

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Zellbiologie

Aufbau eines *Phage Display*-Systems zur Repertoire-
Klonierung und Selektion von F_{ab}-Fragmenten aus Maus
und Kaninchen für die Umweltanalytik

Dipl.-Biol. Univ. Carolin Schüller

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Hock, em.
2. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra
3. Priv.-Doz. Dr. K. Kramer

Die Dissertation wurde am 22.04.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.06.2008 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	10
1.1. Modellsubstanzen mit Umweltrelevanz.....	11
1.1.1. Triazinherbizide	11
1.1.2. Sulfonamide.....	14
1.2. Grundlagen für immunchemische Nachweisverfahren.....	15
1.2.1. Antikörperstruktur und Antikörperrepertoire.....	16
1.2.2. Herstellung von Antikörpern und Antikörperfragmenten	18
1.3. Zielsetzung und Aufbau der Arbeit.....	21
1.3.1. Anforderungen an das neue <i>Phage Display</i> -System	21
1.3.2. Eigenschaften des Ausgangsvektor pASK85-K411B	22
1.3.3. Vorgehensweise	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Material	26
2.1.1. Reagenzien	26
2.1.2. Antikörper.....	27
2.1.3. Probenpuffer, DNS- und Proteinmarker.....	27
2.1.4. Molekularbiologische Reagenzien.....	28
2.1.5. Vektoren und Bakterienstämme	29
2.1.6. Atrazine, Sulfonamide und deren Konjugate	30
2.1.7. Oligodesoxynukleotide	31
2.1.8. Medien und Puffer	33
2.1.9. Verbrauchsmaterial	36
2.1.10. Geräte	37
2.2. Methoden	38
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	38
2.2.2. Präparation und Selektion rekombinanter Phagemide.....	47
2.2.3. Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	51
2.2.4. Proteinchemische Methoden	52
2.2.5. Immunchemische Methoden	54
2.2.6. Computerprogramme und Datenbanken.....	56
3. Ergebnisse	57
3.1. Konstruktion der Phagemide.....	57
3.1.1. pASK85-p3-K411B für murine AK-Gene.....	57
3.1.2. pASK115-p3-K411B für murine AK-Gene.....	61
3.1.3. pASK111R _{ab} -p3 für Kaninchen-AK-Gene.....	63
3.1.4. pASK111R _{ab} -p3-K411B	72
3.2. Vergleich der <i>Phage Display</i> -Vektoren.....	74

3.2.1.	Einfluss der Antibiotika und Leadersequenzen auf das Wachstum in XL1 <i>Blue</i> und TG1 F ⁺	74
3.2.2.	Vergleich der Expression von F _{ab} -pIII und F _{ab} -Fragmenten.....	75
3.2.3.	Vergleich hinsichtlich des Phagentiters und des Verhältnisses Wildtyp zu rekombinanten Phagen	78
3.3.	Selektion von leporiden sulfonamidspezifischen F _{ab} -Antikörperfragmenten	80
3.3.1.	Das F _{ab} -Phagen-System	80
3.3.2.	Etablierung einer immunisierten leporiden Bibliothek	82
3.3.3.	Untersuchung der Expression von LibSARb mittels <i>Western Blot</i>	86
3.3.4.	<i>Phage Display</i> mit Kaninchen-Antikörpergenen.....	87
3.3.5.	Charakterisierung der beiden SA2-spezifischen F _{ab} -Fragmente	95
4.	Diskussion.....	100
4.1.	Konstruktion der Phagemide	100
4.1.1.	Konstruktion von pASK85-p3-K411B und pASK115-p3-K411B für murine AK-Gene.....	100
4.1.2.	<i>Phage Display</i> -Vektor pASK111R _{ab} -p3 für Kaninchen AK-Gene.....	102
4.2.	Vergleich der <i>Phage Display</i> -Vektoren unter Einsatz des murinen F _{ab} K411B	106
4.3.	Selektion von leporiden sulfonamidspezifischen F _{ab} -Fragmenten	108
4.3.1.	Etablierung einer immunisierten leporiden Bibliothek	108
4.3.2.	<i>Phage Display</i> mit den generierten Kaninchen-Bibliotheken.....	109
4.4.	Charakterisierung der F _{ab} -Fragmente	115
5.	Zusammenfassung	119
Anhang A: Strukturformeln und Vektoren-Übersicht		121
Anhang B: Sequenzen		124
Literaturverzeichnis		136
	SÖDERLIND, E., DUENAS, BORREBAECK, C.A (1995) Chaperonins in phage display of antibody fragments. <i>Methods Mol Biol.</i> 51:343-53.	146
Danksagung		149
Lebenslauf		150

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturformel des Herbizids Atrazin	12
Abbildung 2: Strukturmodell der variablen Regionen des F _{ab} -Fragments K411B	13
Abbildung 3: Grundstruktur der aromatischen Sulfonamide	14
Abbildung 4: Struktur und Derivate von murinen und leporiden Antikörpern	16
Abbildung 5: Schema zur Herstellung von Antikörperbibliotheken und deren <i>Panning</i> auf ein Antigen.	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors pASK85-K411B	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Klonierung der Phagemid-Vektoren	25
Abbildung 8: strukturformeln der SA1 und SA2 Konjugate	41
Abbildung 9: Kontrollverdau von pASK85-K411B.1	57
Abbildung 10: Klonierungsstrategie für pASK85-p3-K411B	59
Abbildung 11: <i>Western Blot</i> zum Test der K411B- und K411B-pIII-Expression mit pASK85-p3-K411B in TG1 F ⁺	60
Abbildung 12: Auswertung Atrazin-Verdrängungs-ELISA mit in pASK85-p3-K411B exprimierten F _{ab} -Fragmenten	61
Abbildung 13: Konstruktion des Phagemids pASK115-p3-K411B	62
Abbildung 14: Ausschnitte aus den <i>Domain-Alignments</i> der IMGT-Datenbank	63
Abbildung 15: Agarosegel der Amplifikation von Kaninchen IC- und HC-Genen	67
Abbildung 16: Nukleotidsequenz der <i>Cloning Site</i> R _{ab} CS für leopride Immunglobuline	68
Abbildung 17: Vergleich der Prognosen zweier Peptidase-Schnittstellen für die ompA-Signalsequenz	69
Abbildung 18: Klonierungsstrategie für pASK111R _{ab} -p3	70
Abbildung 19: DNS-Sequenz für die mutierten Basentriplets in der leporiden LC (A) und HC (B) am Beispiel von pASK111R _{ab} -p3-WR13	71
Abbildung 20: Einfügen der diagnostischen Schnittstellen in pASK111R _{ab} -p3-WR13	72
Abbildung 21: Konstruktionsschema für pASK111R _{ab} -p3-K411B	73
Abbildung 22: Schematische Darstellung des Phagemids pASK111R _{ab} -p3-K411B	74
Abbildung 23: <i>Western Blot</i> zum Vergleich der ProteinExpression in XL1 <i>Blue</i> und TG1 F ⁺	76
Abbildung 24: Auswertung von Atrazin-Verdrängungs-ELISAs mit den in den Phagemiden pASK85-K411B, pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111R _{ab} -p3-K411B exprimierten F _{ab} -Fragmenten	77
Abbildung 25: Prozentualer Anteil an rekombinanten Phagen im Phagemidvergleich	79
Abbildung 26: Auswertung von Phagen-ELISAs für den Phagemidvergleich	80
Abbildung 27: Überblick über die Selektion der F _{ab} -Fragmente und Anwendung des <i>Phage Display</i> -Systems	81
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Strategie zur Generierung der F _{ab} -Bibliotheken	84
Abbildung 29: (A) nativer und (B) denaturierender <i>Western Blot</i> zum Nachweis von leporiden F _{ab} -Fragmenten	86
Abbildung 30: Nachweis der Expression von leporiden HC-pIII mittels <i>Western Blot</i>	87
Abbildung 31: Prozentualer Anteil an Verdrängern in den vier <i>Panning</i> -Runden	90
Abbildung 32: Bindungsvergleich bei den Konjugaten ConA-SA1 und OVA-SA1 im ELISA	91
Abbildung 33: <i>Alignment</i> der selektierten Peptidfragmente aus der LibSARb	92
Abbildung 34: Kontrollverdau der selektierten SA2-spezifischen Klone	94

Abbildung 35: Verdrängungswerte der 26 SA2-spezifischen Klone	95
Abbildung 36: <i>Alignment</i> Aminosäuresequenzen HC _{SA2 23} und HC _{SA2 90}	96
Abbildung 37: Analyse der (A) V _H -sequenz (B) der V _L -sequenz der F _{ab} -Fragmente SA2 23 und SA2 90 nach den Regeln der IMGT.....	97
Abbildung 38: Prozentuale Verdrängung der F _{ab} -Fragmenten SA2 23 und SA2 90	98
Abbildung 39: mit dem Programm MFOLD vorhergesagte Sekundärstruktur für die DNS von Klon SA1 19.....	113

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der verwendeten Mutationsprimer	31
Tabelle 2: Primer für die Amplifizierung von Genen und Gensegmenten	31
Tabelle 3: Primer für die Sequenzierung.....	31
Tabelle 4: Primer für die Amplifikation von Ieporiden leichten und schweren Ketten	32
Tabelle 5: Antibiotika-Lösungen.....	34
Tabelle 6: Log-Phase OD ₆₀₀ der verwendeten Bakterienstämme	39
Tabelle 7: Master-Mix für cDNS-Synthese	42
Tabelle 8: Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes.....	43
Tabelle 9: Zeit-Temperatur-Profil der TD-PCR zur Amplifikation der Ieporiden V _H C _H - und V _L C _L - Gene	44
Tabelle 10: Mastermix zur Amplifikation der V _H C _H und V _L C _L von Kaninchen-Antikörpergenen ..	44
Tabelle 11: Primerkombinationen und Volumen cDNS für die Amplifikation der AK-Gene.....	45
Tabelle 12: Waschschemata für das <i>Panning</i>	49
Tabelle 13: Pipettierschema Trenn- und Sammelgele für SDS-Elektrophorese	53
Tabelle 14: Molare Absorptionskoeffizienten für die verwendeten rekombinanten Proteine ...	54
Tabelle 15: Liste der Detektionsantikörper für den <i>Western Blot</i>	54
Tabelle 16: N- und C-terminale Aminosäuresequenzen Ieporider Antikörpergene.....	64
Tabelle 17: Prozentuales Vorkommen von Endonuklease-Erkennungssequenzen in Ieporiden Immunglobulin-Genen.	65
Tabelle 18: Menge der Amplifikate abhängig vom Versuchstier und den Primerpaarungen	67
Tabelle 19: Ernte-OD _{600nm} der Phageninfektionen im Phagemidvergleich	78
Tabelle 20: Ausbeuten der Phagenfällungen im Phagemidvergleich	78
Tabelle 21: Ausbeuten der mRNA-Isolationen	83
Tabelle 22: cDNS-Ausbeute der Amplifikationen für Kaninchen LC- und HC-Gene	83
Tabelle 23: Generierte Phagenbibliotheken und ihre Komplexität	86
Tabelle 24: Auflistung der im <i>Panning</i> verwendeten Konjugate und deren Konzentration.....	88
Tabelle 25: Waschschemata für das <i>Panning</i> mit LibSARb	88
Tabelle 26: Anzahl der eluierten Phagen nach den einzelnen <i>Panning</i> -Runden	89
Tabelle 27: Übersicht der Änderungen im <i>Panning</i> -Protokoll für die Selektion von SA2- affinen Phagen	93
Tabelle 28: Ergebnisse der virtuellen Analyse der beiden SA2-affinen F _{ab} -Fragmente	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A _x	Absorption A bei x nm
AB	Antibiotikum
Ag	Antigen
aTc	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
AMRG	<i>Applied Molecular Receptor Group</i> , Universität Barcelona
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure
bla	β-Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
cDNS	komplementäre DNS
CDR	<i>complementarity determining region</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
C _{H1}	erste konstante Domäne der schweren Kette eines AKs
C _{L(κ/λ)}	Konstante Domäne der leichten Kette eines AKs Subtyp κ o. λ
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
ColE1	Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie
ConA	Concanavalin A
KD	Equilibriumskonstante
(k)Da	(Kilo)Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ε _x	molarer Absorptionskoeffizient bei x nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
F _{ab}	<i>fragment antigen binding</i>
FR	<i>framework regions</i>
f1	intergenische Region des filamentösen Phagen f1
gIII	Gen für das Hüllprotein III des filamentösen Phagen M13
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GC/ GC-MS	Gaschromatographie/ - mit Massenspektrometrie-Kopplung
Gluc	Glucose
HAMA	<i>human anti mouse antibody response</i>
HC _(n)	schwere Kette eines (naiven) AKs
HCH	<i>horseshoe crab hemocyanin</i>
H ₂ O*	Wasser 18 Megohm (DNase und RNase frei), steril
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

IgG	Immunglobulin G
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
LC _(n)	leichte Kette eines (naiven) AKs
(m)M	(Milli)Molar
m/v	Masse pro Volumen
MMP	Magermilchpulver
moi	<i>multiplicity of infection</i>
mRNS	<i>messenger RNS</i>
OD _x	optische Dichte bei x nm (veraltet, entspricht Absorption A)
ompA	<i>outer membrane protein A</i>
OVA	Ovalbumin
pIII	Hüllprotein III des filamentösen Phagen M13
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonale Antikörper
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	<i>plaque forming unit</i>
phoA	bakterielle Alkalische Phosphatase
pmol	pikomol
POD	Peroxidase
ppb	<i>parts per billion</i>
R _{ab} CS	<i>Cloning Site</i> für Kaninchen-AK-Gene
rAK	rekombinante Antikörper
rbp	Retinol-bindendes Protein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RV	Restriktionsverdau
SA1	Sulfapyridin
SA2	Sulfacetamid
SDS	Natriumdodecylsulfat
tet ^{p/o}	Tetracyclin Promotor/Operator
tetR	<i>tet</i> -Repressor-Gens
TD-PCR	<i>Touch-Down-PCR</i>
t _{ipp}	Lipoprotein-Transkriptionsterminator
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
V _H C _H	schwere Kette eines AKs
V _L C _L	leichte Kette eines AKs
w/v	<i>weight per volume</i>
λ	Wellenlänge

1. EINLEITUNG

Seit etwa Mitte des vorigen Jahrhunderts werden chemische Substanzen, wie zum Beispiel Pflanzenschutzmittel und Antibiotika, eingesetzt, um die Erträge in der landwirtschaftlichen Produktion zu steigern und zu sichern. Dem Nutzen dieses Einsatzes stehen die problematischen Rückstände der eingesetzten Xenobiotika und Antibiotika in Wasser, Boden und Nahrung gegenüber. Die Umwelt- bzw. Pestizidanalytik ermöglicht die Erfassung dieser Kontaminationen, die Aufklärung über die Belastung des Ökosystems und der damit verbundenen möglichen Gefahren für die menschliche Gesundheit.

Als sensitive, zuverlässige, kostengünstige und schnelle Methode hat sich in den letzten Jahren die immunchemische Analysetechnik bewährt (Kramer & Hock, 1995; Chiu *et al.*, 2000; Thiele-Bruhn *et al.*, 2004; Zacco *et al.*, 2006). Diese ermöglicht die Messung in unterschiedlichsten Matrices wie Luft (Wex *et al.*, 1995), Boden (Van Elsas *et al.*, 1998), Wasser und biologischem Material (Zacco *et al.*, 2006). Damit sind eine Reihe von Applikationen wie Aufklärung des Transports und der Verteilung von freigesetzten Substanzen in der Umwelt, chemische und mikrobielle Rückstandsanalyse in Nahrungsmitteln, Belastung von Innenräumen und Expositionsnachweis von Arbeitern möglich. Die gängigsten immunchemischen Verfahren sind Immunoassays, Immunchromatographie und Immunosensoren in der Analytik gelöster Stoffe sowie Immunoassays und immunhistochemische Methoden für die Erfassung gebundener Rückstände. Sie alle beruhen auf der spezifischen Bindung biologischer Komponenten (z.B. Antikörper (AK), F_{ab}-Fragmente (*fragment antigen binding*), scFv-Fragmente (*single chain fragment variable*) an die umweltrelevanten Schadstoffe. Immunchemische Analysetechniken, die auf dem Einsatz von Antikörpern und deren spezifischer Reaktion zum Antigen basieren, weisen eine hohe Sensitivität auf und sind einfach und rasch unter geringen Kosten durchzuführen.

Am häufigsten werden in den immunchemischen Analysen polyklonale und monoklonale Antikörper (pAK bzw. mAK) eingesetzt (Zhang *et al.*, 2006; Zacco *et al.*, 2006; Giersch, 1990; Pullen & Hock, 1995a/b). Aber auch rekombinante Antikörperfragmente (rAK) wie scFv (Kramer & Hock, 1996a; Garrett *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1997) und das F_{ab}-Format (Ward *et al.*, 1993; Karu *et al.*, 1994) oder das scAb-Fragment (*single chain antibody*) (Grant *et al.*, 1999) finden Anwendung. Als Quelle für diese AK dienen verschiedene Wirtstiere; vor allem werden Mäuse verwendet. Nur bei der Herstellung pAK werden bevorzugt Kaninchen eingesetzt. Kaninchen (Familie der *Leporidae*) weisen hinsichtlich der Entstehung und Variabilität ihres Antikörperrepertoires ein besonderes Immunsystem auf, da hier die B-Zelllymphopoese nur während einer kurzen Phase der Juvenilentwicklung stattfindet. Sie produzieren auf Grund dessen vielfältige, sehr spezifische und hochaffine AK gegen eine Bandbreite von Molekülen, unter anderem gegen Phosphopeptide, Carbohydrate und Peptide, die für Mäuse nicht immunogen sind (Mage *et al.*, 2006). Des Weiteren weisen Kaninchen-AK, durch ihre phylogenetische Verwandtschaft, häufig andere Epitopspezifitäten als Mäuse auf. Hinzu kommen eine große Stabilität und lange Haltbarkeit dieser Glykoproteine. Hierdurch sind Kaninchen scheinbar eine gute Wahl als Quelle für hochaffine AK und deren Fragmente. Dennoch werden für die Produktion von mAK oder rAK vor allem Mäuse als Ausgangsorganismus benutzt. Dies mag unter anderem darin begründet sein, dass die Herstellung eines stabilen Fusionspartners für monoklonale Kaninchen-AK lange Zeit eine Herausforderung darstellte (Spieker-Polet *et al.*, 1995). Die erfolgreiche Selektion von rekombinanten Kaninchen F_{ab}- oder

scFv-Fragmenten wurde in der Literatur ausschließlich mit Abkömmlingen des pComb-*Phage Display*-Systems beschrieben (Rader *et al.*, 2000; Foti *et al.*, 1998; Ridder *et al.*, 1994; Hofer *et al.*, 2006). In diesen Fällen wurde die Selektion eines humanisierten AKs oder eines AKs für die Humantherapie forciert. Ein Einsatz zur Selektion für die Umweltanalytik ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Die Selektion von rAK mittels *Phage Display* ist deshalb wünschenswert, weil sie neben der Reduzierung des Zeitaufwands (von 6–9 Monaten für mAK auf 3–4 Wochen für rAK), der Expression funktioneller AK-Fragmente und der Modifikation der AK im Hinblick auf Spezifität und Affinität den Verzicht auf Neuimmunisierungen und somit auf Tierversuche ermöglicht. Wegen der kurzen Generationszyklen von Bakterien und der relativ einfachen Handhabung, im Vergleich zur Zellkultur bei mAK, bietet dieses Verfahren eine Beschleunigung und Erleichterung bei der Gewinnung von großen AK-Mengen. Um diese Vorteile mit denen der leporiden AK zu verbinden und für die Umweltanalytik zugänglich zu machen, sollte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit ein neues Phagemid-System entwickelt und etabliert werden. Dies wurde als notwendig erachtet, da sich die Anforderungen zwischen Humantherapie und Umweltanalytik unterscheiden, beginnend mit der Auswahl der Antikörperklassen (z.B. IgA für die Analytik in Milch). Die Zielsetzung war, die Selektion von stabilen, in verschiedenen Matrices einsetzbaren, hochselektiven und hochaffinen murinen und leporiden Antikörpern speziell für die Umweltanalytik zu ermöglichen.

1.1. MODELLSUBSTANZEN MIT UMWELTRELEVANZ

Als Zielanalyte wurden zwei unterschiedliche Substanzklassen mit umweltrelevanter Bedeutung ausgewählt. Sowohl s-Triazine als auch Sulfonamide werden als Pestizide und Herbizide in der Landwirtschaft eingesetzt. Zusätzlich finden Sulfonamid-Antibiotika verbreitete Anwendung in der landwirtschaftlichen Tierhaltung. Für die Etablierung des neuen Phagemid Systems sollte Atrazin-F_{ab} K411B als Antigen-Antikörper-Paar verwendet werden. Um den *proof of concept* für die Verwendbarkeit des neuen Phagemids für leporide Antikörpergene zu zeigen, wurde die Substanzklasse der Sulfonamid-Bakteriostatika als Modellanalyt ausgewählt.

1.1.1. TRIAZINHERBIZIDE

Vor etwa 45 Jahren wurden bei der J. R. Geigy AG, Basel die ersten s-Triazine als selektive Pflanzenschutzmittel entdeckt (Gast *et al.*, 1955). Die Substanzklasse der Triazine wird in drei Gruppen unterteilt: (1) Chlor-Triazine (Endung: azin), (2) Methylthio-Triazine (Endung: tryn) und (3) Methoxy-Triazine (Endung: meton). Noch heute gehört die Gruppe der s-Triazine zu den weltweit am häufigsten eingesetzten Herbiziden (Hock *et al.*, 1995). Sie werden zur Kontrolle breitblättriger Unkräuter in verschiedenen Kulturen, hauptsächlich in Mais, eingesetzt und können im Vor- und Nachauflaufverfahren appliziert werden. Der Grund dafür sind hochwirksame Entgiftungsmechanismen, die diese Pflanzen für Atrazin besitzen. Dazu gehören ein N-Desalkylierungs-, ein nicht-enzymatischer Hydroxylierungs- und ein Konjugationsweg über Glutathion. Diese führen zum Transport der Herbizide in Vakuolen, wo die Stoffe abgebaut oder eingelagert werden (Shimabukuro *et al.*, 1971; Weimar *et al.*, 1988). Durch ihren Wirkungsmechanismus gehören Triazinherbizide zur Gruppe der Hemmstoffe des Photosystems II. Nach Aufnahme über die Wurzeln gelangen die Substanzen in die Spross-Spitzen und Blätter. Dort wirken sie als Analoga von Chinonen, die in der Elektronentransportkette des Photosystems II lokalisiert sind (Deisenhofer & Michel, 1989; Sinning, 1992). Sie verdrängen

die redoxaktiven Plastochinone aus ihren Bindungsstellen und nehmen ihre Position ein, ohne jedoch funktionell aktiv zu sein (Draber *et al.*, 1991). Dies verhindert die Umwandlung von Lichtenergie in elektrochemische Energie. Als Folge entstehen Triplett-Chlorophyll und Sauerstoffradikale, die schließlich die Peroxidierung von Membranlipiden induzieren (Velthuys, 1981; Fuerst & Normann, 1991).

1.1.1.1. ATRAZIN

Im Jahre 1958 wurde das Herbizid Atrazin (Abbildung 1) unter dem Handelsnamen Gesaprim auf den Markt eingeführt. Seit dem Auslauf des Patentschutzes findet es sich als Bestandteil in einer Reihe von Pflanzenschutzmitteln (Alazine, Atred, Crisazina, Farmco u.a.). Die weltweite Produktion wird derzeit auf 50 000 Tonnen pro Jahr geschätzt.

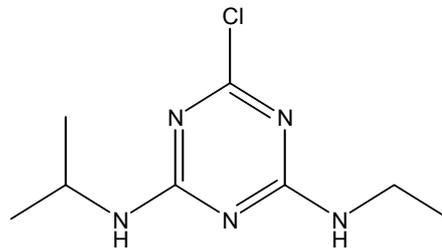


ABBILDUNG 1: STRUKTURFORMEL DES HERBIZIDS ATRAZIN

Die hohe Beständigkeit des Herbizids und seiner Metaboliten im Grundwasser und Boden führt zu einer Anreicherung des Xenobiotikums. Untersuchungen zeigten, dass Algen von allen aquatischen Organismen am empfindlichsten auf das Herbizid reagieren (Pipe, 1992). Für Fische ist Atrazin akut nur mäßig toxisch, allerdings sind negative Langzeitwirkungen wie Fortpflanzungsstörungen und Missbildungen bei geringen Konzentrationen (<20 µg/l) beobachtet worden (Horn & Hanke; 1980; Fischer-Scherl *et al.*, 1991). Auch durch indirekte Effekte des Atrazins (Absterben des Phytoplanktons) können aquatische Ökosysteme nachhaltig gestört werden. Für Bodenorganismen, Nützlinge und den Menschen ist der Wirkstoff vom Bundesumweltamt für weitgehend unbedenklich eingestuft worden, da die akute Giftigkeit gering ist, er sich nicht in Organismen anreichert und damit nicht in die Nahrungskette gelangt (Keck *et al.*, 1991). Allerdings konnten mutagene, teratogene und kanzerogene Effekte bei Langzeitexpositionen nicht völlig ausgeschlossen werden. Diesbezügliche Studien sind zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen gelangt. Zum Beispiel konnten Butler und Hoagland (1989) im Ames-Test keine mutagene Wirkung nachweisen. 1992 zeigten Roloff *et al.* jedoch, dass es bei *in vitro* kultivierten Milzzellen durch Kombination von Atrazin und Linuron zu Chromosomendefekten kommt. Seit 1997 laufen Studien in den USA, um die fruchtschädigende Wirkung von Atrazin in Kombination mit anderen Pestiziden zu überprüfen. In Gegenden der USA, in denen eine Mischung von Atrazin, Cyanazin und Metolachlor als Unkrautvernichter eingesetzt werden, nimmt die Zahl der Fehlgeburten und unterentwickelten Neugeborenen zu (Herbicides Linked to Infant Health (1997); www.ibiblio.org/london/permaculture/mailarchives/sanet2/msg00678.html). Im Frühjahr 2002 bestätigten Hayes *et al.* den Verdacht, dass Atrazin auch als Östrogenanalogon wirken kann, indem er bei männlichen Fröschen eine Geschlechtsumwandlung nachwies, nachdem sie der Chemikalie in Spurenkonzentrationen von 0,01 ppb ausgesetzt worden waren.

Da sich Auswirkungen von Kombinationsbelastungen nur abschätzen lassen und eine Gefahr für die Grundwasserkontamination besteht, hat die EU-Kommission am 10. März 2004 entschieden, dass das Pestizid Atrazin nicht in den Anhang I der Europäischen Pestizid-Zulassungsrichtlinie 91/414 EEC aufgenommen wird. Die Entscheidung wurde am 16. März 2004 im Amtsblatt der EU veröffentlicht. Europaweit mussten somit alle Zulassungen von Pflanzenschutzmitteln, die Atrazin enthalten, bis 10. September 2004 widerrufen werden (bis auf wenige Ausnahmen, die die Anwendung bis 2007 erlaubten). Damit tritt ab 2007 ein europaweites Anwendungsverbot für Atrazin in Kraft. Für die Überwachung stehen neben der klassischen Pestizidanalytik mittels GC, GC/MS oder HPLC (Di Corcia *et al.*, 1997; Koeber *et al.*, 2001; Jeannot *et al.*, 2000) für den Nachweis von Atrazin auch immunochemische Methoden mit einer Reihe von mAK und rAK zur Verfügung (Giersch *et al.*, 1990; Kramer & Hock, 1996b; Rau *et al.*, 2002).

1.1.1.2. F_{ab}-FRAGMENT K411B

Auf Grund der Aktualität des Atrazin-Monitorings und der detaillierten Daten über das F_{ab}-Fragment K411B sowie der geläufigen Testbedingungen wurde dieses Analyt-Antikörperpaar als Referenzpaar für den Test der Vektorenfamilie ausgewählt (Giersch *et al.*, 1993; Lange *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2002a; Kusharyoto, 2002). Bei K411B handelt es sich um ein F_{ab}-Fragment, das in *Escherichia coli* (*E. coli*) funktionell exprimiert werden kann und Atrazin mit einer Affinität von $2,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ bindet. Dieses Fragment wurde aus dem monoklonalen, triazinspezifischen, murinen AK mit der Bezeichnung K4E7 abgeleitet (Giersch, 1993; Kramer & Hock, 1996a; Kramer *et al.*, 2002b). Die Aminosäuresequenz der variablen Domänen von K411B ist in Abbildung 2 dargestellt.

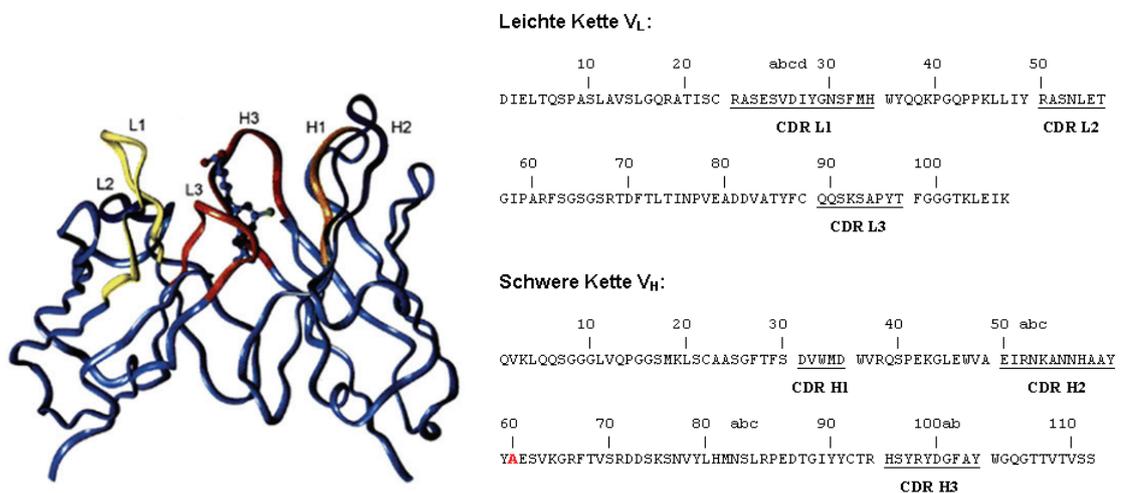


ABBILDUNG 2: STRUKTURMODELL DER VARIABLEN REGIONEN DES F_{ab}-FRAGMENTES K411B

LINKS: BANDDARSTELLUNG MIT DEM HAPTEN ATRAZIN-C₆. DIE CDR-SCHLEIFEN L1-L3 UND H1-H3, DIE DIE BINDUNGSTASCHE BILDEN SIND FARBIG HERVORGEHOBEN; RECHTS: AMINOSÄURESEQUENZ DER VARIABLEN DOMÄNE DER LC UND HC DES K411B. DIE CDR SIND UNTERSTRICHEN UND DIE AMINOSÄURE MIT STILLER MUTATION, DIE DAS F_{ab} K411B VOM F_{ab} K47H UNTERSCHIEDET IST ROT DARGESTELLT (NACH KUSHARYOTO *ET AL.*, 2002)

Sie unterscheidet sich nur durch eine stille Punktmutation in der variablen Domäne der schweren Kette vom publizierten scFv- und F_{ab}- Fragment K47H (AS mit stiller Mutation ist rot). K411B gehört zum Isotyp IgG2b. Die V_L-Domäne gehört zur Subgruppe V-III, während die V_H-Domäne der Subgruppe IIIC zugeschrieben werden kann. Das Kreuzreaktivitätsmuster für das

scFv-Fragment und das F_{ab}-Fragment K411B für verschiedene Triazine ist gleich. Auf Grund seiner hohen Affinität für den Analyten Atrazin, der optimalen Lage des Testmittelpunktes bei 4,3 µg/l im direkten ELISA (Kramer & Hock, 1996a; Piehler, 1997; Kramer *et al.*, 2002b) und der etablierten Protokolle für dessen Expression und Aufreinigung sowie der Standardprotokolle für das Atrazin-Monitoring eignet sich dieses Antigen-Antikörper-Paar für den Test der in dieser Arbeit entwickelten Phagemide.

1.1.2. SULFONAMIDE

Die Substanzklasse der aromatischen Sulfonamide zeichnet sich durch ein breites Anwendungsspektrum aus. Zu ihr gehören Bakteriostatika, Antidiabetika (Susanto & Reinauer, 1997), Herbizide (Li *et al.*, 1996; Rodriguez & Orescan, 1998), Weichmacher u. v. m. Die Sulfonamid-Bakteriostatika wurden 1932 entdeckt, 1935 erschien das erste Handelspräparat (Lerner, 1991). Sie werden bis heute sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt; im Humanbereich vornehmlich bei der Behandlung von Harnwegsentzündungen, von Infektionen der oberen Atemwege und bei Infektionen von HIV-Patienten (Lüllmann & Mohr, 1999). Die Grundstruktur der Sulfonamide ist in Abbildung 3. dargestellt.

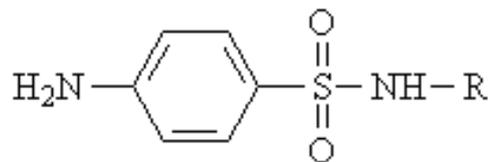


ABBILDUNG 3: GRUNDSTRUKTUR DER AROMATISCHEN SULFONAMIDE

Nach der Entdeckung des Antibiotikums Penicillin und der Tetracycline ist ihre Bedeutung jedoch zurückgegangen. Sie unterliegen keinem Patentschutz und sind einfach herzustellen. Allerdings sind allergische Reaktionen (Rieder *et al.*, 1995; Cerny & Pichler, 1998) und karzinogene Effekte (Yamazaki *et al.*, 1970; Woodward, 1992) bekannt. Ihr Wirkungsspektrum erfasst neben grampositiven und einigen gramnegativen Bakterien auch Chlamydien und Toxoplasmen. Der Wirkmechanismus beruht auf der kompetitiven Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthetase durch Substratkonkurrenz zur p-Aminobenzoesäure, wodurch die Folsäure-Synthese im Mikroorganismus gehemmt wird. Die verschiedenen Sulfonamide unterscheiden sich durch ihre Halbwertszeit (2–60 h) und durch die verschiedenen Anteile, in denen sie im Körper durch Acetylierungen oder Glucuronierungen zu unwirksamen Produkten metabolisiert werden. Die Ausscheidung der unmetabolisierten Sulfonamide (bis zu 80 % der Dosis) erfolgt über die Nieren (Vree, 1987).

Sulfonamidrückstände in tierischen Produkten (Milch, Eier, Fleisch) sind in der EU seit 1999 auf einen Grenzwert von 100 ppb in Milchprodukten und auf 100 µg/kg für sonstige Nahrungsmittel (EU Regulation 508/1999) limitiert. Grund war die Häufung der Verbreitung multipler Resistenzen und allergischen Reaktionen beim Menschen. Die Ausbreitung resistenter Keime erfolgt jedoch nicht nur über den Konsum tierischer Nahrungsmittel, wie z. B. von Holmberg *et al.* (1984) für *Salmonella newport* nachgewiesen wurde, sondern auch über falsche Verschreibungspraktiken, unsachgemäße Anwendung und den Wasserkreislauf (Bergwerff & Schloesser, 2003). So werden Antibiotika in der Landwirtschaft nicht nur zur Behandlung von Infektionen

eingesetzt, sondern auch zur Metaphylaxe (dem vorbeugenden Behandeln des ganzen Bestandes bei Auftreten eines Krankheitsfalles), zur Prophylaxe und um die Gewichtszunahme der Tiere zu erhöhen. Hierfür werden Antibiotika als Leistungsförderer verabreicht. Dadurch ändert sich die Darmflora der Tiere, die somit das Futter effektiver verdauen und hierdurch schneller Gewicht erlangen. Der Einsatz von Leistungsförderern ist in Deutschland seit 2007 aus nach folgendem Grund verboten: 40–90 % der verabreichten Antibiotika werden wieder ausgeschieden und die Metaboliten der Sulfonamidantibiotika verwandeln sich in Gülle praktisch wieder in die ursprüngliche Wirksubstanz zurück (Langhammer, 1989). Diese gelangen über die Gülle in den Boden und in das Grundwasser (Migliore *et al.*, 1995; Jorgensen & Halling-Sorensen, 2000; Boxall *et al.*, 2002; Hamscher *et al.*, 2005) und werden als eine der Ursachen für die gehäuft auftretenden Resistenzen angesehen (Gavalchin & Katz, 1994; Teuber, 2001; Sengeløv *et al.*, 2003; Thiele-Bruhn & Beck, 2005). Als Konsequenz haben die verantwortlichen Behörden Kontrollprogramme etabliert, die die Menge und den Verbleib der Antibiotikarückstände überwachen sollen. In Deutschland werden seit 1989 tierische Lebensmittel nach dem nationalen Rückstandskontrollplan untersucht (Stroh, 2002). Routinemethoden, um den Gehalt an Sulfonamidrückständen in Lebensmittel zu testen, sind:

- der Wachstumsinhibitionstest mit sensitiven Mikroorganismen (Marshall, 2003)
- die klassische Analytik mittels GC, GC-MS oder HPLC (Haller *et al.*, 2002)
- immunchemische Methoden (Sheth *et al.*, 1991; Assil *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Zacco *et al.*, 2007)

Der Nachweis mittels immunchemischen Methoden war bisher vor allem bei Milchprodukten auf Grund von Matrixeffekten problematisch (Sheth *et al.*, 1991; Assil *et al.*, 1992). Zacco *et al.* gelang es 2006 zwei neue Immunosassaymethoden für den Nachweis von Sulfonamiden in Milch zu entwickeln. Die für diese Arbeiten generierten leporiden polyklonalen anti-Sulfonamidantikörper erwiesen sich als äußerst sensitiv und spezifisch und auch in Milchmatrix aktiv (nicht veröffentlichte Daten der AMRG). Da pAK eine begrenzte Ressource darstellen, sollte im Rahmen einer Kooperation in dieser Dissertation versucht werden, die genetische Information für die oben genannten leporiden AK über reverse Transkription und anschließendes *Phage Display* mit dem neu entwickeltem Phagemid-Vektor zu erhalten. Dafür wurden uns die Milzen der immunisierten *New-Zealand-White*-Kaninchen zur Verfügung gestellt (siehe 2.2.1.4, Seite 41).

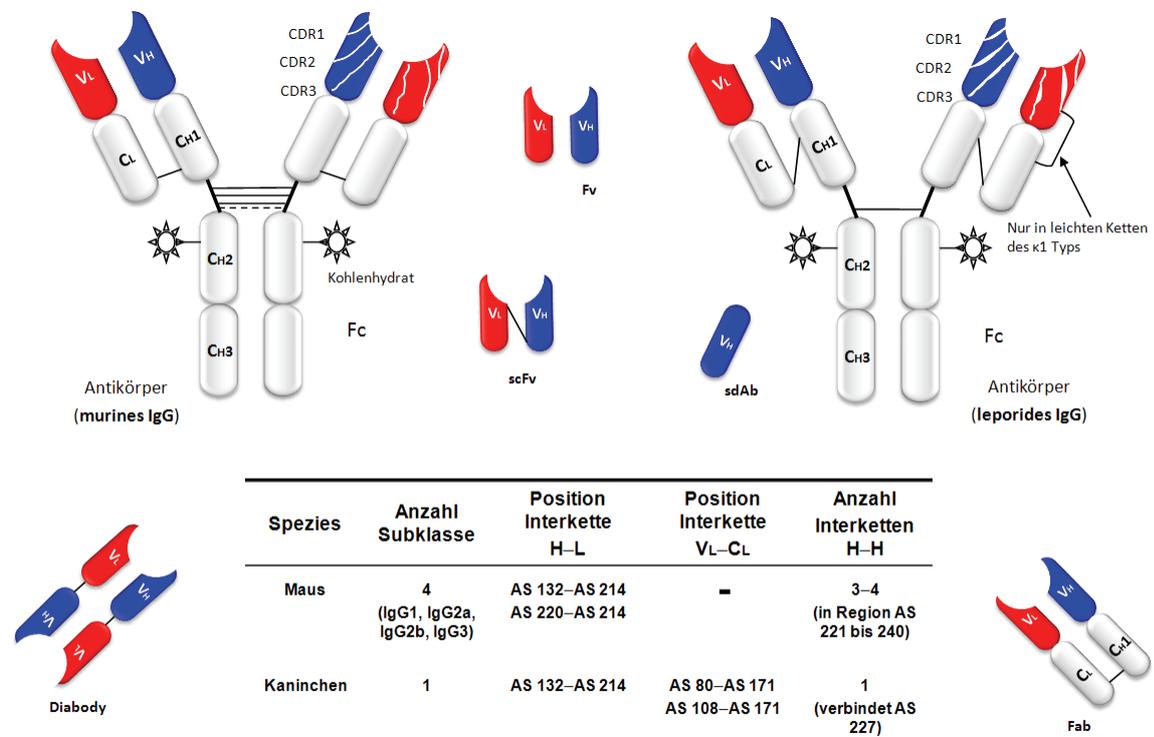
1.2. GRUNDLAGEN FÜR IMMUNCHEMISCHE NACHWEISVERFAHREN

Seit 1988 beschäftigen sich Wissenschaftler auf dem Forschungsgebiet der rekombinanten Antikörpertechnologie mit gentechnologischen Methoden zur *in vitro* Herstellung von Antikörpern. Diese Technologie richtet ihr Augenmerk auf die Generierung von AK-Fragmenten, die nur aus dem antigenbindenden Teil eines Immunglobulins bestehen. Für die Anwendung in Forschung, Diagnostik und Therapie können diese Fragmente sowohl mit heterologen Komponenten wie Enzymen, Toxinen oder fluoreszenten Proteinen als auch mit anderen AK genetisch fusioniert werden (Wells & Lowman, 1992; Reiter & Pastan, 1998; Griep *et al.*, 1999). Die daraus resultierenden neuen Eigenschaften stellen ein erweitertes Anwendungsrepertoire dar. Die Produktion dieser AK-Fragmente und AK-Fusionsproteine erfolgt je nach Themenstellung in prokaryoten oder eukaryotischen Zellsystemen (Hudson & Souriau, 2003). Heutzutage erlauben Selektionsmethoden wie das *Phage Display* die Isolierung von Antikörpern gegen fast

alle Typen von Immunogenen, sogar gegen giftige oder stark pathogene Antigene (Kontermann & Dübel, 2001).

1.2.1. ANTIKÖRPERSTRUKTUR UND ANTIKÖRPERREPERTOIRE

Antikörper sind multifunktionale Glykoproteine, die zur Klasse der Immunglobuline gehören. Sie werden vom Immunsystem der Vertebraten gebildet und nehmen einen wichtigen Platz in den Abwehrreaktionen des Körpers ein. Voraussetzung dafür ist die spezifische Erkennung von Pathogenen und Toxinen. Die Schutzfunktion der AK resultiert unter anderem aus ihrer Fähigkeit körperfremde Substanzen zu erkennen, zu markieren, d.h. Antigen-Antikörper-Komplexe zu bilden, und damit deren Elimination durch Effektormechanismen des Immunsystems einzuleiten. Generell wird jede Fremdschubstanz, die nach Eindringen in den Körper eine spezifische Immunabwehr auslöst, als Antigen bzw. als Immunogen bezeichnet. Innerhalb der Immunglobuline lassen sich beim Menschen und den meisten Säugetieren fünf Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) unterscheiden, wobei IgA und IgG noch einmal in Unterklassen aufgeteilt sind: im murinen System: IgA₁ und IgA₂ bzw. IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃ (Janeway *et al.*, 2002). Im leporiden System gibt es kein IgD und keine Unterteilung für IgG, aber 13 Unterklassen für IgA: IgA₁₋₁₃ (Mage, 1998). Den Unterteilungen in Unterklassen entsprechen auch die Einteilungen und Benennungen der H-Gene. Die leichte Kette ist entweder ein Vertreter der kappa (κ)- oder lambda (λ)-Klasse. Der wichtigste Vertreter im Serum mit einer Konzentration von ca. 16 mg/ml ist IgG, das besonders häufig für immunchemische Fragestellungen verwendet wird. Die Struktur für murine und leporide IgG-Moleküle ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.



Literatur:

Maus: Frangione *et al.*, 1969; Svasti & Milstein, 1970; de Préval *et al.*, 1970; Svasti & Milstein, 1972a; Svasti & Milstein, 1972b; Janeway *et al.*, 2002
 Kaninchen: O'Donnell *et al.*, 1970; Garcia *et al.*, 1982; McCartney-Francis *et al.*, 1984; Mage 1998; Miller *et al.*, 2003

ABBILDUNG 4: STRUKTUR UND DERIVATE VON MURINEN UND LEPORIDEN ANTIKÖRPERN

IgG hat eine molekulare Masse von ca. 150 kDa und besteht aus vier Polypeptidketten, die durch eine Kombination von kovalenten (Disulfidbrücken) und nicht kovalenten Wechselwirkungen (elektrostatische Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals- und hydrophobe Interaktionen) miteinander verbunden sind: aus zwei identischen leichten Ketten (Light, L, jeweils ca. 220 AS lang mit ca. 25 kD) und zwei identischen schweren Aminosäureketten (Heavy, H, jeweils ca. 440 AS lang mit ca. 55 kD) sowie aus zwei Kohlenhydratanteilen. Durch die vorgefundenen Primärstrukturen bezeichnet man die N-terminale Region als variable (V_L) und die C-terminale Region als konstante Domäne (C_L). Die schweren Ketten besitzen ebenfalls eine N-terminale variable Domäne (V_H), der sich jedoch C-Terminal drei konstante Domänen anschließen (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}). Die leichten Ketten sind über ihre C_L -Domänen durch Disulfidbrücken kovalent mit den C_{H1} -Domänen der schweren Ketten verbunden. Weitere Disulfidbrücken in der sogenannten *hinge*-Region zwischen den konstanten Domänen C_{H1} und C_{H2} sorgen für die kovalente Verknüpfung der schweren Ketten. Die Anzahl der Disulfidbrücken und deren Lage variiert zwischen den Säugetierspezies, aber auch zwischen den verschiedenen Subklassen der AK (Janeway *et al.*, 2002). Eine Besonderheit leporider IgGs ist die Verknüpfung der beiden H-Ketten durch nur eine Disulfidbrücke in der *hinge*-Region an Position 227 (Prah *et al.*, 1969; O'Donnell, 1970). Bei murinen Antikörpern befinden sich in der *hinge*-Region zwischen AS 221–240 drei bis vier Disulfidbrücken mit paralleler Ausrichtung (Svasti & Milstein, 1970). Zusätzlich sind alle Domänen eines Immunglobulins der Klasse G, welche jeweils aus ca. 110 Aminosäuren aufgebaut sind, durch zahlreiche hydrophobe Seitenketten und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Auf diese Weise entsteht ein Molekülkomplex mit der charakteristischen Y-förmigen Immunglobulinstruktur (Abbas *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2002).

Abweichend von allen anderen Säugetierspezies haben Kaninchen in ihren leichten Ketten des Ck1-Typs eine zusätzliche Disulfidbrücke. Diese verknüpft die Aminosäure an Position 80 oder 108 der variablen Domäne der leichten Kette mit der Aminosäure 171 an deren konstanten Teil. Daraus resultiert eine höhere Stabilität für leporide AK mit diesen Kettenkombinationen (Lamm & Frangione, 1972; McCartney-Francis *et al.*, 1983; Mage *et al.*, 1987).

Die L- und die H-Kette bilden gemeinsam am aminoterminalen Ende die beiden Antigenbindungsstellen. Hier tritt der AK mit dem Antigen in Wechselwirkung. Innerhalb dieser Region werden vier stärker konservierte Gerüst-Regionen, die *framework regions* (FR), und drei hypervariable Regionen, die CDRs (*complementarity determining regions*), unterschieden (Kabat *et al.*, 1990). Die Aminosäuresequenzen der CDRs bestimmen die Antigenpezifität (Janeway *et al.*, 2002). Die sechs CDRs (H1, H2 und H3 von V_H sowie L1, L2 und L3 von V_L) einer schweren und einer leichten Kette bilden in Form von Peptidschleifen zusammen das Paratop. Als Beispiel ist die Antigenbindungsstelle des F_{ab} -Fragments K411B in Abbildung 2, Seite 13 dargestellt. Die übrigen Bereiche der L- und H-Kette, die konstanten Regionen (C_L und C_{H1-3}), bilden die F_c -Domäne eines AKs und sind bei allen Immunglobulinen einer Klasse identisch aufgebaut. Sie vermitteln die vielfältigen Effektorfunktionen der Immunglobuline im Immunsystem. AK werden von ausdifferenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, in Blut und Lymphe sekretiert, wobei jede B-Zelle AK einer einzigen Spezifität produziert. Die genetische Organisation der Immunglobulingene ist sehr komplex. Die Sequenz ist in mehrere Genblöcke unterteilt, welche für die variable Region der leichten (V-, J-Elemente) bzw. schweren Kette (V-, D- und J-Elemente) und den konstanten Regionen der beiden Ketten kodieren. Bei den Mammalia entsteht die große Vielfalt der AK (10^9 – 10^{11} Varianten) durch somatische

Rekombination der V-, J- und D-Regionen während der lebenslangen B-Zelllymphopoese (Tonegawa, 1983) sowie durch weitere Zufallsmutationen (Insertion von P- und N-Nukleotiden und somatische Hypermutation), die während der klonalen Proliferation eintreten (Wysocki, 1989).

In der Familie der *Leporidae*, zu denen Kaninchen gehören, findet die Differenzierung und Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen nur während einer sehr kurzen Periode der Juvenilentwicklung (bis zur 16. Woche nach der Geburt) statt (Mage, 1998; Knight & Crane 1995; Jasper *et al.*, 2003). Kaninchen haben nur ein C γ -Gen und von den 100–200 V $_H$ -Gensegmenten wird fast ausschließlich der V $_H1$ -Lokus, der den zwölf D $_H$ - und den sechs J $_H$ -Genen am nächsten liegt, verwendet. Von den sechs J $_H$ -Gensegmenten im Genlokus sind nur drei funktionell. Die Antikörperdiversität bei Kaninchen kann demnach nur durch N-Nukleotid-Addition, eine antigenabhängige somatische Hypermutation und Genkonversion während der Immunantwort in dafür spezialisierten Mikromilieus (GALT: *gut associated lymphoid tissue*) gebildet werden (Lanning *et al.*, 2000; Lanning *et al.*, 2002; Mage *et al.*, 2006). Hierin ist eine intrachromosomale Genkonversion zwischen Sequenzblöcken inaktiver V $_H$ -Pseudogene in die stromaufwärts gelegenen funktionellen, umorganisierten V $_H$ -Gene involviert. Diese antigenspezifische Reifung wird auch als Grund für die hohen Affinitäten leporider AK gesehen. Häufig findet man in dieser Spezies Gleichgewichtskonstanten (KD) von bis zu 10⁻¹² M. Die KD-Werte von murinen Antikörpern liegen im Vergleich zwischen 10⁻⁷ bis 10⁻¹¹ M (Gruber, 2007). Auf ähnliche Weise wie die schwere Kette, wird die Vielzahl der unterschiedlichen leichten Ketten aus je einem funktionellen V-, J- und C-Segment hergestellt. Hierbei kommt eine weitere Besonderheit des leporiden Immunsystems zum tragen. Bei Kaninchen ist der gesamte C $_k$ -Lokus dupliziert. C $_{k1}$ ist der am häufigsten exprimierte Leichtkettentyp. Er besteht aus einer unbekannt Anzahl von V $_k$ -, sechs J $_k$ -Gensegmenten (nur eines ist funktionell) und einem C $_{k1}$ -Segment. Der C $_{k2}$ -Lokus ist homolog aufgebaut, besitzt aber drei funktionelle J $_k$ -Genabschnitte. Der C $_{\lambda}$ -Lokus besitzt neben den V $_{\lambda}$ -Gensegmenten, zwei J $_{\lambda}$ - und zwei C $_{\lambda}$ -Genabschnitte. Bis auf den Stamm *Basilea* scheinen Kaninchen nur selten leichte Ketten des λ -Types zu verwenden (Garcia *et al.*, 1982). Das Verhältnis von κ : λ -Kettenexpressionen beträgt wie bei der Maus 20:1.

1.2.2. HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN UND ANTIKÖRPERFRAGMENTEN

Die älteste Methode zur Herstellung von Antikörpern definierter Spezifität ist die Immunisierung von Versuchstieren. Hierzu wird das Tier über mehrere Wochen hinweg mit dem jeweiligen Antigen immunisiert. Die meisten Antigene bestehen aus vielen verschiedenen antigenen Determinanten; durch die Behandlung entwickelt das Immunsystem spezifische Antikörper gegen einige dieser Epitope. Die Gesamtheit aller Antikörper im Serum des Versuchstieres gegen das Antigen wird als polyklonal bezeichnet. 1975 entwickelten Köhler und Milstein die Methode der Hybridomtechnik. Mit ihr war es zum ersten Mal durch die Fusion von B-Lymphozyten mit immortalen Myelomzellen möglich, einen Antikörper gesuchter Spezifität (mAK) in größerem Maßstab und über einen längeren Zeitraum herzustellen. Die Übertragung der Hybridomtechnik von murinen auf leporide Zellen ist schwierig und eine erfolgreiche Standardisierung konnte bis jetzt nur von der Arbeitsgruppe um Spieker-Pohlet *et al.* (1995) realisiert werden.

Aus Antikörpern lassen sich durch proteolytische Spaltung sowie molekularbiologische Methoden (Winter & Milstein, 1991) verschiedene Derivate der Vollängen-AK herstellen (Abbildung 4). Papain schneidet den AK im Bereich der Gelenkregion in drei Teile, in zwei identische F $_{ab}$ -

Fragmente mit je einer Antigenbindungsstelle und in ein kristallisierbares F_c -Fragment (*fragment crystallizing*). Durch Pepsin entsteht ein Homodimer, das $F_{(ab)2}$, welches sich auf Grund seiner bivalenten Bindungseigenschaften wie ein vollständiger AK verhält (Abbas *et al.*, 2000). Noch kleinere Fragmente, welche nur in der V-Region der L- und H-Kette bestehen, heißen F_v -Fragmente (*fragment variable*). Sie entstehen durch freie Assoziation und sind nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Mit rekombinanten Methoden (in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen) können die variablen Domänen der schweren und leichten Kette durch einen Peptidlinker zu einer Polypeptidkette verknüpft werden (Bird *et al.*, 1988). Dadurch erhält man ein monovalentes scFv-Fragment mit der Spezifität des Volllängen-Antikörpers (Skerra, 1993; Bregegere *et al.*, 1997). Diese können durch Dimerisation zweier scFv-Polypeptidketten zum Diabody (ein scFv Homodimer) oder zum bispezifischen scFv (biscFv), aus zwei scFv unterschiedlicher Antigenespezifität, Bivalenz erlangen (Carter *et al.*, 1992). Das kleinste Antikörperderivat, das Antigenbindung besitzt, ist der sdAb (*single domain antibody*), der ausschließlich aus der V_H -Domäne besteht (Ward *et al.*, 1989; Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

1.2.2.1. PHAGE DISPLAY

Für die Anwendung in Forschung, Diagnostik und Therapie kann der Einsatz von scFv-, F_{ab} - oder $F_{(ab)2}$ -Fragmenten an Stelle kompletter Antikörper von Vorteil sein. Durch die rekombinante Antikörpertechnologie und das *antibody engineering* lassen sich diese Fragmente *in vitro* sowohl mit heterologen Komponenten wie Enzymen oder Toxinen als auch mit anderen Antikörpern genetisch fusionieren (Wels *et al.*, 1992; Reiter *et al.*, 1996). Sie bieten somit ein weites Anwendungsspektrum. Die Produktion kann je nach Themenstellung in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellsystemen (Hudson & Souriau, 2003) erfolgen. Selektionsmethoden wie das *Phage Display* (Smith, 1985; Skerra & Plückthun, 1988; McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Rader & Barbas, 1997; Hoogenboom *et al.*, 1998), das *Ribosomen-Display* (Hanes & Plückthun, 1997), das *Bacterial Surface Display* (Stahl & Uhlén, 1997) und das *Hefe-Display* (Boder & Wittrup, 1997; Kieke *et al.*, 1997) erlauben die Isolierung von Antikörpern gegen fast alle Typen von Antigenen, sogar gegen giftige oder stark pathogene Antigene (Kontermann & Dübel, 2001).

Von allen *Display*-Systemen ist die *Phage Display*-Technologie wegen ihrer kontrollierbaren und gut etablierten Handhabung am weitesten verbreitet. Diese Methode beinhaltet die Präsentation eines Peptid- oder Proteinpools als Fusion mit dem pIII- oder pVIII-Hüllprotein filamentöser Bakteriophagen (f1, fd, M13) und die Selektion des gesuchten Peptids durch die Bildung einer Protein-Protein-Bindung – im folgenden *Panning* genannt. Voraussetzung ist, dass diese Protein-Protein-Bindung stark genug ist, den stäbchenförmigen, 900 nm langen und sechs nm dicken Phagen zu halten. Er besteht aus einer Proteinhelix mit ungefähr 2800 Kopien des pVIII-Hüllproteins, den distalen pVII und pIX sowie den proximalen pIII und pVI *minor coat proteins*. Ein Antigen-Antikörper-Komplex kann die obigen Voraussetzungen erfüllen. Die Vermehrung der selektionierten Phagen erfolgt durch die Infektion von *E. coli* und durch die Bindung mindestens einer intakten Kopie des pIII-Proteins an deren f-Pili. Die Replikation der Phagen-DNS geschieht in drei Phasen. Nach dem Eindringen des einzelsträngigen Phagengenoms in die Bakterienzelle erfolgt die Synthese eines Komplementärstranges, die zur Bildung der replikativen, doppelsträngigen Phagen-DNS führt. Diese wird im Cytoplasma des Wirtsbakteriums repliziert und dient als Transkriptionsmatrize für die Synthese der Phagenproteine. In der letzten Phase erfolgt der Zusammenbau des Phagenpartikels in der Bakterienmembran,

wobei er parallel zum Verpackungsprozess durch die Bakterienmembran ausgeschleust wird. Bei der Replikation filamentöser Phagen werden die Wirtsbakterien nicht lysiert, aber ihre Teilungsrate wird vermindert. Der filamentöse Phagen M13 toleriert eine durch den Einbau zusätzlicher Hüllproteine verursachte Vergrößerung der Phagenhülle und dadurch auch eine Verpackung eines vergrößerten Phagengenoms. (Barbas *et al.*, 2001). Außerdem können in das Hüllprotein pIII fremde Sequenzen integriert werden, ohne dessen Funktion stark zu beeinträchtigen (Smith, 1985). Diese beiden Eigenschaften werden beim *Phage Display* rekombinanter AK-Fragmente genutzt.

Die zurzeit am häufigsten eingesetzte Variante ist das monovalente *Phage Display* (Abbildung 5). Dabei kommen Phagemidvektoren zum Einsatz, die ein Verpackungssignal der filamentösen Phagen besitzen und für das zu präsentierende AK-Fragment-pIII-Fusionsprotein kodieren (Plückthun & Skerra, 1989; Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991). Zusätzlich wird ein Helferphage verwendet, der alle anderen Funktionen eines filamentösen Phagen besitzt, dessen Genom aber eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Verpackungsrate hat. Bei der Infektion dieses Helferphagens wird die Phagemid-DNA bevorzugt in die Phagenpartikel eingebaut. Die entstehenden Phagenpartikel tragen neben dem Wildtyp-pIII-Protein auch das AK-Fragment-pIII-Fusionsprotein (ca. 10 % der Phagen) auf ihrer Oberfläche (Lowman *et al.*, 1991; Bradbury *et al.*, 1993; Kretzschmar *et al.*, 1995) und können für ein *Panning* gegen ein immobilisiertes Antigen zur Anreicherung spezifisch bindender Phagenantikörper eingesetzt werden, um das entsprechende, für das AK-Fragment kodierende Gen zu selektieren (Abbildung 5, Seite 21). Zur Herstellung eines AK-Genrepertoires kann man auf immunadaptierte, synthetische, semi-synthetische oder naive Quellen zurückgreifen, wobei man in der Regel Milzzell-Gesamt-RNS oder -mRNS aus immunisierten Tieren verwendet, da ruhende B-Zellen etwa 100, aktive Plasmazellen jedoch bis zu 300 000 Kopien einer Ig-mRNS produzieren. Dadurch müssen die hergestellten Genbibliotheken nicht mehr eine Komplexität von 10^9 – 10^{11} Varianten aufweisen. Spezifische AK können somit auch aus Bibliotheken mit einer Größe von 10^6 – 10^8 selektioniert werden. Die größten Vorteile des *Phage Displays* liegen in der Ko-Selektion des AK-Fragmentes und seiner Nukleotidsequenz, welches die Charakterisierung und Klonierung des Gens enorm vereinfacht ebenso wie die Generierung von Antikörpern gegen insbesondere Autoantigene, Toxine und schwach immunogene Substanzen. Durch Neukombinationen und mittels molekularer Evolution können die Affinitätskonstanten der AK-Fragmente gesteigert werden bzw. murine oder leporide scFv durch den gerichteten Austausch von variablen Domänen (Marks *et al.*, 1992) oder der FR humanisiert (Baca *et al.*, 1997; Rader *et al.*, 1998) werden. Dies ist vor allem bei mAK essentiell, die zur Humantherapie eingesetzt werden sollen, um die sogenannte HAMA-Reaktion (*human anti mouse antibody response*) zu minimieren (Jones *et al.*, 1986; Jung & Plückthun, 1997). Durch den im Rahmen des *Phage Displays* entwickelten Primersatz zur Amplifikation der Immunglobulinsequenzen können auch monoklonale Antikörper mit geringem Aufwand in die entsprechenden scFv- oder F_{ab}-Fragmente umgewandelt werden. Diese Methode bezeichnet man daher auch als *Hybridoma rescue* (Krebber *et al.*, 1997).

Zur Selektion leporider AK in der Umweltanalytik wird die *Phage Display*-Methode bisher nicht angewendet. Ridder *et al.* (1995), Foti *et al.* (1998), Rader *et al.* (2000) und Hofer *et al.* (2006) konnten unter Einsatz des Phagemids pComb (Barbas *et al.*, 2001) erfolgreich Kaninchen-F_{ab}-Fragmente gegen verschiedene in der Humantherapie interessante Zielmoleküle selektionieren.

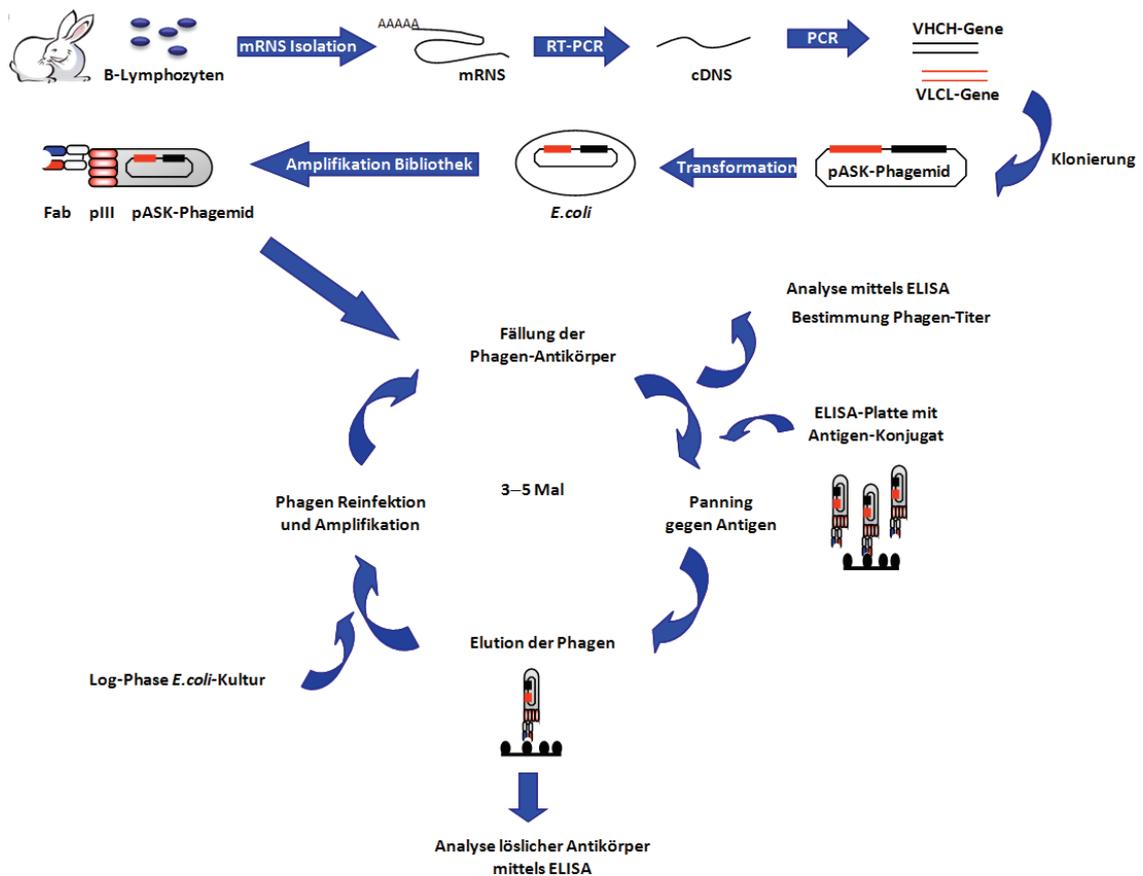


ABBILDUNG 5: SCHEMA ZUR HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERBIBLIOTHEKEN UND DEREN *PANNING* AUF EIN ANTIAGEN. AUS EINEM IMMUNISIERTEN KANINCHEN WIRD DIE MRNS AUS ISOLATIERTEN B-LYMPHOZYTEN GEWONNEN. IM ANSCHLUSS ERFOLGT DIE AMPLIFIKATION DER DNS, DIE FÜR MILLIONEN VON VARIANTEN AN F_{AB}-FRAGMENTEN KODIERT, ÜBER REVERSE TRANSKRIPTION UND NACHFOLGENDE PCR. DIE AMPLIFIZIERTEN GENE WERDEN IN EIN PASK-PHAGEMID KLONIERT UND IN *E. COLI* TRANSFORMIERT. AUS DIESEM REPERTOIRE, KÖNNEN PHAGEN ISOLIERT WERDEN, DIE SPEZIFISCHE F_{AB} AUF IHRER OBERFLÄCHE PRÄSENTIEREN. DIES GESCHIEHT DURCH REPETITIVE SELEKTIONSZYKLEN MIT DEM ANTIAGEN. DIESE BEIHALTEN DIE SPEZIFISCHE BINDUNG AN DAS IMMOBILISIERTE ANTIAGEN, WASCHSCHRITTE, ELUTION DER SELEKTIERTEN PHAGEN UND DEREN AMPLIFIKATION.

1.3. ZIELSETZUNG UND AUFBAU DER ARBEIT

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Einsatzgebiete der rekombinanten Antikörper-technologie durch die Einbindung von den Besonderheiten des Kaninchen-Immunsystems für die Umweltanalytik weiter auszubauen. Für die Umweltanalytik werden die Vorzüge von Kaninchen-Antikörpern bis jetzt fast nur in Form von polyklonalen Seren genutzt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein verbessertes *E. coli Phage Display*-System für die Umweltanalytik entwickelt.

1.3.1. ANFORDERUNGEN AN DAS NEUE *PHAGE DISPLAY*-SYSTEM

Um für die Umweltanalytik geeignete Phagemide für die Selektion von murinen und leporiden F_{ab}-Fragmenten zu entwickeln, wurden folgende Ansprüche an das neue System formuliert: Eine wichtige Voraussetzung war, die Phagemide dem derzeitigen Stand der Technik entsprechend zu entwickeln und so die Möglichkeit zu schaffen, das System in verschiedenen etablierten Selektionsmethoden einzusetzen. Das neue System sollte dem Benutzer die Wahl zwischen murinen und leporiden Antikörpergenen lassen. Damit ein Austausch von AK-Fragmenten oder Affinitätsanhängseln und somit die Anwendung von verschiedenen Analyten und Aufreinigungsarten erfolgen kann, sollte die *Cloning Site* als Kassettensystem gestaltet werden.

Zur effizienten Durchmusterung von Bibliotheken auf F_{ab}-Fragmente mit neuen Liganden-Bindungseigenschaften sollte sowohl das Verfahren des monovalenten als auch des polyvalenten *Phage Displays* (Lowman *et al.*, 1991; Rondot *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2003) angewendet werden können. Zu diesem Zweck wurde ein Phagemid im 3+3-Typ mit dem vollständigen viralen Hüllprotein III als Fusionspartner angestrebt. Da das vollständige pIII ab einem bestimmten Expressionslevel einen toxischen Effekt auf die Wirtszelle ausübt, und zudem die N-terminale und die mittlere Domäne eine inhibitorische Wirkung auf die Superinfektion durch Helferphagen ausüben (Boeke *et al.*, 1982), wurde für den neuen Vektor das streng regulierbare *tet*-Promotor/Operator-System (Skerra, 1994b) ausgewählt. Dieses System wurde bereits erfolgreich für die Expressionskontrolle des Phagemids pGZ1 eingesetzt (Zahn *et al.*, 1999). Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen bei der Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* haben gezeigt, dass das Wachstum von Kulturen zur Produktion plasmidkodierter Fremdproteine häufig mit einem Plasmidverlust der Zellen einhergeht. Dies gilt insbesondere bei der Verwendung des Antibiotikums Ampicillin zur Selektion (Fiedler & Skerra, 2001). Die Verwendung von Phagemiden, die das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) konstitutiv exprimieren, sollte den Plasmidverlust in der Selektionskultur gering halten und so, verglichen mit der Verwendung von Ampicillin, zu einer erhöhten Ausbeute an rekombinanten Phagen führen. Auch wurde die Möglichkeit einer alternativen Produktion von löslichen F_{ab}-Fragmenten und Fusionsproteinen als vorteilhaft erachtet. Aus diesem Grund wurde ein *Amber-Stopp-Codon* zwischen HC und dem GenIII vorgesehen, dass je nach verwendetem Bakterienstamm die alternative Expression ermöglicht. Zusammenfassend wurden folgende Bedingungen für das neue *Display*-System formuliert:

- Kassettensystem der *Cloning Site* zum leichten Austausch von AK-Genen und/oder Affinitätsanhängseln
- Dicistronischer Aufbau der *Cloning Site* mit zwei verschiedenen Signalsequenzen
- Verwendung des vollständigen viralen Hüllprotein pIII als Fusionspartner
- Verwendung des streng regulierbaren *tet*-Promotor/Operator-Systems
- Verwendung von Chloramphenicol-Acetyltransferase als Resistenzmarker, um den Selektionsdruck zu erhöhen und den Vektorverlust zu verringern
- Insertion eines *Amber-Stopp-Codons* zwischen Strukturgen und GenIII zur alternativen Produktion von löslichen F_{ab}-Fragmenten und Fusionsproteinen

1.3.2. EIGENSCHAFTEN DES AUSGANGSVEKTOR PASK85-K411B

Als Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit diente der Expressionsvektor pASK85-K411B (Kramer *et al.*, 2002a). Dieser entstand durch Subklonierung der variablen Regionen des atrazinspezifischen scfv-Fragments K411B in den Expressionvektor pASK85 (Skerra, 1999a & b). pASK85 enthält konstante Domänen des IgG1 κ -Typs der Maus sowie ein His-Affinitätsanhängsel und gestattet so die Expression und Reingigung von murinen F_{ab}-Fragmenten. Der Vektor wurde abgeleitet von dem generischen Expressionsplasmid pASK75, welches durch den erstmaligen Einsatz des *TetA*-Promotor/Operator Systems eine besonders stringente Regulation der Genexpression erlaubt (Skerra, 1994b). Das aus der Subklonierung resultierende murine F_{ab}-Fragment K411B konnte in pASK85 erfolgreich gentechnisch produziert werden. Auch die Eignung des pASK85 für den Einsatz im *Phage Display* konnte 1999 von Zahn *et al.* gezeigt werden. Durch die Verwendung des pASK85-K411B konnten schon im Vorfeld fünf der oben geforderten Eigenschaften abgedeckt werden.

