_{ab}-Fragment K411B konnte in *E. coli* W3110, transformiert mit pASK85-K411B, ebenfalls exprimiert und seine Funktionalität im ELISA nachgewiesen werden. Die Fermentation von K411B im *E. coli*-Stamm W3110 in Minimalmedium führte allerdings im Verlauf der Expression zu einem Plasmidverlust von 40 %, wie regelmäßige Ausstriche auf LB-Agarplatten mit und ohne Ampicillin (Amp) bewiesen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Verwendung von Amp als alleiniger Selektionsmarker schon zu einem frühen Zeitpunkt zum Verlust des Selektionsdrucks führen kann. Gresch (1997; zitiert nach Schlapschy, 2004) beobachtete im Verlauf einer Fermentation im 4 l-Fermenter einen Plasmidverlust von 99 %. Grund hierfür ist die Tatsache, dass im Verlauf der Sekretion des Fremdproteins die äußere Bakterienmembran aufgrund der metabolischen Bürde schneller permeabel (*leaky*) wird als die Cytoplasmamembran (Plückthun und Skerra, 1989; Skerra, 1989). Dadurch kann es zu einem relativ frühen Zeitpunkt zur Freisetzung der im periplasmatischen Raum vorliegenden Proteine, beispielsweise der β -Lactamase, kommen. Das hat einen Abbau des Bakterioantikums im Kulturmedium und einen Verlust an F_{ab}-Fragmenten zur Folge (Georgiou *et al.*, 1988). Der Selektionsdruck auf plasmidlose Zellen geht zurück und diese können sich ungehindert vermehren (Summers, 1991), wodurch

6.1.3 Produktion des Antikörpers K411B inseriert in pASK85-pro-K411B in der Hochzelllichtfermentation

6.1.3.1 Adaptierung des Fermentationsprotokolls

Um eine hohe AK-Ausbeute realisieren zu können, müssen toxische Effekte, bedingt durch Überexpression der Fremdproteine, vermieden werden. Eine dem Bakterienstamm, dem Expressionsvektor und dem exprimierten Protein angepasste Fütterungsstrategie ist dabei von erheblicher Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund ein von Schiweck und Skerra (1995) entwickeltes und erfolgreich verwendetes Fermentationsverfahren an die Produktion des murinen rAK K411B (und später des Kaninchen-AK) in *E. coli* JM83 im 2 l-Laborfermenter adaptiert. Dabei schloss sich einer stationären (*batch*) Phase mit unlimitiertem Wachstum eine Zufütterungsphase (*fed-batch*) mit steigender Glukose-Zufuhr an. Bei Verwendung von Glukose als einziger Kohlenstoffquelle kann durch die Glukosekonzentration im Medium während der *fed-batch*-Phase eine Wachstumsrate $\mu < \mu_{max}$ sichergestellt werden. Dadurch können die Acetatbildung und der damit einhergehende *Crabtree*-Effekt vermieden werden. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass es abhängig vom Bakterienstamm bereits ab einer Acetatkonzentration von $> 0,5 \text{ g l}^{-1}$ im Medium zu einer Reduktion des Wachstums kommen kann (Nakano *et al.*, 1997). Ab einer Konzentration von 5 g l^{-1} hat Acetat deutlich sichtbare Auswirkungen auf die Proteinausbeute (Luli und Strohl, 1990). Um die hemmenden Effekte des Acetats zu umgehen, sollten eine Glukosekonzentration von $1-5 \text{ g l}^{-1}$ und eine Acetatkonzentration von $0,5 \text{ g l}^{-1}$ im Medium möglichst nicht überschritten werden (Luli und Strohl, 1990).

Die Temperatur wurde während der Fermentationsläufe konstant bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Damit konnte eine Reduktion der Ausbeute bedingt durch die Bildung von Einschlusskörpern (*Inclusion Bodies*) aufgrund von Temperaturstress bzw. die Proteolyse des Fremdproteins als Folge der Produktion von Hitzeschockproteinen verhindert werden (Neidhardt *et al.*, 1984; Surek *et al.*, 1991; Glick, 1995). Der pH-Wert wurde mit 12,5 %iger Ammoniaklösung, die gleichzeitig als Stickstoffquelle diente, auf 6,9 und der verfügbare Sauerstoff ($p\text{O}_2$) auf $> 30 \%$ eingestellt. Bei der Adaptierung des Fermentationsprotokolls an die Expression wurden direkte und indirekte *feedback*-Kontrolle kombiniert. Dadurch sollte eine optimale Glukosezufuhr zur Vermeidung von Acetatbildung und damit eine möglichst hohe Proteinausbeute sichergestellt werden. Bei der direkten *feedback*-Kontrolle entscheidet die Konzentration des limitierenden Nährstoffs zum Zeitpunkt der Messung über die weitere Glukosezufuhr. Bei der indirekten *feedback*-Kontrolle werden Parameter, die einen

Rückschluss auf die Glukosekonzentration zulassen, beispielsweise der pO_2 - und der pH-Wert (Riesenberg und Guthke, 1999), gemessen und die Glukosezufuhr daran orientiert. Ein im Verhältnis zur Glukosezufuhr überproportionales Absinken des pH-Werts, erkennbar an einem überproportionalen Anstieg der Ammoniakzufuhr, lässt auf Acetatbildung schließen. Ein Ansteigen des pH-Werts bei Wachstum mit Glukose als limitierendem Faktor weist hingegen auf den Verbrauch des Substrats und den Beginn einer Hungerphase hin. Ebenso kann bei Ansteigen des pO_2 -Werts bei gleich bleibender Sauerstoffzufuhr davon ausgegangen werden, dass die Zellen aufgrund von Nährstoffmangel das Wachstum und damit die Sauerstoffaufnahme eingestellt haben. Ein solches Ansteigen von pO_2 - und pH-Wert wurde bei Expression des AK K411B jeweils nach etwa 16-stündiger *batch*-Phase bei einer OD_{600} von etwa 10 beobachtet, wodurch der Verbrauch der zu Beginn der *batch*-Phase vorgelegten Glukose signalisiert wurde. Um Hungerstress und den damit verbundenen Rückgang der Proteinausbeute zu vermeiden, wurde die *fed-batch*-Phase bereits vor Verbrauch des vorgelegten Kohlenstoffs bei einer $OD_{600} = 9$ durch Ergänzung des Mediums mit Glukose gestartet. Durch regelmäßige Probenentnahme während der *fed-batch*-Phase konnte eine Wachstumsrate von $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ berechnet werden (4.3.1.3). Außerdem ergaben regelmäßige Analysen (4.3.1.4) einen Anstieg von Glukose- und Acetatkonzentration im Medium nach etwa 2-stündiger Induktionsdauer (5.1.3.1). Zur Reduktion der Acetatproduktion wurde nach Angaben von Korz *et al.* (1995) die Glukosezufuhr berechnet, die eine durchschnittliche Wachstumsrate von $0,19 \text{ h}^{-1}$ sichergestellte. Zwar kann bereits eine Wachstumsraten von $0,1$ - $0,35 \text{ h}^{-1}$ zur Akkumulation von Acetat führen, viele Bakterienstämme exprimieren jedoch in diesem Bereich Fremdproteine, ohne dass es durch Acetatbildung zu einer Wachstumshemmung kommt, wie Untersuchungen mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen ergaben (Luli und Strohl, 1990; Lee, 1996; Lee *et al.*, 1999).

6.1.3.2 Produktion des murinen AK K411B im Fermenter

Mittels des adaptierten Fütterungsprotokolls konnte die Ausbeute des murinem F_{ab} -Fragments K411B in der Hochzelllichtfermentation im Fermenter von $160 \mu\text{g l}^{-1} \cdot OD_{600}$ auf $240 \mu\text{g l}^{-1} \cdot OD_{600}$ gesteigert werden. Die anfangs um fast 50 % geringere Proteinmenge kann auf die hemmende Wirkung des als Folge eines Überflussmetabolismus gebildeten Acetats zurückgeführt werden. Lange *et al.* (2001) erreichten bei der Expression des F_{ab} -Fragments K411B in *Pichia Pastoris* eine Proteinausbeute von 40 mg Protein pro l Fermentationskultur. Da lediglich 30 % des in *Pichia Pastoris* exprimierten K411B F_{ab} -Fragments in korrekt gefalteter Form vorlagen und es sich um einen anderen Wirtsorganismus handelte, können die Ergebnisse jedoch nur schlecht verglichen werden (Lange *et al.*, 2001).

Kramer *et al.* (2002) konnten bei der Expression des s-Triazin-F_{ab}-Fragments K47H eine Proteinausbeute von $100 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$ realisieren, wobei die Expression zwar ebenfalls in *E. coli*, jedoch in Stamm W3110 und nicht in JM83 stattgefunden hatte. Dies Ergebnis lässt auf einen positiven Effekt der Verwendung des Stammes *E. coli* JM83 und der Adaptierung des Fermentationsprotokolls auf die Proteinproduktion schließen.

Das in dieser Arbeit in der Hochzelllichtfermentation produzierte F_{ab}-Fragment K411B wurde biotinyliert (INRA, Paris) und an einer magnetischen Sensoroberfläche immobilisiert (Ecole Centrale de Lyon). Die magnetischen Nanopartikel waren zu diesem Zweck vor der Immobilisierung auf der Sensoroberfläche mit Streptavidin beschichtet worden, das als funktionaler Vermittler zwischen den biotinylierten F_{ab}-Fragmenten und der Monolayer dienen sollte. Der im Rahmen des EU-Projekts ELISHA entwickelte immunomagnetisch-elektrochemische Biosensor konnte das Antigen Atrazin sensitiv im Messbereich von 10-600 ng ml⁻¹ detektieren (Helali *et al.*, 2006).

6.2 Vektoren zur Produktion von Kaninchen-Antikörpern

6.2.1 Selektion und Produktion von Kaninchen-Antikörpern

Zu Schwierigkeiten bei der Herstellung löslicher Proteine kann zum einen die Faltung im Periplasma, zum anderen die Toxizität der exprimierten Proteine und Fusionsproteine führen. Der Kaninchen-AK zeichnet sich nicht nur durch eine zusätzliche Disulfidbrücke aus, die die Probleme bei der Faltung erhöhen kann, sondern auch durch das Vorhandensein einer Reihe freier Cysteine, die in Wechselwirkung miteinander und mit der Bakterienmembran treten und dadurch toxisch wirken können (Humphreys *et al.*, 1997). In der hier vorliegenden Arbeit sollte das zunächst entwickelte murine Expressionssystem an die Bedingungen der Produktion von Kaninchen-AK adaptiert werden. Neben einem Expressionsvektor für die Hochzelllichtfermentation sollte außerdem ein Phagemid zur Selektion affiner AK entwickelt werden. Die Eigenschaften des *Phage Display* führen zu einer Selektion auf hohe Expressionsraten und gute Faltungseigenschaften auf Kosten von Varianten mit niedriger Expressionsrate oder toxischem Effekt auf den Wirtsorganismus (Holt *et al.*, 2000). Dadurch ist es möglich, dass hoch affine, aber ungefaltete AK-Fragmente bereits während des *Phage Display* verloren gehen. Um derartige Effekte auszuschließen, muss die Faltung und Assoziation der Polypeptidketten zum F_{ab}-Fragment bzw. zum Fusionsprotein, bestehend aus F_{ab}-Fragment und dem großen Hüllprotein (g3p), im Periplasma möglichst optimal ablaufen.

Rekombinante Kaninchen-AK wurden bereits des Öfteren in Form von scFv- und F_{ab}-Fragmenten mittels unterschiedlicher Expressionsvektoren und Phagemide über *Phage*

Display selektiert und in *E. coli* im Schüttelkolben produziert. Die Expression der AK und AK-Chimäre im Schüttelkolben wurde bisher meistens im *E. coli*-Stamm XL1-blue realisiert (Ridder *et al.*, 1995; Foti *et al.*, 1998; Rader *et al.*, 2000; Hofer *et al.*, 2007), die verwendeten Vektoren variierten. Ridder *et al.* (1995) setzten im Display von Kaninchen-scFv-Fragmenten das Phagemid pGEM-III basierend auf pet3A von Studier *et al.* (1990) mit einem T7-Promotor (Studier und Moffatt, 1986) und dem C-terminalen Teil des p3 (Barbas *et al.*, 1991) ein. Der T7-Promotor hat dabei den Nachteil, dass die T7-RNA-Polymerase durch ihre Grundaktivität eine kontinuierliche Expression bedingt und dadurch die Produktion toxisch wirkender Proteine erschwert (Studier, 1991). Foti *et al.* (1998) verwendeten zur Expression eines Kaninchen F_{ab}-Fragments den Vektor pMF3 basierend auf dem Vektor pJuFo von Cramer und Suter (1993), wobei die Expression der beiden Strukturgene durch jeweils einen *lac*-Promotor (Gronenborn, 1976; Polisky *et al.*, 1976) kontrolliert wird und die Sekretion durch zwei pelB-Signalsequenzen erfolgte. Die Verwendung zweier Promotoren kann zu Unterschieden in der Transkriptionsrate und in Folge dessen zu einem Ungleichgewicht der beiden Ketten im Periplasma führen. Außerdem kann es durch die Wiederholung der Signalsequenz zu Rekombination und dadurch bedingt Deletion der Strukturgene kommen (Barbas *et al.*, 2001). Der *lac*-Promotor ist Bestandteil vieler bisher für die Expression und das *Phage Display* von Kaninchen-AK-Fragmenten und -Chimären verwendeter Vektoren, die häufig auf dem pComb3-System von Barbas *et al.* basieren (1991; 2001). So stellten Lang *et al.* (1996) eine DNA-Bibliothek aus Blut und Knochenmark immunisierter Kaninchen in pComb3H her. Allerdings musste zur Expression des AK die dicistronische F_{ab}-Expressionskassette in den Vektor pAraHA transferiert werden. pAraHA ist mit dem Arabinose induzierbaren, dicht reprimierten *P_{BAD}*-Promotor ausgestattet (Guzman *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2000). Li *et al.* (1999) konstruierten das pComb3-ähnliche Phagemid pSD3 zur Herstellung von Kaninchen scFv-Fragmenten, während Rader *et al.* (2000) den um das p3 reduzierten Vektor pComb3H zur Produktion von Kaninchen-F_{ab}-Fragmenten (Rader und Barbas, 1997) verwendeten. Popkov *et al.* (2003; 2004) benutzten pComb3X zur Konstruktion einer Kaninchen/Mensch Chimären-Bibliotheken und entfernten zur Expression des F_{ab}-Fragments das p3. Hofer *et al.* (2007) optimierten den Vektor pComb3H zu pC3C für das *Phage Display*. Zur Expression eines chimären Kaninchen/Mensch F_{ab}-Fragments entfernten sie ebenfalls das p3.

Das pComb3-System hat neben seiner erwiesenermaßen vorhandenen Funktionalität in Verbindung mit Kaninchen-AK-Fragmenten den Vorteil, dass es sich besonders gut für die Produktion humanisierter Kaninchen-F_{ab}-Fragmente eignet (Popkov *et al.*, 2004). Die

Nachteile des Systems für die Expression rekombinanter F_{ab}-Fragmente in der Hochzelldichtefermentation sind jedoch nicht von der Hand zu weisen. Der *lac*-Promotor ist als undicht (*leaky*) bekannt (Krebber *et al.*, 1996), was eine permanente Expression des Fremdproteins zur Folge hat. Durch die Hintergrundexpression bedingte negative Effekte toxisch wirkender Fremdproteine, die im Falle der Expression eines Fusionsproteins mit dem als toxisch geltenden g3p noch verstärkt werden können (Krebber *et al.*, 1997), führen zu erheblichen Problemen. Sie können beispielsweise einen Selektionsdruck gegen die plasmidtragenden Zellen bedingen, eine frühzeitige Zelllyse zur Folge haben und zum Abbruch des Wachstums bereits bei niedriger Zelldichte führen (Zabriskie und Arcuri, 1986). Außerdem besteht keine Trennung von Expressions- und *Phage Display* Vektor, weshalb das p3 vor der Expression entfernt werden muss. Hinzu kommen die 20-fach höheren Kosten bedingt durch die Verwendung von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) zur Induktion der Proteinexpression an Stelle des billigen aTc (Kramer *et al.*, 2002), das der Induktion des *tet*-Promotors dient (Skerra, 1994a).

6.2.2 Konstruktion Kaninchen-spezifischer Expressionsvektoren und Phagemide

Um oben genannte Nachteile der bisher verwendeten Vektoren zu umgehen, wurden die in dieser Arbeit konstruierten Expressionsvektoren und Phagemide von den Plasmiden pASK85 mit *bla* als Resistenzgen (Skerra, 1994a) und pASK111 mit der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (*Cat*) als Resistenzgen (Vogt und Skerra, 2001) abgeleitet. Durch zwei Shine-Dalgarno-Sequenzen getrennt translatierte Polypeptidketten werden durch unterschiedliche Signalsequenzen in das Periplasma geschleust. Dabei steht die dicistronische Expressionskassette unter der Kontrolle des dicht reprimierten *tet*-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994a). Dadurch ist eine Unterteilung der Fermentation in eine Wachstumsphase, während welcher der Promotor reprimiert ist, und eine durch Induktion mit aTc ausgelöste Phase der Fremdproteinexpression möglich. Das Expressionssystem ist unabhängig vom Bakterienstamm, kann in Minimalmedium induziert werden (Skerra, 1994a) und wurde bereits erfolgreich zur Hochzelldichtefermentation von AK-Fragmenten verwendet (Schiweck und Skerra, 1995; Kramer *et al.*, 2002). Wie schon für die Produktion des murinen F_{ab}-Fragments wurde auch für die Herstellung der Kaninchen-AK der für seine guten Sekretionseigenschaften in Verbindung mit der effizienten Faltung rekombinanter Proteine bekannte Stamm *Escherichia coli* K-12 JM83 verwendet und das Fermentationsprotokoll erneut adaptiert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Trennung von Expressions- und *Phage Display*-System. Ziel der Trennung war es, die Expression mit Amp und *proBA* als Selektionsmarker

in *E. coli* JM83 im Minimalmedium im Fermenter durchzuführen. Die Expression und das Display des Fusionsproteins bestehend aus Kaninchen-F_{ab}-Fragment und g3p erfolgten wiederum ohne die zusätzliche Belastung durch die Expression des in *E. coli* TG1 nicht notwendigen Prolins. Um den Selektionsdruck gegen phagemidlose Zellen dennoch aufrecht zu erhalten, sollte statt Amp der stärkere Selektionsmarker Chloramphenicol (Cam) verwendet werden. Cam hemmt die Proteinbiosynthese nicht-resistenter Zellen nicht im Periplasma, sondern im Cytoplasma durch Bindung an die ribosomale 50 S-Untereinheit, wodurch die bakterielle Peptidyl-Transferase blockiert wird. *Cat*, welche die Resistenz vermittelt, inaktiviert Cam durch Acetylierung. Die Verwendung von Cam anstelle von Amp als Selektionsmarker kann den Plasmidverlust deutlich reduzieren (Fiedler und Skerra, 2001; Schlapschy, 2004).

Um den auf die Expression des murinen AK K411B zugeschnittenen Vektor pASK85-pro-K411B für die Expression des Kaninchen-AK verwenden zu können, mussten einige Modifikationen, bedingt durch die Besonderheiten der Kaninchen-DNA, erfolgen. Dabei spielt der Aufbau der dicistronischen Expressionskassette und der Kaninchen-spezifischen Klonierungsstelle (Rab) mit Ribosomen-Bindungsstelle (RBS), Transkriptionsterminator (Tlpp), den Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen und den Signalsequenzen eine wichtige Rolle.

