

Autodisplay funktioneller Antikörperfragmente in
Escherichia coli

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Felix Blasshofer

aus Essen

Mai 2008

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Joachim Jose

Koreferent: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2008

MEINEN ELTERN

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 13. Juni 2008

(Felix Blasshofer)

Ich danke

Professor Dr. Joachim Jose für die Chance, diese Dissertation am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie - Bioanalytik anzufertigen sowie für die fördernde Umgebung in seinem Arbeitskreis.

Andre Kaeßler für seine Freundschaft, den kontroversen Austausch über Laborinter-
na und ein immer offenes Ohr.

Elisa Winterer, Andreas Gratz und Dirk Betscheider für die freundliche Aufnahme im
Arbeitskreis und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei Fragen eines Mobi-
Newbies. Dirk und Andreas im Speziellen für ihre Zeit und Mühe, die sie bei FACS-
Messungen investiert haben.

Klaudia Petermann, Eva Kranen und Christian Detzel für ihre angenehme freund-
schaftliche Art. Christian besonders für seine Tapferkeit beim Erleiden ernüchternder
Niederlagen beim Badminton.

Ruth Maas für ihre Unterstützung am Beginn der Arbeit und allerlei wertvolle Tipps.

Heinz Mathew für gemeinsames Feiern und Diskutieren.

Karin Voigt und Nora Stellisch für die gute Zusammenarbeit sowie das bereitwillige
Animpfen von Kulturen zu eigentlich menschenunwürdigen Arbeitszeiten.

Boris Litsanov für sein Interesse an meinem Projekt und den gemeinsamen Kampf
gegen „Klon6“ und andere laborinterne Mysterien.

Dominik Kusiek, der mir meine liebste Freizeitbeschäftigung nahegebracht hat.

Steffi Rieken und Jenny Bommer für ihre tolle Mitarbeit im Wahlpflichtpraktikum und
die beiden erfolgreichen Klonierungen, an deren Gelingen ich selbst nicht mehr ge-
glaubt hatte.

Andrea Borchardt, Elisabeth Sauerbier und Lars-Oliver Klotz für die gemeinsame
Arbeit am EGFR-Projekt und die zuverlässige Bereitstellung der Zellen.

Ulrike Fischer für die gute Kooperation beim GLEA2-Projekt.

der Dr. Jürgen Manchot-Stiftung für die finanzielle Förderung des Projektes.

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	Tumoren und ihre Therapie	2
2.1.1	Tumoren als Todesursache Nummer zwei in Deutschland	2
2.1.2	Therapie durch konventionelle Pharmakotherapie	2
2.1.3	Neue Therapieansätze	3
2.2	Antikörper und ihre pharmazeutische Verwendung	4
2.2.1	Wichtige strukturelle und funktionelle Merkmale von Antikörpern	4
2.2.2	Bedeutung von Antikörpern in Forschung, Diagnostik und Therapie	8
2.2.3	Drug Targeting mit Antikörpern	10
2.2.4	Konventionelle Gewinnung monoklonaler Antikörper mit der Hybridom-Technologie	11
2.2.5	Neue Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper	12
2.3	Zelluläre Antikörper-Expression mittels Autodisplay-System	15
2.3.1	Gründe für ein zelluläres Expressionssystem	15
2.3.2	Autotransporter als Exportmechanismus in gramnegativen Bakterien	16
2.3.3	Das Autodisplay-System	17
2.4	Antigene in dieser Arbeit eingesetzter Antikörperfragmente	21
2.4.1	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), ein gut untersuchtes Tumorantigen	21
2.4.2	Nef, ein Pathogenitätsfaktor des HIV-I	22
2.4.3	Gliom-assoziiertes Antigen 2 (GLEA2)	22
2.5	Ziel der Arbeit	23
3	MATERIALIEN	24
3.1	Stämme	24
3.2	Plasmide	24

3.3	Oligonukleotide	25
3.4	Enzyme	27
3.5	Peptide	27
3.6	Nährmedien und Agarplatten	28
3.7	Puffer und andere Lösungen	28
3.7.1	Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly	28
3.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	29
3.7.3	Membranisolierung und SDS-PAGE	29
3.7.4	Lösung für die Fluoreszenzmikroskopie	29
3.8	Chemikalien	29
3.9	Geräte	31
4	METHODEN	32
4.1	Arbeiten mit Bakterien	32
4.1.1	Anzucht von Bakterien	32
4.1.2	Induktion der Proteinexpression	32
4.1.3	Stammhaltung	32
4.1.4	Herstellen elektrokompetenter Zellen	33
4.2	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	33
4.2.1	Anzucht von A431-Zellen	33
4.2.2	Silencing des EGFR in A431-Zellen	34
4.2.3	Kontrolle der EGFR-Level in A431-Zellen	34
4.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren	34
4.3.1	Plasmidisolierung mit Kits	34
4.3.2	Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly (modifiziert)	35
4.3.3	Verlängerung einzelsträngiger Oligonukleotide	35
4.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35

Inhaltsverzeichnis

4.3.5	DNA-Aufreinigung durch Fällung	37
4.3.6	DNA-Aufreinigung durch Kits	37
4.3.7	DNA-Aufreinigung durch Dialyse	38
4.3.8	Restriktionsendonukleaseverdau	38
4.3.9	Dephosphorylierung der 5'-Enden	38
4.3.10	Agarose-Gelelektrophorese	38
4.3.11	Gelextraktion	39
4.3.12	Ligation	39
4.3.13	Transformation in elektrokompente Zellen	39
4.3.14	DNA-Sequenzanalyse	40
4.4	Arbeiten mit Proteinen	40
4.4.1	Isolierung der äußeren Membranen von <i>E. coli</i>	40
4.4.2	Proteaseverdau als Nachweis für die Oberflächenständigkeit von Proteinen	41
4.4.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
4.4.4	Färbung und Auswertung von SDS-Gelen	41
4.5	Arbeiten mit Fluoreszenz	42
4.5.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	42
4.5.2	GFP	43
4.5.3	Vorbereiten der Bakterienzellen für die Immunfluoreszenzmarkierung	43
4.5.4	Durchflusszytometrie	44
4.5.5	Vorbereiten der Bakterienzellen für die Durchflusszytometrie	45
5	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	46
5.1	Antikörperfragmente gegen ein Nef-Epitop aus HIV-I	46
5.1.1	Charakterisierung des für scFv112 kodierenden Plasmids	46
5.1.2	Klonierung der für scFv112 kodierenden Sequenz in einen pET-Vektor	49
5.1.3	Überprüfen der Expression von scFv112 durch den Stamm <i>E. coli</i> UT5600(DE3) pFB006	51
5.1.4	Durchflusszytometrische Analyse als Funktionalitätsnachweis von scFv112	54

5.1.5	Vereinzelung der variablen Domäne V _H 112	55
5.1.6	Oberflächenexpression von V _H 112	57
5.1.7	Vereinzelung der variablen Domäne V _L 112	58
5.1.8	Oberflächenexpression von V _L 112	60
5.1.9	Simultane Expression von V _H 112 und V _L 112 in einer <i>E. coli</i> -Zelle und Prüfen der Funktionalität	61
5.2	Antikörperfragmente gegen EGFR	63
5.2.1	Charakterisierung des für scFv425 kodierenden Plasmids	64
5.2.2	Optimierung der Expressionsstärke von scFv425	65
5.2.3	Tumoraffinität scFv425-exprimierender Zellen	67
5.2.4	Vereinzelung der variablen Domänen V _H 425 und V _L 425	69
5.2.5	Dimerisierung an der Oberfläche von <i>Escherichia coli</i>	70
5.2.6	Tumortargeting mit tcFv425-exprimierenden <i>E. coli</i> -Zellen	70
5.2.7	Silencing des EGFR mit siRNA und erneute Kontrolle der Bindungsaffinität scFv425- und tcFv425-exprimierender Bakterien	71
5.3	Kombinatorik und Identifizierung neuer Antikörpersequenzen	74
5.3.1	Prinzip der zufälligen Variation der CDR3 von V _H und V _L	74
5.3.2	Erstellen einer Bibliothek von variablen leichten Fragmenten (V _L)	77
5.3.3	Erstellen einer Bibliothek von variablen schweren Fragmenten (V _H)	78
5.3.4	Identifizierung eines Epitops von GLEA2 zum Screenen der Bibliothek von tcFv-Fragmenten	80
5.3.5	Screening der Bibliothek auf Affinität zu einem GLEA2-Epitop und Selektion positiver Varianten mittels FACS	82
6	DISKUSSION	87
6.1	Autodisplay von Antikörperfragmenten	87
6.2	Tumortargeting durch <i>Escherichia coli</i>	90
6.3	Entwicklung neuer Antikörper durch High-throughput-Screening von tcFv-Bibliotheken	94

6.4	Fazit und Ausblick	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	99
8	ANHANG	109
8.1	Wichtige Antikörpersequenzen dieser Arbeit	109
8.1.1	Sequenz von scFv112	109
8.1.2	Sequenz von scFv425	110
8.2	Abkürzungsverzeichnis	110
8.3	Firmenverzeichnis	112
8.4	Publikationen	112

1 Zusammenfassung

Die Methode des Drug Targetings stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Reduktion Chemotherapie-assoziiertes Nebenwirkungen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von Bakterien zur Adressierung von Tumorzellen untersucht, um diese künftig einmal als lebende Wirkstofffähre nutzen zu können.

Mit Hilfe des Autodisplay-Systems, das im Arbeitskreis Jose etabliert worden ist, wurde ein Einzelkettenfragment (scFv112) auf der Oberfläche von *Escherichia coli* exprimiert, das gegen ein lineares Epitop des Nef-Proteins aus HIV-1 gerichtet ist. Die Expressionsrate des scFv112 lag bei etwa 1×10^5 Molekülen pro Zelle. Durch Inkubation dieser Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Antigen und folgende durchflusszytometrische Analyse konnte das scFv als antigenbindend bestimmt werden. Die variablen Domänen V_H und V_L wurden getrennt voneinander in einem Stamm als Auto-transporter-Passagiere exprimiert. Durch ihre natürliche Affinität zueinander formierten sie auf der Oberfläche der Bakterienzelle ein Fragment, das den Namen „twin chain variable fragment“ (tcFv) erhielt und sich in analogen Versuchen ebenfalls als funktionell erwies. ScFv- und tcFv-exprimierende Zellen zeigten eine 15-22-fach erhöhte mittlere Fluoreszenz im Vergleich zu Kontrollzellen.

Das Konstrukt scFv425, das gegen ein bedeutendes Tumorantigen - den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) - gerichtet ist, wurde auf die gleiche Weise exprimiert. Auch hier wurde der entsprechende tcFv-exprimierende Stamm erzeugt. Die Expressionsraten waren in der gleichen Größenordnung wie bei scFv112. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte deutliche Affinität scFv-exprimierender Bakterien zur EGFR-überexprimierenden Tumorzelllinie A431 gezeigt werden.

Des Weiteren wurden V_H und V_L mittels degenerierter Oligonukleotide getrennt voneinander in einer hypervariablen Region zufallsvariiert. Durch Kombinatorik beider Ketten wurde eine auf der Oberfläche von *E. coli* vorliegende Bibliothek von tcFv mit $3,8 \times 10^5$ Transformanten erzeugt. Diese wurde auf ihre Bindung an ein Epitop des GLEA2-Proteins, eines Antigens des Glioblastoms, überprüft. Es konnte ein neuer Stamm mit einem tcFv erhalten werden, der das Epitop signifikant stärker bindet als Zellen mit einem Kontroll-scFv an der Oberfläche.

2 Einleitung

2.1 Tumoren und ihre Therapie

2.1.1 Tumoren als Todesursache Nummer zwei in Deutschland

Die Lebenserwartung in Deutschland und anderen Industrieländern ist seit Mitte des 19. Jahrhunderts sprunghaft angestiegen (Vaupel 2005). Begleitet wurde diese positive Entwicklung von einer steten Zunahme sogenannter „Zivilisationskrankheiten“. An erster Stelle sind hier kardiovaskuläre Erkrankungen zu nennen, die als Todesursache Nummer eins gelten. An zweiter Position rangieren neoplastische Veränderungen (Minino et al. 2007). Diese treten teilweise bedingt durch veränderte Lebensumstände (z.B. Stress und erhöhte Karzinogen-Exposition) und Ernährungsgewohnheiten vermehrt auf, andere Krebsarten sind einfach aufgrund der längeren Lebenszeit häufiger als früher (Misra et al. 2004; Kushi et al. 2006; Klenk et al. 2007).

In Deutschland werden jährlich ca. 400.000 Krebserkrankungen neu diagnostiziert, weit über 70 % hiervon bei Menschen, die älter als 60 Jahre sind (Robert-Koch-Institut 2006). Es wird darüber diskutiert, wie zuverlässig die Zahl für Neuerkrankungen ist, da offenbar weitaus nicht alle neu diagnostizierten Fälle in die Statistiken eingehen (Said et al. 2007). Unabhängig davon bleibt festzuhalten, dass Krebs und seine Behandlung eine Herausforderung für Pharmazie und Medizin des 21. Jahrhunderts darstellen.

2.1.2 Therapie durch konventionelle Pharmakotherapie

Neben Tumorsektion und -bestrahlung („Stahl und Strahl“) stellt die Pharmakotherapie die dritte bedeutende Säule der Tumorbehandlung dar. Die meisten „klassischen“ Arzneistoffe verhindern die Teilung von Tumorzellen durch Eingriff in den Zellzyklus oder Schädigung der DNA, was wiederum eine erfolgreiche Zellteilung verhindert. Zu den traditionellen Wirkprinzipien zählen Antimetabolismus, DNA-Alkylierung, DNA-Interkalation, Topoisomerase-Hemmung und Mitose-Hemmung durch Schädigung des Spindelapparats (Mutschler 2001). Zwei große Schwierigkeiten sind mit diesen Therapien verknüpft: Zum einen entwickeln Tumoren häufig Resistenzen gegen einzelne Arzneistoffe (O'Connor et al. 2007), weshalb heute in der Regel bestimmte

Therapieregime etabliert sind, die zwei oder mehr Arzneistoffe mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen enthalten. Diese Polypharmakotherapie verschärft das zweite gravierende Problem der Chemotherapie. Die meisten aktiven Substanzen greifen nicht spezifisch Tumorzellen an, sondern schädigen allgemein schnell proliferierende Gewebe. Hierzu zählen neben Tumor- auch Knochenmarksstamm-, Schleimhaut- und Follikelzellen. Daraus ergeben sich eine Reihe unerwünschter Wirkungen wie beispielsweise Thrombozytopenie, Infektionsanfälligkeit, Erbrechen, Diarrhö, Stomatitis und Alopezie, die eine große zusätzliche Belastung für den Patienten darstellen. Sie sind häufig dosis- und damit therapielimitierend (Carelle et al. 2002).

2.1.3 Neue Therapieansätze

In den letzten Jahren wurden dank intensivierter Forschung eine Reihe neuer vielversprechender Therapieansätze entwickelt, die die Palette klassischer Zytostatika ergänzen. Asparaginase beispielsweise entzieht bestimmten Tumorzellarten die Nährstoffgrundlage und verschont dabei weitgehend gesundes Gewebe (Verma et al. 2007). Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib bewirkt eine Störung des Protein-Turnovers, von dem besonders Krebszellen tangiert werden, was diese letztendlich in die Apoptose führt (Roccaro et al. 2006). Ebenfalls Apoptose aktivierend wirkt Valproinsäure, ein Histondeacetylase-Inhibitor (Duenas-Gonzalez et al. 2008). Darüber hinaus ist die Wiederherstellung der proapoptotischen Funktion des Tumorsuppressorproteins p53 genau wie die Aktivierung von Todesrezeptoren Gegenstand aktueller Studien (Wang und El-Deiry 2008). Eine weitere Möglichkeit, der Immortalität von Tumorzellen entgegenzuwirken, besteht in der Inhibition der Telomerase, eines Enzyms, das den progressiven Abbau der chromosomalen Enden bei Zellteilungen kompensiert (De Cian et al. 2008). Eine Reaktivierung hat Thalidomid erfahren. Seine zytostatische Potenz beruht vermutlich auf einer Hemmung der Angiogenese, also der Neuausbildung von Tumor-versorgenden Gefäßen (Holzgrave 2007). Eine sehr selektive und damit nebenwirkungsarme Therapie wird durch den Einsatz monoklonaler Antikörper ermöglicht, die ein tumorspezifisches Antigen erkennen.

2.2 Antikörper und ihre pharmazeutische Verwendung

2.2.1 Wichtige strukturelle und funktionelle Merkmale von Antikörpern

Antikörper sind lösliche Glykoproteine aus der Superfamilie der Immunglobuline. Diese umfasst außerdem strukturverwandte Verbindungen wie Adhäsionsmoleküle (Integrine, Selektine), T-Zell-Rezeptoren und Moleküle des „major histocompatibility complex“ (MHC), die das wechselseitige Erkennen von Zellstrukturen ermöglichen (Williams und Barclay 1988). Sie werden in Wirbeltieren von B-Zellen als Reaktion auf den Kontakt mit Antigenen gebildet und sind elementarer Bestandteil des humoralen spezifischen Immunsystems. Die Produktion der Antikörper beginnt, wenn die B-Zelle das ihr zugehörige Antigen erkannt hat und gleichzeitig von einer T-Helferzelle, die das Antigen ebenfalls erkannt hat, mit Zytokinen stimuliert wird. Die noch unreife B-Zelle beginnt daraufhin, sich zu teilen und den Zellapparat für die Proteinbiosynthese aufzubauen. Eine nach 4-5 Tagen voll ausgereifte B-Zelle wird Plasmazelle genannt; 90-95 % der von ihr produzierten Proteine sind Antikörper. Pro Sekunde sezerniert sie bis zu 2.000 Antikörper.

Antikörper verbindet ein einheitlicher struktureller Aufbau. Es sind heterotetramere Glykoproteine aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Die variablen aminoterminalen Abschnitte determinieren die Spezifität der Antigenbindung und werden mit V_H und V_L abgekürzt. Sie werden nochmals unterteilt in je drei „complementarity determining regions“ (CDR) und je vier „framework regions“ (FR) (Abb. 2.1). FR1-4 bilden zwei parallele β -Faltblätter, die ein Grundgerüst zur Aufrechterhaltung der korrekten Proteinstruktur und räumlichen Orientierung der CDR darstellen (Harris et al. 1992). CDR selbst sind in ihrer Sequenz hochvariabel (Johnson und Wu 2000). Sie bilden Schleifen am Rande der von den Gerüstregionen gebildeten β -Faltblattstrukturen und treten in direkten Kontakt zum Antigen.

Theoretisch können beim Menschen bis zu 10^{30} verschiedene Antikörper gebildet werden (Winter und Milstein, 1991). Die enorme Vielfalt von Antikörpermolekülen basiert auf der Variabilität von V_H und V_L und entsteht, während sich B-Lymphozyten aus ihren Stammzellen entwickeln. Sie beruht auf vier verschiedenen Mechanismen (Tonegawa 1988).

Die V-Region der schweren Kette wird durch drei verschiedene DNA-Abschnitte kodiert, von denen jeweils mehrere unterschiedliche Varianten im Genom vorkommen. In den Lymphozyten der B-Zelllinie wird ein den größten Teil bildendes V_H -Gensegment durch DNA-Umlagerungen mit einem D-Gensegment („diversity“) und einem JH-Gensegment („joining“) rekombiniert. Diese VDJ-Verknüpfung führt zu einem durchgehenden DNA-Segment, das die gesamte variable Domäne der schweren Kette kodiert. Bei der leichten Kette besteht das DNA-Stück nur aus einer VJ-Rekombination, D-Segmente fehlen vollständig (Lin und Desiderio 1995). Der Vorgang wird auch als somatische Rekombination bezeichnet und führt zu $1,2-6 \times 10^4$ Kombinationsmöglichkeiten pro schwerer und 10^3 pro leichter Kette (Janeway 2002).