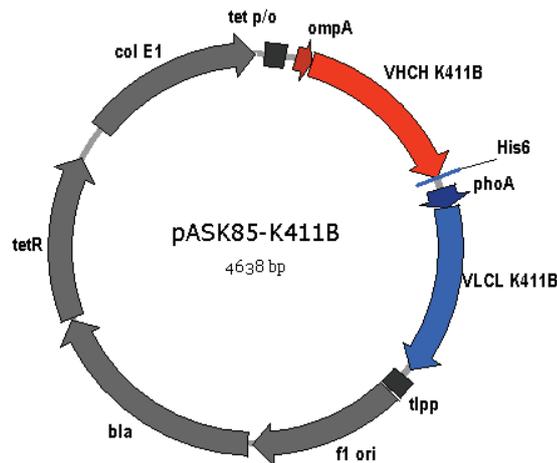


ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VEKTORS PASK85-K411B

DER VEKTOR KODIERT UNTER DER TRANSKRIPTIONSKONTROLLE DES $TET^{p/o}$ FÜR ZWEI FUSIONSPROTEINE. EINES BESTEHEND AUS DER BAKTERIELLEN OMPA-SIGNALSEQUENZ, DER HC DES K411B UND DEM HIS₆-TAG. DIE ANDERE BESTEHEND AUS DER BAKTERIELLEN PHOA-SIGNALSEQUENZ UND DER LC DES K411B. DIE TRANSKRIPTIONSEINHEIT WIRD DURCH DEN LIPOPROTEIN-TRANSKRIPTIONSTERMINATOR (TLPP) ABGESCHLOSSEN. DIE ÜBRIGEN ABKÜRZUNGEN F1 ORI, BLA, TETR UND COL E1 BEZEICHNEN, DIE INTERGENISCHE REGION DES PHAGEN F1, DAS β-LACTAMASEGEN, DAS STRUKTURGEN DES TETRACYCLIN-REPRESSORS SOWIE DEN REPLIKATIONSURSPRUNG

Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des TetA-Promotor/Operators ($tet^{p/o}$) für zwei Fusionsproteine. Ein Protein setzt sich zusammen aus der bakteriellen ompA-Signalsequenz, der schweren Kette des K411B und einem His₆-tag-Affinitätsanhängsel (Hochuli *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1991a). Das andere besteht aus einer bakteriellen phoA-Signalsequenz und der leichten Kette des K411B. Diese Transkriptionseinheit wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}) beendet. Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression des tet-Repressor-Gens ($tetR$) gewährleistet, welches als zweites Element in einem dicistronischen Operon hinter dem Gen der β-Lactamase (bla , Ampicillinresistenz) angeordnet ist. ColE1 und f1 ori bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1. Dadurch stehen bei allen in dieser Arbeit konstruierten Phagemidvektoren die Strukturgene für die leichten und schweren Immunglobulinketten unter der Kontrolle des tet-Promotor/Operator-Systems. Mit Anhydrotetracyclin wird die Genexpression beider Immunglobulinketten induziert, wobei beide Polypeptidketten separat in den periplasmatischen Raum sekretiert werden. Für die Sekretion liegen die Strukturgene für die beiden Ketten an ihren 5'-Enden mit den bakteriellen Signalsequenzen ompA, phoA, oder rbp (Movva *et al.*, 1980; Kikuchi *et al.*, 1981; Groarke *et al.*, 1983) fusioniert vor. Unter den oxidativen Bedingungen dieses Zellkompartiments können sich die Disulfidbindungen der rekombinanten F_{ab}-Fragmente und F_{ab}-pIII-Fusionsproteine ausbilden. Die Präsentation des F_{ab}-Fragments auf der Oberfläche von Phagenpartikeln gelingt, indem in den Phagemiden, welche die intergenische Region des Phagen f1 besitzen, das Fusionsprotein aus bakteriellem Signalpeptid, HC oder LC und dem Phagenhüllprotein pIII in *E. coli* synthetisiert wird. Durch die bakterielle ompA-Signalsequenz wird die Translokation des N-terminalen Segmentes des Fusionsproteins in das bakterielle Periplasma vermittelt (Movva *et al.*, 1980). Dabei durchspannt das C-terminale Fragment des Phagenhüllproteins die innere *E. coli*-Membran, gelangt zusammen mit den nativen Phagenproteinen zur Assemblierungsstelle für die naszierenden Phagenpartikel und wird je nach Display-Format teilweise oder ausschließlich in das Phagemid eingebaut (Barbas *et al.*, 2001). Zwischen den kodierenden

Sequenzen des Fusionsproteins aus bakterieller Signalsequenz, der HC oder LC, dem His₆-Affinitätsanhängsel und dem Phagenhüllprotein pIII ist ein *Amber-Stopp-Codon* zwischen dem His₆-tag und dem Phagenhüllprotein inseriert. Das *Amber-Stopp-Codon* innerhalb des Fusionsproteins dient dem Zweck der alternativen Produktion sowohl der löslichen F_{ab}-Varianten als auch des Fusionsproteins unter Verwendung eines Amber-Suppressorstamms wie *E. coli* TG1 F⁺. Die Fusionierung eines Affinitätsanhängsels mit einem der Strukturgene sollte die einfache Reinigung des Proteins und dessen immunologischen Nachweis erlauben (Evan *et al.*, 1985; Hopp *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1991a; Schmidt & Skerra 1993). Die Transkriptionseinheiten werden jeweils durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator beendet.

1.3.3. VORGEHENSWEISE

Um die oben aufgelisteten Bedingungen für ein neues Phagen Display System umzusetzen, wurde der Expressionsvektor pASK85-K411B durch Insertion des GenIII, das für das Phagenhüllprotein pIII kodiert, in das Phagemid pASK85-p3-K411B überführt und dessen Funktionalität getestet. Mittels Datenbank-Recherchen wurden dann Primer für die Amplifikation leporider Antikörpergene und eine passende *Cloning Site* entworfen, um ein für Kaninchen geeignetes System zu erhalten. Hierbei wurde beachtet, dass in der Umweltanalytik neben IgG auch andere Antikörperklassen für den Einsatz in verschiedenen Matrizes von Interesse sein können. Weiterhin sollten die verwendeten Schnittstellen möglichst selten in leporiden Genen vorkommen und die Peptidase-Schnittstellen der Leadersequenzen nicht verändern. Die *Cloning Site* wurde als Kassettensystem derartig gestaltet, dass ein Austausch von AK-Fragmenten oder Affinitätsanhängseln und somit die Anwendung von verschiedenen Analyten und Reinigungsarten erfolgen kann. Dazu wurde im weiteren Vorgehen die Kassette des F_{ab} K411B im pASK85-p3-K411B mit der neuen *Cloning Site* (R_{ab}CS) ersetzt (pASK85R_{ab}-p3). Um die Vorteile verschiedener Resistenzmarker überprüfen zu können, wurde die Ampicillin-Resistenz gegen einen Chloramphenicol-Marker ausgetauscht. Dies geschah über einen Austausch der Vektorrücken von pASK85R_{ab}-p3 und pASK85-p3-K411B mit dem Vektorrücken von pASK111 (pASK111R_{ab}-p3 und pASK115-p3-K411B). Im Anschluss wurden naive leporide leichte und schwere Ketten als Platzhalter in die R_{ab}CS integriert und diese mit diagnostischen Schnittstellen markiert (pASK111R_{ab}-p3-WR-Reihe). Um die Funktionalität testen zu können, wurde das F_{ab}-Fragment K411B wieder in die neue *Cloning Site* des Phagemids pASK111R_{ab}-p3 inseriert (pASK111R_{ab}-p3-K411B). Die drei entstandenen Phagemide pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B wurden auf Wachstum, Expression des F_{ab}-Fragments sowie des F_{ab}-pIII-Fusionsproteins und Höhe der Phagentiter verglichen. Zuletzt sollte überprüft werden, ob das neue Konstrukt den Eigenheiten leporider Antikörpergene Rechnung trägt und auch für *Phage Display* mit leporiden Genen verwendet werden kann. Dies beinhaltete die Konstruktion eines sulfonamid-spezifischen Kaninchen F_{ab}-Fragments mittels Generierung einer selektiven Antikörper-Bibliothek mit den V_HC_H- und V_LC_L-Genen immunisierter *New-Zealand-White*-Kaninchen (AMR-Gruppe) und Isolation zweier affiner Klone gegen Sulfonamide über *Phage Display*. Die selektierten Klone wurden sequenziert und auf Verdrängung von Sulfonamiden im kompetitiven ELISA untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. REAGENZIEN

Acrylamid 30 %	Roth, 3029.1
Agarose NEE0	Roth, 2267.1
Agarose TopVision™ LE GQ	Fermentas, R0491
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, 9592.3
Ampicillin	Roth, K029.2
Anhydrotetracyclin	Acros, 233131000
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	Sigma, A5754
Bacto Agar	Roth, 5210.3
Chloramphenicol	Roth, 3886.1
Concanavalin A	Roth, 7246.1
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, D- 4254
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, D-8779
dNTPs	MBI Fermentas, R0193
di-Natrimhydrogenphosphat-dodecahydrat	Merck, 1.06579
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, E-5134
Eisessig	Sigma, A-6283
Ethanol abs.	Serva, 11093
Ethidiumbromid	Sigma, E-8751
Formaldehyd 37 %	Fluka, 47629
D(+)-Glucose	Sigma, G-5400
Glutamin	Sigma, G-7513
Glycin	Roth, 3908.3
Glycerol	Sigma, G-5516
Harnstoff	Roth, 3941.3
Hühnerovalbumin OVA)	Sigma, A-5378
Imidazol	Merck, 1.04716
Isopropanol	Sigma, I-9516
Calciumchlorid	Sigma, C-3306
Kanamycin	ICN, 70560-51-9
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth, X968.1
LB-Agar (Luria/Miller)	Roth, X965.1
Magermilchpulver	Roth, T145.3
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Sigma, M-0250
Magnesiumsulfat	Sigma, M-7506
2-Mercaptoethanol	Sigma, M-6250
Natriumacetat	Sigma, S-8625
Natriumazid	Fluka, 71289
Natriumcarbonat, wasserfrei	Fluka, 71355
Natriumchlorid	Merck, 1.06404
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, L-4509

Natriumhydrogencarbonat	Merck, 1.06329
Natriumhydroxid	Merck, 1.06498
ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck, 1.00552
Pfeilschwanzkrebshämocyanin (HCH)	Sigma, H1757
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma, P-5413
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, A-7906
RNase Zap	Ambion, 9780
Salzsäure min. 37 %	Riedel-de Haen, 30721
Schwefelsäure 95-97 %	Merck, 1.00807
SOB-Medium	Roth, A327.1
TEMED	Roth, 2367.3
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma, T-2885
Trichloressigsäure	Roth, 8789.2
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, T-8524
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Serva, 37470
Wasser, 18 Megohm (DNase-+ RNase-frei)	Eppendorf, 32 006.302
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, 1.08597
2YT	Roth, X966.1
2YT Agar	Roth, X967.1

Alle nicht aufgeführten Chemikalien besaßen ebenfalls Analyse-Qualität und wurden bei den Firmen „Roth“ oder „Sigma“ bezogen.

2.1.2. ANTIKÖRPER

Anti-His-Tag-IgG	Amersham, 27-9412-01
Anti-His-Tag-HRP-Konjugat	Invitrogen, 46-0707
Anti-M13-HRP-Konjugat	Amersham, 27-9421-01
Maus-anti-His ₆ -POD-Konjugat	Roche, 11965085001
Maus-anti-pIII	MoBiTec, PSKAN3
Kaninchen F _{ab} -anti-Goat (F _c -spezifisch)	Dianova, 305-007-003
Kaninchen-anti-Sulfacetamid (polyklonales Serum #155)	AMR, Barcelona
Kaninchen-anti-Sulfapyridin (polyklonales Serum #154)	AMR, Barcelona
Ziege-anti-Kaninchen-HRP-Konjugat (H/L-spezifisch)	Promega, W4011
Ziege-anti-Kaninchen-HRP- Konjugat (F _{ab2} -spezifisch)	Dianova, 111-035-006
Ziege-anti-Maus-POD-Konjugat (H/L-spezifisch)	Sigma, A-8924
Ziege-anti-Maus-POD-Konjugat (F _c -spezifisch)	Sigma, A-0186
Ziege-anti-Maus (F _{ab} -spezifisch)	Sigma, M-4155

2.1.3. PROBENPUFFER, DNS- UND PROTEINMARKER

2.1.3.1. DNS-MARKER

GeneRuler™ Express DNA Ladder	Fermentas, SM 1553
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, SM0313
Gene Ruler™ 100 bp plus DNA Ladder	Fermentas, SM0324
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, SM0243
PCR-Marker	NEB, N3234L

2.1.3.2. MOLEKULARGEWICHTSMARKER

Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, SM0441
Precision Plus Protein All Blue Standard	BioRad, 161-0373

2.1.3.3. PROBENPUFFER

Loading Buffer Pack	Fermentas, R0891
6x Mass Loading Dye Solution	Fermentas, R0621
6x Orange Loading Dye	Fermentas, R0631
PageBlue™ Protein Staining Solution	Fermentas, R0571

2.1.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN

2.1.4.1. ENZYME

Benzonase	Sigma, E1014
<i>Pfu</i> Polymerase Ultra	Stratagene, 200523
RNAse Inhibitor	Roche, 1483188
<i>Taq</i> DNA-Polymerase E	Genaxxon, M3043.0250
<i>Taq</i> DNA-Polymerase S	Genaxxon, M3001.0250
Mol <i>Taq</i>	Molzylm, P-010-500
native <i>Taq</i> Polymerase	Fermentas, EP0281
recombinante <i>Taq</i> Polymerase	Fermentas, EP0401
T4 DNA-Ligase	NEB, M0202L

Alle Restriktionsenzyme wurden von „New England BioLabs“ bezogen. Alle Enzyme wurden mit den vom Hersteller gelieferten Puffern und Zusätzen verwendet.

2.1.4.2. KIT-SYSTEME

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, 12328-032
mRNA Isolation Kit	Roche, 1741985
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, 28104
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen, 27104
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, 12143
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, 28704
QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, 200523
Quick Ligation Kit	NEB, M2200S
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, 1635379
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Kit	Fermentas, K1631
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, 1483188

2.1.5. VEKTOREN UND BAKTERIENSTÄMME

2.1.5.1. VEKTOREN

EXPRESSIONSVEKTOREN

pASK85	Prof. Dr. A. Skerra ¹
pASK111	Prof. Dr. A. Skerra
pASK85-K411B	PD. Dr. Karl Kramer ²
pASK85-K411B.1	Carolin Schüller ²
pASK85-K411B.2	Carolin Schüller
pASK85-K411B.3	Antje Pegel ² , Carolin Schüller

KLONIERUNGSVEKTOREN

pUC18	Stratagene
pUC57-R _{ab} CS	Genescript, USA

PHAGEMIDVEKTOREN

pCANTAB 5E	Amersham Pharmacia
pASK85-p3-K411B	Carolin Schüller
pASK85R _{ab} -p3	Carolin Schüller, Julia Wiebe ²
pASK111R _{ab} -p3	Carolin Schüller, Julia Wiebe
pASK111R _{ab} -p3-WR _(LC)	Julia Wiebe
pASK111R _{ab} -p3-WR2/5/13	Julia Wiebe
pASK111R _{ab} -p3-WR2/5/13.1,	Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-WR2/5/13.12	Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-K411B	Antje Pegel, Carolin Schüller
pASK115-p3-K411B	Carolin Schüller

BIBLIOTHEKEN

LibSARb	Carolin Schüller
LibSA _{HC} Rb	Carolin Schüller
LibSA _{LC} Rb	Carolin Schüller

SELEKTIERTE F_{Ab}-FRAGMENTE

F _{ab} SA2 23	Carolin Schüller
F _{ab} SA2 90	Carolin Schüller

Eine Übersicht über die Eigenschaften der in dieser Arbeit neukonstruierten Vektoren findet sich in Anhang B2.

2.1.5.2. TESTVEKTOREN FÜR RESTRIKTIONSENZYME

pXba	New England Biolabs
λ-DNA	New England Biolabs

¹ Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU-München, Freising

² Lehrstuhl für Zellbiologie, TU-München, Freising

2.1.5.3. HELPERPHAGEN

M13K07 Helferphagen

New England Biolabs

2.1.5.4. E. COLI-BAKTERIENSTÄMME

JM83	<i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>rpsL(=strA)</i> , $\phi 80lacZ\Delta M15$ (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), Kramer (TU München)
TG1 F ⁺	K12, <i>supE</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lac-proAB)$, $\Delta(mcrB-hsdSM)$, $5(r_{\text{Km}})/F'[traD36, proAB, lacI^q lacZ\Delta M15]$, (Gibson, 1984), Stratagene (Heidelberg)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>araD139</i> $\Delta(araleu)$ 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , Invitrogen (Karlsruhe)
XL1 Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac[F'proAB, lacI^q Z\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]</i> , (Bullock <i>et al.</i> , 1987), Stratagene (Heidelberg)

Elektrokompetente XL1 Blue, TG1 F⁺ und TOP10 für einfache Klonierungen wurden im Labor hergestellt, siehe 2.2.1.2.

2.1.6. ATRAZINE, SULFONAMIDE UND DEREN KONJUGATE

2.1.6.1. ATRAZIN

Atrazin

Dr. Ehrendorfer GmbH

Atrazin-OVA-Konjugat

Carolin Schüller

Atrazin-POD-Tracer

PD. Dr. Karl Kramer

Das Atrazin wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.1.6.2. SULFONAMIDE

Sulfacetamid (SA2)	C 16988850
Sulfacetamid-BSA-Konjugat (SA2)	AMRG, Universität Barcelona
Sulfacetamid-ConA-Konjugat (SA2)	AMRG, Universität Barcelona
Sulfachinoxalin	C 16990000
Sulfadiazin	C 16990500
Sulfadoxin	C 16990600
Sulfamethoxazol	C 16998100
Sulfanilamide	C 17000000
Sulfapyridin (SA1)	C 17000100
Sulfapyridin-OVA-Konjugat (SA1)	AMRG, Universität Barcelona
Sulfapyridin-ConA-Konjugat (SA1)	AMRG, Universität Barcelona
Sulfathiazol	C 17000200

Alle Sulfonamide wurden von DR. EHRENSDORFER GMBH bezogen. Die Stammlösungen der einzelnen Sulfonamide wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in Acetonitril angesetzt. Bei Lösungsproblemen wurden 3 µl Phosphorsäure pro ml Acetonitril zugegeben. Ausnahmen bildeten die Substanzen Sulfachinoxalin, Sulfapyridin und Sulfadiazin. Sulfachinoxalin wurde in 800 µl Acetonitril, 200 µl Wasser und 5 µl Phosphorsäure aufgenommen und durch Beschallung im Ultraschallbad gelöst. Sulfapyridine konnten in einer Mischung von 950 µl Ethanol

(99 %), 50 µl Wasser und 3 µl Phosphorsäure zur Lösung gebracht werden. Sulfapyridine und Sulfachinoxalin wurden in Stammlösungen von 0,5 mg/ml angesetzt. Sulfadiazin wurde in 200 µl Ethanol, 800 µl Wasser mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml gelöst. Alle Sulfonamid-Stammlösungen wurden bis auf Sulfadiazin (4 °C) bei Raumtemperatur gelagert. Für den Einsatz im kompetitiven ELISA wurde vor jedem Versuch eine Mischung aus den acht Stammlösungen hergestellt.

2.1.7. OLIGODESOXYNUKLEOTIDE

Die Primer wurden von den Firmen BIOMERS.NET GMBH, METABION, INVITROGEN oder OLIGOMERS synthetisiert. Alle Primer lagen in lyophilisierter Form vor. Die Konzentration je Primer wurde mit H₂O* auf 100 pmol/µl eingestellt.

TABELLE 1: LISTE DER VERWENDETEN MUTATIONSPRIMER

Bezeichnung des Primers	Sequenz
<u>Primer zum Einführen einer <i>SacII</i> in pASK85-K411B:</u>	
Mutation pASK85 (<i>SacII</i>) sense	5'-AAT GAG TGT CCG CGG CAA AGG TCC-3'
Mutation pASK85 (<i>SacII</i>) anti	5'-GGA CCT TTG CCG CGG ACA CTC ATT- 3'
<u>Primer zum Einführen einer <i>Sall</i>-Schnittstelle in pASK85-K411B.1:</u>	
Mutation <i>Sall</i> pASK85 sense	5'-GCG CAG GCC GAA GTC GAC CTG CAG CAG TCA- 3'
Mutation <i>Sall</i> pASK85 anti	5'-TGA CTG CTG CAG GTC GAC TTC GGC CTG CGC- 3'
<u>Primer zum Entfernen der <i>KpnI</i>-Schnittstelle aus V_I-Region des K411B in pASK85-p3-K411B:</u>	
MUT Kpn K47H for	5'-GGC AAT AGT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GG- 3'
MUT Kpn K47H rev	5'-CCT GGT TTC TGC TGA TAG TAC CAG TGC ATA AAA CTA TTG CC-3'
<u>Primer zum Einführen von diagnostischen Schnittstellen in pASK111R_{ab}-p3-WR2/5/13:</u>	
<i>NheI</i> Forward	5'-GGC ACA GTC ACC ATC AAT TGC CAG GCT AGC GAG GAC ATT TAT AGC AAT TTA GCC-3'
<i>NheI</i> Reverse	5'-GGC TAA ATT GCT ATA AAT GTC CTC GCT AGC CTG GCA ATT GAT GGT GAC TGT GCC-3'
<i>SacI</i> Forward	5'-GCT GCG GGG ACA CAC CGA GCT CCA CGG TGA CC-3'
<i>SacI</i> Reverse	5'-GGTT CAC CGT GGA GCT CGG TGT GTC CCC GCA GC-3'

TABELLE 2: PRIMER FÜR DIE AMPLIFIKATION VON GENEN UND GENSEGMENTEN

Bezeichnung des Primers	Sequenz
<u>Primer zur Amplifikation von V_HC_H von K411B:</u>	
K47H V _H C _H for	5'-CAG GCA GCG ATC GCC GAA GTT AAA CTG CAG-3'
K47H V _H C _H rev	5'-GAA TAT ACG CGT GCA GTC GCG CGG TAC G- 3'
<u>Primer zur Amplifikation von V_LC_L von K411B</u>	
K47H V _L C _L for	5'-GAA TGC CAT GGC AGA CAT CGA GCT CAC- 3'
K47H V _L C _L rev	5'-CGC CAG GTA CCT TAA CAC TCA TTC CTG TTG- 3'
<u>Primer zur Amplifikation von gIII aus pCantab 5E:</u>	
pCANTAB sense <i>SacII</i>	5'-GTG CCG CGG TAG ACT GTT GA- 3'
GenIII anti (<i>HindIII</i>)	5'-CGG CCA GTA AGC TTT TAT TAA GAC TC- 3'

TABELLE 3: PRIMER FÜR DIE SEQUENZIERUNG

Bezeichnung des Primers	Sequenz
Seq Amber-Stopp for	5'- CCG CGG TAG ACT GTT GAA AG-3'
Seq colE1 for	5'- CGT TCC ACT GAG CGT CAG ACC-3'
Seq colE/TetR rev	5'- GGC CTA ACT ACG GCT ACA CTA G-3'
pASK-IBA3' (SP!)	5'- TAG CGG TAA ACG GCA GAC-3'

FORTSETZUNG TABELLE 3: PRIMER FÜR DIE SEQUENZIERUNG

Bezeichnung des Primers	Sequenz
pASK-IBA5' (SP!)	5'- TTT ACC ACT CCC TAT CAG TG-3'
gIIIN (SP!)	5'- AAA TGA ATT TTC TGT ATG AGG-3'
Seq f1 ori neu	5'-CCT TAT GTC TTT GGC GCT GG -3'
Seq bla Mitte forward	5'-GGG ATC ATG TAA CTC GC -3'
Seq bla Mitte reverse	5'- CCA TTG CTA CAG GCA TCG-3'
f1 ori 3' for (SP!)	5'- GGA TTT TGC CGA TTT CG-3'
Seq CmR Mitte forward	5'-CCT TGT TAC ACC GTT TTC C -3'
pBRforHind (SP!)	5'- GGT CTG GTT ATA GGT ACA TTG-3'

Die mit (SP!) gekennzeichneten Primer waren Standardprimer der Firma SEQUISERVE und lagen nicht im Labor vor.

TABELLE 4: PRIMER FÜR DIE AMPLIFIKATION VON LEPORIDEN LEICHTEN UND SCHWEREN KETTEN

Bezeichnung des Primers	Sequenz
V _{Lk} 1	5'-GCC AGC CCA TGG CAG CSC TTG TGA TGA CCC AGAC-3'
V _{Lk} 2	5'-GCC GCG GCC ATG GCA TA TGT CAT GAT GAC CCA GAC-3'
V _{Lk} 3	5'-GCT ACT CCA TGG CAG CAG CCG TGC TGA CCC AGA C-3'
V _{Lk} 4	5'-GCC GCG CCA TGG CAG ATG TYG TGA TGA CCC AGA C-3'
V _{Lk} 5	5'-GCT CAG CCA TGG CAG ACC CTR TGC TGA CCC AGA C-3'
V _{Lλ} 6	5'-GCT CAG CCA TGG CAG AGC TCG TGC TGA CTC AGT CG-3'
V _{Lλ} 7	5'-GCT CAG CCA TGG CAC AGC CTG TGC TGA CTC AGT CG-3'
V _{Lλ} 8	5'-GCC AGC CCA TGG CAG AGC TCG TGA TGA CTC AGA CG-3'
C _{Lk} 1 C _k 1	5'-GCC GAG GCG GTA CCT TAR CAG TCA CCC CTR TTG AAG C-3'
C _{Lk} 2 C _k 1, c _k 2	5'-GCC GCG GCG GTA CCT TAA CAG YTC TTC CTA YTG AAG C-3'
C _{Lk} 3 C _k 1	5'-GCC GCG GCG GTA CCT TAA CAG TYA TTC CTA YTG AAG C-3'
C _{Lλ} 6 C _λ 1-4	5'-AGT AGC GGT ACC TTA AGG ACA GYG TGC AGG GGC CAC-3'
C _{Lλ} 7 C _λ 5-7	5'-CTG AGC GGT ACC TTA GGA GCA TTC TCG AGG GRC CAG-3'
V _H 1 V _{Ha1} , V _{Hx}	5'-GCT ATA GCG ATC GCC CAG GAG CAG CTG RWG GAG TCC-3'
V _H 2	5'-GTT ATA GCG ATC GCC SAG TCC GGA GGA GGA GCC GG-3'
V _H 3 V _{Ha1} , V _{Ha3}	5'-GTT ATA GCG ATC GCC CAG BCG TTG GAG GAG TCC GGG-3'
V _H 4	5'-GTT ATA GCG ATC GCC CAG TSG CTG GAG GAG TCC RGG-3'
V _H 5	5'-GCT ACT GCG ATC GCC CAG TCG GTG GAG GAG TCC RG-3'
V _H 6 V _{Ha1} , V _{Ha2}	5'-GCT ACT GCG ATC GCC CAG TCG GTG AAG GAG TCC GAG-3'
V _H 7	5'-GCT ACT GCG ATC GCC CAG TCR ATG AAG GAG TCC GAG-3'
V _H 8	5'-GCT ATA GCG ATC GCC CAG TCR TTG GAG GAG TCC GGG-3'
V _H 9	5'-GTT ATA GCG ATC GCC CAG TCC CTG GAG GAG TCG GGG-3'
V _H 10	5'-GTT ATA GCG ATC GCC CAG TCG CTG GTG GAG TCC GGG-3'
V _H 11	5'-GCT CAG GCG ATC GCC CAG TCA GTG AAG GAG TCC GAG-3'
V _H 12	5'-GCT CAG GCG ATC GCC CAG TCG GTG AAG GAA TCC GAG-3'
V _H 13 V _{Hy}	5'-GCT ATA GCG ATC GCC CAG CAG CTG GAG CAG TCC GG-3'
V _H 14	5'-GCT ACT GCG ATC GCC CAG GAG CAG CTG GTG GAG TAC-3'
C _H 1 IgA ₁₊₁₂	5'-GCC GCG ACG CGT TGG GCA GGG CAG GAT CAG-3'
C _H 2 IgA ₂ (Hinge-Region)	5'-GCT CAG ACG CGT CTC ATT GCA AGC TGG GGG GCT G-3'
C _H 3 IgA ₃ (Hinge-Region)	5'-GCC GCG GCA CGC GTT GGA TCT TTG CAC TCT GGG TAG-3'
C _H 4 IgA ₆₊₅ (Hinge-Region)	5'-GCC GCG ACG CGT TGG CGG TTG GCA TTC TGG G-3'
C _H 5 IgA ₄	5'-GCC AGC ACG CGT TAG GCA GGG CAC AGT CAG GTC-3'
C _H 6 IgA ₇₊₁₁ (Hinge-Region)	5'-GCC GCG GCA CGC GTT TCA CAT GGA TCT GGG AAG G-3'
C _H 7 IgA ₈₊₁₃ (Hinge-Region)	5'-GCT CAG ACG CGT GGC TGG GCA GCA GTC TGG G-3'
C _H 8 IgA ₉	5'-GCC GCG ACG CGT TTG GCA GGG CAC AGT CAG ATC-3'
C _H 9 IgA ₁₀	5'-GCT CAG ACG CGT TGG GTG GCA GGG CAC AGG GAG-3'
C _H 10 IgA ₁₄	5'-GCT CAG ACG CGT TGG GGG GCA GGG CAC AGT GAG-3'
C _H 11 IgG (Hinge-Region)	5'-GCC AGC ACG CGT CGT GGG CTT GCT GCA TGT CG-3'
C _H 12 IgM	5'-GCC AGC ACG CGT GGG AAA GGA CAC TCG CAG GTC-3'

Es wurden Kombinationen aus den Primern unter Berücksichtigung der Häufigkeit der zugrunde liegenden Antikörpersequenzen in den Datenbanken IGMT und KABAT hergestellt. Die Primermischungen wurden so konzipiert, dass mit einer Mischung jeweils 20 % der Datenbanksequenzen abgedeckt wurden. Alle seltenen Sequenzen für V_H wurden in der Mischung V_{HMix2} zusammengefasst.

Primerkombination:

$V_H C_H$ -Ketten:

V_{HMix1} : V_H1+5
 V_{HMix2} : $V_H7-10+V_H12+14$
 V_{HMix3} : V_H2-4+V_H11+13
 $V_{H\#19}$: V_H6
 IgA: Alle IgA Primer

$V_L C_L$ -Ketten:

C_{LkMix} : Alle C_{Lk} Primer
 V_{LkMix} : V_{Lk1-4}
 $C_{L\lambda Mix}$: Alle $C_{L\lambda}$ Primer
 $V_{L\lambda Mix}$: $V_{L\lambda7+8}$

2.1.8. MEDIEN UND PUFFER

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNS wurden entweder im Autoklav oder durch Filtration sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden alle Lösungen unter Verwendung von Millipore®-Wasser hergestellt. Kulturplatten wurden bei 4 °C und Lösungen, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

2.1.8.1. ZELLKULTURMEDIEN

RPMI 1640

GibcoBRL, 13018-023

Fötales Kälberserum (FCS)

Bioconcept

EINFRIERMEDIUM

25 ml RPMI 1640

10 % (v/v) FCS

6 % (v/v) DMSO

2.1.8.2. MEDIEN UND AGAR ZUR BAKTERIENKULTUR

LB-MEDIUM (LURIA-BERTANI-MEDIUM), PH 7,0

20 g LB-Pulver ad 1000 ml H_2O_{dest} , autoklavieren.

2YT-MEDIUM

33 g 2YT-Pulver ad 1000 ml H_2O_{dest} , autoklavieren.

2YT-EINFRIERMEDIUM

100 ml 2YT-Medium

15 % oder 30 % (v/v) Glycerol

sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern

SOB-MEDIUM, PH 7,0

25 g SOB-Pulver ad 1000 ml H_2O_{dest}

SOC-MEDIUM

1 ml 1 M Glucose-Lösung (sterilfiltriert) ad 50 ml SOB-Medium

AGAR-PLATTEN

15 g/l Bacto-Agar vor dem Autoklavieren zu entsprechendem Medium geben. Nach Abkühlen die Flüssigkeit in sterile Petrischalen gießen.

M9-AGAR

(I) 5x M9 Salzlösung:

2,5 g NaCl

5 g NH₄Cl

64 g Na₂HPO₄

15 g KH₂PO₄

ad 1000 ml

ad 1000 ml H₂O_{dest.} autoklavieren

(II) Agar

200 ml 5x M9 Salzlösung

2 ml 1M MgSO₄

0,1 ml 1M CaCl₂

20 ml 20 % Glucose

5 g Agar

Nach Abkühlen die Flüssigkeit mit 400 µl Thiaminhydrochlorid (sterilfiltriert) versetzen und in sterile Petrischalen gießen.

ANTIBIOTIKA-LÖSUNGEN

Antibiotika wurden als sterile Stammlösungen bei -20 °C aufbewahrt und dem autoklavierten Medium erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

TABELLE 5: ANTIBIOTIKA-LÖSUNGEN

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Zugabe im Verhältnis
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser	1:1000
Chloramphenicol	35 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol	1:1000
Kanamycin	35 mg/ml in Wasser	1:500
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol	1:1000

ANHYDROTETRACYCLIN-LÖSUNG

Stammlösungen zu 2 mg/ml in DMF

2.1.8.3. PUFFERLÖSUNGEN FÜR ELISACARBONATPUFFER, 50 MM, PH 9,6

50 mM Na₂CO₃

50 mM NaHCO₃

500 ml gelöstes NaHCO₃ vorlegen; pH 9,6 mit gelöstem Na₂CO₃ einstellen.

PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE) 80 MM, PH 7,4

10 mM NaH₂PO₄ H₂O

70 mM Na₂HPO₄

145 mM NaCl

PBS-WASCHPUFFER (PBST)

100 ml PBS (80 mM, pH 7,4)

900 ml H₂O_{dest}

Mit 0,1 oder 0,05 % (v/v) Tween 20

POD-SUBSTRAT

(I) Chromogenlösung
 1,2 mM TMB
 8 mM H₃PO₄
 10 % DMSO

(II) Substratpuffer
 3,5 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O
 132 mM NaH₂PO₄ x H₂O
 3 mM Harnstoffperoxid

Unmittelbar vor Gebrauch 1 Teil Lösung (I) mit 2 Teilen Lösung (II) mischen.

2.1.8.4. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOTBENZONASE-PUFFER

100 mM Tris/HCl pH 8,0
 5 mM MgCl₂

LAUFPUFFER FÜR ELEKTROPHORESE

3,5 mM SDS
 25 mM Tris/HCl
 190 mM Glycin

SDS-POLYACRYLAMID-GEL

(I) Trenngel
 3,5 ml Acrylamid 30 %
 2,59 ml H₂O_{dest}
 3,75 ml Tris/HCl (1 mol/l, pH 8,7)
 90 µl SDS (10 %)
 70 µl APS (200 mg/ml)
 4 µl TEMED

(II) Sammelgel
 660 µl Acrylamid 30 %
 2,75 ml H₂O_{dest}
 500 µl Tris/HCl (1 mol/l, pH 6,8)
 90 µl SDS (10 %)
 24 µl APS (200 mg/ml)
 4 µl TEMED

10 X TRANSFERPUFFER FÜR WESTERN BLOT (PH 8,3)

390 mM Glycin
 480 mM Tris
 0,37 % SDS
 200 ml Methanol
 Ad 1l mit H₂O

POD-SUBSTRAT FÜR WESTERN BLOT

(I) Na-Acidpuffer (pH 5,0)
 200 mM KH₂-Citrat
 1 mM Sorbinsäure
 ad 500 ml H₂O

(II) AEC-Stammlösung
 0,0275 g AEC
 1 ml DMF

(III) H₂O₂-Lösung
 3,3 ml H₂O₂ 30 %
 ad 100 ml H₂O dest.

1 ml AEC-Stammlösung (II) in 49 ml Lösung (I) geben und 20 µl H₂O₂ (III) zugeben.

2.1.8.5. DNS-GELELEKTROPHORESEAGAROSE-GEL

0,7–1,5 % (w/v) Agarose in 1 x TAE oder TAE *modified*-Puffer durch Erhitzen lösen.
 Nach Abkühlung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) versetzen.

50 x TAE

242 g Tris-HCl
 57,1 g Essigsäure
 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
 Ad 1 l H₂O_{dest}

50 x TAE MODIFIED (NACH MILLIPORE)

2,0M Tris-acetate
 5mM Na₂EDTA (pH 8,0)
 Ad 1l H₂O_{dest}

2.1.8.6. SONSTIGE PUFFERMETALL-CHELATCHROMATOGRAPHIE

Puffer I (CPI) (pH 7,5)
 0,5 M Betain
 50 mM H₂PO₄
 Ad 500 ml H₂O

Puffer II (CPII) (pH 7,5)
 0,5 M Betain
 50 mM H₂PO₄
 300 mM Imidazol/HCl
 Ad 500 ml H₂O

PERIPLASMATISCHER LYSE-PUFFER

100 mM Tris/HCl pH 8,0
 0,5 M Saccharose
 1 mM EDTA

DIALYSE-PUFFER

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

2.1.9. VERBRAUCHSMATERIAL

Bio Assay Dish (245x245x25)
 Cryoröhrchen (1,5–2 ml)
 Dialyseschlauch SpectraPor CE
 Elektroporationsküvetten
 Glaspipetten (10 ml)
 Glasschrot Ø
 Mikrotiterplatten (F-Form, Bindungsaffinität hoch)
 Micronics
 Microcon[®] Centrifugal Filter Devices (YM-30, 0,5 ml)
 Microcon[®] Centrifugal Filter Devices (YM-50, 0,5 ml)
 Micropure[®]-EZ Enzyme Remover
 Immobilon P
 PCR-Gefäße (0,2 ml)
 PCR-Pipettenspitzen (CP 10 , CP 100)
 Petrischalen (Ø 8,5 cm), (Ø 14,5 cm)
 Pipettenspitzen (1–50 µl, 10–1000 µl)
 Pipettenspitzen (0,1–10 µl)
 Pasteurpipetten, einmal

Nunc, Karlsruhe
 Nalgene, Neerijse, Belgium
 Roth, Karlsruhe
 PEQLAB, Erlangen
 VWR, Darmstadt
 VWR, Darmstadt
 Greiner, Frickenhausen
 Greiner, Frickenhausen
 Millipore, Eschborn
 Millipore, Eschborn
 Millipore, Eschborn
 Millipore, Eschborn
 Sarstedt, Nürembrecht
 Gilson, Bad Camberg
 Nunc, Karlsruhe
 Sarstedt, Nürembrecht
 Gilson, Bad Camberg
 PEQLAB, Erlangen

Plastikpipetten (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Plastikküvetten UV-Küvette mikro >320nm	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße (500 µl, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpellklingen	VWR, Darmstadt
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Vivaspin 4 (30 kDa)	Diagonal, Münster
Zentrifugenröhrchen (15ml, 30 ml, 50 ml)	VWR, Darmstadt
Zentrifugenbecher (50 ml , 250 ml)	Sorvall, Newton, USA

2.1.10. GERÄTE

BIO-RAD Econo System	BIO-RAD, München
Brutschrank, BB 6220 CU	Heraeus, Osterode
Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer GNA 100, 200	Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer BlueVertical 100/C	Serva, Heidelberg
Elektrophorese-Spannungsversorgung	Pharmacia, Freiburg
Elektroporationsgerät EasyjectT	Equibio, Erlangen
Geldokumentationssystem	LTF Labortechnik
Horizontalschüttler KL2	E. Bühler, Tübingen
Inkubationsschüttler G24/25	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Innova Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen
pH-Meter, inoLab [®]	WTW, Weilheim
Mikrotiterplatten-Waschautomat 96PW	SLT, Crailsheim
PCR-Express Gradient	Hybaid, Heidelberg
Photometer GeneQuant	Amersham Biosciencesn
Biowave CO8000	Biolabo Scientific Inst., Chatel- St Denis
Pipetten Pipetman (10, 100, 1000 µl)	Gilson, Bad Camberg
Reader SPECTRAFlour Plus	Tecan, Crailsheim
Sterilbank Clean Air CA/RE 4	Haan, Kaarst
Semi Dry Blot Power Supply Model 250/2.5	BIO-Rad, München
Semi Dry Blot System	Pharmacia, Freiburg
Thermocycler Primus 25 [®]	PEQLAB, Erlangen
Umkehrmikroskop,	Wilovert II Wild-Leitz, München
Verdrängungspipetten Microman (10, 100 µl)	Gilson, Bad Camberg
Wasserbad Thermostat 2761	Eppendorf, Hamburg
NK 22	Haake, Berlin
HAAKE DC10 Thermo	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Sorvall RC-5B	DuPont Instruments, Wiesba- den

2.2. METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden etablierte Standardtechniken der Molekularbiologie und Proteinbiochemie für unterschiedliche Zielsetzungen benutzt. Die molekularbiologischen Verfahren umfassen im Wesentlichen die Amplifikation von DNS-Sequenzen, den Restriktionsverdau von Vektoren und Insertionen, die Ligation von Vektor-DNS mit Antikörpergenen und die Transformation von *E. coli* mit rekombinierten Vektoren über die CaCl₂-Methode oder Elektroporation. Weiterhin die Analyse und Präparation von DNS in der Gel-Elektrophorese sowie die Reinigung und Präzipitation von DNS. Im Falle der proteinbiochemischen Methoden handelt es sich um die Expression von Proteinen und deren Analyse mittels SDS-PAGE und *Western Blot*. Außerdem kamen immunbiologische Analyseverfahren wie ELISA zum Einsatz. Sofern die einzelnen Methoden nicht näher aufgeführt sind, wird sich auf die von Sambrook & Russell (2001) beschriebenen Techniken bezogen.

2.2.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1.1. KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON *E. COLI*-STÄMMEN

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C (XL1 *Blue*, TOP10, JM83) bzw. 30 °C (TG F⁺) erhalten und zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Zur Selektion auf Plasmide oder Phagemide wurden den Agar-Kulturplatten vor dem Erkalten entsprechende Antibiotika zugesetzt. Die Agar-Platten mit den Bakterienkolonien wurden maximal eine Woche bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde, sofern nicht anders erwähnt, LB-Medium bzw. 2YT-Medium mit dem für den jeweiligen Bakterienstamm geeigneten Antibiotikum versetzt. Für Kulturen im 10-ml-Maßstab wurden 50-ml-Kunststoffröhrchen, für größere Ansätze Erlenmeyerkolben mit dem 2,5 fachen Gefäßvolumen verwendet. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 100 ml wurden direkt mit Einzelkolonien angeimpft, größere Kulturen wurden, sofern nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:1000 mit einer stationären Übernachtskultur angeimpft und bei 200 rpm im temperierten Schüttelinkubator kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Dabei entsprach eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,1 einer Zelldichte von etwa 1 x 10⁸ Zellen/ml für TG1 F⁺ (Stratagene, 2004). Für XL1 *Blue* und JM83 entspricht die OD₆₀₀ = 0,26 einer Zelldichte von etwa 1,6 x 10⁸ Zellen/ml (Skerra, 1989).

Transformierte *E. coli*-Zellen wurden als Glycerinkultur konserviert, indem 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur mit 0,5 ml sterilisiertem 30 % (v/v) 2YT-Einfriermedium gemischt und zu 200 µl Aliquoten bei -70 °C gelagert wurden. Alternativ wurden auch 2 ml einer exponentiellen Kultur mit einer OD₆₀₀ = 0,5–0,8 (je nach Bakterienstamm, siehe Tabelle 6) abzentrifugiert und in 0,5 ml sterilem 15 % (v/v) 2YT-Einfriermedium resuspendiert und zu 100 µl Aliquoten bei -70 °C gelagert.

2.2.1.2. TRANSFORMATION VON *E. COLI*-STÄMMEN MIT PLASMID-DNS

E. coli-Zellen können Plasmid-DNS aufnehmen, nachdem sie in einen transformationskompetenten Zustand überführt wurden. Zwei verschiedene Methoden wurden zu diesem Zweck eingesetzt: die Inoue-Methode (Inoue *et al.*, 1990) und die Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Die Inoue-Methode liefert, in Abhängigkeit vom verwendeten *E. coli*-Stamm,

1×10^8 – 3×10^8 Transformanden pro μg Plasmid-DNS. Diese Methode wurde für Standard-Klonierungen und die Herstellung von Antikörperteilbibliotheken gewählt. Eine bessere Transformationseffizienz von bis zu 10^{10} Transformanden pro μg Plasmid-DNS lässt sich mit der Elektroporation erreichen. Diese Methode wurde verwendet, um die größtmögliche Ausbeute an Transformanden von *E. coli* TG1 F⁺ bei der Zusammenführung der beiden Teilbibliotheken, bestehend aus je einer naiven Kette (HC_n oder LC_n) und dem Gemisch der korrespondierenden immunisierten Ketten, zu erreichen. Zur Ermittlung der Transformationskompetenz der hergestellten kompetenten Zellen wurde wie in Sambrook & Russell (2001) beschrieben eine Testtransformation mit pUC18 (STRATAGENE) durchgeführt.

TRANSFORMATION NACH DER INUOE-METHODE

250 ml SOB-Medium wurden mit einer 6–8 h alten Vorkultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes nach Sambrook & Russell (2001) inokuliert und über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ in der Mitte der Log-Phase (Tabelle 6) bei 200 rpm und 20 °C kultiviert. Bei Erreichen der optischen Dichte wurde das Wachstum durch 10-minütige Inkubation in Eiswasser gestoppt. Die Kultur wurde in 50-ml-Kunststoff-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (4000 rpm, 4 °C, 10 min). Das Zellsediment wurde in 80 ml Inoue-Puffer (unter strikter Vermeidung von Blasenbildung) resuspendiert, die Suspension wie beschrieben zentrifugiert, das erhaltene Zellsediment in 1,5–2 ml Inoue-Puffer resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde auf $1,5 \times 10^{10}$ Zellen/ml eingestellt, die Bakteriensuspension mit DMSO (7,5 % v/v) versetzt, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension zu Aliquoten à 50 und 200 μl auf 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Dampfautoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf -20 °C abgekühlt.

TABELLE 6: LOG-PHASE OD₆₀₀ DER VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME

Bakterienstamm	OD ₆₀₀ bei Log-Phase
JM83	0,5–0,8
TG F ⁺	0,5–0,6
Top10	0,5–0,7
XL1 <i>Blue</i>	0,6–0,8

Für die Transformationen wurde die auf Eis aufgetaute Zellsuspension mit 0,1–1 ng Plasmid-DNS oder 5 μl eines Ligationsansatzes gemischt (z.B. 0,1 ng pUC18-Plasmid-DNS) und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 45 sec im Wasserbad auf 42 °C erhitzt, sofort für 2 min auf Eis gekühlt, danach mit 1 ml warmen SOC-Medium versetzt und für 1–2 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Verdünnungen der Zellsuspension wurden in Abhängigkeit von der Anzahl erwarteter Transformanden auf LB- oder 2YT-Agar ausplattiert, der zur Selektion auf Plasmid-Marker mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war. Die Kulturplatten wurden anschließend über Nacht bei 30 °C beziehungsweise bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

TRANSFORMATION MITTELS ELEKTROPORATION

Die Präparation elektrokompenter Zellen aller *E. coli*-Stämme erfolgte gemäß den optimierten Vorschriften der Firma „EQUIBIO“ (2004). 200 ml LB-Medium wurde mit 1 ml einer exponentiellen Vorkultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes in LB angeimpft und die Kultur bei

22 °C und 200 rpm über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ in der Mitte der Log-Phase (Tabelle 6) geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend sofort in eisgekühlte, sterile 50-ml-Kunststoffröhrchen umgefüllt und bei 4 °C sedimentiert (4000 rpm, 10 min). Nach vollständigem Abziehen des Überstandes wurden die Zellen in insgesamt 200 ml sterilem, eiskaltem Wasser unter strikter Vermeidung von Blasenbildung resuspendiert und erneut wie oben sedimentiert. Nach Wiederholung des Waschschrattes und der Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml vorgekühltem, sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die optische Dichte wurde auf $1,5 \times 10^{10}$ Zellen/ml eingestellt. Die Suspension wurde in Portionen à 50 µl und 200 µl aliquotiert, sofort für die Elektroporation eingesetzt oder bei -70 °C eingefroren und gelagert.

Für die Elektroporation fand das Easyject-Basic-Gerät mit Küvetten der Firma PEQLAB (Elektrodenabstand 0,2 cm) Verwendung. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und die verwendeten Geräte, Pipettenspitzen und Küvetten vorgekühlt. Zu 50–200 µl der Suspension frisch präparierter oder auf Eis aufgetauter elektrokompetenter Zellen wurden 1 ng Plasmid-DNS oder 5 µl eines Ligationsansatzes gegeben und vorsichtig vermischt. Während einer einminütigen Inkubation wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführt, bevor für eine Dauer von ca. 5 ms eine Spannung von 2,5 kV angelegt wurde; dies entspricht einer Feldstärke von 12,5 kV/cm. In die Küvette wurden sofort 500 µl 42 °C warmen SOC-Mediums pipettiert, die Zellsuspension in ein Kulturröhrchen überführt und die Küvette mit 500 µl SOC nachgespült. Anschließend wurde die vereinigte Zellsuspension für 1–2 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Bei Standardtransformationen wurden 50–100 µl dieser Suspension in Abhängigkeit von der Anzahl erwarteter Transformanden auf LB- oder 2YT-Agar ausplattiert. Die Kulturplatten wurden anschließend über Nacht bei 30 °C bzw. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei den Transformationen zur Generierung einer leporiden Antikörperbibliothek wurden zur Ermittlung der Transformationseffizienz Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10 000) der Zellsuspension hergestellt und auf 2YT-Agar ausplattiert, dem zur Selektion auf das Phagemid Chloramphenicol zugesetzt worden war. Der Rest der transformierten Bibliothek wurde auf fünf große 2YT-Agarplatten (Ø 14,5 cm, Bio Assay Dish, Nunc) ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert.

2.2.1.3. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS AUS *E. COLI*

Zur Analyse von Transformanden, die bei der Neukonstruktion von Plasmiden nach ortsgerichteter Mutagenese oder durch Infektion mit Bakteriophagen nach einer Affinitätsanreicherung erhalten worden waren, wurde die Plasmid-DNS einzelner Klone im analytischen Maßstab präpariert. Für umfangreichere DNS-Arbeiten sowie zur Konservierung der Kaninchen-Antikörperbibliotheken nach der Elektroporation wurde Plasmid-DNS im präparativen Maßstab isoliert.

Für analytische Zwecke diente der QIAPREP SPIN PURIFICATION KIT zur Isolierung reiner Plasmid-DNS, wie sie für molekularbiologische Reaktionen benötigt wurde. Sie beruht auf dem alkalischen Zellaufschluss (Birnboim & Doly, 1979) und der spezifischen Bindung von DNS an Ionenaustauschersäulen. Aus 10 ml einer Übernachtskultur wurde Plasmid-DNS nach Angaben des Herstellers isoliert; hierbei wurden zwischen 10 µg und 15 µg DNS isoliert. Größere Mengen Plasmid-DNS im präparativen Maßstab wurden aus 50 ml einer Übernachtskultur mittels MIDI PLASMID PURIFICATION KIT gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Ausbeute betrug ca. 100 µg Plasmid-DNS. Die isolierte Plasmid-DNS wurde zur Hydrolyse mit

Restriktionsenzymen im analytischen und präparativen Maßstab eingesetzt. Bis zur Verwendung wurde sie bei -20 °C gelagert.

2.2.1.4. MRNS-TECHNIKEN

Als Quelle für die mRNS dienten B-Lymphozyten, die aus immunisiertem leporiden Milzgewebe gewonnen wurden. Die Kaninchen-Milzen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Pilar Marco am Lehrstuhl für angewandte molekulare Rezeptoren (AMRG) am Zentrum für Forschung und Entwicklung der Universität Barcelona zur Verfügung gestellt. Es wurden fünf weibliche *New-Zealand-White*-Kaninchen mit zwei verschiedenen Sulfonamid-HCH-Konjugaten (HCH, *horse-shoe crab hemocyanin*) immunisiert. Zwei der Tiere (rb #154 und rb #156) wurden mit dem Sulfonamid-HCH-Konjugat SA1 und drei Tiere (rb #157, rb #158 und rb #159) mit dem Sulfonamid-HCH-Konjugat SA2 immunisiert. Tier rb #154 wurde einer verkürzten Immunisierung unterzogen.

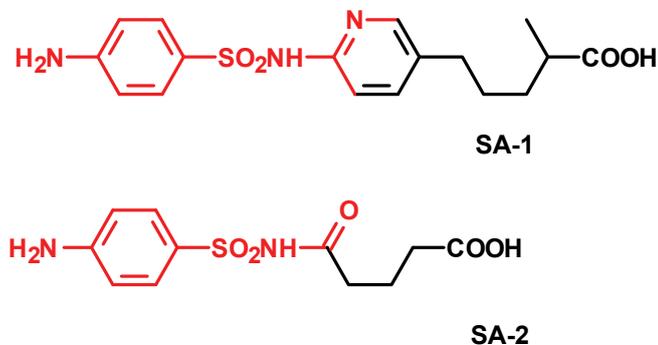


ABBILDUNG 8: STRUKTURFORMELN DER SA1 UND SA2 KONJUGATE
IN ROT: DIE STRUKTUR FÜR SA1 (SUFAPYRIDIN) UND SA2 (SULFACETAMID). IN SCHWARZ: DIE LINKER, WELCHE FÜR DIE KOPPLUNG AN TRÄGERPROTEINE VERANTWORTLICH SIND

ISOLATION VON B-LYMPHOZYTEN AUS MILZGEWEBE

Die vom der AMRG bereitgestellten und auf Trockeneis verschickten Kaninchen-Milzen wurden nach Erhalt bei -70 °C gelagert. Die einzelnen Milzen wurden bei Bedarf unter sterilen Bedingungen auf Eis aufgetaut und mit 5 ml kaltem RPMI 1640 von anhaftenden Fell- und Geweberesten gereinigt. Anschließend wurden die Milzen in gekühlte, mit 5 ml sterilem RPMI 1640 gefüllte Petrischalen übertragen. Durch Perforation des Gewebes und gleichzeitige Injektion von 40 ml kaltem RPMI 1640 mittels einer Kanüle wurden die B-Lymphozyten ausgespült. Dies geschah solange, bis ein heller Bindegewebesack zurückblieb. Die ausgespülten Zellen wurden mittels Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4 °C) zweimal mit 45 ml kaltem RPMI 1640 gewaschen. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauerzählkammer (Hämocytometer). Daraufhin wurden die B-Lymphozyten mit Aliquoten zu 1×10^7 Zellen in flüssigem Stickstoff bis zur RNS-Präparation gelagert.

PRÄPARATION DER MRNS

Für die Isolierung der mRNS aus den leporiden B-Lymphozyten wurde der MRNS ISOLATION KIT der Firma ROCHE verwendet. Für die Versuchsdurchführung kamen nur RNase-freie Plastikwaren und mit RNase ZAP behandelte Geräte zum Einsatz. Die Isolation folgte dem Protokoll des Herstellers für die mRNS-Präparation aus Zellkultur. Hierfür wurde die mRNS nach alkalischem Zellaufschluss temporär an mit OligodT beschichtete Magnetperlen gebunden, gewa-

schen und eluiert. Hierfür wurden die B-Lymphozyten auf Eis aufgetaut und so schnell wie möglich zweimal mittels Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4 °C) mit sterilem PBS gewaschen, um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Die im Anschluss eingesetzten Puffermengen und die Vorgehensweise entsprachen den Herstellerangaben für die korrelierende Gesamtzellzahl der jeweiligen B-Lymphozytenpräparation. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Magnetperlen drei-mal mit 50 µl Wasser eluiert. Die Eluate wurden erst nach Verifizierung der mRNS-Menge und des Reinheitsgrades zusammengefasst. Reinheitsgrad und mRNS-Menge wurden spektralphotometrisch ermittelt (siehe 2.2.1.5). Daraufhin wurden die mRNS-Präparate mit 1 µl RNase-Inhibitor pro 20 µl mRNS-Eluat versetzt und zu 25-µl-Aliquoten bei -70 °C eingefroren.

REVERSE TRANSKRIPTION

Die reverse Transkription wurde mit dem 1ST STRAND CDNS SYNTHESIS KIT FOR RT-PCR (AMV) KIT (ROCHE) durchgeführt. Als Matrize diente die isolierte mRNS. Die Menge der eingesetzten leporiden mRNS betrug bei vier Versuchstieren 200 ng. Bei Tier #157 wurde die eingesetzte Menge wegen des schlechten Reinheitsgrades auf 320 ng erhöht.

TABELLE 7: MASTER-MIX FÜR CDNS-SYNTHESE

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	2,0	1 x
25 mM MgCl ₂	4,0	5 mM
Desoxynucleotid Mix	2,0	1 mM
Random Primer p(dN) ₆	2,0	0,08 A ₂₆₀ units (3,2 µg)
AMV Reverse Transcriptase	0,8	≥20 units
Steriles Wasser	variabel	----
RNSProbe	variabel	200 ng bzw. 320 ng
Insgesamt	20,0	

Die mRNS aus den Kaninchen-Milzen wurden mit den aus Tabelle 7 ersichtlichen Reagenzien gemischt und für 10 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Dadurch wurde die Bindung der Primer an die mRNS-Matrize und deren reverse Transkription in die stabilere cDNS eingeleitet. Die Zugabe von RNase-Inhibitor erübrigte sich, da dieser direkt nach der mRNS-Präparation zugegeben worden war. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation für 5 min bei 99 °C gestoppt und anschließend 5 min bei 4 °C gekühlt. Die so synthetisierte einzelsträngige cDNS kann bei -20 °C über mehrere Monate aufbewahrt werden.

2.2.1.5. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen einer verdünnten Lösung erfolgte durch die Messung der Absorption A bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer. Hierfür wurden nur sterile Einmalküvetten der Firma BRAND benutzt. Die Konzentration wurde nach Formel 1 ermittelt (Sambrook & Russell 2001).

Um die Reinheit der DNS-Lösung zu analysieren, wurde das Verhältnis der Nukleinsäure-Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) berechnet. Lag der Wert $A_{260/280}$ zwischen 1,6–2,0 wurde die DNS als ausreichend rein beurteilt.

$$\text{mRNS: Konzentration [mg/ml]} = A260 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ [mg/ml]}$$

$$\text{ssDNS: Konzentration [mg/ml]} = A260 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 30 \text{ [mg/ml]}$$

$$\text{dsDNS: Konzentration [mg/ml]} = A260 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ [mg/ml]}$$

FORMEL 1: KONZENTRATIONSBERECHNUNG NUKLEINSÄUREN

2.2.1.6. IN VITRO-MODIFIKATION VON DNS

POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) wurde in der vorliegenden Arbeit zur selektiven Amplifizierung von Genen und zur Einführung von ortsgerichteten Mutationen verwendet.

STANDARDAMPLIFIZIERUNG VON GENEN

Die in der PCR paarweise eingesetzten Oligodesoxynukleotide (Primer) flankierten jeweils den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNS komplementäre Sequenz. Am 5'-Ende der Primersequenzen wurden bei Bedarf Restriktionsschnittstellen eingeführt. Als Enzym wurde zur Amplifikation von Genen, die nachfolgend kloniert werden sollten, *Pfu*-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) verwendet.

Der Standardreaktionsansatz für eine PCR mit der *Pfu*-DNS-Polymerase enthielt folgende Komponenten:

TABELLE 8: KOMPONENTEN EINES STANDARD-PCR-ANSATZES

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	5,0	1 x
Desoxynucleotide Mix (2 mM)	5,0	1 mM
Upstream Primer	0,5	20 pmol
Downstream Primer	0,5	20 pmol
Steriles Wasser	variabel	---
Matrizen-DNS	0,01–1 µg	---
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,5	2,5 Units
Insgesamt	50,0	

Nach Auffüllen mit H₂O auf 50 µl wurde der Reaktionsansatz im Thermocycler für 2 min auf 94 °C erhitzt und 2,5 U der entsprechenden Polymerase zugegeben (*Hot Start*). Die PCR wurde wie in Tabelle 8, Seite 43 unter „Amplifikationsphase“ durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur variierte dabei je nach dem verwendeten Primerpaar. Der Amplifikationszyklus wurde in der Regel 25-mal durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 10 min bei 72 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNS mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde anschließend durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und gegebenenfalls anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten.

TOUCH-DOWN-PCR

Die selektive Amplifikation der für $V_H C_H$ - und $V_L C_L$ -codierenden leporiden Nukleotidabschnitte wurden über *Touch-Down-PCR* (TD-PCR) isoliert und amplifiziert (Don *et al.*, 1991). Die PCR wurde durch „Hotstart“ mit 2,5 U *Taq* Polymerase (Chien *et al.*, 1976) induziert (Sambrook & Russell, 2001). Es kam folgendes Zeit-Temperatur-Profil zum Einsatz:

TABELLE 9: ZEIT-TEMPERATUR-PROFIL DER TD-PCR ZUR AMPLIFIKATION DER LERIODEN $V_H C_H$ - UND $V_L C_L$ -GENE

	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Zykluszahl
Anfangsdenaturierung und Hotstart	120	95	1
Touch-Down-Phase			15
Denaturierung	10	95	
Annealing	20	65 ³	
Elongation	30	72	
Amplifikations-Phase			25
Denaturierung	10	95	
Annealing	30	53	
Elongation	60	72	
End-Elongation	600	72	1

Das Reaktionsgemisch wurde wie in Tabelle 10 angegeben angesetzt. Hierbei diente die Erststrang-cDNS (siehe 2.2.1.4) als *template*. Für jede Amplifikation wurde ein Kontrollansatz mitgeführt, der H_2O anstelle der cDNS enthielt. Das Volumen der eingesetzten leporiden cDNS variierte je nach Versuchstier (siehe hierzu

Tabelle 18, Seite 67).

TABELLE 10: MASTERMIX ZUR AMPLIFIKATION DER $V_H C_H$ UND $V_L C_L$ VON KANINCHEN-ANTIKÖRPERGENEN

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	5,0	1 x
Desoxynucleotide Mix (2 mM)	5,0	1 mM
$V_{H/L}$ Primer Mix	0,5	20 µmol
$C_{H/L}$ Primer (Mix)	0,5	20 µmol
Sterile water	variabel	---
Formamid ⁴	1,25	2,5 % (v/v)
cDNS	1 –5	---
<i>Taq</i> E Genaxxon	0,5	2,5 Units
Insgesamt	50,0	

Die Primermischungen für die selektive Amplifikation der leichten und schweren Kette wurden wie in Tabelle 11 Spalte 1 verwendet. Die Zusammensetzung der Primermischungen und deren exakte Sequenzen befinden sich im Materialteil 2.1.7.

³ Temperatur sinkt um 1°C pro Zyklus

⁴ Das Formamid in den PCR-Ansätzen bewirkt, dass sich die aus den Primerlängen resultierenden hohen Annealingtemperaturen um ca. 10 °C senken lassen (Bartlett & Stiring, 2003)

TABELLE 11: PRIMERKOMBINATIONEN UND VOLUMEN CDNS FÜR DIE AMPLIFIKATION DER AK-GENE

Primerkombination	Tier #154	Tier #156	Tier #157	Tier #158	Tier #159
<u>V_HC_H-Ketten:</u>					
IgG + V _{HMix} 1	2 µl	1 µl	2 µl	1 µl	3 µl
IgG + V _{HMix} 2/3	2 µl	1 µl	2 µl	1 µl	3 µl
IgG + V _{H#19}	3 µl	3 µl	5 µl	3 µl	5 µl
IgA + V _{HMix} 1	2 µl	3 µl	2 µl	2 µl	5 µl
IgA + V _{HMix} 2/3	2 µl	3 µl	2 µl	2 µl	5 µl
IgA + V _{H#19}	3 µl	4 µl	3 µl	3 µl	5 µl
IgM + V _{Hmix} 1	1 µl				
IgM + V _{Hmix} 2/3	1 µl				
IgM + V _{H#19}	1 µl				
<u>V_LC_L-Ketten:</u>					
C _{LkMix} + V _{LkMix}	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl
C _{Lk#5} + V _{LkMix}	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl
C _{Lλ Mix} + V _{LλMix}	2 µl	5 µl	5 µl	2 µl	5 µl
C _{Lλ #6} + V _{LλMix}	2 µl	5 µl	5 µl	2 µl	5 µl

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese (1,5%iges Agarosegel) aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und gereinigt (siehe 2.2.1.7).

ORTSGERICHTETE MUTAGENESE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ortsspezifische Mutagenese mittels QUIKCHANGE-KIT (STRATAGENE) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese Ansätze wurden dafür genutzt, Schnittstellen in Vektoren und Phagemide einzuführen oder zu entfernen. Die hierfür verwendeten komplementären Primer mit dem gewünschten Nukleotidaustausch sind in Tabelle 1 im Materialteil aufgelistet. Als Matrize dienten die Vektoren pASK85-K411B, pASK85-K411B.1, pASK85-p3-K411B, pASK111R_{ab}-p3-WR-Reihe mit den zu mutierenden Genen. Im Verlauf der Reaktion banden die Primer an die hitzedenaturierte einzelsträngige Matrizen. Über die folgende Amplifikation wurde die Mutation in die neusynthetisierten DNS-Stränge eingebaut. Am Ende der PCR besaßen alle DNS-Stränge mit Ausnahme der parentalen DNS die entsprechende Mutation. Nach der Reaktion wurde das Produkt 1 h lang mit 1 µl *DpnI* (10 U) behandelt. Die Ansätze wurden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um die parentale DNS zu verdauen. *DpnI* schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNS in der Zielsequenz 5'-Gm⁶ATC-3'. Die Plasmid-templates aus *E. coli* (dam⁺) waren dam-methyliert und wurden daher verdaut, während die durch PCR erzeugten Tochter-Plasmide nicht methyliert waren und daher nicht durch das Enzym angegriffen wurden. Die DNS-Moleküle mit den gewünschten Mutationen wurden in kompetente *E. coli* TOP10 oder XL1 *Blue* transformiert.

RESTRIKTIONSVERDAU VON DOPPELSTRÄNGIGER DNS

Enzymatische Restriktionen wurden nach Herstellerangaben mit den gelieferten Puffern und Zusätzen angesetzt. Ein analytischer Reaktionsansatz hatte in der Regel ein Gesamtvolumen von 10 µl und bestand aus 0,5–1 µg DNS, 1 x Puffer, gegebenenfalls 100 µg/ml BSA und 1–2 U eines Restriktionsenzym. Bei Verdau mit zwei Enzymen wurden die Pufferbedingungen so gewählt, dass für beide Enzyme möglichst optimale Bedingungen gegeben waren. Dieser Ansatz wurde für 1–1,5 h inkubiert.

Präparative Reaktionsansätze wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Dabei wurden Plasmid-DNS-Mengen zwischen 2,5 und 5 µg eingesetzt und mit jeweils 10–50 U

der entsprechenden Restriktionsendonukleasen für 1,5 h inkubiert. Zuvor schon isolierte und gereinigte PCR-Fragmente wurden analog mit 50 U pro μg DNS gespalten. Nach der Umsetzung wurden die Ansätze 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert (Ausubel *et al.*, 1994) und mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese oder Ultrazentrifugation getrennt und gereinigt.

REINIGEN PROZESSIERTER DNS VON ENZYMEN UND SALZEN

Enzymatisch prozessierte DNS wurde mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt (siehe 2.2.1.7). Salzsensitive Anwendungen wie z.B. Ligationen wurden nach der Elution photometrisch auf eine Kontamination mit Salzen geprüft. Im Falle einer erhöhten Salzkonzentration wurde eine Ultrafiltration mittels Mikrokonzentratoren (Microcon) nach Angaben der Firma MILLIPORE nachgeschaltet.

Alternativ wurde zum Aufreinigen von PCR-Amplifikaten, Restriktionen oder Ligationen eine Kombination aus MICROPURE-EZ-SÄULEN und den MICROCON-ULTRAFILTRATIONS-EINHEITEN (Millipore, YM-50, 0,5 ml) eingesetzt. Die Ansätze wurden 3 x mit je 400 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ durch Zentrifugation bei 8000 rpm gewaschen. Die Elution der DNS von der Membran erfolgte mit 10 μl H_2O (Nuklease-frei).

LIGATION VON DNS-FRAGMENTEN

DNS-Ligasen katalysieren die kovalente Verknüpfung freier 3'-Hydroxyenden mit 5'-Phosphatenden von DNS. Für die *sticky-end*-Ligation wurde *Insert*-DNS nach erfolgter Restriktion zu Vektor-DNS im molaren Verhältnis von 1:1 bis 5:1 eingesetzt. Ein Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 μl und bestand aus 20–50 ng geschnittener Vektor-DNS, 1–5 pmol geschnittener *Insert*-DNS pro pmol Vektor-DNS, 1 x Ligase-Puffer und 1 U T4-DNS-Ligase. Nach einer anfänglichen 5-minütigen Inkubation der DNS bei 60 °C, um Sekundärstrukturen aufzulösen, wurden die Ligationsansätze für 16–20 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 10 min eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65 °C. Für die Transformation wurden die Ligationsansätze in Microcon mit EZ-Einsätzen (Millipore, YM-50, 0,5 ml) aufgereinigt. Die DNS wurde für die Transformation elektrokompenter Bakterien oder chemisch-kompenter Bakterien eingesetzt.

$$\text{Benötigte Menge Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} * \text{Insertgröße [bp]} * 1-5}{\text{Vektorgröße [bp]}}$$

FORMEL 2: BERECHNUNG DER *INSERT*MENGE BEI LIGATIONEN

SEQUENZIERUNG VON DNS

Die DNS-Sequenzierungen wurden von der Firma SEQUIERVE durchgeführt. Hierzu wurden pro Sequenzierungsansatz 600 ng Matrizen-DNS in einem Gesamtvolumen von 10 μl EB-Puffer und 20 pmol Sequenzierungsprimer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verschickt.

2.2.1.7. GELELEKTROPHORESE UND REINIGUNG VON DNS

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook & Russell, 2001) eingesetzt. Dieses Verfahren wurde zur Auftrennung von Restriktionsprodukten sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab verwendet.

ANALYTISCHE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Analytische Agarose-Gelelektrophoresen wurden in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Die Menge der Agarose (ROTH) richtete sich hierbei nach der Größe der DNS-Fragmente. Bis zu einer Länge von 1000 Basenpaaren (bp) wurde ein 1,5%iges, ab 1000 bp ein 1%iges und ab 3000 bp ein 0,7%iges Agarose-Gel benutzt. Als Längenstandards dienten DNS-Marker der Firmen NEW ENGLAND BIOLABS und PROMEGA. Der Nachweis von DNS-Fragmenten erfolgte nach 60 minütiger horizontaler Pherographie bei 90 V mittels Ethidiumbromid (0,1 µg/ml). Die Banden wurden mit dem Geldokumentationssystem der Firma LFT mit UV-Licht bei 312 nm sichtbar gemacht und dokumentiert.

PRÄPARATIVE GELELEKTROPHORESE

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten nach erfolgter Restriktion oder Reinigung nach enzymatischer Behandlung wurden ebenfalls abhängig von der Länge 0,7–1,5%ige Agarose-Gele verwendet. Um die Qualität der gereinigten DNS zu erhöhen, kamen bei diesen Elektrophoresen TAE *modified*-Puffer und Agarose TOPVISION™ LE GQ zum Einsatz. Dies verringerte die Kontamination des Eluats mit Salzen und Agaroseresten und führte zu einer erhöhten Ligationseffizienz (0). Es wurde der gesamte Reaktionsansatz auf das Gel aufgetragen und bei 70 V für 90 min aufgetrennt. Die DNS-Banden wurden bei verminderter Intensität der UV-Quelle ausgeschnitten, um Strahlenschäden zu vermeiden, gereinigt und die DNS-Konzentration im Spektralphotometer bestimmt.