Eine Datenbankrecherche (Schüller, Lehrstuhl für Zellbiologie Freising, unveröffentlicht) ergab, dass sich die DNA des Kaninchens in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen im Bereich der Ig-Strukturgene von Mensch und Maus unterscheidet. Vor der Insertion der Kaninchen-Ig-Ketten in den Expressionsvektor bzw. in das Phagemid mussten die verwendeten Vektoren daher zunächst mit einer Kaninchen-spezifischen Klonierungsstelle (Rab) versehen werden (Abb. 17). Diese besteht aus im Kaninchen besonders selten vorkommenden Restriktionsschnittstellen und dazu passenden Signalsequenzen (5.2.1, Abb. 18). Im Hinblick auf eine spätere Nutzung des Phagemids im Rahmen des *Phage Display* gewinnt das Vorhandensein seltener Restriktionsschnittstellen zusätzlich an Bedeutung, da auf diese Weise eine Dezimierung des AK-Repertoires durch Spaltung der DNA inmitten der Genfragmente, beispielsweise bei der Herstellung einer DNA-Bibliothek, vermieden werden kann.

Die Signalsequenzen OmpA (Movva *et al.*, 1980) und RBP (Willis und Furlong, 1974; Groarke *et al.*, 1983) wurden im Hinblick auf ihre Kompatibilität mit den benötigten Restriktionsschnittstellen gewählt. Damit wurde der Einbau einer Restriktionsschnittstelle in die c-Region durch eine stille Mutation (RBP) bzw. durch Austausch einer Aminosäure

(OmpA) ohne Destruktion der Erkennungssequenz der Signalpeptidase I (Ala-X-Ala, Tuteja, 2005) ermöglicht (Abb. 18). OmpA und RBP folgen dem klassischen 5' - 3' Aufbau aus positiver n- und hydrophober h- (core) Region, zuständig für die Translokation durch die Membran, gefolgt von der hydrophilen polaren c-Region mit der Schnittstelle für die Signalpeptidase I (Tuteja, 2005). In der Rab ersetzte RBP die Signalsequenz PhoA (Kikuchi *et al.*, 1981), die im Vektor pASK85-pro-K411B ein Fusionsprotein mit der LC bildet. Zur Insertion der benötigten Schnittstelle in die c-Region von RBP wurde, wie bei Pratap und Dikshit (1998), durch eine stille Mutation das für Alanin-kodierende Triplet von GCG zu GCC mutiert. OmpA blieb als Signalsequenz der HC erhalten, allerdings wurde Ala-Gln-Ala durch Austausch des Glutamins (Gln) gegen Isoleucin (Ile) zu Ala-Ile-Ala. Damit blieb der für das Schneiden der Signalpeptidase I notwendige -3, -1 - code (von Heijne, 1986) bestehen. Die Aminosäure an Position -2 kann bis auf wenige Ausnahmen frei gewählt werden (Paetzel *et al.*, 2002), so dass Isoleucin an dieser Position kein Problem verursachen sollte. Zwar tritt Isoleucin nach Berechnungen, die von Heijne (1986) durch Vergleich von 36 Signalsequenzen anstellte, an dieser Stelle natürlicherweise nicht auf. Untersuchungen von Pratap und Dikshit (1998) ergaben jedoch, dass Ala-Ile-Ala als alternative Schnittstelle sowohl in der c-Region von OmpA als auch in anderen Signalsequenzen ebenso funktionell ist wie Ala-Gln-Ala. Tritt in der c-Region von OmpA beispielsweise eine doppelte Schnittstelle (Ala-Gln-Ala-Ile-Ala) auf, schneidet die Signalpeptidase I zu 80 % Ala-Ile-Ala und nur zu 20 % Ala-Gln-Ala (Pratap und Dikshit, 1998). Außerdem ergaben Vergleiche der OmpA-Signalsequenzvarianten mit dem Programm SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004), das die wahrscheinliche Signalpeptidase I-Schnittstelle berechnet, keine durch die veränderte Aminosäure bedingten Unterschiede (Abb. 19).

OmpA wurde bereits für die Sekretion der LC des Kaninchens (Hofer *et al.*, 2007) und für die Sekretion verschiedener HC als Bestandteil heterologer AK-Proteine genutzt (Skerra, 1994b; Fiedler und Skerra, 1999). Diese Tatsache wurde als gute Voraussetzung für die Verwendung von OmpA gewertet. Collier *et al.* (1990) und Pradel *et al.* (2003) verwendeten RBP für die Sekretion von Proteinen in *E. coli*, allerdings nicht von AK-Polypeptidketten. Alternativ zu RBP wurde die Verwendung der gängigeren Signalsequenz *pectate lyase B* (pelB), die oftmals der Sekretion von AK in das Periplasma dient (beispielsweise im pComb3-System), in Erwägung gezogen. Allerdings haben Untersuchungen von Georgiou und Segatori (2005) ergeben, dass der Export rekombinanter AK-Fragmente besonders mit pelB als Signalsequenz zu unspezifischer Sekretion in das Medium führt. Dadurch bedingt kommt es häufig zu einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Bakterienmembran und

Sensitivität gegenüber Antibiotika und Detergenzien. Ob eine Signalsequenz aber letztlich zu einer hohen Sekretionsrate beiträgt, hängt vom Bakterienstamm, den Eigenschaften der Signalsequenz und ihrer Interaktion mit dem zu sekretierenden Protein ab und kann lediglich in einem „*trial-and error*“-Prozess überprüft werden (Choi und Lee, 2004).

Barbas *et al.* (2001) änderten bei den Folgevektoren des Vektors pComb3 (pComb3H und pComb3X) die Reihenfolge der Ig-Strukturgene in der Expressionskassette. Auch zur Konstruktion des Kaninchen-spezifischen Vektors erfolgte, verglichen mit pASK85-pro-K411B, eine Änderung im Aufbau der dicistronischen Expressionskassette. Die Reihenfolge $V_H-C_H-His_6\text{-tag}/V_L-C_L$ wurde zu $V_L-C_L/V_H-C_H-His_6\text{-tag}$. Grund hierfür waren Untersuchungen von Corisdeo und Wang (2004), die ergeben hatten, dass der Aufbau LC gefolgt von HC und ggf. anschließend daran p3, verglichen mit dem umgekehrten Aufbau zu einer 8 mal höheren Expressions- und Display Effizienz in *E. coli* führen kann.

Zur Amplifizierung der Kaninchen-DNA von LC und HC wurden mit Hilfe von Datenbanken entwickelte Primer verwendet (nähere Informationen zu den Primern finden sich in der bisher unveröffentlichten Dissertation von Schüller, Lehrstuhl für Zellbiologie, Freising). Die Primer erweiterten das auf den Primern von Ridder *et al.* (1995) basierende Primerrepertoire von Lang *et al.* (1996) und Rader *et al.* (2000) mit 2-3 V_{LK} - und 2 C_{LK} - sowie 3-4 V_H -Primern und einem C_H -IgG auf 5 V_{LK} -, 3 C_{LK} - und 14 V_H -Primer. Der zur Amplifizierung der konstanten Region der HC des IgG (C_H -IgG) verwendete Primer stimmte mit dem Primer von Lang *et al.* (1996) überein. Die Klonierung von Kaninchen-AK-DNA-Bibliotheken ist nach Li *et al.* (2000) aufgrund der stark konservierten Rahmenregion 1 (FR1) und dem Rekombinationssystem der Kaninchen-Gensegmente verglichen mit anderen Spezies stark vereinfacht. Laut Knight und Becker (1990) enthalten 90 % der HC das Gensegment V_H1 , und 95 % der LC gehört dem $\kappa 1$ -Allotyp an. Die an die Rekombination anschließenden Vorgänge der Genkonversion und Hypermutation zur Erweiterung des Repertoires betreffen nicht die gesamte variable Region, sondern im Wesentlichen bestimmte, hypervariable Bereiche (CDRs). Auf Grund dessen bleiben die Rahmenregionen im Großen und Ganzen unverändert. Verglichen mit anderen Spezies kann dadurch mit wenigen Primern ein repräsentatives AK-Repertoire des Kaninchens sichergestellt werden (Foti *et al.*, 1998). Die trotz dieser Tatsache realisierte Erweiterung des Primer-Repertoires trug zu einer kompletten Abdeckung des veröffentlichten, derzeit bekannten AK-DNA-Repertoires bei. Dadurch sollte besonders bei der Herstellung von AK-Bibliotheken aus der DNA zuvor immunisierter Kaninchen die Chance auf einen schnellen Erfolg bei der Selektion auf einen spezifischen Binder maximiert werden.

6.2.3 Funktionalität des Kaninchen-spezifischen Expressionsvektors pASK85Rab-pro-K411B

Vor der Insertion der Kaninchen-DNA in den Expressionsvektor wurde die Funktionalität der Signalsequenzen OmpA und RBP (Abb. 18) durch Expression des murinen AK K411B mittels des Expressionsvektors pASK85Rab-pro-K411B überprüft. Die Proteinausbeute der Produktion von K411B mittels der Vektoren pASK85Rab-pro-K411B und pASK85-pro-K411B wurde verglichen (5.1.3.2, 5.2.3.4). Damit sollte ein möglicher Einfluss der Signalsequenzen und des unterschiedlichen Aufbaus der Expressionskassette auf die Proteinausbeute analysiert werden. Die Expression des murinen AK K411B kodiert auf pASK85Rab-pro-K411B im Fermenter ergab eine maximale Ausbeute von $150 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$. Die Expression mit pASK85-pro-K411B hatte mit $240 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$ zu einer deutlich größeren Proteinmenge geführt.

Grund für die geringere Proteinausbeute könnte der umgekehrte Aufbau der Expressionskassette sein. In Anbetracht der Tatsache, dass Corisdeo und Wang (2004) für die Umkehr der Reihenfolge der Strukturgene in der Expressionskassette eine 8-fach höhere Proteinausbeute postulierten, scheint jedoch die Hypothese nahe liegender, dass die Ursache die Eigenschaften der Signalsequenzen und die daraus resultierenden Folgen für die Proteinexpression sind.

Wie bereits beschrieben (5.2.3.2), liegt im Expressionsvektor pASK85Rab-pro-K411B die LC fusioniert an RBP statt an PhoA vor. Signalsequenzen können die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins dahingehend beeinflussen, dass das Präprotein im Cytoplasma nicht von den Chaperonen erkannt wird, die es vor Faltung schützen und damit die Sekretion ermöglichen. Solche Chaperone sind beispielsweise SecB, GroEL-GroES und Dank-DnaJ (Baneyx, 1999). Die Signalsequenz RBP wird zwar über den Sec-Sekretionsweg sekretiert (Kumamoto, 1991; Pugsley, 1993), ist aber im Gegensatz zu OmpA unabhängig von der stabilisierenden Funktion des SecB-Chaperons (Collier *et al.*, 1990; Rosemond *et al.*, 1994) und den heat-shock-Proteinen GroEL-GroES und Dank-DnaJ (Kim *et al.*, 1992). RBP gelangt, genau wie PhoA, unabhängig von der stabilisierenden Wirkung der Chaperone zur Translokationspore SecYEG. Obwohl Watanabe und Blobel (1995) überzeugt sind, dass SecB lediglich an die Signalsequenz und nicht an das Präprotein bindet, womit die LC von SecB-bedingten Effekten nicht betroffen wäre, gibt es Untersuchungen, die auf einen Kontakt von SecB mit dem Präprotein hinweisen (Collier *et al.*, 1990; Randall *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2000). Andere Untersuchungen ergaben, dass sowohl das Präprotein als auch die Signalsequenz mit SecB in Kontakt treten (Altman *et al.*, 1990). Kim *et al.* (1992) und

Francetic und Kumamoto (1996) halten ein solches Zusammenwirken von SecB und RBP für durchaus möglich, wobei sie keine näheren Angaben zur Art des Zusammenwirkens machen. Der Einfluss einer solchen, wie auch immer gearteten Interaktion auf die Sekretion kann nicht ausgeschlossen werden.

Um OmpA für die Rab kompatibel zu machen, wurde die Aminosäure an Position -2 der Signalpeptidase I - Erkennungssequenz (c-Region) ausgetauscht (vgl. Abb 7, 18). Dies könnte zu Problemen bei der Abspaltung der Signalsequenz führen, die Polypeptidkette könnte beispielsweise in der Cytoplasmamembran verankert hängen bleiben (Schatz und Beckwith, 1990). Gegen derartige Probleme bei der Abspaltung sprechen zwar die erfolgreiche Verwendung dieser Erkennungssequenz (Pratap und Dikshit, 1998), die -3, -1-Regel (von Heijne, 1986; Tuteja, 2005) und schließlich die Analyse mit SignalP (Abb. 19); ausgeschlossen werden können sie jedoch nicht. Auch wenn die prokaryontischen Signalsequenzen generell relativ flexibel gewählt werden können und laut Skerra und Plückthun (1991) kaum entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung eines funktionellen Proteins haben, ist es möglich, dass Unterschiede in der Sekretionseffizienz der von verschiedenen Signalsequenzen sekretierten Polypeptidketten auftreten (Humphreys *et al.*, 2002). RBP kann neben der Translokation über die SecYEG-Pore auch über den TAT-Translokationsweg in das Periplasma gelangen (Pradel *et al.*, 2003). Im Falle eines Defekts, einer Verstopfung oder einer Überbelastung des Sec-Translokationswegs kann ein Teil der an RBP fusionierten LC, nicht jedoch der HC, in bereits gefaltetem Zustand über den alternativen TAT-Sekretionsweg in das Periplasma geschleust werden (Wu *et al.*, 2000; Berks *et al.*, 2000). Das ist möglich, obwohl RBP nicht die für den TAT-Sekretionsweg normalerweise notwendigen zwei Arginine in der Signalsequenz aufweist (Stanley *et al.*, 2000; Perez-Rodriguez *et al.*, 2007). Es könnte bedeuten, dass die Verwendung der an Position -2 mutierten Signalsequenz OmpA in Kombination mit RBP das Verhältnis von HC zu LC zugunsten der LC verändert, indem das Fusionsprotein aus RBP und der LC beide Sekretionswege nützt, während das Fusionsprotein aus OmpA und der HC teilweise an der Cytoplasmamembran hängen bleibt. Ein Teil der überschüssig sekretierten LC-Polypeptide könnten in Form von Homodimeren bzw. unlöslichen Aggregaten verloren gehen, was die geringere Ausbeute erklärt und Ergebnisse von Fiedler (2003) bestätigt, der ein Verhältnis von funktionellem zu aggregiertem Protein im Periplasma von 1 :1,5 feststellte.

Bei der Konstruktion der Rab wurde die natürliche Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) von RBP durch die RBS von OmpA und damit die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) AGGA gegen GAGG ausgewechselt. Die verwendete RBS GAGG wurde bereits mehrfach auf ihre

Funktionalität überprüft, so dass die Bildung von Sekundärstrukturen, die zur Hemmung des Translationsstarts führen könnten (Sletta *et al.*, 2007), ausgeschlossen werden kann. Da ein optimaler Translationsstart der mRNA mit der SD-Sequenz UAAGGAGG erreicht wird (Sorensen und Mortensen, 2005b), sollte der Austausch der RBS allerdings keine wesentliche Veränderung mit sich bringen.

Durch den Austausch von PhoA gegen RBP wurde eine Signalsequenz mit der Tendenz zur Ausbildung einer β -Faltblattstruktur im Bereich der hydrophoben h-Region und zufälligen coil-Strukturen in der c-Region durch eine Signalsequenzen mit der Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix Konformation in der h- und c-Region ersetzt (Collier, 1994) (Abb. 7, 18). Collier konnte nicht ausschließen, dass die schlechte Sekretionsleistung von PhoA in *Bacillus subtilis* durch die β -Faltblattstruktur der h-Region bedingt wird. Außerdem ist die Sekundärstruktur der c-Region wichtig für die korrekte Abspaltung der Signalsequenz und die Prozessierung des Proteins, wie Pratap und Dikshit (1998) postulierten. Auch wenn es sich in der hier vorliegenden Arbeit um *E. coli* handelt, wäre es dennoch möglich, dass die α -Helix von RBP zu einer besseren Sekretion und Abspaltung beiträgt als die β -Faltblattstruktur und die zufälligen coils von PhoA und dadurch die Sekretion der LC gefördert wird.

6.3 Rekombinante Kaninchen-Antikörper

6.3.1 Expression des Kaninchen-Antikörpers inseriert in pASK85Rab-pro-WR13

Trotz ihrer vielen Vorteile gegenüber murinen AK (vgl. 3.1.2) wurden rekombinante Kaninchen-AK zwar schon mehrfach über *Phage Display* selektiert und exprimiert, die Produktion im großen Maßstab in der Hochzelldichtefermentation in *E. coli* durch Sekretion in das Periplasma wird jedoch nicht in der Literatur beschrieben. Grund hierfür könnten Schwierigkeiten bei der bakteriellen Produktion von AK-Fragmenten sein. Diese führt immer wieder zu Problemen bei der korrekten Faltung der Proteine, der Ausbildung der Disulfidbrücken und der Zusammenlagerung der beiden sekretierten Ig-Ketten zu einem funktionellen AK-Fragment (Skerra und Plückthun, 1991). Im Periplasma entstehen über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Faltungsintermediaten aus nicht korrekt gefalteten rekombinanten Polypeptidketten Aggregate (Dill, 1990; Bowden *et al.*, 1991; Knappik und Plückthun, 1995; Baneyx und Mujacic, 2004). Diese periplasmatischen Einschlusskörper scheinen gerade im Fall von AK-Fragmenten einen toxischen Effekt auf die Bakterienzelle zu haben (Plückthun und Skerra, 1989). Es wird angenommen, dass das denaturierte Protein durch seine exponierten hydrophoben Peptidsequenzen eine permeabilisierende Wirkung auf die äußere Zellmembran hat und dadurch die Lyse der Zelle

begünstigt (Skerra, 1989). Eine ungünstige Wechselwirkung unverbrückter Cysteinreste des ungefalteten Fremdproteins mit bakterieneigenen periplasmatischen oder membranständigen Proteinen kann zudem nicht ausgeschlossen werden (Schmiedl *et al.*, 2000). Die zusätzliche intrachenare Disulfidbrücke der LC und die damit einhergehende große Cysteinzahl (beispielsweise 7 Cys in der LC, 8 Cys in der HC von IgG13) verstärken diese Effekte wahrscheinlich zusätzlich. Um jedoch die in der Umweltanalytik und Therapie notwendigen großen AK-Mengen generieren zu können, ist die Produktion mittels Hochzell-dichtefermentation unumgänglich.