Beim V(D)J-Rearrangement greift auch der zweite Prozess zur Erzeugung von Variabilität. Die Verknüpfung der Segmente ist nicht immer genau. Mitunter werden an den Enden zusätzliche Nukleotide eingefügt. Dies kann zwar eine Leserasterverschiebung und das Einfügen von Stoppkodons zur Folge haben, jedoch können mitunter auch neue Spezifitäten resultieren.

Ein dritter Grund für die Diversität der Immunglobulingene ist die Tatsache, dass sich die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette ebenfalls verschieden kombinieren können. So können aus ca. 10^3 Genen für V_L und 10^4 für V_H theoretisch 10^7 Gene für die gesamte variable Region eines Antikörpers gebildet werden. Diese Fähigkeit, durch Zusammenstellung einer relativ geringen Zahl von Segmenten viele verschiedene Spezifitäten zu erzeugen, nennt man auch kombinatorische Vielfalt.

Die somatische Hypermutation bewirkt letztendlich eine weitere Diversifizierung der variablen Genabschnitte der Immunglobuline. Dieser Prozess, der auch als Affinitätsreifung bezeichnet werden kann, findet nicht, wie die drei erstgenannten, in den primär lymphatischen Organen, sondern antigenabhängig in den Keimzentren der sekundär lymphatischen Organe statt. Es werden nach dem Kontakt einer naiven B-Zelle mit dem Antigen in den variablen Regionen der rearrangierten Gene in unterschiedlichem Umfang Punktmutationen eingefügt, so dass veränderte Immunglobuline an der Oberfläche von B-Zellen erscheinen. Diejenigen mit der höchsten Affinität für das Antigen werden selektiert. Die somatische Hypermutation erreicht eine Mutationsrate von einem Basenpaar pro 10^3 pro Zellteilung und ist damit um den Faktor

10^9 wahrscheinlicher als eine „normale“ Mutation im menschlichen Genom (Janeway 2002). Eine einzelne B-Zelle produziert dabei stets nur eine Variante eines Antikörpers bestimmter Selektivität (Rajewsky 1996).

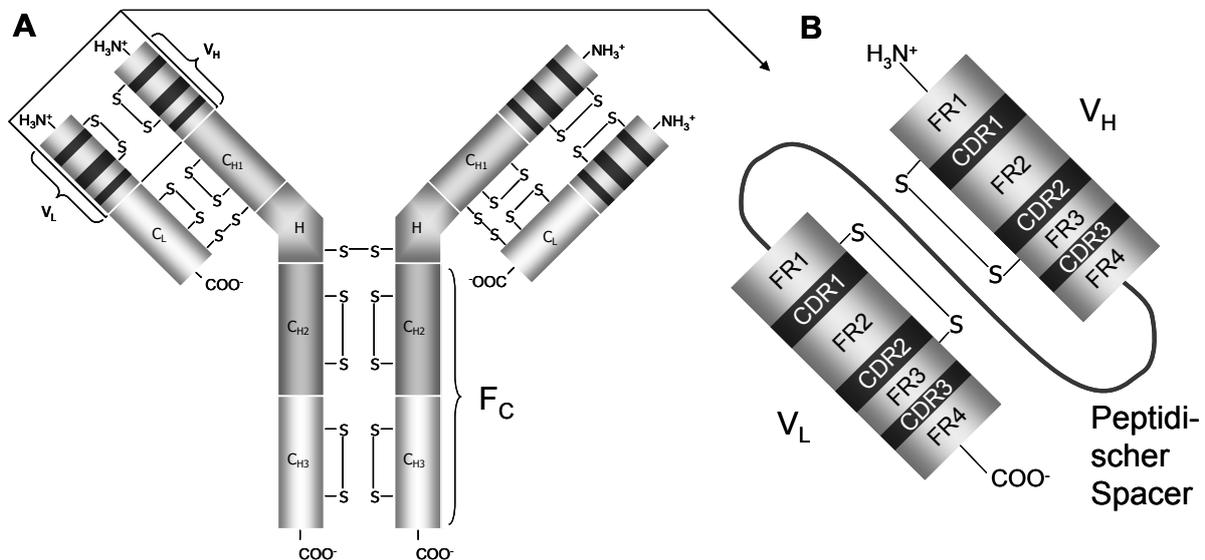


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (A) und eines daraus abgeleiteten single chain Fragments (B).

A – Antikörper in der Übersicht. C_H und C_L bezeichnen die konstanten Domänen der schweren bzw. leichten Kette, V_H und V_L die entsprechenden variablen Regionen. H („Hinge“) ist die Gelenk-Region, F_C bezeichnet das kristallisierbare Fragment eines Antikörpers. Inter- und intramolekulare Disulfidbrücken sind gekennzeichnet.

B – Aus einem Antikörper abgeleitetes variables single chain Fragment. CDR bezeichnet die hypervariablen complementarity determining regions, FR die framework regions.

Die carboxyterminalen Abschnitte beider Ketten stellen die konstanten Untereinheiten eines Antikörpers dar. Wie die variablen Domänen werden sie durch mehrere DNA-Abschnitte kodiert. C_L der leichten Kette wird über Disulfidbrücken mit C_{H1} der schweren Kette verknüpft. In der „Hinge“-Region H befindet sich die einzige Disulfidbrücke, die beide Arme eines Antikörpers wie ein Gelenk miteinander verbindet, so dass die nötige räumliche Flexibilität gewährleistet bleibt. Die sich anschließenden Domänen C_{H2} und C_{H3} der beiden schweren Ketten werden unter dem Begriff „crystallizable fragment“ (F_C) zusammengefasst und zeichnen für der Antigenbindung nachgeschaltete Effektorfunktionen verantwortlich. Hier wird die Bindung an natürliche Killerzellen, Makrophagen und andere phagozytierende Zellen sowie die Komplementbindung vermittelt. Man unterscheidet fünf verschiedene Isotypen (IgA, IgD,

IgE, IgG und IgM), die sich in der Sequenz und Anzahl der konstanten Domänen unterscheiden und denen unterschiedliche Aufgaben in der Immunantwort zukommen. Ein Antikörper-Monomer hat ein Molekulargewicht von etwa 160 kDa.

Einem sezernierten Antikörper kommen in der Immunabwehr unterschiedliche Aufgaben zu. Bakterielle Toxine werden durch Antikörper neutralisiert und anschließend von Makrophagen aufgenommen und inaktiviert. Befinden sich Bakterien im extrazellulären Raum, so markieren Antikörper diese für die Aufnahme durch Makrophagen, die den F_C -Teil mit entsprechenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche erkennen (Opsonisierung). Werden Natürliche Killerzellen durch die Antikörper-Markierung zur Zerstörung der Zelle aktiviert, so spricht man von "antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" (ADCC). Dieser Prozess kann auch entartete körpereigene Zellen betreffen. Die Antikörperbeladung einer Zelle hat außerdem die Aktivierung des Komplementsystems zur Folge. Der Komplementfaktor C1 erkennt Antigen-gebundene F_C -Regionen von Antikörpern, was die Aktivierung zweier assoziierter Serin-Proteasen zur Folge hat. Diese katalysieren die beiden Startreaktionen des Komplementweges, welche über Proteasekaskaden letztendlich zur Produktion des Faktors C3b führen. Dieser wiederum hat opsonisierende Eigenschaften, kann aber auch weitere Reaktionen bis zur Bildung eines Membranangriffskomplexes katalysieren, der durch Porenbildung letztendlich zur Lyse der Zielzelle führt (Janeway 2002). Der Vorgang heißt „complement-dependent cytotoxicity“ (CDC).

Für Antigenbindungsstudien benötigt man nur die variablen Domänen V_H und V_L . Wie Abb. 2.1 zu entnehmen ist, sind diese nicht über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Es gab Versuche, in denen V_H und V_L getrennt periplasmatisch exprimiert wurden. Dort formierten sie zwar ein funktionelles Fragment, die Ketten hatten jedoch eine niedrige Affinität zueinander (K_a von ca. 10^{-6} M^{-1}), so dass sie bei hoher Verdünnung schnell dissoziierten und nur eine geringe Thermostabilität aufwiesen (Skerra und Pluckthun 1988). Für analytische oder therapeutische Zwecke ist ein solches Konstrukt ungeeignet. Es ist jedoch möglich, die beiden Domänen über eine Peptidbrücke kovalent miteinander zu verknüpfen, ohne dass sie die Spezifität und Affinität zu ihrer Zielstruktur einbüßen. Das Linkerpeptid muss hydrophil sein sowie eine ausreichende Länge und Flexibilität besitzen, damit die beiden Domänen eine intakte Antigenbindungsstelle ausbilden können. Um den Abstand von 35-40 Å

zu überbrücken, beträgt die Mindestlänge für einen Linker zwölf Aminosäuren (Pantoliano et al. 1991). Eine häufig verwendete Aminosäuresequenz, welche diese Anforderungen erfüllt, ist $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (Huston et al. 1988). Es resultiert ein „single chain variable fragment“ (scFv), das genau wie der parentale Antikörper in der Lage ist, sein Antigen zu binden (Bird et al. 1988; Huston et al. 1988). Die deutlich geringere Größe (Molekulargewicht von etwa 26 kDa) und die Tatsache, dass die nötige Information nun in einer einzigen Proteinkette enthalten ist, vereinfachen die rekombinante Produktion erheblich.

2.2.2 Bedeutung von Antikörpern in Forschung, Diagnostik und Therapie

Die Zahl der pharmazeutischen Anwendungen, die Antikörper als Werkzeug einsetzen, wächst stetig. Die hohe Spezifität für ihre Zielstruktur prädestiniert sie für eine Reihe verschiedener Einsatzgebiete. Analytische Verfahren wären ohne den Einsatz monoklonaler Antikörper heute nicht mehr vorstellbar. Lange etablierte Testsysteme wie z.B. der ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) machen sich diese Spezifität genauso zu Nutze wie einige instrumentell-analytische Verfahren, zu denen Affinitätschromatographie, Fluoreszenzmikroskopie, Western Blot oder Durchflusszytometrie zählen (Kontsekova 2003). Speziell ELISA und Durchflusszytometrie werden auch bei der Diagnostik von Krebserkrankungen eingesetzt. Dabei werden Blut- oder Gewebeprobe auf Vorhandensein spezifischer Marker untersucht, die für die jeweilige Erkrankung charakteristisch sind (Blank 2006).

Von ebenso großer Bedeutung ist mittlerweile der Einsatz von Antikörpern für therapeutische Zwecke (Brekke und Sandlie 2003). Dies impliziert den akuten Einsatz als Passivvakzine zur Toxinneutralisierung, also postinfektiös gegen körperfremde Strukturen. Die größte Relevanz hat heute aber die Verwendung als antineoplastisches oder antiinflammatorisches therapeutisches Agens, wobei die Antigene hier körpereigene Strukturen sind. Ende 2007 waren bereits 18 monoklonale Antikörper auf dem deutschen Markt, 70 befanden sich im Jahr 2006 in klinischer Prüfung (Neye 2006; VFA 2007). Muromonab bindet z.B. an das CD3-Oberflächenantigen von T-Lymphozyten und unterbricht so die unerwünschte Immunantwort nach einer Organtransplantation. Palivizumab erkennt ein Epitop des F-Proteins des „Respiratory Syncytial Virus (RSV) und wird als Infektionsprophylaxe für Kleinkinder und Säuglinge

eingesetzt. Abciximab bindet an die GPIIb/IIIa-Rezeptoren von Thrombozyten und unterbindet auf diese Weise die Thrombozytenaggregation. Infliximab und Adalimumab binden und inaktivieren beide den Tumornekrosefaktor α (TNF α), einen Entzündungsmediator, der u.a. bei Rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa überexprimiert wird. Mit Omalizumab ist auch ein Antikörper im Handel, der als Zielstruktur andere Antikörper erkennt. Er bindet an die F_C-Domäne von IgE-Molekülen, die bei asthmatischen Erkrankungen verstärkt ausgeschüttet werden. Diese Vielfalt möglicher Zielstrukturen spiegelt sich auch bei monoklonalen Antikörpern zum Einsatz in der Krebstherapie wider. Trastuzumab bindet an HER2-neu, ein Protein aus der Familie Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptoren, das bei einigen Mammakarzinom-Patientinnen überexprimiert wird. Dieser Familie gehört auch EGFR an, der die Zielstruktur von Cetuximab ist. Cetuximab wird bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sowie bei Kolorektalkarzinomen eingesetzt. Die letztere Indikation hat auch Bevacizumab, der nicht einen Wachstumsfaktor-Rezeptor als Zielstruktur hat, sondern den Wachstumsfaktor selbst, in diesem Fall VEGF („vascular endothelial growth factor“). Bei Non-Hodgkin-Lymphomen ist eine Therapie mit Rituximab indiziert, das das B-Zell-Oberflächenantigen CD20 erkennt und diese Zellen für die Vernichtung durch Phagozyten opsonisiert (Neye 2006). All diese Antikörper machen sich tumorspezifische Strukturen zu Nutze, an die sie angreifen und bewirken so eine schonendere Therapie, da gesunde Zellen in der Regel schwächer getroffen werden. Voraussetzung bei der Auswahl eines Zielantigens ist, dass es sich um oberflächenexponierte oder sekretierte Strukturen handeln muss, da Antikörper als Makromoleküle nicht in der Lage sind, Zellmembranen zu passieren. Die WHO hat eine einheitliche Nomenklatur für therapeutische Antikörper etabliert (WHO 1997). Sie tragen alle die Endung -mab („monoclonal antibody“), der eine Silbe vorangestellt wird, die über die Herkunft bzw. die Produktionsweise des Antikörpers Auskunft gibt (Abb. 2.3).

Die Wirkung therapeutischer monoklonaler Antikörper basiert auf verschiedenen Vorgängen. Entweder kommt es zu einer gestörten Ligand-Rezeptor-Interaktion, indem Liganden wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder Zytokine abgefangen und so ihrem Rezeptor entzogen werden bzw. indem der Rezeptor selbst als Zielstruktur des Antikörpers fungiert. Oder der Antikörper markiert eine Zielzelle mit dem entsprechenden Antigen auf der Oberfläche und löst über sekundäre Effektorfunktionen

(CDC, ADCC) die Lyse dieser Zelle aus. Lediglich IgG-Antikörper sind in der Lage, CDC und ADCC zu vermitteln, weshalb alle therapeutischen Antikörper dieser Subpopulation angehören (Brekke und Sandlie 2003).

2.2.3 Drug Targeting mit Antikörpern

Nach der Entdeckung der Antikörper durch Emil von Behring im Jahre 1890, schlug Paul Ehrlich 1906 vor, diese als "magische Kugeln" und "vergiftete Pfeile" zu benutzen, um toxische Substanzen spezifisch auf pathogene Ziele zu richten (Silverstein 1988). Bis diese Idee tatsächlich in die Tat umgesetzt wurde, verstrich fast ein ganzes Jahrhundert. Sie wird heute mit dem Begriff „Drug Targeting“ bezeichnet (Panchagnula und Dey 1997; Schrama et al. 2006). Hierbei nutzt man bestimmte Oberflächenstrukturen der Zielzellen aus, die diese vom gesunden Gewebe unterscheiden. Die gerichtete Freisetzung antineoplastischer oder zytotoxischer Wirkprinzipien unterbindet deren Wirkung an schnell proliferierenden gesunden Geweben und reduziert auf diese Weise die mit ihnen verbundenen Nebenwirkungen.

Die Entwicklung und Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten ist mit einer Reihe technologischer Herausforderungen verknüpft. Nach der Identifikation eines geeigneten Tumorantigens muss zunächst ein monoklonaler Antikörper gegen dieses Antigen gefunden werden. Dieser muss im großen Maßstab produziert und aufgereinigt werden. Anschließend muss der eigentliche Wirkstoff chemisch an das Antikörpermolekül gekoppelt werden, ohne dessen Spezifität für die und Affinität zur Zielstruktur zu tangieren. In der Praxis ergeben sich Schwierigkeiten, das richtige Verhältnis von Arzneistoff zu Antikörper für ausreichende therapeutische Effizienz zu gewährleisten (Schrama et al. 2006). All dies mögen Gründe dafür sein, dass in Deutschland erst ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat für die Therapie zur Verfügung steht. Ibritumomab-Tiuxetan bindet an CD20-positive Non-Hodgkin-Lymphome. Der gekoppelte β -Strahler Yttrium-90 wirkt so hauptsächlich auf die betroffenen B-Zellen ein und verschont gesundes Gewebe (Fietz und Thiel 2007).

Drug Targeting benötigt für seine Wirkung keine sekundären Effektorfunktionen. Die konstanten Antikörperdomänen sind deshalb für den therapeutischen Erfolg nicht essenziell, so dass statt vollständiger IgG-Moleküle auch scFv eingesetzt werden

könnten. Dies böte den Vorteil einer deutlich verbesserten Tumorpenetration (Yokota et al. 1992; Thurber et al. 2007) sowie der Reduktion möglicher Abwehrreaktionen (Mirick et al. 2004). ScFv weisen jedoch eine vergleichsweise schnelle Clearance und damit eine reduzierte Bioverfügbarkeit auf, da sie keine Bindestelle für den neonatalen F_C-Rezeptor aufweisen, der Immunglobuline vor Degradation schützt (Ghetie und Ward 2000). Derzeit befinden sich verschiedene scFv-Wirkstoffkonjugate in der klinischen Prüfung (Schrama et al. 2006).

2.2.4 Konventionelle Gewinnung monoklonaler Antikörper mit der Hybridom-Technologie

Die Produktion monoklonaler Antikörper wurde erst durch die Forschungen von Köhler und Milstein ermöglicht (Kohler und Milstein 1975). Bei der von ihnen entwickelten Hybridom-Technologie wird zunächst eine Maus mit dem Antigen immunisiert, was diese zur Bildung Antikörper-produzierender B-Lymphozyten der gesuchten Selektivität anregt. Der Umweg über Tierversuche ist notwendig, da die komplexe Antikörpervielfalt nur *in vivo* darstellbar ist (jede B-Zelle produziert einen anderen Antikörper) und sich ein Prozess wie der der Affinitätsreifung *in vitro* nicht imitieren lässt (s. Kapitel 2.2.1). Die B-Zellen werden aus der entnommenen Milz isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Auf diese Weise entstehen immortalisierte Hybridomzellen, die nach weiterer Selektion dauerhaft den gewünschten Antikörper produzieren. Da diese letztendlich von einer einzigen B-Zelle abstammen, werden sie als monoklonale Antikörper bezeichnet.

Die Entwicklung dieser Technologie kam einer biomedizinischen Revolution gleich, da nun erstmals die routinemäßige Gewinnung monoklonaler Antikörper möglich war. Sie ist jedoch mit einigen Nachteilen verbunden. Zum einen lassen sich nur Antikörper gegen Antigene gewinnen, die die Maus auch als solche erkennt. Zum anderen sind Toxine als Antigen unter Umständen ungeeignet, da sie den Wirt töten, bevor dieser erfolgreiche Immunabwehr betreiben kann. Die größte Schwierigkeit zeigte sich jedoch beim therapeutischen Einsatz monoklonaler Maus-Antikörper im Menschen. Die murinen F_C-Domänen stellen für den Menschen einen Fremdkörper dar, auf den dieser unterschiedlich stark ausgeprägt reagiert. Es kann zur Ausbildung sogenannter „human anti-mouse antibodies“ (HAMAs) kommen (Khazaeli et al. 1994).