ISOLIERUNG VON DNS AUS AGAROSE-GELEN

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des QIAQUICK GEL EXTRACTIONS KITS nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die DNS vorübergehend an ein Anionenaustauschmaterial gebunden. Um Salze und Reste von Agarose zu beseitigen, wurden die Spin-Säulen nach Zugabe des PE-Puffers 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Elution der gereinigten DNS-Fragmente wurde H₂O verwendet. Dieses wurde vorher auf 50 °C erwärmt und die Spin-Säulen 5–10 min inkubiert, um die Elutionseffizienz zu erhöhen. Die gereinigten DNS-Fragmente können bei -20 °C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

2.2.2. PRÄPARATION UND SELEKTION REKOMBINANTER PHAGEMIDE

2.2.2.1. HERSTELLUNG VON LEPORIDEN PHAGEMIDBIBLIOTHEKEN

Nach Isolierung der mRNS, anschließender cDNS-Transkription, der Amplifikation der leichten und schweren Antikörperketten sowie der Ligation der Ketten in das pASK111R_{ab}-p3-Phagemid konnten die erhaltenen Ligationsansätze in elektrokompente *E. coli* XL1 *Blue*- und TG1 F⁺-Zellen (STRATAGENE) transformiert werden. Für die initiale Transformation der generierten Teilbibliotheken wurde der *E.coli*-Stamm XL1 *Blue* genutzt, da sich aus diesem geeignete ultrakompetente Zellen (siehe 2.2.1.2) präparieren lassen (> 1 x 10⁹ Zellen). Ligierte und gereinigte Plasmid-DNS konnte mit hoher Effizienz in diesen Stamm transformiert werden, um die Herstellung einer, nach statistischen Kriterien, ausreichend diversen Gen-Bibliothek zu gewährleisten. Der Stamm hatte jedoch den Nachteil einer verlängerten Wachstumsphase sowie einer geringeren DNS-Ausbeute. Darum wurde nach den ersten *Panning*-Experimenten der Stamm TG1 F⁺ zur Reinfektion der selektierten F_{ab}-präsentierenden Phagen verwendet.

Nach der Elektroporation wurde der Ansatz für 2 h bei 200 rpm und 37 °C kultiviert, Verdünnungen ausplattiert, der Rest der Suspension auf fünf BioAssay-Platten (Nunc) ausge-

racht und über Nacht bei 30 °C (TG F⁺) oder 37 °C (XL1 *Blue*) inkubiert (siehe 2.2.1.2). Am nächsten Tag wurde die Transformationsrate durch Auszählen der Verdünnungen errechnet. Die Bibliothek wurde durch Beschickung der Platten mit je 3 ml 2YT-Cm-Medium mit einem Drigalskispatel abgenommen und als Glycerinkultur bei -70 °C konserviert. Vor der Zentrifugation wurden 1,5 ml der Kultur zur Isolierung der Plasmid-DNS (siehe 2.2.1.3) entnommen. Einzelne Klone der Verdünnungsplatten wurden einem Restriktionsverdau unterzogen.

2.2.2.2. PRÄPARATION VON REKOMBINANTEN PHAGEN

Die Präparation der Phagen erfolgte zu Beginn jeder *Panning*-Runde und diente zur Herstellung rekombinanter Phagen. Dazu wurden für die erste Runde 50 ml (weitere Runden: 10 ml) 2xTYCm-Medium mit Faktor 10 der errechneten Bibliotheksgröße, mit einem Glycerolstock aus 2.2.2.1, inokuliert. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5–0,7 bei 37°C und 200 rpm angezogen. 50 ml (5 ml) dieser Kultur wurden mit 2 x 10¹¹ (1 x 10¹¹) M13KO7-Helfer-Phagen (NEB) inokuliert und 30 min bei 37 °C ohne Schütteln infiziert. Die infizierten Bakterienzellen wurden zentrifugiert (10 min, 4000 rpm), in 100 ml (25 ml) 2TY resuspendiert und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte die Zugabe von Kanamycin. Durch zusätzliche Induktion der Genexpression der F_{ab}-pIII-Fusionsproteine mit aTc (200 µg/ml) kam es zur Produktion von Phagen, welche die F_{ab}-Varianten auf ihrer Oberfläche präsentierten.

Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C), der Zellrückstand verworfen und der phagenhaltige Überstand durch Zusatz von 1/5 Vol. 20 % (w/v) PEG mit 15 % (w/v) NaCl 20 min bei 4 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 13 000 rpm, 4 °C) wurde der Phagenrückstand in 4 ml (weitere Runden: 2 ml) PBS aufgenommen. Abschließend wurden unlösliche Bestandteile in der Phagensuspension durch Zentrifugation entfernt (1 min, 14 000 rpm), die Suspension sterilfiltriert (0,45 µm), der Phagentiter bestimmt (siehe 2.2.2.3) und die Phagen für das *Panning* verwendet.

2.2.2.3. TITERBESTIMMUNG VON PHAGENLÖSUNGEN

Die Titration einer Phagenbibliothek dient der Ermittlung der *plaque forming unit* (pfu) und ist ein essentieller Schritt für die Durchführung einer *Panning*-Runde. Für die Titerbestimmung von rekombinanten Phagenantikörper-Präparationen wurde die Anzahl infektiöser Phagenpartikel (cfu, *colony forming units*) bestimmt (Coomber, 2002). Da es sich bei den verwendeten pASK111R_{ab}-p3- und pASK85R_{ab}-p3-Vektoren um Phagemide handelt, die sowohl als Plasmide als auch als Phagen-Vektoren fungieren können (Vieira & Messing 1987), kann die cfu der pfu gleichgesetzt werden.

Hierzu wurde von der Phagenpräparation eine Verdünnungsreihe von 10⁻⁴–10⁻¹⁰ in 2YT-Medium hergestellt. Mit 2,5 µl Phagensuspension der Verdünnungsstufen 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ und 10⁻¹⁰ wurden je 250 µl exponentiell wachsende *E. coli* XL1 *Blue*- oder TG F⁺-Bakterien (OD₆₀₀ = 0,5–0,7) in 2YT-Medium infiziert und für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je 100-µl-Aliquots einer infizierten Bakteriensuspension auf eine LB-Cm-Agarplatte und eine LB-Kan-Agarplatte pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle auf potentielle Kontaminationen wurde zusätzlich ein Ansatz mit PBS an Stelle der Phagen-Verdünnung auf LB-Amp, LB-Cm und LB-Kan ausplattiert. Durch Auszählen der Bakterienkolonien konnte die Anzahl infektiöser Phagenpartikel einer Phagenpräparation ermittelt werden.

2.2.2.4. AFFINITÄTSANREICHERUNG REKOMBINANTER PHAGEN (*PANNING*)

Die F_{ab} -assoziierten Phagen präsentieren das F_{ab} an der Phagenoberfläche. Diese Phagen können über haptenbeschichtete Festphasen selektiert werden. In der hier beschriebenen Selektionsmethode, dem *Panning*, diente eine Mikrotiterplatte als Festphase zur Selektion. Diese wurde abwechselnd mit Sulfonamid-Konjugaten beschichtet, die sich in ihren Trägerproteinen unterschieden. Es handelte sich um ein Sulfacetamid-Derivat (SA2) das entweder an BSA oder ConA gekoppelt war, bzw. um Sulfapyridin (SA1), das wahlweise mit OVA oder ConA konjugiert vorlag (Abbildung 8, Seite 41). Das Trägerprotein für die Haptene SA2 und SA1 sollte in den *Panning*-Runden abwechselnd eingesetzt werden, um eine Anreicherung von trägerprotein- und linkerspezifischen rekombinanten Phagen zu vermeiden. Die Phagenpräparation aus Kapitel 2.2.2.2 wurde parallel auf Klone mit Affinität zu HCH, dem Trägerprotein der Immunisierungskonjugate, durchgemustert.

Die Mikrotiterplatten (Greiner) wurden über Nacht bei 4 °C mit 300 µl/Kavität des Hapten-Konjugats SA2-BSA (10–50 µg/ml in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6) inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die unspezifische Bindung von Phagen an die Polystyrol-Oberfläche durch Absättigen freier Bindungsstellen mit 300 µl Magermilchpulver (2 % (w/v) in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur verringert. Während dieser Zeit wurden 150 µl Phagenlösung/Kavität mit 150 µl einer Mischung aus 5 % Magermilchpulver und 2 % Trägerprotein (BSA, ConA) in PBST 0,1 % auf einem Rotor für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBST (0,05 %) wurden 300 µl/Kavität der präinkubierten Phagen auf die Mikrotiterplatte aufgebracht und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift (Dauer und Anzahl richtete sich nach der *Panning*-Runde, siehe Tabelle 12, Seite 49), um nicht gebundene Phagenantikörper zu entfernen. Abschließend wurden die gebundenen Phagenantikörper mit 300 µl/Kavität 0,1 M Glycin/NaCl (pH 2,2) für 9 min eluiert und sofort mit Tris-HCl (pH 7,4) neutralisiert. Im Anschluss an die Anreicherungsexperimente wurden die Titer der Elutionsfraktionen bestimmt (siehe 2.2.2.3) und noch an demselben Tag die eluierten Phagen zur Infektion von Zellen verwendet (siehe 2.2.2.5).

TABELLE 12: WASCHSCHEMA FÜR DAS *PANNING*

<i>Panning</i> -Runde	Anzahl der Waschschriffe		
1	5 x PBST	3 min Pause	5 x PBS
2	10 x PBST	10 min Pause	10 x PBS
3	15 x PBST	20 min Pause	15 x PBS

2.2.2.5. AMPLIFIKATION VON ANGEREICHERTEN PHAGENPARTIKELN

Die bei der Affinitätsanreicherung durch Elution gewonnenen rekombinanten Phagen wurden amplifiziert, bevor sie einem erneuten Selektionszyklus zugeführt wurden. Dazu wurde eine exponentiell wachsende Kultur von *E. coli* TG F^+ verwendet.

Von dieser Kultur wurden 10 ml mit der auf 37 °C temperierten Phagemidlösung (1500 bzw. 1200 µl), die bei der Elution erhalten wurde, infiziert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen sedimentiert (4000 rpm, 4 °C, 5 min) und nach Abziehen des Überstandes in 1 ml 2YT-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf vier 2YT-Cm-Agarplatten ($\varnothing = 14,5$ cm) gleichmäßig verteilt und anschließend über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die

erhaltenen Kolonien wurden analog zu Kapitel 2.2.2.1 von den Platten geschabt, zentrifugiert und eine Glycerinkultur angelegt. Außerdem wurde mit 1,5 ml eine Midipräparation angesetzt.

Für weitere *Panning*-Runden mit rekombinanten Phagen wurden mit 100–1000 µl der Bakteriensuspension in 10 ml 2YT/Cm zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,1–0,15$ angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,5–0,7$ inkubiert. Die Infektion mit Helferphagen und das weitere Vorgehen zur Produktion und Aufarbeitung der rekombinanten Phagen erfolgten wie in den Abschnitten 2.2.2.2 bis 2.2.2.4 beschrieben.

2.2.2.6. SCREENING DER SELEKTIERTEN PHAGEMIDE

EXPRESSION VON LÖSLICHEN F_{AB}

Vom Phagenpartikel getrennte, als löslich bezeichnete F_{abs} lassen sich in ausreichender Menge in TG1 F^+ -Bakterien exprimieren. Das *Amber-Stop-Codon*, das sich zwischen dem 3'-Ende des F_{abs} und der 5'-Seite des GenIII-Teilstücks befindet, wird in dieser Suppressor-Linie zu etwa 10 % durch Glutamin ersetzt (Miller 1992).

Ein Glycerolstock infizierter Bakterien (siehe 2.2.2.5) wurde zur Amplifikation der Phagen aufgetaut und je 100 µl einer seriellen Verdünnung im Bereich von $10^{-6}–10^{-9}$ auf 2YTCm-Platten ausgebracht. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 30 °C. Nachdem Transfer von Einzelkolonien in 100 µl 2YTCm-Medium in die Kavitäten einer 96er-Zellkulturplatte schloss sich eine Inkubation für 2 h bei 30 °C und 200 rpm an. Es wurden für jede Platte Negativkontrollen, bestehend aus einer Kolonie naiver TG F^+ , mitgeführt. 25 µl je Kavität dieser Kulturen wurden in eine 96er Micronic-Platte mit je 1 ml 2YTCm-Medium überführt und bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 (ca. 2–4 h) hochgezogen. Währenddessen wurden die Zellkulturplatten als Sicherheitskopie (Masterplatten) nach Zusetzen von 50 µl Einfriermedium bei -70 °C gelagert.

Sobald die Micronic-Kulturen die gewünschte Trübung aufwiesen, wurde die F_{ab} -Expression durch Zugabe von 25 µl 2YT-Cm-Medium mit 0,2 µg/ml aTc je Kavität und Inkubation induziert und die Micronic-Platten für weitere 16–24 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen aus den Micronic-Gefäßen in 1,5-ml-Reaktionsgefäße gefüllt, die Bakterien sedimentiert (4000 rpm, 5 min, 4 °C) und der geklärte Kulturüberstand in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Der Kulturüberstand wurde direkt im *Screening-ELISA* eingesetzt. Der Rest der Überstände wurde bei -20 °C gelagert.

SCREENING DER EXPRIMIERTEN F_{AB} -FRAGMENTE IM ELISA

Die F_{abs} der aspirierten Kulturüberstände wurden im ELISA auf haptenspezifische Bindung und Verdrängung untersucht. Es wurde ein direkter, kompetitiver ELISA in 96er-Mikrotiterplatten durchgeführt. Da es sich hierbei um einen heterogenen Assay handelte, erfolgte nach jedem Inkubationsschritt ein Waschgang. Die Mikrotiterplatte wurde dazu dreimal mit 350 µl PBS-Waschpuffer je Kavität in einem ELISA-Waschautomaten gewaschen. Die Volumenangaben verstehen sich stets pro Kavität. Verdünnungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in 50 mM PBS, pH 7,4 vorgenommen.

Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit 200 µl des Hapten-Konjugats SA2-BSA oder HCH (5 µg/ml in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6) inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Platten wurden gewaschen und anschließend

die freien Bindungsstellen durch 1 h Inkubation mit 0,2 % BSA abgesättigt (bei HCH wurde kein Blockierungsschritt durchgeführt). Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation der Platte mit je 100 µl Kulturüberstand und 100 µl PBS bzw. Sulfonamid-Mix (siehe 2.1.6.2) oder HCH (1000 µg/l). Der Verdrängungsschritt wurde 1 h bei RT durchgeführt. Es wurden ebenfalls Positivkontrollen in Form von Serum der immunisierten Kaninchen #154 und #155 aufgetragen. Als Sekundärantikörper diente der Zg<Rb_{LC}>POD der Firma DIANOVA. Er wurde in einer Konzentration von 1:100 000 für 1 h eingesetzt. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 200 µl POD-Substrat für 40 min im Dunkeln. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 N H₂SO₄ gestoppt. Die Mikrotiterplatten wurden im MULTISCAN ELISA READER bei 450 nm ausgewertet.

2.2.3. PRODUKTION REKOMBINANTER PROTEINE IN *E. COLI*

Für die Produktion von F_{ab}-Fragmenten oder F_{ab}-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden die konstruierten Phagemide verwendet. Die Bakterienstämme wurden so gewählt, dass das *Ambler-Stop-Codon* zwischen V_HC_H und GenIII je nach Fragestellung erkannt oder supprimiert wurde. Durch die Kopplung der Strukturgene als Fusion mit dem Gen für eine bakterielle Signalsequenz (ompA bzw. rbs) erfolgte die Sekretion der Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum von *E. coli* (Skerra & Plückthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression konnte die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

2.2.3.1. PROTEINPRODUKTION IM ANALYTISCHEN MAßSTAB

Um die Produktion von Fusionsproteinen aus murinen oder leporiden F_{ab}-Fragmenten und dem Phagenhüllprotein pIII zu untersuchen, wurden Experimente im analytischen Maßstab durchgeführt (Zahn *et al.*, 1999). Dazu wurden Zellen von *E. coli* XL1 *Blue* oder TG1 F⁺ mit den zu untersuchenden Phagemiden transformiert. Mit je einer Einzelkolonie wurden Vorkulturen in 2 ml 2YTamp oder Cm angesetzt und für einige Stunden bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Je 25 ml LB Amp oder Cm wurden mit den Vorkulturen zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,05 inokuliert und bei einer Temperatur von 26 °C oder 30 °C im Schüttler kultiviert. Bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 wurde der *tet*-Promotor mit aTc induziert. Dabei wurde aTc als Stammlösung mit der Endkonzentration von 200 µg/l zugegeben. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit dem Expressionsvektor, der kein GenIII enthielt, mit kultiviert. Die Bakterien wurden nach 2,5 h Expression geerntet. Zur späteren Analyse der Proteinproduktion wurden Proben des Gesamtzellproteins präpariert. Dazu wurde 1 ml der Kultur entnommen, zentrifugiert (18 500 g, 4 °C, 2 min) und der Überstand abgezogen. Die Zellen wurden in 80 µl Benzonase-Lösung (12,5 U/ml in Benzonase-Puffer) resuspendiert und mit 20 µl 5 x Auftragspuffer (reduzierend) für die SDS-PAGE gemischt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gesamtzellprotein bei -20 °C eingefroren oder nach Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) für die SDS-PAGE verwendet.

Sollte die subzelluläre Verteilung der exprimierten Proteine untersucht werden, dann wurde 1 ml der Bakterienkultur in Kulturüberstand, die periplasmatische Fraktion, die cytoplasmatische Fraktion und Membran sowie Einschlußkörper aufgespalten. Hierzu wurde wie in Sambrook & Russell (2001) vorgegangen. Die Proteine im Kulturüberstand wurden mit 1/4 Volumen 100 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat zweimal mit 1/4 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen

der Proteinlösung) Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde nach dem Trocknen in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die periplasmatische Fraktion wurde durch 10 minütige Inkubation in 100 µl periplasmatischem Aufschlußpuffer auf Eis erhalten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 000 rpm, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand (Periplasma) auf Eis aufbewahrt. Der Rückstand, der die Sphäroplasten enthielt, wurde in 100 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert und die Sphäroplasten durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört. Ein weiterer Zentrifugationsschritt trennte die cytoplasmatische Fraktion (Überstand) von der Membranfraktion, die auch mögliche Einschlußkörper (Rückstand) enthielt. Der Rückstand wurde ebenfalls in 100 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Alle Fraktionen wurden in 5 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließendem *Western Blot* analysiert.

2.2.3.2. PROTEINPRODUKTION IM 700-ML-MAßSTAB

Für die Produktion rekombinanter Proteine im 700-ml-Maßstab wurden 50 ml LB-Medium, das je nach verwendetem Plasmid mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum versetzt worden war, mit einer Einzelkolonie des mit dem entsprechenden Plasmid transformierten JM83-Stammes über Nacht bei 30 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Die Produktionskultur (700 ml LB-Medium mit Antibiotikum) wurde im Verhältnis 1:50 mit der Vorkultur angeimpft und bei 22 °C (bei Verwendung des Stammes *E. coli* XL1 *Blue* bei 26 °C) bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ im Schüttler bei 200 rpm kultiviert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von aTc zu einer Endkonzentration von 200 µg/l induziert (Skerra, 1994b) und die Bakterien für weitere 3 h im Schüttler kultiviert.

Zur Präparation der periplasmatischen Fraktion der Zellen wurde die Kultur zentrifugiert (5 000 rpm, 4 °C, 12 min), der Überstand vollständig verworfen und das Sediment in insgesamt 1/100 Kulturvolumen eiskaltem periplasmatischem Aufschlußpuffer unter Vermeidung von Schaumbildung zügig resuspendiert. Anschließend wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Sphäroplasten durch Zentrifugation abgetrennt wurden (5 000 rpm, 4 °C, 10 min). Nach erneuter Zentrifugation (15 000 rpm, 4 °C, 15 min) wurde das erhaltene periplasmatische Extrakt über Nacht gegen das 100fache Volumen Dialysepuffer dialysiert und abschließend sterilfiltriert (0,22 µm) und bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde das rekombinante Protein mittels Affinitätschromatographie (siehe 2.3.2) isoliert. Den Kulturen wurden je 1 ml entnommen und das Gesamtzellprotein präpariert (siehe 2.2.4.1).

2.2.4. PROTEINCHEMISCHE METHODEN

2.2.4.1. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Größe wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet. Dabei kam das diskontinuierliche Puffersystem von Fling & Gregerson (1986) zur Anwendung, welches als Hochsalz-Variante der Methode von Laemmli (1970) eine verbesserte Auflösung zeigt. Im Anschluss an die Auftrennung im elektrischen Feld wurden die Proteine durch Anfärben sichtbar gemacht. Alternativ dazu wurde ein *Western Blot* (2.2.5.1) angefertigt.

Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden 10%ige oder 12%ige SDS-Polyacrylamidtrenngele verwendet. Bei rekombinanten AK-Fragmenten wurden, sofern nötig, 12%ige SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgele zur Trennung benutzt, da in Gegenwart von 6 M

Harnstoff mitunter eine Auftrennung der einzelnen Ketten bei sehr ähnlicher Masse erreicht wird (Skerra, 1994a).

TABELLE 13: PIPETTIERSCHEMA TRENN- UND SAMMELGELE FÜR SDS-ELEKTROPHORESE

	Trenngel 12 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Wasser	1,5 ml	2,25 ml	2,82 ml
Acrylamidlösung (30 %)	2,0 ml	1,5 ml	660 µl
Trenn-/Sammel-Gelpuffer	1,25 ml	1,25 ml	500 µl
Harnstoff (bei Bedarf)	1,8 g	--	1,08 g
SDS (10 %)	45 µl	45 µl	45 µl
APS (20 %)	35 µl	35 µl	12 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl
Gesamtvolumen	5 ml	5 ml	4 ml

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5 x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. In die Probentaschen des polymerisierten Gels wurde dann zwischen 5 µl und 20 µl Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von 1 x SDS-Laufpuffer mit 120 V und 30 mA betrieben. Nach Erreichen der unteren Gelkante des Bromphenolblau-Markers (ca. 2 h) wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel entnommen und mit PAGEBLUE™ PROTEIN STAINING SOLUTION der Firma FERMENTAS nach Angaben des Herstellers gefärbt. Die Gele wurden mit dem IMAGING DENSITOMETER GS-710 der Firma BIORAD dokumentiert. Alternativ wurde gleich im Anschluss an die Elektrophorese mit den Gelen ein *Western Blot* durchgeführt.

2.2.4.2. AUFKONZENTRATION VON PROTEINEN

Für verschiedene Experimente waren Lösungen mit hoher Proteinkonzentration notwendig. Dazu wurde das gereinigte Protein mittels einer Konzentratoreinheit (VIVASPIN) mit einer geeigneten Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (4 °C, 3 000 rpm) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein abzentrifugiert (4 °C, 20 min, 14 000 rpm) und der Überstand abgenommen. Die Konzentration einer 1:10 verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Um die Unversehrtheit der Ultrafiltrationsmembran sicherzustellen, wurde auch der Proteingehalt des Filtrats untersucht.

2.2.4.3. BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Konzentration einer Proteinlösung lässt sich photometrisch mittels des Lambert-Beer'schen-Gesetzes bestimmen, wobei die Genauigkeit je nach vorhandener Vorinformation variiert.

Kennt man die Aminosäuresequenz, so lässt sich der Absorptionsfaktor bei 280 nm (ϵ_{280}) berechnen und die Proteinkonzentration einer sauberen, wässrigen Lösung damit genau bestimmen (Gill & von Hippel, 1989; Pace *et al.*, 1995). Der molare Absorptionskoeffizient ϵ eines Proteins ergibt sich aus der Summe der Absorptionen der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie freier und gebundener Cysteinseitenketten bei 280 nm ($A_{\text{Trp}} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $A_{\text{Trp}} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $A_{\text{Cystine}} = 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

$$A = \varepsilon * c * d$$

FORMEL 3: LAMBERT-BEERSCHE-GESETZ

Außerdem hat die Absorption eventuell vorhandener prosthetischer Gruppen wie z.B. FAD einen Einfluss. Die molaren Absorptionskoeffizienten wurden jeweils mit Hilfe der Computerprogramme VECTOR NTI TRANSLATE (VECTOR NTI) und EXPASY PROTPARAM (EXPASY) errechnet (Tabelle 14, Seite 54).

TABELLE 14: MOLARE ABSORPTIONSKOEFFIZIENTEN FÜR DIE VERWENDETEN REKOMBINANTEN PROTEINE

Protein	$\varepsilon_{280} [M^{-1}cm^{-1}]$
F _{ab} K411B	79 300
F _{ab} SA2 23	76 780
F _{ab} SA2 90	76 780

2.2.5. IMMUNCHEMISCHE METHODEN

2.2.5.1. WESTERN BLOT

Um Proteine immunchemisch in einem Proteingemisch nachzuweisen, wurde die Methode des *Western Blot* (Towbin *et al.*, 1979) benutzt. Dabei werden Proteine zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine Membran übertragen. Danach wird das nachzuweisende Protein mit einem spezifischen AK selektiv angefärbt.

TABELLE 15: LISTE DER DETEKTIONSANTIKÖRPER FÜR DEN WESTERN BLOT

Zielprotein	Detektionsantikörper	Verdünnung
Murines K411B	Ziege<Maus>POD, Sigma	1:3000
	Ziege<Maus _{HC/LC} >POD, Sigma	1:5000
leporides F _{ab}	Ziege<Kaninchen>HRP, Promega	1:2500
	Ziege<Kaninchen _{LC} >HRP, Dianova	1:10 000
His ₆ -Tag	Maus<His-Tag>, Roche	1:500
	Maus<His-Tag>HRP, Invitrogen	1:1000
	Maus<His ₆ >POD, Roche	1:500
pIII	Maus<pIII>, MoBiTec	1:1000

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine IMMOBILONP-MEMBRAN erfolgte für 1–2 h bei 1 mA/cm² Gel- bzw. Membranfläche. Nach einem erfolgten Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit PBST (0,5 %) mit 3 % (w/v) BSA abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für 10 min mit PBST (0,1 %) und einmal für 10 min mit PBS gewaschen, bevor sie mit einem primären AK oder direkt mit einem POD-konjugierten AK in einer geeigneten Verdünnung in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen. Das nachzuweisende Protein wurde bei Bedarf mit einem geeigneten sekundären, POD-konjugierten AK in den angegebenen Verdünnungen (Tabelle 15, Seite 54) in PBS für 1 h bei Raumtemperatur identifiziert. Nach dem erneuten Waschen der Membran wurde sie mit

durch Zugabe von 25 ml *Western Blot* POD-Substrat entwickelt. Bei Erreichen des gewünschten Anfärbegrades wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran schließlich an der Luft getrocknet.

2.2.5.2. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Durch einen ELISA können geringe Mengen eines bestimmten Antigens durch spezifisch bindende AK, AK-Fragmente oder Phagen-Antikörper nachgewiesen werden. Es wurden 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten über Nacht bei 4 °C mit 50–100 µl/Kavität Antigen oder AK in einer geeigneten Konzentration in Carbonatpuffer beschichtet. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 2 % (w/v) MMP, BSA oder OVA in PBS (100–200 µl/Kavität) für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Platten wurden dreimal mit PBST gewaschen und zum Nachweis der Spezifität von AK, AK-Fragmenten oder Phagen-Antikörpern eingesetzt.

NACHWEIS DER BINDUNGSAKTIVITÄT

Für den Nachweis von löslichen K411B- oder Sulfomamid-F_{ab}-Fragmenten wurde ein kompetitives Assayformat mit indirektem Nachweis gewählt. Hierfür wurde entweder Atrazin-OVA-Konjugat (2,5 µg/ml) bzw. SA2-BSA-Konjugat (5 µg/ml) in 100 µl Carbonatpuffer auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert und anschließend die Bindung von löslichen F_{ab}, im Falle von K411B mithilfe eines sekundären Ziege<Maus_{HC/LC}>POD-AKs und im Falle von Sulfonamid-F_{ab} durch Einsatz eines Ziege<Kaninchen_{LC}>POD-AKs, nachgewiesen.

Für die Detektion von K411B-pIII-Fusionsproteinen wurde ein kompetitiver Assayaufbau mit direktem Nachweis gewählt. Dazu wurden die Kavitäten mit 50 µl eines 1:1000 verdünnten Maus<pIII>AKs beschichtet. Nach Zugabe von 50 µl periplasmatischen Extrakt wurde durch die Konkurrenz zwischen Atrazin-*Tracer* (1:5 000 vorverdünnt) und freiem Atrazin (1000 µg/l) um die Bindungsstellen eine Farbreaktion hervorgerufen.

Die Entwicklung aller Tests erfolgte durch Zugabe von je 50–100 µl POD-Substratpuffer und 40 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde mit 25–50 µl/Kavität 1 M H₂SO₄ abgestoppt und abschließend die Absorption bei 450 nm und der Referenzabsorption bei 620 nm im TECAN-ELISA-READER gemessen.

PHAGEN-ELISA

Durch einen sogenannten Phagen-ELISA konnte überprüft werden, an welche Antigene die in einer Phagenpräparation bzw. einem Phagenüberstand enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper binden.

Die Tests auf Phagen-K411B wurden im direkten, kompetitiven ELISA durchgeführt. Dafür wurden Verdünnungen der unter 2.2.2.2 erhaltenen Phagenpräparate in 50 µl Carbonatpuffer direkt bei 4 °C über Nacht auf den Mikrotiterplatten immobilisiert. Am nächsten Tag wurde durch die Verdrängung des Atrazin-*Tracers* der rekombinante Phage nachgewiesen.

Für den Nachweis der Spezifität der Sulfonamid-Phagen wurden ebenfalls Verdünnungsreihen der Phagenpräparation in PBS hergestellt. Zum Nachweis der Spezifität der rekombinanten Phagenantikörper wurden 50 µl/Kavität der Verdünnungsstufen für 1 h bei Raumtemperatur auf einer mit SA2-BSA oder SA2-ConA beschichteten und mit BSA oder ConA blockierten Mikrotiterplatte inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch Zugabe von

Maus<M13>HRP-AK (Amersham). Die Entwicklung aller Tests erfolgte durch Zugabe von je 50 µl/Kavität POD-Substratpuffer und 40 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde mit 25 µl /Kavität 1 M H₂SO₄ abgestoppt und abschließend die Absorption bei 450 nm und 620 nm im TECAN-ELISA-READER gemessen.

2.2.6. COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN

2.2.6.1. COMPUTERPROGRAMME

Zur Analyse und Bearbeitung von DNS- und Protein-Sequenzdateien wurde das Programmpaket VECTOR NTI ADVANCE (Version 10(2), INVITROGEN, Deutschland) verwendet.

Proteingele und *Western Blot* Membranen wurden mit der Software PD QUEST UND QUANTITY ONE der Firma BIORAD eingescannt und analysiert.

Agarosegele wurden mit dem Geldokumentationssystem von LTF LABORTECHNIK fotografiert und gespeichert.

Bilder von Gelen und Membranen wurden mit Hilfe des Programms ADOBE PHOTOSHOP 5.0 (ADOBE SYSTEMS INC.) digitalisiert und das erhaltene Bild hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Die Auswertung von Messdaten sowie deren grafische Darstellung und Statistik erfolgte mit Hilfe des Programmes ORIGIN (Version 6.0, MICROCAL, Northhampton, USA).

Alle Programme wurden unter WINDOWS XP PROFESSIONAL ausgeführt.

2.2.6.2. DATENBANKEN

Sequenz- und Strukturdaten von Genen und Proteinen wurden unter Verwendung folgender im *World Wide Web* zugänglicher Datenbanken erhalten und analysiert:

PROTEIN DATA BANK	http://www.rcsb.org/pdb
EXPASY MOLECULAR BIOLOGY SERVER	http://www.expasy.ch
KABATMAN (Martin, 1996)	http://www.bioinf.org.uk/abs
AHO'S	http://www.bioc.uzh.ch/antibody/
PROTONET	http://www.protonet.cs.huji.ac.il
GENBANK	http://www.psc.edu/general/software/packages/genbank/genbank.html
CLUSTALW	http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
IMMUNOGENETICS	http://imgt.cines.fr:8104
CBS	http://www.cbs.dtu.dk/services/
REGULONDB 5.5	http://regulondb.ccg.unam.mx/
MFOLD	http://bioweb.pasteur.fr/cgi-bin/seqanal/mfold.pl

3. ERGEBNISSE

3.1. KONSTRUKTION DER PHAGEMIDE

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines Phagemids, das sich zum *Phage Display* mit leporiden Antikörpersequenzen eignet. Um Phagemide mit den unter 1.3.1 beschriebenen Eigenschaften zu erhalten, diente als Ausgangsmaterial der Expressionsvektor pASK85-K411B (Abbildung 6, Seite 23). Durch die Verwendung von pASK85-K411B konnten schon zu Beginn der Arbeiten fünf der sieben geforderten Eigenschaften für die zukünftigen Phagemide erfüllt werden. Die erfolgreiche Insertion des GenIII und der Austausch des Resistenzmarkers auf dem Vektor pASK85-K411B konnten in den Phagemiden pASK85-p3-K411B und pASK115-p3-K411B realisiert werden. Durch das Design und den Einbau einer für Kaninchen-Antikörpergene entworfenen *Cloning Site* wurden die Phagemide pASK85_{R_{ab}}-p3 und pASK111_{R_{ab}}-p3-WR erhalten. Die prinzipielle Funktionalität der R_{ab}CS konnte durch die Insertion des murinen F_{ab}-Fragments K411B gezeigt werden. Insgesamt wurden drei für das *Phage Display* mit murinen und leporiden AK-Fragmenten geeignete Vektoren hergestellt.

3.1.1. pASK85-p3-K411B FÜR MURINE AK-GENE

3.1.1.1. KLONIERUNG VON pASK85-p3-K411B

Um den Expressionsvektor pASK85-K411B in ein Phagemid umzuwandeln, wurde das Gen für das virale pIII in das Plasmid integriert. Dies sollte als Fusionsgen mit der leichten Kette des murinen F_{ab}-Fragmentes K411B, getrennt durch ein *Amber-Stopp-Codon*, geschehen. Dazu war vorbereitend die Einführung einer *SacII*-Schnittstelle vor dem *Amber-Stopp-Codon* notwendig, um das GenIII-Insert im Leserahmen mit der leichten Kette einführen zu können (Abbildung 10A, Seite 59). Die Mutation des *Amber-Stopp-Codons* zu Prolin und die stille Mutation des angrenzenden Argininrestes am C-Terminus der leichten Kette erfolgten durch ortsgerichtete Mutagenese (Braman *et al.*, 1996). Mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide „MUTATION pASK85 (SACII) SENSE und –ANTI“ wurden die beiden C-terminalen Aminosäurereste der leichten Kette verändert und dadurch eine *SacII*-Restriktionsschnittstelle in der Hybridisierungsregion inseriert, die zugleich zur späteren Identifizierung der Mutation genutzt wurde.

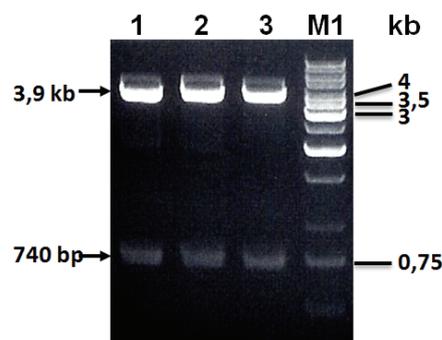


ABBILDUNG 9: KONTROLLVERDAU VON pASK85-K411B.1

SPUR 1-3: RESTRIKTIONSVERDAU VON DREI KLONEN MIT DEN ENDONUKLEASEN *SACII/NCOI*; M1: 1 KB MARKER. DIE ERFOLGREICHE INSERTION DER *SACII*-SCHNITTSTELLE ZEIGT SICH DURCH DEN ERHALT DER BANDE BEI 740 BP

Die Plasmid-DNS von drei der erhaltenen Klone wurde isoliert und einer Restriktionsanalyse mit *SacII* und *NcoI* unterzogen. Alle drei Klone wiesen die neue *SacII*-Erkennungssequenz auf. Ersichtlich war dies durch den Erhalt zweier Banden bei 736 bp und 3902 bp (Abbildung 9, Seite 57). Das Plasmid wurde als pASK85-K411B.1 bezeichnet.

Das mittels PCR aus dem Phagemid pCantab5E-K47H (Kramer *et al.*, 2002a) mit den Primern „PCANTAB SENSE (*SACII*)“ und „GENIII ANTI (*HINDIII*)“ amplifizierte Gen des pIII wurde in den Vektor pASK85-K411B.2 kloniert (Abbildung 10B, Seite 59). Da die zur Amplifikation des GenIII verwendeten Oligodesoxynukleotide am 5'- und 3'-Ende der Amplifikate *SacII* und *HindIII* Erkennungssequenzen in dies mit Pfu-DNS-Polymerase erzeugten PCR-Fragmente einführten, konnte das amplifizierte Gen über die im Vektor vorhandenen Erkennungssequenzen für *SacII* und *HindIII* eingeführt werden. Des Weiteren wurde das *Amber-Stop-Codon* durch den Sense-Primer wieder in den Vektor eingefügt. Zur Konstruktion des Vektors wurden das Amplifikat und der Vektor pASK85-K411B.2 mit *SacII* und *HindIII* geschnitten und die entstandenen Fragmente (4648 bp und 1200 bp) isoliert. Nach erfolgter Ligation wurde die Insertion des GenIII durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *XhoI* und *HindIII* analysiert (Abbildung 10C). Durch Restriktionsanalyse von acht Klonen konnten vier Klone ermittelt werden, die das gewünschte *Insert* trugen.

Die Identität des GenIII-*Inserts* und die Sequenz des Vektors wurde durch Sequenzierung mittels der Oligodesoxynukleotide „MUTATION *SAL*I PASK85 SENSE, -ANTI, SEQ F1 ORI FOR, SEQ AMBER-STOPP FOR, SEQ GEN3 MITTE FOR, SEQ COLE1 FOR, SEQ COLE1/TETR REV, PASK-IBA3', PASK-IBA5'UND GIIIN“ bestätigt. Eines der erhaltenen Plasmide mit der korrekten Sequenz (siehe Anhang C1) wurde als pASK85-p3-K411B (5830 bp) bezeichnet (Abbildung 10C, Seite 59).

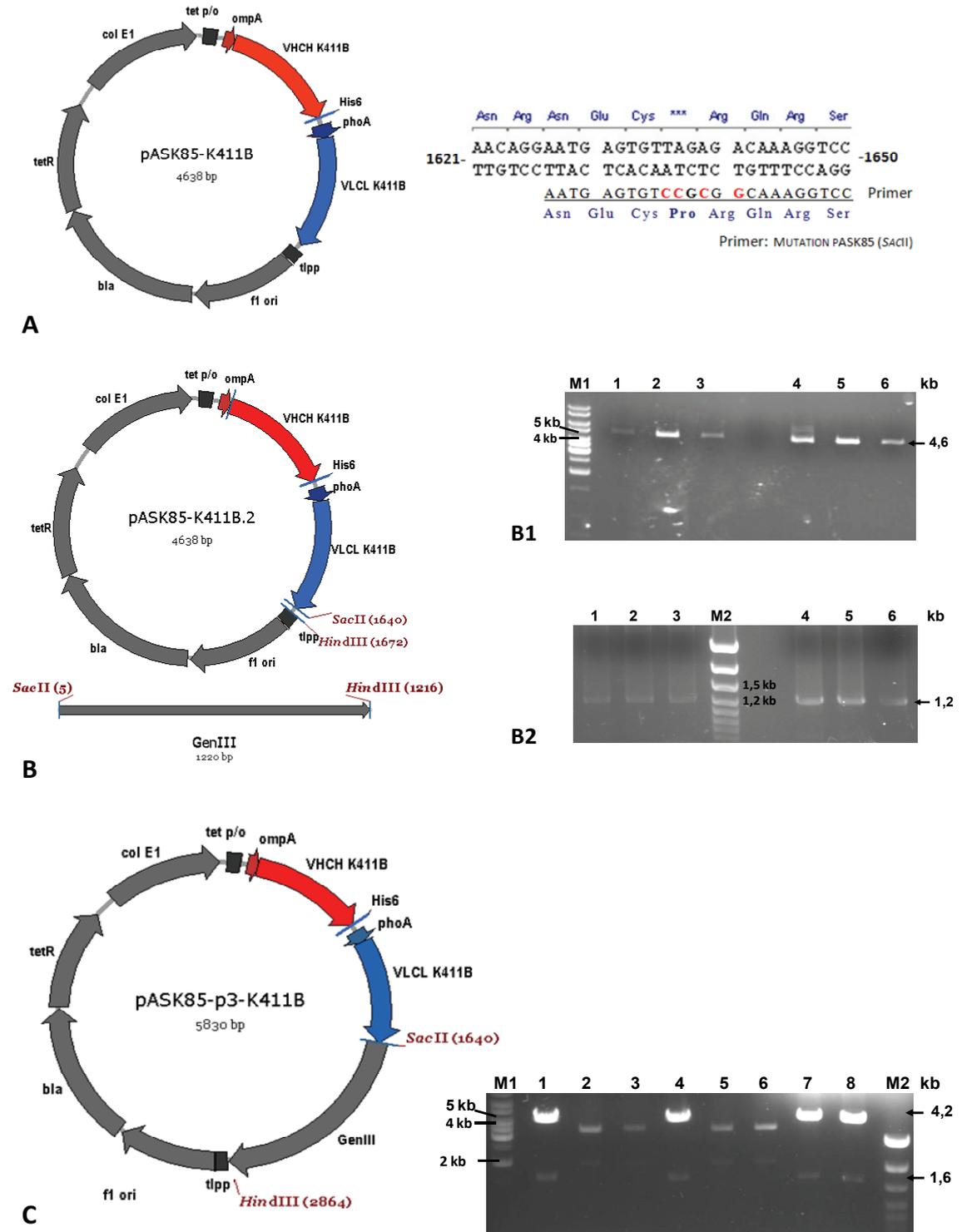


ABBILDUNG 10: KLONIERUNGSSTRATEGIE FÜR PASK85-P3-K411B

(A) ORTSGERICHTETE MUTAGENESE ZUR EINFÜHRUNG DER SACII-ERKENNUNGSSEQUENZ (1636–1641 BP) IN DEN VEKTOR PASK85-K411B; RECHTS: DNS-SEQUENZ FÜR DIE ZU MUTIERENDE GENREGION IN DER MURINEN C_L, AUSGEHEND VOM PLASMID PASK85-K411B. DIE AMINOSÄURESEQUENZ IST ÜBER DER DNS-SEQUENZ ANGEZEIGT. DIE DURCH DIE PRIMER DETERMINIERTEN MUTATIONEN, DIE ZUR EINFÜHRUNG DER SACII-ERKENNUNGSSEQUENZ FÜHREN, SIND IN ROT DARGESTELLT. (B) RESTRIKTION VON PASK85-K411B.2 UND DEN GENIII-AMPLIFIKATEN MIT DEN ENDONUKLEASEN SACII UND HINDIII (B1) AGAROSEGEL DES RESTRIKTIONSVERDAUS VON PASK85-K411B.2 UND (B2) AGAROSEGEL DES RESTRIKTIONSVERDAUS DES INSERTS. JEWEILS AUFGETRAGEN AUF SECHS GELSPUREN. (C) LINKS: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PHAGEMIDS PASK85-P3-K411B. DAS STRUKTURGEN FÜR DIE LEICHTE KETTE IST ZWISCHEN DIE SEQUENZ FÜR DAS PHOA-SIGNALPEPTID UND DIE SEQUENZ FÜR DAS PIII INSERIERT. DIE GENKASSETTE STEHT UNTER DER TRANSKRIPTIONSKONTROLLE DES TET^{P/O}. RECHTS: AGAROSEGEL DES KONTROLLVERDAUS VON ACHT PASK85-P3-K411B KLONEN MIT DEN ENDONUKLEASEN XHOI UND HINDIII. DIE KLONE DER SPUREN 1, 4, 7 UND 8 ENTHALTEN GENIII. M1: 1 KB MARKER; M2: 100-BP-PLUS-MARKER

3.1.1.2. FUNKTIONSANALYSE

Das Phagemid wurde auf die funktionelle Expression des Fusionsproteins und des F_{ab}-Fragments im *Western Blot* und ELISA getestet. Dazu wurde analog dem Protokoll zur Herstellung rekombinanter Proteine im präparativen Maßstab (siehe 2.2.3.1) und rekombinanter Phagen (siehe 2.2.2.2) vorgegangen. Es wurde ein nichtreduzierendes SDS-Gel durchgeführt. Auf die Spuren wurden je 10 µl Proteinpräparation aus dem Periplasma (Spur 1), Cytoplasma (Spur 3) und Membran/Einschlusskörperchen (Spur 2) aufgetragen. Als Kontrolle für den GenIII-spezifischen Ms<pIII>AK (MOBITEC) und den sekundären Ziege<Maus>POD-AK (SIGMA), mit dem der Blot entwickelt wurde, wurden 2 µl über IMAC aufgereinigter K411B und 10 µl Wildtyp M13K07-Phagen mit aufgetragen. Auf dem Blot (Abbildung 11) wurden in der periplasmatischen Fraktion und in der Membran/Einschlusskörperchen-Fraktion Banden gefunden, die sich dem F_{ab}-Fragment (45 kDa), dem Wildtyp pIII (60 kDa), dem Fusionsprotein LC-pIII (85 kDa) und dem F_{ab}-pIII (110 kDa) zuordnen ließen. Die Banden für das Wildtyp pIII (60 kDa), das Fusionsprotein V_LC_L-pIII (85 kDa) und dem F_{ab}-pIII (110 kDa) konnten auch im Kulturüberstand in kleineren Mengen nachgewiesen werden.

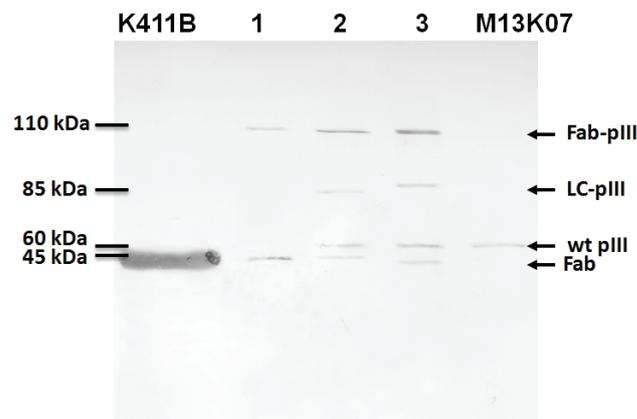


ABBILDUNG 11: WESTERN BLOT ZUM TEST DER K411B- UND K411B-PIII-EXPRESSION MIT PASK85-P3-K411B IN TG1 F⁺
 AUF EIN 10 %IGES SDS POLYACRYLAMIDGEL WURDE VON RECHTS NACH LINKS PORBEN VON K411B, PERIPLASMA (SPUR 1),
 MEMBRAN/EINSCHLUSSKÖRPERCHEN (SPUR 2), CYTOPLASMA (SPUR 3) UND M13K07-PHAGEN AUFGETRAGEN. NACH DEM
 ELEKTROTRANSFER AUF EINE IMMOBILONP-MEMBRAN, WURDE DES GENIII MITTELS DES MS<PIII>- UND DES SEKUNDÄREN
 ZIEGE<MAUS>POD-AK NACHGEWIESEN. DIE SUBSTRATREAKTION ERFOLGTE DURCH ZUGABE VON WESTERN BLOT POD-SUB-
 STRAT (ABSCHNITT 2.2.5.1, SEITE 54)

Durch einen kompetitiven ELISA wurde die Funktionalität der exprimierten F_{ab}-Fragmente bestätigt. 200 µl Dialysat der periplasmatischen Fraktion wurden für 1 h auf Mikrotiterplatten inkubiert, die über Nacht mit 5 µg/ml Ziege<Maus>AK (SIGMA) beschichtet worden waren. Es wurden jeweils Doppelwerte verschiedener Verdünnungsstufen (Unverdünnt, 1:2 und 1:5 verdünnt) aufgetragen. Nach dem Waschen wurden 200 µl einer Mischung aus 150 µl Atrazin (10³ µg/l) und 50 µl eines Atrazin-Tracer-Derivats oder 150 µl PBS und 50 µl eines Atrazin-Tracer-Derivats für eine weitere Stunde zugegeben. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe von je 200 µl /Kavität POD-Substratpuffer und 20 min Inkubation. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl pro Kavität 1 M H₂SO₄ abgestoppt und bei 450 nm ausgewertet. Es zeigte sich in allen Verdünnungsstufen eine starke Verdrängung mit Absorptionsunterschieden von 1,16–0,78 zwischen dem PBS-Wert und dem Atrazin-Wert. Diese Werte spiegelten sich auch in der Positivkontrolle wider, in welche eine 1:20 000-Verdünnung eines über IMAC-gereinigten K411B aufgetragen worden war.

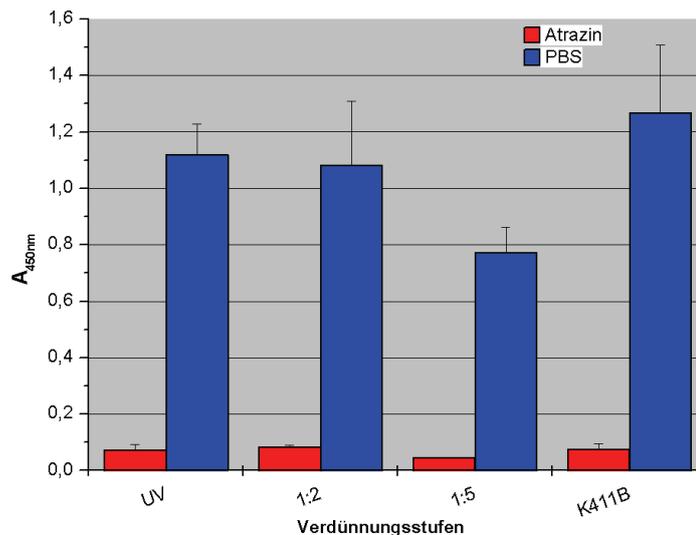


ABBILDUNG 12: AUSWERTUNG ATRAZIN-VERDRÄNGUNGS-ELISA MIT IN PASK85-P3-K411B EXPRIMIERTEN F_{AB}-FRAGMENTEN AUF ÜBER NACHT MIT ZIEGE<MAUS>AK BESCHICHTETEN MIKROTITERPLATTEN WURDEN JE 200 µL DIALYSAT DER PERIPLASMATISCHEN FRAKTION IN DREI VERDÜNNUNGSSTUFEN ((UV) UNVERDÜNNT, 1:2, UND 1:5 VERDÜNNT) UND AFFINITÄTSGEREINIGTER K411B (1:20 000 VERDÜNNT) IN DOPPELWERTEN AUFGETRAGEN. DIE VERDRÄNGUNG DES ATRAZIN-TRACERS ERFOLGTE MIT 10³ µG/L ATRAZIN. DIE SUSTRATREAKTION WURDE DURCH ZUGABE VON ELISA POD-SUBSTRAT GESTARTET

3.1.2. pASK115-p3-K411B FÜR MURINE AK-GENE

Das Enzym β -Lactamase, welches die Hydrolyse des Antibiotikums Ampicillin bewirkt, kann während des Wachstums der Produktionskultur in das Medium gelangen, wenn die rekombinante Produktion von für das Wirtsbakterium toxischen Proteinen zu einer erhöhten Permeabilität der Bakterienwand oder zur Lyse der Zelle führt. Durch die Präsenz des hochaktiven Enzyms im Kulturmedium wird das Antibiotikum abgebaut, wodurch Zellen, die ihr Plasmid verloren haben und deshalb weder Plasmid-DNS replizieren, transkribieren noch entsprechende Genprodukte synthetisieren müssen, einen Wachstumsvorteil gegenüber plasmidtragenden Zellen erhalten.

Das Antibiotikum Chloramphenicol inhibiert die Peptidyl-Transferase auf der großen (50 S) Untereinheit prokaryotischer Ribosomen und damit die Proteinbiosynthese. Das cytoplasmatische Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase, dessen Gen als plasmidkodierter Resistenzmarker dient, katalysiert die Acetylierung des Antibiotikums mit dem Coenzym Acetyl-CoA und führt damit zu dessen Inaktivierung. Gelangt bei der Kultivierung chloramphenicolresistenter Bakterien das Enzym durch vollständige Lyse in das Medium, so führt dies dennoch nicht zur Inaktivierung des Antibiotikums, da das zur Umsetzung notwendige Coenzym dort nur in vernachlässigbar geringer Konzentration vorhanden ist. Die Verwendung von Vektoren, die das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase konstitutiv exprimierten, sollte den Plasmidverlust in der Amplifikationskultur gering halten und so – verglichen mit der Verwendung von Ampicillin als Resistenzmarker – zu einer stabileren Ausbeute an rekombinantem Phagen führen (Fiedler & Skerra, 2001). Um den Einfluss von Antibiotika-Resistenzen auf das Wachstum, die Infektionsrate und die Ausbeute von rekombinanten Phagen untersuchen zu können, wurde ein zu pASK85-p3-K411B korrespondierendes Phagemid mit einer Chloramphenicolresistenz hergestellt. Ein entsprechender Vektor mit dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen anstatt des β -Lactamase-Gens wurde durch Umklonierung der gesamten, für das murine K411B-F_{ab}-Fragment kodierenden Genkassette, in

pASK111R_{ab}-p3-K411B (leporide *Cloning Site*) hergestellt. Hierzu wurde der Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Sac*II von pASK85-p3-K411B geschnitten (1513 bp) und mit dem ebenso behandelten Vektorfragment von pASK111R_{ab}-p3-K411B (4118 bp; siehe 3.1.4) ligiert (Abbildung 13A). Der erhaltene Vektor wurde als pASK115-p3-K411B bezeichnet. In den neuen Phagemid ist das Strukturgen für die leichte Kette zwischen die Sequenz für das *phoA*-Signalpeptid und die Sequenz für das *pIII* inseriert. Die Genkassette steht unter der Transkriptionskontrolle des *tet*-Promotors. Das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase ist als erstes Element in einem dicistronischen Operon vor dem *tet*-Repressor-Gen angeordnet. Die übrigen Elemente sind wie in Abbildung 7 (Seite 23) beschrieben.

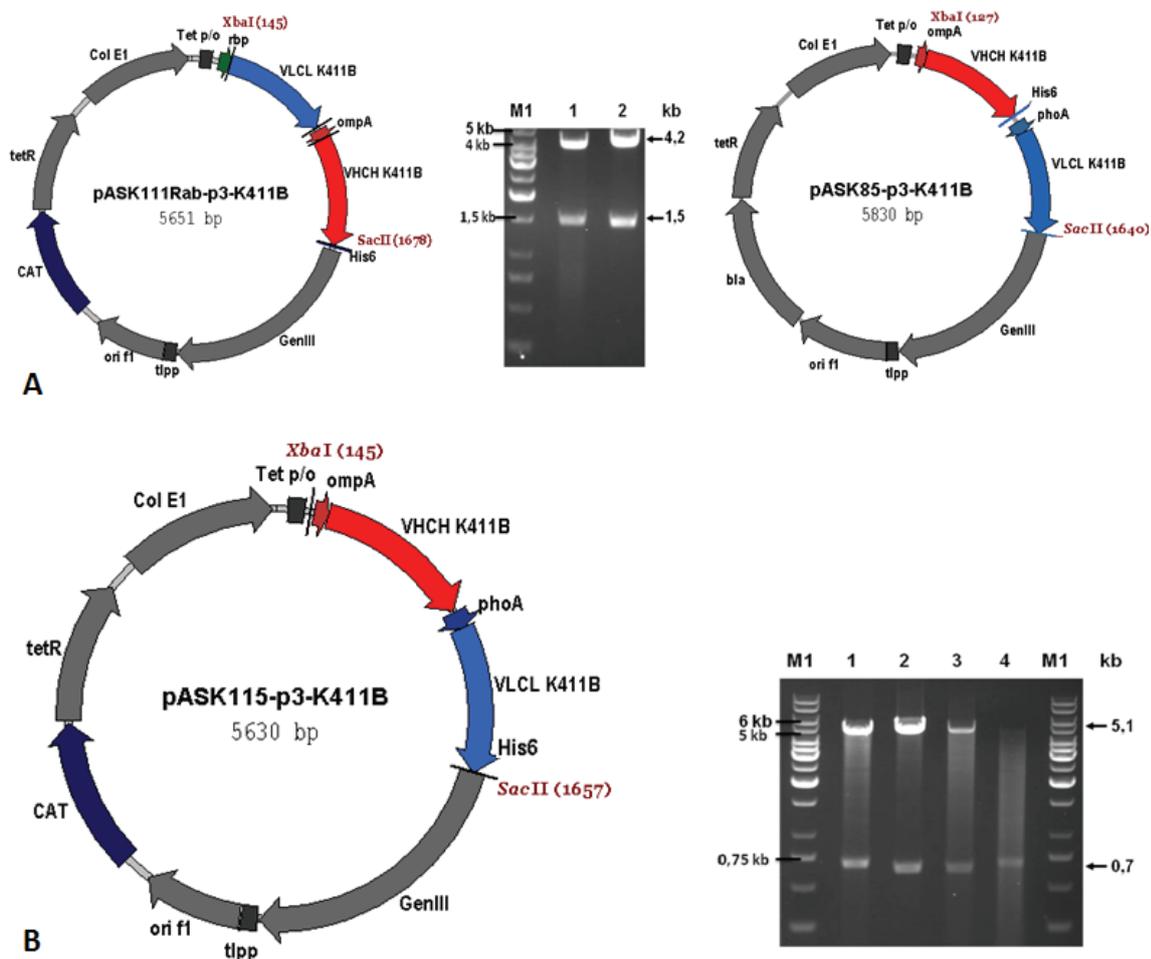


ABBILDUNG 13: KONSTRUKTION DES PHAGEMIDS PASK115-P3-K411B

(A) RESTRIKTION VON PASK111R_{AB}-P3-K411B (SPUR 1) UND PASK85-K411B (SPUR 2) MIT DEN ENDONUKLEASEN *XBA*I UND *SAC*II
 (B) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PHAGEMIDS PASK115R_{AB}-P3-K411B; RECHTS: KONTROLLVERDAU VON ZWEI KLONEN MIT DEN ENDONUKLEASEN *XBA*I/*NCO*I (SPUR 2+3) UND *SAC*I/*SAC*II (SPUR 1+4) (KLON 1: SPUREN 1+2, KLON 2: SPUREN 3+4; M1: 1-KB-MARKER)

Über eine Analyse von zwei isolierten Klonen mittels RV wurde der erfolgreiche Austausch der murinen durch die leporiden *Cloning Site* nachgewiesen (Abbildung 13B). Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung des Vektors durch Sequenzierung (verwendete Primer: „PASK-IBA5“ und „GLIIN-REV“) auf eventuelle Punktmutationen. Die Sequenzierung bestätigte, dass der isolierte Vektor die korrekten *Inserts* des murinen F_{ab}-Fragments K411B enthielt und keine ungewünschten Mutationen in der Sequenz enthalten waren.

3.1.3. PASK111R_{AB}-P3 FÜR KANINCHEN-AK-GENE

3.1.3.1. PRIMERDESIGN ZUR AMPLIFIKATION DER LEPORIDEN ANTIKÖRPER

Um geeignete Primersequenzen für die Amplifikation von Kaninchen-Antikörpergenen aus mRNA zu erhalten, war es notwendig, bereits veröffentlichte Immunglobulinsequenzen aus Kaninchen auf Ähnlichkeiten und konservierte Genabschnitte zu vergleichen. Die Sequenzanalyse erfolgte hauptsächlich mit der Datenbank IMGT. Diese Datenbank ist spezialisiert auf komplexe Genfamilien der spezifischen Immunantwort in Menschen und anderen Vertebraten. Der IMGT-Server ermöglicht den Zugang zu immungenetischen Daten und den Vergleich eines AKs mit diesen gespeicherten Daten. Die Datenbank enthält unter anderem Keimbahngene von Kaninchen, die Informationen über Ähnlichkeiten einer Antikörpersequenz mit leporiden Immunglobulinen liefern. Aus dem Vergleich von in der Datenbank veröffentlichten Aminosäuresequenzen leporider AK wurde je ein *Alignment* für die N- und C-Termini der leichten und schweren Ketten erstellt. Für die variable Region der leichten Ketten des κ -Typs und für die C_H-Region waren bereits solche Listen in der IMGT-Datenbank vorhanden (exemplarische Ausschnitte dargestellt in Abbildung 14).

Allele	AccNum	FR1-IMGT (1-26)		CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)		FR3-IMGT (66-104)		CDR3-IMGT (105-117)	
		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
IGKV152*01	K02438	AQVLTQTESPVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSVY	...DNNY	LSWYQKPGPPKLLIY	DA	...	S	KLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6STYSSGUY
IGKV153*01	K02439	AQVMTQTPASVSA	AVGGTIVTII	QAS	ESI	...SSY	LNWYQKLGPPKLLIY	YA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTEYFTLTISGQCDDAATTC	QHGVIYSSGD
IGKV154*01	K02440	AIDMTQTPASVSA	AVGGTITIN	QAS	ESI	...SSW	LANWYQKPGPPKLLIY	EA	...	S	KLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6GVIYNSGWY
IGKV155*01	X00977	DPVMTQTPSPSA	AVGGTIVTIN	QSS	QNVY	...SNWY	LSWYQKPGPPKLLIY	GA	...	S	KLASGVP.SRFRSGG	.SGKQFTLTISGQCDDAATTC	AGTYTSSGDT
IGKV156*01	X14364	DGVMTQTPAPVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSI	...GSD	LSWYQKPGPPKLLIY	SA	...	S	KLATGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	QCTYSSSTG
IGKV157*01	AF135645	DVYMTQTPSPVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSI	...GSD	LSWYQKPGPPKLLIY	SA	...	S	KLATGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	QCTYSSSTG
IGKV158*01	AF135646	DPMLTQTASPVSA	AVGGTIVTIS	QAS	QSVY	...MNNN	LANWYQKPGPPKLLIY	AA	...	S	NLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	QCTYSSSTG
IGKV159*01	AF135647	AAVLTQTPSPVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSVY	...MNNN	LANWYQKPGPPKLLIY	SA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6TFSSSSAD
IGKV1510*01	AF135648	DVYMTQTPSPVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSI	...NSY	LSWYQKPGPPKLLIY	RA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6TFSSSSAD
IGKV1511*01	AF135649	AAVLTQTPSPVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSVY	...MNNN	LANWYQKPGPPKLLIY	AA	...	S	NLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6TFSSSSAD
IGKV1512*01	AF135650	DPVLTQTASPVSA	AVGGTIVTIS	QSS	QSVY	...MNNN	LSWYQKPGPPKLLIY	GA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6ATYSNHIY
IGKV1514*01	AF135652	DPMLTQTASPVSA	AVGGTIVTIS	QAS	QSVY	...MNNN	LSWYQKPGPPKLLIY	GA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6ATYSNHIY
IGKV1515*01	AF135653	AOGFTQTPSPVSA	AVGGTIVTIN	QTS	ESFY	...SNWY	LSWYQKPGPPKLLIY	DA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6STHSSGUY
IGKV1516*01	AF135654	DPMLTQTASPVSA	AVGGTIVTIS	QAS	QSVY	...MNNN	LANWYQKPGPPKLLIY	SA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6TFSSSSAD
IGKV1517*01	AF135655	ALVHTQTPASVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSI	...SNL	LANWYQKPGPPKLLIY	YA	...	S	DLASGVP.SRFRSGG	.SGTEYFTLTISGQCDDAATTC	Q6TYTSSSAD
IGKV1518*01	AF135656	AAVHTQTPSPVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSVY	...MNNN	LANWYQKPGPPKLLIY	SA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6TFSSSSAD
IGKV1519*01	AF135657	AAVLTQTPSPVSA	AVGGTIVTIN	QSS	QSVY	...MNNN	LSWYQKPGPPKLLIY	DA	...	S	NLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6GTDDBAD
IGKV1520*01	AF135658	DPMLTQTASPVSA	AVGGTIVTIS	QSS	QSVY	...MNNN	LSWYQKPGPPKLLIY	GA	...	S	TLASGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQCDDAATTC	Q6ATYSNHIY
IGKV1521*01	AF135659	VYVHTQTPSSVSA	AVGGTIVTIN	QAS	QSV	...SNL	LANWYQKPGPPKLLIY	GA	...	S	NLESGVP.SRFRSGG	.SGTQFTLTISGQKAEADVATTC	QHQSSTP

Allele	AccNum	A (1-15)		AB (16-26)		B (27-38)		C (39-45)		D (77-84)		E (86-96)		EF (97-104)		FG (105-118)		G (119-125)	
		1	10	20	30	40	80	90	100	110	120								
IGHA1*01	X51647	8765432111231234567123456765432112
IGHA2*01	X82108	...DPATTPLFPLSLPCPLS	...GPPVVGGLIQ	GFFPL	GFLN	VKWTISG	...ENWTFPPVQLDTS	...GLYTTSSLLNLTDEEC	...PTCVAC	HVEHN	...EVDR	YLILPCP
IGHA3*01	X82109	...DLENSPDLPLPCPILEP	...GEPNVIAGLIR	GFFPL	GFLT	VWNVASG	...ESWTFPPVPSPTS	...SLYTTSSLLRPAEQ	...PEENSVAC	RVEHN	...NKGO	DVTVPSP
IGHA4*01	X82110	...ATRAAPPFLIPLHPCALKDT	SATVIAGLIR	GFFPL	GPLS	VSNVNSG	...KQWTFPPVPSGTS	...GPLYTTCSLLSLTPEQC	...PEDHNVVC	HVEHN	...YDEGO	NLTVLTP
IGHA5*01	X82111	...VPATPPIIFPLTGPCVCKDT	SATVIAGLIR	GFFPL	GPLG	VWVMDR	...ANLTFPPVQSATS	...SLYTTCSVLSLPAEQ	...PAGNSVAC	RVEHN	...NKRO	DLTVPLC
IGHA6*01	X82112	...ATRAAPRPLIPLHPCALKDT	SATVIAGLIR	GFFPL	GPLS	VSNVNSG	...KQWTFPPVPSGTS	...GPLYTTCSLLSLTPEQC	...PEDHNVVC	HVEHN	...YDKGO	HVTVPSP
IGHA7*01	X82113	...DPVNTRPILPLPLPILGP	...GEPVVIAGLIR	GFFPL	GPLS	VWVNTSG	...ENLTFPPVQSATS	...SLYTTCSLLRLLAEQC	...PEENSVAC	HVEHN	...YDKGO	HVTVPSP
IGHA8*01	X82114	...EPARTPDIFPLNPLRVSQGN	SQTVVVGCLIR	GFFPL	SPLR	VSNVNSRENIT	...SYNFFPPAPTGTS	...GPLYTTCSLLSLTDDQC	...PRDGNVTC	HVEHN	...YDEGO	NLTVPCQ
IGHA9*01	X82115	...ASRATTPGIYPLSLPLHVSQGN	SQTVVVGCLID	GFFPL	GPLR	VSNVNSRENIT	...SYNFFPPAPTGTS	...GPLYTTCSLLSLTDDQC	...LRHOSAAC	HVEYN	...SVNG	SLVVPYP
IGHA10*01	X82116	...EPARTPDLPLPLPCPECC	...AHPVVIAGLIR	GFFPL	GFLN	VSNVNSG	...GQWTFPPVPSPTS	...SLYTTCSLLSLTDDQC	...PRDGNVTC	HVEHN	...YDEGO	NLTVPCQ
IGHA11*01	X82117	...ERATNLELPMTCPRPRP	...EQTVVVGCLIR	GFFPL	DPLS	VSNVNSGENV	...RYNFFPPAQSATS	...GLMTACSELLSLTPEQC	...PADNIVTC	HVEHN	...NEGO	DLVPVCP
IGHA12*01	X82118	...EPARTPDLPLPLPCPECC	...AHPVVIAGLIR	GFFPL	GFLN	VSNVNSG	...GQWTFPPVPSPTS	...SLYTTCSLLSLTDEEC	...PKVIC	HVEHN	...EVHR	DLILPCP
IGHA13*01	X82119	...ASRATPDLPLPLPCPECC	...GETVVVGCLIR	GFFPL	GFLN	VSNVNSG	...GQWTFPPVPSPTS	...SLYTTCSLLSLTDEEC	...PKVIC	HVEHN	...EVHR	DLILPCP
IGHA14*01	AF314407	...ASRATPDLPLPLPCPECC	...GETVVVGCLIR	GFFPL	GPLS	VSNVNSGENV	...SAYNFFPPAQSATS	...GPLYTTCSLLSLTPEQC	...LEYSAAAC	HVEYN	...SVINE	SLVVPYP
IGHG*01	U29172	...GQPKAPSVFPLAPCCGDTP	...SSTVTLGCLVK	GVLDP	EPVT	VYVNSGFLTM	...GVRTFFPSVROSS	...GLXSLSSVSVTS	...SOPVTC	VYVNSG	...DMYK	DVTVP
IGHM*01	U06666	...VSLSSPFLTVLPSCEGALTD	...GNLVAGGLAR	DPLP	...SSVT	FSWYFKQNSISRTVTFPPVQKGD	...KDMATSQVLPVSKDVLQGTTEYLVC	...KVGHS	...NSHR	DLRVSFP

ABBILDUNG 14: AUSSCHNITTE AUS DEN DOMAIN-ALIGNMENTS DER IMGT-DATENBANK

(A) FÜR IGH_V-REGION UND (B) FÜR DIE IGH_{H1}-REGION. DARGESTELLT SIND DIE AMINOSÄURESEQUENZEN FÜR EINIGE ALLELE. DER ALLELBEZEICHNUNG FOLGT DIE IMGT ZUGANGSNUMMER; FR-REGIONEN SIND IN SCHWARZ, DIE CDR-REGIONEN IN ROT DARGESTELLT. DIE BEZEICHNUNG UND DIE LÄNGE DER REGIONEN SIND ÜBER DEN AMINOSÄURE SEQUENZEN ANGEZEIGT. BEREICHE DER CDR-REGIONEN DIE HYPERVARIABLE SIND, WERDEN ALS PUNKTE ABGEBILDET. DIE CYSTEINE, DIE FÜR DIE AUSBILDUNG DER DISULFIDBRÜCKEN VERANTWORTLICH SIND, SIND PINK HERVORGEHOBEN

Für alle anderen Regionen wurden die notwendigen *Alignments* selbst erstellt. Aus den generierten Listen ließ sich für die N-Termini der leichten Ketten des κ -Typ 16 und für die des λ -Typs drei Leitmotive ermitteln (Tabelle 16, Seite 64).