Zur Entwicklung eines Vektors zur Expression und eines Phagemids zur Selektion von Kaninchen-AK wurde aus mRNA eines nicht immunisierten Kaninchens cDNA synthetisiert und nach Amplifizierung in den Vektor pASK85Rab-pro kloniert. Dazu wurde die mRNA aus peripheren B-Zellen des Bluts (PBL) isoliert und nicht, wie bei Ridder *et al.* (1995) aus der Milz oder bei Lang *et al.* (1996) aus dem Knochenmark, gewonnen (Foti *et al.*, 1998). Die meist CD5 positiven PBL sind rezirkulierende Zellen, die genau wie die B-Zellen der Milz das primäre und nach Immunisierung auch das sekundäre Repertoire erwachsener Kaninchen repräsentieren. Ihre mRNA ist für die Konstruktion einer AK-Bibliothek bestehend aus der DNA immunisierter Kaninchen genauso gut geeignet wie die mRNA der B-Zellen der Milz (Raman und Knight, 1992; Knight und Crane, 1994; Foti *et al.*, 1998). Die Isolierung aus dem Blut hat den Vorteil, dass durch die sofortige Stabilisierung in Stabilisation Reagent ein Verlust intakter mRNA, bedingt durch den Angriff von RNAsen, verhindert wird. Die Sequenzanalyse der Klone IgG2, IgG5 und IgG13 ergab eine identische LC (κ 1-Allotyp) für alle Klone, während sich die HC (Isotyp IgG, Allotyp V_H1a2) in ihrer DNA-Sequenz unterscheiden (5.2.4.1, DNA-Sequenzen im Anhang)

Das rekombinante Kaninchen-IgG13, inseriert in den Expressionsvektor pASK85Rab-pro-WR13, wurde mehrfach sowohl im 2 l-Maßstab im LB-Medium als auch im 2 l-Fermenter im *E. coli*-Stamm JM83 in Minimalmedium exprimiert. Um vorzeitige Expression ggf. toxischer Proteine ausschließen zu können - ausgelöst beispielsweise durch die Unterdrückung des Tetracyclin-Repressors, wie von Fiedler und Skerra (2001) beobachtet werden konnte - wurden die Cytoplasma- und Periplasmafraktion vor der Induktion analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass unter der Kontrolle des *tet*-Promotors ohne Induktion mittels aTc keine Expression stattfand. Die Reinigung der Periplasmafraktion mittels IMAC zeigte nicht das typische Elutionsprofil (Abb. 13), das auf ein spezifisch gebundenes Protein schließen lässt. Im Western-Blot (4.3.3.1) konnten in der Cytoplasmafraktion Polypeptide bei 24 kDa, 43 kDa und 60 kDa, in der ungereinigten Periplasmafraktion bei 24 kDa mit einem

Antikörper gegen die LC nachgewiesen werden. In der reduzierten Cytoplasmafraktion waren Proteine bei 24 kDa und 25 kDa und in der reduzierten Periplasmafraktion bei 25 kDa vorhanden (Abb. 51).

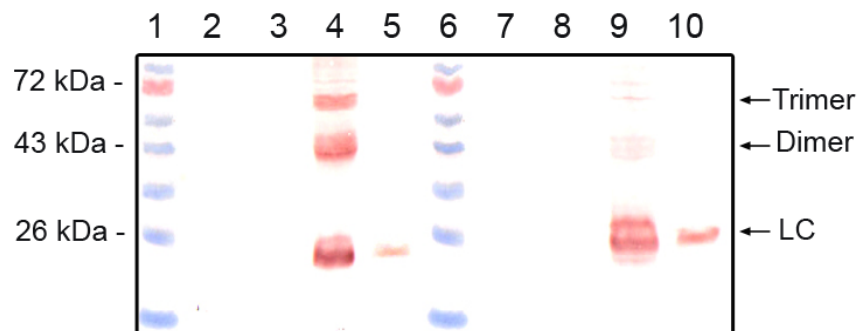


Abbildung 51: Nachweis der Kaninchen-Proteine kodiert auf pASK85Rab-pro-WR13 im Western-Blot.

Nicht reduzierte Cytoplasma- (Spur 2) und Periplasmafraktion (Spur 3) vor der Induktion, nicht reduzierte Cytoplasma- (Spur 4) und Periplasmafraktion nach 2,5 h (Spur 5), reduzierte Cytoplasma- (Spur 7) und Periplasmafraktion (Spur 8) vor der Induktion, reduzierte Cytoplasma- (Spur 9) und Periplasmafraktion (Spur 10) nach 2,5 h Induktion sowie ein Protein-Marker (Spur 1, 6), aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und im Western-Blot mit einem HRP-gekoppelten Maus-anti-Kaninchen-LC-AK nachgewiesen.

Im Periplasma haben sich möglicherweise durch Ausbildung falscher Disulfidbrücken Dimere und Trimere der $\kappa 1$ -b4 LC gebildet. Dies kann zum einen durch das Vorhandensein der vielen Cysteine und der zusätzlichen intrachenaren Disulfidbrücke der LC des Kaninchens begünstigt werden, und zum anderen durch die generelle Tendenz der LC, Homodimere, so genannte Bence-Jones-Dimere, zu bilden (Stevens *et al.*, 1991). Die wohl zunächst sekretierten Polypeptide (dafür könnte das Vorhandensein der einzelnen Kette im Periplasma sprechen) und danach möglicherweise aggregierten und aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit bei der Reinigung des Periplasmas durch Zentrifugation mit dem Cytoplasma sedimentierten LC konnten durch Reduktion mit β -Mercaptoethanol wieder getrennt werden. Für diese Hypothese sprechen Untersuchungen von Skerra und Plückthun (1991), die die ausgefallene HC in der cytoplasmatischen Fraktion nachweisen konnten. Dafür, dass es sich bei dem Protein bei 43 kDa nicht um ein F_{ab} -Fragment handelt, spricht die Tatsache, dass dieses Protein nur in der cytoplasmatischen Fraktion, nicht aber im Periplasma nachgewiesen werden konnten, wo sich F_{ab} -Fragmente aufgrund des oxidierenden Milieus normalerweise zusammenlagern. Korrekt gefaltete und zusammen gelagerte F_{ab} -Fragmente sind löslich und

würden aufgrund dessen nicht mit dem Sphäroplasten sedimentiert werden.

Die Ergebnisse könnten so gedeutet werden, dass zwar eine Sekretion in das Periplasma stattgefunden hat, die Signalsequenzen demnach funktionell sind – was die erfolgreiche Expression des murinen K411B AK mittels pASK85Rab-pro-K411B bestätigte. Die Produktion eines F_{ab}-Fragments scheint jedoch durch das Ungleichgewicht zwischen HC und LC, mangelhafte Disulfidbrückenbildung und Faltung, oder aber die Toxizität der hier exprimierten Kaninchen-Polypeptidketten unmöglich. Für diese Hypothese würden Untersuchungen von Skerra und Plückthun (1991) sprechen, die ergaben, dass das Hauptproblem für die geringe Ausbeute an gefaltetem F_{ab}-Fragment selten die Expression oder Sekretion, sondern meist die Faltung und Zusammenlagerung der Polypeptidketten im Periplasma ist.

6.3.2 Koexpression des Kaninchen-Antikörpers, inseriert in pASK85Rab-pro-WR13 mit Faltungshelferproteinen

Die Disulfidbrückenbildung im Periplasma von *E. coli* wird von verschiedenen Proteinen katalysiert (Bardwell *et al.*, 1991; Wulfing und Plückthun, 1994a; Bader und Bardwell, 2001). Dazu gehören die Proteindisulfidisomerasen (Dsb Proteine, Hiniker und Bardwell, 2003), die die Disulfidbrückenbildung katalysieren (Bardwell, 1994; Collet und Bardwell, 2002; Kadokura *et al.*, 2003), und die Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen), die für die cis/trans-Isomerisierung der Peptidbindungen zuständig sind (Fanghanel und Fischer, 2004) und Chaperon-Funktionen im Periplasma übernehmen (Duguay und Silhavy, 2004) (3.3.2). Untersuchungen haben ergeben, dass die Koexpression der Peptidylprolylisomerasen FkpA und Skp zu einer Verbesserung der Expression löslicher periplasmatischer Proteine beiträgt (Bothmann und Plückthun, 1998; Hayhurst und Harris, 1999; Bothmann und Plückthun, 2000). Ebenfalls eine bessere Ausbildung von Disulfidbrücken im Periplasma konnte durch Überexpression von Dsb-Proteinen festgestellt werden (Kurokawa *et al.*, 2000, 2001).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Koexpression des Kaninchen-AK, inseriert in den Expressionsvektor pASK85Rab-pro-WR13, mit vier Faltungshelferproteinen, kodiert auf dem Plasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006), als eine Möglichkeit gesehen, die Effizienz der Disulfidbrückenbildung bei der Produktion des Kaninchen-AK zu verbessern. Das Plasmid pTUM4 kodiert für die PPIasen SurA und FkpA und die Proteindisulfidisomerasen DsbA und DsbC (Abb. 36). Es ist aufgrund des Replikationsstarts ori p15A und des Cam-Resistenzgens *Cat* kompatibel mit Plasmiden, die mit einem β -Lactamasegen und einem aus der pUC-Plasmidfamilie stammenden ColE1 Replikationsstartpunkt (Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Plückthun und Skerra, 1989) ausgestattet sind (Mayer, 1995; Sorensen und Mortensen,

2005b). Das Faltungshelfer-Plasmid pTUM4 wurde bereits erfolgreich in der Fermentation von Lipocalinen (Breustedt *et al.*, 2006) und für die effizientere Faltung des periplasmatischen humanen Retinolbindeproteins und des humanen Rezeptors DC-SIGN im Schüttelkolben (Schlapschy *et al.*, 2006) eingesetzt. Schlapschy *et al.* (2006) konnten die Ausbeute an löslichem Protein auf diese Weise um das 10-fache steigern. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen durch weniger toxisch wirkende, falsch gefaltete und in Aggregaten zusammengelagerte Polypeptidketten gesteigert und die Produktion von korrekt gefaltetem, löslichem F_{ab}-Fragment im Periplasma durch Koexpression mit den Faltungshelferproteinen kodiert auf pTUM4 ermöglicht wird.

Durch Koexpression im Schüttelkolben mit den Faltungshelferproteinen konnte das Kaninchen-F_{ab}-Fragment exprimiert (4.3.1.1) und im Western-Blot (4.3.3.1) bei 40 kDa nachgewiesen werden. Das F_{ab}-Fragment zeigte damit eine etwas größere elektrophoretische Mobilität, als aufgrund der theoretisch berechneten Molmasse von 45 000 Da zu erwarten war. In der reduzierten Probe zeigten die einzelnen Ketten die aufgrund der Berechnung der Molmasse erwartete Mobilität und konnten bei 23 und 25 kDa nachgewiesen werden. Die größere Mobilität des F_{ab}-Fragments erklärt sich möglicherweise durch die zusätzliche intrachenare Disulfidbrücke, die variable und konstante Region der LC des Kaninchen-AK verbindet. Da sich jedoch die LC erwartungsgemäß verhält, kann keine definitive Aussage getroffen werden.

Auffällig bei der Schüttelkolbenexpression war die längere Dauer der Induktionsphase von 3,5 h, die bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 notwendig war, im Gegensatz zu den für das murine K411B F_{ab}-Fragment benötigten 2,5 h. Das langsamere Wachstum bei Koexpression mit pTUM4 wurde von Schlapschy *et al.* (2006) ebenfalls beobachtet und auf die höhere Belastung der Zelle zurückgeführt.

Erste Koexpressionsversuche des Kaninchen F_{ab}-Fragments im Fermenter (4.3.1.2) mit pASK85Rab-pro-WR13 und pTUM4 nach dem für den murinen AK K411B optimierten Protokoll führten bei einer OD₆₀₀ von 25-30 nach nur 2-stündiger Induktion zu einer Stagnation des Zellwachstum und zu einem Rückgang der optischen Dichte bedingt durch Zelllyse. Da der Sauerstoffgehalt während der *fed-batch*-Phase konstant bei > 30 % gehalten wurde, die Glukoseaufnahme demnach nicht durch reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit zurückgegangen war, wies dies auf eine zu hohe metabolische Belastung der Zellen hin (Bentley *et al.*, 1990). Außerdem konnte eine Acetatkonzentration von durchschnittlich 1,3 g l⁻¹ festgestellt werden, was auf zu hohe Glukoseaufnahme schließen ließ.

Der reduzierte Glukoseverbrauch der Zellen während der Koexpression kann

möglicherweise durch die höhere Belastung der Zellen und das dadurch reduzierte Wachstum erklärt werden. Durch die Expression zweier Resistenzgene (*bla*, *Cat*), die oft in hoher Konzentration produziert werden, die Überexpression der Faltungshelferproteine und die nach der Induktion einsetzende Fremdproteinsynthese wurden möglicherweise für die Expression zelleigener Proteine notwendiges ATP und Aminosäuren abgezogen. Der steigende Energiebedarf führte zu einer Steigerung der Atmungsaktivität, wodurch die Biomassezunahme während der Produktionsphase sank (Summers, 1991; Glick, 1995; Hoffmann und Rinas, 2001) und es zum Eintreten von Überproduktionssterblichkeit (Skare *et al.*, 1989), Hitzeschock-Antwort (Neidhardt *et al.*, 1984) und Acetatproduktion kam. Der Einfluss von Acetat auf die Gene und Proteine der *E. coli*-Stressantwort und -regulation (Blankenhorn *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001) steigerte diese Effekte möglicherweise zusätzlich.

Um die Produktion löslicher Protein sicherzustellen und eine Überproduktion an Fremdprotein und damit die Bildung von Acetat und Einschlusskörpern und schlimmstenfalls den frühen Zelltod zu verhindern, wurde ein langsames Wachstum durch reduzierte Glukosezufuhr getestet. Die während der Expression des murinen F_{ab}-Fragments der Kultur zugeführte Glukosemenge wurde reduziert und dadurch die Wachstumsrate während der Induktion von $\mu = 0,19$ auf $\mu = 0,17$ gesenkt (4.3.1.2, Tab. 9). Die Glukose- und Acetatkonzentration im Medium wurde verringert, und ein Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 40 bei einer Induktionsdauer von 3,5 h konnte realisiert werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen zwar noch keine Zeichen von Zellyse, befanden sich aber bereits im Übergang zur stationären Phase und mussten aufgrund dieses veränderten physiologischen Zustands, der die Gefahr der Bildung von Einschlusskörpern und damit den Verlust an löslichem periplasmatischen AK-Protein (Rinas *et al.*, 1993) birgt, schnellstens geerntet werden. Die längere Induktionsphase bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 40 entsprach den Ergebnissen der Expression im Schüttelkolben, während der die Zellen ebenfalls eine längere Induktionsphase benötigten. Auch hier wurde das langsamere Wachstum in Übereinstimmung mit Schlapschy *et al.* (2006) auf die höhere Belastung der Zellen zurückgeführt.

Die Ausbeute rekombinanter Kaninchen-Proteine in der Hochzelllichtfermentation konnte im Verlauf der Adaptierung des Glukosefütterungsprotokolls an die Bedingungen der Koexpression von $1,7 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$ auf $50 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$ gesteigert werden (5.2.5.3). Dadurch konnte die Vermutung, dass es sich bei dem Kaninchen-AK um ein an sich toxisches Protein handelt, widerlegt werden. Ergebnisse wie für das murine K411B F_{ab}-Fragment, kodiert auf pASK85-pro-K411B und pASK85Rab-pro-K411B, von $240 \mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$ bzw.

150 $\mu\text{g l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}$ (5.1.3.2, 5.2.3.4) wurden nicht erreicht. Grund dafür, dass trotz der Koexpression der Faltungshelferproteine nur eine deutlich niedrigere Proteinausbeute realisiert werden konnte, könnte teilweise die metabolische Belastung durch die zusätzliche Expression der oben beschriebenen Proteine sein. Wahrscheinlich kommen jedoch zu den bereits diskutierten Schwierigkeiten bei der Sekretion, der Faltung und der Ausbildung der Disulfidbrücken Probleme bedingt durch die Aminosäuresequenz des IgG13 hinzu. Diese Hypothesen werden von Untersuchungen von Berges *et al.* (1996) gestützt, die feststellten, dass bei humanen Cytokinen die Sekretionseffizienz nicht nur von der Signalsequenz, sondern auch von dem daran fusionierten Protein abhängt. Aufgrund dieser Ergebnisse und der besseren Proteinausbeute des AK K411B, ebenfalls exprimiert mit pASK85Rab-pro und sekretiert von OmpA und RBP, liegt die Vermutung nahe, dass die Produktion des hier exprimierten Kaninchenproteins durch die Aminosäuresequenz des reifen Proteins beeinflusst wird. Kajava *et al.* (2000) postulierten, dass die Ladung der ersten 20 Aminosäuren des reifen Proteins Einfluss auf die Translokation hat. Positiv geladene Aminosäuren innerhalb der ersten 5 Triplets nach der Signalpeptidase I-Schnittstelle können die Sekretion um das 50-fache senken (Schatz und Beckwith, 1990). Interessanterweise wies Klon 5, für den keinerlei Expression nachgewiesen werden konnte, ein Lysin an Position + 4 der HC auf. Auch das Vorkommen bestimmter Aminosäuren, wie beispielsweise der hohe Cysteingehalt des hier exprimierten Kaninchen IgG-Klon 13 mit 7 Cysteinen in der LC und 8 in der HC, im Gegensatz zu jeweils 5 Cysteinen in der LC und HC des murinen K411B, könnten sich auf die Proteinausbeute auswirken. Die Cysteine ungefalteter Polypeptidketten können zur Toxizität des Proteins beitragen, die Humphrey (1997) in Verbindung mit einem steigenden Cysteinanteil feststellen konnte. Außerdem kann freies Cystein in der LC zu Ausbildung von F_{ab}-Dimeren über kovalente interchenare Disulfidbrücken führen (Skerra und Plückthun, 1991), die Bildung von bivalente Homo- und Heterodimere herbeiführen (Carter *et al.*, 1992) und dazu beitragen, dass die Ausbeute löslicher Heterodimere deutlich sinkt (Dübel *et al.*, 1992).

Ebenfalls von Bedeutung für die erfolgreiche Produktion des Kaninchenproteins könnte die Verwendung von in *E. coli* selten (< 1 %) vorkommenden Kodons (*codon usage*) im Kaninchenpolypeptid sein. Dies kann zu Einschränkungen bei der Translation und Fehlern in der Aminosäuresequenz führen. Heterologe Proteine mit seltenen Kodons werden oft schlecht in *E. coli* exprimiert (Makrides, 1996), da sie starken physiologischen Stress bedingen und es zu Problemen bei der Translation kommt (Kane, 1995; Nakamura *et al.*, 1996). Die Anzahl solcher Kodons in IgG13 überschreitet zwar nicht die Zahl der im murinen AK K411B

vorkommenden seltenen Kodons (Tabelle 10), allerdings befinden sie sich an anderen Positionen im Polypeptid. Die vom Kaninchen verwendeten seltenen Triplets kodieren unter anderem für die Aminosäuren Prolin und Cystein, die eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung und der Disulfidbrückenbildung der Polypeptidketten spielen. Ihr Ersatz durch falsche Aminosäuren aufgrund von Mangel an passenden tRNAs führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu falsch gefalteten Proteinen bzw. zu Fehlern bei der Disulfidbrückenbildung.

Tabelle 10: Seltene Kodons (nach Makrides, 1996) und ihr Vorkommen in Maus und Kaninchen.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Uracil (U).