Diese können eine rasch gesteigerte Clearance des Antikörpers und/oder den Verlust nachgeschalteter Effektorfunktionen bewirken und haben somit regelmäßig einen Therapieabbruch zur Folge. Es sind auch schwere immunologische Reaktionen bis zum anaphylaktischen Schock dokumentiert, die nicht nur den Therapieerfolg, sondern auch die Gesundheit des Patienten ernsthaft gefährden können (Kuus-Reichel et al. 1994). Obgleich neuere Untersuchungen der Produktion von HAMAs einen möglichen therapeutischen Vorteil zuschreiben (Mirick et al. 2004), überwiegen die Nachteile und Gefahren, die mit einer solchen Immunreaktion verbunden sind.

2.2.5 Neue Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper

Seit die mit rein murinen Antikörpern verbundenen Gefahren bekannt sind, gibt es Bestrebungen, eine Annäherung an humane Sequenzen zu erreichen. Dabei wurden immer größere Anteile über die Hybridomtechnologie gewonnener Antikörpermoleküle durch humane Sequenzen ersetzt. Die Chimärisierung von Antikörpern wird durch genetische Fusion der kodierenden Sequenzen der variablen Regionen eines monoklonalen Mausantikörpers mit den konstanten Regionen der schweren und leichten Kette eines humanen Immunglobulins erreicht. Man erhält einen IgG-Expressionsvektor, der in einer Säugerzelllinie wie CHO („chinese hamster ovary“) (Puck et al. 1958) die Produktion ganzer Antikörper erlaubt. Der resultierende Anteil an Mausprotein liegt bei etwa 30 % (Boulianne et al. 1984). Die noch weitergehende Humanisierung von Antikörpern erfolgt durch das Einsetzen der CDR des monoklonalen Mausantikörpers in ein humanes Immunglobulin, was in einem Mausanteil unter 5 % resultiert (Jones et al. 1986). Dieses „CDR-Grafting“ ist zeit- und kostenintensiv, führt aber bereits zu deutlich reduzierten immunologischen Reaktionen. Die Produktion der Antikörper wird auch hier von Säugetierzellen übernommen.

Komplett humane Antikörper werden durch Phagendisplay-Bibliotheken hergestellt (Smith 1985; McCafferty et al. 1990). Diese werden erzeugt, indem man aus humanen Plasmazellen mRNA isoliert und revers transkribiert. Die für V_H und V_L kodierenden Genabschnitte der gewonnenen cDNA werden amplifiziert, als scFv mit dem Gen für das M13-Phagen-Hüllprotein pIII ligiert und anschließend als „Phagemid“-Vektor in *Escherichia coli* transformiert. Das Bakterium dient zur Übersetzung der genetischen Information in Proteinform, so dass schließlich jede Bakterienzelle eine

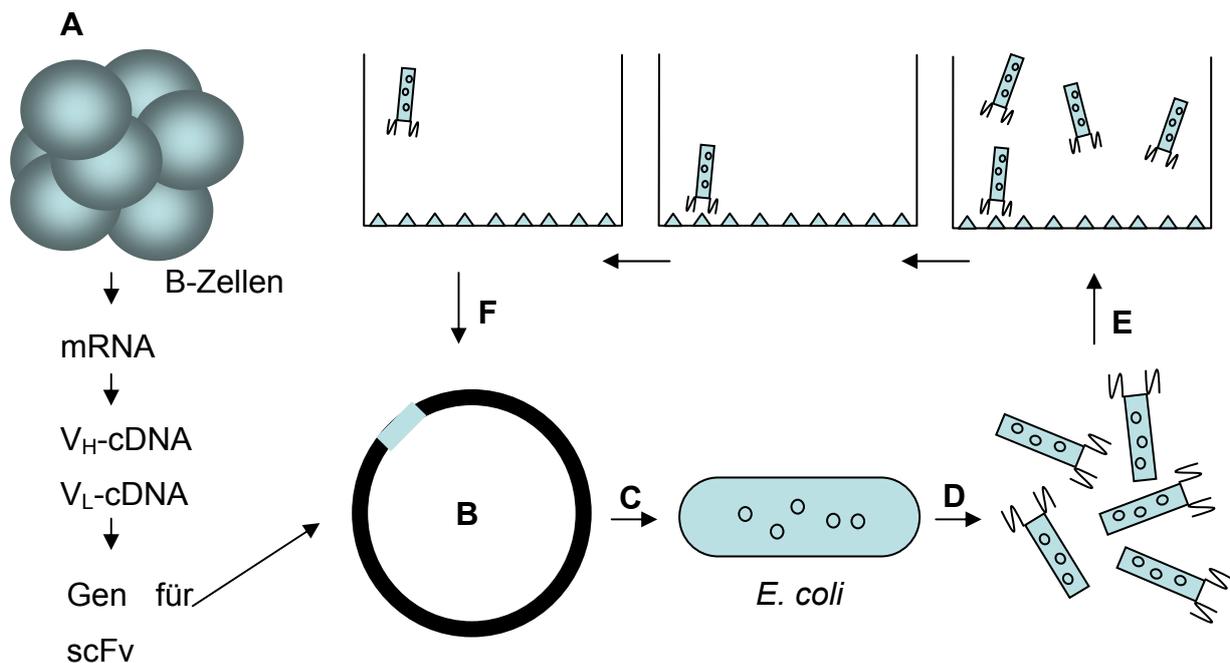


Abbildung 2.2: Funktionsweise des Phagendisplay zur scFv-Gewinnung

A – Die mRNA von B-Zellen wird revers transkribiert und aus der erhaltenen DNA wird eine kombinatorische Bibliothek von scFv-DNA-Sequenzen erstellt

B – Diese Genabschnitte werden mit jenen für ein Signalpeptid und das Hüllprotein pIII ligiert und in einen „Phagemid“-Vektor eingebaut

C – Transformation des Phagemids in *E. coli*. Die scFv-pIII-Fusionsproteine werden periplasmatisch exprimiert

D – Nach Infektion mit einem Helferphagen nimmt dieser die scFv in seine Hülle auf und wird aus der Zelle ausgeschleust

E – „Biopanning“: Positive Varianten binden mit dem scFv an immobilisiertes Antigen, nicht bindende Phagen werden durch Waschen entfernt und bindende Varianten anschließend eluiert.

F – Die aus positiven Varianten isolierten Phagemide stehen für erneute Transformation in *E. coli* zur Verfügung. Nach fünf Selektionsrunden hat man eine Auswahl ausreichend affiner scFv isoliert. Deren Primärstruktur kann durch DNA-Sequenzierung des Phagemids identifiziert werden.

Antikörper-Variante exprimiert. Diese liegt jedoch periplasmatisch vor und muss für Affinitätsuntersuchungen zunächst wieder ausgeschleust werden. Hierzu wird ein Helferphage eingesetzt, der die Zellen infiziert, das Phagemid aufnimmt und das pIII-Konjugat in seine Hülle einbaut. Der Einsatz pIII-defizienter Phagen führt dabei zu einem optimierten viralen Display des Fusionsproteins, da das „Phagemid“ nun die einzige Quelle für das Hüllprotein darstellt (McCafferty 1996; Rondot et al. 2001). Es resultiert ein Phage, der eine einzelne humane Antikörper-Variante an seiner Oberfläche präsentiert und das genomische Korrelat in sich trägt. Phagen sind aufgrund ihrer geringen Größe optischen Analyse-Methoden nicht zugänglich. Die Anreicherung positiver Varianten erfolgt deshalb mit aufgereinigtem immobilisiertem Antigen, mit dem die Bibliothek von scFv-tragenden Phagen inkubiert wird. Nichtbindende

Phagen werden durch Waschprozesse entfernt. Bindende Varianten werden anschließend eluiert, um erneut zur Transformation von *E. coli* zur Verfügung zu stehen. Durch mehrfache Wiederholung dieses Selektionsprozesses, den man in Anlehnung an Goldgräberzeiten als "Biopanning" bezeichnet, erreicht man eine Konzentrierung antigenspezifischer Phagen (Abb. 2.2) (Konthur et al. 2005). Zur Herstellung eines Gesamt-Immunglobulins werden die für V_H und V_L kodierenden Regionen eines selektierten „Phagemids“ in einen Vektor eingesetzt, der auch für die konstanten Regionen kodiert. Die Expression des vollständigen Antikörpers erfolgt dann in Säugetierzellen. Mit Phagendisplay lassen sich auch Antikörper gegen toxische oder nichtimmunogene Antigene gewinnen (Hoogenboom 2002). Das Verfahren kommt komplett ohne Immunisierung, und damit ohne Versuchstiere aus.

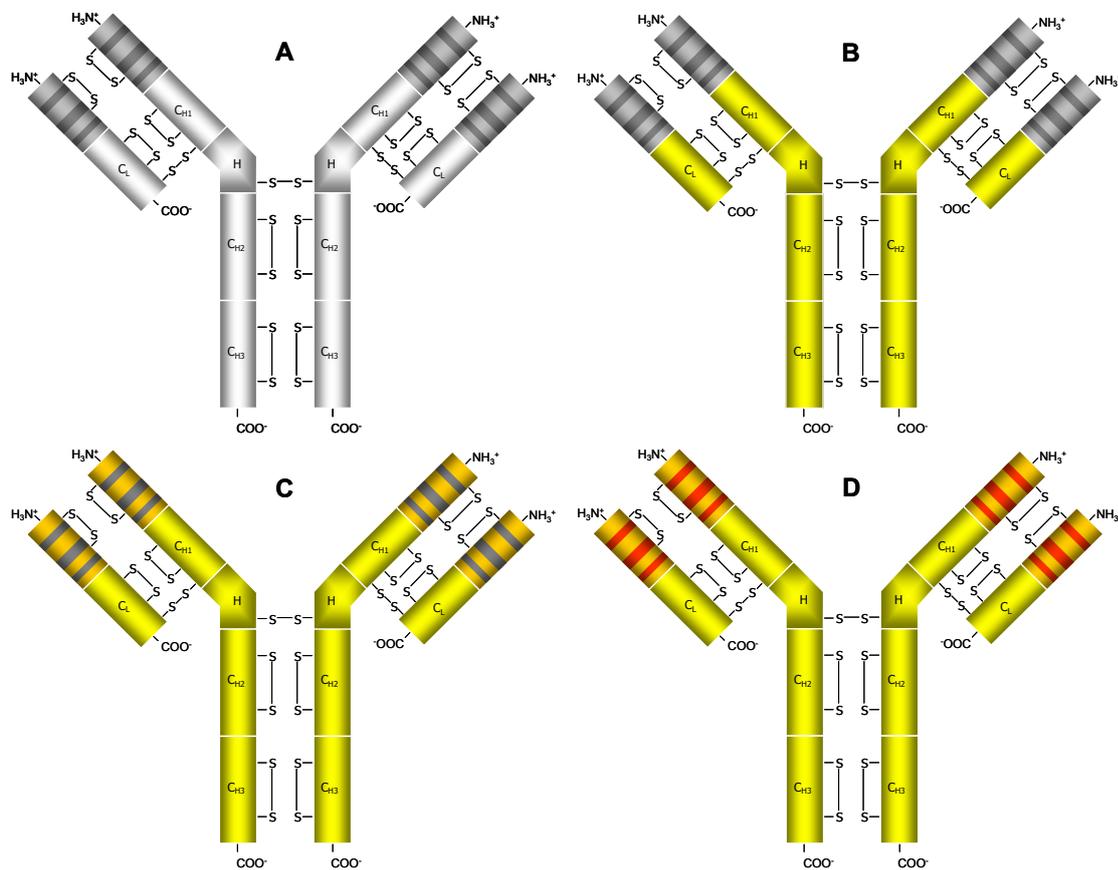


Abbildung 2.3: Vom murinen zum humanen Antikörper

Murine Proteinanteile sind grau, humane Anteile farblich gekennzeichnet.

A – rein muriner Antikörper (Endung -momab)

B – chimärer Antikörper (Endung -ximab)

C – humanisierter Antikörper (Endung -zumab)

D – rein humaner Antikörper (Endung -umab)

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung humaner Antikörper ist der Einsatz transgener Mauslinien, bei denen die murinen Antikörpergene eliminiert und durch einen Minilocus ersetzt wurden, der für die schwere und leichte Kette humaner Antikörper kodiert. V(D)J-Rearrangement und somatische Rekombination finden genauso statt wie im Menschen auch. Mit der klassischen Hybridomtechnik werden aus diesen Mäusen humane monoklonale Antikörper gewonnen. Die lange Generierungszeit für neue monoklonale Antikörper und der tierexperimentelle Aufwand bleiben bei diesem Verfahren erhalten (Green et al. 1994).

Auf dem deutschen Markt befinden sich zwei murine, fünf chimäre, zehn humanisierte und ein humaner Antikörper (VFA 2007).

2.3 Zelluläre Antikörper-Expression mittels Autodisplay-System

2.3.1 Gründe für ein zelluläres Expressionssystem

Phagendisplay stellt die größte Innovation bei der Gewinnung monoklonaler Antikörper seit Köhlers und Milsteins Publikation dar (Kohler und Milstein 1975). Allerdings ist Phagendisplay mit einer Reihe praktischer Schwierigkeiten verbunden. So hat sich gezeigt, dass nach der Transformation *E. coli*-Zellen, die ein korrektes pIII-Fusionsprotein exprimieren, häufig einen Wachstumsnachteil gegenüber Zellen mit fehlerhaften „Phagemiden“ haben (Fischer et al. 1999), da die Produktion des Fusionsproteins metabolische Ressourcen bindet oder sogar toxisch für die Zelle sein kann (Paschke 2006). Schätzungen zufolge liegt der Anteil an resultierenden Phagen ohne scFv-pIII in der Hülle bei bis zu 99,5 %, sei es aufgrund nicht erfolgreicher Translation in *E. coli* oder des ineffizienten Einbaus in die Hülle (Azzazy und Highsmith 2002). Da diese Phagen nicht zur funktionellen Bibliotheksgröße beitragen, wird die Selektionseffizienz drastisch reduziert. Dies hat zur Folge, dass in der Regel fünf Anreicherungszyklen durchgeführt werden müssen, bevor ein ausreichend affiner scFv gefunden wird. Jeder dieser Zyklen beinhaltet Neuinfektion von *E. coli*, Ernte der Phagenpartikel und Selektion. Letztere lässt sich aufgrund der geringen Größe nicht mit optischen Methoden, sondern nur mit immobilisiertem Antigen durchführen, das in ausreichender Menge zur Verfügung stehen muss. Die Immobilisierung, z. B. in den Reaktionsräumen einer Mikrotiterplatte, wiederum kann die Maskierung rele-

vanter Epitope oder unnatürliche konformationelle Änderungen des Antigens zur Folge haben, so dass der *in vitro* gefundene scFv nicht zwangsläufig *in vivo*-Aktivität besitzt (Osei 2002).

Das bakterielle Expressionssystem würde wesentlich vereinfacht, wenn die scFv nach ihrer Expression und dem Transport über die innere Membran nicht im Periplasma verblieben, sondern an der Oberfläche exponiert und korrekt gefaltet vorlägen. Dies würde Bindungsstudien mit ganzen Zellen ermöglichen, zum Beispiel die direkte Analyse mit Durchflusszytometrie in flüssiger Phase (Francisco et al. 1993a; Daugherty et al. 2000; Jose und Handel 2003; Jose und Zangen 2005). Die Anreicherungszyklen würden so erheblich abgekürzt, da der Umgang mit den nicht-autonom replizierenden Phagen, also regelmäßige Neuinfektion und Phagenernte, komplett entfiel.

E. coli stellt das ideale Vehikel für ein solches Expressionssystem dar. Zum einen ist es aufgrund seines weit verbreiteten Einsatzes in der Molekularbiologie einer der bestuntersuchten Organismen überhaupt. Seine Zellanzucht ist schnell, günstig und die DNA-Transformation sehr effizient. Es bestehen außerdem weitreichende Erfahrungen mit heterologer rekombinanter Proteinexpression durch *E. coli*. Eine Proteinglykosylierung ist zwar nicht möglich, bei der geplanten Expression variabler Domänen aber auch nicht notwendig (Verhoeyen 1996). Ein möglicher Weg zur effizienteren Suche nach maßgeschneiderten Antikörpern ist also die oberflächenständige Expression von variablen Fragmenten in *E. coli*.

2.3.2 Autotransporter als Exportmechanismus in gramnegativen Bakterien

Bei der Suche nach einer Möglichkeit, Proteine, in diesem Falle Antikörperfragmente, oberflächenständig auf *E. coli* zu exprimieren, liegt es nahe, zunächst dessen endogene Transportmechanismen näher zu betrachten. In der äußeren Membran gramnegativer Bakterien findet sich eine Reihe von Proteinen, die allesamt über β -Faltblätter verankert sind. *E. coli* verfügt über sechs Klassen unterschiedlicher Transportwege für derartige Proteine (Henderson et al. 2004). Am besten untersucht hiervon ist Typ Va (vgl. Abb. 2.3), der sog. Autotransporter-Proteine umfasst (Jose et al. 1995). Dieser Weg kommt ohne weitere Komponenten aus und enthält alle nöti-

gen Informationen zum Transport in einem Fusionsprotein. Dieses besteht aus vier funktionellen Domänen (Abb. 2.4A). Das N-terminale Signalpeptid vermittelt den Transport über die innere Membran ins Periplasma und wird anschließend durch eine Peptidase entfernt. Ohne Einflussnahme weiterer Komponenten lagert sich dann der C-Terminus in die äußere Membran ein und bildet dort eine porinartige Struktur in Form eines tetradekamembranen β -Fasses aus amphipathischen β -Faltblättern. Nach dem heute akzeptierten Modell (Jose et al. 1995; Muller et al. 2005) wird die entstandene Pore dazu genutzt, einen Linkeranteil wie eine Haarnadel nach Außen zu schleusen, den Passagieranteil als N-terminalen Teil im „Gepäck“. Dessen korrekte Faltung erfolgt erst nach dem Transport über die äußere Membran. Der Transportmechanismus der Autotransporter-Proteine wurde von Pohlner et al. am Beispiel der IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* erstmalig untersucht und charakterisiert (Pohlner et al. 1987). Gestützt wird dieses Ein-Komponenten-Modell nicht zuletzt durch die erste Kristallstruktur einer Autotransporter-Translokationseinheit (Oomen et al. 2004), obgleich es andere Gruppen gibt, die eine Implikation des hochkonservierten bakteriellen Proteins Omp85 in den Transport über die äußere Membran postulieren (Tommasen 2007). Alle bekannten Autotransporter-Proteine wirken als Virulenzfaktoren, indem sie entweder enzymatische Aktivität oder Aktin-gesteuerte bakterielle Motilität vermitteln oder aber Toxine, Adhäsine oder immunmodulatorische Proteine darstellen (Henderson und Nataro 2001). Nach dem Export werden sie in der Regel proteolytisch abgespalten und ins Extrazellulärmilieu sezerniert wie bei der IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner et al. 1987). In einigen Fällen bleiben sie weiter mit dem Bakterium assoziiert wie bei AIDA-I von *E. coli* (Benz und Schmidt 1992) oder werden gar nicht erst abgetrennt wie bei Hia von *Haemophilus influenzae* (St Geme und Cutter 2000).

2.3.3 Das Autodisplay-System

Das Einzigartige an Autotransportern ist, dass sämtliche Erfordernisse für den Transport über beide Membranen in einem Protein kodiert vorliegen. Diesen Vorteil hat sich die Arbeitsgruppe Jose zunutze gemacht, indem sie ein Expressionssystem basierend auf diesem Sekretionsmechanismus gramnegativer Bakterien konstruiert hat. Die Idee war es, den Translokationsmechanismus der Autotransporter für heterologe

Passagierproteine zu nutzen. Durch Austausch des Passagieranteils auf DNA-Ebene ist es möglich, ein anderes Protein als den ursprünglich kodierten Pathogenitätsfaktor oberflächenständig zu exprimieren (Abb. 2.4). Dieses Konzept wurde auf den Namen Autodisplay getauft (Maurer et al. 1997).