TABELLE 16: N- UND C-TERMINALE AMONISÄURESEQUENZEN LEPORIDER ANTIKÖRPERGENE

N-Termini von V _L	C-Termini von C _L	N-Termini von V _H	degenerierte Termini V _H	C-Termini von C _H	
V_L:	C_L:				
ALVMTQT...	...SFNRGDC	QSGGGAG...	XSGGGAG...	IgA ₁₊₁₂	...LILPCP
YVMMTQT...	...SFSRKNC	ESGGGAG...	QXLEESG...	IgA ₂ (Hinge)	...SPPACNE
AAVLTQT...	...SFNRKNC	QSLEESG...	QWLEESX...	IgA ₃ (Hinge)	...YPECKDP
DPVLTQT...	...SFSRKSC	QALEESG...	QSXKESE...	IgA ₆₊₅ (Hinge)	...PECKDP
DVVMTQT...	...SFNRKSC	QPLEESG...	QSVVEESX...	IgA ₄	...DLTPVCL
DPMLTQT...	...SFSRNNC	QWLEESG...	QEQLXES...	IgA ₇₊₁₁ (Hinge)	...FPDPCE
≤ 6,8 %:		QWLEESR...	QEQLVEYG...	IgA ₈₊₁₃ (Hinge)	...PDCCPA
AQVLTQT...		QSVKESE...	QSLVESG...	IgA ₉	...DLTPVCQ
AQVMTQT...		QSMKESE...	QQLEQSG...	IgA ₁₀	...LPVPCHP
DPMMTQT...		QSVVEESR...		IgA ₁₄	...LTVPCPP
AAVMTQT...		QSMKESE...		IgG (Hinge)	...STCSKPT
DPVMTQT...		QSVVEESR...		IgM	...DLRVSFP
DQVMTQT...		QSVVEESG...			
ALVMTQT...		QEQLVES...			
YVMMTQT...		QEQLVES...			
AAVLTQT...		QEQLKES...			
DPVLTQT...		QEQLMES...			
DVVMTQT...		QEQLVES...			
DPMLTQT...		QEQLVEYG...			
DQVMTQT...		QSLVESG...			
AVVLTQT...		QQLEQSG...			
DIVLTQT...					
V_L:	C_L:				
ELVLTQS...	...VAPARCP				
QPVLTQS...	...VAPAHCP				
ELVMTQT...	...LVPAECS				
	...LAPAACS				

Im Falle der V_{Lk}-Ketten kamen zehn der N-terminalen Sequenzen nur einmal in den Immunglobulinlisten vor. Insgesamt machten sie weniger als 6,8 % aller Sequenzen aus und wurden erst auf Nukleotidebene für das Primerdesign berücksichtigt. Für die N-Termini der V_H-Region wurden 21 wiederkehrende Anfangssequenzen ermittelt, bei denen sich jedoch zwölf nur in einer Aminosäure unterschieden. Die Sequenzen konnten deshalb zu neun degenerierten Motiven zusammengefasst werden. Es war zu beobachten, dass die V-Regionen der leichten Kette als dritte AS einen Valinrest aufwiesen, der ein Methionin oder Leucinrest folgte. An Position 5–7 fand sich immer ein Thr-Gln-Thr oder im Falle der λ-Ketten ein Thr-Gln-Ser-Motiv. Die V_H-N-Termini zeichneten sich vor allem dadurch aus, dass sie sehr glutamin- und glutamatreich waren. Eine Zuordnung der Leitmotive zu bestimmten Kaninchen-Allotypen war weder auf Grund der Aminosäure- noch durch die Nukleotidsequenzen möglich. Im Anschluss wurden den N-terminalen Aminosäuresequenzen die in der Datenbank korrespondierenden Nukleotidsequenzen über die Eintragsnummern zugeordnet. Dafür wurden ausschließlich mRNA- und cDNA-Daten verwendet. Aus der daraus resultierenden Zusammenstellung wurden die in Tabelle 4, Seite 32 aufgeführten Primersequenzen abgeleitet. Dies geschah unter anderem durch Verwendung von degenerierten Primern, da hierdurch die Anzahl derselben

überschaubar gehalten und zum Teil die Nukleotidsequenzen der seltenen N-Termini mit integriert werden konnten. Mit den analysierten Nukleotiddaten wurden für die 5'-Enden der Immunglobulinketten insgesamt acht degenerierte Sequenzen für die V_L-Regionen und 14 degenerierte Sequenzen für die V_H-Region ermittelt. Analog wurde mit den Daten für die Aminosäuresequenzen der C-Termini für die leichten Ketten vorgegangen. Hier wurden zunächst sechs Sequenzmotive für die Ketten des κ-Typs und vier Sequenzmotive für die C_L-Ketten ermittelt, die dann später durch Zuordnung der Nukleotidsequenzen in drei Primersequenzen für die κ-Ketten und zwei Oligonukleotidsequenzen für die 3'-Enden der C_L-Ketten aufgeteilt wurden. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Aminosäuresequenzen für die C-Termini der κ-Ketten ein SFXXXC-Motiv und die der λ-Ketten ein XXPAXCX-Motiv aufwiesen. Eine weitere allotypspezifische Zuordnung war weder durch die Aminosäure- noch mittels der Nukleotidsequenzen möglich. Eine Erstellung von Oligonukleotiden für die C_H-Region war auf Grund der in der Datenbank veröffentlichten Liste (Abbildung 14, Seite 63) wesentlich vereinfacht. Die Primer für den C_H-Bereich wurden so in die Sequenzen gelegt, dass der für die korrekte Faltung der F_{ab}-Fragmente notwendige Cysteinrest enthalten war oder beide (IgA-Subklasse 8+13). Zur Verifizierung erfolgte abschließend noch ein Literaturabgleich der einzelnen ermittelten Nukleotidsequenzen mit veröffentlichten Primern zur Amplifikation von Kaninchen-Antikörpergenen (Knight *et al.*, 1984; Ridder *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 1996; Foti *et al.*, 1998; Rader *et al.*, 2000; Barbas *et al.*, 2001; Spieker-Polet *et al.*, 2002; Jasper *et al.*, 2003; Popkov *et al.*, 2003). Für insgesamt 17 der 39 entworfenen Primer konnte eine vollständige bzw. teilweise korrespondierende Sequenz in der Literatur gefunden werden.

Im Zuge des Nukleotidvergleiches wurden 304 aus Kaninchen stammende für AK codierende mRNS- und cDNS-Sequenzen in denselben Arbeitsschritt auf das Vorkommen von Erkennungssequenzen für Restriktionsschnittstellen überprüft (Tabelle 17, Seite 65).

TABELLE 17: PROZENTUALES VORKOMMEN VON ENDONUKLEASE-ERKENNUNGSSEQUENZEN IN LEPORIDEN IMMUNGLOBULINGENEN.

FÜR DIE DATENERHEBUNG WURDEN 304 FÜR ANTIKÖRPER CODIERENDE MRNS- UND CDNS-SEQUENZEN AUS KANINCHEN ANALYSIERT. DIE DATEN GEBEN DEN STAND DER IMGT- UND DER NCBI-DATENBANKEN VOM 01.06.2004–16.07.2004 WIDER.

Schnittstelle	Sequenz	C _H			V _H		C _L		V _L	
		[%]			[%]		[%]		[%]	
		G	M	A		C _κ	C _λ	V _κ	V _λ	
Apal	5' ...GGGCC'C... 3'	0	0	86	0	0	25	0	0	
AsiSI	5' ...GCGAT'CGC...3'	0	0	0	0	0	0	0	0	
BglIII	5' ...A'GATCT... 3'	0	0	14,3	0	0	0	1,8	0	
BstEII	5' ...G'GTNACC...3'	100	0	0	0,64	36	100	0	5,5	
EarI	5'...CTCTTC(N)1'...3'	0	100	50	39	50	92	0	8	
EcoRI	5' ...G'AATTC... 3'	0	0	29	0	57	0	0	5,5	
FseI	5'...GGCCGG'CC...3'	0	0	0	0	0	0	0	0	
HindIII	5' ...A'AGCTT... 3'	0	0	0	5	0	0	45	0	
KpnI	5' ...GGTAC'C... 3'	0	0	0	1,9	0	0	0	64	
MluI	5' ...A'CGCGT... 3'	0	0	0	0	0	0	0	0	
NarI	5' ...GG'CGCC... 3'	0	0	0	0	0	0	0	0	
NcoI	5' ...C'CATGG... 3'	0	100	7	0	0	17	0	0	
NheI	5' ...G'CTAGC... 3'	0	0	0	0	0	0	0	0	
NotI	5'...GC'GGCCGC...3'	0	0	0	0	0	0	0	0	
PacI	5'...TTAAT'TAA...3'	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sall	5' ...G'TCGAC... 3'	0	0	0	16	0	0	0	0	
SacI	5' ...GAGCT'C... 3'	0	0	0	0	0	25	0	81	
SacII	5' ...CCGC'GG... 3'	0	0	7	63	0	75	1,8	0	
SpeI	5' ...A'CTAGT... 3'	0	0	0	1,2	0	8	0	0	
XbaI	5' ...T'CTAGA... 3'	0	0	7	0,64	0	0	3,5	0	
XhoI	5' ...C'TCGAG... 3'	0	0	29	1,2	0	0	0	0	

Abhängig vom Vorkommen der Endonuklease-Erkennungssequenzen wurden zusammen mit den in Kapitel 1.3.1 berücksichtigten Bedingungen für das Design einer leporiden *Cloning Site* die Schnittstellen *AsiSI*, *MluI*, *NcoI* und *KpnI* für die Primer ausgewählt. Die verwendeten Schnittstellen *AsiSI* und *MluI* für V_{HC} bzw. *NcoI* und *KpnI* für V_{LC} kommen in den bisher veröffentlichten Sequenzen der variablen und konstanten leporiden Domänen nicht oder nur zu einem minimalen Prozentsatz vor. Alle Primer wurden so entworfen, dass die *Annealing*-Temperatur durch die Primerüberhänge für die leichten Ketten rechnerisch auf 76 °C angepasst wurden. Für die schweren Ketten wurden 78 °C als *Annealing*-Temperatur eingestellt. Dies war notwendig, um die Primer für leichte und schwere Ketten bei späteren Amplifikationsreaktionen beliebig kombinieren zu können.

3.1.3.2. ETABLIERUNG DER PCR

Unter Verwendung von Erststrang-cDNS (generiert mit dem Roche RT-Kit) eines naiven Wildtyps und der fünf immunisierten *New-Zealand-White*-Kaninchen als Matrize wurden die Amplifikationsbedingungen für die LC- und HC-Ketten der Kaninchen ausgetestet. Für die PCR wurden die *Taq*-Polymerasen *MOLTAQ*, *NATIVE TAQ*, *RECOMBINANT TAQ*, *TAQ E* und *TAQ S* mit *Annealing*-Temperaturen von 50 °C–58 °C verwendet. Hierbei konnte nur mit der *TAQ E* und der *MOLTAQ* eine Amplifikation erreicht werden. Zuerst wurde ein einfaches Programm mit einer Schleife mit 35 Wiederholungen und drei verschiedenen *Annealing*-Temperaturen (48, 53 und 58 °C je 1min), einer Elongation von 2 min bei 72°C und drei *template*-Volumen (0,1 µl, 1 µl und 10 µl) getestet. Es stellte sich heraus, dass für die verwendeten cDNS eine *template*-Menge von 1 µl bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C ausreichend war. Bei einer *template*-Menge von 10 µl traten bereits unerwünschte Nebenbanden auf. Um die Ausbeute zu steigern, wurden die Zusätze $MgCl_2$ (1–4 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (15–30 mM), DMSO (1–10 %) und Formamid (1–10 %) in weiteren Reaktionen getestet (Bartlett & Stiring, 2003). Durch die Zugabe von 2,5 % (v/v) Formamid zur Reaktion konnte die Amplifikatmenge verdoppelt werden. Nachfolgend wurde die Standard-PCR mit 1 µl *template*, 2,5 % Formamid, der *Taq E* und einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C einer TD-PCR (Cox *et al.*, 1991) gegenübergestellt.

Die Reaktion erfolgte als „*Hotstart*-PCR“ mit dem in Tabelle 9, Seite 44 angegebenen Zeit-Temperaturprofil. Bis auf das Zeit-Temperatur-Profil wurden alle anderen Bedingungen beibehalten. Bei der Durchführung der TD-PCR zeigte sich eine weitere Steigerung der Amplifikat-Ausbeuten. Des Weiteren konnten bei diesen Reaktionsbedingungen auch Amplifikate mit Primerkombinationen hergestellt werden, die vorher nicht angeschlagen hatten. Im weiteren Verlauf wurden mit der TD-PCR die notwendigen cDNS-Volumina für die Amplifikation von LC-Ketten des κ - und λ -Typs sowie für HC-Ketten der Antikörperklassen A, M und G, je nach Versuchstier und Primerkombination, ausgetestet. Insgesamt waren zwischen 1–5 µl an cDNS für eine erfolgreiche Amplifikation notwendig (Tabelle 10, Seite 44).

Die Reaktionen wurden über Gelelektrophorese (1,5 % w/v Agarosegel) analysiert. Das Gelfoto (Abbildung 15, Seite 67) zeigt exemplarisch die Banden der amplifizierten leichten Ketten des κ -Typs und der schweren Ketten der IgG- und IgA-Klasse. Je Geltasche wurden 5 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen. Anhand des PCR- und 100-bp-Markers (M1 und M2) ließen sich die DNS-Banden einer Länge von ca. 650–700 bp zuordnen. Es wurden pro Versuchstier zwei Gelspuren aufgetragen, wobei aufsteigend mit Tier #154 begonnen wurde. Die Höhe der Amplifikatausbeuten wurde je nach Tier und Primerpaarung über die eingesetzte *template*-Menge gesteuert (Tabelle 11, Seite 45). Welche Primerkombination mit welchem Kaninchen

nach dem Optimieren der *template*-Menge erfolgreich war, ist nachfolgend in Tabelle 18 dargestellt.

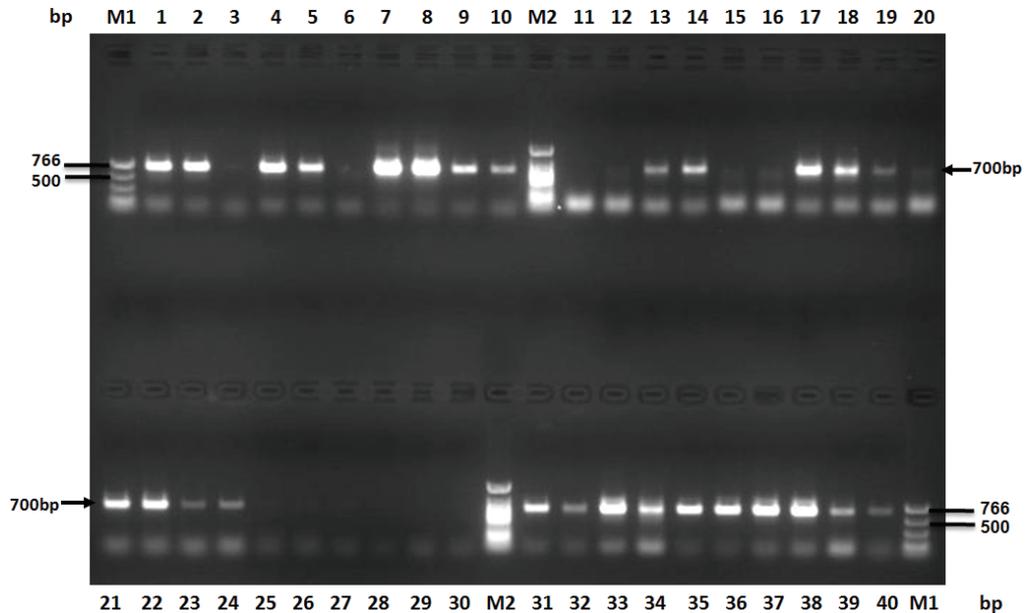


ABBILDUNG 15: AGAROSEGEL DER AMPLIFIKATION VON KANINCHEN LC- UND HC-GENEN
 AUF EIN 1,5 %IGES AGAROSEGEL WURDEN JE 5 μ L PROBE AUFGETRAGEN. 1–10: AMPLIFIKATE VON HC-IgG MIT *FORWARD*-PRIMER V_{H MIX2} (1+2 TIER #154, 3+4 TIER #156, 5+6 TIER #157, 7+8 TIER #158, 9+10 TIER #159), 11–20: AMPLIFIKATE VON HC-IgG MIT *FORWARD*-PRIMER V_{H MIX1} (ANALOG ZU 1–10), 21–24: AMPLIFIKATE VON HC-IgG MIT *FORWARD*-PRIMER V_{H #19} (21+22 TIER #156, 23+24 TIER #159), 25–30: AMPLIFIKATE VON HC-IgA MIT *FORWARD*-PRIMER V_{H #19} (TIERE #154, #156, #157, #158, #159), 31–40: AMPLIFIKATE VON L_{Ck} MIT *REVERSE*-PRIMER C_{L #5} (ANALOG ZU 1–10)

TABELLE 18: MENGE DER AMPLIFIKATE ABHÄNGIG VOM VERSUCHSTIER UND DEN PRIMERPAARUNGEN
 ((++) STARKE GELBANDE, (+) SCHWACHE GELBANDE, (-) KEIN AMPLIFIKAT, (N.D) NICHT UNTERSUCHT)

Primerkombination	Tier naiv	Tier #154	Tier #156	Tier #157	Tier #158	Tier #159
<u>V_HC_H-Ketten:</u>						
IgG + V _{H MIX1}	++	+	++	+	++	++
IgG + V _{H MIX2}	++	++	++	++	++	++
IgG + V _{H MIX3}	++	++	++	++	+	+
IgG + V _{H #19}	+	++	+	+	++	++
IgA + V _{H MIX1}	-	-	-	+	+	+
IgA + V _{H MIX2}	++	+	++	+	+	-
IgA + V _{H MIX3}	+	-	+	+	-	-
IgA + V _{H #19}	-	-	-	-	-	-
IgM + V _{H mix1}	++	++	++	++	++	++
IgM + V _{H mix2}	++	+	+	++	++	+
IgM + V _{H mix3}	+	+	++	++	++	+
IgM + V _{H #19}	-	+	++	++	+	+
<u>V_LC_L-Ketten:</u>						
C _{Lk Mix} + V _{Lk Mix}	++	++	++	++	++	++
C _{Lk #5} + V _{Lk Mix}	++	+	++	++	++	+
C _{Lλ Mix} + V _{Lλ Mix}	+	n.D	+	+	-	-
C _{Lλ #6} + V _{Lλ Mix}	+	n.D	+	-	+	-

3.1.3.3. DESIGN DER LEPORIDEN CLONING SITE FÜR DEN PHAGE DISPLAY-VEKTOR

Die *Cloning Site* für den leporiden *Phage Display*-Vektor wurde unter Berücksichtigung der Häufigkeiten verschiedener Schnittstellen in 304 leporiden Immunglobulin-Sequenzen (Tabelle 17, Seite 65) wie folgt entworfen.

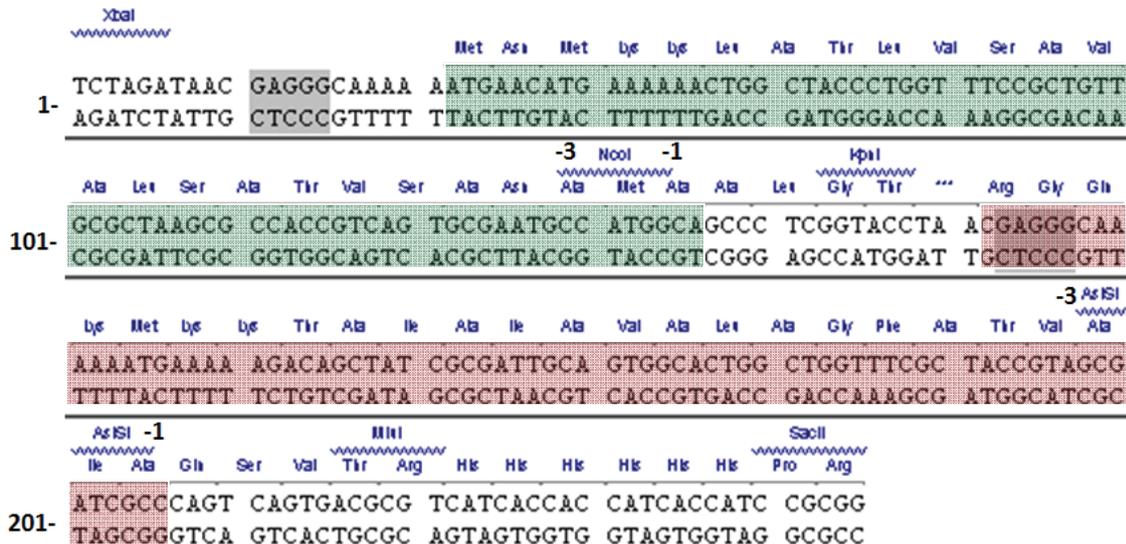


ABBILDUNG 16: NUKLEOTIDSEQUENZ DER CLONING SITE R_{AbCS} FÜR LEOPRIDE IMMUNGLOBULINE
 DIE INSERTION DER LC ERFOLGT ÜBER DIE SCHNITTSTELLEN NCOI/KPNI UND DIE DER HC ÜBER ASISI/ MLUI (DIE ERKENNUNGSSEQUENZEN SIND ÜBER DER AMINOSÄURESEQUENZ IN BLAU DARGESTELLT). DIE RBP-SIGNALSEQUENZ (GRÜN) IST MIT DER V_LC_L UND DIE OMPA-SIGNALSEQUENZ (ROT) MIT DER V_HC_H FUSIONIERT. DER V_HC_H FOLGT EIN HIS₆-TAG. DIE RIBOSOMEN-BINDUNGSTELLEN SIND GRAU HINTERLEGT. MIT -1 UND -3 SIND DIE AMINOSÄUREN GEKENNZEICHNET, DIE ALS ERKENNUNGSSEQUENZEN FÜR DIE PEPTIDASE DIENEN, DIESE WERDEN BEI DER SEKRETION DER PROTEINE INS PERIPLASMA ABGESPALTEN. DIE CLONING SITE WURDE VON DER FIRMA GENSCRIPT SYNTHETISIERT UND IM VEKTOR PUC57 BEZOGEN

Die verwendeten Schnittstellen *NcoI* und *KpnI* für V_LC_L bzw. *AsiSI* und *MluI* für V_HC_H kommen in den bisher veröffentlichten Sequenzen der variablen und konstanten leporiden Domänen nicht oder nur zu einem minimalen Prozentsatz vor (Tabelle 17, Seite 65). Die leichte Kette wird durch die rbp-Signalsequenz und das Fusionsprotein HC-pIII durch die ompA-Signalsequenz in den periplasmatischen Raum ausgeschleust (Groarke *et al.*, 1983; Collier 1994). An das Strukturgen der schweren Kette ist ein His₆-Affinitätsanhängsel (Hochuli *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1991a) angefügt. Diese Einheit wird durch ein *Amber-Stopp-Codon* von der nachfolgenden Sequenz des GenIII getrennt. Die Fusion mit der schweren Kette wurde zur Vermeidung von *Bence Jones*-Dimeren (Solomon *et al.*, 1976; Skerra, 1994a) gewählt. Das ompA-Signalpeptid wurde durch die Erkennungssequenzen ihrer Peptidase-Schnittstellen ausgesucht. Deren letzte drei Aminosäuren tolerieren eine Sequenzänderung von Ala-Gln-Ala in Ala-Ile-Ala (Pratap & Dikshit, 1998). Dadurch konnte die Nukleotidsequenz in die Endonukleaseschnittstelle *AsiSI* geändert werden. Die Nukleotidabfolge der Peptidase-Schnittstelle von rbp (Ala-Met-Ala) konnte über eine stille Mutation in eine *NcoI*-Erkennungssequenz umgewandelt werden. Zur Verifizierung, ob die Änderungen der Peptidase-Bindungsstellen von ompA auch in unserem Fall zu einer Abspaltung des Signalpeptids während des Transports durch die Cytoplasmamembran führt, wurde mit Hilfe des Programms TARGETP eine computergestützte Analyse durchgeführt. Dazu wurde beispielhaft die Antikörpersequenz V_HC_H J00666 aus der IMGT-Datenbank verwendet. Die Analyse prognostizierte eine Abspaltung des Signalpeptids trotz der Aminosäureänderung (Abbildung 17, Seite 69 zeigt den Vergleich der originalen mit der modifizierten Erkennungssequenz).

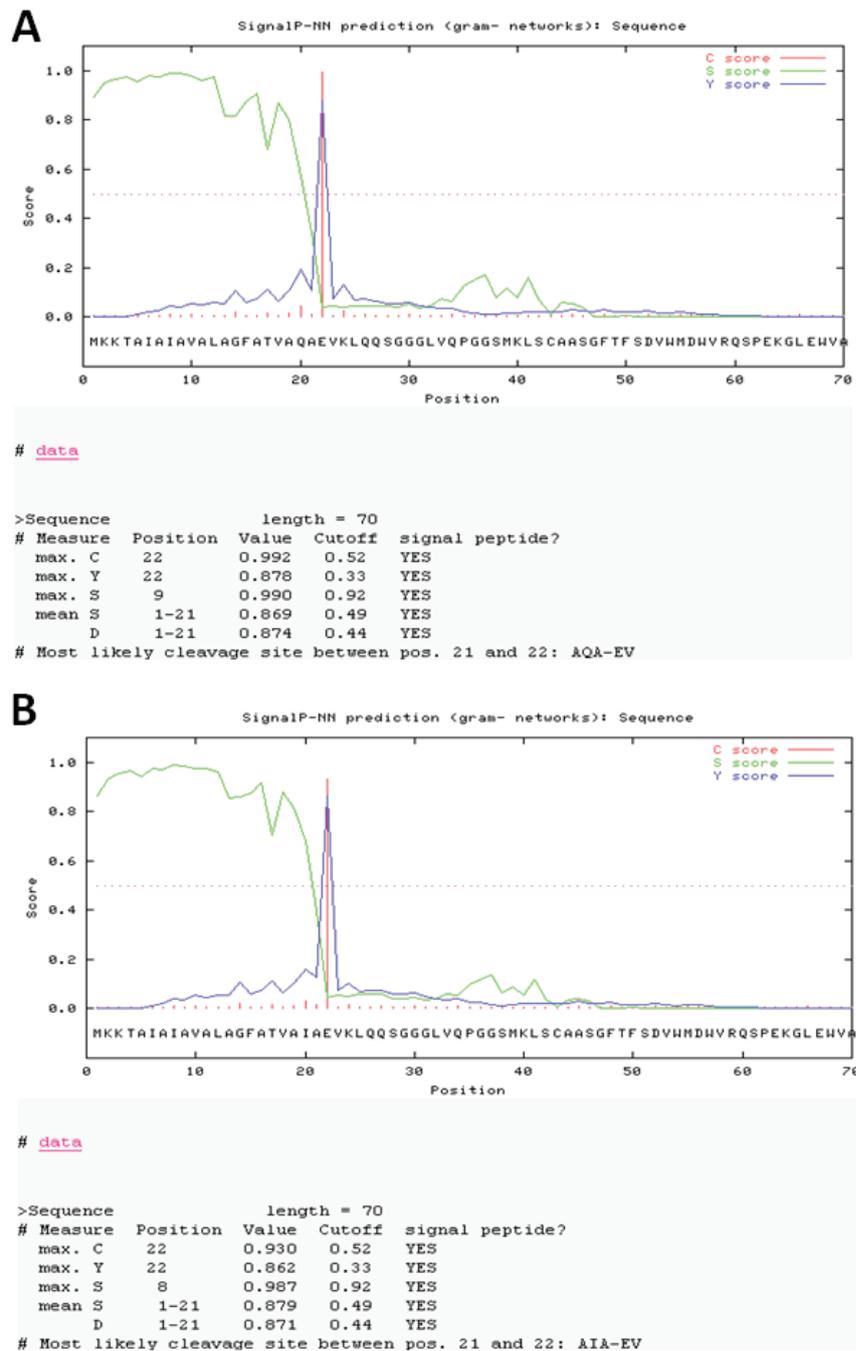
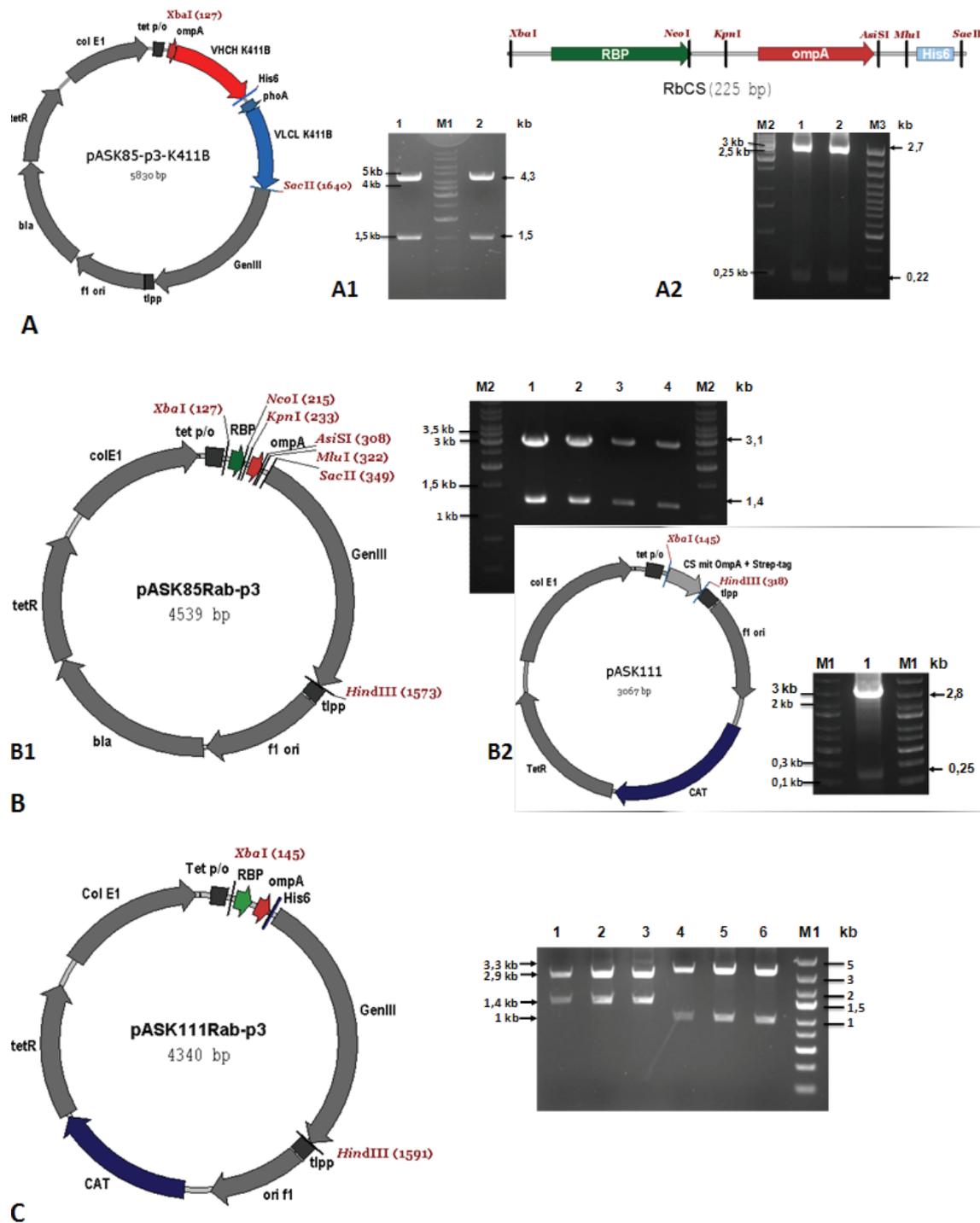


ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER PROGNOSEN ZWEIER PEPTIDASE-SCHNITTSTELLEN FÜR DIE OMPA-SIGNALSEQUENZ (A) ORIGINALE ERKENNUNGSSEQUENZ (B) MODIFIZIERTE ERKENNUNGSSEQUENZ. DAS PROGRAMM TARGETP ERRECHNET UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER BENACHTBARTEN AMINOSÄUREN, AM ENDE DES SIGNALPEPTIDES DIE WAHRSCHEINLICHSTE PEPTIDASESCHNITTSTELLE UND STELLT DIESE ÜBER DER AMINOSÄURESEQUENZ ALS BLAUEN PEAK DAR.

Zur Anwendung alternativer Reinigungsstrategien wurde die Region um die Hexahistidinsequenz, die als Affinitätsanhängsel diente, so konzipiert, dass sie von den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *MluI* und *SacII* eingerahmt ist. Dadurch ist ein einfacher Austausch durch andere Affinitätstags möglich und hält zudem Alternativen für die Reinigung rekombinanter Proteine offen. Im Allgemeinen ist der Austausch einzelner Teile der *Cloning Site* durch die Auswahl und Lage der Schnittstellen durch einfache und gerichtete Klonierung möglich.

3.1.3.4. KONSTRUKTION DES PHAGEMIDS PASK111R_{AB}-P3-WRABBILDUNG 18: KLONIERUNGSSTRATEGIE FÜR PASK111R_{AB}-P3

(A) RESTRIKTIONSVERDAU VON pASK85-P3-K411B (A1) UND PUC57-R_{AB}CS (A2) MIT DEN ENDONUKLEASEN *XBAI/SACII* (B) RESTRIKTIONSVERDAU VON VIER KLONEN DES VEKTORINTERMEDIATS pASK85R_{AB}-P3 (B1) UND VON pASK111 (B2) MIT DEN ENDONUKLEASEN *XBAI/SACII* (C) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PHAGEMIDS PASK111R_{AB}-P3. DIE STRUKTURGENE FÜR *VHCH1* UND *VLCL* AN IHREN 5'-ENDEN FUSIONIERT MIT DEN BAKTERIELLEN SIGNALSEQUENZEN DES *OMP_A* BZW. DES *RBP* VOR. AM 3'-ENDE DES GENS DER SCHWEREN KETTE BEFINDET SICH DIE KODIERENDE SEQUENZ FÜR EIN *HIS₆* UND IM ANSCHLUSS FOLGT *GENIII*. ALLE ANDEREN ABKÜRZUNGEN DER BESCHREIBUNG VON ABBILDUNG 6, SEITE 23. RECHTS: KONTROLLVERDAU VON DREI PASK111R_{AB}-P3 KLONEN (KLON 1: SPUREN 1+4, KLON 2: SPUREN 2+5; KLON 3: SPUR 3+6) MIT DEN ENDONUKLEASEN *SPEI/NCOI* (SPUR 1-3) UND *XBAI/HINDIII* (SPUR 4-6). M1: 1KB-MARKER; M2: 100BP-PLUS-MARKER

Um zwei neue Phagemide mit der *Cloning Site* $R_{ab}CS$ für leporide AK zu erhalten, wurde die ursprüngliche *Cloning Site* aus dem Phagemid pASK85-p3-K411B mit den Endonukleasen *Xba*I und *Sac*II entfernt und durch die ebenso behandelte *Cloning Site* $R_{ab}CS$ ersetzt (Abbildung 18A, Seite 70). Für die alternative Verwendung von Ampicillin oder Chloramphenicol als Selektionsmarker, wurde ein zu dem erhaltenen Phagemid pASK85 R_{ab} -p3 (Vektorkarte Abbildung 18B1) korrespondierendes Phagemid mit dem *cat*-Gen hergestellt. Dazu wurde unter Verwendung der Schnittstellen für *Xba*I und *Hind*III der gesamte für $R_{ab}CS$ und *Gen*III kodierende Bereich (1446 bp) präpariert und mit dem durch analoge Hydrolyse des Vektors pASK111 erhaltenen 2894 bp großen Fragments ligiert (Abbildung 18B). Das resultierende Phagemid wurde als pASK111 R_{ab} -p3 bezeichnet (Abbildung 18C; Sequenz in Anhang B2). Im Anschluss wurden als Platzhalter Amplifivate einer LC und dreier HC eines Wildtyp Kaninchens in die *Cloning Site* eingefügt (Wiebe, 2008). Daraus resultierten die Zwischenstufe pASK111 R_{ab} -p3-WR_{LC} und die Phagemide pASK111 R_{ab} -p3-WR2, pASK111 R_{ab} -p3-WR5, pASK111 R_{ab} -p3-WR13 (Abbildung 20). Um den Austausch der Platzhalter-Gene gegen Amplifivate von immunisierten Kaninchen leichter überprüfen zu können, wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese die diagnostischen Schnittstellen *Sac*I und *Nhe*I in die leichte und die schweren Ketten eingeführt. Unter Verwendung der Primer „*NHE*I FORWARD, *NHE*I REVERSE, *SAC*I FORWARD UND *SAC*I REVERSE“ wurde das Codon CCC (Position 304–7) in FR1 der leichten Kette und die Codons GCC AGT (an Position 1382 in Klon 2, an Position 1394 in Klon 5 und an Position 1376 in Klon 13) in der Consensussequenz in FR3 der schweren Ketten durch stille Mutation in CCG bzw. GCT AGC umgewandelt (siehe Abbildung 19).

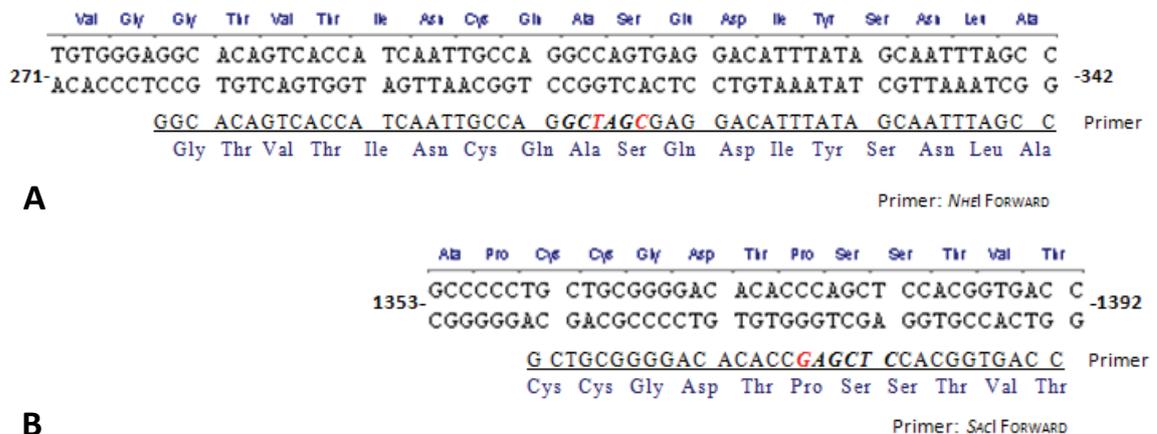


ABBILDUNG 19: DNS-SEQUENZ FÜR DIE MUTIERTEN BASETRIPLETTES IN DER LEPORIDEN LC (A) UND HC (B) AM BEISPIEL VON PASK111 R_{ab} -P3-WR13

DIE AMINOSÄURESEQUENZ IST ÜBER DER DNS-SEQUENZ ANGEZEIGT. DIE DURCH DIE PRIMER DETERMINIERTEN MUTATIONEN, DIE ZUR EINFÜHRUNG DER *SAC*I- BZW. DER *NHE*I-RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLE FÜHREN, SIND ROT UND FETT DARGESTELLT. RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLEN IN DER DNS-SEQUENZ SIND KURSIV DARGESTELLT

Durch die Einführung der *Sac*I-Erkennungssequenz entstanden die Phagemide pASK111 R_{ab} -p3-WR2.1, pASK111 R_{ab} -p3-WR5.1, pASK111 R_{ab} -p3-WR13.1. Durch die Insertion der *Nhe*I-Erkennungssequenz wurden die Endversionen pASK111 R_{ab} -p3-WR2.12, pASK111 R_{ab} -p3-WR5.12, pASK111 R_{ab} -p3-WR13.12 (Abbildung 20) erhalten. Die erfolgreiche Manipulation wurde mittels RV und Sequenzierung überprüft (Sequenz siehe Anhang B3). Das erhaltene Phagemid (Abbildung 20) kodiert unter der Transkriptionskontrolle des *tet*-Promotor/Operators für zwei Fusionsproteine: eines bestehend aus der bakteriellen *rbp*-Signalse-

quenz und der leichten Kette und eines bestehend aus bakterieller ompA-Signalsequenz, der HC, dem His₆-Affinitätsanhängsel und dem Phagenhüllprotein pIII. Zwischen den kodierenden Sequenzen für das His₆-tag und dem pIII ist ein *Amber-Stopp-Codon* inseriert. Das *Amber-Stopp-Codon* innerhalb des Fusionsgens dient dem Zweck der alternativen Produktion sowohl der löslichen F_{ab}-Varianten als auch des Fusionsproteins – unter Verwendung eines Amber-Suppressor-Stamms wie *E. coli* TG1 F⁺ (Barbas *et al.*, 2001). In einem supE Amber-Suppressor-Stamm wird die Translationstermination am Stopp-Codon zu ca. 10 % durch den Einbau eines Glutamin-Restes in die wachsende Polypeptidkette umgangen (Miller, 1992). Es gibt aber auch Hinweise aus anderen Arbeitsgruppen, dass durch das *Amber-Stopp-Codon* die Toxizität von Fremdproteinen in *E.coli* reduziert wird (Schlehuber, 2001). Des Weiteren wird die Chloramphenicol-Acetyltransferase in einer dicistronischen mRNS zusammen mit dem tet-Repressor exprimiert. Die dadurch vermittelte Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol dient als Selektionsmarker für infizierte Bakterien. Dies ist in der Literatur für das *Phage Display* von F_{ab}-Fragmenten bisher nur selten beschrieben worden (zusammengefasst in Hust & Dübel, 2004). Zum Beispiel im Zusammenhang mit dem dualen Cre-Lox *Phage Display*-Vektor System von Zahra *et al.* (1999).

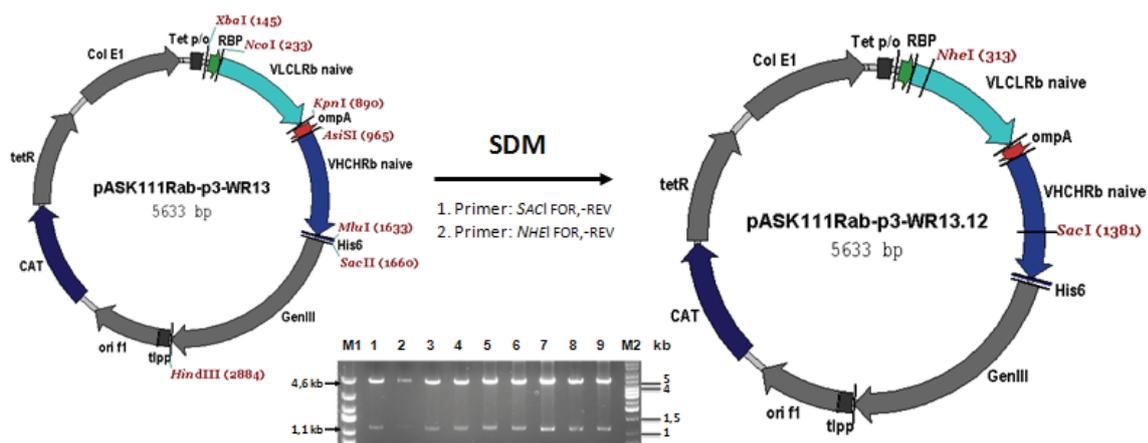


ABBILDUNG 20: EINFÜGEN DER DIAGNOSTISCHEN SCHNITTSTELLEN IN PASK111R_{AB}-P3-WR13

DAS GELBILD ZEIGT DEN KONTROLLVERDAU VON JE DREI KOLONEN DER PHAGEMIDE PASK111R_{AB}-P3-WR2.12 (BANDE 1–3), PASK111R_{AB}-P3-WR5.12 (BANDE 4–6) UND PASK111R_{AB}-P3-WR13.12 (BANDE 7–9) MIT DEN RESTRIKTIONSENZYMEN SACI/NHEI; M1: EXPRESS-MARKER, M2: 1KB-MARKER

3.1.4. pASK111R_{AB}-P3-K411B

Um die Funktionalität des unter 3.1.3.4 erhaltenen Vektors überprüfen zu können, wurde das murine F_{ab}-Fragment K411B in das Phagemid pASK111R_{ab}-p3-WR13.12 inseriert. Diese Arbeiten wurden durchgeführt von Frau Antje Pegel. Dazu wurde im ersten Schritt die im Gen für V_L-K411B liegende zweite *KpnI*-Schnittstelle mittels ortsgerichteter Mutagenese mit den Primern „MUT KPN K47H FOR und –REV“ aus dem Vektor pASK85-K411B entfernt (Abbildung 21A). Durch die Primer wurde das für die Aminosäure Threonin kodierende Basentriplett über eine stille Mutation von ACC zu ACT mutiert. Der erfolgreiche Basenaustausch wurde durch eine Restriktionsanalyse mit der Endonuklease *KpnI* überprüft. Wie zu erwarten, wies der präparierte Vektor pASK85-K411B.3 im Kontrollgel keinen Verdau auf. Die Probe mit der Kontrolle des nicht mutierten Vektors zeigte eine Bande für den linearisierten Vektor (4638 bp). Anschließend wurde eine PCR zur Amplifizierung der murinen Ketten für V_HC_H-K411B und V_LC_L-K411B

mit den Primern „K47H V_HC_H FOR, -REV“ und „K47H V_LC_L FOR, -REV“ (Tabelle 2 Seite 31) durchgeführt (Abbildung 21B). Die entstandenen PCR-Produkte wiesen an ihren 5´- und 3´-Enden jeweils die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *KpnI/NcoI* bzw. *AsiSI/MluI* auf. Diese waren über die Primerüberhänge eingeführt worden.

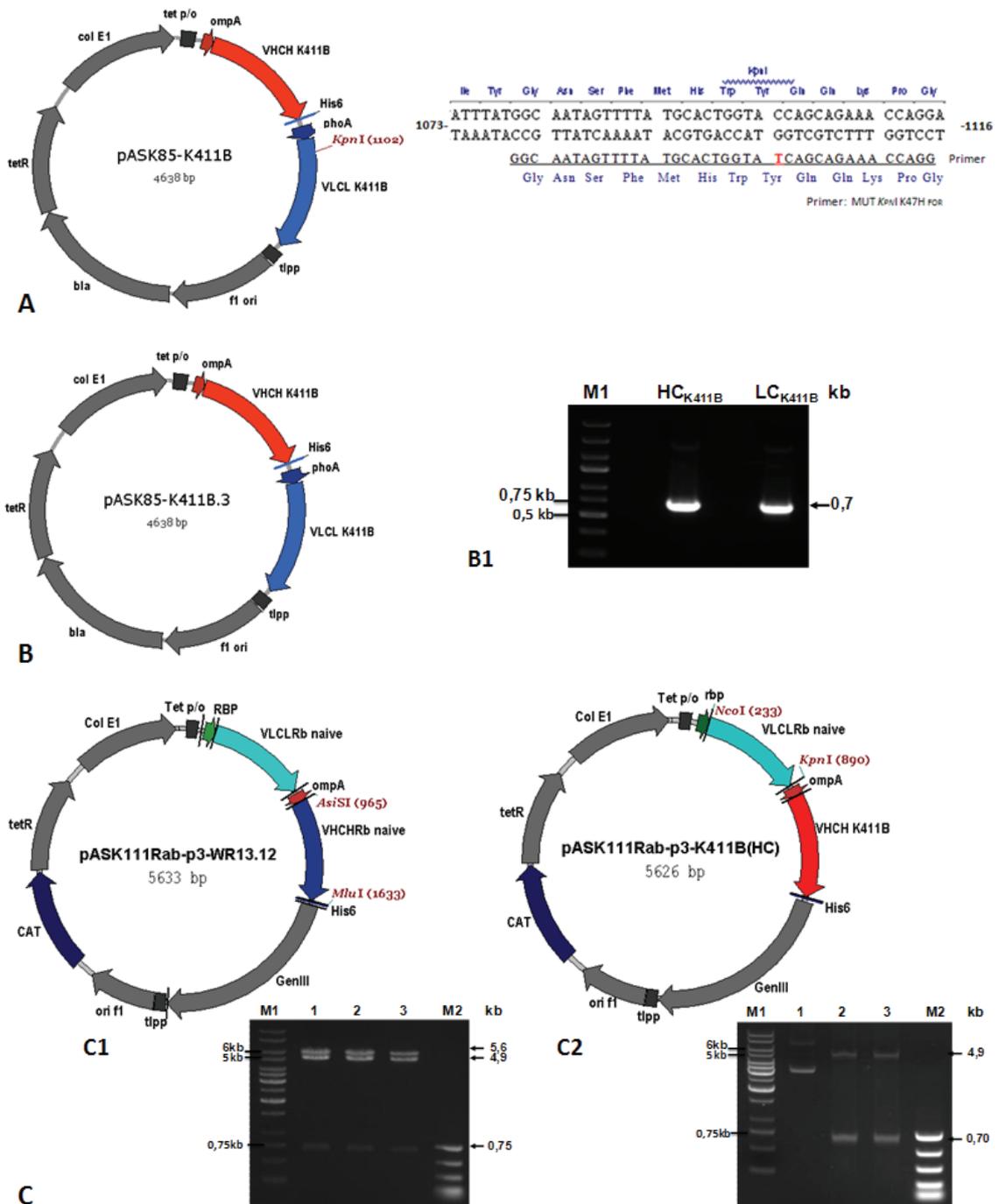


ABBILDUNG 21: KONSTRUKTIONSSCHEMA FÜR PASK111R_{AB}-P3-K411B

(A) ORTSGERICHTE MUTAGENESE ZUR ENTFERNUNG DER KPMI-ERKENNUNGSSEQUENZ (BP 1102) IM VEKTOR PASK85-K411B RECHTS: DNS-SEQUENZ FÜR DIE ZU MUTIERENDE GENREGION IN V_LK411B AUSGEHEND VON PASK85-K411B. RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLEN IN DER DNS-SEQUENZ SIND FETT DARGESTELLT UND DIE AMINOSÄURESEQUENZ IST ÜBER DER DNS-SEQUENZ ANGEZEIGT. DIE DURCH DIE PRIMER DETERMINIERTE MUTATION, DIE ZUR DELETION DER KPMI-RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLE FÜHRT, IST ROT UND FETT DARGESTELLT (B) AGAROSEGEL DER AMPLIFIKATION DER MUTIERTEN LC UND HC DES F_{AB}-FRAGMENTS K411B AUS PASK85-K411B.3 (C) RESTRIKTIONSVERDAU VON PASK111R_{AB}-P3-WR13.12 MIT DEN ENDONUKLEASEN *ASISI/MLUI* (C1) UND VON PASK111R_{AB}-P3-K411B_(HC) MIT *KPNI/NCOI* (C2); M1: 1-KB-MARKER, M2: PCR-MARKER

Die Amplifikate wurden über die korrespondierenden Schnittstellen in den Vektor pASK111R_{ab}-p3-WR13.12 ligiert. Dies geschah über den Austausch der leporiden Ketten durch die murinen Ketten des F_{ab}-Fragmentes K411B. Als Zwischenstufe wurde der Vektor pASK111R_{ab}-p3-K411B_(HC) isoliert, der die schwere Kette des murinen K411B-F_{ab}-Fragments und die leichte Kette des Kaninchen-F_{ab}-Fragments enthielt (Abbildung 21C2, Seite 73). Der gesuchte Vektor pASK111R_{ab}-p3-K411B konnte im Anschluss isoliert werden (Abbildung 22; Sequenz siehe Anhang B4). Über eine Analyse von zwei isolierten Klonen mittels RV mit den Enzymen *NcoI/SacI*, *SacI* und *NheI* wurde der erfolgreiche Austausch der leporiden durch die murinen Ketten nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte eine *Longrun*-Sequenzierung mit dem Primer „K47H V_LC_L FOR“ auf eventuelle Punktmutationen. Die Sequenzierung bestätigte, dass der isolierte Vektor die korrekten *Inserts* des murinen F_{ab}-Fragments K411B enthielt und keine unerwünschten Mutationen vorhanden waren.

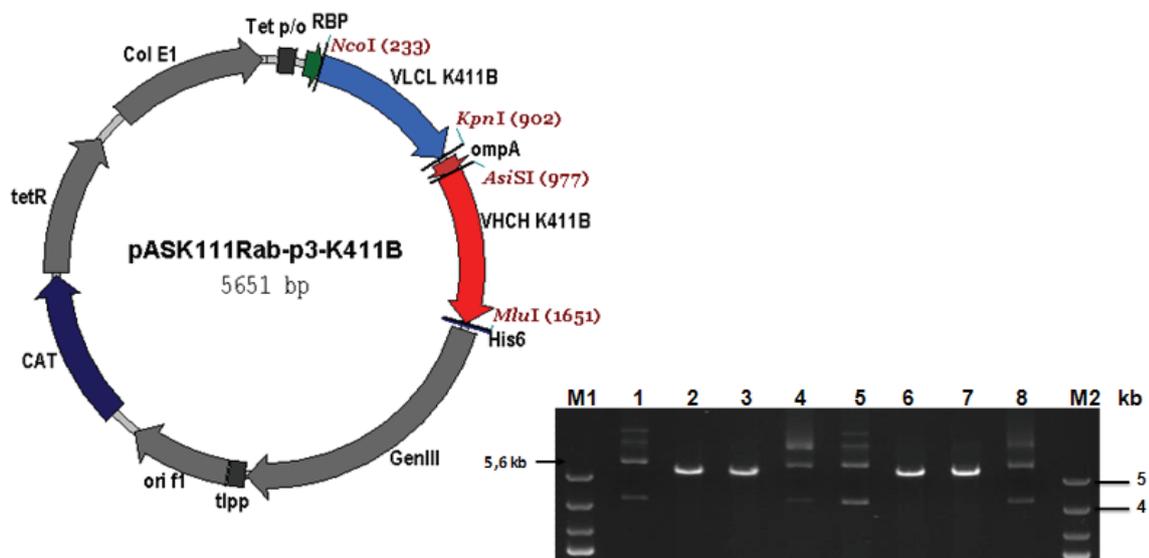


ABBILDUNG 22: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PHAGEMIDS PASK111R_{AB}-P3-K411B.

DER VEKTOR KODIERT UNTER DER TRANSKRIPTIONSKONTROLLE DES *TET^R/O* FÜR ZWEI FUSIONSPROTEINE. EINES BESTEHEND AUS DER BAKTERIELLEN RBP-SIGNALSEQUENZ, DER LC DES K411B UND DEM HIS₆-TAG. DIE ANDERE BESTEHEND AUS DER BAKTERIELLEN OMPA-SIGNALSEQUENZ, DER HC DES K411B UND DEM PIIL. DIE ÜBRIGEN VEKTORELEMENTE ENTSPRECHEN DER BESCHREIBUNG IN ABBILDUNG 6. RECHTS: KONTROLLRESTRIKTION VON ZWEI KLONEN DES PASK111R_{AB}-P3-K411B MIT DEN ENDONUKLEASEN *NCOI/SACI* (SPUR 2+6); *SACI* (SPUR 3+7) UND *NHEI* (SPUR 4+8); UNVERDAUTE PROBEN (SPUR 1+5); M1: EXPRESS-MARKER

3.2. VERGLEICH DER PHAGE DISPLAY-VEKTOREN

Die neukonstruierten Phagemide wurden im nächsten Schritt auf ihre Funktionalität und ihre Eignung zum Einsatz in Verbindung mit murinen Antikörpergenen getestet. Hierfür kam das bereits charakterisierte und etablierte F_{ab}-K411B zum Einsatz.

3.2.1. EINFLUSS DER ANTIKBIOTIKA UND LEADERSEQUENZEN AUF DAS WACHSTUM IN XL1 BLUE UND TG1 F⁺

Als Erstes wurde der Einfluss der verschiedenen Antibiotika und Leadersequenzen auf die Teilungsrate in den für das *Phage Display* geeigneten Bakterienstämmen XL1 *Blue* und TG1 F⁺ untersucht. Dazu wurden die vier Vektoren pASK85-K411B, pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-

K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B in die beiden *E.coli*-Stämme subkloniert und bei 30 °C bzw. 37 °C kultiviert. Dabei zeigte sich, dass die Vektoren bzw. die von ihnen kodierten Antibiotikaresistenzen keinen Einfluss auf das Wachstum beider Bakterienstämme nahmen, solange keine Induktion mit Anhydrotetracyclin erfolgte. Die Wachstumskurven der vier Vektoren in TG1 F⁺ und XL1 *Blue* waren jeweils identisch, wobei die Kulturen der XL1 *Blue* wie zu erwarten eine deutlich verlängerte Lag-Phase aufwiesen. Unterschiede im Wachstumsverhalten wurden erst nach der Induktion des *tet*-Promotors mit 0,2 µg/ml aTc und der damit verbundenen F_{ab}- und F_{ab}-pIII-Expression ersichtlich.

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationstemperatur wurden die F_{ab}-/F_{ab}-pIII-Expressionen bei 37 °C, 30 °C und 26 °C durchgeführt und das Wachstumsverhalten der Kulturen hinsichtlich ihrer Teilungsraten und der erreichten Maximalabsorption bei OD_{600nm} untersucht. Hohe Inkubationstemperaturen (37 °C und im Fall von XL1 *Blue* auch 30 °C) nach der Induktion führten bei beiden Bakterienstämmen zu einer hohen Maximalabsorption, aber gleichzeitig zu einer sehr kurzen stationären Phase und einer schnell einsetzenden Zelllyse. Im Fall einer geringen Inkubationstemperatur von 26 °C konnte bei den TG1 F⁺-Kulturen keine Steigerung der Absorption nach der Induktion beobachtet werden. Im Hinblick auf eine praktikable Versuchsdurchführung wurden die Expressionen deshalb für die XL1 *Blue*-Kulturen bei 26 °C und für die TG1 F⁺-Kulturen bei 30 °C durchgeführt. Die Teilungsrate der mit pASK85-K411B und pASK85-p3-K411B transformierten XL1 *Blue* nahm nach der Induktion stark ab. Diese Kulturen erreichten die stationäre Phase 1 h nach der Induktion, wobei die Teilungsrate für pASK85-K411B schwächer war. Der Beginn der Lytischen Phase konnte im Durchschnitt bei pASK85-K411B nach 3,5 h und bei pASK85-p3-K411B nach 2 h dokumentiert werden. Der Unterschied wird auf die Toxizität des exprimierten pIII zurückgeführt. Die Phagemide mit der CAT^R wiesen eine deutlich längere Log-Phase nach der Induktion auf. Die Dauer der stationären Phase betrug im Vergleich zu den Amp^R-Vektoren 2,5 h. Zwischen den Phagemiden mit der *rbp*- und *phoA*-Signalsequenz bestand ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Teilungsrate und der Länge der Log-Phase. Die erreichte Maximal-OD_{600nm} war 1,1–1,6fach höher als bei den Kulturen für das Phagemid pASK115-p3-K411B (*phoA* und *ompA* Leader). Die Kulturen für das Phagemid pASK111R_{ab}-K411B mit den beiden Signalpeptiden *rbp* und *ompA* wiesen insgesamt die besten Werte auf. Die Wachstumskurven der mit den Phagemiden transformierten TG1 F⁺-Kulturen wiesen eine sehr viel kürzere Lag-Phase von etwa 1 h auf. Die Teilungsraten der mit pASK85-K411B und pASK85-p3-K411B transformierten TG1 F⁺ nahmen nach der Induktion ebenfalls stark ab, wobei im Vergleich zu XL1 *Blue* diese Kulturen mit einer Expression von pIII die schlechteren Teilungsraten aufwiesen. Die stationären Phasen bis zum Einsetzen der Zelllyse betrug bei beiden Amp^R-Phagemiden zwischen 2,5 (pASK85-p3-K411B) und 3 h. Die erreichten Maximal-OD_{600nm} waren 1,2–1,4fach höher als für die Vergleichskulturen mit XL1 *Blue*. Die Cm^R-Vektoren verhielten sich analog zu den Kulturen in XL1 *Blue*. Sie hatten eine stationäre Phase von 3,5 h und erreichten eine ca. 1,6fache höhere Maximal- OD_{600nm} als die Amp^R-Vektoren. Auch im Vergleich zu den TG1 F⁺-Kulturen zeigte sich das Phagemid pASK111R_{ab}-K411B als die Kultur mit der längsten Log-Phase und den insgesamt besten Werten.

3.2.2. VERGLEICH DER EXPRESSION VON F_{AB}-PIII UND F_{AB}-FRAGMENTEN

Um abschließend sagen zu können, welcher der Bakterienstämme am besten für die nachfolgenden Anwendungen geeignet war, wurden die Phagemide in den beiden Stämmen analog dem Protokoll zur Herstellung rekombinanter Proteine im analytischen Maßstab

(2.2.3.1) induziert. Die nach dreistündiger Induktion präparierten periplasmatischen Fraktionen wurden im Verdrängungs-ELISA und *Western Blot* auf die Funktionalität des F_{ab} -K411B und des Fusionsproteins K411B-pIII analysiert.

Die Analyse der Periplasmafraktionen mittels Atrazin-Tracer im *Western Blot* (Abbildung 23) zeigte, dass mit allen Phagemiden K411B- F_{ab} -Fragmente und mit den Phagemiden pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B K411B-pIII-Fusionsproteine exprimiert werden konnten. Die auf dem Blot sichtbaren Banden bei 50 kDa entsprachen dem F_{ab} -K411B und die Banden bei 100 kDa dem Fusionsprotein K411B-pIII. Wie zu erwarten ist die Bande bei 100 kDa deutlich schwächer, da sie etwa 10 % der exprimierten Proteinmenge entsprach. Auch wies die Spur für pASK85-K411B erwartungsgemäß keine Bande auf Höhe von 100 kDa auf. Des Weiteren konnte eine verringerte Proteinmenge auf der Spur für das Phagemid pASK111R_{ab}-p3-K411B beobachtet werden.

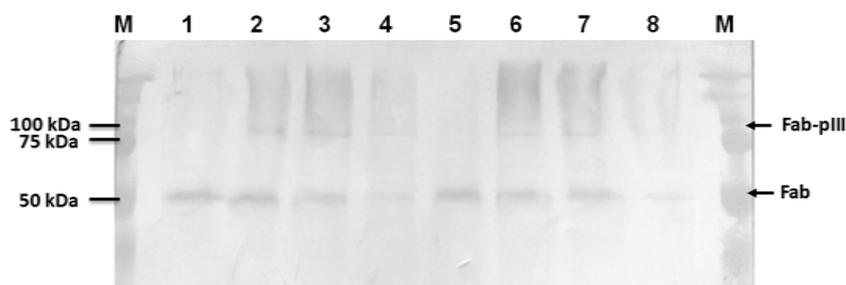


ABBILDUNG 23: WESTERN BLOT ZUM VERGLEICH DER PROTEINEXPRESSION IN XL1 BLUE UND TG1 F⁺
 AUF EIN 10 %IGES NICHTREDUZIERENDES SDS POLYACRYLAMIDGEL WURDEN JE 15 µL PROTEINPRÄPARATION AUS DEM PERIPLASMA DER IN TG1 F⁺ (SPUREN 1–4) UND XL1 BLUE (SPUREN 5–8) EXPRIMIERTEN PHAGMIDE PASK85 (SPUR 1+5), PASK85-P3-K411B (SPUR 2+6), PASK115-P3-K411B (SPUR 3+7) UND PASK111R_{ab}-P3-K411B (SPUR 4+8) AUFGETRAGEN. NACH DEM ELEKTROTRANSFER AUF EINE IMMOBILONP-MEMBRAN, WURDEN K411B F_{ab} -FRAGMENTE MIT ATRAZIN-TRACER NACHGEWIESEN. DIE SUBSTRATREAKTION ERFOLGTE DURCH ZUGABE VON WESTERN BLOT POD-SUBSTRAT (ABSCHNITT 2.2.5.1, SEITE 54); M: PRECISION PLUS PROTEIN STANDARD

Durch einen kompetitiven ELISA wurde die Funktionalität der exprimierten F_{ab} - und F_{ab} -pIII-Fragmente bestätigt. 100 µl der periplasmatischen Fraktionen wurde für 1 h auf Mikrotiterplatten inkubiert, die über Nacht mit 5 µg/ml Ziege<Maus>AK (SIGMA) oder Maus<pIII>AK (MOBITEC) beschichtet worden waren. Es wurden jeweils Dreifachwerte verschiedener Verdünnungsstufen (1:2 und 1:5 verdünnt) aufgetragen. Nach dem Waschen wurden 100 µl eines Gemischs aus 75 µl Atrazin (10³ µg/l) und 25 µl eines Atrazin-Tracer-Derivats oder 75 µl PBS und 25 µl eines Atrazin-Tracer-Derivats für eine weitere Stunde zugegeben. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Auswertung der Absorptionen bei 450 nm. Die Absorptionen wurden aus den ELISA-Messungen für beide Bakterienstämme auf eine Bakterienzahl von 1 x 10⁹ normalisiert, damit die Vergleichbarkeit innerhalb eines Versuches gegeben war. Es zeigte sich, wie bereits im *Western Blot* dargestellt, dass mit allen Vektoren in beiden Bakterienstämmen eine funktionelle Expression von F_{ab} induziert werden konnte (Abbildung 24A, Seite 77). Diese drückte sich in den hohen Absorptionsunterschieden zwischen den Werten für die Zugabe des Atrazin-Überschusses und den PBS-Werten aus. Für die Phagemide pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B konnte zusätzlich die funktionelle Expression des K411B-pIII nachgewiesen werden (Abbildung 24B, Seite 80).

Im Vergleich der Absorptionsmaxima zwischen den verschiedenen Phagemiden konnte beobachtet werden, dass das Phagemid pASK111R_{ab}-K411B nur die Hälfte der Absorptionen

der anderen periplasmatischen Fraktionen erreichte, obwohl dieses Phagemid in den Teilungsraten und der OD_{600nm} bei der Ernte die höchsten Werte erreicht hatte. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Intensität der *Western Blot*-Banden wider. Die Absorptionswerte von pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B waren bei der Analyse hinsichtlich der Gesamtmenge an F_{ab} gegenüber den Amp^R-Phagemiden verringert. Vergleicht man bei den eingesetzten Antibiotika das Verhältnis der Signalstärken bezüglich des Fusionsproteins F_{ab}-pIII ließ dies folgenden Rückschluss zu: Durch die stringenteren Chloramphenicol-Resistenz wurde die Proteinexpression insgesamt reduziert, jedoch stieg der Anteil an exprimierten Fusionsproteinen. Setzte man diese Beobachtung mit den Werten für den pASK111R_{ab}-p3-K411B in Relation, konnten die Absorptionswerte wahrscheinlich durch die Verwendung der Singelsequenz rbp begründet werden.

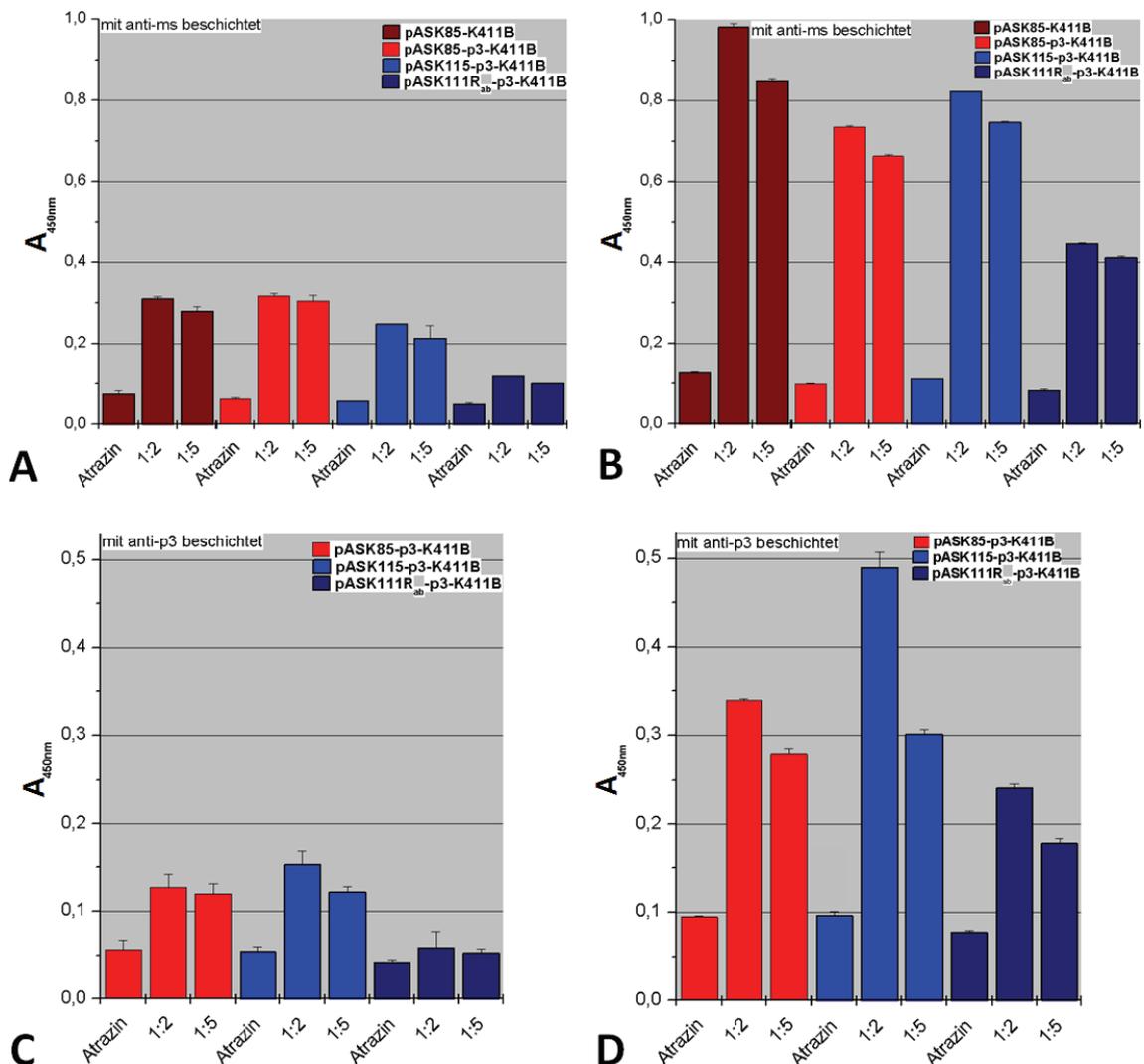


ABBILDUNG 24: AUSWERTUNG VON ATRAZIN-VERDRÄNGUNGS-ELISAS MIT DEN IN DEN PHAGEMIDEN PASK85-K411B, PASK85-P3-K411B, PASK115-P3-K411B UND PASK111R_{ab}-P3-K411B EXPRIMIERTEN F_{ab}-FRAGMENTEN
VERDRÄNGUNGS-ELISA MIT PERIPLASMATISCHEN FRAKTIONEN AUS TG1 F⁺ (A+C) UND XL1 BLUE (B+D). ZUR ERMITTLUNG DER F_{ab}-EXPRESSION WURDEN MIKROTITERPLATTEN MIT ZIEGE<MAUS>AK BESCHICHTET (A+B); FÜR DIE MESSUNG DES F_{ab}-P_{III} ANTEILS WURDE MIT MAUS<P_{III\muL VON VERDÜNNUNGEN DER PERIPLASMATISCHEN FRAKTIONEN (1:2 UND 1:5 VERDÜNNT). DER NACHWEIS DER F_{ab}-FRAGMENTE WURDE DURCH DIE ZUGABE VON ATRAZIN-TRACER ERBRACHT. DESSEN VERDRÄNGUNG ERFOLGTE MIT 10³ μ G/L ATRAZIN. DIE SUBSTRATREAKTION WURDE DURCH ZUGABE VON ELISA POD-SUBSTRAT GESTARTET. DIE DARGESTELLTEN DATEN WURDEN IN DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN ERMITTELT}

Die Auswertung der Analysen ließ darauf schließen, dass der *E. coli*-Stamm XL1 *Blue* von beiden getesteten Bakterienstämmen die besseren Sekretionseigenschaften für die murinen Proteine aufweist und deshalb für die Expression von löslichen F_{ab}-Fragmenten besser geeignet ist.

3.2.3. VERGLEICH HINSICHTLICH DES PHAGENTITERS UND DES VERHÄLTNISSIS WILDTYP ZU REKOMBINANTEN PHAGEN

Durch die kürzere Lag-Phase und die ausgeprägtere stationäre Phase bot sich für weitere Analysen bezüglich des Einbaus des K411B-pIII in rekombinante Phagen, abhängig vom verwendeten Phagemid, die weitere Verwendung des *E. coli*-Stamms TG1 F⁺ an. Um die Gesamtmenge an sekretierten Phagen abhängig von dem verwendeten Phagemid zu ermitteln, wurden wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben je 5 ml einer sich in der Mitte der Log-Phase befindlichen TG1 F⁺-Kultur mit M13K07-Helferphagen infiziert und die Expression des K411B-pIII-Fusionsproteins induziert. Am nächsten Morgen wurde die Ernte-OD_{600nm} der verschiedenen Kulturen bestimmt. Tabelle 19 zeigt die Werte von drei unabhängigen Infektionen.

TABELLE 19: ERNTE-OD_{600NM} DER PHAGENINFEKTIONEN IM PHAGEMIDVERGLEICH

Phagemid in TG F ⁺	Ernte OD _{600nm} nach 12h		
	1. Infektion	2. Infektion	3. Infektion
pASK85-K411B	4,2	5,9	5,8
pASK85-p3-K411B	3,7	4,9	5,0
pASK115-p3-K411B	0,23	0,35	0,14
pASK111R _{ab} -p3-K411B	0,41	0,48	0,2

Die Menge der sekretierten Phagen jeder Phagemid-Kultur und der darin enthaltene Anteil an rekombinanten Phagen wurde durch Reinfektion von je 250 µl Log-Phase-TG1 F⁺ und anschließendem Ausplattieren von je 100 µl der Reinfektionen auf Kan- und Amp/Cm-Platten ermittelt (siehe 2.2.2.3). Die Anzahl an ausgezählten Kolonien, deren Summe der Gesamtmenge der jeweiligen Phagenpräzipitation entsprach, ist in Tabelle 20 dargestellt (Coomber, 2003). Die Werte wurden aus vier unabhängigen Versuchen bezogen.