Aminosäure	Kodon	Klon13	Klon 13	K411B	K411B
		LC	HC	LC	HC
Arginin	AGG, AGA, CGA, CGG	3	4	5	5
Prolin	CCC,CCA,CCU	11	7	9	8
Cystein	UGU, UGC	7	7	5	5
Serin	UCA, AGU, UCG, UCC	8	9	12	7
Glycin	GGG, GGA	7	1	7	9
Leucin	CUC, CUA	4		7	1
Threonin	ACA	5	7	1	
insgesamt		45	35	46	35

Sorensen *et al.* (1989) stellten fest, dass die Verwendung seltener Kodons die Translationsdauer beeinflusst. Das könnte zu einer Reduzierung der Translation führen. Möglicherweise kommt es durch Mangel an bestimmten tRNAs zu Fehlern bei der Translation oder zur Leserahmenverschiebung, wie sie von Wu *et al.* (2004) postuliert wurden, und damit zur Expression nicht funktioneller Polypeptide. Die Verwendung seltener Kodons hat damit eine biologische Signifikanz für die Translation, die Protein-Faltung und die Degradierung (Griswold *et al.*, 2003). Es gibt aber Untersuchungen, die eine effiziente Expression trotz seltener Kodons nachweisen (Ernst und Kawashima, 1988). Daher kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur das alleinige Vorhandensein seltener Kodons ausschlaggebend ist, sondern dass ihre Position und eine Reihe anderer Faktoren ebenfalls Einfluss auf den Expressionserfolg nehmen können (Kane, 1995). Dafür spricht die Tatsache, dass die Translation in manchen Fällen durch gezielte Mutation, durch Koexpression der seltenen Kodons oder durch die Komplettierung des Mediums mit der entsprechenden

Aminosäure gesteigert werden kann, in anderen hingegen nicht (Kane, 1995; Griswold *et al.*, 2003; Sorensen und Mortensen, 2005b). Griswold *et al.* (2003) postulierten, dass die Mutation seltener Kodons weniger Effekt auf die Expression eines heterologen Proteins hat, als beispielsweise eine Veränderung der mRNA-Struktur. Beispielsweise stabilisieren sekundäre Strukturen wie Hairpins oder Stemloops im nicht translatierten 5'-Bereich (*untranslated region*, UTR) vor der Startsequenz die mRNA und kontrollieren (und hemmen) dadurch den Translationsstart. Das konnte durch das Einfügen von Hairpin-Strukturen in die UTR gezeigt werden (de Smit und van Duin, 1990; Carrier und Keasling, 1999).

Eine weitere Hypothese für die Ursache der geringen Proteinausbeute sind Unterschiede in der Effizienz, mit der die mit verschiedenen Signalsequenzen fusionierten Ig-Ketten in das Periplasma sekretiert werden und die damit verbundenen Folgen (Humphreys *et al.*, 2002). Die geringere Ausbeute muriner AK exprimiert mit pASK85Rab-pro-K411B verglichen mit pASK85-pro-K411B wird in der vorliegenden Arbeit (6.2.3) teilweise dadurch erklärt, dass die Verwendung der Signalsequenz RBP möglicherweise ein solches Ungleichgewicht der Ig-Ketten im Periplasma zur Folge hat. Gleiches könnte für die Produktion des im gleichen Vektor exprimierten Kaninchen-F_{ab}-Fragments gelten. Die Übersekretion des Fusionsproteins, bestehend aus LC und RBP, würde einen Überschuss an LC und die Bildung von kovalenten und nicht kovalenten LC-Dimeren im Periplasma bedingen (Humphreys *et al.*, 2002). Steht der HC im Periplasma keine LC zur Bildung eines F_{ab}-Fragments zur Verfügung, aggregieren die *in vitro* schlecht löslichen Polypeptide (Nisonoff *et al.*, 1975; zitiert nach Skerra und Plückthun, 1991). Ein solches Phänomen wurde bereits für HCs muriner F_{ab}-Fragmente beschrieben, die in Abwesenheit der LC ausgefallen und schließlich in der cytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen wurden (Skerra und Plückthun, 1991). Dieses Ungleichgewicht könnte durch die Signalsequenz OmpA verstärkt werden, wenn diese die Sekundär- und Tertiärstruktur des Kaninchen-Proteins dahingehend beeinflusst, dass es im Cytoplasma nicht mehr von SecB erkannt und vor vorzeitiger Faltung geschützt wird (Baneyx, 1999). Daraus würden Probleme für den Transport der aufgrund von OmpA vom Chaperon Sec-B abhängigen HC zur Sekretionspore SecYEG resultieren. Die bereits diskutierten möglichen Probleme bei der Abspaltung von OmpA durch die Signalpeptidase I würden das Ungleichgewicht weiter steigern.

Der umgekehrte Fall, ein Überschuss des Fusionsproteins bestehend aus OmpA und HC im Periplasma, ist eher unwahrscheinlich. Dem SecB-unabhängigen Fusionsprotein aus LC und RBP steht im Falle einer Überlastung des Sec-Sekretionswegs, wie er von Perez-Perez *et al.* (1994) beschrieben wird, der TAT-Sekretionsweg (3.2.2) zur Verfügung (Pradel *et al.*,

2003). Ein Mangel an LC aufgrund von Problemen bei der Sekretion ist daher eher unwahrscheinlich.

Probleme bedingt durch den Einfluss der Signalsequenz auf die Aminosäuresequenz des Kaninchen-Polypeptids könnten durch Austausch der Signalsequenzen untersucht werden. Dabei wäre der Austausch von RBP und ggf. auch OmpA gegen PelB, das bereits erfolgreich für die Sekretion von LC und HC des Kaninchens verwendet wurde (Foti *et al.*, 1998), eine Möglichkeit, um den Einfluss der Signalsequenzen auf den Produktionserfolg zu untersuchen. Ein Einfluss bedingt durch die Eigenheiten der Kaninchen-DNA könnte durch Austausch von IgG13 gegen ein Kaninchen-F_{ab}-Fragment mit erwiesenermaßen hoher Faltungseffizienz überprüft werden.

Das Auftreten missgefalteter Polypeptide, Dimere, F_{ab}-Dimere u.ä. könnte das Elutionsprofil der Koexpression erklären, das bei der Reinigung der periplasmatischen Fraktion direkt nach der unspezifisch gebundenen Fraktion reproduzierbar einen kleinen Peak aufweist (Abb. 38). In Abb. 52 ist das Elutionsprofil schematisch dargestellt (vgl. Abb. 13). Es könnte sich hierbei um falsch assemblierte Dimere oder Trimer, möglicherweise Homodimere der LC, so genannte Bence-Jones-Proteine (Stevens *et al.*, 1991), handeln. Das korrekt assemblierte Heterodimer aus HC und LC wurde erst bei einer höheren Konzentration in einem symmetrischen Peak eluiert. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits von Fiedler (2003) beobachtet.

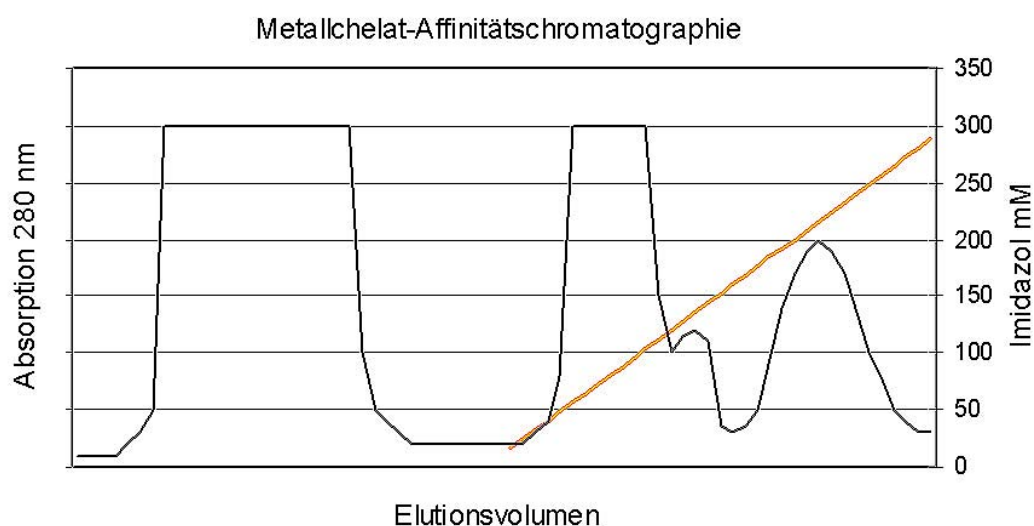


Abbildung 52: Schematische Darstellung des IMAC-Profiles bei der Reinigung koexprimierter Kaninchen Fab-Fragmente (vgl. Abb. 13, 38)

Fiedler (2003) hatte mit einer Verteilung des rekombinanten Proteins von etwa 90 % als cytoplasmatisches und 6,0 % als periplasmatisches Aggregat, davon nur 4,0 % in

funktioneller Form, Ergebnisse von Wall und Plückthun (1995) bestätigt, die postuliert hatten, dass in den meisten Fällen der größere Anteil des heterologen Proteins in aggregierter Form vorliegt. Damit konnte er den Einfluss von effizienter Sekretion und Faltung auf die funktionelle Proteinausbeute verdeutlichen. Basierend auf diesen Untersuchungen wäre eine Analyse des anteiligen Vorkommens des Kaninchen-F_{ab}-Fragments in Cytoplasma und Periplasma und die Anteile nicht aggregierter heterologer Proteine von großem Interesse.

6.4 Konstruktion von Phagemiden, Expression von Proteinen und Fusionsproteinen

6.4.1 Expression des murinen Antikörpers K411B inseriert in das Phagemid pASK111Rab-p3-K411B

Um aus dem AK-DNA-Repertoire eines immunisierten Kaninchens die DNA für einen hoch affinen AK selektieren zu können, wird die mRNA isoliert und daraus die cDNA synthetisiert. Diese wird in entsprechenden Mengen in einen Phage oder *Phage Display*-Vektor kloniert. Die Bibliothek, die eine Größe von $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$ haben sollte, wird exprimiert und schließlich im *Phage Display* auf affine Liganden untersucht. Das von Skerra und Plückthun (1988) entwickelte Sekretions- und Expressionssystem, die von Sastry *et al.* (1989) postulierte Klonierung von cDNA-Bibliotheken und das Display von AK auf Phagen zur Selektion spezifischer AK (McCafferty *et al.*, 1990) werden hierzu kombiniert.

Zu dem hier entwickelten und verwendeten Expressionssystem für rekombinante Kaninchen-AK sollte ein passendes *Phage Display*-System entwickelt werden. Bisher wurden für das *Phage Display* von Kaninchen fast ausschließlich auf pComb3-basierende Vektorsysteme verwendet (Barbas *et al.*, 1991). Die Strukturgene der Fremdproteine stehen wie bei pHEN1 (Hoogenboom *et al.*, 1991) unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (Gronenborn, 1976) und enthalten den C-terminalen Teil des p3. In den Phagemiden pGZ1 (Zahn *et al.*, 1999), das die Expression über das *tet*-Promotor/Operator-System steuert, und pHEN1 liegt das Fremdprotein dagegen fusioniert an den N-terminalen Teil des gesamten p3 vor. Das *tet*-Promotor/Operator-System hat sich, verglichen mit dem *lac*-Promotor, auch im *Phage Display* als deutliche vorteilhaft erwiesen. Dies zeigten Vergleich der Phagemide pHEN1 und pGZ1 durch Zahn *et al.* (1999), die außerdem die Funktionalität des *tet*-Promotors in Verbindung mit dem gesamten p3 im *Phage Display* nachweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für das hier konstruierte Phagemid ebenfalls das *tet*-Promotor/Operator-System in Kombination mit dem gesamten p3 verwendet. Da Krebber

et al. (1996) die Toxizität des Fusionsproteins in Zusammenhang mit der „Dichte“ des Promotors stellten, kann angenommen werden, dass unter der Kontrolle des *tet*-Promotors diese Toxizität keine entscheidende Rolle mehr spielt.

Die Signalsequenzen können die Expression beeinflussen (6.2.3). Um zu überprüfen, ob das Phagemid überhaupt zur erfolgreichen Expression eines F_{ab} -Fragments dienlich ist, wurde zunächst im Rahmen eines Praktikums das murine F_{ab} -Fragment K411B von A. Pegel in das Phagemid pASK111Rab-p3-K411B inseriert (5.2.3.1). Dieses enthält die Rab mit den Signalsequenzen RBP und OmpA und an Stelle von *bla* und *proBA* das einen stärkeren Selektionsdruck ausübende *Cat* als Resistenzgen. Der AK K411B wurde im Schüttelkolben im *E. coli*-Stamm JM83 mittels des Phagemids pASK111Rab-p3-K411B erfolgreich exprimiert, das F_{ab} -Fragment im Western-Blot nachgewiesen und seine Funktionalität im Atrazin-ELISA bestätigt. (Abb. 41, 42). Damit konnte gleichzeitig die Funktionalität von OmpA und RBP in Verbindung mit dem murinen AK K411B und mit *Cat* als Resistenzmarker im Phagemid bestätigt werden.

6.4.2 Expression des Kaninchen-Antikörpers inseriert in die Phagemide pASK111Rab-p3-WR13 und pASK85Rab-p3-WR13

Basierend auf den Ergebnissen der Expressionsversuche von K411B, kodiert auf dem Phagemid pASK111Rab-p3-K411B wurde die Expression der Kaninchen-AK IgG2, 5 und 13 im Phagemid parallel zueinander getestet. Dadurch sollte ein eventueller Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Expression nachgewiesen werden. Die Phagemide pASK111Rab-p3-WR2, 5 und 13 (Abb. 32), die sich von pASK111Rab-p3-K411B (Abb. 24) nur durch die Strukturgene der LC und HC unterscheiden, wurden unter Standardbedingungen wiederholt in Schüttelkultur in 2 l LB-Medium im *E. coli*-Stamm JM83 exprimiert. Die Expression sollte der Feststellung der Eignung der Phagemide zur Expression eines Kaninchen- F_{ab} -Fragments dienen. Das zwischen dem Strukturgen des Ig und dem p3 befindliche Amber-Stopp-Signal wird bei Expression in JM83 als solches erkannt und p3 nicht translatiert. Expression und Induktion im Schüttelkolben folgten dabei den bereits beschriebenen Vorgehensweisen. Zum Nachweis des F_{ab} -Fragments wurde die periplasmatische Fraktion über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot immunchemisch analysiert. Die Expression und Analyse der Klone IgG2 und IgG5 führte zu keinem reproduzierbaren Ergebnis, was möglicherweise auf die Aminosäuresequenz dieser Klone zurückgeführt werden kann. In der cytoplasmatischen Fraktion, nicht aber im Periplasma, konnten für den Klon IgG13 HC und LC nachgewiesen werden, nicht aber ein F_{ab} -Fragment (Abb. 53). Die Existenz der HC konnte mittels des His₆-tags und eines Maus-anti-His₆-AK eindeutig nachgewiesen werden, der Nachweis der LC

mittels eines polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen-AK ist etwas weniger eindeutig. Nach der Reinigung über IMAC, die keinen spezifischen Peak aufwies, konnten weder im Coomassiegefärbten Polyacrylamidgel noch im Western-Blot ein F_{ab}-Fragment nachgewiesen werden.

Als Grund für dieses Ergebnis konnte eine Hintergrundexpression ggf. toxischer Proteine ausgeschlossen werden, da sich der *tet*-Promotor als „dicht“ erwies, wie Analysen des Gesamtzellaufschlusses, entnommen vor der Induktion, im Western-Blot ergaben (Abb. 53). Der Verdacht der generellen Toxizität des korrekt gefalteten Kaninchen F_{ab}-Fragments IgG13 war in vorangegangenen Versuchen bereits entkräftet worden. Da die Expression zudem im Non-Suppressorstamm JM83 stattgefunden hatte, konnte die von Krebber *et al.* (1996) beschriebene Toxizität des Fusionsproteins nicht die Ursache der erfolglosen Expression sein. Die Funktionalität der Signalsequenzen und die Sekretionseffizienz konnten als alleinige Ursache zwar ebenfalls ausgeschlossen werden, da sie bereits in Verbindung mit der Koexpression des Vektors pASK85Rab-pro-WR13 zur Produktion eines Kaninchen-AK beigetragen hatten (5.2.5.2), nicht aber die bereits diskutierten Unterschiede der Sekretionseffizienz (6.2.3).

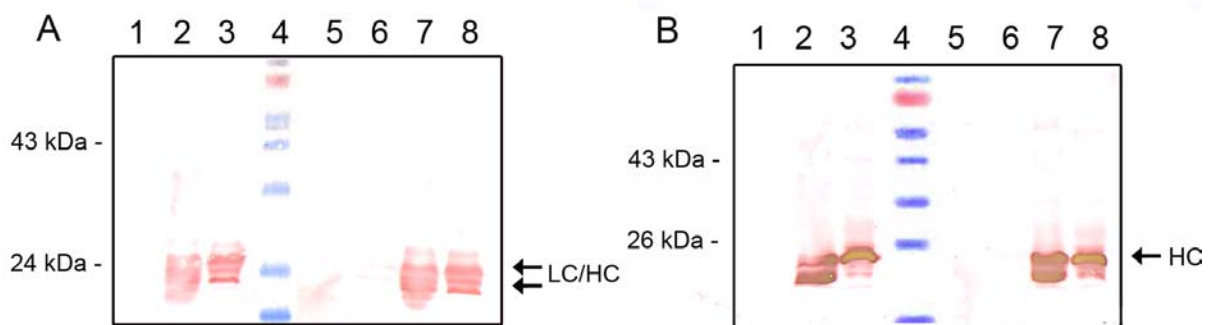


Abbildung 53: Nachweis des Kaninchen-AK kodiert auf pASK111Rab-p3-WR13 mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

(A) Reduzierter Gesamtzellaufschluss vor der Induktion (Spur 1), nicht reduzierter (Spur 2) und reduzierter Gesamtzellaufschluss nach 2,5-stündiger Induktion (Spur 3), Protein-Marker (Spur 4), nicht reduzierte (Spur 5) und reduzierte Periplasmafraktion nach 2,5-stündiger Induktion (Spur 6) und nicht reduzierte (Spur 7) und reduzierte (Spur 8) Cytoplasmafraktion nach 2,5-stündiger Induktion, aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Nach Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF Membran wurden HC (25 kDa) und LC (23 kDa) mittels eines polyklonalen Maus-anti-Kaninchen-AK nachgewiesen. (B) Gesamtzellaufschluss vor der Induktion (Spur 1), nicht reduzierte (Spur 2) und reduzierte Gesamtzellfraktion nach 3-stündiger Induktion (Spur 3), nicht reduzierte (Spur 5) und reduziert Periplasmafraktion (Spur 6) sowie nicht reduzierte (Spur 7) und reduziert (Spur 8) Cytoplasmafraktion, aufgetrennt über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden auf eine PVDF Membran elektrotransferiert und die HC (25 kDa) mittels des His₆-tag und eines Maus-anti-His₆-AK nachgewiesen.

Die wahrscheinlichsten Gründe für die nicht realisierbare Expression der Kaninchen-AK waren wahrscheinlich auch hier Probleme bei der korrekten Ausbildung der Disulfidbrücken und der Faltung und Zusammenlagerung der Einzelketten zum F_{ab}-Fragment - bedingt beispielsweise durch die Aminosäuresequenz des Kaninchen-IgG, die zusätzliche Disulfidbrücke in der LC und ein ungleiches Verhältnis der Einzelketten im Periplasma (6.2.3).

Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass sich die augenscheinlich in der cytoplasmatischen Fraktion vorliegende HC durch β -Mercaptoethanol reduzieren lässt, nicht aber im Periplasma nachgewiesen werden kann, dessen oxidierendes Milieu die Voraussetzung zur Ausbildung von Disulfidbrücken ist (Rietsch und Beckwith, 1998).

Möglicherweise hat eine Sekretion, gefolgt von der Ausbildung (falscher) Disulfidbrücken und anschließend daran Aggregation und Ausfällung der Polypeptidkettenaggregate mit den Sphäroplasten während des Periplasmaaufschlusses stattgefunden, wodurch sich die Polypeptidketten schließlich in der cytoplasmatischen Fraktion wieder fanden (6.3.2).

6.4.3 Koexpression des Kaninchen-Antikörpers inseriert in das Phagemid pASK85Rab-p3-WR13 mit Faltungshelfern

Um den Einfluss der Ausbildung der Disulfidbrücken auf die erfolgreiche Expression des F_{ab}-Fragments bzw. des Fusionsproteins aus F_{ab}-Fragment und g3p untersuchen zu können, sollte das Phagemid mit den Faltungshelferproteinen, kodiert auf pTUM4, koexprimiert werden. Um die Koexpression zu ermöglichen, wurde die Expressionskassette in das Phagemid pASK85Rab-p3 mit dem β -Lactamasegen *bla* als Resistenzmarker transferiert, wodurch pASK85Rab-p3-WR13 entstand (Abb. 43).