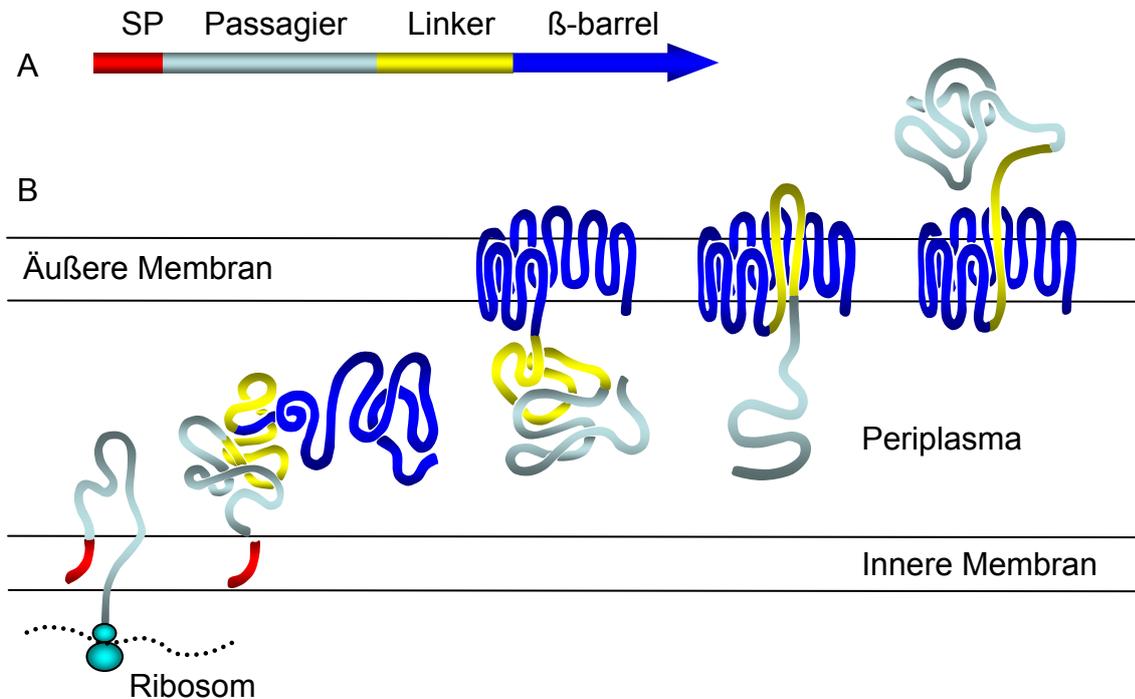


Abbildung 2.4: Der Autotransporter-Sekretionsweg

A – Schematische Darstellung des Aufbaus eines Autotransporterproteins; SP=Signalpeptid. Beim Autodisplay wird die kodierende Region des Passagiers durch jene ausgetauscht, die für das gewünschte Protein kodiert.

B – Funktionsweise: Das N-terminale Signalpeptid lagert sich in die innere Membran ein und vermittelt den Transport des übrigen Proteinanteils ins Periplasma. Nachdem das Signalpeptid durch eine Peptidase entfernt wurde, integriert der C-Terminus in die äußere Membran und bildet dort eine Pore aus. Durch diese wird der Passagier über den Linker ins Extrazellulärmedium transportiert, wo er seine endgültige Faltung annimmt.

Das im Arbeitskreis Jose etablierte Autodisplay-System ist komplett artifiziell und besteht aus den C-terminalen Regionen des AIDA-I, also dem Linker und dem β-Barrel sowie N-terminal aus dem Signalpeptid der Cholera-toxin B-Untereinheit (CTB), welches sich bereits in früheren Studien mit der IgA-Protease bewährt hatte (Klauser et al. 1990; Klauser et al. 1992). AIDA steht für „adhesin involved in diffuse adherence“ und stellt ein multifunktionelles Autotransporter-Protein enteropathogener *E. coli*-Stämme (EPEC) dar, mit dem die Bakterien unter anderem an Epithelzellen anheften (Benz und Schmidt 1989; Charbonneau und Mourez 2007). Über eine bestimmte Auswahl an Restriktionsschnittstellen lässt sich der DNA-Abschnitt für das ge-

wünschte Passagierprotein „downstream“ des Signalpeptids „in frame“ integrieren. In die Linkerregion wurden die Erkennungssequenz für eine Protease zur spezifischen Freisetzung des Passagiers sowie Epitope für Detektionszwecke eingebaut. Die DNA liegt in zirkulärer Plasmidform vor und kann durch Transformation schnell und effizient in *E. coli* eingebracht werden.

Die mögliche dreidimensionale Ausdehnung des zu exportierenden Proteins beim Transport über die äußere Membran wird durch jene der entstandenen Pore limitiert. Eine vorzeitige Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen und damit stabiler dreidimensionaler Strukturen im Periplasma kann den Transport behindern (Klauser et al. 1990). Dies betrifft vor allem die Ausbildung von Disulfidbrücken, die normalerweise im Periplasma gebildet werden. Um einen translokationskompetenten Zustand des heterologen Proteins aufrecht zu erhalten, wurde mit JK321 ein DsbA-negativer Stamm konstruiert, der die nötige Oxidoreduktase nicht produziert (Jose et al. 1996). Beim Einsatz DsbA-produzierender Stämme wie UT5600(DE3) kann durch Zusatz eines reduzierenden Agens die periplasmatische Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert werden. Für die stabile Oberflächenexpression ist ein weiteres Protein von *E. coli* von Interesse. OmpT ist eine natürliche Endopeptidase in der äußeren Membran (Grodberg und Dunn 1988). Sie ist in der Lage, das Passagierprotein von der Translokationseinheit zu trennen und in den Überstand zu entlassen, wie mit dem Stamm UT2300 (*ompT*⁺) gezeigt werden konnte (Maurer et al. 1997). Da dies für eine Vielzahl von Anwendungen unerwünscht ist, wurde auch *ompT* in JK321 mutiert. Weitere OmpT-defiziente Stämme sind UT5600 und BL21 sowie deren λ (DE3)-Mutanten.

Autodisplay als eine Form der zellulären Proteinexpression bringt bedeutende Vorteile gegenüber konventionellen Verfahren mit sich (Wernerus und Stahl 2004). Bakterien sind selbstreplikativ, bedürfen also keines Wirts zu ihrer Vermehrung wie es bei Phagen der Fall ist. Die Zahl der exportierten rekombinanten Proteine wurde in zwei Untersuchungen mit der Größenordnung von $1,5 \times 10^5$ bis $1,8 \times 10^5$ pro Zelle bestimmt (Jose et al. 2001; Jose und von Schwichow 2004a). Sie liegt damit über jener anderer Oberflächen-Expressionssysteme (Francisco et al. 1993a; Strauss und Gotz 1996). Die Zahl der Proteine in der äußeren Membran kann auch anhand des gefärbten SDS-Gels abgeschätzt werden, da das natürliche Protein OmpA in nahezu kon-

stanter Zahl pro Zelle in der äußeren Membran exprimiert wird und somit als interner Standard eingesetzt werden kann (Cole et al. 1982; Koebnik et al. 2000). Ein wesentlicher Vorzug des Autodisplays ist die freie Zugänglichkeit des heterologen Proteins an der Oberfläche, das somit den direkten Einsatz ganzer Zellen für Bindungs- oder Aktivitätsstudien ermöglicht. Die Membranmatrix hat ferner einen stabilisierenden Effekt und gewährleistet besser die Annahme einer funktionellen Konformation als bei aufgereinigtem Protein (Jose 2006). Ganze Zellen lassen sich auch für Screening-Methoden wie Durchflusszytometrie oder ELISA einsetzen. Für Bibliotheks-Anwendungen ist von Vorteil, dass die Sequenz bzw. Primärstruktur einer positiven Variante anhand des internen Labels, das jede Zelle in Form eines DNA-Plasmids trägt, einfach und schnell analysiert werden kann (Jose und Zangen 2005).

Das Autodisplay-System hat bereits in einer Reihe von Untersuchungen die Möglichkeit einer funktionellen Oberflächenexpression rekombinanter Proteine unter Beweis gestellt. So gelang es, verschiedene Enzyme wie Hydrolasen, speziell Esterasen sowie Dehydrogenasen zu exprimieren (Lattemann et al. 2000; Schultheiss 2002; Jose und von Schwichow 2004a). Am Beispiel des Eisen-Schwefel-Proteins Adrenodoxin konnte demonstriert werden, dass ein Einbringen prosthetischer Gruppen nach ihrem Transport über die äußere Membran zu einer funktionellen Einheit führt (Jose et al. 2001). Aprotinin als Enzyminhibitor wurde ebenfalls in funktionellem Zustand transloziert (Jose und Zangen 2005). Außerdem wurden Peptidbibliotheken exprimiert, aus denen mittels „High-Throughput Screening“ per „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) Enzyminhibitoren selektiert werden konnten (Jose et al. 2005). Auf dem Weg zu Ganzzellimpfstoffen ist die oberflächenständige Expression peptidischer Epitope von Interesse, die bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Maurer et al. 1997).

Eine weitere Besonderheit des Autodisplay-Systems ist die Tatsache, dass die Passagiere dank ihrer membranären Verankerung in Form des β -Barrels zwar fest mit der Zelle verbunden sind, jedoch an der Oberfläche selbst nicht stationär fixiert sind. Gemäß dem Flüssigmosaikmodell hat das β -Fass und demzufolge auch der mit ihm verbundene Passagier freie laterale Beweglichkeit in der Membran. Diese Tatsache ist für die Expression multimerer Proteine von Relevanz, da es möglich sein könnte, dass exprimierte Monomere sich an der Oberfläche zu funktionellen Einheiten zu-

sammenlagern. Tatsächlich konnte für die beiden Homodimere Sorbitdehydrogenase und Adrenodoxin gezeigt werden, dass die natürliche Affinität ihrer Untereinheiten zueinander ausreicht, dass sie sich in der äußeren Membran spontan zu funktionellen Entitäten zusammenzulagern (Jose et al. 2001; Jose und von Schwichow 2004a).

2.4 Antigene in dieser Arbeit eingesetzter Antikörperfragmente

2.4.1 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), ein gut untersuchtes Tumorantigen

EGFR ist eine Rezeptortyrosinkinase und gehört einer Familie von vier homologen Rezeptoren (ErbB1-ErbB4) an. Sie sind aus einer extrazellulären Ligandenbindungs-Domäne, einem membranständigen Abschnitt und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität aufgebaut. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch die Bindung spezifischer Liganden wie EGF und TGF α . Sie resultiert in der Ausbildung von ErbB-Homo- oder Heterodimeren und anschließender Phosphorylierung bestimmter intrazellulärer Aminosäurereste. Dadurch rekrutierte Effektormoleküle vermitteln die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Identifiziert wurden bisher die Wege über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase sowie die „signal transducers and activators of transcription“ (STATs). Am Ende dieser Kaskaden steht eine erhöhte Proliferation, Migration und Überlebensrate der Zellen (Mamot und Rochlitz 2006). Große Bedeutung haben ErbB-Rezeptoren aufgrund ihrer Rolle beim Wachstum einer Reihe epithelialer Tumoren gewonnen. Sie werden unter anderem bei Darm-, Hirn-, Blasen-, Prostata-, Lungen-, Brust-, Ovarial- und Kopf-Hals-Tumoren im Vergleich zum gesunden Gewebe signifikant überexprimiert (Kraus et al. 1987; Kyritsis und Saya 1993; Di Lorenzo et al. 2002; Maihle et al. 2002; Bruell et al. 2003; Levitzki 2003).

Es existieren viele Ansätze, um die tumorpromovierenden Effekte des EGFR und seiner Homologe zu unterbinden. Noch nicht zur Marktreife gebracht haben es short interfering RNA (siRNA) oder Antisense-Oligonukleotide, die bereits die Synthese des Rezeptors auf Transkriptions- bzw. Translationsebene verhindern sollen. Hingegen gibt es mittlerweile einige „small molecules“ wie Erlotinib oder Gefitinib, die die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors intrazellulär hemmen. Die Spezifität der Arzneistoffe ist begrenzt und es konnten bisher nur begrenzte Erfolge erzielt werden (Shepherd et

al. 2005; Chan et al. 2006). Eine erfolgreiche Alternative sind monoklonale Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet sind. Sie verhindern die Bindung des Liganden und die folgende Signalkaskade. Cetuximab ist ein solcher Antikörper und bereits im Markt etabliert. Die Zulassung erstreckt sich aktuell auf die Therapie des Kolorektalkarzinoms bei Versagen eines Irinotecan-haltigen Regimes und die Behandlung lokal fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses. Panitumumab ist ein humaner Antikörper mit dem gleichen Antigen und hat in Deutschland eine begrenzte Zulassung zur Behandlung metastasierter Kolorektalkarzinome erhalten (Yang et al. 2001). Im Unterschied zu Cetuximab handelt es sich nicht um einen chimären, sondern um einen humanen Antikörper. Die Wirkung beruht deshalb neben der Unterbindung von Proliferationssignalen zusätzlich auf Effektorfunktionen, die durch den humanen F_c -Teil des Antikörpers vermittelt werden und den Angriff des unspezifischen Immunsystems auf die entartete Zelle einleiten. Trastuzumab richtet sich gegen ErbB2 (HER2/neu) und wird zur Behandlung von Brustkrebspatientinnen mit Überexpression dieses Rezeptors eingesetzt.

2.4.2 Nef, ein Pathogenitätsfaktor des HIV-I

Das Nef-Protein ist ein Pathogenitätsfaktor aus dem Humanen Immundefizienzvirus I (HIV-I). Die Bezeichnung rührt daher, dass ihm ursprünglich ein negativer Einfluss auf das virale Wachstum zugeschrieben wurde, weshalb er als „negative factor“ bezeichnet wurde (Kim et al. 1989). Nef reguliert die Oberflächenexpression von MHC-I- und CD4-Rezeptormolekülen infizierter T-Zellen herunter. Hierdurch wird deren Erkennbarkeit für Zellen des humanen Immunsystems stark eingeschränkt, was eine beschleunigte Manifestation des Krankheitsbildes AIDS zur Folge hat (Williams et al. 2005). Nef ist deshalb ein interessantes pharmazeutisches Target in der HIV-Therapie und der Impfstoff-Forschung.

2.4.3 Gliom-assoziiertes Antigen 2 (GLEA2)

GLEA2 steht für glioma-expressed antigen 2. Es ist ein Autoantigen, das bei Patienten mit Hirntumoren häufig zu finden ist, während Blut- oder Gewebeproben gesunder Probanden nur geringe Konzentrationen aufweisen. Immunfluoreszenz und Immunhistochemie konnten die Präsenz von GLEA2 im Zellkern nachweisen, was die

These einer Rolle als Transkriptionsfaktor unterstützt (Pallasch et al. 2005). Die Präsenz ist jedoch nicht exklusiv für Tumorzellen, auch in gesunden Zellen findet sich die entsprechende mRNA (Fischer et al. 2001). Obgleich dies die Eignung als Target für spezifische Wirkstofffreisetzung einschränkt, bleibt GLEA2 für diagnostische Zwecke ein interessantes Ziel. Glioblastom-Patienten entwickeln in 43 % der Fälle eine Antikörper-Antwort gegen dieses Protein, was in einem Überlebensvorteil gegenüber seronegativen Patienten resultiert (Pallasch et al. 2005). Möglicherweise ist ein direktes Vorgehen gegen GLEA2 eine Therapieoption bei Glioblastom-Patienten.

2.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein zelluläres Oberflächen-Expressionssystem für Antikörperfragmente zu etablieren. Der Einsatz des Autodisplay-Systems sollte die funktionelle Expression von Antikörperfragmenten in *E. coli* ermöglichen. Dies sollte zunächst am Beispiel von scFv demonstriert werden. In einem weiteren Schritt sollte die getrennte Expression der leichten und schweren variablen Domäne eines Antikörpers erfolgen und geprüft werden, ob die erwartete Zusammenlagerung zu einem funktionellen Heterodimer erfolgt. Bei erfolgreichem Verlauf sollte durch getrennte Zufallsvariation von V_H und V_L eine kombinatorische Bibliothek generiert und auf Affinität zu einem GLEA2-Epitop gescreent werden, um so eine neue Antikörpersequenz zu erhalten. Dies diene als erster Schritt, um die beschriebenen Erleichterungen auf der Suche nach neuen maßgeschneiderten Antikörpern umzusetzen.

3 Materialien

3.1 Stämme

Die Experimente zur Oberflächenexpression wurden durchweg mit dem Stamm *E. coli* UT5600(DE3) (F^- , *ara-14*, *leuB6*, *secA6*, *lacY1*, *proC14*, *tsx-67*, $\Delta(\textit{ompT-fepC})266$, *entA403*, *trpE38*, *rfbD1*, *rpsL109(StrR)*, *xyl-5*, *mtl-1*, *thi-1*, $\lambda(\text{DE3})$) durchgeführt. Dieser hatte sich in vorherigen Untersuchungen als besonders geeignet für die Verwendung im Autodisplay-System erwiesen (Jose et al. 1996). Der Stamm JM110 (*rpsL*, (*StrR*), *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, $\Delta(\textit{lac-proAB})$, [F' , *traD36*, *proAB*, *lacIqZ\Delta M15*]) ist defizient für die Methylase Dam und wurde deshalb für kritische Anwendungen eingesetzt, bei denen Methylierungsmuster-sensitive Restriktionsenzyme wie XbaI zum Einsatz kamen (Sambrook 2001). Testweise wurden einzelne Plasmide in den Stamm BL21(DE3) (*B*, F^- , *dcm*, *ompT*, *lon*, *hsdS(rB⁻ mB⁻)*, *gal*, $\lambda(\text{DE3})$) transformiert, um die Stärke der Oberflächenexpression vergleichen zu können (Studier und Moffatt 1986). Sämtliche Plasmide, die als Grundlage dieser Arbeit dienten, lagen im Stamm JK321 ($\Delta\textit{ompT}$, *proC*, *leu-6*, *trpE38*, *ent*, *zih12::Tn10*, *dsbA::kan*) vor (Jose et al. 1996).

3.2 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden als Basis für die Arbeit verwendet, entweder als Vektorrückgrat oder als Lieferant für Antikörper-DNA-Sequenzen.

Plasmid	Größe	Resistenz	Passagier, Bemerkungen
pJM498 (Maurer 1998)	5155 bp	Amp ^R	scFv112
pJM568 (Maurer 1998)	4730 bp	Amp ^R	V _L 112
pJM1072/1074 (Maurer 1998)	5163 bp	Amp ^R	scFv425
pET-SH3 (Jose und von Schwichow 2004b)	7101 bp	Amp ^R	---

pET-SH3SDH08 (Jose und von Schwichow 2004a)	7872 bp	Amp ^R	SDH
pET-SH4 (Jose und von Schwichow 2004b)	7113 bp	Amp ^R	---
pKE19 (Engel 2006)	3397 bp	Cm ^R	kodiert für GFP, Mutante 3 (Cormack et al. 1996)
pCOLADuet-1 (Novy 2002; Held 2004)	3719 bp	Km ^R	Expressionsvektor mit 2 MCS und ColA ori (Zverev und Khmel 1985)
pAG004 (Gratz unveröffentlicht)	3723 bp	Km ^R	wie pCOLADuet-1, aber ohne Agel-Schnittstelle

3.3 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert, FB013-FB016 stammen von Operon.