TABELLE 20: AUSBEUTEN DER PHAGENFÄLLUNGEN IM PHAGEMIDVERGLEICH

Phagemid in TG F ⁺	AB	[cfu/ml] pro Experiment			
		1	2	3	4
pASK85-K411B	Amp	--	--	--	--
	Kan	4,9 x 10 ⁹	5,9 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁹
pASK85-p3-K411B	Amp	2,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	6 x 10 ⁴
	Kan	5,8 x 10 ⁹	3,9 x 10 ⁹	4,3 x 10 ⁷	3,3 x 10 ⁹
pASK115-p3-K411B	Cm	6,6 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁶
	Kan	1,7 x 10 ⁷	8,5 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁷	3 x 10 ⁶
pASK111R _{ab} -p3-K411B	Cm	5,7 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	3,6 x 10 ⁶	4,7 x 10 ⁶
	Kan	9,4 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁷	5 x 10 ⁷

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Gesamtmenge an sekretierten Phagen in den Cm-Kulturen insgesamt niedriger war als in den Amp-Kulturen. Die Cm-Kulturen wiesen jedoch einen größeren Anteil an rekombinanten Phagen auf. Bei der Gesamtphagenmenge von pASK85-p3-K411B lag der Anteil an rekombinanten Phagen unter 1 %. Beim Phagemid pASK115-p3-

K411B war die Menge an Phagen, die das Phagemid trugen, signifikant höher als die der Wildtypphagen. Hier lag der Anteil zwischen 20 und 65 %.

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 25, Seite 79 der prozentuale Anteil an rekombinanten Phagen, bezogen auf die Gesamtmenge an Phagen, dargestellt. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittel aus den vier Experimenten.

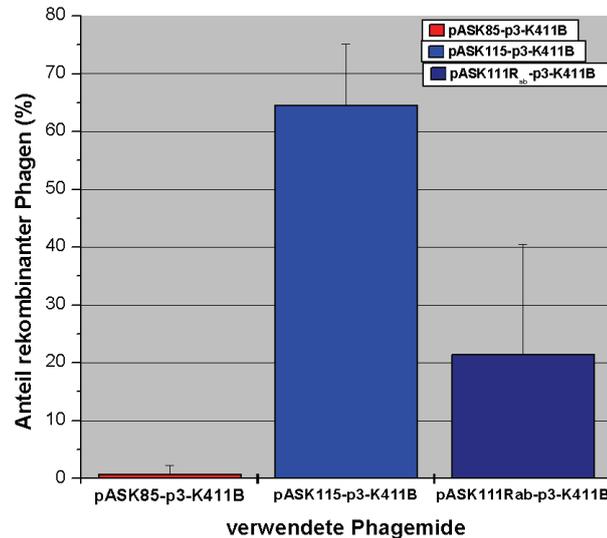


ABBILDUNG 25: PROZENTUALER ANTEIL AN REKOMBINANTEN PHAGEN IM PHAGEMIDVERGLEICH
 DER ANTEIL IST BEZOGEN AUF DIE GESAMTMENGE AN ERHALTENEN PHAGEN. DIE ABBILDUNG BASIEREND AUF DEN WERTEN
 AUS TABELLE 20. DIE WERTE ENTSPRECHEN JEWEILS DEM MITTEL AUS DEN VIER EXPERIMENTEN.

Setzte man die Menge der Gesamtphagen ins Verhältnis zur Ernte OD_{600nm} , dann wurde ersichtlich, dass die Kulturen, die die Phagemide pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B trugen und damit unter der Kontrolle der Chloramphenicolresistenz standen, ebenfalls die besseren Ausbeuten an Phagen pro Bakterienmasse hatten.

Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Phagen auch ein funktionelles F_{ab}-Fragment auf ihrer Oberfläche präsentierten, wurde ein Phagen-ELISA durchgeführt. Die Tests auf Phagen-K411B wurden im direkten, kompetitiven ELISA durchgeführt. Dafür wurden Verdünnungen mit je $3,5 \times 10^4$, 350 und 35 Phagen jeder Präparation in 50 μ l Carbonatpuffer direkt bei 4 °C über Nacht auf den Mikrotiterplatten immobilisiert. Am nächsten Tag wurden durch die Verdrängung des Atrazin-Tracers die rekombinanten Phagen nachgewiesen (siehe 2.2.5.2).

Die Auswertung dieses Tests bestätigte die Ergebnisse aus den Reinfektionsversuchen. Die Phagenpräzipitation aus der Kultur mit dem Phagemid pASK115-p3-K411B lieferte die höchsten Signale und legte damit nahe, dass diese Präparationen den höchsten Anteil an K411B-Phagen enthielten. Die Präzipitation aus den Kulturen, die das für leporide Antikörpergene geeignete Phagemid pASK111R_{ab}-p3-K411B enthielten, lieferten geringfügig schwächere Werte. Damit konnten auch in diesem Fall die Ergebnisse aus dem Reinfektionsversuch bestätigt werden. Das Phagemid pASK85-p3-K411B erbrachte in beiden Versuchen die schlechtesten Ergebnisse.

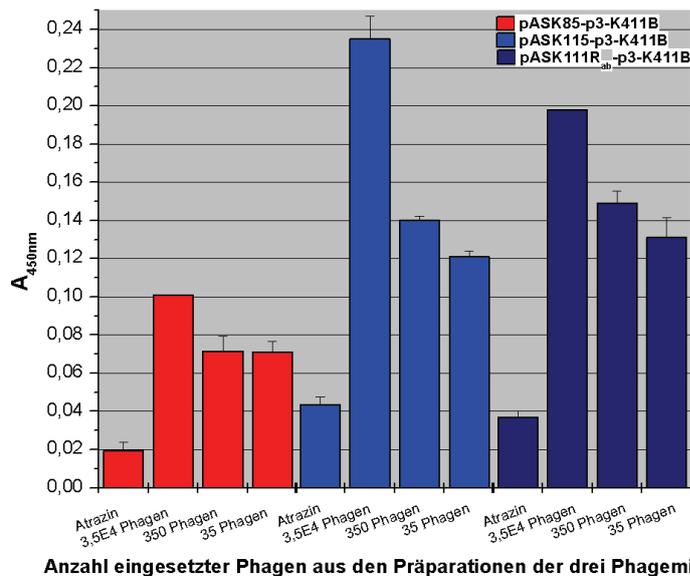


ABBILDUNG 26: AUSWERTUNG VON PHAGEN-ELISAS FÜR DEN PHAGEMIDVERGLEICH

DURCHGEFÜHRT WURDEN VERDRÄNGUNGS-ELISAS MIT JE $3,5 \times 10^4$, 350 UND 35 PHAGEN AUS DEN PRÄPARATION MIT DEN PHAGEMIDEN PASK85-P3-K411B, PASK115-P3-K411B UND PASK111R_{AB}-P3-K411B. DIE PHAGEN WURDEN ÜBER NACHT DIREKT AUF MIKROTITERPLATTEN IMMOBILISIERT. DER NACHWEIS VON ASSOZIIERTEN F_{AB}-FRAGMENTE WURDE DURCH DIE ZUGABE VON ATRAZIN-TRACER ERBRACHT. DESSEN VERDRÄNGUNG ERFOLGTE MIT 10^3 µG/L ATRAZIN. DIE SUSTRATREAKTION WURDE DURCH ZUGABE VON ELISA POD-SUBSTRAT GESTARTET. DIE DARGESTELLTEN DATEN WURDEN IN VIER UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN ERMITTELT

3.3. SELEKTION VON LEPORIDEN SULFONAMIDSPEZIFISCHEN F_{AB}-ANTIKÖRPER-FRAGMENTEN

3.3.1. DAS F_{AB}-PHAGEN-SYSTEM

Zur Selektion von sulfonamidspezifischen F_{ab}-Fragmenten wurde die Technik des monovalenten *Phage Displays* (Lowman & Wells, 1991) unter Verwendung des neukonstruierten Phagemidvektors pASK111R_{ab}-p3 angewandt. Abbildung 27, Seite 81 gibt einen Überblick über die Methodik zur Selektion der F_{ab}-Fragmente aus leporiden B-Lymphozyten mit Hilfe des Phagemids. Die Präsentation des Fremdproteins auf der Oberfläche von Phagenpartikeln gelingt, indem durch das Phagemid, welches die intergenische Region des Phagen f1 besitzt, ein Fusionsprotein aus bakteriellem Signalpeptid, Fremdprotein und dem Phagenhüllprotein pIII des Bakteriophagen M13 oder Fragmenten desselben in *E. coli* synthetisiert wird. Dabei bewirkt die Signalsequenz die Translokation des N-Terminus des Fusionsproteins in das Periplasma des Bakteriums. Die pIII-Domäne am C-Terminus des Fusionsproteins bleibt in der inneren Membran von *E. coli* verankert, dort findet die Phagenassemblierung statt. Dabei kommt es teilweise zum Einbau des Fusionsproteins neben dem nativen Phagenhüllprotein in die Phagenpartikel (Barbas *et al.*, 2001). Diese Partikel sind natürlichen Phagen sehr ähnlich und können Bakterienzellen infizieren. Durch die Ko-Infektion mit dem Helferphagen werden die Hüllproteine des nativen Phagen produziert. Eine entsprechende Genregulation kann dabei die Produktion des Fusionsproteins so regulieren, dass bei etwa 10 % der Phagen eine der insgesamt fünf Kopien des pIII durch das Fusionsprotein ersetzt wird (Kontermann & Dübel, 2001). Die funktionelle, monovalente Präsentation des Fremdproteins auf der Phagenoberfläche erlaubt die Trennung unterschiedlicher Phagemide anhand der Bindungseigenschaften des präsentierten F_{ab}-Fragments zu einem gegebenen Zielmolekül. Bindende Phagenpartikel wer-

den isoliert und deren DNS amplifiziert, indem Bakterienzellen infiziert und damit erneut rekombinante Phagen produziert werden. Diese können nun wieder einem Zyklus zugeführt werden, in welchem die Phagenpartikel mit Affinität zum vorgegebenen Liganden weiter angereichert werden. Anschließend werden die selektierten AK in der Regel auf ihre Liganden-Bindungs-Eigenschaften getestet. Da die selektierte Phagemidpopulation meist heterogen ist und auch Partikel mit nicht-spezifischen Bindungseigenschaften enthält, empfiehlt sich die Analyse zahlreicher Varianten.

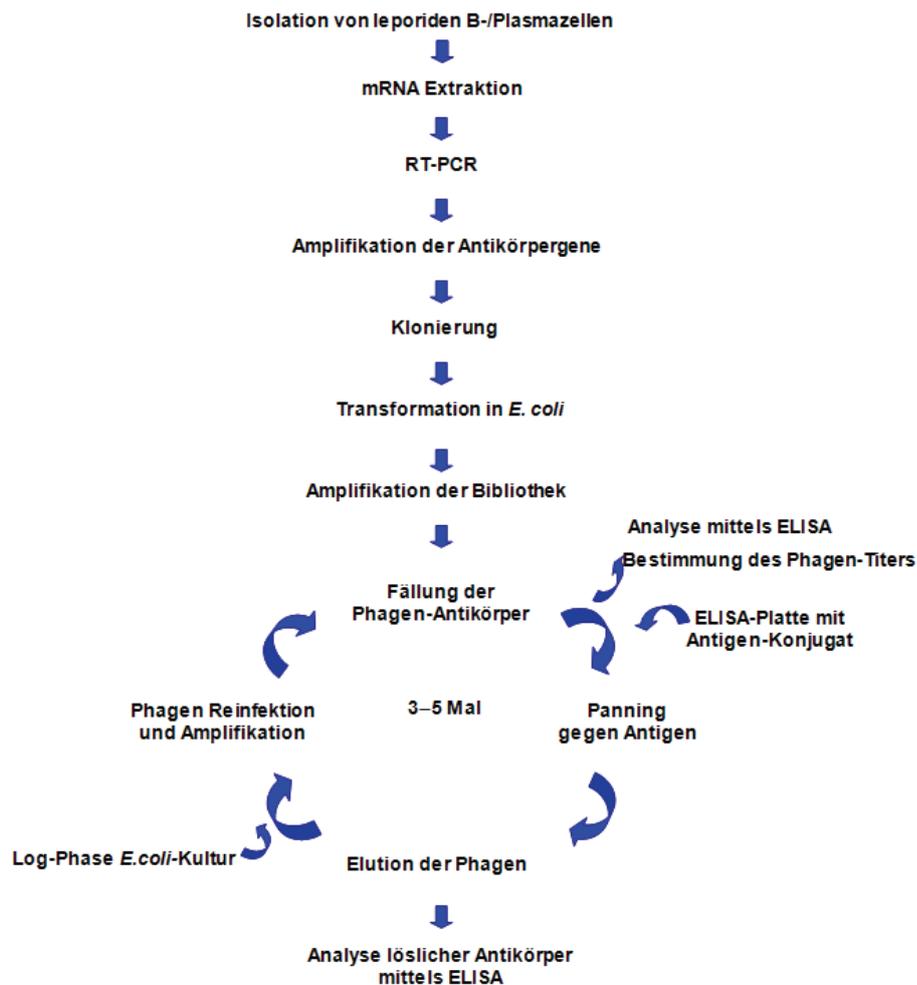


ABBILDUNG 27: ÜBERBLICK ÜBER DIE SELEKTION DER F_{ab} -FRAGMENTE UND ANWENDUNG DES PHAGE DISPLAY-SYSTEMS

Grundlage für die Isolierung eines spezifischen F_{ab} -Fragments war eine immunisierte Bibliothek mit einer Komplexität von $6,6 \times 10^6$ Varianten. Diese Molekül-Bibliothek war durch Ligation von $6,4 \times 10^5$ Varianten einer Leichtketten-Bibliothek und der $2,14 \times 10^6$ Varianten einer Schwerketten-Bibliothek generiert worden (siehe 2.2.2.1). Als mRNS-Quelle dienten B-Lymphozyten, die aus den Milzen von fünf mit Sulfonamid-HCH-Konjugaten (SA1 und SA2) immunisierten weiblichen *New-Zealand-White*-Kaninchen gewonnen wurden. Zwei der Tiere (rb #154 und rb #156) wurden mit dem Sulfonamid-HCH-Konjugat SA1 und drei Tiere (rb #157, rb #158 und rb #159) mit dem Sulfonamid-HCH-Konjugat SA2 immunisiert (AMRG, Publikation in Vorbereitung). Bei SA1 handelt es sich um das Sulfonamid Sulfapyridin und bei SA2 um die Substanz Sulfacetamid. Die für die Immunisierungen verwendeten Sulfonamide waren kovalent mit dem immunogenen Trägerprotein HCH konjugiert. Die fünf Kaninchen erhielten jeweils mehrere

Immunisierungen mit den Vakzinen. Dabei sollten die Tiere durch die wiederholte Applikation der Konjugate im Rahmen einer humoralen Immunantwort verstärkt AK gegen die verabreichten Substanzen bilden (Janeway *et al.*, 2002). Die Entwicklung der Antikörpertiter in den Kaninchen wurde mit Hilfe von ELISAs untersucht. In allen Tieren wurden durch die Immunisierungen AK induziert, die an die für die Vakzinierungen verwendeten Komponenten, Sulfonamid SA1, SA2 und Linker, binden konnten. Mit dem von der AMR zur Überwachung der Serumtiter durchgeführten ELISA-Experimente konnte außerdem eine Kreuzreaktivität der fünf Tiere für beide Sulfonamide gezeigt werden.

Im Anschluss an die mRNS-Isolierung und die cDNS-Erststrangsynthese wurden die Leicht- und Schwerketten selektiv über PCR amplifiziert. Über die verwendeten Oligonukleotide wurden während der Amplifikation zugleich die Restriktionsschnittstellen *AsiI* und *MluI* am 5'-Ende bzw. 3'-Ende der schweren Kette eingeführt. Analog wurden die 5'-Enden der leichten Kette mit *NcoI* und die 3'-Enden mit *KpnI* als Erkennungssequenz versehen. Die entsprechenden Amplifikate ließen sich elektrophoretisch auftrennen und isolieren. Über die angefügten Restriktionsstellen erfolgte die Ligation der LC- und HC-Fragmente mit dem Phagemid pASK111R_{ab}-p3-WR. Hieraus resultierten zwei getrennte Bibliotheken für die leichten und schweren Ketten. Diese können nach Bedarf zu einer vollständigen Sulfonamid-Bibliothek zusammenligiert werden. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt in einer Erhöhung der Rekombinationsmöglichkeiten und dem Vermeiden von *Insert*-Verlust durch Restriktion.

Durch den Aufbau des Phagemids (siehe 3.1.3.4) entstand nach Insertion der HC in pASK111R_{ab}-p3-LC_{SABib} ein Fusionsgen aus dem HC-Fragment und dem GenIII. Während der Expression in der *E. coli* Suppressor-Linie TG1 F⁺ entstanden durch Überlesen des *Amber-Stop-Codons* F_{ab}-pIII-Fusionsproteine, die nach Infektion mit M13KO7-Helferphagen an der Phagenoberfläche präsentiert wurden. Bei der Selektion der F_{ab}-tragenden Phagen im *Panning* banden die spezifischen Phagen über das AK-Fragment an das Hapten-Konjugat SA2-ConA, das auf Mikrotiterplatten immobilisiert worden war. Nach dem Entfernen ungebundener Phagen im nachgeschalteten Waschschrift (Dauer und Anzahl richtete sich nach der *Panning*-Runde, siehe Tabelle 12) wurden die gebundenen Phagenantikörper mit 300 µl/Kavität 0,1 M Glycin/NaCl (pH 2,2) für 9 min eluiert und sofort mit Tris-HCl (pH 7,4) neutralisiert. Im Anschluss an die Anreicherungsexperimente wurden die Titer der Elutionsfraktionen bestimmt (siehe 2.2.2.3) und im Anschluss an die Selektion wurden *E. coli* TG1 F⁺-Zellen mit den selektierten Phagen infiziert. Durch Ausplattieren auf Selektionsmedium bildeten sich Einzelkolonien, die nach Kultivierung und Induktion mit aTc, lösliche F_{ab}-Fragmente exprimierten. Die einzelnen Klone wurden im Enzymimmunoassay auf ihre Spezifität zu SA2-ConA über Verdrängung mit Sulfonamid-Analyten getestet.

3.3.2. ETABLIERUNG EINER IMMUNISIERTEN LEPORIDEN BIBLIOTHEK

3.3.2.1. ISOLATIERUNG DER MRNS UND REVERSE TRANSKRIPTION

Als DNS-Matrix zur Amplifikation der V_HC_H- und V_LC_L-Regionen diente die cDNS, die aus isolierter mRNS synthetisiert wurde. Zur Gewinnung der mRNS wurden aus den zur Verfügung gestellten Kaninchenmilzen die B-Zellen ausgespült. Durch Einsatz einer Neubauerzählkammer wurde die Anzahl der Zellen auf 4,2 x 10⁷ Zellen bzw. 8,6 x 10⁷ Zellen für die Präparation der Tiere rb #154 bzw. rb #156 bestimmt. Die Behandlung der Milzen rb #157, rb #158 und rb #159

ergaben jeweils eine Ausbeute von $8,4 \times 10^7$, $2,8 \times 10^7$ und $3,1 \times 10^7$ Zellen. Die Zellen wurden in Aliquoten zu 1×10^7 bzw. 3×10^7 Zellen aufgeteilt, abzentrifugiert und eingefroren.

Die anschließende mRNS-Extraktion (siehe 2.2.1.4) erfolgte mit Hilfe des mRNA ISOLATION KIT (ROCHE), wobei die polyadenylierte mRNS nach Zellaufschluss von 1×10^7 bis 3×10^7 Zellen über poly(dT) beschichtete Magnetperlen isoliert und nach Zusatz von RNase-Inhibitor bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren wurde. Die Ausbeute der mRNS ist in Tabelle 21 angegeben:

TABELLE 21: AUSBEUTEN DER MRNS-ISOLATIONEN

Tier	Zellen [n]	mRNS-Ausbeute [μg]
#154	1×10^7	1,6
#156	3×10^7	5,3
#157	2×10^7	4,2
#158	3×10^7	1,4
#159	3×10^7	16,2

Der poly(A)+-RNS-Extrakt wurde für die Synthese der Erststrang-cDNS (siehe 2.2.1.4) verwendet. Die Synthesereaktion erfolgte über die Katalyse mit *reverser Transkriptase*. Die gewonnene cDNS aller Versuchstiere wurde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und zur Amplifikation der variablen Regionen eingesetzt.

3.3.2.2. SELEKTIVE AMPLIFIKATION DER LEPORIDEN $V_H C_H$ - UND $V_L C_L$ - REGIONEN

Unter Verwendung der Erststrang-cDNS als *template* wurden die LC- und HC-Ketten der immunisierten Kaninchen in separaten PCR-Reaktionen (siehe 2.2.1.6) mit den entsprechenden Primern amplifiziert. Die höchsten Ausbeuten mit den meisten Primerpaarungen ergaben sich bei der Durchführung einer TD-PCR mit *Taq* E unter Zusatz von 2,5 % (v/v) Formamid. Hierbei betrug der TD-Bereich $65 \text{ }^\circ\text{C}$ – $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Die *Annealing*-Temperatur in der konstanten Amplifikationsphase betrug $53 \text{ }^\circ\text{C}$. Für die Amplifikation der beiden Ketten wurden Volumina von 1–5 μl an cDNS eingesetzt (siehe Tabelle 11 Seite 45). Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne cDNS mitgeführt. Die Reaktion erfolgte als *Hotstart*-PCR mit dem angegebenen Zeit-Temperatur-Profil (Tabelle 9, Seite 44). Es wurden separate PCR-Ansätze für die Amplifikation von LC-Ketten des κ - und λ -Typs sowie für HC-Ketten der Antikörperklassen A, M und G unter Verwendung von verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt. Die Reaktionen wurden über Gelelektrophorese (1,5 % Agarosegel) analysiert. Nach Isolation der Banden aus den Agarosegelen wurden die Amplifikate der verschiedenen Versuchstiere kettenspezifisch vereinigt und die Gesamtkonzentration ermittelt (Tabelle 22).

TABELLE 22: DNS-AUSBEUTE DER AMPLIFIKATIONEN FÜR KANINCHEN LC- UND HC-GENE

Kette	Anzahl der Reaktionen	DNS-Ausbeute [μg]
LC $\kappa + \lambda$	20	2,3
LC λ	20	0,46
HC IgA	16	0,85
HC IgM	16	5,7
HC IgG	20	5,6

3.3.2.3. KLONIEREN DER AMPLIFIKATE AUF DEM PHAGEMID $pASK111R_{AB-P3-WR}$

Die verwendeten Schnittstellen *AsiSI* und *MluI* für $V_{H}C_{H}$ bzw. *NcoI* und *KpnI* für $V_{L}C_{L}$ kommen in den bisher veröffentlichten Sequenzen der variablen und konstanten leporiden Domänen nur zu einem minimalen Prozentsatz vor (Lefranc *et al.*, 1999; Riuz *et al.*, 2000; Lefranc *et al.*, 2005). Um dennoch sicherzustellen, dass bei der Klonierung keine DNS-Fragmente durch vorhandene Schnittstellensequenzen verloren gehen, wurden zuerst separate LC- und HC-Subbibliotheken kloniert und transformiert (Abbildung 28B, Seite 84). Die $V_{H}C_{H}$ - und $V_{L}C_{L}$ -Amplifikate der leporiden AK-Subklassen wurden vorher gemäß ihres natürlichen prozentualen Anteils gemischt, wobei IgG 80 %, IgA 12 % und IgM 4 % des HC-Ansatzes ausmachten (Mage, 1998). Der Ansatz der leichten Kette bestand zu 95 % aus κ - und zu 5 % aus λ -Domänen. Auch wurde ein equimolarer $pASK111R_{ab-p3-WR}$ -Phagemid-Mix aus den Klonen 2, 5 und 13 hergestellt.

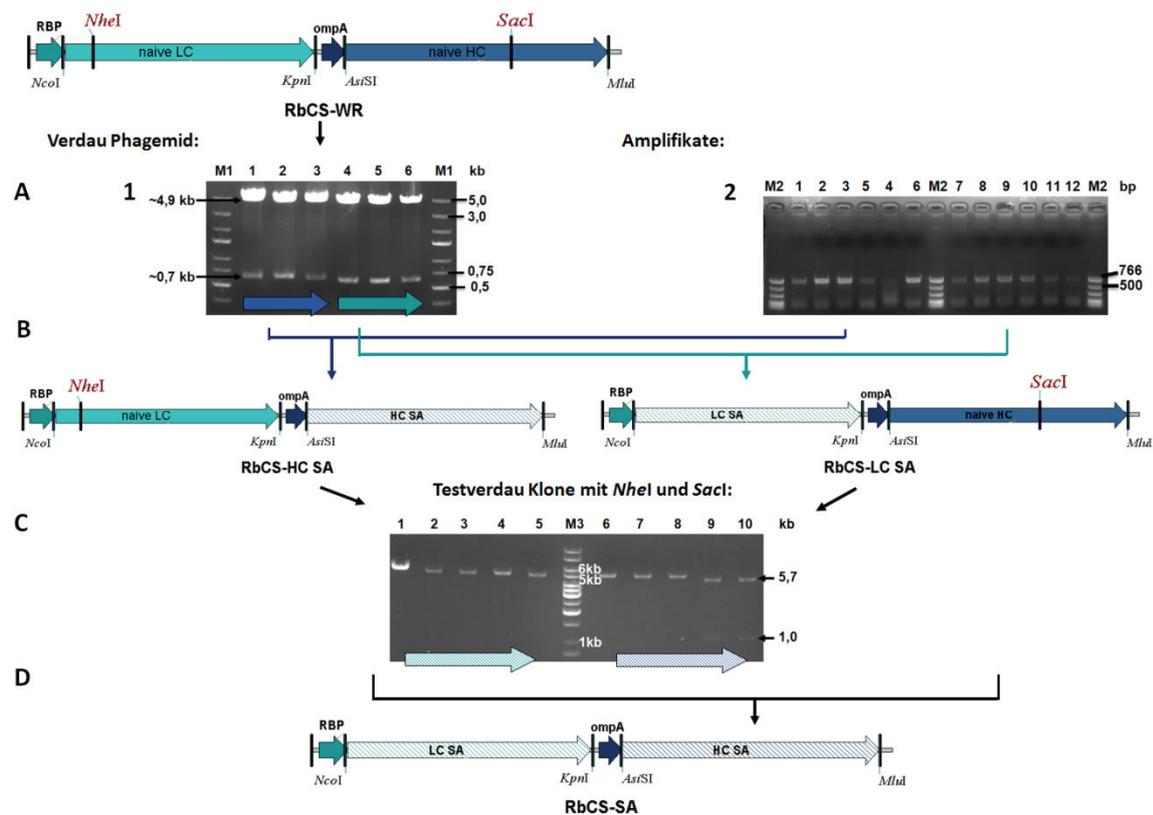


ABBILDUNG 28: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER STRATEGIE ZUR GENERIERUNG DER F_{AB} -BIBLIOTHEKEN.

ERKLÄRUNGEN ZUM KONSTRUKTIONSERGANG FINDEN SICH IM TEXT. M1: GENE-RULER-EXPRESS (FERMENTAS); M2: PCR-MARKER; M3: 1KB-MARKER. IN DAS SCHEMA EINGEFÜGT SIND AGAROSEGELE VON RESTRIKTIONSANALYSEN DER PHAGEMIDE $pASK111R_{AB-P3-WR2/5/13}$ (A1) UND DER ANALYSE DER AMPLIFIKATE FÜR LC UND HC VON IgG (A2) SOWIE DER RESTRIKTIONSVERDAUE MIT DEN DIAGNOSTISCHEN SCHNITTSTELLEN *NHEI* UND *SACI* VON JEWEILS FÜNF INDIVIDUELLEN KLONEN DER $V_{H}C_{H}$ - UND $V_{L}C_{L}$ - BIBLIOTHEKEN. (C) SPUR 9+10: $V_{H}C_{H}$ -KLONE OHNE *INSERT*-AUSTAUSCH.

Wegen der endständigen Lage der Enzym-Erkennungssequenzen an den Amplifikaten wurden die Inkubationszeiten im LC- und HC-RV um 30 min gegenüber dem Vektor-RV verlängert und die Enzymmengen verdoppelt. Die eingesetzten DNS-Mengen im Vektor-RV und LC- bzw. HC-RV betragen 1 μ g je 50 μ l Ansatz. Die Reinigung der geschnittenen Fragmente erfolgte mittels Ultrafiltration. Der RV des präparierten Phagemid-Mix $pASK111R_{ab-p3-WR2/5/13}$ wurde in einem 0,7%igen Agarosegel (Abbildung 28A) analysiert, aufgetrennt und anschließend aus der Agarose isoliert. Die korrespondierenden Enden der gereinigten Fragmente und des Phagemids

wurden über Nacht bei 16 °C miteinander ligiert (Abbildung 26B). Pro Ligationsansatz (siehe 2.2.1.2) wurde eine Gesamt-DNS-Menge von ca. 700 ng eingesetzt, wobei ein molares Verhältnis von Vektor zu *Insert* von 1:3 eingehalten wurde. Eine Kontrolle ohne *Insert* wurde mitgeführt, um die Rate der Religation des 2fach geschnittenen Vektors zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass DNS-Fragmente, die über Elektrophoresen mit TAE *modified*-Puffer und Agarose TOPVISION™ LE GQ aufgereinigt worden waren, eine höhere Ligationseffizienz aufwiesen als DNS, die mit herkömmlichen TAE-Puffer und unbehandelter Agarose aufgereinigt worden war. Im Anschluss an die Reinigung des Ligationsansatzes wurde die DNS über Elektroporation in *E. coli* XL1 *Blue* eingeschleust (siehe 3.1.3.4). Die Bestimmung der Anzahl unabhängiger Kolonien nach der Klonierung und die daraus ermittelten Größen der Subbibliotheken ist in Tabelle 23, Seite 86 dargestellt. Die Kolonien der Verdünnungsplatten wurden zur Analyse von Einzelkolonien genutzt. Nach der Präparation der Plasmid-DNS von je fünf Einzelkolonien der beiden Subbibliotheken konnte durch eine Restriktionsanalyse unter Verwendung der beiden diagnostischen Schnittstellen *NheI* und *SacI* der erfolgreiche Austausch der jeweiligen naiven Kette gezeigt werden (Abbildung 28C).

Von jeder der beiden Bibliotheken wurden durch Midipräparation etwa 90 µg Phagemid-DNS isoliert (siehe 2.2.1.3) und jeweils 5 µg analog zur Klonierung der F_{ab} -Bibliothek geschnitten, analysiert und ligiert (siehe 2.2.1.6). Die restringierten Vektoren wurden gereinigt und durch Testligationen und -transformationen hinsichtlich des durch unvollständig geschnittene DNS verursachten Hintergrundes kontrolliert. Vektorpräparationen, die bei einem Einsatz von 50 ng Vektor Transformationsraten von $>10^4$ cfu/µg DNS erzeugten, wurden für die Subklonierung der variablen Domänen eingesetzt. Abschließend wurden die isolierten Schwerketten-Fragmente in die $V_L C_L$ -Subbibliothek kloniert (Abbildung 26D). Zur Herstellung der F_{ab} -Bibliothek wurden sie mit den Vektoren im molaren Verhältnis 1:3 ligiert. Die ligierten Phagemide wurden in *E. coli* TG1 F^+ transformiert.

3.3.2.4. GRÖßEN DER GENERIERTEN PHAGENBIBLIOTHEKEN

Ligierte Plasmide wurden in *E. coli* XL1 *Blue* (Subbibliotheken) oder in TG1 F^+ (Gesamtbibliothek) elektrotransformiert (siehe 2.2.1.2) und diese dann zur Berechnung der Gesamtzahl der rekombinanten Klone verdünnt und plattiert. Je Ansatz wurden 100 µl elektrokompente Bakterien mit je 10 µl DNS (entsprach ca. 50 ng DNS) der verschiedenen Ligationsansätze und der Ligationskontrolle transformiert. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolltransformation ohne DNS, um die Präsenz von Fremdplasmiden auszuschließen. Nach erfolgter Transformation wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium bei 37 °C für 2 h im Schüttler inkubiert und je 100 µl Bakteriensuspension in seriellen 10fach Verdünnungen auf 2YTCm-Agar ausplattiert. Weitere 800 µl je unverdünnten Transformationsansatzes wurden auf große 2YTCm-Platten (Ø 14,5 cm) ausgebracht und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die ermittelten Größen der Bibliotheken sind nachfolgend tabellarisch dargestellt. Die Größe der Bibliotheken berechnete sich aus transformierte Zellen/µg DNS, die Komplexität bzw. die Anzahl verschiedener Varianten aus transformierte Zellen/ml.

TABELLE 23: GENERIERTE PHAGENBIBLIOTHEKEN UND IHRE KOMPLEXITÄT

Bibliothek ⁵	Transformationsrate [cfu/μg]	Varianten [cfu/ml]
LibSA _{HC} Rb	$8,65 \times 10^7$	$2,14 \times 10^6$
LibSA _{LC} Rb	$2,8 \times 10^7$	$6,4 \times 10^5$
LibSARb	$1,32 \times 10^8$	$6,6 \times 10^6$

3.3.3. UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON LIBSARB MITTELS WESTERN BLOT

Um die funktionelle Expression von F_{ab}-pIII und den Einbau von F_{ab}-pIII in Phagen zu überprüfen, wurden mit der Bibliothek LibSARb *Western Blots* geführt. Dazu wurde analog den Protokollen zur Herstellung rekombinanter Proteine im analytischen Maßstab (siehe 2.2.3.1) bzw. zur Herstellung von rekombinanten Phagen (siehe 2.2.2.2) vorgegangen. Es wurden parallel ein nichtreduzierendes und eine reduzierendes SDS-Gel mit 10 M Urea durchgeführt.

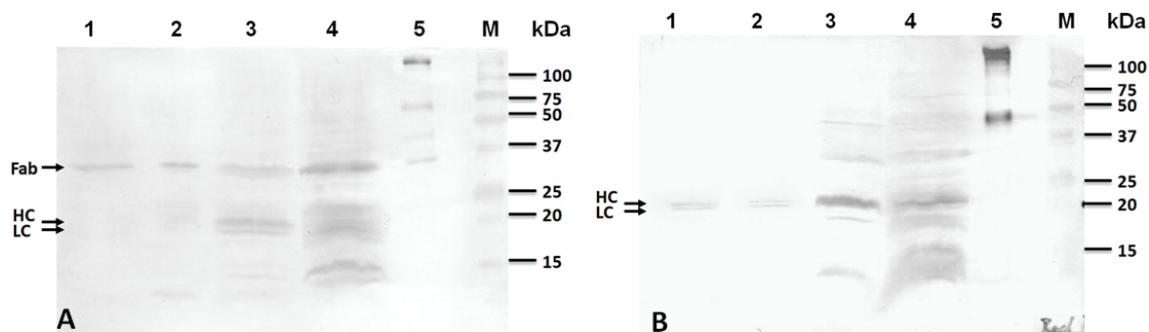


ABBILDUNG 29: (A) NATIVER UND (B) DENATURIERENDER WESTERN BLOT ZUM NACHWEIS VON LEPORIDEN F_{AB}-FRAGMENTEN AUF 12 %IGE SDS POLYACRYLAMIDGELE WURDEN VON LINKS NACH RECHTS JE 10 μL PROTEINPRÄPARATION AUS DEM KULTURÜBERSTAND, PERIPLASMA, CYTOPLASMA UND MEMBRAN/EINSCHLUSSKÖRPERCHEN, SOWIE KANINCHEN-MAK UND M: PRECISION PLUS PROTEIN STANDARD AUFGETRAGEN. NACH DEM ELEKTROTRANSFER AUF EINE IMMOBILONP-MEMBRAN, WURDEN DIE F_{AB}-FRAGMENTE MIT F_{AB2}-SPEZIFISCHEN ZIEGE<KANINCHEN>POD-AK NACHGEWIESEN. DIE SUBSTRATREAKTION ERFOLGTE DURCH ZUGABE VON WESTERN BLOT POD-SUBSTRAT (ABSCHNITT 2.2.5.1, SEITE 54)

Auf die Spuren wurden je 10 μl Proteinpräparation aus dem Medium (Spur 1), Periplasma (Spur 2), Cytoplasma (Spur 3) und Membran/Einschlusskörperchen (Spur 4) aufgetragen. Als Kontrolle für den F_{ab2}-spezifischen Ziege<Kaninchen>POD-AK, mit dem der Blot entwickelt wurde, wurden 2 μl eines monoklonaler Kaninchen-Antikörpers mit aufgetragen (Spur 5). Auf dem nicht reduzierenden Blot (Abbildung 29A) wurden ca. 37 kDa große Banden in allen Fraktionen nachgewiesen. Dieser Wert stimmte nicht mit der kalkulierten Größe für ein leporides F_{ab}-Fragment von 46 kDa überein. Die cytoplasmatische und die Membran/Einschlusskörper-Fraktion wiesen weitere Banden auf, die Abbauprodukte und Faltungsintermediate von Kaninchen-F_{ab}-Fragmenten darstellen könnten. Unter anderem zwei dicht beieinander liegende Banden mit ca. 22 und 24 kDa, die der Größe von ungefalteten Leicht- und Schwereketten entsprachen. Äquivalente Banden fanden sich in allen Fraktionen des reduzierenden Blots (Abbildung 29B), bei denen die Banden bei 37 kDa deutlich reduziert waren. Darum wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Banden bei 22, 24 und 37 kDa

⁵ Die Namensgebung der verschiedenen Bibliotheken erfolgte nach folgender Nomenklatur: „Lib“ für *Library*, „SA“ für Sulfonamid, „LC“ bzw. „HC“ für *light chain* bzw. *heavy chain*, „Rb“ für den Wirtsorganismus Kaninchen.

um die leichten und schweren Ketten bzw. leporide F_{ab} -Fragmente handelte. Eine Bande, die der rechnerischen Größe von ca. 95 kDa für F_{ab} -pIII entsprach, wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht nachgewiesen. Deshalb wurde ein Blot zum Nachweis des Einbaus von F_{ab} -pIII in die rekombinanten Phagen durchgeführt. Dafür wurden mit der Bibliothek LibSARb rekombinante Phagen hergestellt, gefällt (siehe 2.2.2.2) und in 100 μ l reduzierenden SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Als Referenzkontrolle wurden Wildtyp-M13KO7-Phagen verwendet. Entwickelt wurde der Blot mit primären Maus<pIII>Antikörper und sekundärem polyvalenten Ziege<Maus>POD. Auf dem Blot (Abbildung 30) zeigten sich nach Auftrag von 15 μ l reduzierter rekombinanter Phagenlösung (Spur 1, entsprach 2×10^{12} Phagenpartikeln) zwei Banden bei ca. 60 kDa und ca. 86 kDa. Die Referenzgröße der als Kontrolle aufgetragenen reduzierten Wildtyp-M13KO7-Phagen (Spur 2, entsprach 2×10^9 Phagen) lag bei ca. 60 kDa. Damit stimmten die Banden mit dem Wildtyp-pIII überein. Die Bande bei ca. 86 kDa entsprach der kalkulierten Größe für HC-pIII (84 kDa). Damit konnte der Einbau von F_{ab} -pIII in die rekombinanten Phagen dokumentiert werden.

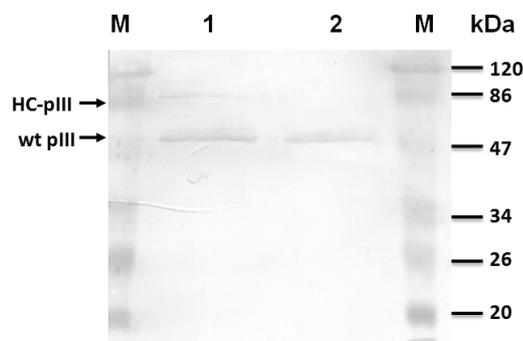


ABBILDUNG 30: NACHWEIS DER EXPRESSION VON LEPORIDEN HC-PIII MITTELS WESTERN BLOT
 AUF 10 %IGE REDUZIERENDES SDS POLYACRYLAMIDGELE WURDEN 2×10^{12} REKOMBINANTE PHAGEN (SPUR 1) UND 2×10^9 WILDTPY-M13KO7-PHAGEN, SOWIE PRECISION PLUS PROTEIN STANDARD (M) AUFGETRAGEN. NACH DEM ELEKTROTRANSFER AUF EINE IMMOBILONP-MEMBRAN, WURDE GENIII MIT MAUS<PIII>- UND SEKUNDAREN ZIEGE<MAUS>POD-AK NACHGEWIESEN. DIE SUBSTRATREAKTION ERFOLGTE DURCH ZUGABE VON WESTERN BLOT POD-SUBSTRAT (ABSCHNITT 2.2.5.1, SEITE 54)

3.3.4. PHAGE DISPLAY MIT KANINCHEN-ANTIKÖRPERGENEN

Da die sicherste Methode, Funktionalität nachzuweisen, die Durchführung eines *Pannings* war, sollten die leporiden rekombinanten Antikörpergenbibliothek im Folgenden für eine *in vitro*-Selektion mit Hilfe des *Phage Displays* eingesetzt werden, um spezifisch an Sulfomamid-Antibiotika bindende F_{ab} -Fragmente zu isolieren. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe von M13KO7-Phagen aus der im Phagemid pASK111R_{ab}-p3-WR vorliegenden Antikörpergenbibliothek Phagenantikörper hergestellt und für ein *Panning* auf die Sulfonamid-Konjugate SA1 und SA2 verwendet. Als Ausgangspunkt für das *Phage Display* diente das im Labor verwendete Standardprotokoll (Kramer, 2002b).

3.3.4.1. PHAGE DISPLAY MIT LIBSARB

Durch Superinfektion der transformierten Bakterien mit M13KO7-Helferphagen wurden die rekombinanten Phagemide der leporiden F_{ab} -Bibliothek isoliert. Dazu wurden für jedes Konjugat eine Starterkultur à 80 ml 2YTCm-Medium mit ca. 7×10^7 Bakterien inokuliert, was in etwa einer 100fachen Größenüberschreitung der Bibliotheksgröße aus Kapitel 3.3.2.4 entsprach. Bei allen späteren Amplifikationsrunden wurden nur noch 10 ml Starterkulturen angesetzt. 50 ml

(später 5 ml) der Starterkulturen wurden bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,55 mit 2×10^{11} cfu (1×10^{11} cfu) M13KO7-Helferphagen für 30 min infiziert, anschließend zentrifugiert und in frischen 2YTCm-aTc-Medium resuspendiert. Jedem Ansatz wurde nach einer Stunde Kanamycin zugegeben und die Bakterien über Nacht kultiviert. Die Selektion von phageninfizierten Bakterien, die das rekombinante Phagemid pASK111R_{ab}-p3-WR enthielten, geschah durch die Zusätze Chloramphenicol und Kanamycin. Die Expression des HC-pIII-Fusionsproteins, das für den Einbau der rekombinanten F_{ab}-Fragmente in die Phagenhülle notwendig war, wurde durch den Zusatz von 0,2 µg/ml aTc gestartet. Auf Grund der unvollständigen Unterdrückung des *Amber-Stopp-Codons*, lokalisiert zwischen F_{ab} und GenIII auf dem Phagemid, wurden neben den phagenassoziierten auch gelöste F_{ab}-Fragmente produziert (Miller, 1992). Um die Konkurrenz zwischen den löslichen und den phagenassoziierten F_{ab} um die Antigenbindungsplätze im nachfolgenden *Panning* zu verhindern, wurden die löslichen F_{ab} über Präzipitation mit Polyethylenglykol entfernt (siehe 2.2.2.2).

PANNING DER LIBSARB-PHAGENANTIKÖRPER

Die Selektion antigenspezifischer Phagen über *Panning* (siehe 2.2.2.4) wurde sofort an die Phagenselektion angeschlossen, um die Zerstörung der Verbindung zwischen dem F_{ab}-Fragment und dem Phagen durch Proteasen in der Phagenlösung zu vermeiden. Die F_{ab}-assoziierten Phagen wurden abwechselnd über mit OVA-SA1, ConA-SA1 bzw. über mit BSA-SA2 und ConA-SA2 beschichtete Mikrotiterstreifen selektiert. Abhängig von der *Panning*-Runde wurde eine unterschiedliche Anzahl von Kavitäten mit verschiedenen Konjugatkonzentrationen über Nacht beschichtet (Tabelle 24).

TABELLE 24: AUFLISTUNG DER IM PANNING VERWENDETEN KONJUGATE UND DEREN KONZENTRATION

<i>Panning</i> -Runde	[n] Kavitäten	[c] Konjugat [µg/ml]	Trägerprotein
1	3	20	BSA/OVA
2	2	10	BSA/OVA
3	2	5	BSA/OVA
4	2	5	BSA/OVA
W4*	2	5	ConA

* Wiederholung der 4. *Panning*-Runde

Der Austausch des Trägerproteins fand statt, um die Anreicherung linker- und proteinspezifischer F_{ab}-Fragmente zu minimieren. Um unspezifische Bindungen der Phagen zu reduzieren, wurden vor dem Auftrag der Phagenlösung sowohl die freien Bindungsstellen an der Polystyrol-Oberfläche als auch die Phagenlösung blockiert. Eine Gesamtmenge von ca. 2×10^{12} Phagen wurde je *Panning*-Runde in die Kavitäten zugegeben. Nach Inkubation für 1 h wurden die ungebundenen Phagen mit folgendem Waschschemata entfernt und die gebundenen Phagen eluiert.

TABELLE 25: WASCHSCHEMA FÜR DAS PANNING MIT LIBSARB

<i>Panning</i> -Runde	PBS-T 0,05 %	Pause [min]	PBS
1	8 x	3	8 x
2	15 x	10	15 x
3	30 x	20	30 x
4	30 x	20	30 x

Die so gewonnenen rekombinanten Phagen wurden in *E. coli* TG1 F⁺ amplifiziert und erneut in M13KO7-Phagen verpackt, um analog weitere *Panning*-Runden auf SA1 und SA2 durchzuführen. Nach jeder Runde wurden alle im *Panning* eingesetzten Phagenpräparationen titriert, um die Anreicherung zu dokumentieren. Mit beiden Haptenen wurden vier Selektionsrunden durchgeführt. Die Menge der in den einzelnen *Pannings* eluierten Phagen ist in Tabelle 26 aufgeführt. Bei beiden Haptenen konnte mit dem oben aufgeführten Protokoll nach vier Runden keine Anreicherung erzielt werden. Deshalb wurde die vierte *Panning*-Runde zu den Bedingungen der dritten wiederholt und auf die Konjugate mit dem Trägerprotein ConA gewechselt.

TABELLE 26: ANZAHL DER ELUIERTEN PHAGEN NACH DEN EINZELNEN *PANNING*-RUNDEN

<i>Panning</i> -Runde	Eluierte Phagen	Eluierte Phagen
	[cfu/ml] SA1	[cfu/ml] SA2
1	5×10^5	1×10^6
2	$4,5 \times 10^2$	5×10^4
3	$5,7 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$
4	$2,0 \times 10^2$	10
W4*	$2,2 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$

*Wiederholung der 4. *Panning*-Runde

Für das Konjugat SA2 zeigte sich nach der Wiederholungsrunde eine Anreicherung um den Faktor fünf. Bei den Phagen, die gegen das Hapten SA1 selektiert worden waren, war hingegen keine Anreicherung sichtbar. Ein Ausbleiben einer Anreicherung muss nicht zwangsläufig auch einen *Panning*-Misserfolg bedeuten (Coomber, 2002), da auch andere limitierende Faktoren wie zum Beispiel die Bindungsaffinität oder die Effizienz der Phagenproduktion darauf einen großen Einfluss nehmen können. Um festzustellen, ob der Grund für die geringe bzw. ausbleibende Anzahl an infizierten Bakterien auf einen der oben genannten limitierenden Faktoren zurückzuführen war, wurden zwischen 88 und 176 Einzelkolonien pro Hapten aus jeder der durchgeführten *Panning*-Runden im *Screening*-ELISA auf SA1- bzw. SA2-spezifische Bindung und Verdrängung untersucht.

SCREENING-ELISA MIT DEN SELEKTIERTEN PHAGEMIDEN

Dazu wurden die Bakterienstocks der vier *Panning*-Runden ausplattiert (siehe 2.2.2.6), über Nacht inkubiert und zwischen 88 und 176 Stück der erhaltenen Kolonien in Zellkulturplatten angezogen. Nach einer Inkubationszeit von 3–4 h wurden je 25 µl der Bakteriensuspension in 1-ml-Micronicplatten überimpft und bebrütet. Die sogenannte Masterplatte wurde bei -70 °C als Sicherheitskopie eingefroren. Nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurde die F_{ab}-Expression in den Micronicplatten mittels Zugabe von 0,2 µg/ml aTc induziert und über Nacht fortgeführt. Parallel wurden die Kavitäten von Mikrotiterplatten mit 2,5 µg/ml OVA-SA1 bzw. BSA-SA2 über Nacht beschichtet. Am nächsten Morgen wurden die Bakteriensuspensionen abzentrifugiert und 100 µl Bakterienüberstand auf den mit OVA bzw. BSA blockierten Mikrotiterplatten mittels Verdrängung durch Sulfonamiden analysiert. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Reaktion mit dem Ziege<Rabbit_{t_C}>POD-AK. Die Farbreaktion, hervorgerufen durch den enzymatischen Umsatz des zugegebenen POD-Substrats, wurde nach Abstoppen der Reaktion im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Als positiv wurden Kavitäten gewertet, bei denen die A_{450nm} des PBS-Wertes (Bindung des exprimierten F_{ab}-Fragments) mindestens 30 % höher waren als die A_{450nm} der Negativkontrolle (Kulturüberstand

aus Wildtyp TG1 F⁺) und der Unterschied zwischen Verdrängungs- und PBS-Wert mindestens 25 % betrug. Die Absorptionwerte der Negativkontrolle für den PBS-Wert und die Verdrängung lagen zwischen 0,089 und 0,14. Nach diesen Kriterien wurden OD-Unterschiede von 0,07–0,19 zwischen dem PBS-Wert und dem höchsten Verdrängungswert gemessen. Diese Werte spiegelten sich auch in den beiden Positivkontrollen wider, in welchen 1:10 000 und 1:100 000 verdünntes polyklonales Serum des Kaninchens 154 eingesetzt wurde. Von den 890 analysierten Klonen wiesen nach diesen Kriterien im *Screening*-ELISA insgesamt 35 Klone für das SA1-Konjugat und 30 Klone für das SA2-Konjugat eine ausreichende Verdrängung auf. Abbildung 31 gibt den prozentualen Anteil an Klonen in den vier *Panning*-Runden wider, bei denen nach den obigen Kriterien eine Verdrängung nachweisbar war.

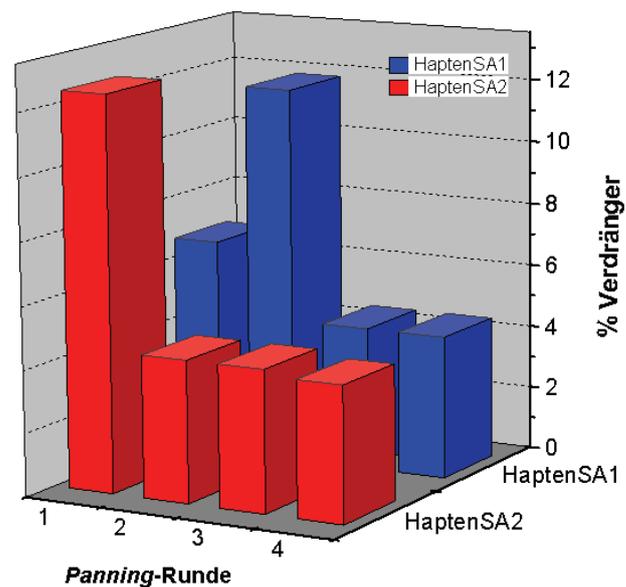


ABBILDUNG 31: PROZENTUALER ANTEIL AN VERDRÄNGERN IN DEN VIER *PANNING*-RUNDEN

DURCHGEFÜHRT WURDEN *SCREENING*-ELISAS MIT JE 100 μ L KULTURÜBERSTAND, AUS ÜBER NACHT INDUZIERTEN TG1 F⁺ MICRONIC-KULTUREN. ZUR UNTERSUCHUNG AUF SPEZIFISCHE F_{AB}-FRAGMENTE WURDEN MIKROTITERPLATTEN ÜBER NACHT MIT 2,5 μ G/ML HAPTEN-KONJUGAT BESCHICHTET. DER NACHWEIS VON F_{AB}-FRAGMENTEN WURDE DURCH DIE ZUGABE VON ZIEGE<RABBIT>_IC-POD-AK ERBRACHT. DIE SUSTRATREAKTION WURDE DURCH ZUGABE VON ELISA POD-SUBSTRAT GESTARTET. UNTERSUCHTE KLONE/RUNDE: 1+3: JE HAPTEN N = 88; RUNDE 2: JE HAPTEN N = 176; RUNDE 4: SA1 N =22, SA2 N =164 KLONE. DIE STATISTIK WURDE IN BEZUG AUF FALSCHPOSITIVE SIGNALE DIE DURCH DEN ELISA-PLATTENWASCHER HERVORGERUFEN WURDEN BEREINIGT

Es stellte sich heraus, dass bei Hapten SA2 die meisten Positiven in der ersten Runde nachweisbar waren und anscheinend schon in der zweiten Runde nicht mehr angereichert werden konnten. Der Anstieg der eluierten Phagen (Tabelle 26, Seite 89) nach der vierten Runde konnte nicht im *Screening*-ELISA bestätigt werden. Bei Hapten SA1 waren die meisten Positiven in der zweiten Runde nachweisbar und verloren sich dann.

ELISA MIT SA1-SPEZIFISCHEN F_{AB}-FRAGMENTE

Wegen dieser Ergebnisse wurden die *Panning*-Protokolle wie folgt abgeändert: Die Menge der in den einzelnen *Panning*-Runden eingesetzten Haptenkonjugate sollte erhöht und die Stringenz der Selektion durch Vermindern der Anzahl und Dauer der Waschschrte herabgesetzt werden. Außerdem sollten die Haptene mit den Trägerproteinen BSA/OVA und ConA von vornherein alternierend verwendet werden. Des Weiteren wurde beschlossen, statt das *Panning*

mit der Bibliothek LibSARb und den geänderten Protokollen zu wiederholen, die Gene der zehn SA1 Klone, die die höchste Verdrängung aufwiesen, zu *shuffeln* (Harayama, 1998) und damit eine neue Selektion durchzuführen, da sich hiervon in kürzerer Zeit eine erfolgreiche Selektion versprochen wurde. Zu diesem Zweck wurde der *Screening*-ELISA mit den 35 positiv selektierten Klonen zur Validierung der ersten Messung wiederholt und für jeden Klon Doppelproben für Verdrängung und Bindung aufgetragen. Für die erneute Expression wurden die Masterplatten, die zu Beginn des *Screenings* eingefroren worden waren, kurz angetaut, um etwas Zellsuspension der gewünschten Klone mit einer Pipette abzuziehen. Anschließend wurden die Platten wieder eingefroren. Die weitere Vorgehensweise war wie oben beschrieben. Die elf Klone mit der stärksten Verdrängung wurden im Anschluss einem dritten ELISA unterzogen, in dem nicht nur gegen das Konjugat OVA-SA1 (2,5 µg/ml), sondern auch gegen das Konjugat ConA-SA1 (2,5 µg/ml) verdrängt wurde. Dies sollte gewährleisten, dass die Gene, die letztendlich im *Shuffling* verwendet wurden, nicht für linker- oder trägerproteinspezifische F_{ab}-Fragmente kodierten.

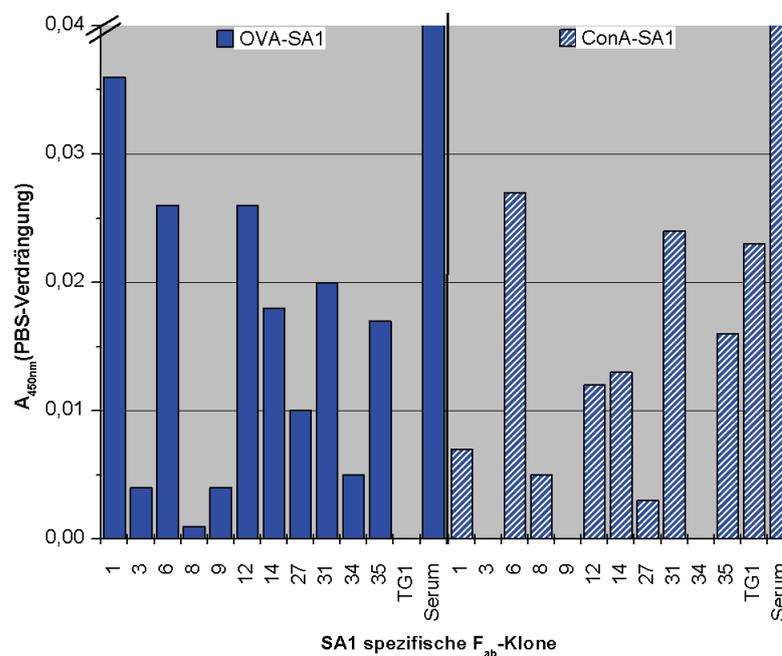


ABBILDUNG 32: BINDUNGSVERGLEICH BEI DEN KONJUGATEN CONA-SA1 UND OVA-SA1 IM ELISA
 DURCHFÜHRT WURDEN *SCREENING*-ELISAS MIT JE 100 µL KULTURÜBERSTAND, AUS ÜBER NACHT INDUZIERTEN TG1 F⁺ MICRONIC-KULTUREN. ZUR UNTERSUCHUNG AUF SPEZIFISCHE F_{AB}-FRAGMENTE WURDEN MIKROTITERPLATTEN ÜBER NACHT MIT 2,5 µG/ML HAPTEN-KONJUGAT BESCHICHTET. DER NACHWEIS DER F_{AB}-FRAGMENTE WURDE DURCH DIE ZUGABE VON ZIEGE<RABBIT>POD-AK ERBRACHT. DIE SUSTRATREAKTION WURDE DURCH ZUGABE VON ELISA POD-SUBSTRAT GESTARTET. AUFGETRAGEN WURDE DIE DIFFERENZ DER MITTELWERTE DER PBS- UND DER SULFONAMID-VERDRÄNGUNG

Bei acht der untersuchten Klone (SA1 1, SA1 6, SA1 8, SA1 12, SA1 19, SA1 27, SA1 31 und SA1 35) konnte eine Verdrängung bei beiden Konjugaten nachgewiesen werden. Bei der Negativkontrolle für ConA-SA1 zeigte sich allerdings, dass dieser Messwert auf Grund seiner hohen Absorption nicht als Referenz herangezogen werden konnte. Die Differenz zwischen den Absorptionen der PBS-Werte und der Verdrängung lagen zwischen 0,004 und 0,036 und waren damit deutlich niedriger als in den vorhergegangenen Messungen.

3.3.4.2. DNS-ANALYSE DER SELEKTIERTEN KLONE DER LIBSARB-BIBLIOTHEK

Für das *Shuffling* wurden aus den Sicherheitsstammlösungen der acht in Kapitel 3.3.4.1 ermittelten Klone Kulturen für eine Midipräparation angesetzt. Die isolierten Plasmide wurden Kontrollverdauen mit *NcoI/KpnI* und *AsiSI/MluI* unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass die Phagemide um ca. 1 kb zu klein waren und bei allen Klonen nur noch fragmentarische Stücke der leichten und schweren Kette vorhanden waren. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden stichprobenartig die vier Klone SA1 1, SA1 19, SA1 27 und SA1 31 mit dem Primer „PASK-IBA-5“ sequenziert. „PASK-IBA-5“ hybridisierte mit der Sequenz von pASK-Vektoren im Bereich für das bakterielle Signalpeptid und diente zur Sequenzierung des F_{ab}-Genfragments. Bei den Klonen 19 und 31 kam es in der ersten Reaktion zu einem völligen Sequenzabbruch. Als Grund wurde vermutet, dass Schleifen-Strukturen der *Inserts* stabile Sekundärstrukturen ausbilden, welche den Sequenzabbruch auslösten. Dies konnte durch eine Wiederholung der Sequenzierreaktion unter Bedingungen gegen stabile Sekundärstrukturen (Bauer, 2007, pers. Korrespondenz) bestätigt werden. Der Sequenzvergleich der vier Klone zeigte in einem Kontrollverdau, das Fehlen der beiden Antikörperketten. Diese kamen gar nicht oder nur noch fragmentarisch vor (Nukleotid-Sequenzen siehe Anhang B5). Unter anderem enthielten die Klone ein 57 bp langes Stück, das die *NcoI*- und *KpnI*-Schnittstellen enthielt. Diese Sequenzen lagen im Leserahmen und führten zu Fusionspeptiden aus dem rbp-Signalpeptid und Peptiden, die die ersten sechs N-terminalen und die letzten acht C-terminalen Aminosäuren von leichten Kaninchen-Antikörperketten enthielten (siehe *Alignment* Abbildung 33).

```

1          DVVMTQTCFNANDC
19         DVVMTQTCFNAMNC
31         DVVMTQTCFSANDC
27         ALVMTQTCFSALSC
          :*****.*.*

```

ABBILDUNG 33: ALIGNMENT DER SELEKTIERTEN PEPTIDFRAGMENTE AUS DER LIBSARB
 DAS ALIGNMENTS ERFOLGTE MIT DEM PROGRAMM CLUSTALW. ÜBEREINSTIMMENDE AMONISÄUREN SIND MIT EINEM STERN MARKIERT.

Eine Ausnahme bildete Klon SA1 27 der zusätzlich für ein Fusionsprotein aus *ompA* und einem unbekanntem Protein kodierte (siehe Anhang B5). Da diese Fragmente jedoch reproduzierbare Verdrängungen bei den drei ELISA-Messungen ergeben hatten, wurden die Sequenzen über eine Blast-Suche (NCBI) auf mögliche Ähnlichkeiten zu bereits bekannten „bindenden Peptiden“ (de Haas *et al.*, 1998; Dankesreiter *et al.*, 2000) überprüft. Hierbei wurden keine verwertbaren Ergebnisse erzielt. Weil es sich bei den selektierten „Bindern“ nicht um F_{ab}-Fragmente handelte, wurden die Arbeiten mit ihnen an diesem Punkt eingestellt.

Nachgeschaltete Analysen der Bibliothek LibSARB konnten aufzeigen, dass bereits nach dem Austausch der naiven schweren Ketten gegen die HC aus der Teilbibliothek fragmenthaltige Phagemide vorhanden waren. Deren steigende Anreicherung im Laufe der vier *Panning*-Runden (Daten nicht gezeigt) wurde auf den hohen Selektionsdruck durch die Kombination der Antibiotika Kan und Cm zurückgeführt.

3.3.4.3. LIBSAHCRB-SUBBIBLIOTHEK

Um die Funktionalität des Phagemids zu erbringen, wurde ein monovalentes *Phage Display* mit der HC-Teilbibliothek LibSA_{HC}Rb gegen das Sulfonamid-Hapten SA2 durchgeführt. Hierbei wurden die Protokolle so angepasst, dass der Selektionsdruck vermindert wurde. Die Menge der in den einzelnen *Panning*-Runden eingesetzten Haptenkonjugate wurde erhöht und die Stringenz der Selektion durch Reduktion der Anzahl und Dauer der Waschschrte herabgesetzt. Außerdem sollten die Haptene mit den Trägerproteinen BSA und ConA von vornherein alternierend verwendet werden. Eine wesentliche Änderung bestand in dem Einsatz von nur noch einem Antibiotikum (Kan) für die Amplifikation der Bibliothek. Dadurch wuchs zwar die Wahrscheinlichkeit, Wildtypphagen in die nächste *Panning*-Runde einzubringen, aber da diese keine spezifischen Bindungseigenschaften für das nachgeschaltete *Panning* hatten, wurde dies in Kauf genommen. Die durch die Wildtypphagen verfälschte [cfu/ml] wurde durch Ausplattieren einer 10fach Verdünnungsreihe der reinfizierten Bakterien auf 2YTCm und 2YTKan kontrolliert.

TABELLE 27: ÜBERSICHT DER ÄNDERUNGEN IM *PANNING*-PROTOKOLL FÜR DIE SELEKTION VON SA2-AFFINEN PHAGEN

Runde	Anzahl Kavitäten	Konjugat [µg/ml]	Trägerprotein	Waschzyklen		
				PBS-T 0,05 %	Pause [min]	PBS
1	3	50	ConA	5 x	3 x	5 x
2	2	20	BSA	10 x	15 x	10 x
3	2	10	ConA	15 x	20 x	15 x

Die Antikörpergenbibliothek wurde in M13KO7-Phagen verpackt (siehe 2.2.2.2), um rekombinante Phagen für ein *Panning* auf SA2 zu erhalten, mit dem Unterschied, dass zur Selektion infizierter Bakterien nur noch das Antibiotikum Kan eingesetzt wurde. Je 2×10^{10} rekombinante Phagen wurden in drei Kavitäten eines Nunc-Streifens gegeben, an deren Oberfläche vorher 50 µg/ml SA2-ConA gebunden worden war. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die gebundenen, F_{ab}-Fragmente tragenden Phagenpartikel mit Glycin/NaCl (pH 2,2) eluiert und in *E. coli* TG1 F⁺ amplifiziert. Nach der 30-minütigen Infektion wurden die Bakterien in einer 10fach Verdünnungsreihe auf 2YT-Platten titriert, um die Anzahl eluierter Phagenpartikel zu bestimmen. Damit sollte die Anreicherung spezifisch an SA2 bindenden Phagen verfolgt werden. Der Rest der Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation geerntet, resuspendiert und auf vier großen 2YTCm-Platten über Nacht bei 30 °C bebrütet. Nach der ersten *Panning*-Runde wurde nur ein Phagentiter von 344 cfu/ 10 ml erreicht. Um zu testen, ob es sich dabei um spezifische Klone handelte und nicht um eine Anreicherung von fragmenthaltigen Phagemiden, wurden von zehn Kolonien Kulturen für Minipräparationen zur Untersuchung der Größe der Phagemide und der Länge der Antikörperketten mittels RV angesetzt. Aus zehn Klonen konnten bei acht Klonen die leichten und schweren Ketten durch Verdau mit *NcoI/KpnI* und *AsiSI/MluI* isoliert werden. Abbildung 34, Seite 94 zeigt die Kontrollverdaue der Klone 3 69, 3 45, 1 90 und 1 23 jeweils mit *AsiSI/MluI* und *NcoI/KpnI*. Bei den Klonen 3 69 und 3 45 (Gelspuren 1–4) konnte ein Fehlen der leichten Kette nachgewiesen werden. Bei den Klonen 1 23 und 1 90 (Gelspuren 5–6) lagen beide Ketten vor.

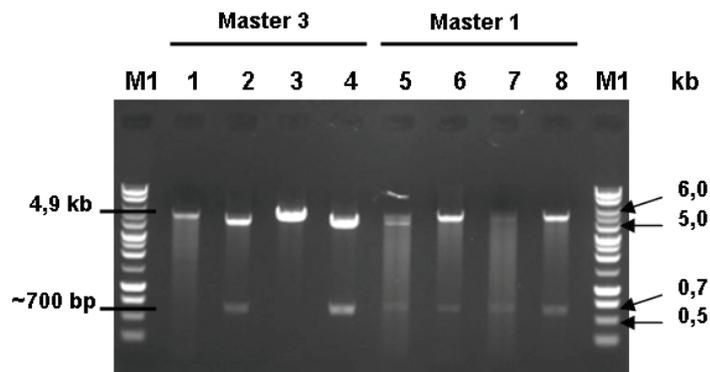


ABBILDUNG 34: KONTROLLVERDAU DER SELEKTIERTEN SA2-SPEZIFISCHEN KLONE

AUF EIN 1 %IGES AGAROSEGEL WURDEN JE 5 μ L PROBE AUFGETRAGEN. KLONE 3 69 (SPUREN 1+2), 3 45 (SPUREN 3-4), 1 90 (SPUREN 5+6) UND 1 23 (SPUREN 7+8) JEWEILS MIT *ASIS1/MLUI* (SPUREN 1,3,5+7) UND *NCOI/KPMI* (SPUREN 2,4,6+8); M1: 1-KB-MARKER

SCREENING-ELISA

Alle erhaltenen 344 Kolonien wurden parallel im *Screening*-ELISA auf ihre Bindungseigenschaften überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Kolonien in Zellkulturplatten angezogen. Nach einer Inkubationszeit von 3–4 h wurden je 25 μ l der Bakteriensuspension in 1-ml-Micronic-Platten überimpft und inkubiert. Die sogenannte Masterplatte wurde bei -70 °C als Sicherheitskopie eingefroren. Nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurde die F_{ab} -Expression in den Micronic-Platten mittels Zugabe von 0,2 μ g/ml aTc induziert und die Inkubation über Nacht fortgeführt. Parallel wurden die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 5 μ g/ml ConA-SA2 beschichtet und unspezifische Bindungsstellen mit 2 % (w/v) ConA abgesättigt. Am nächsten Morgen wurden die Bakteriensuspensionen abzentrifugiert und 100 μ l Bakterienüberstand mittels Verdrängung auf Binder analysiert. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Reaktion mit Ziege<*Rabbit*_{LC}>POD-AK. Die Farbreaktion, hervorgerufen durch den enzymatischen Umsatz des zugegebenen POD-Substrats, wurde nach Abstoppen der Reaktion im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Als positiv wurden Kavitäten gewertet, bei denen die Absorption_{450nm} des PBS-Wertes (Bindung des exprimierten F_{ab} -Fragmentes) mindestens 30 % höher waren als die Absorption_{450nm} der Negativkontrollen (Kulturüberstand aus Wildtyp TG1 F^+ mit einem OD-Mittelwert von 0,09) sowie der Unterschied zwischen Verdrängungs- und PBS-Wert mindestens 25 % betrug. Nach diesen Kriterien wurden OD-Unterschiede von 0,025–0,105 zwischen dem PBS-Wert und dem höchsten Verdrängungs-Wert gemessen. Die Differenz Absorptionsunterschiede der Positivkontrolle mit dem 1:100 000 verdünnten Serum des Kaninchens 154 betrug 0,054. Dieser Werte liegt im Mittel für die untersuchten Klone. Von den 344 analysierten Klonen wiesen im *Screening*-ELISA insgesamt 26 Klone für das SA2-Hapten eine ausreichende Verdrängung auf. Die Differenz aus PBS-Wert und Sulfonamid-Wert dieser Klone ist in Abbildung 35, Seite 95 aufgetragen:

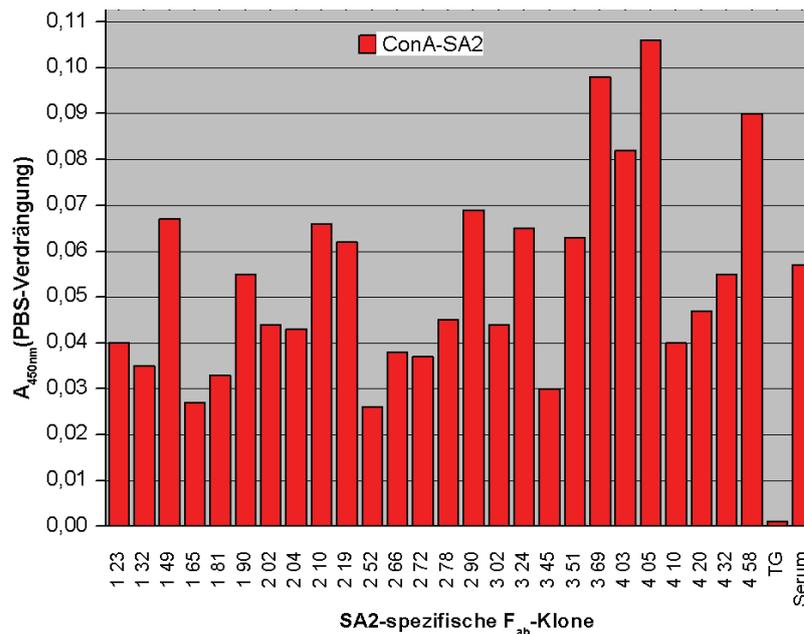


ABBILDUNG 35: VERDRÄNGUNGSWERTE DER 26 SA2-SPEZIFISCHEN KLONE

DURCHGEFÜHRT WURDEN *SCREENING*-ELISAS MIT JE 100 μ L KULTURÜBERSTAND, AUS ÜBER NACHT INDUZIERTEN TG1 F⁺ MICRONIC-KULTUREN. ZUR UNTERSUCHUNG AUF SPEZIFISCHE F_{AB}-FRAGMENTE WURDEN MIKROTITERPLATTEN ÜBER NACHT MIT 5 μ G/ML HAPTEN-KONJUGAT BESCHICHTET. DER NACHWEIS DER F_{AB}-FRAGMENTE WURDE DURCH DIE ZUGABE VON ZIEGE<RABBIT>POD-AK ERBRACHT. DIE SUBSTRATREAKTION WURDE DURCH ZUGABE VON ELISA POD-SUBSTRAT GESTARTET. AUFGETRAGEN WURDE DIE DIFFERENZ DER MITTELWERTE DER PBS- UND DER SULFONAMID-VERDRÄNGUNG

In weiteren ELISA-Versuchen lieferten die Klone 1 23, 1 32, 1 90, 3 45 und 3 69 die am besten reproduzierbaren Messwerte mit beiden Konjugaten. Von diesen fünf Klonen wurden die Phagemide mittels RV auf ihre Größe und die Längen ihrer Antikörperketten überprüft (Abbildung 34, Seite 94). Nach dem Überprüfen dieser fünf Klone wurden die Klone 1 23, 1 32 und 1 90 für weitere Charakterisierungen ausgewählt, da diese beide Antikörperketten enthielten.