Zunächst wurde der Kaninchen-AK IgG13, kodiert auf pASK85Rab-p3-WKR13, im *E. coli*-Stamm JM83 in 2 l LB-Medium ohne Koexpression der Faltungshelferproteine exprimiert. Dadurch sollte ein, wenn auch unwahrscheinlicher, negativer Einfluss von Cam auf die Expression ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Western-Blots entsprachen denen der Expression des AK kodiert auf pASK111Rab-p3-WR13. Damit schied Cam als Grund für die Probleme bei der Expression des Kaninchen-F_{ab}-Fragments aus.

In der Literatur beschriebene Untersuchungen haben ergeben, dass die Koexpression von Faltungshelferproteinen und Chaperonen neben einer Verbesserung der Expression löslicher periplasmatischer Proteine auch bessere Ergebnisse im *Phage Display* zur Folge haben. Der auf Phagen exprimierte Anteil der Fusionsproteine konnte gesteigert und die periplasmatische Produktion durch Koexpression, beispielsweise von FkpA und Skp, deutlich verbessert

werden (Bothmann und Plückthun, 1998; Hayhurst und Harris, 1999; Bothmann und Plückthun, 2000). Grund für die besseren Ergebnisse des *Phage Displays* ist die Unterstützung der Bildung und der Faltung des Fusionsproteins. Dieses besteht aus einem Protein der Ig-Kette verbunden mit dem N-terminalen Ende des g3p. Seine Expression ist die Voraussetzung für das *Phage Display*. Fusionsproteine werden vor dem Einbau in die Phagenhülle im Periplasma gefaltet, wobei sie über den hydrophoben c-Terminus des g3p mit der inneren Membran verankert sind. Die Faltung des Fusionsproteins wird somit von denselben Faktoren beeinflusst wie die Faltung des löslichen periplasmatischen Proteins (Davis *et al.*, 1985).

Um den Einfluss der Faltungshelferproteine, kodiert auf pTUM4, auf die Expression eines Kaninchen-Fusionsproteins zu untersuchen, wurde die Koexpression parallel in den *E. coli*-Stämmen JM83 und TG1 durchgeführt und die Bildung des F_{ab}-Fragments und des Fusionsproteins in SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (5.3.2.2). Der Amber-Suppressorstamm TG1 überliert das Amber-Stopp-Signal in den meisten Fällen und exprimiert ein Fusionsprotein; In *E. coli* JM83 wird das Amber-Stopp-Signal erkannt und nur das F_{ab}-Fragment exprimiert. Die Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zur Expression ohne die Unterstützung der Faltungshelferproteine bei Koexpression sowohl ein F_{ab}-Fragment als auch ein Fusionsprotein gebildet werden (Abb. 45, 46). Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein bestehend aus F_{ab}-Fragment und g3p unter Kontrolle des *tet*-Promotors in der Expression im 2 l-Schüttelkolben keine derart toxische Wirkung ausübt, dass es bei einer Expression zu schädlichen Effekten auf die Zelle oder gar zur Zellyse kommt.

Zur Durchführung eines *Phage Display* zur Isolierung eines hoch affinen Kaninchen-AK könnten, basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen, im Rahmen dieser Arbeit klonierte Immunrepertoires für leporide LC und HC in dem Phagemid pASK85Rab-p3 zu einer Bibliothek von ca. 9×10^7 kombiniert und gescreent werden. In Anbetracht der Tatsache, dass die Gruppe von Dr. Pilar Marco (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona) nach Immunisierung mittels des gleichen Hapten-Konjugats, wie es in der vorliegenden Arbeit zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet wurde, hoch affine polyklonale AK gewinnen konnte, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass bereits erste Binder eine relativ hohe Affinität aufweisen. Durch Neukombination der einzelnen Ketten (*shuffling*) oder gezielte Mutationen der variablen Regionen könnten diese ersten Binder verbessert und AK-Varianten mit geringerer Immunogenität, höherer Affinität, veränderter Antigenspezifität oder gesteigerter Stabilität gewonnen werden (Krebber *et al.*, 1997).

7 Literatur

Akimenko, M. A., O. Heidmann and F. Rougeon (1984). "Complex allotypes of the rabbit immunoglobulin kappa light chains are encoded by structural alleles." *Nucleic Acids Res* 12: 4691-701.

Akimenko, M. A., B. Mariame and F. Rougeon (1986). "Evolution of the immunoglobulin kappa light chain locus in the rabbit: evidence for differential gene conversion events." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5180-3.

Alfthan, K., K. Takkinen, D. Sizmann, I. Seppala, T. Immonen, L. Vanne, S. Keranen, M. Kaartinen, J. K. Knowles and T. T. Teeri (1993). "Efficient secretion of murine Fab fragments by *Escherichia coli* is determined by the first constant domain of the heavy chain." *Gene* 128: 203-9.

Allegrucci, M., G. O. Young-Cooper, C. B. Alexander, B. A. Newman and R. G. Mage (1991). "Preferential rearrangement in normal rabbits of the 3' V_{HA} allotype gene that is deleted in Alicia mutants; somatic hypermutation/conversion may play a major role in generating the heterogeneity of rabbit heavy chain variable region sequences." *Eur J Immunol* 21: 411-7.

Altman, E., S. D. Emr and C. A. Kumamoto (1990). "The presence of both the signal sequence and a region of mature LamB protein is required for the interaction of LamB with the export factor SecB." *J Biol Chem* 265: 18154-60.

Andersson, L., S. Yang, P. Neubauer and S. O. Enfors (1996). "Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*." *J Biotechnol* 46: 255-63.

Arie, J. P., N. Sassoon and J. M. Betton (2001). "Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 39: 199-210.

Arnold, C. N., J. McElhanon, A. Lee, R. Leonhart and D. A. Siegele (2001). "Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response." *J Bacteriol* 183: 2178-86.

Bader, M. W. and J. C. Bardwell (2001). "Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in *Escherichia coli*." *Adv Protein Chem* 59: 283-301.

Baich, A. (1969). "Proline synthesis in *Escherichia coli*. A proline-inhibitable glutamic acid kinase." *Biochim Biophys Acta* 192: 462-7.

Baich, A. (1971). "The biosynthesis of proline in *Escherichia coli*: phosphate-dependent glutamate -semialdehyde dehydrogenase (NADP), the second enzyme in the pathway." *Biochim Biophys Acta* 244: 129-34.

Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotechnol* 10: 411-21.

Baneyx, F. and M. Mujacic (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." *Nat Biotechnol* 22: 1399-408.

- Barbas, C. F., 3rd, A. S. Kang, R. A. Lerner and S. J. Benkovic (1991).** "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7978-82.
- Barbas, C. F., 3rd, D. R. Burton, J. K. Scott and G. J. Silverman (2001).** *Phage Display A Laboratory Manual*. New York.
- Bardwell, J. C., K. McGovern and J. Beckwith (1991).** "Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*." *Cell* 67: 581-9.
- Bardwell, J. C. (1994).** "Building bridges: disulphide bond formation in the cell." *Mol Microbiol* 14: 199-205.
- Becker, R. S. and K. L. Knight (1990).** "Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits." *Cell* 63: 987-97.
- Behrens, S., R. Maier, H. de Cock, F. X. Schmid and C. A. Gross (2001).** "The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions *in vivo* and has chaperone activity." *Embo J* 20: 285-94.
- Benammar, A. and P. A. Cazenave (1982).** "A second rabbit kappa isotype." *J Exp Med* 156: 585-95.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak (2004).** "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J Mol Biol* 340: 783-95.
- Benedict, C. L., S. Gilfillan, T. H. Thai and J. F. Kearney (2000).** "Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development." *Immunol Rev* 175: 150-7.
- Bentley, W. E., N. Mirjalili, D. C. Andersen, D. R.H. and D. S. Kompala (1990).** "'Plasmid-encoded protein: the principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria.'" *Biotechnology and Bioengineering* 35: 668-681.
- Berges, H., E. Joseph-Liauzun and O. Fayet (1996).** "Combined effects of the signal sequence and the major chaperone proteins on the export of human cytokines in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 62: 55-60.
- Berks, B. C., F. Sargent and T. Palmer (2000).** "The Tat protein export pathway." *Mol Microbiol* 35: 260-74.
- Better, M., C. P. Chang, R. R. Robinson and A. H. Horwitz (1988).** "*Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment." *Science* 240: 1041-3.
- Bienz, M., E. Kublil, J. Kohli, S. deHenau, G. Huez, M. Marbaix and H. Grosjean (1981).** "Usage of the three termination codons in a dnagle eukaryotic cell, the *Xenopus laevis* oocyte." *Nucleic Acids Research* 9.
- Bird, R. E., K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S. M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan and M. Whitlow (1988).** "Single-chain antigen-binding proteins." *Science* 242: 423-6.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979).** "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.

- Blankenhorn, D., J. Phillips and J. L. Slonczewski (1999).** "Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis." J Bacteriol 181: 2209-16.
- Bothmann, H. and A. Plückthun (1998).** "Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression." Nat Biotechnol 16: 376-80.
- Bothmann, H. and A. Plückthun (2000).** "The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines." J Biol Chem 275: 17100-5.
- Bowden, G. A., A. M. Paredes and G. Georgiou (1991).** "Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*." Biotechnology (N Y) 9: 725-30.
- Brenner, S., A. O. Stretton and S. Kaplan (1965).** "Genetic code: the 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression." Nature 206: 994-998.
- Breustedt, D. A., D. L. Schonfeld and A. Skerra (2006).** "Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins." Biochim Biophys Acta 1764: 161-73.
- Brinkmann, U., Y. Reiter, S. H. Jung, B. Lee and I. Pastan (1993).** "A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment." Proc Natl Acad Sci U S A 90: 7538-42.
- Byrne, F. R., S. D. Grant, A. J. Porter and W. J. Harris (1996).** "Cloning, expression and characterization of a single-chain antibody specific for the herbicide atrazine." Food Agric. Immunol. 8: 19-29.
- Carlson, L. M., W. T. McCormack, C. E. Postema, E. H. Humphries and C. B. Thompson (1990).** "Templated insertions in the rearranged chicken IgL V gene segment arise by intrachromosomal gene conversion." Genes Dev 4: 536-47.
- Carrier, T. A. and J. D. Keasling (1999).** "Library of synthetic 5' secondary structures to manipulate mRNA stability in *Escherichia coli*." Biotechnol Prog 15: 58-64.
- Carter, P., R. F. Kelley, M. L. Rodrigues, B. Snedecor, M. Covarrubias, M. D. Velligan, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. E. Kotts, M. E. Carver and et al. (1992).** "High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment." Biotechnology (N Y) 10: 163-7.
- Cashel, M., D. M. Gentry, V. J. Hernandez and D. Vinella (1996).** The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Washington D.C., ASM Press, Washington D.C. .
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976).** "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." J Bacteriol 127: 1550-7.
- Choi, J. H. and S. Y. Lee (2004).** "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol 64: 625-35.
- Collet, J. F. and J. C. Bardwell (2002).** "Oxidative protein folding in bacteria." Mol Microbiol 44: 1-8.

- Collier, D. N., S. M. Strobel and P. J. Bassford, Jr. (1990).** "SecB-independent export of *Escherichia coli* ribose-binding protein (RBP): some comparisons with export of maltose-binding protein (MBP) and studies with RBP-MBP hybrid proteins." *J Bacteriol* 172: 6875-84.
- Collier, D. N. (1994).** "*Escherichia coli* signal peptides direct inefficient secretion of an outer membrane protein (OmpA) and periplasmic proteins (maltose-binding protein, ribose-binding protein, and alkaline phosphatase) in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 176: 3013-20.
- Collinson, I. (2005).** "The structure of the bacterial protein translocation complex SecYEG." *Biochem Soc Trans* 33: 1225-30.
- Cooper, M. D., D. Y. Perey, A. E. Gabrielsen, D. E. Sutherland, M. F. McKneally and R. A. Good (1968).** "Production of an antibody deficiency syndrome in rabbits by neonatal removal of organized intestinal lymphoid tissues." *Int Arch Allergy Appl Immunol* 33: 65-88.
- Corchero, J. L. and A. Villaverde (1998).** "Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins." *Biotechnol Bioeng* 58: 625-32.
- Corisdeo, S. and B. Wang (2004).** "Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions." *Protein Expr Purif* 34: 270-9.
- Crabtree, H. G. (1929).** "Observations on the carbohydrate metabolism of tumours." *Biochem J* 23: 536-45.
- Craig, N. J., L. J. Kennedy and J. D. Reynolds (2006).** "Antibody repertoire development in the sheep." *Developmental and Comparative Immunology* 30 165-174.
- Cramer, R. and M. Suter (1993).** "Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production." *Gene* 137: 69-75.
- Crane, M. A., M. Kingzette and K. L. Knight (1996).** "Evidence for limited B-lymphopoiesis in adult rabbits." *J Exp Med* 183: 2119-21.
- Cristobal, S., P. Scotti, J. Luirink, G. von Heijne and J. W. de Gier (1999a).** "The signal recognition particle-targeting pathway does not necessarily deliver proteins to the sec-translocase in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 274: 20068-70.
- Cristobal, S., J. W. de Gier, H. Nielsen and G. von Heijne (1999b).** "Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*." *Embo J* 18: 2982-90.
- Davis, N. G., J. D. Boeke and P. Model (1985).** "Fine structure of a membrane anchor domain." *J Mol Biol* 181: 111-21.
- De Genst, E., D. Saerens, S. Muyldermans and K. Conrath (2006).** "Antibody repertoire development in camelids." *Dev Comp Immunol* 30: 187-98.
- de Smit, M. H. and J. van Duin (1990).** "Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 38: 1-35.

- DeLisa, M. P., D. Tullman and G. Georgiou (2003).** "Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6115-20.
- Deutch, A. H., K. E. Rushlow and C. J. Smith (1984).** "Analysis of the *Escherichia coli* proBA locus by DNA and protein sequencing." *Nucleic Acids Res* 12: 6337-55.
- Dill, K. A. (1990).** "Dominant forces in protein folding." *Biochemistry* 29: 7133-55.
- DiPietro, L. A., J. A. Short, S. K. Zhai, A. S. Kelus, D. Meier and K. L. Knight (1990).** "Limited number of immunoglobulin V_H regions expressed in the mutant rabbit "Alicia"." *Eur J Immunol* 20: 1401-4.
- Dray, S., G. O. Young and A. Nisonoff (1963).** "Distribution of Allotypic Specificities among Rabbit Gamma-Globulin Molecules Genetically Defined at Two Loci." *Nature* 199: 52-5.
- Driessen, A. J., P. Fekkes and J. P. van der Wolk (1998).** "The Sec system." *Curr Opin Microbiol* 1: 216-22.
- Dübel, S., F. Breitling, I. Klewinghaus and M. Little (1992).** "Regulated secretion and purification of recombinant antibodies in *E. coli*." *Cell Biophys* 21: 69-79.
- Dübel, S. (2007).** "Recombinant therapeutic antibodies." *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 723-9.
- Dubiski, S. and P. J. Muller (1967).** "A "new" allotypic specificity (A9) of rabbit immunoglobulin." *Nature* 214: 696-7.
- Duguay, A. R. and T. J. Silhavy (2004).** "Quality control in the bacterial periplasm." *Biochim Biophys Acta* 1694: 121-34.
- Dunbar, B., B. Riggle and G. Niswender (1990).** "Development of Enzyme Immunoassay for the Detection of Triazine Herbicides." *J. Agric. Food Chem.* 38: 433-437.
- Eiteman, M. A. and E. Altman (2006).** "Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations." *Trends Biotechnol* 24: 530-6.
- Emorine, L., K. Dreher, T. J. Kindt and E. E. Max (1983).** "Rabbit immunoglobulin kappa genes: structure of a germline b4 allotype J-C locus and evidence for several b4-related sequences in the rabbit genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5709-13.
- Ernst, J. F. and E. Kawashima (1988).** "Variations in codon usage are not correlated with heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*." *J. Biotechnol.* 7.
- Faelber, K., D. Kirchhofer, L. Presta, R. F. Kelley and Y. A. Muller (2001).** "The 1.85 Å resolution crystal structures of tissue factor in complex with humanized Fab D3h44 and of free humanized Fab D3h44: revisiting the solvation of antigen combining sites." *J Mol Biol* 313: 83-97.
- Fanghanel, J. and G. Fischer (2004).** "Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases." *Front Biosci* 9: 3453-78.

- Feeney, A. J. (1990).** "Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences." *J Exp Med* 172: 1377-90.
- Fiedler, M. and A. Skerra (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: 421-7.
- Fiedler, M. and A. Skerra (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: 111-8.
- Fiedler, M. (2003).** "Neutralisierung eines Inhibitors der neuronalen Regeneration im ZNS: Optimierung des anti-Nogo-A Antikörpers IN-1 durch Protein Engineering. Dissertation." Dissertation. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, München, Technische Universität München.
- Fink, A. L. (1998).** "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid." *Fold Des* 3: R9-23.
- Foti, M., F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Spreafico, M. Ackermann and M. Suter (1998).** "Rabbit monoclonal Fab derived from a phage display library." *J Immunol Methods* 213: 201-12.
- Francetic, O. and C. A. Kumamoto (1996).** "*Escherichia coli* SecB stimulates export without maintaining export competence of ribose-binding protein signal sequence mutants." *J Bacteriol* 178: 5954-9.
- Friedman, M. L., C. Tunyaplin, S. K. Zhai and K. L. Knight (1994).** "Neonatal V_H, D, and J_H gene usage in rabbit B lineage cells." *J Immunol* 152: 632-41.
- Froderberg, L., E. Houben, J. C. Samuelson, M. Chen, S. K. Park, G. J. Phillips, R. Dalbey, J. Luirink and J. W. De Gier (2003).** "Versatility of inner membrane protein biogenesis in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 47: 1015-27.
- Fuschiotti, P., M. G. Fitts, R. Pospisil, P. D. Weinstein and R. G. Mage (1997).** "RAG1 and RAG2 in developing rabbit appendix subpopulations." *J Immunol* 158: 55-64.
- Gallati, H. and I. Pracht (1985).** "Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H₂O₂ and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine." *J Clin Chem Clin Biochem* 23: 453-60.
- Gay, D., T. Saunders, S. Camper and M. Weigert (1993).** "Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance." *J Exp Med* 177: 999-1008.
- Georgiou, G., J. N. Telford, M. L. Shuler and D. B. Wilson (1986).** "Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase." *Appl Environ Microbiol* 52: 1157-61.
- Georgiou, G., M. L. Shuler and D. B. Wilson (1988).** "Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of β -lactamase overproduction in *Escherichia coli* " *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 32, Issue 6 (p 741-748) 32: 741-748.