Primername	Sequenz	Bindungsrichtung	Zweck
FB001	AAAAATAGGCGTAT CACGAGG	forward	Sequenzierung von pJM1072
FB002	ACGCTCTAGAGAC TACAAAGACGAAGTG	forward	Amplifikation der scFv425-DNA unter Einfügung einer XbaI-Schnittstelle
FB003	TATGTCTAGAGACAT CGAGCTCACCCAG	forward	Amplifikation der V _L 425-DNA unter Einfügung einer XbaI-Schnittstelle
FB004	TATAGTCGACCCCA GTAGTAGGTTGAG	forward	Amplifikation der kompletten Auto-transporter-DNA von pFB002
FB005	TATAAGATCTTGAG GAGACGGTGACCG	reverse	Amplifikation der V _H 425-DNA
FB006	CCCGACGCACTTT GCG	reverse	Sequenzierung des pFB004-Vektorbackbones
FB007	ATACACGGTGCCT GACTG	forward	Sequenzierung des pFB004-Vektorbackbones

FB008	CGAAATCTGACGC TCAAATC	forward	Sequenzierung des pFB004-Vektorbackbones
FB009	GTGGAGCTCCAAT TCG	reverse	Sequenzierung des pFB004-Vektorbackbones
FB010	ATATCTCGAGCCG TTTCAGCTCCAGC	reverse	Amplifikation der V _L 112-DNA unter Einfügung einer XhoI-Schnittstelle
FB011	ATATTCTAGATGTG GTGGTGGATCCCA GG	forward	Amplifikation der V _H 112-DNA unter Einfügung einer XbaI-Schnittstelle
FB012*	CTATTACTGTGCA AGAαβNaβNaβNaβ NaβNaβNaβNaβND γBGAYδWTTGGGG CGCAGGCACCA	forward	Variation der CDR3 von V _H 112
FB013	TGGTGCCTGCGCC CCA	reverse	Auffüllen von FB012 zum Doppelstrang
FB014*	GGGAGTTTATTACTG CCεCARζηYDRTR RTNNNθCTNNNACG TTCGGCTCGGGGA	forward	Variation der CDR3 von V _L 112
FB015	TCCCCGAGCCGAA CGT	reverse	Auffüllen von FB014 zum Doppelstrang
FB016	GCTGACTCAGTTTCC	forward	Sequenzierung von pFB015 und daraus abgeleiteten Bibliotheksplasmiden

* Die Buchstaben bei den Bibliotheksoligonukleotiden FB012 und FB014 sind entsprechend der international üblichen Nomenklatur (ambiguity code) gewählt (Tipton 1994). Die griechischen Buchstaben geben bestimmte prozentuale Gewichtungen einzelner Basen der customized wobbles wider:

α: 20 % A + 20 % C + 40 % G + 20 % T

β: 40 % A + 20 % C + 20 % G + 20 % T

γ: 15 % A + 15 % C + 00 % G + 70 % T

δ: 10 % A + 10 % C + 40 % G + 40 % T

ε: 95 % A + 00 % C + 00 % G + 05 % T

ζ: 10 % A + 10 % C + 10 % G + 70 % T

η: 70 % A + 10 % C + 10 % G + 10 % T

θ: 00 % A + 80 % C + 00 % G + 20 % T

3.4 Enzyme

Enzym	Hersteller / Lieferant
Antarktische Phosphatase	NEB
Desoxyribonuklease	Serva
Lysozym	Roth
Proteinase K	Fluka
Restriktionsenzyme	NEB, Fermentas, Hybaid, Takara
Ribonuklease A	Roth
T4-DNA-Ligase	NEB
Taq-Polymerase (Mastermix)	Eppendorf, Peqlab
Trypsin	Roth, Worthington
Vent-Polymerase	NEB

3.5 Peptide

Die Peptide FB1 und FB2 sind Epitope des Nef-Proteins bzw. von GLEA2 und wurden für durchflusszytometrische Messungen mit einer N-terminalen Fluorescein-Markierung synthetisiert.

FB1: FITC-GAASRDLD (Thermo)

FB2: FITC-PKRKRG (GLSChina)

3.6 Nährmedien und Agarplatten

Mit Wasser ist grundsätzlich steriles, hochdeionisiertes Wasser gemeint (MilliQ-Deionisierung). Alle Rezepte nach „Molecular Cloning - A laboratory manual“ (Sambrook 2001).

LB-Medium: 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl und 10 g Trypton/Pepton wurden in 1 l Wasser gelöst. Der pH wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Zum Gießen von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 15 g Agar-Agar hinzugegeben. Der sterilen Lösung wurden ggf. ein oder mehrere Antibiotika zugesetzt und die Platten gegossen. Endkonzentrationen: Ampicillin-Na 50-100 µg/ml; Chloramphenicol: 25 µg/ml; Kanamycinsulfat-Na 15-30 µg/ml.

YT-Medium: 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 16 g Trypton/Pepton wurden in 1 l Wasser gelöst. Der pH wurde auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

GYT-Medium: 1,25 g Hefeextrakt, 2,5 g Trypton/Pepton und 10 g Glycerol 99,5 % wurden in 1 l Wasser gelöst und die Lösung autoklaviert.

SOC-Medium: 5 g Hefeextrakt, 20 g Trypton/Pepton, 2 ml KOH 1 M und 10 ml NaCl 1 M wurden in 1 l Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden MgCl₂ und Glukose zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt.

PPM-Medium: 15 g Trypton/Pepton, 5 g NaCl, 1 g Zulkowsky Stärke, 1 g KH₂PO₄, 0,8 g K₂HPO₄, 232,5 ml Glycerin 86 % wurden in 767,5 ml Wasser gelöst und autoklaviert.

3.7 Puffer und andere Lösungen

Alle Rezepte nach „Molecular Cloning - A laboratory manual“ (Sambrook 2001).

3.7.1 Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly

- Lösung 1 Na₂EDTA 10 mM in Tris/HCl 50 mM pH 8,0; dann + RNAse A 100 µg/ml
- Lösung 2 Natriumdodecylsulfat (SDS) 1 % in NaOH 0,2 M
- Lösung 3 Kaliumacetat 3 M / Eisessig pH 4,8 - 5,3

3.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

1 x TA-Puffer	Tris 40 mM, EDTA 1 mM, mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt
Färbebad	Ethidiumbromid 1 µg/ml in 1 x TA-Puffer
10 x Gelladepuffer	SDS 1 %, Glycerol 50 %, Bromphenolblau 0,02 %

3.7.3 Membranisolierung und SDS-PAGE

PBS	KCl 0,2 g/l, KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l, pH 7,4
Extraktionspuffer	Triton X 100 2 %, Tris 0,2 M/HCl pH8 25%, MgCl ₂ 1M 1%
Trenngelpuffer	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 %, TEMED 0,4 %
Trenngel 12,5 %	2,1 ml Polyacrylamidlösung, 1,25 ml Trenngelpuffer, 1,6 ml Wasser, 50 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lösung 1 % (APS)
Sammelgelpuffer	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4 %, TEMED 0,4 %
Sammelgel	0,22 ml Polyacrylamidlösung, 0,42 ml Sammelgelpuffer, 1,03 ml Wasser und 10 µl APS-Lösung
Probepuffer	Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 4 %, Glycerol 20 %, EDTA 2 mM, Bromphenolblau 0,02 %
SDS-Laufpuffer	Tris 0,025 M, Glycin 0,192 M, SDS 0,1 %
Coomassie-Lösung	Coomassie Brilliant-Blue 0,25 g, 45 ml Methanol, 45 ml Wasser, 10 ml Eisessig

3.7.4 Lösung für die Fluoreszenzmikroskopie

Mounting Medium	Polyvinylalkohol 25/140 5 %, Glycerol 10 % in PBS
-----------------	---

3.8 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Albumin Fraktion V	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Merck

Ampicillin-Natrium	Roth
Aprotinin	Roth
Bromphenolblau	Acros
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma
Chloramphenicol	Roth
Coomassie Brilliant Blue	Serva
D(+)-Saccharose p.a.	Roth
Dodecylsulfat-Na (SDS)	Serva
Ethanol p.a.	Riedel-de Haën
Fetal Calf Serum (FCS)	BioWest
Glycerol p.a. wasserfrei	Roth
Glycerol reinst 86 %	Roth
Glycin p.a.	Roth
Glutamax	Gibco/Invitrogen
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Applichem
Isopropanol p.a.	Fluka
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	Fermentas
Kanamycinsulfat	Roth
Natriumchlorid	Merck
n-Laurylsarcosinat-Na	Sigma
Page Ruler Unstained Protein Ladder	Fermentas
Penicillin	Coelbe
PMSF	Sigma
Rotiphorese Gel 30 37,5:1	Roth
Streptomycin	Coelbe
TEMED	Roth
Tris	Sigma
Tris-HCl	Roth
Trypton/Pepton aus Casein	Roth

3.9 Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Labnet	Electrophoresis Sub System 150
Autoklav	Systec	3850 ELV
Brutschrank	Memmert	
Dokumentationssystem	Intas	
Elektroporator	Eppendorf	2510
Feinwaage	Sartorius	2001 MP2
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axiovert 100
Magnetrührer	Ikamag	RCT
PCR-Geräte	Eppendorf	Mastercycler gradient
	MWG	Primus
pH-Meter	Knick	766 Calimatic
Photometer	Thermo lectron	E- Genesys 6
Power-Supply	Biometra	Standard Power Pack P25
Rotoren Ultrazentrifuge	Thermo Scientific	Sorvall SS-34, SLA-1500
Schüttelinkubator	Infors	Minitron
SDS-Gelelektrophoresekammer	Biorad	Mini Protean 3
Thermoblock	Labnet	AccuBlock
Tischzentrifugen	Hettich	Mikro 120 (ohne Kühleinheit)
		Universal 32R (mit Kühleinheit)
Ultrazentrifuge	Thermo Scientific	RC5C Plus
Vortex	Scientific industries	In- Vortex-1 Genie Touch Mixer
Wasseraufbereiter	Millipore	Biocell Milli-Q
Wasserbad	Memmert	

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Bakterien

4.1.1 Anzucht von Bakterien

Übernachtskulturen von Bakterien wurden in LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Abhängig von den enthaltenen Plasmiden des anzuziehenden Stammes wurden ferner Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml) und/oder Kanamycin (15 µg/ml) zugesetzt. Die Beimpfung erfolgte entweder durch eine Einzelkolonie einer Agarplatte, durch einen Teil einer Glycerolkultur, der 1 % des Volumens der Übernachtskultur entsprach oder durch ein einzelnes Glaskügelchen eines Kryoröhrchens. Die jeweilige Hauptkultur des nächsten Tages wurde neben den Antibiotika zusätzlich mit 10 µM EDTA und 15 mM 2-Mercaptoethanol versetzt und anschließend mit einem Teil der Übernachtskultur angeimpft, der 1 % des Volumens der Hauptkultur entsprach. Die Zellen wurden in der Regel bis zu einer optischen Dichte von $OD_{578\text{ nm}}=0,5-1,0$ angezogen.

Zur Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C auf Agarplatten angezogen, in die die entsprechenden Antibiotika in der oben angegebenen Konzentration miteingegossen worden waren. Die Platten wurden mit jeweils einer Einzelkolonie beimpft und am nächsten Tag mit einer Impföse abgeerntet.

4.1.2 Induktion der Proteinexpression

Für Versuche, die auf der Expression von Autotransporter-Fusionsproteinen basierten, wurde nach der Zellanzucht 1 mM IPTG zur Flüssigkultur hinzugefügt, um auf diese Weise die Proteinexpression zu induzieren. Die Kolben wurden 1 h bei 28 °C und 200 rpm geschüttelt. Für die anschließenden Experimente wurden die Zellen bei 3.000 x g abzentrifugiert.

4.1.3 Stammhaltung

Zur kurzfristigen Lagerung von Stämmen wurden Ausstriche auf Agarplatten angelegt. Zur längerfristigen Lagerung (mehr als zwei Wochen) wurde eine wie unter 4.1.1

beschrieben angezogene Flüssigkultur mit 20 % reinem Glycerol versetzt und bei -70 °C eingefroren. Zur dauerhaften Lagerung (länger als sechs Monate) wurden die Zellen einer frischen Stammhaltungsplatte mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens abgeerntet und in 2 ml PPM-Medium überführt. Die gleichmäßig verteilte Zellsuspension wurde zu gleichen Hälften in zwei sterile, mit Glaskugeln gefüllte Kryoröhren pipettiert, im Ethanol/Trockeneis-Bad schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4.1.4 Herstellen elektrokompetenter Zellen

Für den Einsatz bei der Elektroporation werden Zellsuspensionen benötigt, die einen minimalen Salzgehalt aufweisen. Um dies zu erreichen, wurden 2 x 200 ml Hauptkultur des betreffenden Stammes mit YT-Medium und ggf. dem nötigen Antibiotikum angesetzt und mit je 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Bei $OD_{578\text{ nm}}=0,5$ wurden die Kulturkolben 30 min auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 4 °C und 2.500 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden zwei mal mit kaltem Millipore-Wasser und einmal mit 10 %-iger Glycerollösung gewaschen. Das nach erneuter Zentrifugation resultierende Pellet wurde in 750 µl GYT-Medium resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt. Diese wurden im Ethanol/Trockeneis-Bad eingefroren und bei -70 °C gelagert.

4.2 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

Diese Arbeiten wurden vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von PD Dr. Lars-Oliver Klotz durchgeführt. Lars-Oliver Klotz ist mittlerweile Arbeitsgruppenleiter in der Abteilung für Molekulare Altersforschung des Instituts für Umweltmedizinische Forschung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

4.2.1 Anzucht von A431-Zellen

Die humane Epidermis-Tumorzelllinie A431 wurde freundlicherweise von Prof. Peter Brenneisen, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Sie wurde bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) kultiviert, das mit 9 % FCS, 2 mM Glutamax, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt war.

4.2.2 Silencing des EGFR in A431-Zellen

Um die Expression des EGF-Rezeptors durch RNA-Interferenz herunterzuregulieren, wurden die A431-Zellen mit einer Dichte von 25.000-50.000 / Kulturschale (7 cm²) ausgesät und bis zu 30-40 %-iger Konfluenz kultiviert. Die Verabreichung von short interfering RNA (siRNA) wurde mit Oligofectamine Transfektionsreagenz (Invitrogen) durchgeführt. Eingesetzt wurde siRNA gegen den EGFR oder Kontroll-siRNA in einer Konzentration von jeweils 30 nM.

4.2.3 Kontrolle der EGFR-Level in A431-Zellen

Die Analyse der EGFR-Expressionsstärke erfolgte per Western Blot. Pro Kulturschale wurden 100 µl SDS-Lösung (0,5 %) zur Lyse der Zellen hinzugefügt. Nach kurzer Ultraschallbehandlung wurde zentrifugiert. Der folgenden SDS-PAGE mit 10 %-igem Acrylamidgel schloss sich ein Western Blot und die Immunodetektion mit einem polyklonalen Kaninchen anti-EGFR Antikörper (#06-847, Upstate Biotechnology) an. Die Visualisierung erfolgte nach Standardprozedur mit einem sekundären Antikörper und Detektion mittels Chemilumineszenz. Da 72 h nach der siRNA-Transfektion die EGFR-Expression signifikant reduziert war, wurden zu diesem Zeitpunkt die Bindungsexperimente mit *E. coli*-Zellen sowie eine immunzytochemische Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die EGFR-Verteilung mit oben genanntem Antikörper nach Standardprotokoll überprüft. Die Zellkerne wurden mit 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) blau angefärbt.

4.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.3.1 Plasmidisolierung mit Kits

Zu Zwecken der Sequenzierung, PCR oder vergleichbar sensibler Anwendungen wurden Plasmidisolate mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits hergestellt. Hierbei wurde abhängig von den eingesetzten Plasmiden meist ein größeres Volumen der Übernachtskultur eingesetzt (8-10 ml) als in der Anleitung vorgesehen, da sich auf diese Weise eine deutlich gesteigerte Ausbeute erzielen ließ. Im Übrigen wurde die Anleitungen des jeweiligen Kits befolgt. Zum Einsatz kam am Anfang der Arbeit das „Plasmid Miniprep Kit“ (Peqlab), später das „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen).

4.3.2 Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly (modifiziert)

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Eine Impföse einer frisch bewachsenen Agarplatte des betreffenden Stammes wurde in 300 µl Lösung 1 (inkl. 1 % RNase) durch Vortexen und Scratches an einem Reaktionsgefäßständer sorgfältig suspendiert. Danach wurden 300 µl Lösung 2 hinzugegeben und die Mischung für 3 min inkubiert bei gelegentlichem vorsichtigem Schwenken. Nach Zugabe von 300 µl der Lösung 3 wurde das Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig gekippt. Anschließend wurde bei 15.500 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 700 µl Isopropanol p.a. überführt. Nach kurzem Schütteln wurde erneut 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 900 µl Ethanol p.a. 70% zugeben. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde erneut der Überstand verworfen, das Pellet durch Unterdruck getrocknet und in einem adäquatem Volumen Millipore-Wasser (50-100 µl) gelöst.

4.3.3 Verlängerung einzelsträngiger Oligonukleotide

Für die Strategie zur Randomisierung einzelner Abschnitte in Plasmiden war es nötig, die als einzelsträngige DNA-Moleküle gelieferten Oligonukleotide FB012 und FB014 zunächst zum Doppelstrang aufzufüllen. Hierzu wurden je 5 µg mit einem dreifachen molaren Überschuss an 3'-bindendem Primer (FB013 für FB012 und FB015 für FB014) versetzt und mit 40 µl TE-Puffer + 100 mM NaCl auf 50 µl aufgefüllt. Nach initialer Denaturierung im Thermocycler (10 min bei 95 °C) wurden durch langsames Abkühlen (0,1 °C/s) auf 4 °C beide Stränge hybridisiert. Nach Zugabe von 8 µl dNTP Mix (10 mM), 20 µl Klenow-Puffer und 3 µl Klenow-Enzym (3', 5'-exo⁻) wurde mit Millipore-Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde nach 15 min bei 37 °C durch Denaturierung des Enzyms (20 min bei 75 °C) abgestoppt. Der Ansatz wurde anschließend durch Einsatz eines speziellen Kits („Qiaquick Nucleotide Removal Kit“, Qiagen) vom kurzkettigen Primer und Salzen befreit.

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vorbereitung von Klonierungen wurden DNA-Abschnitte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1988) vervielfältigt. Hierzu wurde meist Plasmid-

DNA als Template eingesetzt, welche mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits isoliert worden war. Als Primer wurden entweder Oligonukleotide eingesetzt, die unmittelbar den zu amplifizierenden Abschnitt begrenzen oder die weiter außerhalb dieser Region binden, sofern bereits geeignete Restriktionsendonuklease-Schnittstellen im Template vorhanden waren. Als vervielfältigendes thermostabiles Enzym wurde standardmäßig Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Carballeira et al. 1990) eingesetzt. Dieses wurde in Form des „MasterMix“ (Eppendorf) verwendet, der bereits alle nötigen Puffersubstanzen und Nukleotide enthielt. Folgende Volumina bzw. Konzentrationen kamen zum Einsatz:

- ◆ 27,4 µl Millipore-Wasser
- ◆ 1,0 µl Primer 1 (10 µM)
- ◆ 1,0 µl Primer 2 (10 µM)
- ◆ 0,6 µl Template-DNA
- ◆ 20,0 µl Mastermix

Die Reaktion wurde in einer der verfügbaren PCR-Geräte durchgeführt, wobei der initialen Denaturierung der DNA bei 94 °C (5 min) die eigentliche Amplifikation (30-33 Zyklen) folgte: Denaturierung bei 94 °C (30 s), Annealing (T_A , 30 s) und Elongation (72 °C, t_{el}). Abschließend wurde die Probe weitere 6 min bei 72 °C gehalten und dann auf 4 °C heruntergekühlt. Die optimale Annealingtemperatur T_A wurde mit Hilfe des Programms Vector NTI (Invitrogen) bestimmt. Die Elongationszeit t_{el} wurde abhängig von der Größe der zu amplifizierenden DNA gewählt, wobei pro Kilobase mit etwa einer Minute kalkuliert wurde. Nach Abschluss der eingestellten Temperaturzyklen wurde das Produkt aufgereinigt, wobei eine der im Folgenden genannten Methoden (in der Regel Fällung) zum Einsatz kam.