3.3.5. CHARAKTERISIERUNG DER BEIDEN SA2-SPEZIFISCHEN F_{AB}-FRAGMENTE

Die generierten sulfonamidspezifischen F_{ab}-Fragmente SA2 23, SA 32 und SA2 90 sollten biochemisch und immunologisch detailliert charakterisiert werden. Dies beinhaltete die Bestimmung der Nukleinsäureabfolge durch Sequenzierung. Die Nukleinsäuresequenz ermöglichte eine computergestützte Translation in die primäre Aminosäuresequenz, anhand derer die Integrität der drei F_{ab}-Fragmente überprüft werden konnte. Die festgestellte strukturelle Integrität der Proteine sollte im Anschluss durch eine bakterielle Expression bestätigt werden, an die sich die immunologischen Experimente bezüglich der Reaktivitäten und Kreuzreaktivitäten mit Sulfonamid-Derivaten anschließen sollten.

Die unter 3.3.4.2 bereits per Minipräparation isolierte und im Kontrollverdau auf die Größe und das Vorkommen der beiden Immoglobulinketten analysierte Plasmid-DNS der Klone 1 23 und 1 90 (Abbildung 34, Seite 94) wurde durch eine Sequenzierung mit den Primern „PASK-IBA5' und GIIINREV“ auf ihre Basenabfolge untersucht. Die Sequenzierung bestätigte, dass in den isolierten Phagemiden SA2 23 und SA2 90 die leichte Kette nicht mutiert und vollständig erhalten war (Sequenz siehe Anhang B3). Die Länge der beiden schweren Ketten betrug 684 Basenpaare und sie unterschieden sich in nur vier Basenpaaren. Die Nukleotidsequenzen der variablen Regionen sind in Abbildung 37, Seite 97 zusammen mit ihrer Translation in die pri-

märe Aminosäuresequenz dargestellt. Die vollständige Nukleotidsequenz für die Konsensussequenz der beiden HC der F_{ab}-Fragmente SA2 23 und SA2 90 befindet sich im Anhang B6 und B7. Bei dem Phagemid SA2 32 zeigte sich wieder eine Trunktierung der leichten Kette zu einer den unter 3.3.4.2 beschriebenen Peptiden ähnlichen Sequenz – mit dem Unterschied, dass die schwere Kette noch vollständig erhalten war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde nur noch mit den Klonen SA2 23 und 90 weitergearbeitet.

Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen von HC_{SA2 23/90} zeigte, dass die mutierten Basenpaare in den Rahmenregionen lagen. Die computergestützte Translation der Nukleinsäuresequenzen von HC_{SA2 23} und HC_{SA2 90} in die Aminosäuresequenz zeigte, dass die Basenunterschiede zu zwei Aminosäureunterschieden in der V_H und zu einer Differenz in der C_H der schweren Ketten führen (Abbildung 36).

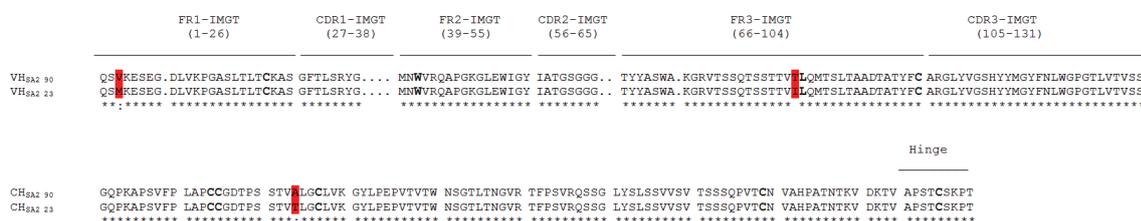


ABBILDUNG 36: ALIGNMENT AMINOSÄURESEQUENZEN HC_{SA2 23} UND HC_{SA2 90}

DARGESTELLT SIND DIE AMINOSÄURESEQUENZEN DER BEIDEN HC. DIE BEZEICHNUNG UND DIE LÄNGE DER FRAMEWORK-REGIONEN UND CDRS SIND ÜBER DEN AMINOSÄURESEQUENZEN ANGEZEIGT. DIE AMINOSÄUREN IN WELCHEN SICH DIE BEIDEN KETTEN UNTERSCHIEDEN SIND ROT HINTERLEGT. DIE CYSTEINE, DIE FÜR DIE AUSBILDUNG DER DISULFIDBRÜCKEN VERANTWORTLICH SIND, SIND FETT HERVORGEHOBBEN

Nach der Translation von LC_{WR}, HC_{SA2 23} und HC_{SA2 90} in die Aminosäuresequenz erfolgte eine Analyse mit den in der Datenbank IMMUNOGENETICS festgelegten Kriterien. Um zu erkennen, ob eine Antikörpersequenz vorlag, konnten u.a. vier konservierte Aminosäuren, die an konservierten Positionen in den Rahmenregionen einer Antikörpersequenz lagen, als Anhaltspunkte zur Analyse herangezogen werden. Dies waren die Aminosäuren Cystein an Position 23 in FR1, Tryptophan an Position 41 in FR2 sowie Lysin und Cystein an Position 89 bzw. 104 in FR3. Bei den beiden Cysteinen handelte es sich um die Aminosäuren, die für die interchenare Disulfidbrücke verantwortlich waren. Die Sequenzen der variablen und konstanten Regionen der leichten und der beiden schweren Ketten wurden in ihre CDR- und FR-Regionen unterteilt und deren Größe und Aminosäurezusammensetzung mit denen von gespeicherten Antikörpersequenzen verglichen.

Abbildung 37 zeigt das Ergebnis der Analyse der variablen Regionen. Die im Leserahmen befindlichen Basentriplets werden im Aminosäure-Code angegeben. Die Punkte anstelle der Basen stehen für zusätzliche Basen in den Keimbahngenen des Datenbankrepertoires, die bei der zu vergleichenden Sequenz fehlten. Das *Alignment* zeigt, dass die selektierten AK-Fragmente sich in allen Punkten den von der IMGT definierten Regeln für Immunglobulinsequenzen fügen. Alle drei variablen Regionen zeigen eine Übereinstimmung mit den Referenz-Aminosäuren (blau und rot hervorgehoben). Die Aminosäureunterschiede sind blau hinterlegt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass mit Hilfe des *Phage Display* F_{ab}-Fragmente selektioniert wurden.

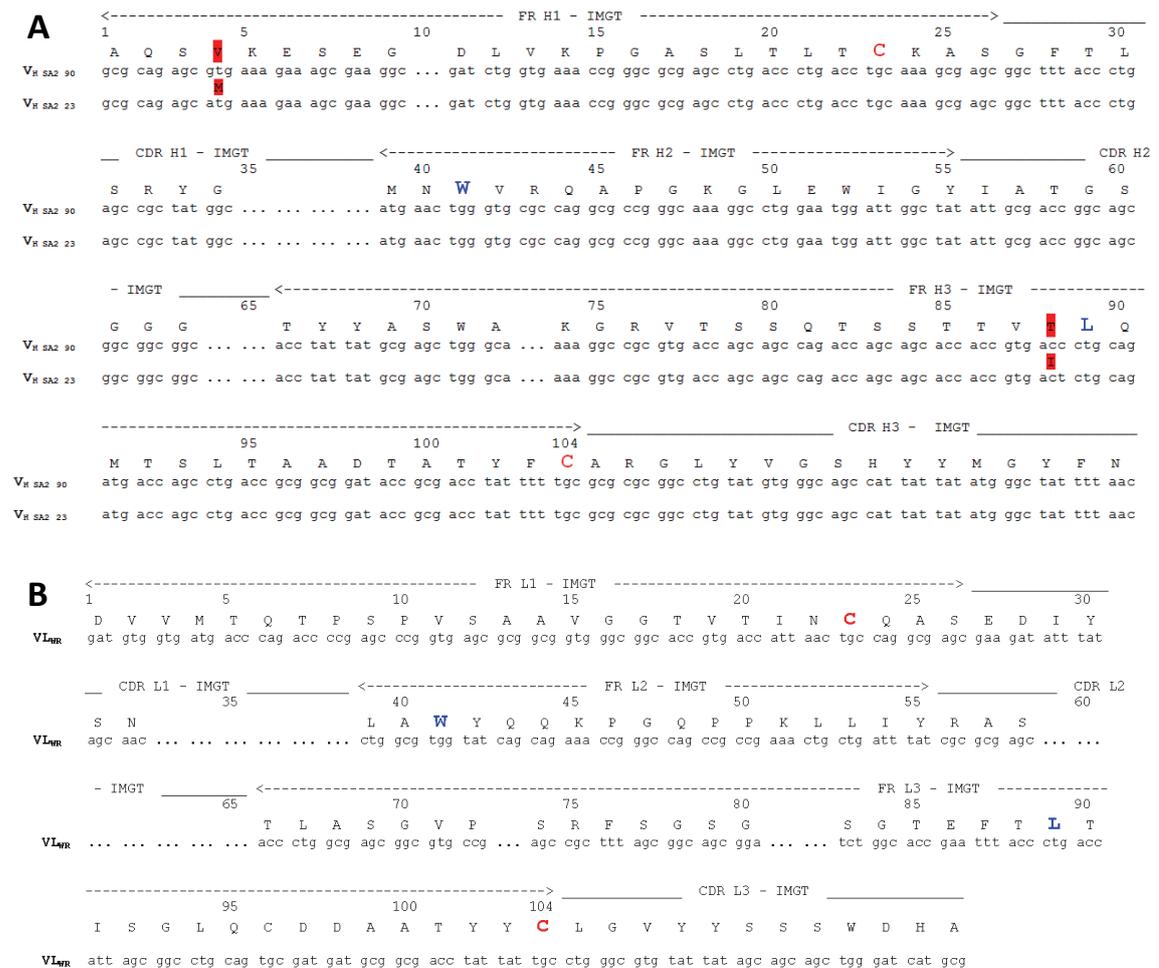


ABBILDUNG 37: ANALYSE DER (A) V_H-SEQUENZ (B) DER V_L-SEQUENZ DER F_{AB}-FRAGMENTE SA2 23 UND SA2 90 NACH DEN REGELN DER IMGT

ZUR ANALYSE WURDEN VIER IN DEN RAHMENREGIONEN VON ANTIKÖRPERSEQUENZEN KONSERVIERTE AMINOSÄUREN HERANGEZOGEN: CYSTEIN AN POSITION 23 IN FR1, TRYPTOPHAN AN POSITION 41 IN FR2 SOWIE LYSIN UND CYSTEIN AN POSITION 89 BZW. 104 IN FR3 (ROT BZW. BLAU). BEI DEN BEIDEN CYSTEINEN HANDELT ES SICH UM DIE AMINOSÄUREN, DIE FÜR DIE INTERCHENARE DISULFIDBRÜCKE VERANTWORTLICH SIND. DIE DEN SEQUENZABSCHNITTEN ZUGEORDNETE REGION IST ÜBER DEN SEQUENZEN ANGEGEBEN. AMINOSÄUREN IN WELCHEN SICH DIE BEIDEN KLONE UNTERSCHIEDEN SIND ROT HINTERLEGT

Es wurde des Weiteren eine Blastanalyse mit bereits publizierten leporiden Antikörperketten durchgeführt, um Informationen über mögliche Allotyp- bzw. Genfamilien-Zugehörigkeiten zu erhalten. Die Blastrecherche ergab, dass es sich bei beiden Klonen um eine leichte Kette des κ1, b4-Allotyps handelte (Accession No. D38376 IMGT und K01358). Die schwere Kette von SA2 23 wies eine 89%ige Übereinstimmung mit den variablen Regionen des V_{H1a3}-Allotyps auf (Accession No. AF264429), der konstante Teil war mit 99%iger Übereinstimmung dem de12, 14-Allotyp der leporiden schweren Ketten von IgG zuzuordnen (Accession No. K00752 IMGT). Bei Klon 90 handelte es sich mit 90%iger Übereinstimmung beim variablen Teil der schweren Kette ebenfalls um einen V_{H1a3}-Allotyp (Accession No. AF264511). Besonders anzumerken ist, dass diese V_H in der Datenbank fast ausschließlich mit dem konstanten Teil von IgM gekoppelt waren. Der konstante Teil wurde mit 98 % ebenfalls als IgG identifiziert (Accession No. K02532 IMGT). Virtuelle Analysen bezüglich der Moleküleigenschaften mit den Programmen auf dem Server EXPASY MOLECULAR BIOLOGY erbrachten folgende Resultate:

TABELLE 28: ERGEBNISSE DER VIRTUELLEN ANALYSE DER BEIDEN SA2-AFFINEN F_{AB}-FRAGMENTE

SA2 23		
MW		47,9 kDa
ϵ		76 780 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs _{1,0}		1,6 g/l
Instab. Index		31,65
SA2 90		
MW		48,0 kDa
ϵ		76 780 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs _{1,0}		1,6 g/l
Instab. Index		32,14

Beide Moleküle haben ein rechnerisches Molekulargewicht von 48 kDa. Der auf Grund der Aminosäuresequenz errechnete Absorptionskoeffizient entspricht 76 780 M⁻¹cm⁻¹, damit sollte eine Absorption von 1,0 bei 280 nm einer Proteinmenge von ca. 1,6 mg/ml entsprechen. Der niedrige Instabilitätsindex zeigt, dass die beiden Moleküle in wässriger Lösung theoretisch stabil sein sollten.

Im Anschluss an die theoretischen Analysen wurde jeweils eine Expression in 20-ml-Kulturen für beide Klone angeschlossen (siehe 2.2.3.1). Die erhaltenen und dialysierten periplasmatischen Fraktionen wurden in zwei weiteren unabhängigen Verdrängungs-ELISA, analog zu den *Screening*-ELISAS (siehe 2.2.2.6) getestet. Aufgetragen wurden neben den periplasmatischen Fraktionen auch 1:100 000 verdünntes Serum des Tieres #154 als Positivkontrolle. Der prozentuale Vergleich zeigt in den beiden unabhängigen Experimenten für beide F_{ab}-Fragmente immer das gleiche Verhältnis der Verdrängung zur Positivkontrolle. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den beiden isolierten F_{ab}-Fragmenten SA2 23 und SA2 90 mit großer Wahrscheinlichkeit um funktionelle und sulfonamidspezifische AK-Fragmente handelt.

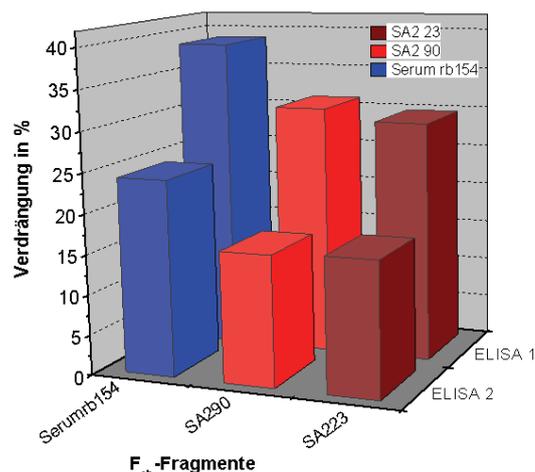


ABBILDUNG 38: PROZENTUALE VERDRÄNGUNG DER F_{AB}-FRAGMENTEN SA2 23 UND SA2 90
 DURCHFÜHRT WURDEN VERDRÄNGUNGS-ELISAS MIT JE 100 μ L DIALYSIERTEM PERIPLASMA UND 1:100 000 VERDÜNNTEM SERUM DES KANINCHENS #154 IN MIT 5 μ G/ML HAPTEN-KONJUGAT BESCHICHTET MIKROTITERPLATTEN . DER NACHWEIS VON F_{AB}-FRAGMENTEN WURDE DURCH DIE ZUGABE VON ZIEGE<RABBIT>POD-AK ERBRACHT. DIE SUSTRATREAKTION WURDE DURCH ZUGABE VON ELISA POD-SUBSTRAT GESTARTET

Die erfolgreiche Isolation der beiden F_{ab} -Fragmente aus der LibSAHCRb zeigt, dass mit dem neuen Phagemid pASK111R_{ab}-p3-WR funktionelle Immunglobulin-Fragmente aus Kaninchen-Antikörperbibliotheken selektiert werden können.

4. DISKUSSION

Das *Phage Display* (Hust & Dübel, 2004; Hoogenboom, 2005) imitiert die Strategie des Immunsystems zur Selektion antigenspezifischer AK. Die Methode des *Expressions-Screenings* hat sich in vielen Labors zur Selektion neuer AK bewährt. Seit 1997 Hall *et al.* die Anwendungsmöglichkeiten der *Phage Display*-Technologie für die Umweltanalytik in ihrem Review zusammengefasst haben, wurden für diese spezielle Zielsetzung dieser Technologie keine wesentlichen Neuerungen in der Literatur berichtet. Die Intention dieser Arbeit war, die Einsatzgebiete der rekombinanten Antikörpertechnologie unter Einbindung von den Besonderheiten des Kaninchen Immunsystems für die Umweltanalytik auszubauen. Dafür wurden drei Phagemide zur Selektion von AK-Fragmenten aus murinen und leporiden Antikörperbibliotheken generiert. Phagemide haben gegenüber Phagen-Vektoren, durch die geringere Größe den Vorteil, dass sie Bakterienzellen 100fach effektiver infizieren können (Barbas *et al.*, 2001). Dies ist bei der Generation von großen, verschiedenartigen Bibliotheken mit vielen unterschiedlichen AK-Genen bedeutsam. Im Hinblick auf die Ansprüche der Umweltanalytik wurden die Phagemide so entworfen, dass mit ihnen für verschiedene Matrizes und Testansätze rekombinante F_{ab} -Fragmente aus den beiden Spezies isoliert werden können. Die Vorgehensweise beinhaltete das Design eines aktualisierten Primerrepertoires für die Amplifikation von Kaninchen-Antikörpergenen und dessen Abgleich mit bereits veröffentlichten Sequenzen. Des Weiteren wurde eine *Cloning Site* entworfen, die durch die verwendeten Schnittstellen und Leadersequenzen den Eigenheiten von leporiden Immunglobulinsequenzen Rechnung trug. Ausgehend vom Expressionvektor pASK85-K411B wurden drei Phagemide hergestellt, die sich in den konstitutiv exprimierten Antibiotikaresistenzen und/oder der verwendeten *Cloning Site* unterschieden. Unter Verwendung des rekombinanten atrazinspezifischen F_{ab} -Fragments K411B konnte gezeigt werden, dass sich alle drei Phagemide für die Expression von F_{ab} -Fragmenten und die Herstellung von rekombinanten Phagen mit murinen Antikörpergenen eignen. Um die Funktionalität der neuen *Cloning Site* und der Primer für Kaninchen-Gene zu überprüfen, wurde unter deren Verwendung eine sulfonamidspezifische leporide Bibliothek erstellt und mittels *Phage Display* zwei Kaninchen- F_{ab} -Fragmente (F_{ab} SA2 23 und F_{ab} SA2 90) selektiert. Dadurch konnte die Funktionalität des pASK111R_{ab}-p3 mit leporiden Immunglobulingenen aufgezeigt werden.

4.1. KONSTRUKTION DER PHAGEMIDE

4.1.1. KONSTRUKTION VON PASK85-P3-K411B UND PASK115-P3-K411B FÜR MURINE AK-GENE

Zur Herstellung von rekombinanten Phagen, wurden verschiedene Phagemide ausgehend von dem Expressionsvektor pASK85-K411B (Abbildung 6, Seite 59) konstruiert. Dieser Expressionsvektor (Skerra, 1994b) war bereits erfolgreich für die gentechnische Produktion des murinen F_{ab} -Fragments K411B (Kramer *et al.*, 2002b) sowie für die Umwandlung in ein Phagemid eingesetzt worden (Zahn *et al.*, 1999) und erfüllte bereits fünf der sieben Anforderungen (siehe Einleitung 1.3.1, Seite 21f). Weitere Beispiele für *Phage Display*-Systeme sind pHEN-1 (Hoogenboom *et al.*, 1991), pComb (Barbas *et al.*, 2001) und pCANTAB 5E (Malone, 1994) und deren Derivate. Zur effizienten Durchmusterung von Bibliotheken auf F_{ab} -Fragmente mit neuen Liganden-Bindungseigenschaften sollte sowohl das Verfahren des monovalenten als auch des polyvalenten *Phage Displays* (Lowman *et al.*, 1991; Rondot *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2003)

angewendet werden können. Zu diesem Zweck wurde ein Phagemid im 3+3-Typ mit dem vollständigen pIII als Fusionspartner angestrebt. Dadurch besteht die Möglichkeit, andere Helferphagen als den in dieser Arbeit verwendeten M13K07, wie den Hyperphagen (Rondot *et al.*, 2001), den Ex-Phagen (Baek *et al.* 2002) und andere im Laufe der Zeit verbesserte M13-Derivate (Phaberge (Soltes *et al.*, 2003); M13 Δ 3.2 (Duenas & Borrebaek, 1995); CT-Phage (Kramer *et al.*, 2003)), durch einfache Manipulation am Vektor einsetzen zu können. Im ersten Schritt, wurde durch Insertion des vollständigen GenIII, der Expressionsvektor in das Phagemid pASK85-p3-K411B überführt. Die erfolgreiche Umwandlung konnte im Anschluss durch die funktionelle Expression des Fusionsproteins und des F_{ab}-Fragments im *Western Blot* und ELISA bestätigt werden.

Seit der Verwendung der ersten Phagemide wurde eine Reihe von Studien angefertigt, in welchen der Einfluss der Reihenfolge der leichten und schweren Ketten und deren Anordnung in einem mono- oder dicistronische Operon unter Kontrolle von einem oder zwei Promotoren untersucht wurden (Kirsch *et al.*, 2004; Coriseo & Wang, 2004). Trotz der Reihenfolge der beiden Ketten (HC vor LC) in der *Cloning Site*, die nach Coriseo & Wang (2004) nicht optimal ist, konnte eine ausreichend starke Expression von K411B beobachtet werden (siehe 3.1.1.2). Auch die Fusion des GenIII an die Leicht- oder Schwerekette kann einen wesentlichen Einfluss auf die Expression ausüben, vor allem da hier die mögliche Selektion von *Bence Jones*-Dimeren nicht unterschätzt werden sollte (Solomon, 1976; Skerra, 1994a). Im *Western Blot* (Abbildung 11, Seite 60) konnte mit pASK85-p3-K411B kein Hinweis auf das Vorkommen von *Bence Jones*-Dimeren gefunden werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass solche Konstrukte bei der Selektion anderer Antikörpergene auftreten können, da die Bildung zu einem Großteil durch die Aminosäuresequenz gefördert werden (Skerra, 1994b). Dies ist ein wichtiger Punkt, der beim Einsatz des Phagemids mit anderen AK-Fragmenten streng kontrolliert werden sollte. Durch die Fusion des GenIII an die leichte Kette besteht die Möglichkeit, dass es während *Pannings* zur Anreicherung von *Bence Jones*-Dimeren kommen kann.

Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen bei der Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* haben gezeigt, dass das Wachstum von Kulturen zur Produktion plasmidkodierter Fremdproteine häufig mit einem Plasmidverlust der Zellen einhergeht. Dies gilt insbesondere bei Verwendung des Antibiotikums Ampicillin zur Selektion (Fiedler & Skerra, 2001). Um den Einfluss von Antibiotika-Resistenzen auf das Wachstum, die Infektionsrate und die Ausbeute von rekombinanten Phagen untersuchen zu können, wurde ein zu pASK85-p3-K411B korrespondierendes Phagemid mit einer Chloramphenicolresistenz hergestellt (pASK115-p3-K411B, Seite 62f). Für die beiden Phagemide pASK85-p3-K411B und pASK115-p3-K411B können die in der Literatur beschriebenen Standard-Primer zur Amplifikation von murinen Antikörpergenen verwendet werden (Barbas *et al.*, 2001; Skerra, 1994b). Dabei ist zu beachten, dass die ersten beiden Aminosäuren muriner V-Domänen fest in die *Cloning Site* integriert sind. Aus diesem Grund eignen sich diese beiden Phagemide, trotz der Seltenheit der Schnittstellen in Kaninchen-Antikörpersequenzen, nicht zur Repertoire-Klonierung von leporiden Immunglobulinen, da sie nicht native AS an die N-Termini der reifen Ig-Fragmente anfügen. Diese können die Faltung oder zu einem späteren Zeitpunkt die Anwendung selektierter F_{ab}-Fragmente beeinträchtigen.

4.1.2. PHAGE DISPLAY-VEKTOR PASK111R_{AB}-P3 FÜR KANINCHEN AK-GENE

4.1.2.1. PRIMERDESIGN UND AMPLIFIKATION VON LEPORIDEN ANTIKÖRPERN

Die letzte publizierte Datenbankanalyse zum Design von Primern zur Amplifikation von Kaninchen-AK-Genen wurde von Lang *et al.* 1996 durchgeführt. Allerdings wurden die Restriktionserkennungssequenzen für diese Primer suboptimal gewählt, da ein kleiner Prozentsatz der Amplifikate während des RV zerstört wurde. Die meisten Arbeitsgruppen, die chimäre humane/Kaninchen-F_{ab}-Fragmente selektieren, verwendeten das Phagemid pComb3H und die sechs Primer, die sich zur Amplifikation des leporiden b9-Allotypen bewährt haben, da dieser Typ die beste Kompatibilität mit den humanen C-Domänen aufweist (Rader *et al.*, 2000; Barbas *et al.*, 2001; Jasper *et al.*, 2003; Popkov *et al.*, 2003).

In der Umweltanalytik sind neben IgG auch andere Antikörperklassen für den Einsatz in verschiedenen Matrices von Interesse. Dazu zählen vor allem AK der Immunglobulinklasse A. Diese kommen *in vivo* vor allem in Sekreten vor und zeichnen sie sich häufig durch einen lipophilen Charakter aus. In der Umweltanalytik kann man sich diese Eigenschaften für den Nachweis von unerlaubten Substanzen z.B. in Milch zu Nutze machen. Das Kaninchen-Repertoire zeichnet sich gegenüber anderen Säugetieren durch die hohe Anzahl an IgA-Keimbahn-Genen aus. Auch die Klasse IgM wurde in das Primerrepertoire mit eingeschlossen. Es kann von Interesse sein, gezielt Antikörpergene dieser Klasse zu isolieren, da sie in einer sehr frühen Phase der Immunreaktion gebildet werden. Schwach antigene Substanzen wie zum Beispiel das Galactomannan führen nur zu einer primären Immunantwort und lösen keine Affinitätsreifung mit anschließendem Klassenwechsel zu IgG aus (Stynen *et al.* 1992; Latha *et al.*, 2007). Bei anderen Substanzen führen erst die Stoffwechselprodukte zu einer Immunreaktion. Um früh Kontaminationen mit solchen Substanzen nachweisen zu können, schien es sinnvoll, ebenfalls Oligonukleotide für die Klasse IgM mit zu entwerfen.

Aus dem Vergleich von in Datenbanken (IGMT, KABAT, AHOS) veröffentlichten Aminosäuresequenzen leporider AK wurden für die 5'-Enden von Immunglobulinketten insgesamt acht degenerierte Sequenzen für die V_L-Regionen und 14 degenerierte Sequenzen für die V_H-Region ermittelt. Analog wurden für die Aminosäuresequenzen der C-Termini für die leichten Ketten sechs Sequenzmotive für die Ketten des κ-Typs und vier Sequenzmotive für die λ-Ketten ermittelt, die dann mit Hilfe der Nukleotidsequenzen in drei Primersequenzen für die κ-Ketten und zwei Oligonukleotidsequenzen für die 3'-Enden der λ-Ketten aufgeteilt wurden. Die Primer für die C_H-Region wurden so in die Sequenzen gelegt, dass einer oder beide (IgA-Subklasse 8+13) für die korrekte Faltung der F_{ab}-Fragmente notwendigen Cysteinreste enthalten waren. Der zur Verifizierung durchgeführte Literaturabgleich mit veröffentlichten Primern zur Amplifikation von Kaninchen-Antikörpergenen (Knight *et al.*, 1984; Ridder *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 1996; Foti *et al.*, 1998; Rader *et al.*, 2000; Barbas *et al.*, 2001; Spieker-Polet *et al.*, 2002; Jasper *et al.*, 2003; Popkov *et al.*, 2003) betätigte 17 der 39 entworfenen Primer.

Eine Möglichkeit, die Primerlängen und daraus resultierende hohe *Annealing*-Temperaturen zu minimieren, stellt der Ansatz einer *nested*-PCR dar. Hierbei wird mit zwei Primersätzen gearbeitet. Der erste Primersatz dient der spezifischen Amplifikation des gewünschten Gens. Über einen zweiten Primersatz werden nachfolgend an das Amplifikat Modifikationen wie z.B. Überhänge, Schnittstellen oder Biotin angefügt (Bartlett & Stirling, 2003). Dieser Ansatz wurde für die Amplifikation von leporiden HC und LC ausgeschlossen, da sich die Verkürzung der Pri-

mer und die dadurch reduzierte *Annealing*-Temperatur nicht mit dem Mehraufwand an Arbeitsschritten die Waage hielt.

Um alle Primer für die Leichten- und Schwereketten je nach Fragestellung beliebig kombinieren zu können, wurden deren Schmelztemperaturen aufeinander abgestimmt. In die Berechnung flossen die N- bzw. C-terminalen Sequenzen, die Endonukleaseschnittstellen und die Mindestlänge der Basenüberhänge ein. Die Länge der Überhänge wurde durch die für die Restriktion erforderliche Anzahl von 6 bzw. 8 Basen Überhang bestimmt. Alle Primer wurden durch die Zusammensetzung der Überhänge rechnerisch auf die niedrigst-mögliche Konsensustemperatur von 76 °C für die leichten, und von 78 °C für die schweren Ketten eingestellt. Mit einer durchschnittlichen Länge von 37 Basen spiegeln die in dieser Arbeit vorgestellten Primer die Länge von etablierten Oligodesoxynukleotiden (Barbas et al., 2001) wider. Für diese Primer werden *Annealing*-Temperaturen von 56°C beschrieben. Damit liegen sie an der oberen Grenze der in der Literatur empfohlenen *Annealing*-Temperaturen von 45°C–58°C (Sambrook, et al., 2003). O'Brien et al. (2002) empfehlen die Verwendung einer TD-PCR bei Einsatz von Primergemischen zur Amplifikation von Immunglobulinen. Durch die Durchführung einer TD-PCR (Don et al., 1991) mit *Hotstart* und den Einsatz von 2,5 % (v/v) Formamid (Bartlett & Stiring, 2003), konnte für alle neu entworfenen Primer eine einheitliche *Annealing*-Temperatur von 53°C realisiert werden. Zusätzlich wurde so die Entstehung von Nebenbanden minimiert und die Bildung von Primerdimeren verhindert. Mit dem beschriebenen TD-Protokoll liesen sich mit fast allen Primerkombinationen erfolgreich Amplifikate erzeugen (Tabelle 18, Seite 67). Die einzige Ausnahme stellt die Primerkombination IgA+V_{H#19} dar. Die Differenzen der Amplifikat-Ausbeuten, abhängig von der Antikörperklasse, können auf die physiologische Verteilung der B-Zellsubtypen im Organismus zurückgeführt werden. In der Milz gibt es einen großen Anteil an IgM- und IgG- und nur wenig IgA-tragende B-Zellen. Für die gezielte Isolation von IgA-präsentierenden B-Zellen empfiehlt sich die Verwendung von Drüsengewebe. So verwenden Mage et al. (1989) für Studien, über die IgA-Keimbahngene in Kaninchen, das Milchdrüsengewebe säugender Tiere. Die in Kapitel 2.2.1.6, Seite 45 ermittelten Unterschiede an notwendigen cDNS-Volumina für die Amplifikation von LC-Ketten sowie für HC-Ketten je nach Versuchstier und Primerkombination, werden auch auf den Ausblutungsgrad der Versuchstiere und damit auf die unterschiedlichen Ausbeuten an B-Zellen zurückgeführt. Schon bei der Isolation der mRNA aus den B-Zellen zeigten sich abhängig vom Versuchstier Unterschiede in den Ausbeuten. Auch wurde das Tier #154 einem verkürzten Immunisierungsprozess unterzogen (Marco P., persönliche Mitteilung, 2005).

4.1.2.2. DESIGN DER LEPORIDEN CLONING SITE FÜR DEN PHAGE DISPLAY-VEKTOR

Die *Cloning Site* für den leporiden *Phage Display*-Vektor wurde unter Berücksichtigung der Häufigkeiten verschiedener Schnittstellen (siehe Tabelle 17 Seite 65) und unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.1.3, Seite 63f beschriebenen Kriterien entworfen. Es wurde entschieden, vier verschiedene Schnittstellen für die sequentielle Klonierung der LC und HC zu verwenden. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, einzelne Ketten gerichtet austauschen zu können. Auch Johansen et al., (1995) und Barbas et al., (2001) setzten diese Methode bei der Klonierung ein. Krebber et al. (1997) hingegen verwendeten nur das asymmetrische Restriktionsenzym *SfiI*, um das Risiko des Schneidens in Antikörpergenen zu umgehen. Weiterhin ist eine Kombination aus *SfiI* und *NotI* eine verbreitete Alternative, da diese Restriktionsenzyme nicht in den V-Regionen schneiden (Hoogenboom et al., 1991; Rader et al., 1997). Da die *Cloning Site* für murine und leporide AK-Gene einsetzbar sein sollte, war es nicht möglich, die ersten speziesspezifischen

AS, die die Endonukleaseschnittstellen enthielten, zu integrieren. Deshalb musste die Peptidaseschnittstelle der Signalsequenzen so verändert werden, dass die Endonukleaseschnittstellen für die Amplifikate inseriert werden konnten. Eine Veränderung der Peptidaseschnittstelle kann jedoch dazu führen, dass die Signalsequenz nach der Translokation nicht mehr abgespalten werden kann und damit die Proteinfaltung beeinflusst wird (Pratap & Dikshit, 1998; Jain *et al.*, 1994; Tanji *et al.*, 1991). Aus der Vielzahl von im *Phage Display* eingesetzten Signalsequenzen, wie pelB, gp3, cat und stil (Gennity *et al.*, 1990; Hust & Dübel, 2004), waren nur unzureichende Informationen über deren Toleranz gegenüber Änderungen an den Peptidase-Erkennungssequenzen erhältlich. Deshalb wurden die ompA- und die rbp-Signalsequenz ausgewählt, da für diese beiden umfangreiche Studien über die Auswirkungen von Manipulationen an den Peptidaseschnittstellen vorlagen. Die ompA-Signalsequenzen tolerieren eine Sequenzänderung von Ala-Gln-Ala in die Sequenz Ala-Ile-Ala (Pratap & Dikshit, 1998). Dadurch konnte die Nukleotidsequenz in die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *AsiI* verändert werden. Die Nukleotidsequenz der Peptidase-Schnittstelle von rbp (Ala-Met-Ala) konnte über eine stille Mutation in eine *NcoI*-Erkennungssequenz umgewandelt werden. Da die originale *Shine Dalgarno*-Sequenz (RBS) für die rbp nicht verfügbar war (REGULONDB, Araceli *et al.*, 1998), wurde ersatzweise die RBS von ompA verwendet. Die Verwendung einer alternativen RBS für die rbp-Signalsequenz kann Einfluss auf die Translation haben und damit die Höhe der Expression der Leichtkette beeinflussen (Schultzaberger *et al.*, 2001; Golshani *et al.*, 2004). Wie unter 4.2 diskutiert wird, scheint bei dem durchgeführten Phagemid-Vergleich bei pASK111R_{ab}-p3-K411B tatsächlich eine verminderte Translation stattzufinden. Diese drückt sich im Unterschied der ELISA-Messungen sowie einer höheren Vitalität der Bakterien, angezeigt durch die erreichte Ernte-OD_{600nm}, während der Expression aus. Um die Auswirkungen der verwendeten ompA-RBS auf die Expressionsrate genauer zu analysieren, würde sich der Test verschiedener RBS in der R_{ab}CS anbieten (Hoogenboom, 2005).

Die Reihenfolge der LC und HC in der *Cloning Site* R_{ab}CS ist in Einklang mit den Erfahrungen von Kirsch *et al.* (2004) und Coriseo & Wang (2004) angeordnet. Die leichte Kette wird durch die rbp-Signalsequenz und das Fusionsprotein HC-pIII durch die ompA-Signalsequenz in den periplasmatischen Raum ausgeschleust (Groarke *et al.*, 1983; Collier 1994). An das Strukturgen der schweren Kette ist ein His₆-Anhängsel angefügt. Diese Einheit wird durch ein *Amper-Stopp-Codon* von der nachfolgenden Sequenz des GenIII getrennt. Die Fusion mit der schweren Kette wurde zur Vermeidung von *Bence Jones*-Dimeren (Solomon *et al.*, 1976; Skerra, 1994a) gewählt. Dadurch wurde ebenfalls die Möglichkeit einer alternativen Produktion von löslichen F_{ab}-Fragmenten und Fusionsproteinen offen gehalten. Damit kann die Spezifität von selektierten AK-Fragmenten in kleinem Maßstab durch einfaches Umklonieren der selektierten Plasmide in Nonsuppressorstämme getestet werden. Auch finden sich in der Literatur Hinweise auf einen regulatorischen Effekt dieses Codons auf die Höhe der toxischen Gendosis des Fusionsproteins (Schlehuber, 2001). Zur Anwendung alternativer Reinigungsstrategien wurde die Region um die Hexahistidinsequenz so konzipiert, dass sie von den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *MluI* und *SacII* eingerahmt ist. Dadurch ist ein einfacher Austausch durch andere Affinitätstags (z.B. Strep-tag (Schmidt & Skerra, 1993), E-tag (Malone, 2004), c-Myc-tag (Evan *et al.*, 1985) oder FLAG-tag (Hopp *et al.*, 1988)) möglich und erlaubt so auch Alternativen für die Reinigung rekombinanter Proteine. Im Allgemeinen ist der Austausch einzelner Teile der *Cloning Site* durch die Auswahl und Lage der Schnittstellen durch einfache und gerichtete Klonierung möglich. Dadurch erhöht sich die Flexibilität des Systems.

4.1.2.3. KONSTRUKTION VON pASK111R_{ab}-p3-WR UND pASK111R_{ab}-p3-K411B

Zur Konstruktion des Phagemids pASK85R_{ab}-p3 wurde anschließend die Kasette des F_{ab}-K411B von pASK85-p3-K411B durch die neue *Cloning Site* R_{ab}CS ersetzt. Um die Auswirkungen verschiedener Resistenzmarker überprüfen zu können, wurde die Ampicillin-Resistenz gegen einen Chloramphenicol-Marker ausgetauscht. Dies geschah über einen Austausch der Vektorrücken von pASK85R_{ab}-p3 und pASK85-p3-K411B mit dem Vektorrücken des pASK111. Wie in allen in dieser Arbeit konstruierten Phagemide, steht damit auch hier die Transkription von leporiden AK-Fragmenten unter der Kontrolle des *tet*-Promoter/Operator-Systems. Die Produktion von rekombinanten AK-Fragmenten profitiert von einigen Merkmalen des Anhydrotetracyclin-induzierbaren *tet*-Promoters. Die *tet* gesteuerte Expression von heterologen Genkonstrukten in *E. coli* ist eine günstige Alternative zu IPTG-induzierbaren Promoterkonstruktionen, wie z.B. der *lac* Promoter und dessen Derivate (Reznikoff & Gold, 1986). Der Einsatz des *tet*-Promoters ermöglicht die ökonomische Massenproduktion von rekombinanten F_{ab}-Fragmenten, da die Kosten für den Induktor Anhydrotetracyclin um etwa den Faktor 20 niedriger liegen als für IPTG. Außerdem ist das *tet*-Promoter-System weitgehend unabhängig vom *E. coli* Stamm, der für die Produktion der rekombinanten Proteine eingesetzt wird (Skerra, 1994b). Dies ermöglicht es, die Wirtsstämme nach optimalen Wachstumsbedingungen auszuwählen, z.B. für die Fermentation mit hoher Zelldichte (Schiweck & Skerra, 1995). Addierend kommt hinzu, dass das *tet*-Promoter-System auch induzierbar ist, wenn die Zellen in Minimalmedium kultiviert werden. Auf Grund der streng regulierten Expression lassen sich Toxizitätsprobleme, verursacht durch Expression von AK-Fragmenten während der bakteriellen Wachstumsphase, vermeiden (Skerra, 1994b). Der Zelltod vor der Induktion wird verhindert, da das *tetR*-Gen getrennt von der *tet*-Kontrollregion in den pASK-Vektoren inseriert ist. Durch die transkriptionelle Fusion des *tetR*-Gens an das 3.-Ende des Resistenzmarker-Gens (*bla* oder *cat*) kann die ununterbrochene Expression des Repressors erfolgen.

Für die Konstruktion einer Antikörperbibliothek ist es wichtig, den vollständigen Verdau des verwendeten Phagemids zu überprüfen. Die Kontamination von Antikörperbibliotheken mit unpräparierten oder nicht vollständig geschnittenen Vektoren wurde des Öfteren beobachtet (Courtney *et al.*, 1995; Johansen *et al.*, 1995). Diese führt zu einer Verfälschung der Werte für die Transformationsraten und die Komplexität der Bibliothek. Um ein Mittel zur Kontrolle über die Vollständigkeit der Restriktionsverdau zu erhalten, wurden naive leporide leichte und schwere Ketten als Platzhalter in die R_{ab}CS integriert und diese mit diagnostischen Schnittstellen markiert (pASK111R_{ab}-p3-Reihe, Abschnitt 3.1.4). Wie in Kapitel 4.3.2.2. ausführlicher diskutiert werden wird, ist es wichtig die beiden diagnostischen Schnittstellen, für die Überprüfung des Restriktions- und Ligationserfolges, nicht in Kombination einzusetzen. Die Untersuchung auf ein Ausbleiben der Restriktion kann dazu führen, dass *Escape*-Mutanten mit einer geringeren Molekül-Größe übersehen werden. Eine Alternative zur Kontrolle des Restriktionserfolges verwendet der Phagemidvektor pAK100 (Krebber *et al.*, 1997), mit dem *Insert* für eine Tetracyclin-Resistenz, zwischen den Klonierungsschnittstellen. Die erfolgreiche Insertion des scFv-Fragments kann mittels der verlorenen Tetracyclin-Resistenz überprüft und der vollständige Verdau gesichert werden.

Da im Labor kein charakterisiertes, rekombinantes Kaninchen-F_{ab}-Fragment für Funktionstests mit dem neuen Phagemid zur Verfügung stand, wurde das murine F_{ab}-Fragment K411B in das Phagemid pASK111R_{ab}-p3-WR13.12 inseriert. Dies sollte die Funktion der neuen Signalsequenz

rbp und die der geänderten Peptidase-Schnittstelle für die ompA-Signalsequenz bestätigen. Ein diesbezüglicher Test der Vektorbestandteile war durch die massiven Änderungen dringend erforderlich, um bei auftretenden Problemen die Ursachen lokalisieren zu können.

4.2. VERGLEICH DER PHAGE DISPLAY-VEKTOREN UNTER EINSATZ DES MURINEN F_{AB} K411B

Der Vergleich der vier Vektoren pASK85-K411B, pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B in die beiden *E.coli* Stämmen XL1 *Blue* und TG1 F⁺ zeigte, dass die Vektoren bzw. die von ihnen kodierten Antibiotikaresistenzen keinen Einfluss auf das Wachstum beider Bakterienstämme nahmen, solange keine Induktion mit aTc erfolgte. Unterschiede im Wachstumsverhalten wurden erst nach der Induktion des *tet*-Promotors mit 0,2 µg/ml aTc und der damit verbundenen F_{ab}- und F_{ab}-pIII-Expression ersichtlich (Abschnitt 3.2, Seite 74f). Die eingesetzte Menge des *Inducers* zur Expression von K411B wurde aus der Literatur übernommen (Kramer *et al.*, 2002a). Für die Expression anderer F_{ab}-Fragmente kann es sinnvoll sein, die Menge an aTc jeweils individuell zu ermitteln und anzupassen, um eine optimale Expressionsrate zu gewährleisten.

Eine möglichst niedrige Temperatur nach der Induktion ist ein essentieller Faktor für die Expression von löslichen rekombinanten Antikörpern, da hierbei Expression und Transport der exprimierten Proteine in den periplasmatischen Raum langsamer geschieht (Schein und Noteborn, 1988; Tagaki *et al.*, 1988). Die Überexpression von rekombinanten Antikörpern kann die Bildung von unlöslichen Aggregaten hervorrufen. Auch ist die korrekte Faltung des AKs eher bei niedrigeren Temperaturen gewährleistet (Lee *et al.*, 1998). Die zur Ermittlung der optimalen Inkubationstemperatur bei 37 °C, 30 °C und 26 °C durchgeführten F_{ab}-/F_{ab}-pIII-Expressionen ergaben, dass die optimale Expressionstemperatur für das F_{ab}-Fragment K411B in XL1 *Blue* bei 26 °C und in TG1F⁺ bei 30 °C lag, da sich hier die Teilungsraten und die Dauer der stationären Phase in etwa die Waage hielten. Die gewonnenen Daten ließen sich mit in der Literatur beschriebenen Angaben vergleichen. Je nach exprimierten AK-Fragment konnten dort Temperaturen von 30 °C (Lennard, 2002 in O'Brien; Kramer, 2002b) bzw. 37 °C (Martineau *et al.*, 1998; de Haard *et al.*, 1999) für den *E. coli*-Stamm TG F⁺ gefunden werden. Die Angaben für Expressionen in XL1 *Blue* wiesen einen größeren Temperaturbereich von 25 °C–37 °C auf (Bullock *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1997; Coomber *et al.*, 1999; Zahn *et al.*, 1999; Schlehuber, 2001). Unter Umständen spiegelt sich darin eine größere Sensibilität dieses Bakterienstammes gegenüber Fremdproteinen wieder. Und unterstreicht so die Notwendigkeit, vor der Durchführung eines *Phage Displays* die Eignung des gewünschten Bakterienstammes zu überprüfen.

Die Unterschiede in der Dauer der stationären Phasen zwischen pASK85-K411B und pASK85-p3-K411B in beiden *E.coli*-Stämmen können auf die Toxizität des exprimierten pIII zurückgeführt werden. Die Phagemide mit der Cm^R wiesen eine deutlich längere Log-Phase nach der Induktion auf. Zwischen den Phagemiden mit der rbp- und ompA-Signalsequenz bestand ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Teilungsrate und der Länge der Log-Phase. Die erreichte Maximal-OD_{600nm} war 1,1–1,6fach höher als bei den Kulturen für das Phagemid pASK115-p3-K411B. Durch die Verwendung einer alternativen *Shine Dalgarno*-Sequenz für die rbp-Signalsequenz kann ein Einfluss auf die Translationseffizienz nicht ausgeschlossen werden. Die dadurch verringerte Produktion des toxischen Fusionsproteins kann zu der berichteten höheren Teilungsrate für die Bakterien mit diesem Phagemid führen.

Um abschließend sagen zu können, welcher der Bakterienstämme am besten für die nachfolgenden Anwendungen geeignet war, wurden die Phagemide in den beiden Stämmen, analog dem Protokoll zur Herstellung rekombinanter Proteine, im analytischen Maßstab (siehe 2.2.3.1) induziert. Die Analyse der Periplasmafraktionen durch *Western Blot* (Abbildung 23, Seite 76) zeigte, dass mit allen Phagemiden K411B-F_{ab}-Fragmente und mit den Phagemiden pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B K411B-pIII-Fusionsproteine exprimiert werden konnten. Auch die Applikation der periplasmatischen Zellfraktionen in einem direkten, kompetitiven ELISA zeigte eine konzentrationsabhängige Reaktion für alle Phagemide (siehe 3.2.2). Für die Phagemide pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B konnte zusätzlich die funktionelle Expression des K411B-pIII nachgewiesen werden (Abbildung 24B, Seite 77). Im Vergleich der Absorptionsmaxima zwischen den verschiedenen Phagemiden konnte beobachtet werden, dass das Phagemid pASK111R_{ab}-K411B nur die Hälfte der Absorptionen der anderen periplasmatischen Fraktionen erreicht, obwohl dieses Phagemid in den Teilungsraten und der OD_{600nm} bei der Ernte die höchsten Werte erreicht hatte. Diese Beobachtung findet sich auch in der Intensität der *Western Blot*-Banden. Die Absorptionswerte für die Gesamtmenge an F_{ab} im ELISA sind bei pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B im Vergleich zu den beiden anderen Phagemiden verringert. Vergleicht man jedoch das Absorptionsverhältnis bezüglich des Fusionsproteins, lässt dies den Rückschluss zu, dass durch den Einfluss des Chloramphenicols auf die 50S Untereinheit der Ribosomen die Proteinexpression insgesamt reduziert wird. Dies könnte zu einem stabileren Gleichgewicht verschiedener Faltungsintermediate im Cytoplasma führen, welches die Sekretion der Fusionsproteine in das Periplasma positiv beeinflusst. Die geringeren Werte für den pASK111R_{ab}-p3-K411B können in diesem Zusammenhang eventuell auf die Verwendung der alternativen *Shine Dalgarno*-Sequenz für die rbp-Signalsequenz und damit auf eine weniger effektive Translationsinitiation zurückzuführen sein. Die dadurch verringerte toxische Proteinproduktion führt zu der oben berichteten größeren Teilungsrate für die Bakterien mit diesem Phagemid. Diese Beobachtungen wurden auch bei der Untersuchung bezüglich des funktionellen Einbaus des Fusionsproteins in die Phagenpartikel bestätigt.

Aus dem Vergleich der in den Kapiteln 3.2.3 und 3.2.4 erhaltenen Daten, wird ersichtlich, dass die Gesamtmenge an sekretierten Phagen in den Cm-Kulturen insgesamt niedriger ist als in den Amp-Kulturen. Die Cm-Kulturen weisen jedoch einen größeren Anteil an rekombinanten Phagen auf. Beim Phagemid pASK85-p3-K411B betrug der Anteil an rekombinanten Phagen weniger als 1 %. Beim Phagemid pASK115-p3-K411B ist die Menge an Phagen, die das Phagemid tragen, signifikant höher als die der Wildtypphagen. Hier liegt der Anteil bei 65 %. Der signifikante Unterschied in den Ausbeuten lässt sich durch zwei mögliche Ursachen erklären: Erstens durch den Einfluss des Antibiotikums Cm auf die Peptidyl-Transferase und eine damit einhergehendes gesteigertes Überlesen des Amber-Stopp-Kodons, und zweitens eventuell auch durch die unterschiedliche Reihenfolge der leichten und schweren Kette auf der dicistronischen mRNA. Dadurch eventuell hervorgerufene Sekundärstrukturen können die Translation negativ beeinflussen. Corisdeo & Wang (2004) und Kirsch *et al.* (2004) konnten in ihren Experimenten große Unterschiede in den Ausbeuten bei der Expression desselben AK-Fragments feststellen, abhängig von der Reihenfolge, in welcher die beiden Ketten in der *Cloining Site* angeordnet waren. Setzt man die Gesamtmenge der Phagen ins Verhältnis zur Ernte-OD_{600nm}, dann wird ersichtlich, dass die Kulturen, die die Phagemide pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B tragen und damit unter der Kontrolle der Chloramphenicolresistenz stehen, die besseren Ausbeuten an Phagen pro Bakterienmasse haben. Die Auswertung bezüg-

lich der Eignung der beiden Bakterienstämme XL1 *Blue* und TG1 F⁺ legt für den *E.coli*-Stamm XL1 *Blue* die besseren Sekretionseigenschaften für die löslichen murinen Proteine nahe. Damit ist dieser für die Expression von solublen F_{ab}-Fragmenten besser geeignet. Für die Produktion rekombinanter Phagen bietet sich hingegen der *E. coli*-Stamm TG1 F⁺ durch die kürzere Lag-Phase, die ausgeprägtere stationäre Phase und damit durch seine größere Toleranz gegenüber der Expression von pIII an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit allen drei Phagemiden rekombinante Phagenpartikel sekretiert wurden. Diese tragen ein funktionelles F_{ab}-Fragment auf ihrer Oberfläche. Damit können alle drei Vektoren für das *Phage Display* mit murinen Immunglobulinen verwendet werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass für das Phagemid pASK111R_{ab}-p3 die ersten beiden AS der V-Domänen in die Primer integriert sein müssen. Für pASK115-p3-K411B und pASK111R_{ab}-p3-K411B konnte ein positiver Einfluss der Cm^R auf die Ausbeute an rekombinanten Phagenpartikeln beobachtet werden. Bei pASK111R_{ab}-p3 wurde außerdem durch die alternative Ribosomenbindungsstelle eine höhere Vitalität der Bakterien während der Expression dokumentiert. Damit bietet sich dieses Phagemid nach derzeitigem Stand zur Selektion von toxischen AK-Fragmenten an, weil es gegenüber dem Ampicillin-System eine deutliche Steigerung der Ausbeute an F_{ab}-Phagen um 20 % gestattet.

4.3. SELEKTION VON LEPORIDEN SULFONAMIDSPEZIFISCHEN F_{AB}-FRAGMENTEN

4.3.1. ETABLIERUNG EINER IMMUNISIERTEN LEPORIDEN BIBLIOTHEK

Zur Selektion von sulfonamidspezifischen F_{ab}-Fragmenten aus Kaninchen wurde das Verfahren des monovalenten *Phage Displays* (Barbas *et al.*, 2001; Hoogenboom, 2005; O'Brien *et al.*, 2002) angewendet. Durch ein monovalentes *Display* werden überwiegend AK-Fragmente selektiert, die gute Affinitäten aufweisen (Barbas *et al.*, 2001). Die funktionelle Präsentation des Fremdproteins auf der Phagenoberfläche erlaubt die Trennung unterschiedlicher Phagemide anhand der Bindungseigenschaften des präsentierten F_{ab}-Fragments zu einem gegebenen Zielmolekül.

Für die monovalente Präsentation der leporiden F_{ab}-Fragmente auf Phagenpartikeln wurde das neue Phagemid pASK111R_{ab}-p3-WR (siehe 3.1.3.4) verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Klonierung einer leporiden Antikörpergenbibliothek standen aus Milzgewebe isolierte B-Zellen von insgesamt fünf weiblichen *New-Zealand-White*-Kaninchen zur Verfügung, die mit Sulfonamid-HCH-Konjugaten immunisiert worden waren. Weiterhin ist die Generation einer AK-Genbibliothek auch aus naiven oder immunisierten B-Zellen aus Blut (Foti *et al.*, 1998), Knochenmark (Lang *et al.*, 1996) und Drüsengewebe (Knight *et al.*, 1984) oder aus monoklonalen Hybridomzellen (Hall *et al.*, 1997) möglich. Durch die in Kapitel 3.3.2 beschriebene Vorgehensweise konnten, unter Verwendung des pASK111R_{ab}-p3-WR, zwei Teilbibliotheken für die leichten (LibSA_{LC}Rb) und schweren Ketten (LibSA_{HC}Rb) und eine vollständige sulfonamidspezifische Bibliothek (LibSARb) in *E.coli* TG1 F⁺ hergestellt werden. Die für die LC- und HC-Ketten kodierenden Gene wurden separat kloniert, um sicherzustellen, dass bei der Klonierung keine DNS-Fragmente durch vorhandene Schnittstellensequenzen verlorengehen. Die beiden Teilbibliotheken enthielten die für die Antikörperketten kodierenden Gene aller fünf Kaninchen, wobei die Bibliothek LibSA_{HC}Rb eine Mischung der der γ-, μ- und α-Ketten-Gene enthielt, während die Bibliothek LibSA_{LC}Rb aus einem Gemisch der κ- und λ-Ketten bestand. Die Zusammensetzung der Gemische entsprach dem prozentualen Anteil der

Kettensubtypen *in vivo*, um das natürliche AK-Genrepertoire gut imitieren zu können. In anderen Arbeiten werden für jeden AK-Kettensubtyp eine eigene Bibliothek erstellt und die verschiedenen Bibliotheken vor der Selektion kombiniert (Dorfmueller, 2002; Toleikis *et al.*, 2004). Diese Vorgehensweise eröffnet die Freiheit die Zusammensetzung des im *Panning* verwendeten Antikörpergen-Repertoires der Fragestellung anpassen zu können. Für die Selektion eines lipophilen AK-Fragments kann zum Beispiel der Anteil an IgA-Kettengen erhöht werden. Diese Vorgehensweise bietet sich vor allem für die Etablierung naiver Bibliotheken an, aus denen später AK-Fragmente gegen Zielmoleküle mit unterschiedlichen Eigenschaften isoliert werden sollen.

Die durch die oben beschriebene Vorgehensweise erhaltenen Teilbibliotheken wiesen eine Komplexität von $2,14 \times 10^6$ für die HC-Bibliothek und $6,4 \times 10^5$ für die LC-Bibliothek auf. Die vollständige Bibliothek LibSARb bestand aus $6,6 \times 10^6$ Varianten. Die größte bisher beschriebene *batch*-klonierte AK-Bibliothek mit 3×10^{11} unabhängigen Klonen wurde von Sblattero *et al.* (2000) beschrieben. Für chimäre Kaninchen/Human-Bibliotheken wurden Größen von $1,9 \times 10^8$ bis $3,8 \times 10^8$ berichtet (Popkov *et al.*, 2004). Für rein leporide F_{ab} -Fragmente wurden bisher Bibliotheksgrößen von 2×10^7 (Lang *et al.*, 1996), und 2×10^6 (Foti *et al.*, 1998) publiziert. Damit liegen die in dieser Arbeit generierten Bibliotheken genau im Mittel und wurden deshalb als ausreichend groß für die Selektion von sulfonamid-spezifischen AK-Fragmenten erachtet. Auch deshalb, weil die Kombination der Teilbibliotheken theoretisch zu einer Komplexität von 10^{11} F_{ab} -Varianten führt.

Von den erhaltenen Transformanten wurden für jede Bibliothek fünf Einzelkolonien zur Analyse auf den Austausch der naiven Platzhalterketten im RV mit den diagnostischen Schnittstellen untersucht. Im Kontrollgel zeigte sich, dass alle isolierten Phagemide die richtige Gesamtgröße aufwiesen, und es sich bei zwei der fünf Klone der LibSA_{HC}Rb um Religanden mit der naiven schweren Kette handelte. Das Vorkommen von Phagemiden mit trunktierten Ketten in der Teilbibliothek LibSA_{LC}Rb und damit später in der vollständigen Bibliothek LibSARb wurde mit beiden Untersuchungen nicht erfasst. Wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben wird, haben diese Phagemide auf Grund ihrer Größe und dem Fehlen einer Kette einen Wachstumsvorteil und reichern sich während des nachfolgenden *Pannings* an. Im Nachhinein kann festgestellt werden, dass die Anzahl von je fünf analysierten Transformanten zu gering ist, um eine verlässliche statistische Aussage über den Erfolg der Ligation zu machen. Auch kann die durchgeführte funktionelle Analyse der Bibliothek mittels *Western Blot*, die notwendige genomische Analyse nicht ersetzen, nur ergänzen. Es wird daher empfohlen, die Analyse auf eine repräsentative Anzahl von mindestens 10–20 Einzelkolonien auszuweiten. Ideal wäre eine Genanalyse mittels Sequenzierung, da hierdurch zugleich eine Aussage über die Variabilität der Gene gemacht werden kann. Eine kostengünstige Alternative ist die Durchführung eines *Bst*NI-Fingerprintings. Diese Methode wurde zur initialen Evaluierung von mittels *Phage Display* isolierten scFv entwickelt (Marks *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1998) und hat sich in anderen Arbeitsgruppen vielfach bewährt.

4.3.2. PHAGE DISPLAY MIT DEN GENERIERTEN KANINCHEN-BIBLIOTHEKEN

Für das monovalente *Phage Display* der Gesamtbibliothek (Abbildung 27, Seite 81) wurden *E. coli*-Zellen des Amber-Suppressor-Stammes TG1 F^+ durch Elektroporation mit den rekombinanten Phagemiden transformiert. Durch Superinfektion der Transformanten mit M13KO7-Helferphagen und anschließende Induktion des *tet*-Promotors zur Genexpression wurden

Phagenpartikel produziert, die Varianten von F_{ab} -Fragmenten funktionell auf ihrer Oberfläche präsentierten (Abbildung 29 und Abbildung 30, Seite 86) und gleichzeitig das jeweilige Phagemid im einzelsträngigen Genom enthielten. Auf Grund der langen Expressionszeit wurden die Phagenpartikel vom bakteriellen Periplasma in den Kulturüberstand sekretiert. Die nachfolgende Affinitätsanreicherung der Phagenpartikel über das Antigen ist mit der klonalen Selektion *in vivo* gleichzusetzen. Im Selektionsvorgang, dem *Panning* (Hust & Dübel, 2005b), wurden die F_{ab} -tragenden Phagen mittels der auf Mikrotiterplatten immobilisierten Hapten-Konjugate SA1-OVA/SA1-ConA und SA2-BSA/SA2-ConA von den nicht bindenden Phagen getrennt und in einem zur Affinitätschromatographie analogen Schritt angereichert (siehe 2.2.2.4). Für das *Panning* können auch Polystyrol-Gefäße eingesetzt werden. Als weitere Beispiele für die Selektion können, die Bindung an biotinyliertes Antigen in Lösung, gefolgt von der Isolation mittels streptavidinbeschichteten magnetischen Partikel, die Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) oder die Affinitätschromatographie mit antigenbeschichteten Säulen genannt werden (Übersicht von Bradbury *et al.*, 2003a). Ein Nachteil des *Pannings* ist die Anwesenheit von unspezifischen Klonen in der positiven Fraktion. Um diesen Anteil an unerwünschten Phagen zu reduzieren, wählten Kramer & Hock (1996a) die immunmagnetische Separation. Hierbei wurden der Kulturüberstand mit haptenbeschichteten, paramagnetischen Partikeln inkubiert und die gebundenen Phagen über Magnetismus aus der Lösung entfernt. Auch die Selektion von Bindern über Biosensoren z.B. BIAcore ist möglich (Malmberg *et al.* 1996). Diese Methode hat außerdem den Vorteil, dass sie auch gleichzeitig die kinetischen Daten über die erhaltenen rekombinanten Phagen liefert. Derselbe Informationsgehalt kann auch über die *Phage Display mediated immuno PCR* (Guo *et al.*, 2006) erzielt werden.

Als ein wichtiger Aspekt in der Selektion von rekombinanten Antikörpern aus haptenspezifischen Antikörperbibliotheken muss das im *Panning* und *Screening* eingesetzte Hapten-Konjugat angesehen werden. Jung *et al.* (1989) und Manclús *et al.* (1996) wiesen auf die Schwierigkeiten bei der Synthese von geeigneten Haptenen und deren Auslösen einer ausreichenden Immunantwort bei der Synthese von monoklonalen Antikörpern hin. Das ist auch auf rekombinante AK, die aus B-Zellen generiert werden, zu übertragen. Auf Grund der äußerst feinen Toleranz in der Affinität eines AKs zu seinem Zielmolekül ist es wichtig, rekombinante AK zu produzieren, die möglichst genau die Bindungstaschen der nativen AK imitieren (Ward *et al.*, 1993). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit für jedes Hapten (Sulfapyridin oder Sulfacetamid) drei Konjugate mit verschiedenen Trägerproteinen und Linker-Eigenschaften verwendet. Dadurch sollte die Anreicherung von linker- oder trägerproteinspezifischen Phagen ausgeschlossen werden. Die für die Immunisierung benutzten Konjugate mit dem Trägerprotein HCH wurden nicht für die Selektion oder *Screening*-Tests verwendet. Zusätzlich wurden für die *Panning*- und *Screening*-Experimente abwechselnd je zwei Konjugate mit unterschiedlichen Trägerproteinen benutzt. Durch Reinfektion der TG1 F^+ -Bakterien mit den F_{ab} -assoziierten Phagen wurden die selektierten sulfonamidspezifischen F_{ab} -Gene gerettet. Die Prozedur des *Pannings* kann mehrere Male wiederholt werden, evtl. auch unter Einsatz von geringeren Antigenmengen (Hall *et al.*, 1997), um möglichst hochaffine Phagen zu isolieren. Eine andere Methode, die spezifischen Gene zu isolieren, ist die Elution der rekombinanten Phagen mit dem Analyten. Yuan *et al.* (1997) verwendeten hierfür freies Mykotoxin Zearalenon. Nach jeder Runde wurden die im *Panning* erhaltenen Phagenpräparationen titriert, um eine Anreicherung zu dokumentieren.

4.3.2.1. SELEKTION MIT DER LIBSARb

Mit dem im Labor vorliegenden Standardprotokoll (Kramer *et al.*, 1998) konnte aus der LibSARb nach vier *Panning*-Zyklen bei beiden Haptenen keine Anreicherung von bindungsaktiven Varianten dokumentiert werden.

Die Technologie des *Phage Displays* entfaltet ihr Potential zur zielgerichteten Selektion hochaffiner phagenpräsentierender F_{ab}-Fragmente vor allem durch die Möglichkeit, die Wasch- und Elutionsprotokolle individuell an das Antigenmaterial anpassen zu können (Tordsson *et al.*, 1997). Deshalb wurde die vierte *Panning*-Runde zu den Bedingungen der dritten wiederholt und auf die Konjugate mit dem Trägerprotein ConA gewechselt. Für das Konjugat SA2 zeigte sich nach der Wiederholungsrunde eine Anreicherung um den Faktor fünf. Bei den Phagen, die gegen das Hapten SA1 selektiert worden waren, war hingegen keine Anreicherung sichtbar. Ein Ausbleiben einer Anreicherung muss nicht zwangsläufig auch einen *Panning*-Misserfolg bedeuten, da auch andere limitierende Faktoren wie zum Beispiel die Bindungsaffinität oder die Effizienz der Phagenproduktion einen großen Einfluss nehmen können (Coomber, 2002). Um festzustellen, ob der Grund für die geringe bzw. ausbleibende Anreicherung auf einen der genannten limitierenden Faktoren zurückzuführen war, wurden zwischen 88 und 176 Einzelkolonien pro Hapten aus jeder der vier durchgeführten *Panning*-Runden im *Screening*-ELISA auf SA1- bzw. SA2-spezifische Bindung und Verdrängung analysiert. Da *E. coli* TG1 F in ausreichendem Maße das *Amber-Stopp-Codon* zwischen HC und GenIII erkennen kann (ca. 10 %), ist die Synthese von löslichen Fragmenten parallel zu dem Fusionsprotein möglich. Somit konnte bei dieser Vorgehensweise ein Arbeitsschritt eingespart werden, da die Infektion eines Nicht-Suppressor-Stammes mit den rekombinanten Phagen nicht zwingend nötig war (Kramer & Hock, 1996b). Andere Arbeitsgruppen bevorzugen hingegen die Verwendung eines *E. coli*-Nicht-Suppressor-Stamms wie HB2151 zur Produktion von löslichen Fragmenten (Yuan *et al.*, 1997; Schlebusch *et al.*, 1997; Cummings *et al.*, 1998), da hierdurch eine größere Menge an F_{ab}-Fragmenten für Analysen erhalten wird. Das *Screening* der exprimierten F_{ab}-Fragmente erfolgte sowohl nach Bindung als auch nach Verdrängung über die Hapten-Konjugate SA2-BSA und SA1-OVA (siehe 2.2.2.6). Durch die Doppelanalyse sollten falsch-positive Signale reduziert werden. Von den 890 analysierten Klonen wiesen im *Screening*-ELISA insgesamt 35 Klone für das SA1-Konjugat und 30 Klone für das SA2-Konjugat eine ausreichende Verdrängung auf.

Die statistische Auswertung der Daten ergab, dass bei Hapten SA2 die meisten Positiven in der ersten Runde nachweisbar waren, während sie in der zweiten Runde anscheinend nicht mehr angereichert werden konnten. Der Anstieg der eluierten Phagen (Tabelle 26, Seite 89) nach der vierten Runde spiegelte sich nicht im *Screening*-ELISA wider. Damit muss die Anreicherung spezifischer Phagen angezweifelt werden. Bei Hapten SA1 waren die meisten Positiven in der zweiten Runde nachzuweisen und verloren sich in den nachfolgenden *Panning*-Runden. Daraus konnte geschlossen werden, dass das verwendete Selektionsprotokoll zu stringent war und die beginnende Anreicherung, angedeutet durch die Anzahl an im *Screening*-ELISA ermittelten Bindern, durch die Selektionsbedingungen zunichte gemacht wurde. Wegen dieser Vermutung wurden die *Panning*-Protokolle abgeändert. Statt das *Panning* mit der Bibliothek LibSARb zu wiederholen, sollten die Gene der zehn SA1 Klone, die die höchste Verdrängung aufwiesen, *geschuffelt* werden (Harayama, 1998), und einem neuen *Panning* mit dem angepassten Protokoll unterzogen werden, da man sich hiervon in kürzerer Zeit eine erfolgreiche Selektion versprach.

Weitere Untersuchungen der 35 positiv selektierten SA1-Klone durch *Screening*-ELISA und Kontrollrestriktionen ergab, dass die aussichtsreichsten Klone Phagemide aufwiesen, die um ca. 1 kb zu klein waren und nur noch fragmentarische Stücke der leichten und schweren Kette vorhanden waren. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden stichprobenartig die vier Klone SA1 1, SA1 19, SA1 27 und SA1 31 sequenziert. Bei den Klonen 19 und 31 kam es in der ersten Reaktion zu einem völligen Sequenzabbruch. Der Grund wurde darin vermutet, dass Schleifenstrukturen der *Inserts* stabile Sekundärstrukturen ausgebildet hatten, welche den Sequenzabbruch auslösten. Unter Reaktionsbedingungen gegen stabile Sekundärstrukturen konnte die Sequenzierung erfolgreich durchgeführt werden. Der Sequenzvergleich der vier Klone bestätigte das Fehlen der beiden Antikörperketten. Die beiden Ketten kamen gar nicht oder nur noch fragmentarisch vor (Nukleotid-Sequenzen siehe Anhang B5). Unter anderem enthielten sie ein 57 bp langes Stück mit den Schnittstellen *NcoI* und *KpnI*. Diese Sequenzen lagen im Leserahmen und führten zu Fusionspeptiden aus dem rbp-Signalpeptid und Peptiden, die die ersten sechs N-terminalen und die letzten acht C-terminalen Aminosäuren von leichten Kaninchen Antikörperketten umfassten (siehe *Alignment* Abbildung 33, Seite 92). Eine Ausnahme bildete Klon SA1 27 der zusätzlich für ein Fusionsprotein aus *ompA* und einem unbekanntem Protein kodierte (siehe Anhang B5).

Nachgeschaltete Analysen der Bibliothek LibSARb konnten aufzeigen, dass bereits nach dem Austausch der naiven Schwereketten gegen die HC aus der Teilbibliothek ca. 10 % an Phagemiden mit fragmentarischer LC vorhanden waren. Diese Klone wurden dann bei den Untersuchungen mit den diagnostischen Schnittstellen übersehen, da die Gelbilder auf ein Ausbleiben der Restriktion mit *NheI* und *SacI* hin und nicht auf die Größe der Vektoren hin analysiert wurden. Additiv wurden offenbar im Laufe der Selektionsrunden auch die HC-Ketten deletiert. Durch diese Erfahrung ist dringend dazu raten, die Untersuchung nicht im Doppelverdau mit beiden diagnostischen Enzymen durchzuführen, sondern jedes Enzym mit einer weiteren in den Vektoren vorliegenden Endonuklease-Schnittstelle zu kombinieren. Die Ursachenanalyse für die LC-Mangel-Phagemide führte zurück zur Teilbibliothek für die Leichtketten LibSARb_{LC}. Die 10 % der fragmenthaltigen Phagemide waren direkt bei deren Klonierung entstanden. Es wurden zwei Ursachen hierfür ermittelt: Erstens kommen die Endonuklaeaseschnittstellen *KpnI* und *NcoI* zu 64 % bzw. zu 17 % in den Leichtketten des λ -Subtyps vor (Tabelle 17, Seite 65). Der Anteil an λ -Ketten im Ig-Repertoire für Leichtketten entspricht zwischen 5–10 % (Mage *et al.*, 2005), damit kann mit bis zu 8 % Verlust bei Restriktionen eines physiologischen κ/λ -Gemischs gerechnet werden. Bei der Auswahl der Schnittstellen wurde dieser Verlust als vertretbar angesehen. Auch andere Arbeitsgruppen nehmen durch die Wahl ihrer Endonuklaeaseschnittstellen Verluste bei der Restriktion in Kauf (Lang *et al.*, 1996). Zweitens mag eine unzureichende Abtrennung von Primern und/oder Restriktionsüberhängen bei der Aufreinigung der PCR-Ansätze und Amplifikatverdaue mittels der Microconeinheiten eine Ursache sein. In beiden Fällen kann die Aufreinigung der Amplifikate über Elektrophorese mit hochprozentigen Agarosegelen zur Abtrennung kleinerer DNS-Fragmente eine Lösung für das Problem darstellen.