- Georgiou, G. and L. Segatori (2005).** "Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects." *Curr Opin Biotechnol* 16: 538-45.
- Giersch, T. (1993).** "A new monoclonal antibody for the sensitive detection of atrazine with Immunoassay in microtiter plate and dipstick format." *J. Agric. FoodChem.* 41 1006-1011.
- Gill, D. S. and N. K. Damle (2006).** "Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds." *Curr Opin Biotechnol* 17: 653-8.
- Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989).** "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Anal Biochem* 182: 319-26.
- Glick, B. R. (1995).** "Metabolic load and heterologous gene expression." *Biotechnol Adv* 13: 247-61.
- Glockshuber, R., T. Schmidt and A. Plückthun (1992).** "The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding *in vitro*, and functional expression in *Escherichia coli*." *Biochemistry* 31: 1270-9.
- Grabherr, R., E. Nilsson, G. Striedner and K. Bayer (2002).** "Stabilizing plasmid copy number to improve recombinant protein production." *Biotechnol Bioeng* 77: 142-7.
- Graur, D., L. Duret and M. Gouy (1996).** "Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies)." *Nature* 379: 333-5.
- Gresch, O. (1997).** "Gentechnische Herstellung eines bispezifischen (Fab)₂-Fragments für die Zelloberflächenantigene CD16 und CD30. Diplomarbeit." Dissertation., Darmstadt, Technische Universität Darmstadt.
- Griswold, K. E., N. A. Mahmood, B. L. Iverson and G. Georgiou (2003).** "Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm." *Protein Expr Purif* 27: 134-42.
- Groarke, J. M., W. C. Mahoney, J. N. Hope, C. E. Furlong, F. T. Robb, H. Zalkin and M. A. Hermodson (1983).** "The amino acid sequence of D-ribose-binding protein from *Escherichia coli* K12." *J Biol Chem* 258: 12952-6.
- Gronenborn, B. (1976).** "Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*." *Mol Gen Genet* 148: 243-50.
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson and J. Beckwith (1995).** "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." *J Bacteriol* 177: 4121-30.
- Guzzella, L., F. Pozzoni and G. Giuliano (2006).** "Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy." *Environ Pollut* 142: 344-53.
- Haas, G. J. and E. J. Guardia (1968).** "Production of antibodies against insecticide-protein conjugates." *Proc Soc Exp Biol Med* 129: 546-51.
- Han, K., H. Lim and J. Hong (1991).** "Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation." *Biotechnology and Bioengineering* 39: 663-671.

- Hanes, J. and A. Plückthun (1997).** "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display." Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4937-42.
- Hayden, M. S., L. K. Gilliland and J. A. Ledbetter (1997).** "Antibody engineering." Curr Opin Immunol 9: 201-12.
- Hayhurst, A. and W. J. Harris (1999).** "*Escherichia coli* skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments." Protein Expr Purif 15: 336-43.
- He, M. and M. J. Taussig (1997).** "Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites." Nucleic Acids Res 25: 5132-4.
- Heidmann, O., C. Auffray, P. A. Cazenave and F. Rougeon (1981).** "Nucleotide sequence of constant and 3' untranslated regions of a K immunoglobulin light chain mRNA of a homozygous b4 rabbit." Proc. Natl Acad. Sci. USA 78: 5802-5806.
- Heidmann, O. and F. Rougeon (1983).** "Diversity in the rabbit immunoglobulin kappa chain variable regions is amplified by nucleotide deletions and insertions at the V-J junction." Cell 34: 767-77.
- Helali, S., C. Martelet, A. Abdelghani, M. A. Maaref and N. Jaffrezic-Renault (2006).** "A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads on gold surface for the detection of atrazine " Electrochimica Acta 51: 5182-5186.
- Hellmuth, K., D. J. Korz, E. A. Sanders and W. D. Deckwer (1994).** "Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1." J Biotechnol 32: 289-98.
- Hertz, M. and D. Nemazee (1998).** "Receptor editing and commitment in B lymphocytes." Curr Opin Immunol 10: 208-13.
- Hikida, M., M. Mori, T. Takai, K. Tomochika, K. Hamatani and H. Ohmori (1996).** "Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells." Science 274: 2092-4.
- Hiniker, A. and J. C. Bardwell (2003).** "Disulfide bond isomerization in prokaryotes." Biochemistry 42: 1179-85.
- Hochuli, E., H. Dobeli and A. Schacher (1987).** "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues." J Chromatogr 411: 177-84.
- Hochuli, E. (1988).** "Large-scale chromatography of recombinant proteins." J Chromatogr 444: 293-302.
- Hock, B., M. Seifert and K. Kramer (2002).** "Engineering receptors and antibodies for biosensors." Biosens Bioelectron 17: 239-49.
- Hofer, T., W. Tangkeangsirisin, M. G. Kennedy, R. G. Mage, S. J. Raiker, K. Venkatesh, H. Lee, R. J. Giger and C. Rader (2007).** "Chimeric rabbit/human Fab and IgG specific for members of the Nogo-66 receptor family selected for species cross-reactivity with an improved phage display vector." J Immunol Methods 318: 75-87.

- Hoffmann, F. (1999).** "Pysiologischer Zustand von rekombinanten *Escherichia coli* in Hochzelldichtekultivierungen bei der Produktion eines humanen Proteins." Dissertation. Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät, Braunschweig, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Hoffmann, F. and U. Rinas (2001).** "On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation." *Biotechnol Bioeng* 76: 333-40.
- Hole, N. J., N. Harindranath, G. O. Young-Cooper, R. Garcia and R. G. Mage (1991a).** "Identification of enhancer sequences 3' of the rabbit Ig kappa L chain loci." *J Immunol* 146: 4377-84.
- Hole, N. J., G. O. Young-Cooper and R. G. Mage (1991b).** "Mapping of the duplicated rabbit immunoglobulin kappa light chain locus." *Eur J Immunol* 21: 403-9.
- Holt, L. J., K. Bussow, G. Walter and I. M. Tomlinson (2000).** "By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays." *Nucleic Acids Res* 28: E72.
- Hoogenboom, H. R., A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson and G. Winter (1991).** "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains." *Nucleic Acids Res* 19: 4133-7.
- Hoogenboom, H. R., A. P. de Bruine, S. E. Hufton, R. M. Hoet, J. W. Arends and R. C. Roovers (1998).** "Antibody phage display technology and its applications." *Immunotechnology* 4: 1-20.
- Huang, W., M. McKevitt and T. Palzkill (2000).** "Use of the arabinose p(bad) promoter for tightly regulated display of proteins on bacteriophage." *Gene* 251: 187-97.
- Humphreys, D. P., A. P. Chapman, D. G. Reeks, V. Lang and P. E. Stephens (1997).** "Formation of dimeric Fabs in *Escherichia coli*: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions." *J Immunol Methods* 209: 193-202.
- Humphreys, D. P., B. Carrington, L. C. Bowering, R. Ganesh, M. Sehdev, B. J. Smith, L. M. King, D. G. Reeks, A. Lawson and A. G. Popplewell (2002).** "A plasmid system for optimization of Fab' production in *Escherichia coli*: importance of balance of heavy chain and light chain synthesis." *Protein Expr Purif* 26: 309-20.
- Jackson, T., B. A. Morris, A. C. Martin, D. F. Lewis and P. G. Sanders (1992).** "Molecular modelling and site-directed mutagenesis on a bovine anti-testosterone monoclonal antibody." *Protein Eng* 5: 343-50.
- Janeway, C. A. and P. Travers (1997).** *Immunologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Jasper, P. J., S. K. Zhai, S. L. Kalis, M. Kingzette and K. L. Knight (2003).** "B lymphocyte development in rabbit: progenitor B cells and waning of B lymphopoiesis." *J Immunol* 171: 6372-80.

- Justice, S. S., D. A. Hunstad, J. R. Harper, A. R. Duguay, J. S. Pinkner, J. Bann, C. Frieden, T. J. Silhavy and S. J. Hultgren (2005).** "Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 187: 7680-6.
- Kadokura, H., F. Katzen and J. Beckwith (2003).** "Protein disulfide bond formation in prokaryotes." *Annu Rev Biochem* 72: 111-35.
- Kajava, A. V., S. N. Zolov, A. E. Kalinin and M. A. Nesmeyanova (2000).** "The net charge of the first 18 residues of the mature sequence affects protein translocation across the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria." *J Bacteriol* 182: 2163-9.
- 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.
- Kelus, A. S. and S. Weiss (1977).** "Variant strain of rabbits lacking immunoglobulin kappa polypeptide chain." *Nature* 265: 156-8.
- Kelus, A. S. and S. Weiss (1986).** "Mutation affecting the expression of immunoglobulin variable regions in the rabbit." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4883-6.
- Kiefhaber, T., R. Rudolph, H. H. Kohler and J. Buchner (1991).** "Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation." *Biotechnology (N Y)* 9: 825-9.
- Kikuchi, Y., K. Yoda, M. Yamasaki and G. Tamura (1981).** "The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of alkaline phosphatase structural gene (*phoA*) of *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* 9: 5671-8.
- Kim, B. S. and S. Dray (1972).** "Identification and genetic control of allotypic specificities on two variable region subgroups of rabbit immunoglobulin heavy chains." *Eur J Immunol* 2: 509-14.
- Kim, B. S. and S. Dray (1973).** "Expression of the a, x, and y variable region genes of heavy chains among IgG, IgM, and IgA molecules of normal and a locus allotype-suppressed rabbits." *J Immunol* 111: 750-60.
- Kim, J., Y. Lee, C. Kim and C. Park (1992).** "Involvement of SecB, a chaperone, in the export of ribose-binding protein." *J Bacteriol* 174: 5219-27.
- Kim, J., J. Luirink and D. A. Kendall (2000).** "SecB dependence of an exported protein is a continuum influenced by the characteristics of the signal peptide or early mature region." *J Bacteriol* 182: 4108-12.
- Knappik, A. and A. Plückthun (1995).** "Engineered turns of a recombinant antibody improve its *in vivo* folding." *Protein Eng* 8: 81-9.
- Knappik, A., L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellnhofer, A. Hoess, J. Wolle, A. Plückthun and B. Virnekas (2000).** "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides." *J Mol Biol* 296: 57-86.

- Knight, K. L., R. C. Burnett and J. M. McNicholas (1985).** "Organization and polymorphism of rabbit immunoglobulin heavy chain genes." *J Immunol* 134: 1245-50.
- Knight, K. L. and R. S. Becker (1990).** "Molecular basis of the allelic inheritance of rabbit immunoglobulin V_H allotypes: implications for the generation of antibody diversity." *Cell* 60: 963-70.
- Knight, K. L. (1992).** "Restricted V_H gene usage and generation of antibody diversity in rabbit." *Annu Rev Immunol* 10: 593-616.
- Knight, K. L. and M. A. Crane (1994).** "Generating the antibody repertoire in rabbit." *Adv Immunol* 56: 179-218.
- Köhler, G. and C. Milstein (1975).** "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256: 495-7.
- Kontermann, R. and S. Dübel (2001).** *Antibody Engineering*. Berlin.
- Koonin, E. V. (1997).** "Genome sequences: genome sequence of a model prokaryote." *Curr Biol* 7: R656-9.
- Korndörfer, I. P., M. K. Dommel and A. Skerra (2004).** "Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture." *Nat Struct Mol Biol* 11: 1015-20.
- Korz, D. J., U. Rinas, K. Hellmuth, E. A. Sanders and W. D. Deckwer (1995).** "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*" *J Biotechnol* 39: 59-65.
- Kramer, K. and B. Hock (1996).** "Recombinant single-chain antibodies against s-triazines." *Food Agric. Immunol.* 8: 97-109.
- Kramer, K. (1998).** "Synthesis of pesticide-specific single-chain Fv utilizing the Recombinant Phage Antibody System (RPAS, Pharmacia). A detailed protocol. ." *Anal. Lett* 31: 67-92.
- Kramer, K., J. Lepschy and B. Hock (2001).** "Long-term monitoring of atrazine contamination in soil by ELISA." *J AOAC Int* 84: 150-5.
- Kramer, K. (2002).** "Synthesis of a group-selective antibody library against haptens." *J Immunol Methods* 266: 209-20.
- Kramer, K., M. Fiedler, A. Skerra and B. Hock (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: 305-13.
- Kramer, K. and B. Hock (2003).** "Recombinant antibodies for environmental analysis." *Anal Bioanal Chem* 377: 417-26.
- Krebber, A., J. Burmester and A. Pluckthun (1996).** "Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p." *Gene* 178: 71-4.

- Krebber, A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H. R. Bosshard and A. Pluckthun (1997).** "Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system." *J Immunol Methods* 201: 35-55.
- Kues, U. and U. Stahl (1989).** "Replication of plasmids in gram-negative bacteria." *Microbiol Rev* 53: 491-516.
- Kumamoto, C. A. (1991).** "Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane." *Mol Microbiol* 5: 19-22.
- Kurokawa, Y., H. Yanagi and T. Yura (2000).** "Overexpression of protein disulfide isomerase DsbC stabilizes multiple-disulfide-bonded recombinant protein produced and transported to the periplasm in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 66: 3960-5.
- Kurokawa, Y., H. Yanagi and T. Yura (2001).** "Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 276: 14393-9.
- Kusharyoto, W. (2001).** "Strukturelle Untersuchungen an Atrazin- und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-spezifischen Antikörperfragmenten mittels molecular modelling und ortsspezifischer Mutagenese." Dissertation. Fakultät Chemie, Institut für Technische Biochemie Stuttgart, Universität Stuttgart.
- Kusharyoto, W., J. Pleiss, T. T. Bachmann and R. D. Schmid (2002).** "Mapping of a hapten-binding site: molecular modeling and site-directed mutagenesis study of an anti-atrazine antibody." *Protein Eng* 15: 233-41.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-5.
- Lai, E., R. K. Wilson and L. E. Hood (1989).** "Physical maps of the mouse and human immunoglobulin-like loci." *Adv Immunol* 46: 1-59.
- Lang, I. M., C. F. Barbas, 3rd and R. R. Schleef (1996).** "Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules." *Gene* 172: 295-8.
- Lange, S., J. Schmitt and R. D. Schmid (2001).** "High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *J Immunol Methods* 255: 103-14.
- Lanning, D., P. Sethupathi, K. J. Rhee, S. K. Zhai and K. L. Knight (2000a).** "Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire." *J Immunol* 165: 2012-9.
- Lanning, D., X. Zhu, S. K. Zhai and K. L. Knight (2000b).** "Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection." *Immunol Rev* 175: 214-28.
- Lanning, D. K. and K. L. Knight (1997).** "Somatic hypermutation: mutations 3' of rabbit VDJ H-chain genes." *J Immunol* 159: 4403-7.

- Lanning, D. K., S. K. Zhai and K. L. Knight (2003).** "Analysis of the 3' Cmu region of the rabbit Ig heavy chain locus." *Gene* 309: 135-44.
- Lee, J., S. Y. Lee, S. Park and A. P. Middelberg (1999).** "Control of fed-batch fermentations." *Biotechnol Adv* 17: 29-48.
- Lee, S. Y. (1996).** "High cell-density culture of *Escherichia coli*." *Trends Biotechnol* 14: 98-105.
- Li, Y., W. Cockburn, J. B. Kilpatrick and G. C. Whitelam (1999).** "Selection of rabbit single-chain Fv fragments against the herbicide atrazine using a new phage display system." *Food and Agricultural Immunology* 11: 5-17.
- Li, Y., W. Cockburn, J. B. Kilpatrick and G. C. Whitelam (2000).** "High affinity ScFvs from a single rabbit immunized with multiple haptens." *Biochem Biophys Res Commun* 268: 398-404.
- Luli, G. W. and W. R. Strohl (1990).** "Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations." *Appl Environ Microbiol* 56: 1004-11.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge and E. J. Mathur (1991).** "High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*." *Gene* 108: 1-6.
- Mage, R. (1998a).** *Immunology of Lagomorphs, Handbook of Vertebrate Immunology*, Academic Press Limited.
- Mage, R. G., G. O. Young-Cooper and M. R. Harrison (1974).** "Rabbit allotypes--tools for the examination of gene expression in lymphoid differentiation." *Soc Gen Physiol Ser* 29: 71-82.
- Mage, R. G., G. O. Young-Cooper, C. B. Alexander and A. S. Kelus (1984).** "Genetics and expression of kappa-type light chains in Basilea rabbits." *Immunogenetics* 19: 425-34.
- Mage, R. G. (1998b).** "Diversification of rabbit V_H genes by gene-conversion-like and hypermutation mechanisms." *Immunol Rev* 162: 49-54.
- Mage, R. G., D. Sehgal, E. Schiaffella and A. O. Anderson (1999).** "Gene-conversion in rabbit B-cell ontogeny and during immune responses in splenic germinal centers." *Vet Immunol Immunopathol* 72: 7-15.
- Mage, R. G., D. Lanning and K. L. Knight (2006).** "B cell and antibody repertoire development in rabbits: The requirement of gut-associated lymphoid tissues." *Dev Comp Immunol* 30: 137-53.
- Mahan, M. J. and L. N. Csonka (1983).** "Genetic analysis of the proBA genes of *Salmonella typhimurium*: physical and genetic analyses of the cloned proB⁺ A⁺ genes of *Escherichia coli* and of a mutant allele that confers proline overproduction and enhanced osmotolerance." *J Bacteriol* 156: 1249-62.
- Makrides, S. C. (1996).** "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*." *Microbiol Rev* 60: 512-38.

- Malone, J. (1994).** "pCANTAB 5 E: a vector designed for the expression of antibody variable regions as phage-displayed or soluble single-chain proteins (scFv)." Direct Submission, Pharmacia, Biotech Inc.
- Martineau, P., P. Jones and G. Winter (1998).** "Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm." *J Mol Biol* 280: 117-27.
- Mayer, M. P. (1995).** "A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript." *Gene* 163: 41-6.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter and D. J. Chiswell (1990).** "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature* 348: 552-4.
- McCartney-Francis, N., R. M. Skurla, Jr., R. G. Mage and K. E. Bernstein (1984).** "Kappa-chain allotypes and isotypes in the rabbit: cDNA sequences of clones encoding b9 suggest an evolutionary pathway and possible role of the interdomain disulfide bond in quantitative allotype expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1794-8.
- McElroy, P. J., N. Willcox and D. Catty (1981).** "Early precursors of B lymphocytes. I. Rabbit/mouse species differences in the physical properties and surface phenotype of pre-B cells, and in the maturation sequence of early B cells." *Eur J Immunol* 11: 76-85.
- Meisner, L. F., B. D. Roloff and D. A. Belluck (1993).** "In vitro effects of N-nitrosoatrazine on chromosome breakage." *Arch Environ Contam Toxicol* 24: 108-12.
- Mergulhao, F. J., M. A. Taipa, J. M. Cabral and G. A. Monteiro (2004).** "Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*." *J Biotechnol* 109: 31-43.
- Mergulhao, F. J., D. K. Summers and G. A. Monteiro (2005).** "Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*." *Biotechnol Adv* 23: 177-202.
- Miot, M. and J. M. Betton (2004).** "Protein quality control in the bacterial periplasm." *Microb Cell Fact* 3: 4.
- Missiakas, D. and S. Raina (1997).** "Protein folding in the bacterial periplasm." *J Bacteriol* 179: 2465-71.
- Movva, N. R., K. Nakamura and M. Inouye (1980).** "Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 255: 27-29.
- Nakamura, Y., K. Wada, Y. Wada, H. Doi, S. Kanaya, T. Gojobori and T. Ikemura (1996).** "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases." *Nucleic Acids Res* 24: 214-5.
- Nakano, K., M. Rischke, S. Sato and H. Markl (1997).** "Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor." *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 597-601.
- Neidhardt, F. C., R. A. VanBogelen and V. Vaughn (1984).** "The genetics and regulation of heat-shock proteins." *Annu Rev Genet* 18: 295-329.

- Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter (1990).** Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach. Sunderland, MA.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne (1997).** "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." *Protein Eng* 10: 1-6.
- Nisonoff, A., J. E. Hopper and S. B. Spring (1975).** The Antibody Molecule. New York, Academic Press, New York.
- Novacek, M. J. (1996).** "Taxonomy. Where do rabbits and kin fit in?" *Nature* 379: 299-300.
- Nygren, P. A. and A. Skerra (2004).** "Binding proteins from alternative scaffolds." *J Immunol Methods* 290: 3-28.
- Oudin, J. (1956).** "Specific precipitation reaction between blood of animals of the same species." *C R Hebd Seances Acad Sci* 242: 2489-90.
- Paetzel, M., A. Karla, N. C. J. Strynadka and R. E. Dalbey (2002).** "Signal Peptidases." *Chem. Rev.* 102: 4549-4579.
- Papavasiliou, F., R. Casellas, H. Suh, X. F. Qin, E. Besmer, R. Pelanda, D. Nemazee, K. Rajewsky and M. C. Nussenzweig (1997).** "V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses." *Science* 278: 298-301.
- Pascual, V., L. Verkruyse, M. L. Casey and J. D. Capra (1993).** "Analysis of Ig H chain gene segment utilization in human fetal liver. Revisiting the "proximal utilization hypothesis"." *J Immunol* 151: 4164-72.
- Perey, D. Y., M. D. Cooper and R. A. Good (1968).** "The mammalian homologue of the avian bursa of Fabricius. I. Neonatal extirpation of Peyer's patch-type lymphoepithelial tissues in rabbits: methods and inhibition of development of humoral immunity." *Surgery* 64: 614-21.
- Perez-Perez, J., G. Marquez, J. L. Barbero and J. Gutierrez (1994).** "Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*." *Biotechnology (N Y)* 12: 178-80.
- Perez-Rodriguez, R., A. C. Fisher, J. D. Perlmutter, M. G. Hicks, A. Chanal, C. L. Santini, L. F. Wu, T. Palmer and M. P. DeLisa (2007).** "An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway." *J Mol Biol* 367: 715-30.
- Plückthun, A. and A. Skerra (1989).** "Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*." *Methods Enzymol* 178: 497-515.
- Plückthun, A. (1992).** "Mono- and bivalent antibody fragments produced in *Escherichia coli*: engineering, folding and antigen binding." *Immunol Rev* 130: 151-88.
- Polisky, B., R. J. Bishop and D. H. Gelfand (1976).** "A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 3900-4.

- Popkov, M., R. G. Mage, C. B. Alexander, S. Thundivalappil, C. F. Barbas, 3rd and C. Rader (2003).** "Rabbit immune repertoires as sources for therapeutic monoclonal antibodies: the impact of kappa allotype-correlated variation in cysteine content on antibody libraries selected by phage display." *J Mol Biol* 325: 325-35.
- Popkov, M., N. Jendreyko, G. Gonzalez-Sapienza, R. G. Mage, C. Rader and C. F. Barbas, 3rd (2004).** "Human/mouse cross-reactive anti-VEGF receptor 2 recombinant antibodies selected from an immune b9 allotype rabbit antibody library." *J Immunol Methods* 288: 149-64.
- Pradel, N., C. L. Santini, C. Y. Ye, L. Fevat, F. Gerard, M. Alami and L. F. Wu (2003).** "Influence of tat mutations on the ribose-binding protein translocation in *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* 306: 786-91.
- Pratap, J. and K. L. Dikshit (1998).** "Effect of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase from *Escherichia coli*: requirement for secondary structure at the cleavage junction." *Mol Gen Genet* 258: 326-333.
- Pugsley, A. P. (1993).** "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria." *Microbiol Rev* 57: 50-108.
- Rader, C. and C. F. Barbas, 3rd (1997).** "Phage display of combinatorial antibody libraries." *Curr Opin Biotechnol* 8: 503-8.
- Rader, C., G. Ritter, S. Nathan, M. Elia, I. Gout, A. A. Jungbluth, L. S. Cohen, S. Welt, L. J. Old and C. F. Barbas, 3rd (2000).** "The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies." *J Biol Chem* 275: 13668-76.
- Rader, C. (2001).** "Antibody libraries in drug and target discovery." *Drug Discov Today* 6: 36-43.
- Raman, C. and K. L. Knight (1992).** "CD5+ B cells predominate in peripheral tissues of rabbit." *J Immunol* 149: 3858-64.
- Randall, L. L., T. B. Topping and S. J. Hardy (1990).** "No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export." *Science* 248: 860-3.
- Ratcliffe, M. J. H. (2006).** "Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development." *Developmental and Comparative Immunology* 30: 101-118.
- Rau, D. (2002).** "Konstruktion von scFv-, Fab- und enzymkonjugierten Antikörperfragmenten für die Umweltanalytik." Dissertation. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, München, Freising, Technische Universität München.
- Rejnek, J., E. Appella, R. G. Mage and R. A. Reisfeld (1969).** "Subtypes of rabbit kappa light polypeptide chains associated with the beta locus." *Biochemistry* 8: 2712-8.
- Ridder, R., R. Schmitz, F. Legay and H. Gram (1995).** "Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*." *Biotechnology (N Y)* 13: 255-60.

- Riesenberg, D. and R. Guthke (1999).** "High-cell-density cultivation of microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 422-30.
- Rietsch, A. and J. Beckwith (1998).** "The genetics of disulfide bond metabolism." *Annu Rev Genet* 32: 163-84.
- Rinas, U., T. C. Boone and J. E. Bailey (1993).** "Characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* producing high levels of porcine somatotropin." *J Biotechnol* 28: 313-20.
- Roe, A. J., C. O'Byrne, D. McLaggan and I. R. Booth (2002).** "Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity." *Microbiology* 148: 2215-22.
- Rosemond, M. J., S. M. Strobel, P. H. Ray and P. J. Bassford, Jr. (1994).** "Ability of MBP or RBP signal peptides to influence folding and *in vitro* translocation of wild-type and hybrid precursors." *FEBS Lett* 349: 281-5.
- Rouviere, P. E. and C. A. Gross (1996).** "SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins." *Genes Dev* 10: 3170-82.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988).** "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239: 487-91.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989).** *Molecular cloning*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Santini, C. L., B. Ize, A. Chanal, M. Muller, G. Giordano and L. F. Wu (1998).** "A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*." *Embo J* 17: 101-12.
- Sargent, F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks and T. Palmer (1998).** "Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway." *Embo J* 17: 3640-50.
- Sastry, L., M. Alting-Mees, W. D. Huse, J. M. Short, J. A. Sorge, B. N. Hay, K. D. Janda, S. J. Benkovic and R. A. Lerner (1989).** "Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5728-32.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger and M. S. Schlissel (1992).** "V(D)J recombination: molecular biology and regulation." *Annu Rev Immunol* 10: 359-83.
- Schatz, P. J. and J. Beckwith (1990).** "Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*" *Annu. Rev. Genet.* 24: 215-48.
- Schiaffella, E., D. Sehgal, A. O. Anderson and R. G. Mage (1999).** "Gene conversion and hypermutation during diversification of V_H sequences in developing splenic germinal centers of immunized rabbits." *J Immunol* 162: 3984-95.

Schiweck, W. and A. Skerra (1995). "Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling." *Proteins* 23: 561-5.

Schlapschy, M. (2004). "Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments zur Immuntherapie des Hodkin-Lymphoms." Dissertation. Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Lehrstuhl für Biologische Chemie, München, Technische Universität München.

Schlapschy, M., S. Grimm and A. Skerra (2006). "A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*." *Protein Eng Des Sel* 19: 385-90.

Schlehuber, S. and A. Skerra (2005a). "*Anticalins* as an alternative to antibody technology." *Expert Opin Biol Ther* 5: 1453-62.

Schlehuber, S. and A. Skerra (2005b). "Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "*anticalins*"." *Drug Discov Today* 10: 23-33.

Schmiedl, A., F. Breitling, C. H. Winter, I. Queitsch and S. Dubel (2000). "Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*." *J Immunol Methods* 242: 101-14.

Sehgal, D., E. Schiaffella, A. O. Anderson and R. G. Mage (1998). "Analyses of single B cells by polymerase chain reaction reveal rearranged V_H with germline sequences in spleens of immunized adult rabbits: implications for B cell repertoire maintenance and renewal." *J Immunol* 161: 5347-56.

Sehgal, D., G. Johnson, T. T. Wu and R. G. Mage (1999). "Generation of the primary antibody repertoire in rabbits: expression of a diverse set of Igk-V genes may compensate for limited combinatorial diversity at the heavy chain locus." *Immunogenetics* 50: 31-42.

Sehgal, D., E. Schiaffella, A. O. Anderson and R. G. Mage (2000). "Generation of heterogeneous rabbit anti-DNP antibodies by gene conversion and hypermutation of rearranged V_L and V_H genes during clonal expansion of B cells in splenic germinal centers." *Eur J Immunol* 30: 3634-44.

Sehgal, D., H. Obiakor and R. G. Mage (2002). "Distinct clonal Ig diversification patterns in young appendix compared to antigen-specific splenic clones." *J Immunol* 168: 5424-33.

Shokri, A., A. M. Sanden and G. Larsson (2003). "Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 654-64.

Short, J. A., P. Sethupathi, S. K. Zhai and K. L. Knight (1991). "VDJ genes in V_Hα2 allotype-suppressed rabbits. Limited germline V_H gene usage and accumulation of somatic mutations in D regions." *J Immunol* 147: 4014-8.

Simic, B., Z. Kniewald, J. E. Davies and J. Kniewald (1991). "Reversibility of the inhibitory effect of atrazine and lindane on cytosol 5 alpha-dihydrotestosterone receptor complex formation in rat prostate." *Bull Environ Contam Toxicol* 46: 92-9.

- Skare, J. T., S. K. Roof and K. Postle (1989).** "A mutation in the amino terminus of a hybrid TrpC-TonB protein relieves overproduction lethality and results in cytoplasmic accumulation." *J Bacteriol* 171: 4442-7.
- Skerra, A. and A. Plückthun (1988).** "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*." *Science* 240: 1038-41.
- Skerra, A. (1989).** "Funktionlle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*." Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilian-Universität München, Ludwig-Maximilian-Universität
- Skerra, A. and A. Plückthun (1991).** "Secretion and *in vivo* folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines." *Protein Eng* 4: 971-9.
- Skerra, A. (1994a).** "Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*." *Gene* 151: 131-5.
- Skerra, A. (1994b).** "A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments." *Gene* 141: 79-84.
- Skerra, A. (2001).** "'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties." *J. Biotechnol.* 74: 257-275.
- Skerra, A. (2007a).** "Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition." *Curr Opin Biotechnol* 18: 295-304.
- Skerra, A. (2007b).** "*Anticalins* as alternative binding proteins for therapeutic use." *Curr Opin Mol Ther* 9: 336-44.
- Sletta, H., A. Tondervik, S. Hakvag, T. E. Aune, A. Nedal, R. Aune, G. Evensen, S. Valla, T. E. Ellingsen and T. Brautaset (2007).** "The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 73: 906-12.
- Smithies, O. (1967).** "Antibody variability. Somatic recombination between the elements of "antibody gene pairs" may explain antibody variability." *Science* 157: 267-73.
- Sorensen, H. P. and K. K. Mortensen (2005a).** "Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*." *Microb Cell Fact* 4: 1.
- Sorensen, H. P. and K. K. Mortensen (2005b).** "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *J Biotechnol* 115: 113-28.
- Sorensen, M. A., C. G. Kurland and S. Pedersen (1989).** "Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 207: 365-77.
- Spieler-Polet, H., P. Sethupathi, P. C. Yam and K. L. Knight (1995).** "Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9348-52.

- Stanley, N. R., T. Palmer and B. C. Berks (2000).** "The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 275: 11591-6.
- Steinberger, P., J. K. Sutton, C. Rader, M. Elia and C. F. Barbas, 3rd (2000).** "Generation and characterization of a recombinant human CCR5-specific antibody. A phage display approach for rabbit antibody humanization." *J Biol Chem* 275: 36073-8.
- Stemke, G. W. and R. J. Fischer (1965).** "Rabbit 19S antibodies with allotypic specificities of the a-locus group." *Science* 150: 1298-303.
- Stenstrom, C. M., E. Holmgren and L. A. Isaksson (2001).** "Cooperative effects by the initiation codon and its flanking regions on translation initiation." *Gene* 273: 259-65.
- Stepankova, R., F. Kovaru and J. Kruml (1980).** "Lymphatic tissue of the intestinal tract of germfree and conventional rabbits." *Folia Microbiol (Praha)* 25: 491-5.
- Stevens, F. J., A. Solomon and M. Schiffer (1991).** "Bence Jones proteins: a powerful tool for the fundamental study of protein chemistry and pathophysiology." *Biochemistry* 30: 6803-5.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986).** "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* 189: 113-30.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff (1990).** "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185: 60-89.
- Studier, F. W. (1991).** "Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system." *J Mol Biol* 219: 37-44.
- Summers, D. K. (1991).** "The kinetics of plasmid loss." *Trends Biotechnol* 9: 273-8.
- Surek, B., M. Wilhelm and W. Hillen (1991).** "Optimizing the promoter and ribosome binding sequence for expression of human single chain urokinase-like plasminogen activator in *Escherichia coli* and stabilization of the product by avoiding heat shock response." *Appl Microbiol Biotechnol* 34: 488-94.
- Svitol, A. L., M. Cashel and J. W. Zyskind (1993).** "Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis *in vivo*. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 268: 2307-11.
- Swartz, J. R. (2001).** "Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins." *Curr Opin Biotechnol* 12: 195-201.
- Talmadge, K., J. Kaufman and W. Gilbert (1980).** "Bacteria mature preproinsulin to proinsulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3988-92.
- Tunyaplin, C. and K. L. Knight (1995).** "Fetal VDJ gene repertoire in rabbit: evidence for preferential rearrangement of V_{H1}." *Eur J Immunol* 25: 2583-7.
- Tuteja, R. (2005).** "Type I signal peptidase: an overview." *Arch Biochem Biophys* 441: 107-11.

- Vajdy, M., P. Sethupathi and K. L. Knight (1998).** "Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits." *J Immunol* 160: 2725-9.
- Valent, Q. A., P. A. Scotti, S. High, J. W. de Gier, G. von Heijne, G. Lentzen, W. Wintermeyer, B. Oudega and J. Luirink (1998).** "The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon." *Embo J* 17: 2504-12.
- Vemuri, G. N., M. A. Eiteman, J. E. McEwen, L. Olsson and J. Nielsen (2007).** "Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2402-7.
- Ventura, S. and A. Villaverde (2006).** "Protein quality in bacterial inclusion bodies." *Trends Biotechnol* 24: 179-85.
- Villaverde, A. and M. M. Carrio (2003).** "Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies." *Biotechnol Lett* 25: 1385-95.
- Vogt, M. and A. Skerra (2001).** "Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H." *J Mol Recognit* 14: 79-86.
- Von Heijne, G. (1984).** "How signal sequences maintain cleavage specificity." *J Mol Biol* 173: 243-251.
- von Heijne, G. (1986).** "A new method for predetektung signal sequence cleavage sites." *Nucleic Acids Research* 14.
- Wall, J. G. and A. Plückthun (1995).** "Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotechnol* 6: 507-16.
- Walton, T. A. and M. C. Sousa (2004).** "Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation." *Mol Cell* 15: 367-74.
- Wang, L., A. Miller and D. A. Kendall (2000).** "Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity." *J Biol Chem* 275: 10154-9.
- Ward, V. K., P. G. Schneider, S. B. Kreissig, B. D. Hammock and P. V. Choudary (1993).** "Cloning, sequencing and expression of the Fab fragment of a monoclonal antibody to the herbicide atrazine." *Protein Eng* 6: 981-8.
- Watanabe, M. and G. Blobel (1995).** "High-affinity binding of *Escherichia coli* SecB to the signal sequence region of a presecretory protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10133-6.
- Weill, J. C. and C. A. Reynaud (1987).** "The chicken B cell compartment." *Science* 238: 1094-8.
- Weinstein, P. D., A. O. Anderson and R. G. Mage (1994).** "Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: V_H diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms." *Immunity* 1: 647-59.
- Wickner, S., M. R. Maurizi and S. Gottesman (1999).** "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins." *Science* 286: 1888-93.
- Williams, D. C., R. M. Van Frank, W. L. Muth and J. P. Burnett (1982).** "Cytoplasmic

inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins." *Science* 215: 687-9.

Willis, R. C. and C. E. Furlong (1974). "Purification and properties of a ribose-binding protein from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 249: 6926-9.

Winstead, C. R., S. K. Zhai, P. Sethupathi and K. L. Knight (1999). "Antigen-induced somatic diversification of rabbit IgH genes: gene conversion and point mutation." *J Immunol* 162: 6602-12.

Winter, G. (1998). "Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering." *FEBS Lett* 430: 92-4.

Wrobel, B. and G. Wegrzyn (1998). "Replication regulation of ColE1-like plasmids in amino acid-starved *Escherichia coli*." *Plasmid* 39: 48-62.

Wu, L. F., B. Ize, A. Chanal, Y. Quentin and G. Fichant (2000). "Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism." *J Mol Microbiol Biotechnol* 2: 179-89.

Wu, X., H. Jornvall, K. D. Berndt and U. Oppermann (2004). "Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance." *Biochem Biophys Res Commun* 313: 89-96.

Wulfing, C. and A. Plückthun (1994a). "Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 12: 685-92.

Wulfing, C. and A. Plückthun (1994b). "Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli*. Influence of folding catalysts." *J Mol Biol* 242: 655-69.

Wunderlich, M. and R. Glockshuber (1993). "*In vivo* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA)." *J Biol Chem* 268: 24547-50.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* 33: 103-19.

Zabriskie, D. W. and E. J. Arcuri (1986). "Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms." *Enzyme Microbio. Technol* 8: 706-717.

Zahn, G., A. Skerra and W. Hohne (1999). "Investigation of a tetracycline-regulated phage display system." *Protein Eng* 12: 1031-4.

Zhao, Y., S. M. Jackson and R. Aitken (2006). "The bovine antibody repertoire." *Developmental and Comparative Immunology* 30: 175-186.