Ganz analog wurden PCR zur Überprüfung von Klonierungsergebnissen durchgeführt. Da hier jedoch eine qualitative Analyse ausreichend war, wurde in der Regel ein Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt mit entsprechend reduzierten Volumina der einzelnen Komponenten. Der Ansatz wurde zur Visualisierung im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die PCR zur Randomisierung der CDR3 von V_H112 und V_L112 wurden folgendermaßen durchgeführt: Mittels Gradienten-PCR und durch Variation von t_{el} wurden die optimale Bedingungen für beide PCR ermittelt. Nach der Durchführung der PCR mit diesen Parametern wurde das Template durch DpnI-Verdau (2 h bei 37 °C) degradiert, um als Bruchstücke aus den Ansätzen entfernt werden zu können. Anschließend wurde die DNA durch Fällung gereinigt und der komplette Ansatz transformiert. Das erhaltene Bibliotheksplasmid pFB015_{Bib} wurde in *E. coli* UT5600(DE3) transformiert. Aus dem Ansatz wurden elektrokompetente Zellen erstellt, in die anschließend pFB008_{Bib} transformiert wurde.

	V_L112 (pFB015_{Bib})	V_H112 (pFB008_{Bib})
T_A	59,6 °C	63,0 °C
t_{el}	7 min	14 min

4.3.5 DNA-Aufreinigung durch Fällung

Eine effektive Methode zur Entfernung von Pufferbestandteilen oder anderen hydrophilen Agenzien in einer DNA-Lösung stellt die alkoholische Fällung dar. Hierzu wurde das doppelte Volumen der zu fällenden Lösung an Isopropanol p.a. hinzugesetzt und der Ansatz 1 h bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde für 20 min bei 4 °C und 19.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und zur Lösung etwaiger ionischer Restbestandteile wurde das vierfache Ausgangsvolumen Ethanol 70 % p.a. (V/V) zugegeben und erneut für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Unterdruck getrocknet und mit dem gewünschten Volumen Millipore-Wasser gelöst.

4.3.6 DNA-Aufreinigung durch Kits

Eine schnellere, wenn auch quantitativ weniger erfolgreiche Methode zur DNA-Aufreinigung stellt die Verwendung kommerziell erhältlicher Kits dar. Es wurden hierbei die Anleitungen der Hersteller befolgt. Am Beginn der Arbeit kam das „Gel Extraction Kit“ (Peqlab) zum Einsatz, später das „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen).

4.3.7 DNA-Aufreinigung durch Dialyse

Eine dritte Möglichkeit zur DNA-Aufreinigung ist die Dialyse mittels geeigneter Membranen. Sie ist mit geringen Verlusten verbunden und schnell durchzuführen, allerdings bietet sie nicht die Möglichkeit zur Aufkonzentrierung der DNA. Zum Einsatz kamen MF Millipore Membranfilter mit einer Porenweite von 25 nm (VSWP02500). Ein Membranstück wurde auf die Wasseroberfläche in einer Petrischale gelegt und die DNA-Lösung aufpipettiert. Nach 30-60 min des osmotischen Ausgleichs wurde die entsalzte Probe wieder abpipettiert.

4.3.8 Restriktionsendonukleaseverdau

Die Einzelkomponenten bei Restriktionsverdau (DNA, Puffer, Wasser, Enzym) wurden nach den Angaben der Hersteller zusammengefügt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h bei 37 °C (oder abweichend anderer Temperatur, je nach Enzym). Für rein analytische Verdau wurde teilweise auf eine zeitaufwändige Inkubation verzichtet und stattdessen eine 45-sekündige Behandlung mit Mikrowellen (600 W) durchgeführt, die in der Regel zum gleichen Ergebnis führte.

4.3.9 Dephosphorylierung der 5'-Enden

Um eine Religation von nur einfach geschnittenen Vektormolekülen bei Ligationsansätzen zu vermeiden, wurde der Vektor in der Regel am 5'-Ende dephosphoryliert. Hierbei kam Antarktische Phosphatase zum Einsatz. Puffer und Enzym wurden direkt zum Restriktionsansatz hinzugegeben und für 15 min (5'-Überhänge, blunt ends) bzw. 1 h (3'-Überhänge) bei 37 °C inkubiert. Die Enzyminaktivierung erfolgte bei 65 °C für 5 min.

4.3.10 Agarose-Gelelektrophorese

Standardmäßig wurden DNA-Fragmente in 0,8 %-iger Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die deutliche Auftrennung kleinerer Fragmente (<1 kbp) wurde 1,5 % bis 2,5 % Agarose eingesetzt. Die Agarose-Lösung wurde durch Aufkochen der entsprechenden Menge Agarose in TA-Puffer hergestellt und bei 65 °C gelagert. Gele wurden dann in der Regel frisch gegossen und nach dem Aushärten in die mit TA-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Neben den DNA-Proben, die es zu unter-

suchen galt, wurde immer mindestens eine Laufspur für einen DNA-Marker reserviert, der einen Größenvergleich der Banden ermöglicht. Um das Absinken der DNA-Proben in die Geltaschen zu gewährleisten, wurde ihre Dichte durch Zugabe von Ladepuffer erhöht, der mit Bromphenolblau gleichzeitig einen farbigen Marker zur Visualisierung der erzielten Laufweite beinhaltet. Bei einer Spannung von 120 V wurden die Proben aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele im Ethidiumbromidbad gefärbt, unter UV-Licht bei 312 nm ausgewertet und dokumentiert.

4.3.11 Gelextraktion

Um Fragmente, die für weitere Versuche benötigt wurden, wieder aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde eine Gelextraktion durchgeführt. Hierzu wurde das DNA-Stück mit einem Skalpell unter dem Transilluminator ausgeschnitten und die enthaltene DNA unter Einsatz kommerziell erhältlicher Kits extrahiert. Die Aufreinigung erfolgte exakt nach Anleitung. Am Beginn der Arbeit kam das „Gel Extraction Kit“ (Pq-lab) zum Einsatz, später das „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen).

4.3.12 Ligation

Zur Verknüpfung zweier DNA-Fragmente, die über kompatible Enden verfügen, wurde eine Ligation mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA in Gegenwart von ATP. Die Volumina an DNA-Lösung wurden dabei so gewählt, dass ein fünffacher molarer Überschuss des kleineren („Insert“) gegenüber dem größeren Fragment („Vektor“) resultiert, um die Effizienz des Fragmenteinbaus zu erhöhen. Zum Einsatz kamen ausschließlich bereits aufgereinigte DNA-Lösungen. Nach Zugabe von Pufferlösung und 1 µl der T4-DNA-Ligase (NEB) wurde der Ansatz unterschiedlich behandelt. Entweder erfolgte die Inkubation für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 16 °C. Im Anschluss erfolgte in der Regel eine DNA-Aufreinigung, meist durch Fällung.

4.3.13 Transformation in elektrokompetente Zellen

E. coli-Zellen sind natürlicherweise nicht in der Lage, DNA aktiv aufzunehmen. Hierzu bedarf es erst einer entsprechenden Behandlung. Um ein Plasmid, das man z.B.

durch einen Ligationsansatz erhalten möchte, in *E. coli* zu transformieren, wurde die Methode der Elektroporation gewählt (Neumann et al. 1982). Ein Aliquot elektrokompenter Zellen des betreffenden Stammes wurde auf Eis lagernd aufgetaut und mit der DNA-Lösung vermischt. Aufgereinigte Ligationsansätze wurden meist als Ganzes eingesetzt, bei der Transformation von Plasmidlösung war 1 µl Lösung immer ausreichend. Die Zell-DNA-Suspension wurde einem kurzen Spannungsimpuls (ca. 4 ms) von 1.800 V ausgesetzt und anschließend sofort mit 1 ml SOC-Medium versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C und 50 rpm inkubiert, um dann unterschiedliche Volumina auf Antibiotika-haltigen Agarplatten auszustreichen.

4.3.14 DNA-Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungen wurden durch externe Analyse im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum Düsseldorf durchgeführt. Es wurden eigene Primer eingesetzt, die mindestens 100 bp upstream der interessierenden Sequenz binden. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Chromas Lite 2.0 ausgewertet.

4.4 Arbeiten mit Proteinen

4.4.1 Isolierung der äußeren Membranen von *E. coli*

Die Isolierung äußerer Membranen und ihrer integralen Proteine erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke 1981). Nach Anzucht der Zellen bis zu einer $OD_{578\text{ nm}}=0,6$ wurde die Proteinexpression induziert und eine Zentrifugation bei 2.000 x g vollzogen. Das erhaltene Zellpellet wurde zweimal mit Tris 0,2 M/HCl-Lösung pH8 gewaschen und dann in 1,5 ml dieser Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Saccharose 1 M (Endkonzentration $c=20\text{ mM}$), 100 µl EDTA 10 mM ($c=0,2\text{ mM}$), 100 µl Lysozym 1 % ($c=0,2\text{ mg/ml}$) und 3,2 ml Wasser wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so erhaltenen Sphäroplasten wurden durch Zugabe von 50 µl PMSF 100 mM in Isopropanol ($c=0,5\text{ mM}$), 10 µl Aprotinin 1 % in HEPES 10 mM pH8 ($c=10\text{ µg/ml}$), 5 ml Extraktionspuffer und 100 µl DNase 0,1 % ($c=10\text{ µg/ml}$) aufgeschlossen. Nach 25 min auf Eis wurde bei 1500 x g zentrifugiert, der Überstand samt enthaltener äußerer Membranen in ein neues Gefäß überführt und bei 25.000 x g erneut zentrifugiert, wobei ein Protein-Membran-Konglomerat sedimentiert. Das Pellet wurde mit 10 ml n-Laurylsarcosinat-Na 1 % in

PBS versetzt, nach erneuter Sedimentation mit 1 ml Wasser gewaschen und abschließend mit Sample-Buffer resuspendiert. Vor einer Auftrennung im SDS-Gel erfolgte ein kurzes Aufkochen (5 min) der Proben bei 95 °C, um die Sekundärstrukturen der Proteine zu zerstören. Eine Lagerung der Proben war ohne Weiteres für längere Zeit bei -20 °C möglich.

4.4.2 Proteaseverdau als Nachweis für die Oberflächenständigkeit von Proteinen

Die Behandlung ganzer Zellen mit einer Protease führt zur Degradation nach außen gerichteter (Passagier)Proteine. Ein Fehlen vorher vorhandener Banden im SDS-Gel indiziert dann die Oberflächenständigkeit des Proteins, also den korrekten Export mittels Autodisplay. Um diesen Nachweis zu führen, wird dem Protokoll zur Isolierung der äußeren Membranen bis zum Waschen des Pellets mit Tris-Lösung gefolgt. Hier schließt sich der Protease-Verdau an, indem man das Pellet in 1 ml Tris 0,2 M/HCl-Lösung pH8 resuspendiert und 150 µl Trypsin 2,5 % in NaCl 0,9 % (c=0,75 mg/ml) oder 50 µl Proteinase K 2 % in NaCl 0,9 % (c=0,2 mg/ml) zugibt. Die Inkubation erfolgt 1 h lang bei 37 °C und 50 rpm. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 ml FCS 10 % in Tris 0,2 M/HCl pH8 abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit dieser FCS-Lösung wird das obige Protokoll mit der Lysozym-Zugabe fortgesetzt.

4.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die erhaltenen Membranisolate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden 10-12,5 %-ige Polyacrylamidgele eingesetzt, da diese eine optimale Trennung der Autotransporterproteine und anderer bedeutender Membrankomponenten ermöglichen. Ein darüber gelegenes Sammelgel bewirkte die Aufkonzentrierung der Proteine. Die aufgekochten Proben wurden bei einer konstanten Spannung von 100 V aufgetrennt. Als Marker wurde der SDS-PAGE Ruler von Fermentas genutzt.

4.4.4 Färbung und Auswertung von SDS-Gelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die SDS-Gele für 30 min mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Essigsäure 10 % und durch moderates Schütteln. Der Vorgang konnte durch Einsatz von Mikrowellen (150 W)

deutlich beschleunigt werden. Vor der Dokumentation wurden die Gele noch mit Wasser rehydratisiert, was sie wieder zur ursprünglichen Größe aufquellen ließ.

4.5 Arbeiten mit Fluoreszenz

Die Visualisierung biologischer Phänomene ist eine wichtige Voraussetzung molekularbiologischer Arbeiten im Labor. Häufig genutzt werden hierzu Fluoreszenzfarbstoffe, die einem Peptid, Protein oder auch einer ganzen Zelle Farbigkeit verleihen, welche mit optischen Methoden analysiert werden kann.

Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz, bei der ein elektronisches System beim Übergang in einen Zustand niedrigerer Energie spontan Licht emittiert. Das Phänomen basiert auf der Anregung bestimmter, meist aromatischer Strukturen im Molekül durch ein Photon definierter Wellenlänge. Dieser angeregte Zustand ist instabil und führt zu einer unmittelbaren Rückkehr (nach einigen Nanosekunden) in den Grundzustand. Ein Teil der Energie geht dabei verloren (z.B. durch Schwingungsrelaxation), während der Rest erneut als Lichtquant emittiert wird. Durch den Energieverlust sinkt auch dessen Frequenz, so dass die Emissionswellenlänge größer ist als die Anregungswellenlänge (Stokes-Shift). Als Fluorophore werden in der Molekularbiologie meist Moleküle mit ausgedehntem π -Elektronensystem wie beispielsweise Ethidiumbromid eingesetzt, da die Anregung (mesomer) delokalisierter Elektronen bevorzugt abläuft.

4.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzmikroskopie ist in der Pharmazie, Biologie und Medizin ein sehr wichtiges Werkzeug, da sich mit ihr auch Strukturen darstellen lassen, die weit unter der Auflösungsgrenze liegen. Diese können identifiziert, lokalisiert und in ihrer Funktion analysiert werden.

In der Fluoreszenzmikroskopie steht man vor dem Problem, dass das emittierte Fluoreszenzlicht meist nur sehr schwach ist und vom wesentlich stärkeren Anregungslicht, also von der Beleuchtung des Mikroskops überstrahlt wird. Aus diesem Grund ist im normalen Hellfeld keine Fluoreszenz zu sehen. Um die Fluoreszenz sichtbar zu machen, muss das Licht gefiltert werden. Dabei wird das durch die Stokesche Ver-

schiebung längerwellige Fluoreszenzlicht vom kurzwelligem Anregungslicht getrennt. Um möglichst nur die gesuchte Struktur anzuregen, verwendet man als Anregungslicht nur jenen Wellenlängenbereich, der dafür notwendig ist. Die gewünschte Farbe wird durch Lichtfilter oder Prismen vom Licht der Lichtquelle herausgefiltert. Dieser Filter wird daher als Anregungsfilter oder „Excitation Filter“ bezeichnet. Jedoch entsteht auch bei Anregung mit einem sehr engen Wellenlängenbereich Fluoreszenz in mehreren Farben, außerdem wird nicht das gesamte Anregungslicht vom Präparat absorbiert und würde so die Fluoreszenz stören. Um nur das gewünschte Fluoreszenzlicht zu erhalten, wird das gesamte Licht nach dem Objektiv nochmals gefiltert. Dieser Sperrfilter oder Barrier-Filter lässt nur Licht der gesuchten Fluoreszenz-Wellenlänge passieren. Welche Anregungs- und Emissionswellenlängen bei den Filtern gewählt werden, hängt vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff und der Autofluoreszenz des Objektes ab.

4.5.2 GFP

Eines der heute bedeutendsten Werkzeuge in der Zellbiologie ist das Green Fluorescent Protein (GFP) (Shimomura et al. 1962). Dieses aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende Protein fluoresziert bei der Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün. Strukturell stellt GFP ein elfsträngiges β -Fass dar, das eine zentrale α -Helix enthält. Diese beinhaltet die fluorophore Struktur, die auf einer autokatalytischen Zyklisierung dreier Aminosäuren zu einem p-Hydroxybenzylidenimidazolinon beruht (Cubitt et al. 1995). GFP wurde in dieser Arbeit zur Markierung von Bakterienzellen verwendet, wobei mit eGFP eine leicht abgewandelte Form zum Einsatz kam (Cormack et al. 1996). Das kodierende Plasmid pKE19 wurde freundlicherweise von Stefan Odenbreit (Pettenkofer-Institut, München) zur Verfügung gestellt.

4.5.3 Vorbereiten der Bakterienzellen für die Immunfluoreszenzmarkierung

Es wurden 3 ml-Hauptkulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme sowie von *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3SDH08 angelegt und bis $OD_{578\text{ nm}}=0,5$ kultiviert, um die Proteinexpression zu induzieren. Entsprechend der exakten optischen Dichte nach der Induktion wurde ein Volumen, das 1 ml Zellsuspension mit $OD_{578\text{ nm}}=0,5$ entsprach, bei 4 °C und 2.000 x g abzentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden drei

Mal mit je 0,5 ml PBS gewaschen, 3 min mit 3 % FCS in PBS geblockt, anschließend erneut mit PBS gewaschen und mit PBS auf $OD_{578\text{ nm}}=1,0$ eingestellt. Das Pellet von *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3SDH08 wurde mit PBS auf $OD_{578\text{ nm}}=0,05$ eingestellt und im Folgenden als „Waschlösung“ verwendet.

Die Deckgläschen mit A431-Zellen lagen in 6-Well-Platten vor. Zunächst wurde das Medium hieraus abpipettiert und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Waschschrte wurden jeweils für 5 min auf Eis bei 50 rpm durchgeführt. Anschließend wurde 0,1 % Triton X in PBS zugesetzt und erneut für 5 min bei 50 rpm auf Eis inkubiert. Nach zwei neuerlichen Waschschrten mit PBS wurde mit 1 % FCS in PBS zum Blocken versetzt. Abschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und genau 1 ml PBS in jedes Well pipettiert.

Je 100 μ l der Bakterienzellsuspensionen wurden zu den A431-Zellen hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 50 rpm. Abschließend wurde drei Mal mit der bakteriellen „Waschlösung“ gewaschen (je 5 min auf Eis bei 50 rpm). Die Deckgläser wurden auf einen Objektträger aufgebracht, auf den 7,5 μ l Mounting Medium pipettiert worden waren. Die Bindung der Bakterien an die Tumorzellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie an einem Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) untersucht, an das eine CCD Kamera angeschlossen (Hamamatsu) war.

4.5.4 Durchflusszytometrie

Eine elegante Alternative zur Analyse fluoreszierender Zellen stellt die Durchflusszytometrie dar. Hierbei werden die in einer Probe enthaltenen Partikel bzw. Zellen durch eine Kapillare gesaugt und vereinzelt. Jede Zelle passiert innerhalb eines Flüssigkeitsstroms einen Laserstrahl und emittiert je nach ihrer Fluoreszenzeigenschaften Photonen, deren Intensität gemessen wird. Es lassen sich auch mehrere Fluoreszenzsignale parallel messen. Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit Fluorescein als Label für Peptidepitope durchgeführt. Zusätzlich wird für jedes Messereignis die Streulichtintensität detektiert. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit dem Volumen der Zelle, das Seitwärtsstreulicht gibt Auskunft über ihre Granularität. Der zweite Parameter ist vor allem bei Blutuntersuchungen bedeutsam.