Offenbar handelt es sich bei den isolierten Phagemiden um *Escape*-Mutationen der Bakterien. Diese können durch übermäßigen Selektionsdruck während des bakteriellen Wachstums auftreten. Ursache hierfür können das verwendete Antibiotikum (Georgiou *et al.*, 1997), die unzureichend regulierte Expression eines Fremdproteins (Bradbury *et al.*, 2003) oder die Größe des zu verpackenden Phagengenoms sein (Barbas *et al.*, 2001). Je kleiner das Phagengenom ist,

desto schneller wird es verpackt und die Phagenpartikel sekretiert. Damit erhalten solche Phagen einen Selektionsvorteil gegenüber Phagenpartikel, die das Volllängen-Phagemid enthalten. Die steigende Anreicherung der fragmenthaltigen Phagemide im Laufe der vier *Panning*-Runden sowie der additive Verlust der HC deutet auf einen Selektionsdruck aus der Kombination der Antibiotika Kan und Cm sowie des Selektionsvorteils durch die bereits vorhandenen fragmenthaltigen Phagenpartikel hin. Als Lösungsansatz wurde nachfolgend der Selektionsdruck durch Erhöhung der Haptenmenge, Reduktion der Waschschritte und der Verwendung von nur noch einem Antibiotikum während der Phageninfektion gearbeitet. Die Auswirkungen werden in Kapitel 4.3.2.2 erörtert. Um einen Selektionsvorteil kleinerer Phagemide vorzubeugen, sollten zukünftige Bibliotheken nicht mehr mit Microcon aufgereinigten Amplifikaten erstellt und vor dem Einsatz durch die Analyse einer ausreichend großen Menge an Kolonien auf die Volllängen der Inserts überprüft werden.

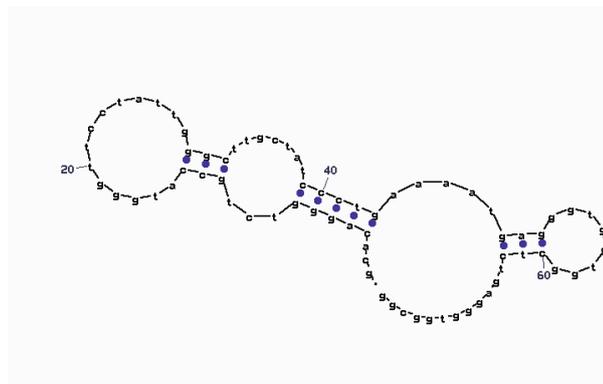


ABBILDUNG 39: MIT DEM PROGRAMM MFOLD VORHERGESAGTE SEKUNDÄRSTRUKTUR FÜR DIE DNS VON KLON SA1 19

Da die isolierten Fragmente jedoch reproduzierbare Verdrängungen bei den drei ELISA-Messungen ergeben hatten, wurden die Sequenzen über eine Blast-Suche auf mögliche Ähnlichkeiten zu bereits bekannten „bindenden Peptiden“ (de Haas *et al.*, 1998; Dankesreiter *et al.*, 2000, Skerra, 2007) überprüft. Wegen der Anzahl und Verteilung der polaren Seitenketten sowie durch die beiden Cysteinreste in den vier Peptiden könnte es durchaus sein, dass es sich um sogenannte bindende Peptide handelt. Die Aminosäuren Aspartat, Asparagin, Glutamin, Serin und Threonin, die 50 % der Sequenzen ausmachen, sind prädestiniert dafür, Bindungen mit den Amin- und/oder Carboxyresten der verwendeten Sulfonamide auszubilden.

Durch die bei der Sequenzierung vorgefundenen Sekundärstrukturen wurden die Sequenzen auch auf die Möglichkeit überprüft, ob es sich eventuell um Aptamere handeln konnte. Dies ist nicht ganz unwahrscheinlich, da einzelsträngige Phagen-DNS durch Zellyse in das Medium abgegeben wird. Deshalb wurde interessehalber nach Abschluss der Untersuchungen an der vorliegenden Arbeit, mit dem Programm MFOLD, eine Analyse der RNS-Sekundärstruktur für Klon SA1 19 gemacht und mit einer in der Literatur beschriebenen Aptamersequenz (Kim *et al.* 2007) verglichen. Tatsächlich konnte eine geringfügige Übereinstimmung im Übergangsbereich von Singelsequenz zu Peptid gefunden werden. Nach dem Programm MFOLD bilden sich tatsächlich stabile Sekundärstrukturen. Ob diese zur Bindung und Verdrängung der Sulfonamide führen, muss kritisch betrachtet werden, vor allem weil der Nachweis im ELISA über einen gegen Kaninchen-AK gerichteten sekundären AK erfolgte. Die genaue Untersuchung, woher die reproduzierbaren Signale kamen, wäre sicher ein interessantes Aufgabengebiet. Da

weiterführende Untersuchungen von der eigentlichen Zielsetzung wegfürten, den Nachweis für die Funktionalität des neuen Phagemids pASK111R_{ab}-p3-WR mittels Selektion eines funktionellen F_{ab}-Fragments zu erbringen, wurden die Arbeiten mit den Peptidfragmenten nicht weiter verfolgt.

4.3.2.2. SELEKTION MIT LIBSA_{HC}RB

In der Literatur gibt es Hinweise, dass aus Bibliotheken, in denen nur die V_H eine Spezifität zum Antigen aufweist, funktionelle Fragmente mit relativ hohen Affinitäten isoliert werden können (Rini *et al.*, 1992; Kramer *et al.*, 2002a; Im *et al.*, 2006). Da zum Nachweis der Funktionalität des neuen Phagemids die Selektion auch eines weniger affinen AK-Fragments ausreichend würde, wurde ein monovalentes *Phage Display* mit der HC-Teilbibliothek LibSA_{HC}Rb gegen das Sulfonamid-Hapten SA2 durchgeführt, da diese nachweislich beide Ketten in Volllänge aufwiesen. Für die Selektion wurden die Protokolle so angepasst, dass der Selektionsdruck vermindert wurde (siehe 3.3.4.3). In der Literatur finden sich für dasselbe Phagemid oft verschiedene Amplifikations- und *Panning*-Protokolle, abhängig vom verwendeten Antigen und dem Spenderorganismus. Vor allem unterscheiden sich die Protokolle hinsichtlich der Inkubationsdauer vor und nach der Infektion mit Helferphagen sowie dem Zeitpunkt, an dem die Induktion der F_{ab}-/*scFv*-Gene geschieht (Barbas *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2002; Corisdeo & Wang, 2003; Hoogenboom 2005). Dies ist unter anderem auf die speziellen Anforderungen und Bedürfnisse der verwendeten Antigene und der exprimierten AK-Fragmente ebenso wie auf deren Toxizität für den Wirtsorganismus zurückzuführen (Liu *et al.*, 2001; Bradbury *et al.*, 2003; Kirsch *et al.*, 2005). Deshalb ist es nötig, die Bedingungen auf jedes neue Antigen-Antikörper-Paar abhängig vom verwendeten Phagemid und Bakterienstamm einzustellen.

Die Antikörpergenbibliothek wurde wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben in M13KO7-Phagen verpackt, um rekombinante Phagen für ein *Panning* auf SA2 zu erhalten, mit dem Unterschied, dass zur Selektion infizierter Bakterien nur noch das Antibiotikum Kan eingesetzt wurde. Nach der ersten *Panning*-Runde wurde nur ein Phagentiter von 344 cfu/10 ml erreicht, das heißt, von 6×10^{10} eingesetzten Phagen wurden 344 F_{ab}-tragende Phagen nach einer Runde *Panning* gewonnen. Dieser Wert war um das 10fache niedriger als bei Schlebusch *et al.* (1997) mit ca. 10^4 eluierten Phagen nach der ersten Selektionsrunde. Um zu testen, ob es sich dabei um spezifische Klone handelte und nicht um eine Anreicherung von fragmenthaltigen Phagemiden, wurden zehn Kolonien auf die Größe ihrer Plasmide im RV untersucht. Bei acht von zehn Klonen konnten die leichten und schweren Ketten durch Verdau mit *NcoI/KpnI* und *AsiSI/MluI* isoliert werden. Weil die erhaltene Menge an Klonen so überschaubar war, wurden alle im *Screening*-ELISA untersucht. Die Anforderungen für eine Bewertung als positive Reaktion wurden aus Kapitel 2.2.2.6 übernommen. Aus den 344 analysierten Kolonien wurden durch wiederholte *Screening*-ELISAs und DNS-Analysen die drei Klone 1 23, 1 32 und 1 90 für weitere Charakterisierungen ausgewählt.

Um aussagekräftigere Erfahrungswerte für das neue Phagemid zu erhalten, sollten weitere Selektionen gegen Antigene verschiedener Größen und Charaktere (Proteine, Peptide) durchgeführt werden. Bei diesen Selektionen ist dringend zu raten, eine stringente Überwachung auf *Insert*-Verluste der Phagemide durchzuführen, da sich auch in der Selektion mit der LibSA_{HC}Rb *Escape*-Mutationen andeuteten. Die erfolgreiche Isolierung von F_{ab}-Fragmenten aus Kaninchen scheint sehr stark vom Allotyp der verwendeten Versuchstiere abhängig zu sein. So verwendete die Arbeitsgruppe Rader bevorzugt Tiere mit dem Allotyp b9, da sich dieser am

besten für das *Phage Display* eignet (Popkov *et al.*, 2003). Es liegen keine Angaben über den Allotyp der fünf in dieser Arbeit verwendeten Kaninchen vor. Die beobachteten *Escape*-Mutationen könnten also durchaus auf allotypspezifische Toxizität und/oder Faltung der F_{ab} -Fragmente zurückzuführen sein (siehe 1.2.1). Interessant zur Evaluierung dieser Beobachtungen wären Untersuchungen mit etablierten Phagemiden, in welchen die Amp^R gegen eine Cm^R ausgetauscht wird, um zu überprüfen, ob hier ebenfalls über Faltungsprobleme und die Anreicherung von Deletionsmutanten berichtet werden kann. Anbieten würde sich für solche Zwecke das Phagemid pComb3H mit dem leporiden F_{ab} -Fragment gegen KLH (Foti *et al.*, 1997).

Eine weitere Möglichkeit diese Theorie zu überprüfen, wäre der Versuch das Phage Display mit pASK111Rab unter Ko-Expression von Chaperonen durch zu führen. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Kombination der pASK-Phagemide mit dem Vektor pTUM4 (Schlapshy *et al.*, 2006). Bei pTUM4 handelt es sich um ein Plasmid, das für die vier periplasmatischen Chaperone DsbA, DsbC, FkpA und SurA kodiert. Zwei der vier Faltungshelfer (DsbA und DsbC) beeinflussen die Ausbildung von Disulfidbrücken. Mit diesem Plasmid konnten in unserem Labor bereits erfolgreich die Probleme bei Expression von leporiden AK-Fragmenten im Fermenter gemeistert werden (Wiebe, 2008). Das die Expression weiterer Proteine in Form von Faltungshelfern während des Phage Displays trotz der zusätzlichen Belastung für die Bakterien möglich ist, wurde bereits von den Arbeitsgruppen um Söderlind *et al.* (1993), Hayhorst & Harris (1999) und Løset *et al.* (2007) gezeigt.

4.4. CHARAKTERISIERUNG DER F_{AB} -FRAGMENTE

Die generierten sulfonamid-spezifischen F_{ab} -Fragmente SA2 23, SA2 32 und SA2 90 wurden am Computer charakterisiert. Dies setzte die Bestimmung der Nukleinsäureabfolge durch Sequenzierung voraus. Die Nukleinsäuresequenz ermöglichte eine computergestützte Translation in die primäre Aminosäuresequenz, anhand derer die Integrität der drei F_{ab} -Fragmente überprüft wurde. Bei der Sequenzierung mit dem Phagemid SA2 32 zeigte sich wieder eine Verkürzung der leichten Kette zu einer den in Kapitel 3.3.4.2 beschriebenen Peptiden ähnlichen Sequenz, mit dem Unterschied, dass die schwere Kette noch vollständig erhalten war. Da die für die Selektion verwendete Bibliothek LibSA_{HC}Rb keinen Manipulationen im Bereich der leichten Kette unterzogen wurde, die zu einem ligationsbedingten Verlust der Gensequenz führen kann, muss davon ausgegangen werden, dass die Deletion durch die Bakterien selbst verursacht wurde, um dem Wachstumsnachteil durch die eventuelle Toxizität des Fremdproteins zu entgehen (Georgiou *et al.*, 1997; Bradbury *et al.*, 2003a+b). Der Selektionsdruck war in dieser Runde durch den Einsatz von nur noch einem Antibiotikum bereits reduziert (siehe 4.3.2.2). Um eine Anreicherung von *Escape*-Mutanten so gering wie möglich zu halten, sollte das *Panning*-Protokoll in dieser Beziehung weiter optimiert werden. Zum Beispiel könnte die Induktion des Fusionsproteins HC-pIII erst mit der Zugabe des Antibiotikums und nicht mit der Infektion der Helferphagen erfolgen. Diese Vorgehensweise wird bei einigen Arbeitsgruppen bevorzugt (O'Brien & Aitken, 2001). Dies hätte zwei positive Folgen: Erstens sind zum Zeitpunkt der Induktion schon mehr Bakterien durch den Helferphagen infiziert und die Expression des HC-pIII hätte nur mehr einen geringen Einfluss auf die Infektionsrate durch den Helferphagen. Zweitens würde eine eventuelle Toxizität der Kaninchen-Antikörperketten erst zu einem späteren Zeitpunkt zum Tragen kommen. Alternativ könnte über die Menge an *Inducer* (aTc) die Transkription des Fusionsproteins heruntergeregelt werden. Dies wurde in dieser Arbeit nicht ausprobiert, da Erfahrungswerte von Zahn *et al.* (1997) für die Induktion mit 0,2 µg/ml

aTc zu Grunde gelegt wurden. Außerdem sollten konsequent Kontrollen nach jedem *Panning*-Zyklus in Hinblick auf *Insert*-Verluste durchgeführt werden.

Die DNS-Analyse der zwei verbleibenden positiven Klone SA2 23 und SA2 90 bestätigte, dass hier die leichte naive Kette nicht mutiert und vollständig erhalten war. Die Länge der beiden schweren Ketten betrug 684 Basenpaare und sie unterschieden sich in nur vier Basenpaaren (Basenpaare 867, 1096, 1234 und 1298). Die errechnete Gesamtgröße der Moleküle lag bei 48 kDa. Die Basenunterschiede führten zu zwei Aminosäureunterschieden in der V_H und zu einer Differenz in der C_H der schweren Ketten ($AS_4 + AS_{88}$ der V_H und AS_{24} der C_H1 ; siehe *Alignment* Abbildung 36, Seite 96). Alle Unterschiede befanden sich in den Rahmenregionen der jeweiligen Domänen. Demarest *et al.* fanden 2006 heraus, dass Aminosäuresubstitutionen in den Rahmenregionen von Antikörpern vor allem im Bereich der konstanten Regionen zu stabileren und richtig gefalteten Molekülen führen können. Die berechneten Instabilitätsindizes der beiden Moleküle wiesen tatsächlich einen Unterschied zwischen F_{ab} SA2 23 ($II = 31,65$) und F_{ab} SA2 90 ($II = 32,14$) auf. Interessant könnte sein, ob sich diese Differenz auch in der Praxis auf die Moleküleigenschaften der beiden Fragmente auswirkt und sich die Aussage von Demarest bestätigen lässt.

Nach der Translation von LC_{WR} , $HC_{SA2\ 23}$ und $HC_{SA2\ 90}$ in die Aminosäuresequenz erfolgte eine Analyse mit den in der Datenbank IMGT festgelegten Kriterien. Das *Alignment* zeigte, dass die selektierten AK-Fragmente sich in allen Punkten den von der IMGT definierten Regeln für Immunglobulinsequenzen fügen. Alle drei variablen Regionen zeigten eine Übereinstimmung mit den Referenz-Aminosäuren (Abbildung 37, Seite 97). Die im Anschluss durchgeführte Blastrecherche ergab, dass es sich bei beiden Klonen um eine leichte Kette des $\kappa 1$, b4-Allotyps handelt (*Accession No.* D38376 IMGT und K01358). Die schwere Kette von SA2 23 wies eine 89%ige Übereinstimmung mit den variablen Regionen des V_{H1-3} -Allotyps auf (*Accession No.* AF264429), der konstante Teil war mit 99%iger Übereinstimmung dem de12, 14-Allotyp der leporiden schweren Ketten von IgG zuzuordnen (*Accession No.* K00752 IMGT). Bei Klon 90 handelte es sich mit 90%iger Übereinstimmung beim variablen Teil der schweren Kette ebenfalls um einen V_{H1-3} -Allotyp (*Accession No.* AF264511). Der konstante Teil war mit 98%iger Übereinstimmung ebenfalls als IgG identifiziert (*Accession No.* K02532 IMGT).

Die festgestellte strukturelle Integrität der Proteine wurde in Anschluss durch eine bakterielle Expression bestätigt, an die sich die immunologischen Experimente bezüglich der Reaktivitäten und Kreuzreaktivitäten mit Sulfonamid-Derivaten anschlossen. Es wurde jeweils eine Expression in 20-ml-Kulturen für beide Klone durchgeführt (siehe 2.2.3.1). Die erhaltenen und dialysierten periplasmatischen Fraktionen wurden in zwei weiteren unabhängigen Verdrängungs-ELISAs analog zu den *Screening*-ELISAs getestet. Aufgetragen wurden neben den periplasmatischen Fraktionen auch 1:100 000 verdünntes Serum des Tieres #154 als Positivkontrolle. Der Test der beiden Moleküle auf Bindung und Verdrängung im ELISA zeigte eindeutig eine Bindungsreaktion der Fragmente an das Hapten-Konjugat SA2-ConA. Die Absorptionen gegenüber der Kontrolle mit dem Trägerprotein ConA waren um das 1,5–5fache höher (siehe 3.3.4.1). Der prozentuale Vergleich zeigt außerdem in den beiden unabhängigen Experimenten immer das gleiche Verhältnis der Verdrängung zur Positivkontrolle. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den beiden isolierten F_{ab} -Fragmenten SA2 23 und SA2 90 mit großer Wahrscheinlichkeit um funktionelle und sulfonamidspezifische AK-Fragmente handelt. Durch die Verwendung von TG1 F^+ -Bakterien als Kontrolle kann der Einfluss von Matrixeffekten,

hervorgerufen durch andere periplasmatische Proteine, auf die Absorptionen ausgeschlossen werden.

Für die noch ausstehenden immunologischen Analysen bezüglich der Spezifität und der Kreuzreaktivitäten der F_{ab} -Fragmente SA2 23 und SA2 90 sollten weitere Expressionsexperimente in dem leporiden Hochzell-dichte-Fermentationssystem von Wiebe (2008) durchgeführt werden. Dieses System wurde in unserem Labor als Ergänzung zu dem in dieser Arbeit vorgestellten Phagemid-System entwickelt und optimiert. Hierbei handelt es sich um einen zur Hochzell-dichte-Fermentation leporider AK entworfenen Vektor mit Ko-Expression von periplasmatischen Faltungshelfern. In Bezug auf Transkriptions- und Translationseffizienz weitgehend optimierte Expressionssysteme können die Ausbeute an rekombinanten Proteinen effizient steigern, da hierbei in erster Linie die Aminosäuresequenz des zu synthetisierenden Proteins die Ausbeute bestimmt. Dabei spielen besonders die Sekretions- und Faltungseffizienz sowie die Stabilität des rekombinanten Genproduktes, dessen Empfindlichkeit gegenüber Proteasen und dessen Toxizität für die Wirtszelle eine Rolle. Von Nachteil ist insbesondere eine Tendenz von Fremdproteinen zur Aggregation in *E. coli*. Für die Aggregation von Makromolekülen sind vor allem hydrophobe Wechselwirkungen von Intermediatzuständen der Faltung verantwortlich (Zettlmeissl *et al.*, 1979). Bei diesen Vorgängen spielt unter anderem das als *Molten Globule* (Creighton, 1997) bezeichnete Zwischenprodukt der Proteinfaltung eine Rolle. Andererseits kann Aggregation auch bei nativ gefalteten Proteinen auftreten, wenn diese hydrophobe Regionen auf der Oberfläche präsentieren. Proteine, die isoliert von ihrem biologischen Kontext vorliegen, weisen in manchen Fällen ausgeprägt hydrophobe Bereiche auf, welche Interaktionsstellen zu einem natürlichen Bindungspartner darstellen. So musste beispielsweise bei Immunglobulin-Fragmenten eine deutliche Tendenz zur Aggregation festgestellt werden, bei denen die bei vollständigen Antikörpern dem Lösungsmittel nicht zugänglichen Kontaktstellen der leichten und schweren Kette zur Assoziation und unspezifischen Adsorption sowohl im Periplasma von *E. coli* als auch *in vitro* führten (Skerra, 1989; Skerra, 1991b; Glockshuber *et al.*, 1990; Davies & Riechmann, 1995).

Vorversuche zur gentechnischen Herstellung der selektierten F_{ab} -Fragmente SA2 23 und SA2 90 in dem Non-Suppressor-Stamm JM83, unter Verwendung des Phagemids pASK111R_{ab}-p3 im 1 l Maßstab (Daten nicht gezeigt) erbrachten, folgende Erkenntnisse: Die Reinigung der exprimierten F_{ab} -Fragmente über das C-terminal anhängige His₆-Motiv und dessen Affinität zu Nickelionen war problematisch. Auf den Schreiberdruckungen des Fraktionskollektors zeigten sich für beide Klone nach dem Anlegen des Gradienten drei Ausschläge, von denen wegen ihrer geringen Höhe keiner eindeutig der unspezifischen Proteinfraktion zugeordnet werden konnte. Um zu klären, in welchem Ausschlag sich die eluierten F_{ab} -Fragmente befanden, wurden die Fraktionen der drei Signale in einem Verdrängungs-ELISA auf ihre Reaktivität getestet. Es ergaben sich Verdrängungssignale bei beiden Klonen in den Fraktionen, die unmittelbar nach Anlegen des Gradienten erhalten wurden. Der erste Ausschlag ist der, in dem hauptsächlich die unspezifisch gebundenen Proteine zu erwarten gewesen wären.

Zur Ursachenanalyse wurde eine Kontrolle der Proteinexpression mit Gesamtzelllysat nach 0 h und 3 h Expression mittels *Western Blot* durchgeführt. Diese ergab, dass nach 3 h bei beiden Klonen eine 37 kDa große Bande mit Ziege<Kaninchen F_{ab} >POD nachgewiesen werden konnte. Wurde derselbe Blot mit Maus<His₆>POD entwickelt, ergab sich keine Bande (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auf ein Problem mit dem His₆-Tag schließen, eventuell durch die Faltung der

leporiden Antikörperketten hervorgerufen. Foti *et al.* (1998) berichteten in ihrem Paper „*Rabbit monoclonal Fab derived from a phage display library*“ von der selben Problematik bei der Aufreinigung eines in XL1 *Blue* exprimierten leporiden anti-KLH-F_{ab}-Fragments. Auch diese Arbeitsgruppe konnte dieses F_{ab}-Fragment nicht ausreichend über IMAC aufreinigen, obwohl für die Expression ein reiner Expressionvektor verwendet wurde. Sie führten diese Beobachtung auf die Unzugänglichkeit des His₆-Anhängsels auf Grund der Proteinfaltung zurück. Dies würde auch die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Differenzen zwischen rechnerischer (48 kDa) und tatsächlicher Laufgröße (37 kDa) der Moleküle im *Western Blot* erklären (Abbildung 29, Seite 86). Daten weiterer Arbeitsgruppen (Lang *et al.*, 1996) lassen darauf schließen, dass die Expression von rekombinanten leporiden F_{ab}-Fragmenten nicht als trivial angesehen werden kann, und unterstreichen die Notwendigkeit, die Expression in einem etablierten und kontrollierbaren Expressionssystem durchzuführen. Da sowohl die in der vorliegenden als auch die in der Arbeit von Foti *et al.* (1998) exprimierten F_{ab}-Fragmente, trotz der mangelhaften Aufreinigung, reproduzierbare Reaktionen im ELISA aufwiesen, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass für die Größendifferenz die Faltung der konstanten Domäne verantwortlich ist. Diese Möglichkeit kann durch die Expression in dem optimierten, für Kaninchen-F_{ab}-Fragmente geeigneten Expressionssystem, untersucht werden. Sollte der Grund für die Größendifferenz in einer sequenzbedingten Faltung der konstanten Domänen zu finden sein, kann durch die Substitution einzelner Aminosäure-Seitenketten die Faltung positiv beeinflusst werden und eventuell zu einer erhöhten F_{ab}-Fragment-Ausbeute führen (Nieba *et al.*, 1997; Duenas *et al.*, 1995b).

Zusammenfassend wird trotz der beschriebenen Größendifferenz davon ausgegangen, dass mit Hilfe des *Phage Display* unter Verwendung des neuen Phagemids pASK111R_{ab}-p3-WR funktionelle F_{ab}-Fragmente selektiert wurden, da sowohl die DNS-Analyse als auch die Überprüfung der F_{ab}-Fragmente im ELISA deren leporide Herkunft, vollständige Kettenlänge und deren Funktionalität bestätigten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Intention dieser Arbeit war, die rekombinante Antikörpertechnologie durch Berücksichtigung der Besonderheiten des Kaninchen-Immunsystems für die Umweltanalytik zu nutzen und weiter auszubauen. Für die Umweltanalytik werden die Vorzüge von Kaninchen-Antikörpern bis jetzt nur in Form von polyklonalen Seren genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein verbessertes *E. coli* Phage Display-System für die Umweltanalytik entwickelt. Anforderungen an das neue System waren die wahlweise Anwendbarkeit auf murine und leporide Antikörpergene. Dieses Design kombiniert die bewährten Eigenschaften bisheriger Phagemide mit der Möglichkeit, verschiedene Display-Formate durchführen zu können.

Folgende Ansprüche wurden an das neue System formuliert:

- Verwendung des streng regulierbaren *tet*-Promotor/Operator-Systems
- Verwendung des vollständigen viralen pIII-Hüllproteins als Fusionspartner
- Dicistronischer Aufbau der *Cloning Site* mit zwei verschiedenen Signalsequenzen
- Kassettensystem der *Cloning Site* zum leichten Austausch von AK-Genen und/oder Affinitätsanhängseln
- Insertion eines *Amber-Stopp-Codons* zwischen Strukturgen und GenIII zur alternativen Produktion von löslichen F_{ab}-Fragmenten und Fusionsproteinen
- Verwendung von Chloramphenicol-Acetyltransferase als Resistenzmarker, um den Selektionsdruck zu erhöhen und den Vektorverlust zu verringern

Um die oben aufgelisteten Bedingungen umzusetzen, wurden ausgehend vom Expressionvektor pASK85-K411B vier Phagemide hergestellt, die sich in den konstitutiv exprimierten Antibiotikaresistenzen und/oder der verwendeten *Cloning Site* unterscheiden.

Zuerst wurde der Expressionsvektor pASK85-K411B durch Insertion des GenIII, das für das Phagenhüllprotein pIII kodiert, in das Phagemid pASK85-p3-K411B überführt und dessen Funktionalität im ELISA und *Western Blot* bestätigt.

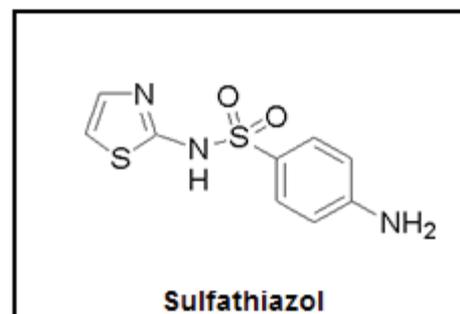
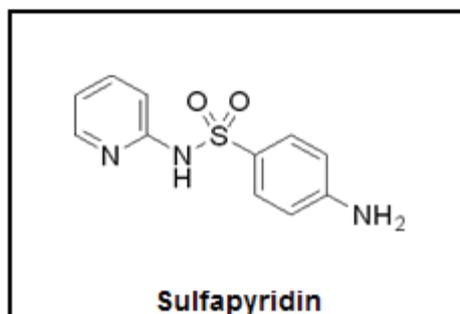
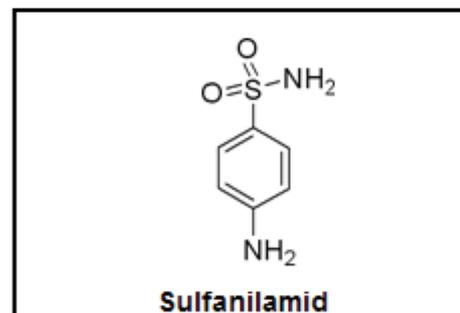
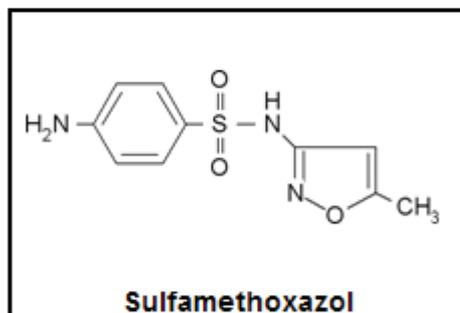
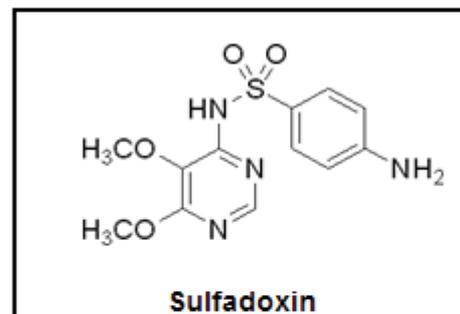
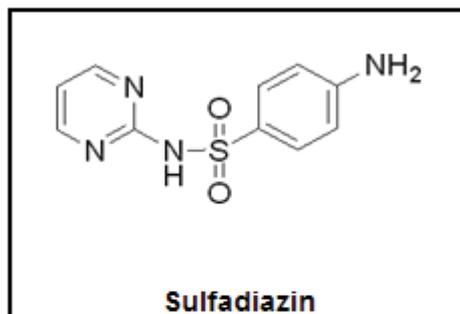
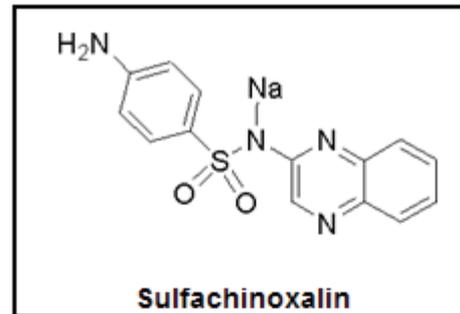
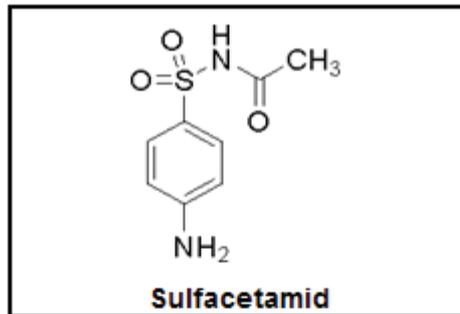
Um ein für Kaninchen-Antikörper geeignetes System zu erhalten, wurden nachfolgend mittels Datenbank-Recherche 40 Primer zur Amplifikation von Immunglobulinen aus Kaninchen aller Allotypen entworfen. Hierbei wurde beachtet, dass in der Umweltanalytik neben IgG auch andere Antikörperklassen, wie IgA und IgM, für den Einsatz in verschiedenen Matrices von Interesse sein können. Die Primer wurden erfolgreich getestet und durch die Etablierung der Amplifikationsprotokolle verifiziert. Die Informationen der Datenbankrecherche wurden zusätzlich für das Design einer geeigneten *Cloning Site* verwendet. Unter anderem wurden die Schnittstellen so ausgewählt, dass sie möglichst selten in leporiden Antikörpergenen vorkommen und die Peptidaseschnittstellen der Signalsequenzen nicht verändern. Die *Cloning Site* wurde als Kassettensystem derartig gestaltet, dass ein Austausch von AK-Fragmenten oder Affinitätsanhängseln und somit die Anwendung von verschiedenen Analyten und Reinigungsarten erfolgen konnte.

Im weiteren Vorgehen wurde die Kasette des F_{ab}-K411B im pASK85-p3-K411B durch die neue *Cloning Site* (R_{ab}CS) ersetzt (pASK85R_{ab}-p3). Um die Vorteile verschiedener Resistenzmarker überprüfen zu können, wurde die Ampicillinresistenz gegen einen Chloramphenicol-Marker ausgetauscht. Dies geschah über einen Austausch der Vektorrücken von pASK85R_{ab}-p3 und pASK85-p3-K411B mit dem Vektorrücken des pASK111 (pASK111R_{ab}-p3 und pASK115-p3-

K411B). Im Anschluss wurden naive, leporide leichte und schwere Ketten als Platzhalter in die $R_{ab}CS$ integriert und diese mit diagnostischen Schnittstellen markiert (pASK111 R_{ab} -p3-WR-Reihe). Um die Funktionalität testen zu können, wurde das F_{ab} -Fragment K411B wieder in die neue *Cloning Site* des Phagemids pASK111 R_{ab} -p3-WR inseriert (pASK111 R_{ab} -p3-K411B). Die drei entstandenen Phagemide pASK85-p3-K411B, pASK115-p3-K411B und pASK111 R_{ab} -p3-K411B wurden auf Wachstum, Expression von F_{ab} -K411B und F_{ab} -K411B-pIII und Höhe der Phagentiter verglichen. Durch die Vergleiche stellte sich heraus, dass sich alle drei Vektoren für das *Phage Display* mit murinen Antikörpergenen eignen, wobei sich die Phagemide mit dem Chloramphenicol-Marker durch eine bis zu Faktor 65 höhere Menge an rekombinanten Phagenpartikeln auszeichneten.

Zuletzt wurde überprüft, ob das neue Konstrukt pASK111 R_{ab} -p3-WR den Eigenheiten leporider Antikörpergene Rechnung trägt und für *Phage Display* mit Immunglobulinen aus Kaninchen verwendet werden kann. Dies beinhaltete die Selektion zweier sulfonamidspezifischer leporider F_{ab} -Fragmente (F_{ab} SA2 23 und F_{ab} SA2 90) aus einer dafür generierten Antikörper-Bibliothek über *Phage Display*. Die selektierten Klone wurden sequenziert, virtuell analysiert und auf Verdrängung von Sulfonamiden im kompetitiven ELISA untersucht. Dadurch konnte die Funktionalität des pASK111 R_{ab} -p3-WR mit leporiden Immunglobulinen aufgezeigt werden.

Somit wurden in dieser Arbeit drei Phagemide für das *Phage Display* mit murinen Antikörpergenen (pASK85-p3, pASK115-p3 und pASK111 R_{ab} -p3) und zwei Phagemide für leporide Antikörpergene (pASK85 R_{ab} -p3 und pASK111 R_{ab} -p3) kloniert. Damit liegen nun für jede Spezies zwei Phagemide vor, die sich nur in der konstitutiv exprimierten Antibiotikaresistenz unterscheiden und dem Benutzer je nach Anforderung die Wahl zwischen den beiden Systemen lassen. Die Grundprotokolle für das *Phage Display* mit den neuen Phagemiden wurden verifiziert und können als Ausgangspunkt für weitere Selektionen benutzt werden. Durch weitere Erfahrungen mit dem System sollten die Protokolle weiter optimiert werden. In der Regel dauert die Optimierung eines *Phage Display*-Systems bis zur vollständigen Ausreifung mehrere Jahre (Hoogenboom, 2005; Barbas *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden 40 allotypspezifische Primer zur Amplifikation von leporiden Immunglobulinen entworfen und die korrespondierenden Amplifikationsprotokolle etabliert. Die Funktionalität des Systems wurde durch die Selektion von zwei F_{ab} -Fragmenten bestätigt.

ANHANG A: STRUKTURFORMELN UND VEKTOREN-ÜBERSICHT**A.1 SULFONAMIDE MIT STRUKTURFORMELN**

A.2: EIGENSCHAFTEN DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN UND NEU KONSTRUIERTEN PHAGEMIDE UND VEKTOREN

Plasmide	Eigenschaften	Kloniert bzw. zur Verfügung gestellt von
pASK85	<i>tet^R</i> ⁶ ; ompA-V _H -C _{H1-γ1} -His ₆ , phoA-V _L -C _{MUK} ; <i>bla/tetR</i> als Transkriptionsfusion	Prof. Dr. A. Skerra ⁶
pASK85-K411B	wie pASK85; mit ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ , phoA-V _L (K411B)-C _{LK}	PD. Dr. K. Kramer ⁷
pASK85-K411B.1	wie pASK85; mit ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ , phoA-V _L (K411B)-C _{LK} (mit <i>SacII</i> durch Punktmutation AS ₁₆₃₉)	Carolin Schüller ⁷
pASK85-K411R.2	wie pASK85; mit ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ , phoA-V _L (K411B)-C _{LK} (mit <i>SacI</i> durch Punktmutation AS ₂₁₃)	Carolin Schüller
pASK85-K411B.3	wie pASK85; mit ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ , phoA-V _L (K411B)-C _{LK} (ohne <i>KpnI</i> in LC durch Punktmutation AS ₁₁₀₁)	Antje Pegel ⁷ , Carolin Schüller
pASK85-p3-K411B	wie pASK85; mit ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ , phoA-V _L (K411B)-C _{LK} -pIII	Carolin Schüller
pASK85R _{ab} -p3	wie pASK85; mit R _{ab} CS; rbp-, ompA-His ₆ -pIII	Carolin Schüller, Julia Wiebe ⁷
pASK111	<i>tet^R</i> ⁶ ; ompA-PL-strep; <i>cat/tetR</i> als Transkriptionsfusion	Prof. Dr. A. Skerra
pASK111R _{ab} -p3	wie pASK111; mit R _{ab} CS; rbp-, ompA-His ₆ -pIII	Julia Wiebe, Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-WR(LC)	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-His ₆ -pIII	Julia Wiebe
pASK111R _{ab} -p3-WR2	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _F -C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII	Julia Wiebe
pASK111R _{ab} -p3-WR5	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _F -C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII	Julia Wiebe
pASK111R _{ab} -p3-WR13	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _F -C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII	Julia Wiebe
pASK111R _{ab} -p3-WR2/5/13.1	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _F -C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII (mit diagnostischer Schnittstelle <i>NheI</i> durch Punktmutation AS ₃₁₃ in LC)	Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-WR2.12	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _F -C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII (mit diagnostischen Schnittstellen <i>NheI</i> in LC und <i>SacI</i> durch Punktmutation AS ₁₃₈₇ in HC)	Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-WR5.12	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _F -C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII (mit diagnostischen Schnittstellen <i>NheI</i> in LC und <i>SacI</i> durch Punktmutation AS ₃₅₉ in HC)	Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-WR13.12	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _F -C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII (mit diagnostischen Schnittstellen <i>NheI</i> in LC und <i>SacI</i> durch Punktmutation AS ₁₃₈₁ in HC)	Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-K411B(HC)	wie pASK111; mit rbp-V _L -C _{op} , ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII	Antje Pegel, Carolin Schüller
pASK111R _{ab} -p3-K411B	wie pASK111; mit rbp-V _L (K411B)-C _K -ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ -pIII	Antje Pegel, Carolin Schüller
pASK115-p3-K411B	wie pASK111; mit ompA-V _H (K411B)-C _{H1-γ1} -His ₆ , phoA-V _L (K411B)-C _{LK} -pIII	Carolin Schüller

⁶ Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU-München, Freising ⁷ Lehrstuhl für Zellbiologie, TU-München, Freising

A.3 EIGENSCHAFTEN DER IN DIESER ARBEIT KONSTRUIERTEN BIBLIOTHEKEN UND SELEKTIERTEN F_{AB}-FRAGMENTE

Selektierte Kaninchen-anti-Sulfonamid-Klone	
pASK111R _{ab} -p3-F _{ab} SA2 23	wie pASK111R _{ab} -p3; mit rbp-V _L -C _{K1b4} , ompA-V _{H(1a3)} -C _{H(de12,14)} -His ₆ -pIII
pASK111R _{ab} -p3-F _{ab} SA2 90	wie pASK111R _{ab} -p3; mit rbp-V _L -C _{K1b4} , ompA-V _{H(1a3)} -C _{H(de12,14)} -His ₆ -pIII
Anti-Sulfonamid-Bibliotheken	
LibSA _L C _{Rab}	in pASK111R _{ab} -p3; mit rbp-V _L BibSA ⁻ -C _L BiSA _B , ompA-V _H -C _H 1-His ₆ -pIII
LibSA _H C _{Rab}	in pASK111R _{ab} -p3; mit rbp-V _L -C _L , ompA-V _H BibSA ⁻ -C _H BibSA ⁻ -His ₆ -pIII
LibSARab	in pASK111R _{ab} -p3; mit rbp-V _L BibSA ⁻ -C _L BiSA _B , ompA-V _H BibSA ⁻ -C _H BibSA ⁻ -His ₆ -pIII

1801 GGTACATGGG TTCCTATTGG GCTTGCTATC CCTGAAAATG AGGGTGGTGG CTCTGAGGGT
 CCATGTACCC AAGGATAACC CGAACGATAG GGACTTTTAC TCCCACCACC GAGACTCCCA
 GlyThrTrpVal ProIleGly LeuAlaIle ProGluAsnGlu GlyGlyGly SerGluGly
 68 ($\Delta pIII$)

1861 GGCGTTCTG AGGGTGGCGG TTCTGAGGGT GGCGGTAATA AACCTCCTGA GTACGGTGAT
 CCGCCAAGAC TCCCACCACC AAGACTCCCA CCGCCATGAT TTGGAGGACT CATGCCACTA
 GlyGlySerGlu GlyGlyGly SerGluGly GlyGlyThrLys ProProGlu TyrGlyAsp

1921 ACACCTATTC CGGGCTATAC TTATATCAAC CCTCTCGACG GCACTTATCC GCCTGGTACT
 TGTGGATAAG GCCCGATATG AATATAGTTG GGAGAGCTGC CGTGAATAGG CGGACCATGA
 ThrProIlePro GlyTyrThr TyrIleAsn ProLeuAspGly ThrTyrPro ProGlyThr

1981 GAGCAAAACC CCGCTAATCC TAATCCTTCT CTTGAGGAGT CTCAGCCTCT TAATACTTTC
 CTCGTTTTGG GCGGATTAGG ATTAGGAAGA GAACTCCTCA GAGTCGGAGA ATTATGAAAG
 GluGlnAsnPro AlaAsnPro AsnProSer LeuGluGluSer GlnProLeu AsnThrPhe

2041 ATGTTTCAGA ATAATAGGTT CCGAAATAGG CAGGGTGCAT TAACTGTTTA TACGGGCACT
 TACAAAGTCT TATTATCCAA GGCTTTATCC GTCCCACGTA ATTGACAAAT ATGCCCGTGA
 MetPheGlnAsn AsnArgPhe ArgAsnArg GlnGlyAlaLeu ThrValTyr ThrGlyThr

2101 GTTACTCAAG GCACTGACCC CGTAAAACT TATTACCAGT ACACTCCTGT ATCATCAAAA
 CAATGAGTTC CGTGACTGGG GCAATTTTGA ATAATGGTCA TGTGAGGACA TAGTAGTTTT
 ValThrGlnGly ThrAspPro ValLysThr TyrTyrGlnTyr ThrProVal SerSerLys

2161 GCCATGTATG ACGCTTACTG GAACGGTAAA TTCAGAGACT GCGCTTTCCA TTCTGGCTTT
 CCGTACATAC TGCGAATGAC CTTGCCATTT AAGTCTCTGA CCGGAAAGGT AAGACCGAAA
 AlaMetTyrAsp AlaTyrTrp AsnGlyLys PheArgAspCys AlaPheHis SerGlyPhe

2221 AATGAGGATC CATTGTTTG TGAATATCAA GGCCAATCGT CTGACCTGCC TCAACCTCCT
 TTACTCCTAG GTAAGCAAAC ACTTATAGTT CCGGTTAGCA GACTGGACGG AGTTGGAGGA
 AsnGluAspPro PheValCys GluTyrGln GlyGlnSerSer AspLeuPro GlnProPro

2281 GTCAATGCTG GCGGCGGCTC TGGTGGTGGT TCTGGTGGCG GCTCTGAGGG TGGCGGCTCT
 CAGTTACGAC CGCCGCCGAG ACCACCACCA AGACCACCGC CGAGACTCCC ACCGCCGAGA
 ValAsnAlaGly GlyGlySer GlyGlyGly SerGlyGlyGly SerGluGly GlyGlySer
 217 ($\Delta\Delta pIII$)

2341 GAGGGTGGCG GTTCTGAGGG TGGCGGCTCT GAGGGTGGCG GTTCCGGTGG CGGCTCCGGT
 CTCCCACCGC CAAGACTCCC ACCGCCGAGA CTCCCACCGC CAAGGCCACC GCCGAGGCCA
 GluGlyGlyGly SerGluGly GlyGlySer GluGlyGlyGly SerGlyGly GlySerGly

2401 TCCGGTGATT TTGATTATGA AAAAAATGGCA AACGCTAATA AGGGGGCTAT GACCGAAAAT
 AGGCCACTAA AACTAATACT TTTTACCGT TTGCGATTAT TCCCCGATA CTGGCTTTTA
 SerGlyAspPhe AspTyrGlu LysMetAla AsnAlaAsnLys GlyAlaMet ThrGluAsn

2461 GCCGATGAAA ACGCGCTACA GTCTGACGCT AAAGGCAAAC TTGATTCTGT CGCTACTGAT
 CGGCTACTTT TGCGCGATGT CAGACTGCGA TTTCCGTTTG AACTAAGACA GCGATGACTA
 AlaAspGluAsn AlaLeuGln SerAspAla LysGlyLysLeu AspSerVal AlaThrAsp

2521 TACGGTGCTG CTATCGATGG TTTTATTGGT GACGTTTCCG GCCTTGCTAA TGTAATGGT
 ATGCCACGAC GATAGCTACC AAAGTAACCA CTGCAAAGGC CGGAACGATT ACCATTACCA
 TyrGlyAlaAla IleAspGly PheIleGly AspValSerGly LeuAlaAsn GlyAsnGly

2581 GCTACTGGTG ATTTTGTCTG CTCTAATTC CAAATGGCTC AAGTCGGTGA CGGTGATAAT
 CGATGACCAC TAAAACGACC GAGATTAAGG GTTTACCGAG TTCAGCCACT GCCACTATTA
 AlaThrGlyAsp PheAlaGly SerAsnSer GlnMetAlaGln ValGlyAsp GlyAspAsn

2641 TCACCTTTAA TGAATAATTT CCGTCAATAT TTACCTTCTT TGCCTCAGTC GGTGAAATGT
 AGTGGAAATT ACTTATTAAA GGCAGTTATA AATGGAAGAA ACGGAGTCAG CCAACTTACA
 SerProLeuMet AsnAsnPhe ArgGlnTyr LeuProSerLeu ProGlnSer ValGluCys

2701 CGCCCTTATG TCTTTGGCGC TGTTAAACCA TATGAATTTT CTATTGATTG TGACAAAATA
 GCGGGAATAC AGAAACCGCG ACCATTTGGT ATACTTAAAA GATAACTAAC ACTGTTTTAT
 ArgProTyrVal PheGlyAla GlyLysPro TyrGluPheSer IleAspCys AspLysIle

2761 AACTTATTCC GTGGTGTCTT TGCCTTCTT TTATATGTTG CCACCTTAT GTATGTATTT
 TTGAATAAGG CACCACAGAA ACGCAAAGAA AATATACAAC GGTGAAATA CATAcataaa
 AsnLeuPheArg GlyValPhe AlaPheLeu LeuTyrValAla ThrPheMet TyrValPhe

2821 TCGACGTTTG CTAACATACT GCGTAATAAG GAGTCTTAAT AAAAGCTT
 AGCTGCAAAC GATTGTATGA CGCATTATTC CTCAGAATTA TTTTCGAA
 SerThrPheAla AsnIleLeu ArgAsnLys GluSerEndEnd
 HindIII
 406

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit der NcoI-Erkennungssequenz, gefolgt von der Signalse-

quenz *phoA*, der sich die Sequenz für die V_{LK411B} anschließt. Nach dem *Amber-Stop-Codon* folgt das GenIII für das Phagenhüllprotein pIII mit dessen Aminosäuren 3 bis 406. Eingezeichnet sind außerdem die Erkennungssequenzen für *NcoI*, *SacI*, *SacII* und *HindIII*, welche die Genkassette der leichten Kette und die des *gIII* flankieren, sowie die mit der Einfügung der *SacII*-Schnittstellen einhergehenden Basensubstitutionen (fett). Außerdem sind die verschiedenen Domänen des pIII bezeichnet.

B.2: DIE KODIERENDE SEQUENZ FÜR DIE *TET*-PROMOTOR-REGION UND DIE CLONING SITE AUF DEM PHAGEMID PASK111R_{AB}-P3

```

1    CCATAACGCT CGGTTGCCGCG CGGGCGTTTT TTATTGGCCA GATGATTAAT TCCTAATTTT
    GGTATTGCCGA GCCAACGGCG GCCCGCAAAA AATAACCGGT CTACTAATTA AGGATTAATAA

61   TGGTTGACACT CTATCATTGA TAGAGTTATT TTACCACCTCC CTATCAGTGA TAGAGAAAAG
    ACAACTGTGA GATAGTAACT ATCTCAATAA AATGGTGAGG GATAGTCACT ATCTCTTTTC
    -35                -10      +1

121  TGAAATGAAT AGTTCGACAA AAATCTAGAT AACGAGGGCA AAAAATGAAC ATGAAAAAAC
    ACTTTACTTA TCAAGCTGTT TTTAGACTA TTGCTCCCGT TTTTACTTGG TACTTTTTTTG
                                RBP: MetAsn MetLysLysL·
                                NcoI

181  TGGCTACCCT GGTTCGCTT GTTGCGCTAA GCGCCACCGT CAGTGCGAAT GCCATGGCAG
    ACCGATGGGA CCAAAGGCGA CAACGCGATT CGCGGTGGCA GTCACGCTTA CGGTACCGTC
    euAlaThrLeu ValSerAla ValAlaLeuSer AlaThrValSerAlaAsn AlaMetAlaA·

241  CCCTCGGTAC CTAACGAGGG CAAAAAATGA AAAAGACAGC TATCGCGATT GCAGTGGCAC
    GGGAGCCATG GATTGCTCCC GTTTTTTACT TTTTCTGTCG ATAGCGCTAA CGTCACCGTG
    laLeuGlyThr End OmpA: MetLys LysThrAla IleAlaIle AlaValAlaL·

301  TGGCTGGTTT CGCTACCATA GCGATCGCCC AGTCAGTGAC GCGTCATCAC CACCATCACC
    ACCGACAAA GCGATGGCAT CGCTAGCGGG TCAGTCACTG CGCAGTAGTG GTGGTAGTGG
    euAlaGlyPhe AlaThrVal AlaIleAlaGln SerValThr ArgHisHis HisHisHisH·

361  ATCCGCGGTA GACTGTTGAA AGTTGTTTAG...
    TAGGCGCCAT CTGACAACCT TCAACAAATC...
    isProArgEnd ThrValGlu SerCys...
    Amb +3 (pIII)

1572 ... AATAAGGAG TCTTAATAAA AGCTTGACCT GTGAAGTAA AAATGGCGCA CATTGTGCGA
    ... TTATTCCTC AGAATTATTT TCGAACTGGA CACTTCACCT TTTACCGCGT GTAAACACGCT
    ... AsnLysGlu SerEndEnd
    HindIII
    406 (pIII)

1601 CATTMTTTT GTCTGCCGTT TACCGCTACT GCGTCACGGA TCT
    GTAAAAAAA CAGACGGCAA ATGGCGATGA CGCAGTGCCT AGA
  
```

Der abgebildete Sequenzbereich enthält die *tet*^{p/o}-Region, wobei die -35 und -10 Konsensussequenzen und der Transkriptionsstartpunkt +1 gekennzeichnet sind (Skerra, 1994a). Die Transkriptionseinheit endet mit dem Transkriptionsterminator t_{pp} . Weiterhin sind die kodierenden Bereiche für die *ompA*-Signalsequenz, die *rbp*-Signalsequenz, das His₆-tag und die Anfangssequenz von *gIII* dargestellt. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *XbaI*, *HindIII*, *NcoI*, *KpnI*, *AsiSI*, *MluI* und *SacII* sind unterstrichen. Des Weiteren sind die *tet*-Repressor-Bindungsstellen durch graue Hinterlegungen gekennzeichnet, dasselbe gilt für die Ribosomen-Bindungsstellen. Die Nummerierung der Basensequenz bezieht sich auf die Abfolge im Vektor pASK111R_{ab}-p3.

B.3: DIE KODIERENDE SEQUENZ FÜR DAS LEPORIDE F_{AB}-FRAGMENT WR 13.2 AUF DEM PHAGEMID PASK111R_{AB}-P3-WR13.12

```

144          XbaI
          TCTAGAT AACGAGGGCA AAAAATGAAC ATGAAAAAAC
          AGATCTA TTGCTCCCGT TTTTACTTG TACTTTTTTG
                                     MetAsn MetLysLysL·
                                     RBP:  -21

181          NcoI
TGGCTACCT GGTTCGGCT GTTGCCTAA GCGCCACCGT CAGTGC GAAT GCCATGGCAG
ACCGATGGGA CCAAAGGCGA CAACGCGATT CGCGGTGGCA GTCACGCTTA CGTACCCTGC
euAlaThrLeu ValSerAla ValAlaLeuSer AlaThrVal SerAlaAsn AlaMetAlaA·
                                     LCWR:  +1

241          ATGTCGTGAT GACCCAGACT CCATCCCCCG TGTCTGCCGC TGTGGGAGGC ACAGTCACCA
TACAGCACTA CTGGGTCTGA GGTAGGGGGC ACAGACGGCG ACACCCTCCG TGTCAAGTGGT
spValValMet ThrGlnThr ProSerProVal SerAlaAla ValGlyGly ThrValThrI·

301          NheI
TCAATTGCCA GGCTAGCGAG GACATTTATA GCAATTTAGC CTGGTATCAG CAGAAACCAG
AGTTAACGGT CCGATCGCTC CTGTAAATAT CGTTAAATCG GACCATAGTC GTCTTTGGTC
leAsnCysGln AlaSerGlu AspIleTyrSer AsnLeuAla TrpTyrGln GlnLysProG·

361          GGCAGCCTCC CAAACTCCTG ATCTACAGGG CATCCACTCT GGCATCTGGG GTCCCATCGC
CCGTCCGAGG GTTTGAGGAC TAGATGTCCC GTAGGTGAGA CCGTAGACCC CAGGGTAGCG
lyGlnProPro LysLeuLeu IleTyrArgAla SerThrLeu AlaSerGly ValProSerA·

421          GGTTCAGCGG CAGTGGATCT GGGACAGAGT TCACTCTCAC CATCAGCGGC TTGCAGTGTG
CCAAGTCGCC GTCACCTAGA CCCTGTCTCA AGTGAGAGTG GTAGTCGCCG AACGTCACAC
rgPheSerGly SerGlySer GlyThrGluPhe ThrLeuThr IleSerGly LeuGlnCysA·

481          ACGATGCTGC CACTTACTAC TGTCTAGGCG TTTATTATAG TAGTAGTTGG GACCATGCTT
TGCTACGACG GTGAATGATG ACAGATCCGC AAATAATATC ATCATCAACC CTGGTACGAA
spAspAlaAla ThrTyrTyr CysLeuGlyVal TyrTyrSer SerSerTrp AspHisAlaP·

541          TCGGCGGAGG GACCGAGGTG GTGGTCAAAG GTGATCCAGT TGCACCTACT GTCCTCATCT
AGCCGCTCC CTGGCTCCAC CACCGTTTC CACTAGGTCA ACGTGGATGA CAGGAGTAGA
heGlyGlyGly ThrGluVal ValValLysGly AspProVal AlaProThr ValLeuIleP·

601          TCCCACCAGC TGCTGATCAG GTGGCAACTG GAACAGTCAC CATCGTGTGT GTGGCGAATA
AGGGTGGTCG ACGACTAGTC CACCGTTGAC CTTGTCAGTG GTAGCACACA CACCGCTTAT
heProProAla AlaAspGln ValAlaThrGly ThrValThr IleValCys ValAlaAsnL·

661          AATACTTTCC CGATGTCACC GTCACCTGGG AGGTGGATGG CACCACCCAA ACAACTGGCA
TTATGAAAGG GCTACAGTGG CAGTGGACCC TCCACCTACC GTGGTGGGTT TGTGACCGT
ysTyrPhePro AspValThr ValThrTrpGlu ValAspGly ThrThrGln ThrThrGlyI·

721          TCGAGAACAG TAAAACACCG CAGAATTCTG CAGATTGTAC CTACAACCTC AGCAGCACTC
AGCTCTTGTC ATTTTGTGGC GTCTTAAGAC GTCTAACATG GATGTTGGAG TCGTCGTGAG
leGluAsnSer LysThrPro GlnAsnSerAla AspCysThr TyrAsnLeu SerSerThrL·

781          TGACACTGAC CAGCACACAG TACAACAGCC ACAAAGAGTA CACCTGCAAG GTGACCCAGG
ACTGTGACTG GTCGTGTGTC ATGTTGTCGG TGTTCCTCAT GTGGACGTTT CACTGGGTCC
euThrLeuThr SerThrGln TyrAsnSerHis LysGluTyr ThrCysLys ValThrGlnG·

841          KpnI
GCACGACCTC AGTCGTCCAG AGCTTCAATA GGGGTGACTG TTAAGGTACC TAACGAGGGC
CGTGTGGAG TCAGCAGGTC TCGAAGTTAT CCCACTGAC AATTCATGG ATTGCTCCCG
lyThrThrSer ValValGln SerPheAsnArg GlyAspCys ENDGlyThr END

901          AsiSI
AAAAAATGAA AAAGACAGCT ATCGCGATTG CAGTGGCACT GGCTGGTTTC GCTACCGTAG
TTTTTTACTT TTTCTGTCGA TAGCGCTAAC GTCACCGTGA CCGACCAAAG CGATGGCATT
MetLys LysThrAla IleAlaIleAla ValAlaLeu AlaGlyPhe AlaThrValA·
OmpA:  -21

961          AsiSI
CGATCGCCCA GGAGCAGCTG GTGGAGTCCG GGGGAGACCT GGTC AAGCCT GGGGCATCCC
GCTAGCGGGT CCTCGTCGAC CACCTCAGGC CCCCTCTGGA CCAGTTCGGA CCCGTAGGG
laIleAlaGln GluGlnLeu ValGluSerGly GlyAspLeu ValLysPro GlyAlaSerL·
HCWR13:  +1

1021         TGACACTCAC CTGCACAGCC TCTGGATTCT CCTTCAGTGG CAACCTTCAC ATGTGTTGGG
ACTGTGAGTG GACGTGTCGG AGACCTAAGA GGAAGTCACC GTTGAAGTG TACACAACCC
euThrLeuThr CysThrAla SerGlyPheSer PheSerGly AsnLeuHis MetCysTrpV·

```

```

1081   TCCGCCAGGC TCCAGGAAG GGGCTGGAGT GGATCGCATG CATTATGGT GGTAGTAGTG
      AGGCGGTCCG AGGTCCCTTC CCCGACCTCA CCTAGCGTAC GTAAATACCA CCATCATCAC
      alArgGlnAla ProGlyLys GlyLeuGluTrp IleAlaCys IleTyrGly GlySerSerG·

1141   GTGGCACTTA CTACGCGAGC TGGGCGAAAG GCCGATTCAC CATTTCACAA ATTTTCGTCGA
      CACCGTGAAT GATGCGCTCG ACCCGCTTTC CGGCTAAGTG GTAAAGGTTT TAAAGCAGCT
      lyGlyThrTyr TyrAlaSer TrpAlaLysGly ArgPheThr IleSerLys IleSerSerT·

1201   CCACGGTGAC TCTGCAAATG ACCAGTCTGA CAGTCGCGGA CACGGCCACC TATTTCTGTG
      GGTGCCACTG AGACGTTTAC TGGTCAGACT GTCAGCGCCT GTGCCGGTGG ATAAAGACAC
      hrThrValThr LeuGlnMet ThrSerLeuThr ValAlaAsp ThrAlaThr TyrPheCysA·

1261   CGAGAGGTTT TTATAATGCT GGCTTGTGGG GCCCAGGCAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG
      GCTCTCCAAA AATATTACGA CCGAACACCC CGGGTCCGTG GGACCAGTGG CAGAGGAGTC
      laArgGlyPhe TyrAsnAla GlyLeuTrpGly ProGlyThr LeuValThr ValSerSerG·

1321   GGCAACCTAA GGCTCCATCA GTCTTCCCAC TGGCCCCCTG CTGCGGGGAC ACACCGAGCT
      CCGTTGGATT CCGAGGTAGT CAGAAGGGTG ACCGGGGGAC GACGCCCTG TGTGGCTCGA
      lyGlnProLys AlaProSer ValPheProLeu AlaProCys CysGlyAsp ThrProSerS·
      SacI

1381   CCACGGTGAC CCTGGGCTGC CTGGTCAAAG GCTACCTCCC GGAGCCAGTG ACCGTGACCT
      GGTGCCACTG GGACCCGACG GACCAGTTTC CGATGGAGGG CCTCGGTCAC TGGCACTGGA
      erThrValThr LeuGlyCys LeuValLysGly TyrLeuPro GluProVal ThrValThrT·

1441   GGAACCTCGG CACCCTCACC AATGGGGTAC GCACCTTCCC GTCCGTCCGG CAGTCCTCAG
      CCTTGAGCCC GTGGGAGTGG TTACCCCATG CGTGGAAAGG CAGGCAGGCC GTCAGGAGTC
      rpAsnSerGly ThrLeuThr AsnGlyValArg ThrPhePro SerValArg GlnSerSerG·

1501   GCCTCTACTC GCTGAGCAGC GTGGTGAAGC TGACCTCAAG CAGCCAGCCC GTCACCTGCA
      CGGAGATGAG CGACTCGTCG CACCACTCGC ACTGGAGTTC GTCGGTCGGG CAGTGGACGT
      lyLeuTyrSer LeuSerSer ValValSerVal ThrSerSer SerGlnPro ValThrCysA·

1561   ACGTGGCCCA CCCAGCCACC AACACCAAAG TGGACAAGAC CGTTGCGCCC TCGACATGCA
      TGCACCGGGT GGGTCGGTGG TTGTGGTTTC ACCTGTTCTG GCAACGCGGG AGCTGTACGT
      snValAlaHis ProAlaThr AsnThrLysVal AspLysThr ValAlaPro SerThrCysS·

1621   GCAAGCCAC GACGCGTCAT CACCACCATC ACCATCCGCG GTAGACTGTT GAAAGTTGT
      CGTTCGGGTG CTGCGCAGTA GTGGTGGTAG TGGTAGGCGC CATCTGACAA CTTTCAACA
      erLysProThr ThrArgHis HisHisHisHis HisProArg ENDThrVal GluSerCys
      MluI SacII
      Amb +3 (pIII)

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit der *Xba*I-Erkennungssequenz, gefolgt von der Signalsequenz rbp, der sich die Sequenz für die naive leporide V_LC_L anschließt. Nach dem ompA-Signalpeptid folgt die Sequenz für die naive leporide V_HC_{HWR13}, der sich das His₆-Tag mit *Amber-Stopp-Codon*, gefolgt von den ersten vier AS des Phagenhüllproteins pIII, anschließt. Eingezeichnet sind außerdem die Erkennungssequenzen für *Nco*I, *Kpn*I, *Asi*SI, *Mlu*I, *Sac*I, *Nhe*I und *Sac*II, welche die Genkassetten der leichten und schweren Kette und die des gIII flankieren, sowie die mit der Einfügung der diagnostischen *Sac*I- und *Nhe*I-Schnittstellen einhergehenden Basensubstitutionen (fett).

B.4: DIE KODIERENDE SEQUENZ FÜR DAS MURINE ATRAZINSPEZIFISCHE F_{AB}-FRAGMENT K411B AUF DEM PHAGEMID PASK111R_{AB}-P3

```

144          XbaI
          TCTAGAT AACGAGGGCA AAAAATGAAC ATGAAAAAAC
          AGATCTA TTGCTCCCGT TTTTACTTG TACTTTTTTG
                                MetAsn MetLysLysLeu·
                                RBP:      -21

181          TGGTACCCT GGTTCGGCT GTTGCCTAA GCGCCACCGT CAGTGC GAAT GCCATGGCAG
          ACCGATGGGA CCAAAGGCGA CAACGCGATT CGCGGTGGCA GTCACGCTTA CGGTACCGTC
          ·LAlaThrLeu ValSerAla ValAlaLeuSer AlaThrVal SerAlaAsn AlaMetAlaA·
                                VLCIK411B: +1

241          ACATCGAGCT CACTCAGTCT CCAGCTTCTT TGGCTGTGTC TCTAGGGCAG AGGGCCACCA
          TGTAGCTCGA GTGAGTCAGA GGTCAAGAA ACCGACACAG AGATCCCCTC TCCCGGTGGT
          spIleGluLeu ThrGlnSer ProAlaSerLeu AlaValSer LeuGlyGln ArgAlaThrI·

301          TCTCTGCAG AGCCAGTGAA AGTGTGATA TTTATGGCAA TAGTTTTATG CACTGGTATC
          AGAGGACGTC TCGGTCACCT TCACAACAT AAATACCGTT ATCAAAATAC GTGACCATAG
          leSerCysArg AlaSerGlu SerValAspIle TyrGlyAsn SerPheMet HisTrpTyrG·

361          AGCAGAAACC AGGACAGCCA CCCAACTCC TCATCTATCG TGCATCCAAC CTAGAACTG
          TCGTCTTTGG TCCTGTCCGGT GGGTTGAGG AGTAGATAGC ACGTAGGTTG GATCTTTGAC
          lnGlnLysPro GlyGlnPro ProLysLeuLeu IleTyrArg AlaSerAsn LeuGluThrG·

421          GGATCCCTGC CAGGTTCACT GGCAGTGGGT CTAGGACAGA CTTACCCTC ACCATTAATC
          CCTAGGACG GTCCAAGTCA CCGTCACCCA GATCTGTCT GAAGTGGGAG TGGTAATTAG
          lyIleProAla ArgPheSer GlySerGlySer ArgThrAsp PheThrLeu ThrIleAsnP·

481          CTGTGGAGGC TGATGATGTT GCAACCTATT TCTGTCAGCA AAGTAAATCA GCTCCGTACA
          GACACCTCCG ACTACTACAA CGTTGGATAA AGACAGTCGT TTCATTTAGT CGAGGCATGT
          roValGluAla AspAspVal AlaThrTyrPhe CysGlnGln SerLysSer AlaProTyrT·

541          CGTTCGGAGG GGGCACCAAG CTCGAGCTGA AGCGCGCTGA TGCTGCACCG ACTGTATCCA
          GCAAGCCTCC CCCGTGGTTC GAGCTCGACT TCGCGCGACT ACGACGTGGC TGACATAGGT
          hrPheGlyGly GlyThrLys LeuGluLeuLys ArgAlaAsp AlaAlaPro ThrValSerI·

601          TCTTCCCACC ATCCAGTGAG CAGTTAACAT CTGGAGGTGC CTCAGTCGTG TGCTTCTTGA
          AGAAGGGTGG TAGGTCACCT GTC AATTGTA GACCTCCACG GAGTCAGCAC ACGAAGAACT
          lePheProPro SerSerGlu GlnLeuThrSer GlyGlyAla SerValVal CysPheLeuA·

661          ACAACTTCTA CCCCAAAGAC ATCAATGTCA AGTGGAAGAT TGATGGCAGT GAACGACAAA
          TGTTGAAGAT GGGGTTTCTG TAGTTACAGT TCACCTTCTA ACTACCGTCA CTTGCTGTTT
          snAsnPheTyr ProLysAsp IleAsnValLys TrpLysIle AspGlySer GluArgGlnA·

721          ATGGCGTCTT GAACAGTTGG ACTGATCAGG ACAGCAAAGA CAGCACCTAC AGCATGAGCA
          TACCGCAGGA CTTGTCAACC T GACTAGTCC TGTCGTTTCT GTCGTGGATG TCGTACTCGT
          snGlyValLeu AsnSerTrp ThrAspGlnAsp SerLysAsp SerThrTyr SerMetSerS·

781          GCACCCTCAC GTTGACCAAG GACGAGTATG AACGACATAA CAGTATAACC TGTGAGGCCA
          CGTGGGAGTG CAACTGGTTC CTGCTCATAC TTGCTGTATT GTCGATATGG AACTCCGGT
          erThrLeuThr LeuThrLys AspGluTyrGlu ArgHisAsn SerTyrThr CysGluAlaT·

841          CTCACAAGAC ATCAACTTCA CCCATTGTCA AGAGCTTCAA CAGGAATGAG TGTTAAGGTA
          GAGTGTCTG TAGTTGAAGT GGGTAACAGT TCTCGAAGTT GTCCTTACTC ACAATTCCAT
          hrHisLysThr SerThrSer ProIleValLys SerPheAsn ArgAsnGlu CysENDGlyT·

901          KpnI
          CCTAACGAGG GCAAAAAATG AAAAAGACAG CTATCGCGAT TGCAGTGGCA CTGGCTGGTT
          GGATTGCTCC CGTTTTTTAC TTTTCTGTG GATAGCGCTA ACGTCACCGT GACCGACCAA
          hrEND          Met LysLysThrAla IleAlaIle AlaValAla LeuAlaGlyP·
          OmpA:      -21

961          AsiSI
          TCGTACCGT AGCGATCGCC GAAGTTAAAC TGCAGCAGTC AGGAGGAGGC TTGGTGAAC
          AGCGATGGCA TCGCTAGCGG CTTCAATTTG ACGTCGTCAG TCCTCCTCCG AACCACTTG
          heAlaThrVal AlaIleAla GluValLysLeu GlnGlnSer GlyGlyGly LeuValGlnP·
          VHCHK411B: +1

```

```

1021 CTGGAGGATC CATGAAACTC TCTTGTGCTG CCTCTGGATT CACTTTCAGT GACGTCTGGA
GACCTCCTAG GTACTTTGAG AGAACACGAC GGAGACCTAA GTGAAAGTCA CTGCAGACCT
roGlyGlySer MetLysLeu SerCysAlaAla SerGlyPhe ThrPheSer AspValTrpM

1081 TGGACTGGGT CCGCCAGTCT CCAGAGAAGG GGCTTGAGTG GGTCGCTGAA ATTAGAAAACA
ACCTGACCCA GGCGGTCAGA GGTCTCTTCC CCGAACTCAC CCAGCGACTT TAATCTTTGT
etAspTrpVal ArgGlnSer ProGluLysGly LeuGluTrp ValAlaGlu IleArgAsnL·

1141 AAGCTAATAA TCATGCAGCA TATTATGCTG AGTCTGTGAA AGGGAGGTTC ACCGTTTCAA
TTTGATTATT AGTACGTCGT ATAATACGAC TCAGACACTT TCCCTCCAAG TGGCAAAGTT
ysAlaAsnAsn HisAlaAla TyrTyrAlaGlu SerValLys GlyArgPhe ThrValSerA·

1201 GAGATGATTC CAAAAGTAAT GTCTACCTGC ACATGAATAG CTTAAGACCT GAAGACACTG
CTCTACTAAG GTTTTTCTTA CAGATGGACG TGTACTTATC GAATTCTGGA CTTCTGTGAC
rgAspAspSer LysSerAsn ValTyrLeuHis MetAsnSer LeuArgPro GluAspThrG·

1261 GCATTTATTA TTGTACCAGG CACAGCTATA GGTACGACGG GTTTGCTTAC TGGGGCCAAG
CGTAAATAAT AACATGGTCC GTGTGCATAT CCATGCTGCC CAAACGAATG ACCCCGGTTC
lyIleTyrTyr CysThrArg HisSerTyrArg TyrAspGly PheAlaTyr TrpGlyGlnG·

1321 GCACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCAAAGA CCACTCCTCC GTCTGTTTAC CCTCTGGCTC
CGTGGTGCCA GTGGCAGAGG AGTCGTTTCT GGTGAGGAGG CAGACAAATG GGAGACCGAG
lyThrThrVal ThrValSer SerAlaLysThr ThrProPro SerValTyr ProLeuAlaP·

1381 CTGGTTCTGC GGCTCAGACT AACTCTATGG TGACTCTGGG ATGCCTGGTC AAGGGCTATT
GACCAAGACG CCGAGTCTGA TTGAGATACC ACTGAGACCC TACGGACCAG TTCCCATAAA
roGlySerAla AlaGlnThr AsnSerMetVal ThrLeuGly CysLeuVal LysGlyTyrP·

1441 TCCCTGAGCC AGTGACAGTG ACCTGGAAct CTGGATCCCT GTCCAGCGGT GTGCACACCT
AGGGACTCGG TCACTGTCAC TGGACCTTGA GACCTAGGGA CAGGTCGCCA CACGTGTGGA
heProGluPro ValThrVal ThrTrpAsnSer GlySerLeu SerSerGly ValHisThrP·

1501 TCCCAGCTGT CCTGCAATCT GACCTCTACA CTCTGAGCAG CTCAGTGACT GTCCCCTCCA
AGGGTCGACA GGACGTTAGA CTGGAGATGT GAGACTCGTC GAGTCACTGA CAGGGGAGGT
heProAlaVal LeuGlnSer AspLeuTyrThr LeuSerSer SerValThr ValProSerS·

1561 GCACCTGGCC CAGCGAGACC GTCACCTGCA ACGTTGCCCA CCCGGCTTCT AGCACCAAAG
CGTGGACCGG GTCGCTCTGG CAGTGGACGT TGCAACGGGT GGGCCGAAGA TCGTGGTTTC
erThrTrpPro SerGluThr ValThrCysAsn ValAlaHis ProAlaSer SerThrLysV·
MluI SacII
1621 TTGACAAGAA AATCGTACCG CGCGACTGCA CGCGTCATCA CCACCATCAC CATCCGCGGT
AACTGTTCTT TTAGCATGGC GCGCTGACGT GCGCAGTAGT GGTGGTAGTG GTAGGCGCCA
alAspLysLys IleValPro ArgAspCysThr ArgHisHis HisHisHis HisProArgE
Amb
1681 AGACTGTTGA AAGT
TCTGACAACT TTCA
NDThrValGlu Ser
Amb +3 (pIII)

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit der *Xba*I-Erkennungssequenz, gefolgt von der Signalsequenz rbp, der sich die Sequenz für die $V_L C_{LK411B}$ anschließt. Nach dem ompA-Signalpeptid folgt die Sequenz für die $V_H C_{HK411B}$, der sich das His-Tag mit *Amber-Stopp-Codon*, gefolgt von den ersten vier AS des Phagenhüllproteins pIII, anschließt. Eingezeichnet sind außerdem die Erkennungssequenzen für *Nco*I, *Kpn*I, *Asi*SI, *Mlu*I und *Sac*II, welche die Genkassetten der leichten und schweren Kette und die des gIII flankieren.