8 Anhang

Im Folgenden ist die DNA-Sequenz des Klons IgG13, inseriert in das Phagemid pASK111Rab-g3-WR13, die DNA-Sequenzen der Rab (Kaninchen spezifische Klonierungsstelle) der beiden Kaninchen-Klone IgG2 und IgG5 sowie die DNA-Sequenz des murinen AK K411B, inseriert in den Vektor pASK85-pro-K411B, angegeben.

pASK111Rab-p3-WR13

tet-Promotor (*tet*^{p/o}, blau), Signalsequenzen (orange), leporide LC/ HC (grau), His₆ (blau), p3 (braun), *ori*f1 (ocker), Chloramphenicol-Resistenzgen *Cat* (braun), *tet*-Repressor (*tet*R) (orange), *ColE1* (braun)

▶ *tet*^{p/o}

CCATAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTATTGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTTG
TTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAA
SD ▶ RBP

ATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGATAAC GAGGGCAAAAA ATGAACATGAAAAAACTGGCTA
NcoI ▶ LC

CCCTGGTTTCCGCTGTTGCGCTAAGCGCCACCGTCAGTGCGAATGCCATGGCAGATGTCGTG

Kaninchen

ATGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCCGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCA
GGCCAGTGAGGACATTTATAGCAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA
AACTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGT
GGATCTGGGACAGAGTTCCTCTCACCATCAGCGGCTTGCAAGTGTGACGATGCTGCCACTTA
CTACTGTCTAGGCGTTTATTATAGTAGTAGTTGGGACCATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGG
TGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAG
GTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGT
CACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGA
ATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAAC
AGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCAGCACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAA
LC ◀ * *Kpn*I ▶ *OmpA*

TAGGGGTGACTGTTAA AGGTACCTAACGAGGGCAAAAA ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTG
*Asi*SI ▶ HC Kaninchen

CAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGATCGCCCAGGAGCAGCTGGTGGAGTCCGGG
GGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTT
CAGTGGCAACCTTCACATGTGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCG
CATGCATTTATGGTGGTAGTAGTGGTGGCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTC
ACCATTTCCAAAATTTTCGTTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGA
CACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGTTTTTATAATGCTGGCTTGTGGGGCCAGGCACCC
TGGTCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCTGC
GGGACACACCGAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGCTACCTCCCGGAGCC
AGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCC
GGCAGTCTCAGGCCTTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCC
GTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACCAAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTC

HC ◀ *Mlu*I His₆-tag *Sac*II * ▶ p3

GACATGCAGCAAGCCACGACGCGT CATCACCACCATCACCAT CCGCGGTAGACTGTTGAAA
GTTGTTTTAGCAAAACCTCATAACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAAC
TTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTAC
TGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTTCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATG
AGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTACTAAA

CCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCAC
 TTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGC
 CTCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGT
 TATACGGGCACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAACTTATTACCAGTACACTCCTGT
 ATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTCCATT
 CTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAA
 CCTCCTGTCAATGCTGGCGGGGCTCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGG
 CTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTT
 CCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTGTATTATGAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGG
 GCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCCAACTTGATTC
 TGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTA
 ATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGAC
 GGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTGCCTCAGTCGGT
 TGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACA
 AAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTA

Ende p3 ◀ *HindIII*

TTTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATAAAAGCTTGACCTGTGAAG
 TGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTGTCTGCCGTTTACCCTACTGCGTCACG

► *Orf1*

GATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
 GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCTCG
 CCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTT
 AGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCC
 ATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAC
 TCTTGTTCCAAACGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGTATTATAAGGG
 ATTTTGCAGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAA
 TTTTAACAAAATTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTCACC
 ATAATGAAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAG

► *Cat*

GAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCG
 TAAAGAACATTTTGGAGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGC
 TGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTT
 ATTCACATTTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGG
 TGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCCTTGTACACCGTTTTTCCATGAGCAAACCTGAAA
 CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCG
 CAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATAT
 GTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATA
 TGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTTCACTATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTG
 CTGATGCCGCTGGCGATTACAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCCGCAGAAT

►

GCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATAGGAATTAATGA
 tetR

TGTCTCGTTTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCCGA
 ATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTA
 TTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGC
 ACCATACTCACTTTTGCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCT
 AAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACG
 GCCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAAGGTT
 TTCACTAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCAGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTA
 TTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTAT
 GCCGCCATTTATTACGACAAGCTATCGAATTTTGTATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCT
 TATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGTCT

TAAAGCAGCATAACCTTTTTCCGTGATGGTAACTTCACTAGTTTAAAAGGATCTAGGTGAA
GATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGT

► ColE1

CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
TGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACC
AACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG
TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTG
CTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTC
AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
CCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC
GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGG
AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTTCGGGTTTC
GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGAC
CCGACA

pASK111Rab-p3-WR5 (Rab mit IgG5)

tet-Promotor (*tet*^{fl}, blau), Signalsequenzen (orange), leporide LC/ HC (grau), His₆ (blau) p3 (braun).

▶ *tet*^{fl}/o

CCATAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTG
 TTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAA
 SD ▶ RBP

ATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGATAAC GAGGGCAAAAA ATGAACATGAAAAAACTGGCTA
 NcoI ▶ LC

CCCTGGTTTTCCGCTGTTGCGCTAAGCGCCACCGTCAGTGCGAATGCCATGGCAGATGTCGTG
 Kaninchen

ATGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCCGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCA
 GGCCAGTGAGGACATTTTATAGCAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA
 AACTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGT
 GGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCTTGCCAGTGTGACGATGCTGCCACTTA
 CTACTGTCTAGGCGTTTTATTATAGTAGTAGTTGGGACCATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGG
 TGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAG
 GTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGT
 CACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGA
 ATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAAC
 AGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCAGCACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAA
 Ende LC ◀ * *KpnI* ▶ *OmpA*

TAGGGGTGACTGTTAAGGTACCTAACGAGGGCAAAAA ATGAAAAGACAGCTATCGCGATTG
 AsiSI ▶ HC Kaninchen

CAGTGGCACTGGCTGGTTTTCGCTACCGTAGCGATCGCCCAGTCAGTGAAGGAGTCCGAGGGA
 GACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTACCCTCAG
 TAGATATGGAATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATACA
 TTGCTACTGGTAGTGGTGGTGGCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGAGTCACCAGC
 TCCCAAACCTCGTCGACCACGGTGA CTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGC
 CACCTATTTCTGTGCGAGAGGACTGTATGTTGGTAGTCATTATTATATGGGATACTTTAACT
 TGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTC
 CCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCGAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAA
 AGGCTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCTCACCAATGGGGTAC
 GCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGGAGCGTG
 ACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGA
 Ende HC ◀ *MluI* His₆-tag

CAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCCACGACGCGTCATCACCACCATCACCATC
 SacII * ▶ p3

CGCGGTAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAACCTCATAACAGAAATTCATTTACTA.....

pASK111Rab-p3-WR2 (Rab mit IgG2)

tet-Promotor (*tet*^{p/o}, blau), Signalsequenzen (orange), leporide LC/ HC (grau), His₆ (blau) p3 (braun).

▶ *tet*^{p/o}

CCATAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTG
 TTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAA
 SD ▶RBP

ATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGATAAC GAGGGCAAAAA ATGAACATGAAAAAACTGGCTA
 NcoI ▶ LC

CCCTGGTTTTCCGCTGTTGCGCTAAGCGCCACCGTCAGTGCGAATGCCATGG CAGATGTCGTG
 Kaninchen

ATGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCCGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCA
 GGCCAGTGAGGACATTTATAGCAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA
 AACTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGT
 GGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCTTGCCAGTGTGACGATGCTGCCACTTA
 CTACTGTCTAGGCGTTTTATTATAGTAGTAGTTGGGACCATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGG
 TGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAG
 GTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGT
 CACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGA
 ATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAAC
 AGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCAGCACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAA
 Ende LC ◀ * *KpnI* ▶ *OmpA*

TAGGGGTGACTGT TAAGGTACCTAACGAGGGCAAAAA ATGAAAAGACAGCTATCGCGATTG
AsiSI ▶ HC Kaninchen

CAGTGGCACTGGCTGGTTTTCGCTACCGTAGCGATCGCC CAGTCCCTGGAGGAGTCGGGGGA
 GACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAG
 TAGCACGCATTGGATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCGT
 GCATTTATAATGGTGATAATAAAGACTTATTACGCGAGCTGGGTGAATGGTTCGATTACCATC
 TCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGA CTCTGCAAATGACCAGCCTGACAGCCGCGGACACGGC
 CACCTATTTCTGTGCGAGATCTGCTACTGCTGCTGGTTATCGCTTTAACTTGTGGGGCCCAG
 GCACCCTGGTACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCC
 TGCTGCGGGGACACACCGAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGCTACCTCCC
 GGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCCT
 CCGTCCGGCAGTCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGC
 CAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGC
 Ende HC ◀ *MluI* His₆-tag *SacII* * ▶ p3

GCCCTCGACATGCAGCAAGCCCACG ACGCGT CATCACCACCATCACCAT CCGCGG TAGACTG
TTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGA... .

pASK85-pro-K411B

tet-Promotor (*tet*^{p/o}, blau), Signalsequenzen (orange), murine HC/LC (grau), His₆ (blau), orifl (ocker), Ampicillin-Resistenzgen *bla*t (blau), *tet*-Repressor (*tetR*) (orange), *proA* (hellblau), *proB* (grün), P^{proBA} (blau), *ColE1* (braun)

▶ *tet*^{p/o}

ACCCGACACCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGA
 TAGAGTTATTTTACCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTTCGACAAA
 XbaI SD ▶ OmpA
 ATCTAGATAACGAGGGCAAAAATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG

▶ HC K411B

GTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGCAGCAGTCAGGAGGAGGCTTGGTGCAA
 CCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTGACGTCTGGAT
 GGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTCGCTGAAATTAGAAACAAAG
 CTAATAATCATGCAGCATATTATGCTGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCGTTTTCAAGAGAT
 GATTCCAAAAGTAATGTCTACCTGCACATGAATAGCTTAAAGACCTGAAGACACTGGCATTTA
 TTATTGTACCAGGCACAGCTATAGGTACGACGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACCACGG
 TCACCGTCTCCTCAGCAAAGACCACTCCTCCGTCTGTTTACCCTCTGGCTCCTGGTTCTGCG
 GCTCAGACTAACTCTATGGTGA CTCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGT
 GACAGTGACCTGGA ACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTCTGC
 AATCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAG
 ACCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCTTCTAGCACCAAAGTTGACAAGAAAATCGTACC
 HC Ende ◀ His₆-tag * * NcoI SD ▶ PhoA

GCGCGACTGC CATCACCACCATCACCATTAAATAACCATGGAGAAAATAAA GTGAAACAAAGC
 ▶ LC K411B

ACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCT
 CACTCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAG
 CCAGTGAAAAGTGTGATATTTATGGCAATAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAAACCAGGA
 CAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGAAACTGGGATCCCTGCCAGGTT
 CAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCTCACCATTAATCCTGTGGAGGCTGATGATG
 TTGCAACCTATTTCTGTGACAAAGTAAATCAGCTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGCACCAG
 CTCGAGCTGAAGCGCGCTGATGCTGCACCGACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCA
 GTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCA
 ATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGAT
 CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTA
 TGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCA
 LC K411B Ende ◀ Hind

AGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT TAGAGACAAAGGTCCTGATGCTGCTGATAGCAGGTA AGC
 III ▶ Tlpp

TTGACCTGTGAAGTGAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTTGTCTGCCGTTTACCG
 ▶ Ori fl

CTACTGCGTCACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGG
 TTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTC
 CCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT
 AGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGTGTT
 CACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT
 TTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTT
 TGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAA
 AATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA
 AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
 ▶ Amp
 GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAAC

ATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCA
 GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGA
 ACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA
 TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAG
 CAACTCGGTGCGCGCATACTACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGA
 AAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTG
 ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTT
 TTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGC
 CATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
 TATTAACGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTGATAGACTGGATGGAGGCG
 GATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA
 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGCTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
 CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGA

► tetR

CAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAGGAATTAATGATGTCTCGTTT
 AGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTGCGAATCGAAGGTT
 TAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTA
 AAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCA
 CTTTTGCCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTTA
 GATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAA
 AAACAGTATGAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTTCACTAGA
 GAATGCATTATATGCACTCAGCGCAGTGGGGCATTTTACTTTAGGTGCGTATTGGAAGATC
 AAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTA
 TTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCT
 TGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGTCTTAAAGCAGC

SpeI

ATAACCTTTTTCCGTGATGGTAACTTCACTAGTCATGTTACGAAACGTGAATCACGGTGGAC
 AAGGTTAAAACCTAACCGGGCGATGCGTCAATGGCCTTGTTGAATCAAATGGCTACTTTTGCAT

► proA Ende

CACCCGGTTTTATTTACGCACGAATGGTGTAATCACCAATGCCGATCCACTTGTAAGTGGTC
 AGTGCTTCCAGCCCCATTGGGCCACGCGGTGGAGTTTTTGTGTGCTTACCGCCACTTCCGC
 ACCCAGACCAAACCTGGCCGCGTCGGTAAAACGCGTAGAGGCGTTACTGCGCCAGTGCAGCT
 GCATCTGCGTGTAATGTCACGCCGCTTCCGCCATTTGTTTGTGTTAATGCGGGCAGGAAGCT
 ATCGGCGATGTTTTTATTCACCAGCAACGTTTCAACCGTATTACATGTGCTCGGACGCTGAG
 TTTTCGCGTTGACGATCACTTTAATGCTTCAGCGATCTCTACACTTTCATCAACGTAAATA
 TGGCATAACGCTATAACCACCTGTGATCACCGGATTGTCGACTGTTACCGGCACAGTTTATG
 CAAACCAGCGCCACCACGCGGGATCAGCATGTGCGATGATTTATCCATACGCAGCATTTCAC
 TGACCAGCGCACGGTCAGGATTATCAATCGCCTGCACGGCACCCGCCGGTAAGCCGCAGGAT
 TTCAGGGCGTCTGAATCACCGCCACCGTTGCAGCGTTAGTGCGACACGTTTCTTTGCCACC
 GCGCAGGATCACCGCATTACCGTTTTTCAGGCACAGCGAAGCGACATCAACCGTCACGTTTCG
 GCGCGCTTCATAAATCACGCCAATAACCCCCAGCGGTACGCGACGACGCTCAAGACGCAGG
 CCGCTGTCCAGTACGCCGCCATCGATTACCTGCCCCACCGGATCGGCGAGGTTGCACACCTG
 ACGTACATCGTCGGCAATGCCTTTCAGCCGTGCGGGCGTCAGTGCCAGACGGTCAAGCATCG
 CTTTCGCTAAGGCCATTGGCTCGCGCGTCAGCAACATCCTGGGCGTTAGCGTTGAGGATGATT
 TCGCTTTGTGCTTCCAGTTCATCGGCGATTTTTTCCAGCACGCGATTTTTTTTCGCGGCTGGA

proA Start ◀

► proB

GAGTTGCGCTAATTTATACGAGGCTTGCTTCGCGGCAATGCCCATTTGTTCCAGCATCAGCC

Ende

TGCTCCTTAACGGGTAATCATGTCATCACGGTGAACGGCAACCGGGCCGTATTCATATCCCA
 GTATTGCATCAATTTCTTGCAGTGGTGTCCGGCAATACGGCGTAATGCATCGCTGTTGTAA
 CGACTGACGCCGTGGGCGATATCGCGGCCTTCGAGGTTGCAAATGCGGATGACTTCACCACG
 CGAGAAATTGCCAGTCACGCTTTAATGCCTTTCGGCAACAGGGAGCTGCCGCGTTCAGAA

TGGCGGCAGTTGCCCTTCATCTACCGTGATTTACCCGCCGGCGGCACCGAAAATCCAG
CGTTTACGTTTTTCAAGCGGAGTCGCCTGGGCATGGAACAGCGTACCGACGGAAATGCCTTC

SacII

CATCACATCACCAATAACGCCCGGCTTGCTGCCCGCGGCAATAATGGTGTGCGATACCCGCAC
GGCAAGCCACGTCAGCGGCCTGCAATTTGGTACTCATGCCGCCAGTTCCGAGGCCTGAAACG
CTGTCACCGGCAATCGCGCGCAGTGCCTCATCAATGCCGTAAACATCTTTAATCAGTTCTGC
CTGCGGATTGCTGCGCGGGTCAGCGGTATACAAACCTTTTTGATCGGTTCAGCAGCAACAGTT
TATCGGCACCCGCAAGAATCGCCGCCAGCGCAGAAAGGTTATCGTTATCGCCGACCTTAATC
TCTGCCGTAGCGACAGCATCGTTCTCATTGATTACCGGAACGATATTGTTATCGAGCAACGC
TCGAGGGTGTGCGCGGGCTTCAGGAAGCGTTCACGGTCTTCCATATCAGCACGGGTTCAGCA
GCATTTGCCCGACGTGAATGCCATAAATCGAAAACAGCTGTTCCCACAGTTGAATCAGTCGA
CTCTGCCCTACCGCCGCCAGCAGTTGTTTCGAGGCGATGGTCGCTGGCAGTTCCGGGTAACC
CAGGTGCTCACGTCGGCGGGCGATCGCGCCCGACGTCACAATAACAATCCGATGCCCGGCGG
CATGTAACTGCGCGCACTGGCGAACAAGTTCAACGATATGGGCACGGTTCAGACGGCGCGAT

proB Start ◀

CCGCCTGTTAGCACACTGGTGCCGAGTTTTACCACCAGCGCCTGGCTGTCACTCATGATTCT

proBA^{p/o}

CTGCCATTCAATTTTAGGAAAAATGATATCAAACGAACGTTTTAGCAGGACTGTTCGTCGGTT

◀ *SpeI*

GCACTAGTTTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTT

▶ *ColE1*

AACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA
GATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
GGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAG
CGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGA
TAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGG
GCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGA
TACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTA
TCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCT
GGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC
TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATG

9 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer **Dr. Karl Kramer** für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Er hat mir mit seinem enormen Erfahrungsschatz stets hilfreich zur Seite gestanden. Seine fachlichen Anregungen und seine Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. B. Hock** für die Überlassung des Themas, für seine kompetente fachliche Unterstützung und für seine Bereitschaft, mir in jeder Situation geduldig mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. A. Skerra** sehr herzlich, der mir mit seiner Fachkompetenz und viel Geduld unter die Arme gegriffen hat und sowohl den Expressionsvektor pASK111 zur Verfügung gestellt als auch die Unterstützung durch sein Labor ermöglicht hat. Mein Dank gilt dabei besonders **Dr. Martin Schlapschy** und **Klaus Wachinger**.

Prof. Dr. Angelika Schnieke danke ich dafür, dass sie den Vorsitz der Prüfungskommission übernommen hat.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zellbiologie für die gute Zusammenarbeit danken. Besonders danke ich meinen Kollegen und Freunden **Kathrin, Katja, Martin, Micha, Nici** und **Ralph** für die abwechslungsreiche Zusammenarbeit innerhalb und außerhalb des Labors. **Antje** danke ich für ihre effektive Hilfe im Labor, **Christian** für die Versorgung mit Milchprodukten.

Mein herzlichster Dank gilt meinen **Eltern** und meinen Schwestern **Silia** und **Sophia**, die immer an mich geglaubt haben und mich unterstützt haben- nicht nur mit velouté de potiron haben sie mir die Arbeit extrem erleichtert und mein Überleben im Labor gesichert.

Besonders möchte ich **César** danken für seine liebevolle Unterstützung „en la prosperidad y la adversidad“, bei hd und in LP. Gracias a **Eva, Silvia, Eva Marcela, Juan, el Jefe** und **Toto** für das regelmäßige lebensnotwendige Asyl. Ganz herzlich danke ich **Vroni**, die mir zusammen mit unserem geschätzten australischen Kollegen **Peter Lehmann** ein „molliges“ Leben ermöglicht hat, **Steffi** und **Matthias**, die sie dabei unterstützt haben und **Peter Schatz**, der uns den Weg über die Brücke gewiesen hat.

Darüber hinaus gilt mein herzlichster Dank **Julia1, Lea, Azita, Marina, Nils, Ole (16.2.08), Michi** und allen meinen Freunden.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Julia Charlotte Wiebe
Geburtsdatum	9. April 1976
Geburtsort	Freiburg

SCHULBILDUNG

1982 - 1995	Freie Waldorfschule Freiburg
-------------	------------------------------

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Aug. 1995 –Dez. 1995	Englisch-Sprachkurs am Wesli-Institute of Madison, USA
1996 - 1998	Biologie an der Freien Universität zu Berlin, Vordiplom
1998 – 2002	Agrarwissenschaften an der Humboldt-Universität zu Berlin
Jan. – April 2000	Institut National Agronomique Paris-Grignon (INAP-G), Paris, ERASMUS
Mai - Aug. 2000	Praktikum am Institut National de Recherche Agronomique (INRA), Jouy en Josas, Frankreich
März - April 2001	Praktikum beim Servicio de Investigación Agroalimentaria (SIA), Zaragoza, Spanien
September 2002	Abschluss als DIPL.-ING. AGR. (UNIV) an der Humboldt Universität zu Berlin Albrecht-Daniel-Thaer-Preis für besondere Studien-Leistungen
Feb. - Mai 2003	Praktikum am Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spanien
Aug. - Dez 2003	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
Jan. 2004-Juni 2007	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Zellbiologie der TU München bei Prof. Dr. Bertold Hock. Während dieser Zeit wurde die vorliegende Arbeit angefertigt
Seit März 2008	Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas, Spanien