Der große Vorteil der Durchflusszytometrie besteht in ihrer außergewöhnlich hohen Durchsatzkraft. Mehrere 10.000 Zellen können pro Sekunde gemessen werden (Daugherty et al. 1999). Neben dieser überaus effizienten Analyse ist auch das Aus-sortieren von Zellen nach vorgegebenen Kriterien möglich. Bei der Durchforstung einer tcFv-Bibliothek können Zellen, die besonders viel fluoreszenzmarkiertes Anti-gen gebunden haben, von nichtaktiven Zellen isoliert werden. Durch diesen Prozess werden die Zellen nicht abgetötet und können direkt auf eine Agarplatte gespottet werden, von der aus sie wieder rekultivierbar sind. Die Firma Becton-Dickinson, deren Durchflusszytometer FACS Aria® zum Einsatz kam, bezeichnet diesen Vorgang als „fluorescence activated cell sorting“ (FACS).

4.5.5 Vorbereiten der Bakterienzellen für die Durchflusszytometrie

Für alle Schritte wurden partikelfreie Lösungen eingesetzt.

Es wurden 3 ml-Hauptkulturen der zu untersuchenden Stämme angesetzt, welche bei $OD_{578\text{ nm}}=0,5$ induziert wurden. Bei $2.000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ wurde ein Volumen der Zellsuspension abgeerntet, das 1 ml einer Kultur mit $OD_{578\text{ nm}}=0,5$ entsprach. Das erhaltene Pellet wurde mit 5 % BSA in PBS und zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 μl PBS resuspendiert. Hierzu wurde die Peptidlösung pipettiert:

10 μl von FB1 (1 mM) bzw.

1 μl von FB2 (1 mM)

Die Inkubation erfolgte für 1 h auf Eis. Es wurde mit PBS auf 1 ml aufgefüllt, abzentrifugiert und ein Mal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml PBS re-suspendiert und im FACS analysiert.

5 Experimente und Ergebnisse

5.1 Antikörperfragmente gegen ein Nef-Epitop aus HIV-I

Im ersten Teil der Arbeit sollte die prinzipielle Eignung des Autodisplay-Systems zur funktionellen Oberflächenexpression von Antikörperfragmenten untersucht werden. Aus der Dissertation von Jochen Maurer (Maurer 1998) hervorgegangene Plasmide dienten als Ausgangspunkt zur Etablierung eines zellulären Expressionssystems für Antikörper.

5.1.1 Charakterisierung des für scFv112 kodierenden Plasmids

In seiner Arbeit beschreibt Maurer eine Reihe verschiedener Experimente, bei denen die Gene für V_H , V_L oder scFv unterschiedlicher Antikörper als Passagier vor den AIDA-Autotransporter kloniert wurden. Die resultierenden Plasmide ermöglichen die oberflächenständige Expression dieser Antikörperfragmente in *E. coli*. Das Konstrukt scFv112 richtet sich gegen ein lineares heptapeptidisches Epitop des Nef-Proteins aus HIV-I. Wie alle Plasmide aus Maurers Arbeit basiert scFv112 auf einer entsprechenden Hybridomzelllinie, die den zugehörigen monoklonalen Antikörper Dü112 produziert. Diese wurde von Shi (Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Feinlokalisierung der Epitope wurde von Spohn durchgeführt (Spohn et al. 1992). Um eine für *E. coli* lesbare genetische Information zu generieren, wurde zunächst von Zellen der Hybridome Gesamt-RNA gewonnen und revers transkribiert. Aus der cDNA wurden mittels zweier Polymerasekettenreaktionen (PCR) die Antikörperbruchstücke amplifiziert und anschließend durch überlappende PCR fusioniert (McCafferty 1996). Das resultierende Fragment wurde als Passagier des Autotransporters in einen pBR322-basierten Vektor (pJM369) eingebaut, der bereits die DNA-Sequenz für das *ctxB*-Signalpeptid und die Translokationseinheit von AIDA enthält (Bolivar et al. 1977). So wurde das Plasmid pJM498 erhalten (Abb. 5.1).

Die nähere Untersuchung dieses Plasmids (isoliert aus dem Stamm *E. coli* JK321 pJM498) förderte einige Ungereimtheiten zu Tage. Das Insert ist laut Maurer über XbaI in den Vektor pJM369 eingesetzt worden. Um dies zu überprüfen, wurde die

unverdaute Form des Plasmids sowie ein Ansatz mit dessen XbaI-Verdau im Agarosegel aufgetrennt. Erwartet wurden für die unverdaute Form zwei Banden, wovon eine die weiter laufende supercoiled, die andere die open circular Form des Plasmids darstellen würde. Der Verdau des Plasmids mit XbaI sollte das Herausfallen eines ca. 400bp großen DNA-Stücks zur Folge haben und des Weiteren einen linearisierten Vektor von etwa 4,8 kbp zurücklassen. In der Realität zeigte sich jedoch ein anderes Bild (Abb. 5.2). Die unverdaute Form des isolierten Plasmids wies nicht zwei, sondern sechs Banden auf. Der Verdau mit XbaI war unvollständig und brachte darüber hinaus nur eine neue Bande bei ca. 5,2 kbp. Eine mögliche Erklärung hierfür war, dass das Plasmidisolat nicht rein und die Vielzahl der Banden auf drei unterschiedliche Plasmide zurückzuführen war. Um dies auszuschließen, wurden drei der Banden des unverdauten Plasmids aus dem Agarosegel extrahiert und in *E. coli* UT5600(DE3) transformiert. Die aus den resultierenden Stämmen isolierten Plasmide

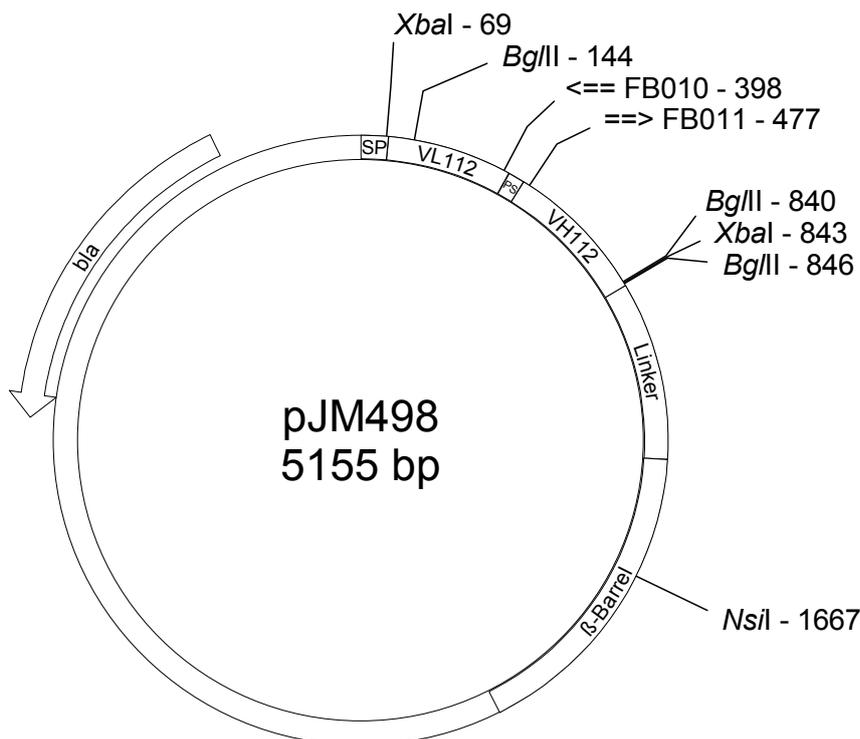


Abbildung 5.1: Plasmidkarte von pJM498, das für ein Autotransporter-Fusionsprotein mit scFv112 als Passagier (scFv112-FP) kodiert (gerichtet gegen ein lineares Epitop des Nef-Proteins aus HIV-1)

Markiert sind die Erkennungsstellen für die Arbeit bedeutender Restriktionsenzyme sowie die Bindestellen einiger relevanter Primer mit deren Bindungsrichtung. *bla* steht für das β -Laktamase-Gen, welches für ein Enzym kodiert, das der Zelle Ampicillinresistenz verleiht. Gekennzeichnet sind außerdem die einzelnen Domänen des Autotransportergens. SP=Signalpeptid, PS=peptidischer Spacer. Im Signalpeptid wurde bei der DNA-Sequenzierung ein „frame shift“ ermittelt, der eine korrekte Expression des Fusionsproteins verhindert.

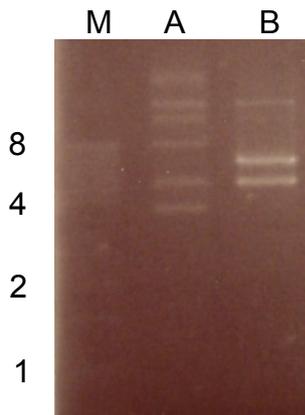


Abbildung 5.2: Restriktionsverdau von pJM498 im Agarosegel

Die DNA-Proben wurden im 0,8 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethdiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

M – DNA-Marker (links Angabe der Größe in kbp)

A – unverdaute Form des Plasmids pJM498

B – pJM498 nach Verdau mit XbaI

wiesen erneut das in Abb. 5.2 gezeigte Bandenmuster auf, so dass nun davon ausgegangen werden konnte, dass es sich tatsächlich um ein einziges Plasmid handelt. Eine DNA-Sequenzierung zeigte weiterhin, dass in der Tat zwei XbaI-Schnittstellen im Plasmid vorhanden waren. Nur eine dieser beiden wurde jedoch vom Enzym geschnitten. Dies wiederum mag im ungewöhnlichen Sequenzmotiv begründet liegen, das die Schnittstelle umrahmt (Abb. 5.3). Diese Vermutung wurde durch spätere Untersuchungen an Plasmiden mit dem identischen Motiv unterstützt. Möglicherweise maskiert die laterale Verlängerung des palindromischen Charakters die zentral enthaltene Erkennungssequenz für XbaI.

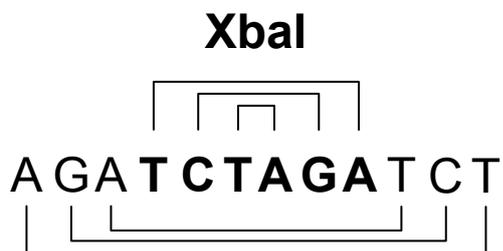


Abbildung 5.3: Sequenzmotiv in pJM498, das Ursache für die Nichtverdaubarkeit mit XbaI sein könnte

Gezeigt ist ein Sequenzausschnitt aus pJM498 am Übergang zwischen Passagier und Linker. Die Verbindungslinien deuten die möglichen Basenpaarungen an. Die resultierende DNA-Sekundärstruktur maskiert vermutlich die zentral enthaltene Erkennungssequenz für XbaI (fett gedruckt) und verhindert so den Angriff dieses Restriktionsenzym.

Trotz des auffälligen Bildes im Agarosegel handelte es sich bei pJM498 doch um das von Maurer beschriebene Plasmid. Allerdings wurde durch das Sequenzierungsergebnis eine weitere Schwierigkeit offenbar. In der Sequenz für das Signalpeptid war ein „frame shift“ enthalten, der damit das korrekte Ablesen des open reading frames verhindert. Eine Präparation der äußeren Membranen zeigte demzufolge auch keinerlei oberflächenständiges Protein (ohne Abb.). Deshalb sollte im Folgenden eine Klonierung der für scFv112 kodierenden Sequenz in einen neuen Vektor mit korrekter Signalpeptid-Sequenz vorgenommen werden.

5.1.2 Klonierung der für scFv112 kodierenden Sequenz in einen pET-Vektor

Als neues Vektorrückgrat für die für scfv112 kodierende Sequenz aus pJM498 wurde pET-SH3SDH08 ausgewählt (Jose und von Schwichow 2004a). Dieses Plasmid unterscheidet sich in einem wichtigen Punkt von pJM369. Es ist ein Abkömmling des kommerziell erhältlichen Plasmids pET-11d (Studier und Moffatt 1986; Studier et al. 1990). ET steht für „expression by T7-RNA polymerase“. Diese spezielle Polymerase wird in genetisch veränderten *E. coli*-Stämmen (benannt mit dem Zusatz (DE3)) induzierbar produziert. Die Basalexpression möglicherweise zytotoxischer Proteine wird durch zwei Schutzmechanismen reduziert. Das Zielgen von Interesse wird durch den T7-Promotor kontrolliert, der Laktose- bzw. IPTG-abhängig ist. Die Plasmide der pET-Reihe enthalten einen „open reading frame“ für die Überexpression des Lac-Repressors, der das Ablesen derartiger Gene verhindert. Sollte der Promotor dennoch undicht („leaky“) sein, so schützt weiterhin die Tatsache, dass dessen nachgeschaltete Gene nur von der T7-Polymerase in die korrespondierende mRNA übersetzt werden können. Die nötige Polymerase selbst steht unter Kontrolle eines Lac-Promotors und kann ebenfalls erst nach Entfernen des Lac-Repressors durch IPTG abgelesen werden. Im Gegensatz zu pJM369 ist die Expression der Gene bei Plasmiden der pET-Reihe induzierbar und nicht länger konstitutiv. In vorangegangenen Arbeiten hat sich das pET-System als vorteilhaft für die Oberflächenexpression rekombinanter Proteine mittels Autodisplay erwiesen (Jose et al. 2001; Jose und von Schwichow 2004b; Jose und von Schwichow 2004a).

pET-SH3SDH08 enthält das Gen für ein Autotransporterkonstrukt samt Sorbitdehydrogenase als Passagier. Um diesen durch die für scFv112 kodierende Region als

Passagier zu ersetzen, wurde das Plasmid mit den beiden Restriktionsenzymen XbaI und NsiI geschnitten. Wie der Plasmidkarte (Abb. 5.4) zu entnehmen ist, fällt hierdurch ein ca. 1,6 kbp großes Fragment heraus. Der so behandelte Vektor wurde im 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt und die Bande bei 6,2 kbp aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

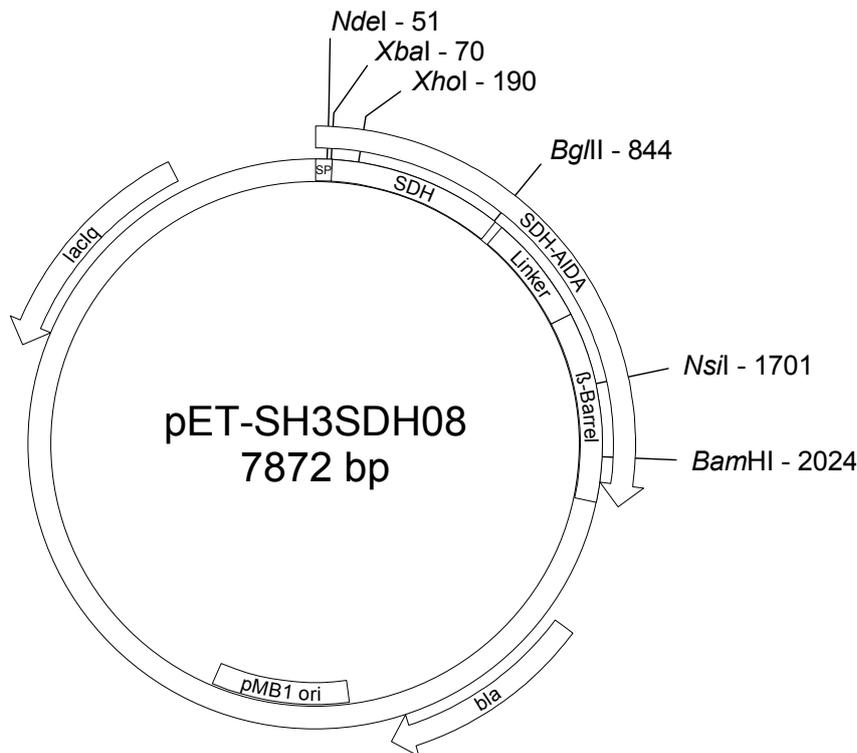


Abbildung 5.4: Plasmidkarte von pET-SH3SDH08, das als Vektor für die induzierbare Expression von scFv112-FP eingesetzt wurde

Markiert sind die Erkennungsstellen für die Arbeit bedeutender Restriktionsenzyme und die Untereinheiten des Autotransportergens. SP=Signalpeptid, SDH=Sorbitoldehydrogenase. *lacIq* bewirkt eine Überexpression des Lac-Repressors. pMB1 bezeichnet den Replikationsursprung des Plasmids. pET-SH3SDH08 basiert auf dem kommerziell erhältlichen Plasmid pET-11d.

pJM498 wurde genauso behandelt (Verdau mit XbaI/NsiI), so dass ein Fragment herausfiel, das den für scFv112 kodierenden Teil inkl. einem Stück des Autotransporters, nicht jedoch das fehlerhafte Signalpeptid, enthielt. Hierbei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die zweite XbaI-Schnittstelle vom Enzym wie oben beschrieben nicht erkannt wurde. Dieses DNA-Fragment wurde ebenfalls aus einem Agarosegel aufgereinigt und sollte nun in den Vektor eingebaut werden. Hierdurch würde die Passagierdomäne SDH gegen scFv112 getauscht. Der Wechsel des Autotransporteranteils bliebe ohne Folgen, da dieser in beiden Plasmiden identisch ist.

Zum Verbinden der beiden Fragmente wurde T4 DNA-Ligase eingesetzt, welche kompatible Enden doppelsträngiger DNA kovalent miteinander verknüpfen kann. Insert und Vektor wurden im molaren Verhältnis von 5:1 gemischt und mit dem Enzym inkubiert. Die resultierende Lösung ist aufgrund der enthaltenen Pufferbestandteile sehr elektrolytreich und eignet sich somit schlecht für eine direkte Transformation mittels Elektroporation. Deshalb wurde sie durch Fällung der DNA und Lösung derselben in Wasser entsalzt und anschließend zur Transformation in ein Aliquot des elektrokompetenten Stamms *E. coli* UT5600(DE3) eingesetzt. Nach Anwendung eines kurzen Strompulses (einige Millisekunden) von 1800 V durch einen Elektroporator wurde die Zellsuspension mit SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion positiver Varianten wurden Teile des Transformationsansatzes auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und am nächsten Tag näher analysiert. Hierzu wurden Plasmide der erhaltenen Transformanden mittels Miniprep nach Birnboim-Doly isoliert und anschließend mit BglII verdaut. Wie der Plasmidkarte des erwarteten neuen Plasmids (Abb. 5.5) zu entnehmen ist, ist dessen Erkennungssequenz dort dreimal enthalten, wobei zwei Schnittstellen unmittelbar benachbart sind. Deshalb sollte durch den Verdau mit BglII neben einem nicht detektierbaren kleinen Fragment ein weiteres von ca. 700 bp Größe herausfallen und nach der Auftrennung im Agarosegel sichtbar werden.

Nur eines der zwölf analysierten Plasmide wies dieses Restriktionsmuster auf. Als weitere Kontrolle wurde dieses anschließend als Template zweier PCR-Reaktionen verwendet, die den korrekten Einbau des Fragments bestätigen sollten. Als Primerpaare dienten SH024 und FB010 bzw. FB011 und SH002. Da FB010 und FB011 spezifisch in der Sequenz von scFv112 binden, können diese Reaktionen nur bei korrektem Fragmenteinbau erfolgreich ablaufen (s. Abb. 5.5). In beiden Fällen konnten Amplikons der erwarteten Größe detektiert werden, was die Korrektheit des neuen Plasmids bestätigte. Es erhielt die Bezeichnung pFB006.