B.5: DIE SEQUENZEN FÜR DIE MIT DEM ERSTEN *PANNING*-PROTOKOLL SELEKTIERTEN FRAGMENTE AUS DER BIBLIOTHEK LIBSARB

Klon SA1 27:

```

1      ATAGAGAAAA GTGAAATGAA TAGTTCGACA AAAATCTAGA TAACGAGGGC AAAAAATGAA
      TATCTCTTTT CACTTTACTT ATCAAGCTGT TTTTAGATCT ATTGCTCCCC TTTTACTT
                                                    MetAsn
                                                    RPB: -21
61     CATGAAAAAA CTGGCTACCC TGGTTTCCGC TGTGCGCTA AGCGCCACCG TCAGTGCGAA
      GTACTTTTTT GACCGATGGG ACCAAAGGCG ACAACGCGAT TCGCGGTGGC AGTCACGCTT
      ·MetLysLys LeuAlaThrLeu ValSerAla ValAlaLeu SerAlaThrVal SerAlaAsn·
      NcoI                                                    KpnI
121    TGCCATGGCA GCGCTGTGA TGACCAGAC TTGCTTCAGT AGGAAGAGCT GTTAAGGTAC
      ACGGTACCGT CGCGAACACT ACTGGGTCTG AACGAAGTCA TCCTTCTCGA CAATTCCATG
      ·AlaMetAla AlaLeuValMet ThrGlnThr CysPheSer ArgLysSerCys END
      Fragment 27a: +1
      KpnI
181    CTAACGAGGG CAAAAAATGA AAAAGACAGC TATCGCGATT GCAGTGGCAC TGGCTGGTTT
      GATTGCTCCC GTTTTTTACT TTTTCTGTCG ATAGCGCTAA CGTCACCGTG ACCGACCAA
      MetLys LysThrAla IleAlaIle AlaValAlaLeu AlaGlyPhe·
      ompA: -21
      SacII
241    CGCTACCGTA GCGATC ACCA TCCGCGGTAG ACTGTTGAAA GTTGTTTAGC AAAACCTCAT
      GCGATGGCAT CGCTAG TGGT AGGCGCCATC TGACAACCTT CAACAAATCG TTTTGGAGTA
      ·AlaThrVal AlaIleThrIle ArgGlyArg LeuLeuLys ValValGlnGln AsnLeuIle·
      Fragment 27b: +1
301    ACAGAAAATT CATTTACTAA CGTCTGGAAA GACGACAAAA CTTTATAGTCG TTACGCTAAC
      TGCTTTTTAA GTAAATGATT GCAGACCTTT CTGCTGTTTT GAAATCTAGC AATGCGATTG
      ·GlnLysIle HisLeuLeuThr SerGlyLys ThrThrLys LeuGlnIleVal ThrLeuThr·
361    TATGAGGGCT GTCTGTGGAA TGCTACAGGC GTTGTGGTTT GTACTGGTGA CGAAACTCAG
      ATACTCCCGA CAGACACCTT ACGATGTCCG CAACACCAA CATGACCACT GCTTTGAGTC
      ·MetArgAla ValCysGlyMet LeuGlnAla LeuTrpPhe ValLeuValThr LysLeuSer·
421    TGTTACGGTA CATGGGTTCC TATTGGGCTT GCTATCCCTG AAAATGAGGG TGGTGGCTCT
      ACAATGCCAT GTACCCAAGG ATAACCCGAA CGATAGGGAC TTTTACTCCC ACCACCGAGA
      ·ValThrVal HisGlyPheLeu LeuGlyLeu LeuSerLeu LysMetArgVal ValAlaLeu·
481    GAGGGTGGCG GTTCTGAGGG TGGCGTCTCT GAGGGTGGCG GTACTAAACC TCCTGAGTAC
      CTCCCACCGC CAAGACTCCC ACCGCCAAGA CTCCCACCGC CATGATTTGG AGGACTCATG
      ·ArgValAla ValLeuArgVal AlaValLeu ArgValAla ValLeuAsnLeu LeuSerThr·
541    GGTGATACAC CTATTCCGGG CTATACTTAT ATCAACCCTC TCGACGGCAC TTATCCGCTT
      CCACTATGTG GATAAGGCC GATATGAATA TAGTTGGGAG AGCTGCCGTG AATAGCGCGA
      ·ValIleHis LeuPheArgAla IleLeuIle SerThrLeu SerThrAlaLeu IleArgLeu·
601    GGTACTGAGC AAAACCCCGC TAATCCTAAT CCTTCTCTTG AGGAGTCTCA GCCTCTTAAT
      CCATGACTCG TTTTGGGGCG ATTAGGATTA GGAAGAGAAC TCCTCAGAGT CGGAGAATTA
      ·ValLeuSer LysThrProLeu IleLeuIle LeuLeuLeu ArgSerLeuSer LeuLeuIle·
661    ACTTTCATGT TTCAGAATA TAGGTTCCGA AATAGGCAGG GTGCATTAA
      TGAAAGTACA AAGTCTTATT ATCCAAGGCT TTATCCGTCC CACGTAATT
      ·LeuSerCys PheArgIleIle GlySerGlu IleGlyArg ValHisEND

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit dem *Annealing*-Bereich des Sequenzierprimers pASK-IBA-5', gefolgt von der Signalsequenz rbp, der sich die Sequenz für das erste Fragment 27a anschließt. Nach dem ompA-Signalpeptid folgt die Sequenz für das zweite Fragment 27b. Die Punktmutation, die zur Änderung der letzten Aminosäure der ompA-Signalsequenz und zum Verlust der *AsiSI*-Erkennungssequenz führt, ist grau und fett gekennzeichnet. Im Anschluss an dieses Codon ist eine Base deletiert, was zu dem *frameshift* führt, der den Leserahmen für das GenIII verschiebt. Eingezeichnet sind auch die Erkennungssequenzen für *NcoI*, *KpnI* und *SacII*.

KLON SA1 31:

```

1      ATAGAGAAAA GTGAAATGAA TAGTTCGACA AAAATCTAGA TAACGAGGGC AAAAAATGAA
      TATCTCTTTT CACTTTACTT ATCAAGCTGT TTTTAGATCT ATTGCTCCCG TTTTTTACTT
                                                    MetAsn·
                                                    RBP: -21
61     CATGAAAAAA CTGGCTACCC TGGTTTCCGC TGTTGCGCTA AGCGCCACCG TCAGTGCGAA
      GTACTTTTTT GACCGATGGG ACCAAAGCGC ACAACGCGAT TCGCGGTGGC AGTCACGCTT
      ·MetLysLys LeuAlaThrLeu ValSerAla ValAlaLeu SerAlaThrVal SerAlaAsn·
      NcoI
121    TGCCATGGCA GATGTTGTGA TGACCCAGAC TTGCTTCAGT AGGAATGACT GTTAAGGTAC
      ACGGTACCGT CTACAACACT ACTGGGCTG AACGAAGTCA TCCTTACTGA CAATTCATG
      ·AlaMetAla AspValValMet ThrGlnThr CysPheSer ArgAsnAspCys ***
      Fragment 31: +1
                                                    NcoI
181    CTTAGCAGTC ACCCCTATTG AAGCTAGGGT CTGGGTAGCA CGGCTGCTGC CATGGGCTGG
      GAATCGTCAG TGGGGATAAC TTCGATCCA GACCCATCGT GCCGACGACG GTACCCGACC
      NcoI
241    CCATGGCATA TGTCATGATG ACCCAGACTT GCTTCAACAG GGGTGACTGC TAAGGTACCG
      GGTACCGTAT ACAGTACTAC TGGGTCTGAA CGAAGTTGTC CCCACTGACG ATTCATGGC
301    CCTCGGCAAT ATTTACCTTC TTTGCCCTAG TCGGTTGAAT GTCGCCCTTA TGCTTTGGC
      GGAGCCGTTA TAAATGGAAG AAACGGAGTC AGCCAACCTTA CAGCGGGAAT ACAGAAACCG
      (ΔpIII)
361    GCTGGTAAAC CATATGAATT TTCTATTGAT TGTGACAAAA TAACTTATT CCGTGGTGTC
      CGACCATTTG GTATACTTAA AAGATAACTA ACACTGTTTT ATTTGAATAA GGCACCACAG
421    TTTGCGTTTC TTTTATATGT TGCCACCTTT ATGTATGTAT TTTGACGTT TGCTAACATA
      AAACGCAAAG AAAATATACA ACGGTGAAA TACATACATA AAAGCTGCAA ACGATTGTAT
                                                    HindIII
481    CTGCGTAATA AGGAGTCTTA ATAAAAGCTT GAC
      GACGCATTAT TCCTCAGAAT TATTTTCGAA CTG

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit dem *Annealing*-Bereich des Sequenzierprimers pASK-IBA-5', gefolgt von der Signalsequenz rbp, der sich die Sequenz für das Fragment 31 anschließt. Die nach dem Stopp-Codon folgende Nukleotidsequenz lässt sich erst wieder ab dem Basenpaar 307 dem Phagemid zuordnen. Eingezeichnet sind auch die Erkennungssequenzen für *NcoI* und *HindIII*.

KLON SA1 1:

```

1      ATAGAGAAAA GTGAAATGAA TAGTTCGACA AAAATCTAGA TAACGAGGGC AAAAAATGAA
      TATCTCTTTT CACTTTACTT ATCAAGCTGT TTTTAGATCT ATTGCTCCCG TTTTTTACTT
                                                    MetAsn·
                                                    RBP: -21
61     CATGAAAAAA CTGGCTACCC TGGTTTCCGC TGTTGCGCTA AGCGCCACCG TCAGTGCGAA
      GTACTTTTTT GACCGATGGG ACCAAAGCGC ACAACGCGAT TCGCGGTGGC AGTCACGCTT
      ·MetLysLys LeuAlaThrLeu ValSerAla ValAlaLeu SerAlaThrVal SerAlaAsn·
      NcoI
121    TGCCATGGCA GATGTTGTGA TGACCCAGAC TTGCTTCAAT AGGAATGACT GTTAAGGTAC
      ACGGTACCGT CTACAACACT ACTGGGCTG AACGAAGTTA TCCTTACTGA CAATTCATG
      ·AlaMetAla AspValValMet ThrGlnThr CysPheAsn ArgAsnAspCys ***
      Fragment 1: +1
      KpnI
                                                    MluI
181    CTTAAGGACA GTGTGCAGGG GCCACTCGAG AATGCTCCAC GCGTCATCAC CACCATCACC
      GAATTCCTGT CACACGTCCC CGGTGAGCTC TTACGAGGTG CGCAGTAGTG GTGGTAGTGG
      SacII
241    ATCCGCGGTA GACTGTTGA
      TAGGCGCCAT CTGACAACT

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit dem *Annealing*-Bereich des Sequenzierprimers pASK-IBA-5', gefolgt von der Signalsequenz rbp, der sich die Sequenz für das Fragment 1 anschließt. Die nach dem Stopp-Codon folgende Nukleotidsequenz lässt sich dem C-Terminus des WR-13-Klons zuordnen. Eingezeichnet sind auch die Erkennungssequenzen für *NcoI*, *KpnI*, *MluI* und *SacII*.

KLON SA1 19:

```

1      ATAGAGAAAA GTGAAATGAA TAGTTCGACA AAAATCTAGA TAACGAGGGC AAAAAATGAA
      TATCTCTTTT CACTTTACTT ATCAAGCTGT TTTTAGATCT ATTGCTCCCG TTTTTTACTT
                                                    MetAsn·
                                                    RBP: -21
61     CATGAAAAAA CTGGCTACCC TGGTTTCCGC TGTTCGCCTA AGCGCCACCG TCAGTGCAGAA
      GTACTTTTTT GACCGATGGG ACCAAAGGCG ACAACGCGAT TCGCGGTGGC AGTCACGCTT
      ·MetLysLys LeuAlaThrLeu ValSerAla ValAlaLeu SerAlaThrVal SerAlaAsn·
      NcoI
121    TGCCATGGCA GATGTTGTGA TGACCCAGAC TTGCTTCAAT AGGAATAACT GTTAAGGTAC
      ACGGTACCGT CTACAACACT ACTGGGTCTG AACGAAGTTA TCCTTATTGA CAATTCCATG
      ·AlaMetAla AspValValMet ThrGlnThr CysPheAsn ArgAsnAsnCys ***
      Fragment 19: +1
      KpnI
181    CTTAACAGTT ATTCTATTG AAGCAAGTCT GGGTCAGCAC AGGGTCTGCC ATGGGTTCTCT
      GAATTGTCAA TAAGGATAAC TTCGTTGAGA CCCAGTCGTG TCCAGACGG TACCCAAGGA
                                                    NcoI
                                                    (ΔpIII)
241    ATTGGGCTTG CTATCCCTGA AAAT
      TAACCCGAAC GATAGGGACT TTTA

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit dem *Annealing*-Bereich des Sequenzierprimers pASK-IBA-5', gefolgt von der Signalsequenz rbp, der sich die Sequenz für das Fragment 19 anschließt. Die nach dem Stopp-Codon folgende Nukleotidsequenz lässt sich erst wieder ab dem Basenpaar 230 dem Phagemid zuordnen. Eingezeichnet sind auch die Erkennungssequenzen für *NcoI* und *KpnI*.

B.6: SEQUENZ FÜR DIE SCHWERE KETTE DES F_{AB}-FRAGMENTS SA2 90 AUF DEM PHAGEMID PASK111R_{AB}-P3

```

906          ATGA AAAAGACAGC TATCGCGATT GCAGTGGCAC TGGCTGGTTT
          TACT TTTTCTGTCTG ATAGCGCTAA CGTCACCGTG ACCGACCAAA
          MetLys LysThrAla IleAlaIle AlaValAlaLeu AlaGlyPhe·
OmpA-HCSA2 90 -21
          AsiSI
961  CGCTACCGTA GCGATCGCCC AGTCGGTGAA GGAGTCCGAG GGAGACCTGG TCAAGCCTGG
          GCGATGGCAT CGCTAGCGGG TCAGCCACTT CCTCAGGCTC CCTCTGGACC AGTTCGGACC
          ·AlaThrVal AlaIleAlaGln SerValLys GluSerGlu GlyAspLeuVal LysProGly·
          +1
1021 GGCATCCCTG ACACTCACCT GCAAAGCCTC TGGATTACCC CTCAGTAGAT ATGGAATGAA
          CCGTAGGGAC TGTGAGTGGG CGTTTCGGAG ACCTAAGTGG GAGTCATCTA TACCTTACTT
          ·AlaSerLeu ThrLeuThrCys LysAlaSer GlyPheThr LeuSerArgTyr GlyMetAsn·
1081 CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAGTGGATC GGATACATTG CTACTGGTAG
          GACCCAGGCG GTCCGAGGTC CCTTCCCCGA CCTCACCTAG CCTATGTAAC GATGACCATC
          ·TrpValArg GlnAlaProGly LysGlyLeu GluTrpIle GlyTyrIleAla ThrGlySer·
1141 TGGTGGTGGC ACTTACTACG CGAGCTGGGC GAAAGGCCGA GTCACCAGCT CCCAAACCTC
          ACCACCACCG TGAATGATGC GCTCGACCCG CTTTCCGGCT CAGTGGTCGA GGGTTTGGAG
          ·GlyGlyGly ThrTyrTyrAla SerTrpAla LysGlyArg ValThrSerSer GlnThrSer·
1201 GTCGACCACG GTGACTCTGC AAATGACCAG TCTGACAGCC GCGGACACGG CCACCTATTT
          CAGCTGGTGC CACTGAGACG TTTACTGGTC AGACTGTCCG CGCCTGTGCC GGTGGATAAA
          ·SerThrThr ValThrLeuGln MetThrSer LeuThrAla AlaAspThrAla ThrTyrPhe·
1261 CTGTGCGAGA GGACTGTATG TTGGTAGTCA TTATTATATG GGATACTTTA ACTTGTGGGG
          GACACGCTCT CCTGACATAC AACCATCAGT AATAATATAC CCTATGAAAT TGAACACCCC
          ·CysAlaArg GlyLeuTyrVal GlySerHis TyrTyrMet GlyTyrPheAsn LeuTrpGly·
1321 CCCAGGCACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGG GCAGCCTAAG GCTCCATCAG TCTTCCCCT
          GGGTCCGTGG GACCAGTGGC AGAGGAGTCC CGTCGGATTC CGAGGTAGTC AGAAGGGTGA
          ·ProGlyThr LeuValThrVal SerSerGly GlnProLys AlaProSerVal PheProLeu·
          SacI
1381 GGCCCCCTGC TGCGGGGACA CACCGAGCTC CACGGTG CC CTGGGCTGCC TGGTCAAAGG
          CCGGGGGACG ACGCCCCTGT GTGGCTCGAG GTGCCAC GG GACCCGACGG ACCAGTTTCC
          ·AlaProCys CysGlyAspThr ProSerSer ThrValAla LeuGlyCysLeu ValLysGly·
1441 CTACCTCCCG GAGCCAGTGA CCGTGACCTG GAACTCGGGC ACCCTACCA ATGGGGTACG
          GATGGAGGGC CTCGGTCACT GGCACCTGGAC CTTGAGCCCG TGGGAGTGGT TACCCCATGC
          ·TyrLeuPro GluProValThr ValThrTrp AsnSerGly ThrLeuThrAsn GlyValArg·
1501 CACCTTCCCG TCCGTCCGGC AGTCCTCAGG CCTCTACTCG CTGAGCAGCG TGGTGAGCGT
          GTGGAAGGGC AGGCAGGCCG TCAGGAGTCC GGAGATGAGC GACTCGTCGC ACCACTCGCA
          ·ThrPhePro SerValArgGln SerSerGly LeuTyrSer LeuSerSerVal ValSerVal·
1561 GACCTCAAGC AGCCAGCCCG TCACCTCAA CGTGGCCAC CCAGCCACCA ACACCAAAGT
          CTGGAGTTCG TCGGTCGGGC AGTGGACGTT GCACCGGGTG GGTCGGTGGT TGTGGTTTCA
          ·ThrSerSer SerGlnProVal ThrCysAsn ValAlaHis ProAlaThrAsn ThrLysVal·
          MluI
1621 GGACAAGACC GTTGCGCCCT CGACATGCAG CAAGCCCACG ACGCGTCATC ACCACCATCA
          CCTGTTCTGG CAACCGGGGA GCTGTACGTC GTTCGGGTGC TGCGCAGTAG TGGTGGTAGT
          ·AspLysThr ValAlaProSer ThrCysSer LysProThr ThrArgHisHis HisHisHis·
1671 CCATCCGCGG TAG
          GGTAGGCGCC ATC
          ·HisProArg ***

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit der ompA-Signalsequenz, der sich die Sequenz für die HC_{SA2 90} anschließt. Eingezeichnet sind auch die Erkennungssequenzen für *MluI*, *SacI* und *KpnI*. Die Basenpaare, in denen sich die schwere Kette von HC_{SA2 23} unterscheidet sind grau und fett dargestellt. Die mutierten Aminosäuren sind fett markiert.

B.7: SEQUENZ FÜR DIE SCHWERE KETTE DES F_{AB}-FRAGMENTS SA2 23 AUF DEM PHAGEMID PASK111R_{AB}-P3

```

906          ATGA AAAAGACAGC TATCGCGATT GCAGTGGCAC TGGCTGGTTT
          TACT TTTTCTGTCTG ATAGCGCTAA CGTCACCGTG ACCGACCAAA
          MetLys LysThrAla IleAlaIle AlaValAlaLeu AlaGlyPhe
OmpA-HCSA2 23 -21
          AsiSI
961  CGCTACCGTA GCGATCGCCC AGTCGATGAA GGAGTCCGAG GGAGACCTGG TCAAGCCTGG
          GCGATGGCAT CGCTAGCGGG TCAGTACTT CCTCAGGCTC CCTCTGGACC AGTTCCGGACC
          ·AlaThrVal AlaIleAlaGln SerMetLys GluSerGlu GlyAspLeuVal LysProGly
          +1
1021 GGCATCCCTG ACACTCACCT GCAAAGCCTC TGGATTCACC CTCAGTAGAT ATGGAATGAA
          CCGTAGGGAC TGTGAGTGA CGTTTCGGAG ACCTAAGTGG GAGTCATCTA TACCTTACTT
          ·AlaSerLeu ThrLeuThrCys LysAlaSer GlyPheThr LeuSerArgTyr GlyMetAsn
1081 CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAGTGGATC GGATACATTG CTACTGGTAG
          GACCCAGGCG GTCCGAGGTC CCTTCCCCGA CCTCACCTAG CCTATGTAAC GATGACCATC
          ·TrpValArg GlnAlaProGly LysGlyLeu GluTrpIle GlyTyrIleAla ThrGlySer
1141 TGGTGGTGGC ACTTACTACG CGAGCTGGGC GAAAGCCGA GTCACCAGCT CCCAAACCTC
          ACCACCACCG TGAATGATGC GCTCGACCCG CTTTCCGGCT CAGTGGTCGA GGTTTGGAG
          ·GlyGlyGly ThrTyrTyrAla SerTrpAla LysGlyArg ValThrSerSer GlnThrSer
1201 GTCGACCACG GTGATCTCTG AAATGACCAG TCTGACAGCC GCGGACACGG CCACATATTT
          CAGCTGGTGC CACTAAGACG TTTACTGGTC AGACTGTCTG CGCCTGTGCC GGTGGATAAA
          ·SerThrThr ValIleLeuGln MetThrSer LeuThrAla AlaAspThrAla ThrTyrPhe
1261 CTGTGCGAGA GGAAGTATG TTGGTAGTCA TTATTATATG GGATACTTTA ACTTGTGGGG
          GACACGCTCT CCTGACATAC AACCATCAGT AATAATATAC CCTATGAAAT TGAACACCCC
          ·CysAlaArg GlyLeuTyrVal GlySerHis TyrTyrMet GlyTyrPheAsn LeuTrpGly
1321 CCCAGGCACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGG GCAACCTAAG GCTCCATCAG TCTTCCCCT
          GGGTCCGTGG GACCAGTGGC AGAGGAGTCC CGTGGATTC CGAGGTAGTC AGAAGGGTGA
          ·ProGlyThr LeuValThrVal SerSerGly GlnProLys AlaProSerVal PheProLeu
          SacI
1381 GGCCCCCTGC TCGGGGACA CACCGAGCTC CACGGTGACC CTGGGCTGCC TGGTCAAAGG
          CCGGGGACG ACGCCCTGT GTGGCTCGAG GTGCCACTGG GACCCGACGG ACCAGTTTCC
          ·AlaProCys CysGlyAspThr ProSerSer ThrValThr LeuGlyCysLeu ValLysGly
1441 CTACCTCCCG GAGCCAGTGA CCGTGACCTG GAACTCGGGC ACCCTCACCA ATGGGGTACG
          GATGGAGGGC CTCGGTCACT GGCCTGGAC CTTGAGCCCG TGGGAGTGGT TACCCCATGC
          ·TyrLeuPro GluProValThr ValThrTrp AsnSerGly ThrLeuThrAsn GlyValArg
1501 CACCTTCCCG TCCGTCCGGC AGTCCTCAGG CCTCTACTCG CTGAGCAGCG TGGTGAGCGT
          GTGAAGGGC AGGCAGGCCG TCAGGAGTCC GGAGATGAGC GACTCGTCTGC ACCACTCGCA
          ·ThrPhePro SerValArgGln SerSerGly LeuTyrSer LeuSerSerVal ValSerVal
1561 GACCTCAAGC AGCCAGCCG TCACCTGCAA CGTGGCCCAC CCAGCCACCA ACACCAAAGT
          CTGGAGTTCG TCGGTCCGGC AGTGGACGTT GCACCGGGTG GGTGGTGGT TGTGGTTTCA
          ·ThrSerSer SerGlnProVal ThrCysAsn ValAlaHis ProAlaThrAsn ThrLysVal
          MluI
1621 GGACAAGACC GTTGCGCCCT CGACATGCAG CAAGCCCACG ACGCGTCATC ACCACCATCA
          CCTGTCTGG CAACGCGGGA GCTGTACGTC GTTCGGGTGC TGCGCAGTAG TGGTGGTAGT
          ·AspLysThr ValAlaProSer ThrCysSer LysProThr ThrArgHisHis HisHisHis
1671 CCATCCGCGG TAG
          GGTAGGCGCC ATC
          ·HisProArg ***

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit der ompA-Signalsequenz, der sich die Sequenz für die HC_{SA2 23} anschließt. Eingezeichnet sind auch die Erkennungssequenzen für *MluI*, *SacI* und *KpnI*. Die Basenpaare in denen sich die schwere Kette von HC_{SA2 90} unterscheidet, sind grau und fett dargestellt. Die Aminosäureunterschiede sind fett markiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. (2000) Cellular and Molecular Immunology. 4th Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- ASSIL, H.I., SHETH, H., SPORNS, P. (1992) An ELISA for sulfonamide detection using affinity-purified polyclonal antibodies. *Food Res. Int.* 25: 343-353.
- ARACELI, M.H., SALGADO, H., THIEFFRY, D., COLLADO-VIDES, J. (1998) RegulonDB: a database on transcriptional regulation in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* 26: 55-59
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E. (1994) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, New York.
- BACA, M., PRESTA, L.G., O'CONNOR, S.J., WELLS, J.A. (1997) Antibody humanization using monovalent phage display. *J Biol Chem* 272: 10678-10684.
- BAEK, H., SUK, K.H., KIM, Y.H., CHA, S. (2002) An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Res* 30: e18.
- BARBAS, C.F., 3RD, KANG, A.S., LERNER, R.A., BENKOVIC, S.J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7978-7982.
- BARBAS, C.F., 3RD, BURTON, D.R., SCOTT, J.K., GREGG, J.S. (2001) Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- BARTLETT, J.M.S., STIRLING, D. (2003) PCR Protocols. 2nd Edition. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- BAUER, C. (2007) Sequenzierung SA Klone # 1, 19, 27, 31. Persönliche Mitteilung v. 10.02.2007. Vaterstetten.
- BERGWERFF, A.A., SCHLOESSER, J. (2003) Antibiotics and Drugs, Residue Determination. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Hrsg.) *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. 2nd Edition. Elsevier, London: 154-161
- BIRD, R.E., HARDMAN, K.D., JACOBSON, J.W., JOHNSON, S., KAUFMAN, B.M., LEE, S.M., LEE, T., POPE, S.H., RIORDAN, G.S., WHITLOW, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242: 423-426.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- BODER, E.T., WITTRUP, K.D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 15: 553-557.
- BOEKE, J.D., MODEL, P., ZINDER, N.D. (1982) Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane. *Mol Gen Genet* 186: 185-192.
- BOXALL, A.B., BLACKWELL, P., CAVALLO, R., KAY, P., TOLLS, J. (2002) The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol Lett* 131: 19-28.
- BRADBURY, A., PERSIC, L., WERGE, T., CATTANEO, A. (1993) Use of living columns to select specific phage antibodies. *Biotechnology (NY)* 11: 1565-1569.
- BRADBURY, A., VELAPPAN, N., VERZILLO, V., OVECKA, M., CHASTEEN, L., SBLATTERO, D., MARZARI, R., LOU, J., SIEGEL, R., PAVLIK, P. (2003a) Antibodies in proteomics II: screening, high-throughput characterization and downstream applications. *Trends Biotechnol* 21: 312-317.
- BRADBURY, A., VELAPPAN, N., VERZILLO, V., OVECKA, M., CHASTEEN, L., SBLATTERO, D., MARZARI, R., LOU, J., SIEGEL, R., PAVLIK, P. (2003b) Antibodies in proteomics I: generating antibodies. *Trends Biotechnol* 21: 275-281.
- BRAMAN, J., PAPWORTH, C., GREENER, A. (1996) Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* 57: 31-44.
- BREGEGERE, F., ENGLAND, P., DJAVADI-OHANIAN, L., BEDOUELLE, H. (1997) Recognition of E. coli tryptophan synthase by single-chain Fv fragments: comparison of PCR-cloning variants with the parental antibodies. *J Mol Recognit* 10: 169-181.

- BREITLING, F., DUBEL, S., SEEHAUS, T., KLEWINGHAUS, I., LITTLE, M. (1991) A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104: 147-153.
- BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M., SHORT, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*: 376-379.
- BUTLER, M.A., HOAGLAND, R.E. (1989) Genotoxicity assessment of atrazine and some major metabolites in the Ames test. *Bull Environ Contam Toxicol* 43: 797-804.
- CARTER, P., KELLEY, R.F., RODRIGUES, M.L., SNEDECOR, B., COVARRUBIAS, M., VELLIGAN, M.D., WONG, W.L., ROWLAND, A.M., KOTTS, C.E., CARVER, M.E., ET AL. (1992) High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology (NY)* 10: 163-167.
- CERNY, A., PICHLER, W. (1998) Allergy to antibacterials: the problem with beta-lactams and sulfonamides. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 7 Suppl 1: 23-36.
- CHENNA, R., SUGAWARA, H., KOIKE, T., LOPEZ, R., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G., THOMPSON, J.D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-3500.
- CHIEN, A., EDGAR, D.B., TRELA, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127: 1550-1557.
- CHIU, Y.W., CHEN, R., LI, Q.X., KARU, A.E. (2000) Derivation and properties of recombinant Fab antibodies to coplanar polychlorinated biphenyls. *J Agric Food Chem* 48: 2614-2624.
- CLACKSON, T., HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352: 624-628.
- CLARK, M.A., PAPAIOANNOU, A., HAWKINS, N.J., FIDDES, R.J., WARD, R.L. (1997) Isolation of human anti-c-erbB-2 Fabs from a lymph node-derived phage display library. *Clin Exp Immunol* 109: 166-174.
- COOMBER, D.W.J., CLARK, M.A., HAWKINS, N.J., WARD, R.L. (1999) Generation of anti-p53 Fab fragments from individuals with colorectal cancer using phage display. *J Immunol* 163: 2276-2283
- COOMBER, D.W.J. (2002) Panning of Antibody Phage-Display Libraries. In: O'Brien, P.M., Aitken, R. (Hrsg) *Antibody Phage Display*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey: 133-145
- CORISDEO, S., WANG, B. (2004) Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. *Protein Expr Purif* 34: 270-279.
- COURTNEY, B.C., WILLIAMS, K.C., SCHLAGER, J.J. (1995) A phage display vector with improved stability, applicability and ease of manipulation. *Gene* 165: 139-140.
- CREIGHTON, T.E. (1997) How important is the molten globule for correct protein folding? *Trends Biochem Sci* 22: 6-10.
- CUMMINGS, P.J., HOOPER, N.E., ROWLAND, S.S. (1998) Generation of a recombinant bacteriophage antibody library to mycobacterium tuberculosis. *Hybridoma* 17: 151-156.
- DANKESREITER, S., HOESS, A., SCHNEIDER-MERGENER, J., WAGNER, H., MIETHKE, T. (2000) Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF-alpha production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J Immunol* 164: 4804-4811.
- DAVIES, J., RIECHMANN, L. (1995) Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology (NY)* 13: 475-479.
- DE HAAS, C.J., VAN DER TOL, M.E., VAN KESSEL, K.P., VERHOEF, J., AND VAN STRIJP, J.A. (1998) A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on amino acids 27-39 of serum amyloid P component inhibits lipopolysaccharide-induced responses in human blood. *J Immunol* 161: 3607-3615.
- DE HAARS, H.J., VAN NEER, N., REURS, A., HUFTON, S.E., ROOVERS, R.C., HENDERIKX, P. (1999) A large non-immuneized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* 274: 218-230

- DEISENHOFER, J., MICHEL, H. (1989) The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Biosci Rep* 9: 383-419.
- DE PREVAL, C., PINK, J.R., MILSTEIN, C. (1970) Variability of interchain binding of immunoglobulins. Interchain bridges of mouse IgG2a and IgG2b. *Nature* 228: 930-932.
- DI CORCIA, A., CRESCENZ, C., GUERRIERO, E.R.S., (1997) Ultratrace Determination of Atrazine and Its Six Major Degradation Products in Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray/Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol* 31: 1658-1663.
- DON, R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K., MATTICK, J.S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- DORFMÜLLER, S. (2002) Herstellung, Expression und Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern und Immuntoxinen gegen *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Verticillium dahlia*. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, Deutschland.
- DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- DRABER, W., KLUTH, J.F., TIETJEN, K., TREBST, A. (1991) Herbizide in der Photosyntheseforschung. *Angew Chem* 103: 1650-1663.
- DUENAS, M., AYALA, M., VAZQUEZ, J., OHLIN, M., SODERLIND, E., BORREBAECK, C.A., GAVILONDO, J.V. (1995b) A point mutation in a murine immunoglobulin V-region strongly influences the antibody yield in *Escherichia coli*. *Gene* 158: 61-66.
- EQUIBIO, L. (2004) Electroporation and Optimisation Guide. Issue 5. Erlangen
- EU Regulation (1999) Regulation 508, L60 (9-3-1999): 16-52.
- EU Regulation (2004) Regulation 91/414, EEC (10-3-2004): Annex 1
- EVAN, G.I., LEWIS, G.K., RAMSA, Y.G., BISHOP, J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5: 3610-3616
- FIEDLER, M., SKERRA, A. (2001) proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene* 274: 111-118.
- FISCHER-SCHERL, T., VEESER, A., HOFFMANN, R.W., KUHNHAUSER, C., NEGELE, R.D., EWRINGMANN, T. (1991) Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Environ Contam Toxicol* 20: 454-461.
- FLING, S.P., GREGERSON, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155: 83-88.
- FOTI, M., GRANUCCI, F., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., SPREAFICO, A., ACKERMANN, M., SUTER, M. (1998) Rabbit monoclonal Fab derived from a phage display library. *J Immunol Methods* 213: 201-212.
- FRANGIONE, B. (1969) Correlation of the c-terminal sequence of rabbit light chains with allotypes. *FEBS Lett* 3: 341-342.
- FUERST, E.P., NORMANN, M.A. (1991) Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science*: 458-464.
- GARCIA, I., BRANDT, D.C., BENAMMAR, A., CAZENAVE, P.A., JATON, J.C. (1982) BASILEA rabbits express two types of immunoglobulin light chains: lambda and kappa-like. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4391-4394.
- GARRETT, S.D., APPLEFORD, D.J.A., WYATT, G.M., LEE, H.A., MORGAN, M.R.A. (1997) Production of a recombinant anti-Parathion antibody (scFv); stability in methanolic food extracts and comparison to an anti-parathion monoclonal antibody. *J Agric Food Chem* 45: 4183-4189.
- GAST, A., KNUESLI, E., GYSIN, H. (1955) Über Pflanzenwachstumsregulatoren. *Experientia* XI: 107-108.
- GAVALCHIN, J., KATZ, S.E. (1994) The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *J AOAC Int* 77: 481-485.

- GENNITY, J., GOLDSTEIN, J., INOUE, M. (1990) Signal peptide mutants of *Escherichia coli*. *J Bioenerg Biomembr* 22: 233-269.
- GEORGIU, G., STATHOPOULOS, C., DAUGHERTY, P.S., NAYAK, A.R., IVERSON, B.L., CURTISS, R., 3RD. (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol* 15: 29-34.
- GIBSON, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Dissertation. University of Cambridge, England.
- GIERSCH, T., HOCK, B. (1990) Production of monoclonal antibodies for the determination of s-triazines with enzyme immunoassays. *Food Agric Immunol.* 2: 85-97
- GIERSCH, T., KRAMER, K., HOCK, B. (1993) Optimization of a monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of terbuthylazine. *Sci Total Environ* 132: 435-448.
- GILL, S.C., VON HIPPEL, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem* 182: 319-326.
- GIUDICELLI, V., DUROUX, P., GINESTOUX, C., FOLCH, G., JABADO-MICHALOUD, J., CHAUME, D., LEFRANC, M.P. (2006) IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 34: 781-784.
- GLOCKSHUBER, R., MALIA, M., PFITZINGER, I., PLUCKTHUN, A. (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29: 1362-1367.
- GOLSHANI, A., KROGAN, N.J., XU, J., PACAL, M., YANG, X.C., IVANOV, I., PROVIDENTI, M.A., GANOZA, M.C., IVANOV, I.G., ABOUHAIIDAR, M.G. (2004) *Escherichia coli* mRNAs with strong Shine/Dalgarno sequences also contain 5' end sequences complementary to domain #17 on the 16S ribosomal RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 978-983.
- GRANT, S.D., PORTER, A.J., HARRIS, W.J. (1999) Comparative sensitivity of immunoassays for haptens using monomeric and dimeric antibody fragments. *J Agric Food Chem* 47: 340-345.
- GRIEP, R.A., VAN TWISK, C., VAN DER WOLF, J.M., SCHOTS, A. (1999) Fluobodies: green fluorescent single-chain Fv fusion proteins. *J Immunol Methods* 230: 121-130.
- GROARKE, J.M., MAHONEY, W.C., HOPE, J.N., FURLONG, C.E., ROBB, F.T., ZALKIN, H., HERMODSON, M.A. (1983) The amino acid sequence of D-ribose-binding protein from *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 258: 12952-12956.
- GRUBER, R. (2007) Antikörper. In: Ream, A.M., Rauch, P. (Hrsg.) *Immunoassay*. Spektrum Verlag, München
- GUO, Y.C., ZHOU, Y.F., ZHANG, X.E., ZHANG, Z.P., QIAO, Y.M., BI, L.J., WEN, J.K., LIANG, M.F., ZHANG, J.B. (2006) Phage display mediated immuno-PCR. *Nucleic Acids Res* 34: 362.
- HALL, C.J., O'BRIEN, G.M., WEBB, S.R. (1997) Display technology for environmental analysis. *American Chem Soc*: 22-37.
- HALLER, M.Y., MULLER, S.R., MCARDELL, C.S., ALDER, A.C., SUTER, M.J. (2002) Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 952: 111-120.
- HAMERS-CASTERMAN, C., ATARHOUCHE, T., MUYLDERMANS, S., ROBINSON, G., HAMERS, C., SONGA, E.B., BENDAHMAN, N., HAMERS, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.
- HAMSCHEER, G., PAWELZICK, H.T., HOPER, H., NAU, H. (2005) Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ Toxicol Chem* 24: 861-868.
- HANES, J., PLÜCKTHUN, A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci* 94: 4937-4942.
- HARAYAMA, S. (1998) Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends Biotechnol* 16: 76-82.

- HAYES, T.B., COLLINS, A., LEE, M., MENDOZA, M., NORIEGA, N., STUART, A.A., VONK, A. (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5476-5480.
- HAYHURST, A., HARRIS, W.J. (1999) Escherichia coli skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Expr Purif.* 15: 336-43.
- HOCHULI, E., BANNWARTH, W., DÖBELI, R., GENTZ, R., STÜBER, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology (NY)* 6: 1321-1325.
- HOCK, B. (1995) Immunochemical Assay of Environmental Pollutants using Pesticides as an Example. In: Hock, B., Niessner, R. (Hrsg.) *Immunochemical Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water*. VCH, Heidelberg: 3-24.
- HOCK, B., KRAMER, K., SEIFERT, M. (2001) Environmental analysis using antibody and receptor based techniques. *Int J Environ Anal Chem* 78: 289-303.
- HOFER, T., TANGKEANGSIRISIN, W., KENNEDY, M.G., MAGE, R.G., RAIKER, S.J., VENKATESH, K., LEE, H., GIGER, R.J., RADER, C. (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.
- HOLMBERG, S.D., OSTERHOLM, M.T., SENGER, K.A., COHEN, M.L. (1984) Drug-resistant Salmonella from animals fed antimicrobials. *N Engl J Med* 311: 617-622.
- HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D., JOHNSON, K.S., CHISWELL, D.J., HUDSON, P., WINTER, G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19: 4133-4137.
- HOOGENBOOM, H.R., DE BRUINE, A.P., HUFTON, S.E., HOET, R.M., ARENDS, J.W., ROOVERS, R.C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4: 1-20.
- HOOGENBOOM, H.R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23: 1105-1116.
- HOPP, T.P., PRICKET, K.S., PRICE, V.L., LIBBY, R.T., MARCH, C.J., CERETTI, D.P., URDAL, D.L., CONLON, P.J. (1988) A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *BioTechnology* 6:1204-1210
- HORN, G., HANKE, W. (1980) Hämatologische Veränderungen bei Karpfen unter dem Einfluss von Atrazin. Dissertation. Zoologisches Institut Universität Karlsruhe, Deutschland.
- HUDSON, P.J., SOURIAU, C. (2003) Engineered antibodies. *Nat Med* 9: 129-134.
- HUST, M., DÜBEL, S. (2004) Phage Display Vectors for the In Vitro Generation of Human Antibody Fragments. In: Burns, R. (Hrsg.) *Immunochemical Protocols*. 3rd Edition. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- HUST, M., DUBEL, S. (2004b) Mating antibody phage display with proteomics. *Trends Biotechnol* 22: 8-14.
- IM, S.Y., KIM, K.S., YUN, C.O., KIM, J.H., YI, K.S., CHUNG, J. (2006) Generation of a rabbit V(H) domain antibody polyspecific to c-Met and adenoviral knob protein. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 305-312.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- JAIN, R.G., RUSCH, S.L., KENDALL, D.A. (1994) Signal peptide cleavage regions. Functional limits on length and topological implications. *J Biol Chem* 269: 16305-16310.
- JANEWAY, C.A., TRAVES, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. (2002) Immunologie. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- JASPER, P.J., ZHAI, S.K., KALIS, S.L., KINGZETTE, M., KNIGHT, K.L. (2003) B lymphocyte development in rabbit: progenitor B cells and waning of B lymphopoiesis. *J Immunol* 171: 6372-6380.

- JEANNOT, R., SABIK, H., SAUVARD, E., GENIN, E. (2000) Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *J Chromatogr A* 879: 51-71.
- JOHANSEN, L.K., ALBRECHTSEN, B., ANDERSON, H.W., ENGBERG, J. (1995) pFab60: a new, efficient vector for expression of antibody Fab fragments displayed on phage. *Prot Eng* 8: 1063-1067.
- JONES, P.T., DEAR, P.H., FOOTE, J., NEUBERGER, M.S., WINTER, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522-525.
- JORGENSEN, S.E., HALLING-SORENSEN, B. (2000) Drugs in the environment. *Chemosphere* 40: 691-699.
- JUNG, F., GEE, S.J., HARRISON, R.O., GOODROW, M.H., KARU, A.E., BRAUN, A.L., HAMMOCK, B.D. (1989) Use of immunochemical techniques for the analysis of pesticides. *Pestic Sci* 26: 303-317.
- JUNG, S., PLUCKTHUN, A. (1997) Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Eng* 10: 959-966.
- KABAT, E.A., WU, T.T., PERRY, H.M., GOTTESMAN, K.S., FOELLER, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest In: *U. D. o. H. a. H. Services* . 5th Edition. US Government Printing Office.
- KARU, A.E., SCHOLTOV, K.-B.G., ZHANG, G., BELL, C.W. (1994) Recombinant antibodies to small analytes and prospects for deriving them from synthetic combinatorial libraries. *Food Agric Immunol* 6: 277-286.
- KECK, G.G., BOSTVIRONNOIS, C., BRAQUET, E. (1991) Veterinary toxicology of a model herbicide-Atrazine. *Rev Mde Vet* 142: 481-488.
- KIEKE, M.C., CHO, B.K., BODER, E.T., KRANZ, D.M., WITTRUP, K.D. (1997) Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng* 10: 1303-1310.
- KIKUCHI, Y., YODA, K., YAMASAKI, M., TAMURA, G. (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: 5671-5678.
- KIM, Y.S., JUNG, H.S., MATSUURA, T., LEE, H.Y., KAWAI, T., GU, M.B. (2007) Electrochemical detection of 17beta-estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosens Bioelectron* 22: 2525-2531.
- KIRSCH, M., ZAMAN, M., MEIER, D., DUBEL, S., HUST, M. (2005) Parameters affecting the display of antibodies on phage. *J Immunol Methods* 301: 173-185.
- KNIGHT, K.L., MARTENS, C.L., STOKLOSA, C.M., SCHNEIDERMAN, R.D. (1984) Genes encoding alpha-heavy chains of rabbit IgA: characterization of cDNA encoding IgA-g subclass alpha-chains. *Nucleic Acids Res* 12: 1657-1670.
- KNIGHT, K.L., CRANE, M.A. (1995) Development of the antibody repertoire in rabbits. *Ann NY Acad Sci* 764: 198-206.
- KOEBER, R., FLEISCHER, C., LANZA, F., BOOS, K.S., SELLERGRENN, B., BARCELO, D. (2001) Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecularly imprinted polymers. *Anal Chem* 73: 2437-2444.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- KONTERMANN, R., DÜBEL, S.E. (2001) Antibody Engineering. Springer Verlag, Heidelberg.
- KRAMER, K., HOCK, B. (1995) Rekombinante Antikörper in der Umweltanalytik. *Lebensmittel- & Biotechnologie* 2: 49-55.
- KRAMER, K., HOCK, B. (1996a) Recombinant Single-chain Antibodies against s-Triazines. *Food Agric Immunol* 8: 97-109.
- KRAMER, K., HOCK, B. (1996b) Recombinant antibodies for pesticide immunoanalysis. In: Beier, R., Stanker, L. (Hrsg.) *Immunoassays for residue analysis – food safety*. ACS Symposium Series: 471-484. Oxford University Press. New York.

- KRAMER, K., FIEDLER, M., SKERRA, A., HOCK, B. (2002a) A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of F(ab) fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability. *Biosens Bioelectron* 17: 305-313.
- KRAMER, K. (2002b) Evolutionary affinity and selectivity optimization of a pesticide-selective antibody utilizing a hapten-selective immunoglobulin repertoire. *Environ Sci Technol* 36: 4892-4898.
- KRAMER, R.A., COX, F., VAN DER HORST, M., VAN DER OUDENRIJN, S., RES, P.C., BIA, J., LOGTENBERG, T., DE KRUIF, J. (2003) A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. *Nucleic Acids Res* 31: e59.
- KREBBER, A., BORNHAUSER, S., BURMESTER, J., HONEGGER, A., WILLUDA, J., BOSSHARD, H.R., PLUCKTHUN, A. (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.
- KRETZSCHMAR, T., GEISER, M. (1995) Evaluation of antibodies fused to minor coat protein III and major coat protein VIII of bacteriophage M13. *Gene* 155: 61-65.
- KUSHARYOTO, W., PLEISS, J., BACHMANN, T.T., SCHMID, R.D. (2002) Mapping of a hapten-binding site: molecular modeling and site-directed mutagenesis study of an anti-atrazine antibody. *Protein Eng* 15: 233-241.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAMM, M.E., FRANGIONE, B. (1972) Intrachain disulphide bridges of rabbit immunoglobulin light chains of allotypes b4 and b5. *Biochem J* 128: 1357-1359.
- LANG, I.M., BARBAS, C.F., 3RD, SCHLEEF, R.R. (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: 295-298.
- LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID, R.D. (2001) High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* 255: 103-114.
- LANGHAMMER, J.P. (1989) Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Dissertation. Universität Bonn, Deutschland.
- LANNING, D., ZHU, X., ZHAI, S.K., KNIGHT, K.L. (2000) Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunol Rev* 175: 214-228.
- LANNING, D., JASPER, P., KNIGHT, K. (2002) IgH haplotype exclusion in rabbits. *Semin Immunol* 14: 163-168; discussion 161-220.
- LATHA, D., GEETHA, M., RAMADASS, P., NARAYANAN, R.B. (2007) Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 119: 278-286.
- LEE, H.J., WATANABE, T., GEE, S.J., HAMMOCK, B.D. (2003) Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine deltamethrin residues in milk. *Bull Environ Contam Toxicol* 71: 14-20.
- LEFRANC, M.P., GIUDICELLI, V., GINESTOUX, C., BODMER, J., MULLER, W., BONTROP, R., LEMAITRE, M., MALIK, A., BARBIE, V., CHAUME, D. (1999) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 27: 209-212.
- LEFRANC, M.P., GIUDICELLI, V., KAAS, Q., DUPRAT, E., JABADO-MICHALOUD, J., SCAVINER, D., GINESTOUX, C., CLEMENT, O., CHAUME, D., LEFRANC, G. (2005) IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res* 33: D593-597.
- LENNARD, S. (2002) Standard Protocols for the Construction of scFv Libraries. In: O'Brien, P.M., Aitken, R. (Hrsg) *Antibody Phage Display*. Humana Press Inc, Totowa, NJ: 133-145

- LERNER, B.H. (1991) Scientific evidence versus therapeutic demand: the introduction of the sulfonamides revisited. *Ann Intern Med* 115: 315-320.
- LI, L., CAMPBELL, D.A., BENNETT, P.K., HENION, J. (1996) Acceptance criteria for ultratrace HPLC-tandem mass spectrometry: quantitative and qualitative determination of sulfonylurea herbicides in soil. *Anal Chem* 68: 3397-3404.
- LI, J.S., LI, X.W., YUAN, J.X., WANG, X. (2000) Determination of sulfonamides in swine meat by immunoaffinity chromatography. *J AOAC Int* 83: 830-836.
- LIU, R.S., HUANG, H., YANG, Q., LIU, W.Y. (2002) Purification of alpha-sarcin and an antifungal protein from mold (*Aspergillus giganteus*) by chitin affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 25: 50-58.
- LØSET, G.A., LUNDE, E., BOGEN, B., BREKKE, O.H., SANDLIE, I. (2007) Functional phage display of two murine alpha/beta T-cell receptors is strongly dependent on fusion format, mode and periplasmic folding assistance. *Protein Eng Des Sel* 20: 461-72
- LOWMAN, H.B., BASS, S.H., SIMPSON, N., WELLS, J.A. (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* 30: 10832-10838.
- LÜLLMANN, H., MOHR, K. (1999) Pharmakologie und Toxikologie. 14. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- LUNDBERG, K.S., SHOEMAKER, D.D., ADAMS, M.W., SHORT, J.M., SORGE, J.A., MATHUR, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6.
- MAGE, R.G., MCCARTNEY-FRANCIS, N.L., KOMATSU, M., LAMOYI, E. (1987) Evolution of genes for allelic and isotypic forms of immunoglobulin kappa chains and of the genes for T-cell receptor beta chains in rabbits. *J Mol Evol* 25: 292-299.
- MAGE, R.G. (1998) Immunology of Lagomorphs. In: Griebel, P., Pastoret, P.P. (Hrsg.) *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press Limited, London.
- MAGE, R.G., LANNING, D., KNIGHT, K.L. (2006) B cell and antibody repertoire development in rabbits: The requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol* 30: 137-153.
- MALONE, J.A. (1994) pCANTAB 5E: A vector designed for the expression of antibody F variable regions as phage-displayed or soluble single-chain proteins (scFv). *Direct submission*, Pharmacia Biotech Inc.
- MANCLÚS, J.J., PRIMO, J., MONTOYA, A. (1996) Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 1. Monoclonal antibody production and immunoassay design. *J Agric Food Chem* 44: 4052-4062.
- MARCO, M.P. (2005) Persönliche Mitteilung vom 20.12.2005, Barcelona.
- MARKS, J.D., HOOGENBOOM, H.R., BONNERT, T.P., MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222: 581-597.
- MARTINEAU, P., JONES, P., WINTER, G. (1998) Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J Mol Biol* 280: 117-127
- MARSHALL, R.J. (2003) Milk Analysis. In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition. 2nd Edition. Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Hrsg.). Academic Press. Burlington, Massachusetts.
- MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G., CHISWELL, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552-554.
- MCCARTNEY-FRANCIS, N., SKURLA, R.M., JR., MAGE, R.G., BERNSTEIN, K.E. (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 USA* 81: 1794-1798.
- MIGLIORE, L., BRAMBILLA, G., COZZOLINO, S., GAUDIO, L. (1995) Effects on plants of suphadimethoxine used in intensive farming. *Agric Ecosyst Environ* 52: 103-110.

- MILLER, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- MILLER, J.H., DRAPER, L.R., KEMPNER, E.S. (2003) Direct radiation damage is confined to a single polypeptide in rabbit immunoglobulin G. *Biophys J* 84: 2781-2785.
- MOVVA, N.R., NAKAMURA, K., INOUE, M. (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.
- NIEBA, L., HONEGGER, A., KREBBER, C., PLUCKTHUN, A. (1997) Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng* 10: 435-444.
- O'DONNELL, I.J., FRANGIONE, B., PORTER, R.R. (1970) The disulphide bonds of the heavy chain of rabbit immunoglobulin G. *Biochem J* 116: 261-268.
- PACE, C.N., VAJDOS, F., FEE, L., GRIMSLEY, G., GRAY, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 11: 2411-2423.
- PANNA-ORGANISATION (1997, Links 2008) Herbicides Linked to Infant Health. www.ibiblio.org/london/permaculture/mailarchives/sanet2/msg00678.html.
- PIEHLER, J., BRECHT, A., GIERSCH, T., HOCK, B., GAUGLITZ, G. (1997) Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J Immunol Methods* 201: 189-206.
- PIPE, R.K. (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel Mytilus edulis. *Dev Comp Immunol* 16: 111-122.
- PLÜCKTHUN, A. & SKERRA, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli. *Methods Enzymol.* 178: 497-515.
- POPKOV, M., MAGE, R.G., ALEXANDER, C.B., THUNIVALAPPIL, S., BARBAS, C.F., 3RD, RADER, C. (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: 325-335.
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599.
- PRAHL, J.W., MANDY, W.J., TODD, C.W. (1969) The molecular determinants of the A11 and A12 allotypic specificities in rabbit immunoglobulin. *Biochemistry* 8: 4935-4940.
- PRATAP, J., DIKSHIT, K.L. (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.
- PULLEN, S., HOCK, B. (1995a) Development of Enzyme Immunoassays for the detection of pyrethroid insecticides. 1. Monoclonal antibodies for allethrin. *Anal Lett* 28: 765-779.
- PULLEN, S., HOCK, B. (1995b) Development of Enzyme Immunoassays for the detection of pyrethroid insecticides. 2. Polyclonal antibodies for pyrethroid insecticides. *Anal Lett* 28: 781-795.
- RADER, C., BARBAS, C.F., 3RD. (1997) Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol* 8: 503-508.
- RADER, C., CHERESH, D.A., BARBAS, C.F., 3RD. (1998) A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8910-8915.
- RADER, C., RITTER, G., NATHAN, S., ELIA, M., GOUT, I., JUNGBLUTH, A.A., COHEN, L.S., WELT, S., OLD, L.J., BARBAS, C.F., 3RD. (2000) The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies. *J Biol Chem* 275: 13668-13676.
- RANGONE, A.G., RIZZELLO, N. (1960) A new sulfonamide with prolonged action in urology. *Minerva Med* 51: 1238-1240.
- RAU, D., KRAMER, K., HOCK, B. (2002) Cloning, functional expression and kinetic characterization of pesticide-selective Fab fragment variants derived by molecular evolution of variable antibody genes. *Anal Bioanal Chem* 372: 261-267.

- REITER, Y., PASTAN, I. (1998) Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol* 16: 513-520.
- REZNIKOFF, W., GOLD, L. (1986) Maximizing gene expression. Butterworth: Stoneham, Massachusetts.
- RIDDER, R., SCHMITZ, R., LEGAY, F., GRAM, H. (1995) Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology (NY)* 13: 255-260.
- RIEDER, M.J., KRAUSE, R., BIRD, I.A. (1995) Time-course of toxicity of reactive sulfonamide metabolites. *Toxicology* 95: 141-146.
- RINI, J.M., SCHULZE-GAHMEN, U., WILSON, I.A. (1992) Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 255: 959-965.
- RODRIGUEZ, M., ORESCAN, D.B. (1998) Confirmation and quantitation of selected sulfonylurea, imidazolinone, and sulfonamide herbicides in surface water using electrospray LC/MS. *Anal Chem* 70: 2710-2717.
- ROLOFF, B.D., BELLUCK, D.A., MEISNER, L.F. (1992) Cytogenetic studies of herbicide interactions in vitro and in vivo using atrazine and linuron. *Arch Environ Contam Toxicol* 22: 267-271.
- RONDOT, S., KOCH, J., BREITLING, F., DUBEL, S. (2001) A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* 19: 75-78.
- RUIZ, M.G., V., GINESTOUX, C., STOEHR, P., ROBINSON, J., BODMER, S.G., BONTROP, R., LEMAITRE, M., LEFRANC, G., CHAUME, D., LEFRANC, M.P. (2000) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucl Acid Res*: 219-221.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. (2003) Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3th Edition. Cold Spring Harbor Press, New York.
- SBLATTERO, D., BRADBURY, A. (2000) Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18: 75-80.
- SCHEIN, C.H., NOTEBORN, M.H.M. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favoured by lower growth temperature. *Bio Technology* 6: 291-294.
- SCHLAPSCHY, M., GRIMM, S., SKERRA, A. (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. (2001) Evolutes Protein-Design eines "Anticalins" mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. Dissertation. Technische Universität München, Deutschland.
- SCHMIDT, T. G. M., SKERRA, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Prot. Eng.* 6: 109-122.
- SCHIWECK, W., SKERRA, A. (1995) Fermenter production of an artificial Fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins Struct Funct Genet* 23: 561-565.
- SENGELOV, G., AGERSO, Y., HALLING-SORENSEN, B., BALODA, S.B., ANDERSEN, J.S., JENSEN, L.B. (2003) Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ Int* 28: 587-595.
- SHETH, H.B., SPORNS, P. (1990) Enzyme immunoassay for screening of sulfathiazole in honey. *J Assoc Off Anal Chem* 73: 871-874.
- SHETH, H.B., SPORNS, P. (1991) Development of a Single ELISA for Detection of Sulfonamides. *J Agric Food Chem* 39: 1696-1700.
- SHIMABUKURO, R.H., FREAR, D.S., SWANSON, H.R., WALSH, W.C. (1971) Glutathione conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn. *Plant Physiol* 47: 10-14.

- SHULTZABERGER, R.K., BUCHEIMER, R.E., RUDD, K.E., SCHNEIDER, T.D. (2001) Anatomy of Escherichia coli Ribosome Binding Sites. *J Mol Biol* 313: 215-228.
- SINNING, I. (1992) Herbicide binding in the bacterial photosynthetic reaction center. *Trends Biochem Sci* 17: 150-154.
- SKERRA, A., PLÜCKTHUN, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* 240: 1038-1041.
- SKERRA, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in Escherichia coli. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland.
- SKERRA, A., PFITZINGER, I. & PLÜCKTHUN, A. (1991a) The functional expression of antibody Fvfragments in Escherichia coli: improved vectors and a generally applicable purificationstechnique. *Biotechnology* 9: 273-278.
- SKERRA, A., PLÜCKTHUN, A. (1991b) 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: 971-979.
- Skerra, A. (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 256-262.
- SKERRA, A. (1994a) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* 141: 79-84.
- SKERRA, A. (1994b) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli. *Gene* 151: 131-135.
- SKERRA, A. (2007) Alternative nonantibody scaffolds for molecular recognition. *Prot Technol* 18: 295-304.
- SMITH, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
- SOLOMON, A., SCHMIDT, W., HAVEMANN, K. (1976) Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. XIII. Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases derived from human granulocytes on Bence Jones proteins. *J Immunol* 117: 1010-1014.
- SOLTES, G., BARKER, H., MARMAI, K., PUN, E., YUEN, A., WIERSMA, E.J. (2003) A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions. *J Immunol Methods* 274: 233-244.
- SÖDERLIND, E., DUENAS, BORREBAECK, C.A (1995) Chaperonins in phage display of antibody fragments. *Methods Mol Biol.* 51:343-53.
- SPIEKER-POLET, H., SETHUPATHI, P., YAM, P.C., KNIGHT, K.L. (1995) Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9348-9352.
- SPIEKER-POLET, H., YAM, P.C., KNIGHT, K.L. (2002) Functional analysis of I alpha promoter regions of multiple IgA heavy chain genes. *J Immunol* 168: 3360-3368.
- STAHL, S., UHLEN, M. (1997) Bacterial surface display: trends and progress. *Trends Biotechnol* 15: 185-192.
- STROH, K. (2002, Links 2005) Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in Lebensmitteln und Umwelt. In U. Bayern [ed.], Fachinformation "Umwelt und Gesundheit", www.bayern.de/data/archiv/antibiot_2002.html.
- STYNEN, D., SARFATI, J., GORIS, A., PREVOST, M.C., LESOURD, M., KAMPHUIS, H., DARRAS, V., LATGE, J.P. (1992) Rat monoclonal antibodies against Aspergillus galactomannan. *Infect Immun* 60: 2237-2245.
- SUSANTO, F., REINAUER, H. (1996) Glibenclamide in serum: comparison of high-performance liquid chromatography using fluorescence detector and liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical-ionization (APCI LC/MS). *Anal Bioanal Chem* 356: 352-357.
- SVASTI, J., MILSTEIN, C. (1970) Interchain bridges of mouse IgG1. *Nature* 228: 932-934.

- SVASTI, J., MILSTEIN, C. (1972a) The disulphide bridges of a mouse immunoglobulin G1 protein. *Biochem J* 126: 837-850.
- SVASTI, J., MILSTEIN, C. (1972b) The parallel nature of the interchain disulphide bonds of immunoglobulins. Studies on a mouse IgG1 myeloma protein. *Eur J Biochem* 31: 405-422.
- TAGAKI, H., MORIGANA, Y., TSUCHIYA, M., IKEMURA, H., INOUE, M. (1988) Control of folding of protein secreted by a high expression secretion vector, pIN-III-ompA: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 6: 948-950.
- TANJI, M., KAGEYAMA, T., TAKAHASHI, K. (1991) Occurrence of cathepsin D isozymes with different specificities in monkey skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 798-804.
- TEUBER, M. (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 4: 493-499.
- THIELE-BRUHN, S., SEIBICKE, T., SCHULTEN, H.R., LEINWEBER, P. (2004) Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J Environ Qual* 33: 1331-1342.
- THIELE-BRUHN, S., BECK, I.C. (2005) Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59: 457-465.
- TOLEIKIS L., BRODERS O., DÜBEL S. (2004) Cloning single-chain antibody fragments (scFv) from hybridoma cells. *Methods Mol Med* 94:447-58.
- TONEGAWA, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581.
- TORDSSON, J., ABRAHMSSEN, L., KALLAND, T., LJUNG, C., INGVAR, C., BRODIN, T. (1997) Efficient selection of scFv antibody phage by adsorption to in situ expressed antigens in tissue sections. *J Immunol Methods* 210: 11-23.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.F., ROSADO, A.S., SMALLA, K. (1998) Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J Microbiol Meth* 32: 133-154.
- VELTHYS, B.R. (1981) Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding photosystem II. *FEBS Letters* 126: 277-281.
- VIEIRA, J., MESSING, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153: 3-11.
- VREE, T.B., HEKSTER, Y.A. (1987) Clinical pharmacokinetics of sulfonamides and their metabolites: an encyclopedia. *Antibiot Chemother* 37: 1-214.
- WARD, E.S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A.D., JONES, P.T., WINTER, G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341: 544-546.
- WARD, V.K., SCHNEIDER, P.G., KREISSIG, S.B., HAMMOCK, B.D., CHOUDARY, P.V. (1993) Cloning, sequencing and expression of the Fab fragment of a monoclonal antibody to the herbicide atrazine. *Protein Eng* 6: 981-988.
- WEBB, S.R., LEE, H., HALL, J.C. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of an anti-cyclohexanedione single-chain variable antibody fragment and comparison to the parent monoclonal antibody. *J Agric Food Chem* 45: 535-541.
- WEIMAR, M.R., SWUSHER, B.A., VOGEL, K.P. (1988) Metabolism as a basis for differential atrazine tolerance in warm-season forage grasses. *Weed Science* 36: 436-440.
- WELLS, J.A., LOWMAN, H.B. (1992) Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Curr Opin Biotechnol* 3: 355-362.
- WEX, K., MANN, A., SCHÄFER, G., WENZEL, B.E. (1995) Immunchemische Schnelltests zur Detektion von monovalenten Umweltschadstoffen. *Focus Mul* 12: 22-28.

- WIEBE, J.C. (2008) Optimierung eines Expressionssystems zur Hochzelldichte Fermentation von Maus- und Kaninchen-Antikörper-Fragmenten. Dissertation. Technische Universität München, Deutschland.
- WINTER, G., MILSTEIN, C. (1991) Man-made antibodies. *Nature* 349: 293-299.
- WITHOLT, B., BOEKHOUT, M., BROCK, M., KINGMA, J., VAN HEERIKHUIZEN, H., DE LEIJ, L. (1976) An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 1: 160-170.
- WOODWARD, K.N. (1992) Carcinogenicity of sulphadimidine. *Hum Exp Toxicol* 11: 60-61.
- WYSOCKI, L.J., GEFTER, M.L. (1989) Gene conversion and the generation of antibody diversity. *Annu Rev Biochem* 58: 509-531.
- YAMAZAKI, M., KAKEYA, N., MORISHITA, T., KAMADA, A., AOKI, M. (1970) Biological activity of drugs. X. Relation of structure to the bacteriostatic activity of sulfonamides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 18: 702-707.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- YUAN, Q., CLARKE, J.R., ZHOU, H.-R., LINZ, J.E., PESTKA, J.J., HART, P.L. (1997) Molecular cloning, expression and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone. *Appl Environm Microbiol* 63: 263-269.
- ZACCO, E., PIVIDORI, M.I., ALEGRET, S., GALVE, R., MARCO, M.P. (2006) Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Anal Chem* 78: 1780-1788.
- ZACCO, E., ADRIAN, J., GALVE, R., MARCO, M.P., ALEGRET, S., PIVIDORI, M.I. (2007) Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosens Bioelectron* 22: 2184-2191.
- ZAHN, G., SKERRA, A., HOHNE, W. (1999) Investigation of a tetracycline-regulated phage display system. *Protein Eng* 12: 1031-1034.
- ZAHRA, D.G., VANCOV, T., DUNN, J.M., HAWKINS, N.J., WARD, R.L. (1999) Selectable in-vivo recombination to increase antibody library size-an improved phage display vector system. *Gene* 227: 49-54.
- ZETTLMEISSL, G., RUDOLPH, R., JAENICKE, R. (1979) Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry* 18: 5567-5571.
- ZHANG, H., DUAN, Z., WANG, L., ZHANG, Y., WANG, S. (2006) Hapten synthesis and development of polyclonal antibody-based multi-sulfonamide immunoassays. *J Agric Food Chem* 54: 4499-4505.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bertold Hock von der Technischen Universität München für die interessante Fragestellung und das mir entgegen gebrachte Vertrauen.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Arne Skerra von der Technischen Universität München für die zur Verfügung gestellten Vektoren und die Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn PD Dr. Karl Kramer danke ich für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Drittgutachtens.

Auch möchte ich Frau Antje Pegel für die gute und produktive Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Projektarbeit danken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Sheila Vignali und Frau Dr. Eszter Hars für die zahlreichen freundschaftlichen und fachlichen Diskussionen sowie Frau Andrea Hubauer und Frau Irmgard Scholz für die kollegiale Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Auch bei der AMR der Universität Barcelona unter der Leitung von Dr. Pilar Marco, möchte ich mich für die von ihnen zur Verfügung gestellten Arbeitsmaterialien herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt hier Javier Adrián Izquierdo, der mich hilfsbereit mit Informationen versorgt hat.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich immer liebevoll unterstützt hat.

Ganz besonders danke ich Chris für sein Verständnis und seine Geduld. Du bist das Beste was mir je passiert ist.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name: Schüller, geb. Kraft
 Vorname: Carolin
 Geburtsdatum: 23.02.1978
 Geburtsort: München
 Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG

1984 - 1988	Grundschule	München
1988 - 1995	Willi-Brandt-Gesamtschule	München
1995 - 1997	Willi-Graf-Gymnasium	München
1997	Abitur	

AKADEMISCHE LAUFBAHN

1997 – 2002	Technische Universität Studium Biologie Hauptfach: Biochemie Nebenfächer: Pharmakologie/Toxikologie und angewandte Botanik	München
WiSe 2000/2001	Georgia State University Auslandspraktikum am Lehrstuhl für Neurobiologie Prof. D. Edwards Posterpräsentation <i>East Coast Nerve Net Conference</i>	Atlanta, USA
2002	Technische Universität Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Botanik Prof. B. Hock	München
2002	Technische Universität München Diplomarbeit am Lehrstuhl für Botanik Prof. B. Hock	München
Okt. 2002	Technische Universität Abschluß als Diplom Biologin	München
Okt. – Dez. 2002	Sprachreise	Neuseeland
Jan. 2003 – Dez. 2003	Klinikum Rechts der Isar (TUM) Doktorandin am Lehrstuhl Hämatologie / Onkologie Prof. C. Peschel Posterpräsentation <i>Cellular Therapie 2003</i>	München
Jan. 2004 – Jul. 2007	Wissenschaftszentrum Weihenstephan Doktorandin am Lehrstuhl für Zellbiologie Prof. B. Hock	München
Jul. 2007 – Okt. 2007	Technische Universität Vorbereitung für EXIST-Stipendium	München
Seit Okt. 2007	Technische Universität EXIST-Stipendiatin am Lehrstuhl für Tierhygiene Prof. J. Bauer	München