5.1.3 Überprüfen der Expression von scFv112 durch den Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pFB006

Das neu erstellte Plasmid pFB006 kodiert für das single chain variable fragment 112 als Passagier des Autotransporters. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der

Wechsel des Plasmidhintergrunds tatsächlich zur Präsentation von scFv112 auf der Oberfläche von *E. coli*-Zellen führte. Eine Möglichkeit, dies zu kontrollieren, besteht in der Isolierung der äußeren Membranen samt ihrer enthaltenen integralen Proteine und deren Auftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polaycrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Wird hier ein Protein der erwarteten Größe sichtbar, das in Kontrollstämmen nicht detektierbar ist, so kann man von erfolgreicher Translokation der Passagierdomäne über die äußere Membran ausgehen. Hierzu wurde der Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pFB006 bis zu einer optischen Dichte von 0,6 in ampicillinhaltigem Medium angezogen und anschließend durch die Zugabe von IPTG zur Produktion des rekombinanten Proteins angeregt. Das Wachstum erfolgte dabei durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol in reduzierenden Milieu, um auf diese Weise die periplasmatische Ausbildung von Disulfidbrücken zu unterdrücken. Wie frühere Untersuchungen gezeigt hatten, wirkt sich eine vorzeitige Faltung des Passagiers negativ auf die Translokationsrate aus (Jose et al. 1996). Als Kontrolle diente der identische Stamm, bei dem jedoch auf eine Induktion der Proteinexpression verzichtet wurde.

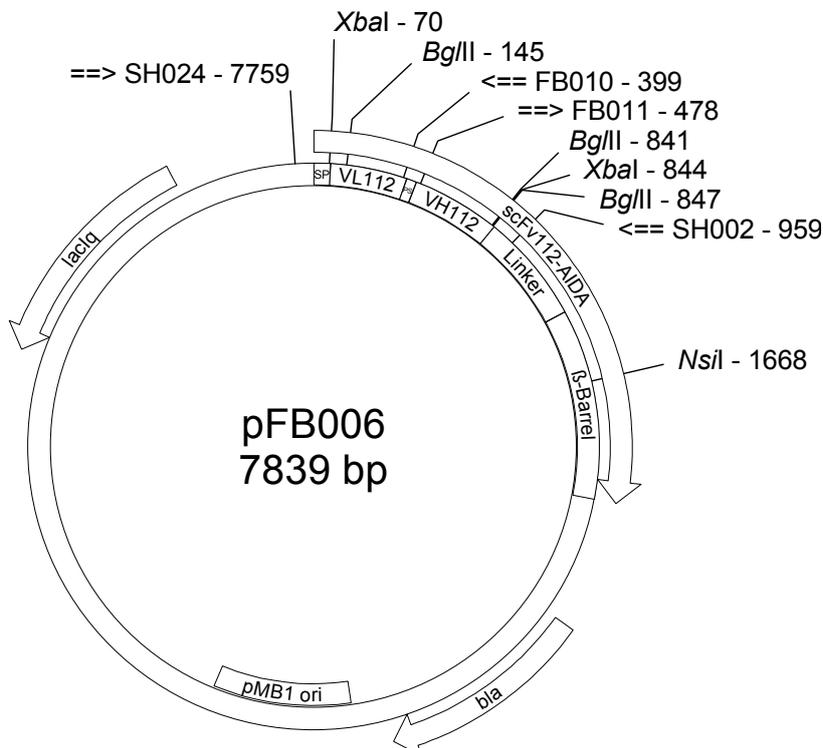


Abbildung 5.5: Plasmidkarte von pFB006, das die induzierbare Expression von scFv112-FP erlaubt

Markiert sind die Bindungsstellen relevanter Restriktionsenzyme und Primer, der Replikationsursprung des Plasmids sowie die Untereinheiten des Autotransportergens. SP=Signalpeptid, PS=peptidischer Spacer.

Das Protokoll zur Isolierung der äußeren Membranen basiert auf der Lyse der Zellen und anschließenden Zentrifugationsschritten, die zunächst Zelltrümmer abtrennen sollen und anschließend die äußeren Membranen samt der integralen Proteine ausfällen und so von gelösten Proteinen trennen (Hantke 1981). Das translozierte und im SDS-Gel detektierte Protein besteht aus dem Passagier, der Linker-Region sowie dem membranständigen β -Fass - ohne das zuvor eliminierte Signalpeptid - und hat eine Größe von ca. 76 kDa. Abb. 5.6 zeigt das gefärbte SDS-Gel, bei dem im Vergleich zum nicht induzierten Stamm eine deutliche Expression des Proteins festgestellt werden konnte. Das apparente Molekulargewicht spiegelt dabei in etwa die tatsächliche Größe wider. Die Intensität der Färbung der Proteinbande ist vergleichbar mit der von OmpA, das als „interner Standard“ verwendet werden kann. OmpA ist ein natives Protein der äußeren Membran von *E. coli* mit Porinaktivität (Koebnik et al. 2000). Seine Expressionsrate beträgt einigermaßen konstant 2×10^5 pro Zelle (Cole et al. 1982). Legt man diese Zahl zu Grunde und berücksichtigt die Tatsache, dass scFv112-FP ein etwa doppelt so großes Molekulargewicht wie OmpA besitzt, so lässt sich eine Expression von 1×10^5 scFv112-FP-Molekülen pro Zelle abschätzen. Diese steht im Einklang mit bisherigen Ergebnissen bei der Expression heterologer Proteine durch Autodisplay (Jose et al. 2001; Jose und von Schwichow 2004a).

Die Bande bei 76 kDa in Abb. 5.6 (Spur B) kann als Beleg für die Integration des scFv112-AIDA-Fusionsproteins in die äußere Membran gewertet werden. Es stellt jedoch noch keinen Nachweis der Oberflächenständigkeit desselben dar, da die Passagierdomäne auch ins Periplasma gerichtet sein könnte. Deshalb wurde in einem parallelen Ansatz nach der Induktion und vor der Präparation der äußeren Membranen ein Verdau ganzer Bakterienzellen mit Trypsin vorgenommen. Hierdurch werden Proteine, die für diese Protease frei zugänglich sind, abgebaut. Nicht korrekt translozierte Proteine hingegen, die zum periplasmatischen Raum hin orientiert sind, sind für das Makromolekül Trypsin nicht erreichbar (Maurer et al. 1997; Jung et al. 1998). Wie Spur C in Abb. 5.6 belegt, wurde scFv112 durch pFB006 korrekt an die Oberfläche transportiert, da nach Trypsinverdau ganzer Zellen nur noch eine schwache Bande bei 76 kDa detektierbar war.

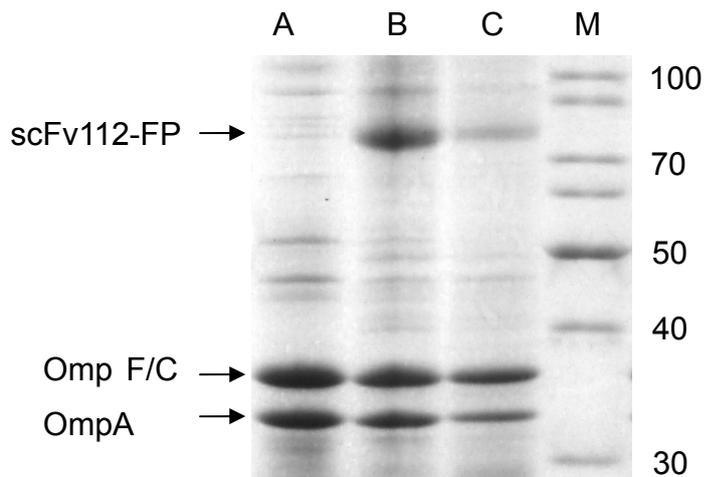


Abbildung 5.6: Expression eines Autotransporter-Konstruktes mit scFv112 als Passagier (scFv112-FP) in der äußeren Membran von *E. coli*

Die Bakterienkulturen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB006 wurden in reduzierendem Milieu angezogen und mit IPTG induziert. Gemäß modifiziertem Protokoll nach Hantke wurden die äußeren Membranen mit ihren Proteinen isoliert, welche mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue analysiert wurden.

M – Größenmarker

A – Kontrolle ohne Induktion

B – Proteinexpression induziert

C – wie B, aber zusätzlich Ganzzellverdau mit Trypsin zur Kontrolle der Oberflächenständigkeit

5.1.4 Durchflusszytometrische Analyse als Funktionalitätsnachweis von scFv112

Das neu konstruierte Plasmid pFB006 kann zur Oberflächenexpression von scFv112 auf *E. coli*-Zellen eingesetzt werden. Es schließt sich nun die Frage an, ob diese Fragmente auch in der Lage sind, ihr Antigen zu erkennen, ob sie also funktionell sind. Diese Frage wurde durch Markierung mit dem zugehörigen Antigen (Abb. 5.7) und anschließende durchflusszytometrische Analyse untersucht. Das Konstrukt

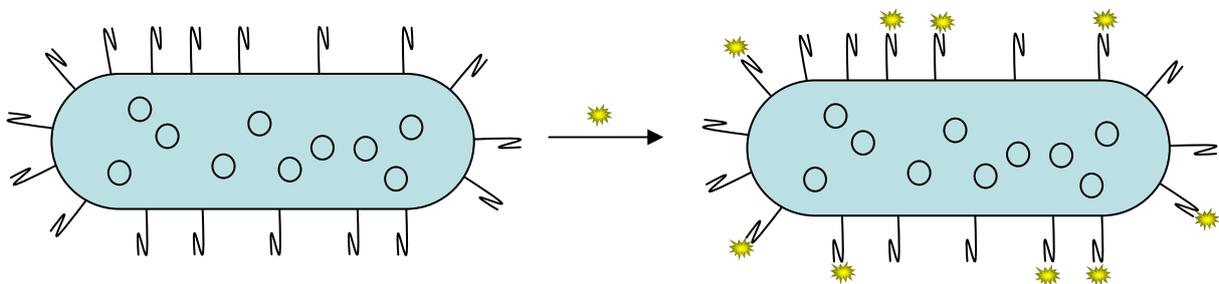


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der Färbung scFv112-tragender Zellen

Dargestellt ist eine Bakterienzelle, die das scFv112 an ihrer Oberfläche exprimiert. Gibt man das korrespondierende Antigen GAASRDL in markierter Form hinzu, so wird dieses an scFv112 binden und der Zelle somit fluoreszierende Eigenschaften verleihen. Diese lassen sich durchflusszytometrisch analysieren und quantifizieren.

scFv112 richtet sich gegen ein linearisiertes Epitop des Nef-Proteins aus HIV-I. Dieses besteht aus der Aminosäurefolge GAASRDL. Damit es sich für die Durchflusszytometrie eignet, musste das Peptid in fluoreszierender Form vorliegen. Es wurde deshalb mit N-terminaler Fluorescein-Markierung synthetisiert und erhielt den Namen FB1. *E. coli* UT5600(DE3) pFB006 wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen und durch Zugabe von IPTG induziert. Die Zellen mit dem scFv112 auf ihrer Oberfläche wurden mit FB1 inkubiert und anschließend im FACS Aria® analysiert. Als Kontrolle dienten zwei identisch behandelte Stämme, die keine Bindung an das Antigen aufweisen sollten. Zum einen *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid und ferner *E. coli* UT5600(DE3) pFB001, welcher ein Kontroll-scFv auf seiner Oberfläche trägt, das gegen ein anderes Antigen gerichtet ist (s. Kapitel 5.2). Die in Abb. 5.8 angegebenen Fluoreszenz-Mittelwerte der gezeigten Histogrammplots verdeutlichen, dass *E. coli* UT5600(DE3) pFB006-Zellen nach Inkubation mit dem Antigen FB1 im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich stärker fluoreszieren. Diese Ergebnisse können als eindeutiger Beleg für die Funktionalität des oberflächenständigen scFv112 im neu erzeugten Bakterienstamm *E. coli* UT5600(DE3) pFB006 gedeutet werden. Die Messungen wurden dreimal wiederholt, was jeweils zu nahezu identischen Ergebnissen führte. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass durch Einsatz des Autodisplay-Systems die funktionelle Oberflächenexpression von sc-Fragmenten auf *E. coli* möglich ist.

5.1.5 Vereinzelnung der variablen Domäne V_H112

scFv112 enthält die beiden variablen Domänen des Antikörpers Dü112 durch einen künstlich eingefügten peptidischen Spacer kovalent verknüpft. Die Notwendigkeit dieser Verknüpfung ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass V_H und V_L eines Antikörpers grundsätzlich lediglich intramolekulare, jedoch keine sie verbindenden intermolekularen Disulfidbrücken aufweisen. Die nötige Stabilität wird deshalb durch diese künstliche „Brücke“ gewährleistet. Ein großer Vorteil des Autodisplay-Systems ist wie beschrieben die Tatsache, dass auch multimere Proteine funktionell exprimiert werden können. Sie lagern sich in der äußeren Membran zu einer Einheit zusammen und erhalten so ihre volle Funktionalität. Dies wurde für zwei verschiedene homomultimere Proteine beschrieben (Jose et al. 2001; Jose und von Schwichow 2004a). Im

Folgendes sollte untersucht werden, ob dies auch für die heterodimeren variablen Fragmente eines Antikörpers zutrifft. V_H112 und V_L112 wurden deshalb getrennt voneinander oberflächenständig exprimiert und anschließend in einem Stamm vereint und auf Funktionalität untersucht.

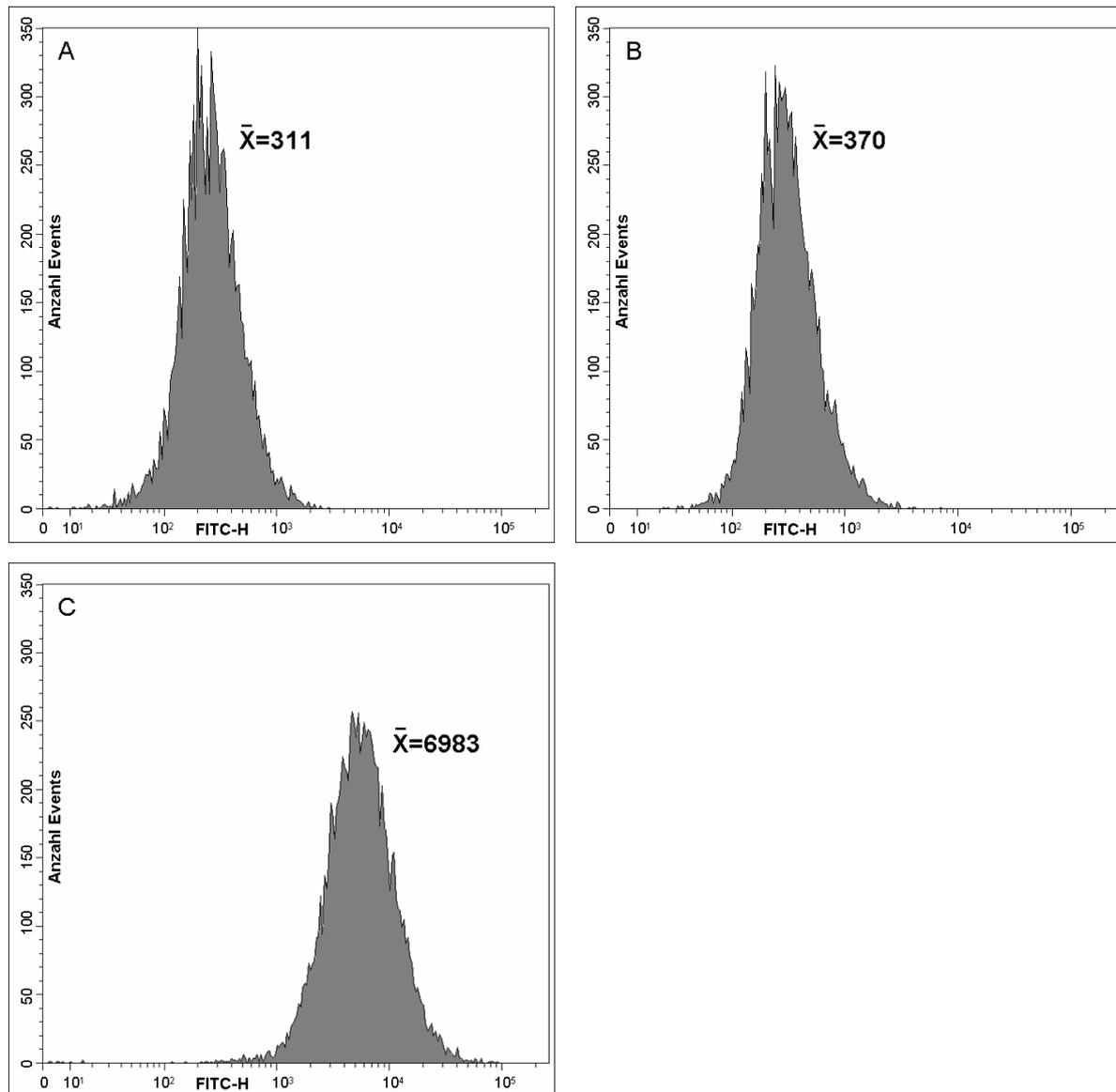


Abbildung 5.8: Durchflusszytometrische Analyse der relativen Fluoreszenz scFv112-tragender Zellen, die mit dem fluoreszenzmarkierten Epitop GAASRD L markiert wurden

Gezeigt sind Histogramm-Plots der durchflusszytometrischen Analyse von je 10.000 Events im FACS Aria®. Die halblogarithmische Darstellung bildet die Anzahl detektierter Zellen gegen die Intensität der grünen Fluoreszenz ab. Der Fluoreszenz-Mittelwert ist jeweils angegeben. Markiert wurden die Zellen nach Standard-Zellanzucht durch Zugabe von FB1, einem Fluorescein-markierten Heptapeptid (GAASRD L).

A – 1. Negativkontrolle: *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid

B – 2. Negativkontrolle: *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 (trägt Kontroll-scFv auf seiner Oberfläche)

C – *E. coli* UT5600(DE3) pFB006: exprimiert scFv112, das das Peptid FB1 bindet

Um V_H112 als Passagier des Autotransporters einzusetzen, musste ein entsprechendes Plasmid konstruiert werden. Am 3'-Ende des zugehörigen DNA-Abschnitts in pJM498 befindet sich eine BglII-Schnittstelle, die für die Klonierung genutzt werden konnte. Am 5'-Ende gibt es keine vergleichbare Schnittstelle. Diese musste deshalb mit Hilfe der PCR eingefügt werden. Es wurde ein Oligonukleotid (FB011) konstruiert, das exakt am Beginn der Sequenz für V_H112 bindet und das lateral eine XbaI-Schnittstelle sowie einen Überhang von vier Basenpaaren aufweist. Gemeinsam mit dem Primer SH002 und pJM498 als Template wurde eine PCR durchgeführt. Auf diese Weise wurde der Genabschnitt für V_H112 amplifiziert. Um den Ansatz von Salzen zu befreien, wurde eine DNA-Fällung durchgeführt und das Pellet in Wasser gelöst. Sowohl der designierte Vektor (erneut pET-SH3SDH08) als auch das Insert wurden anschließend mit BglII und XbaI verdaut. Die Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die benötigte DNA (Banden bei 7,1 kbp (Vektor) bzw. 400 bp (Insert)) mittels Kit aus dem Gel extrahiert. Nach Ligation, erneuter Aufreinigung des Ansatzes und Transformation in *E. coli* UT5600(DE3) wurde der Ansatz auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert. Lediglich ein einzelner Transformant konnte gefunden werden. Dieser wurde wie oben beschrieben geprüft: Durch Einzelverdau des Plasmidisolats mit NsiI wurde das zirkuläre DNA-Molekül linearisiert und die korrekte Größe des Plasmids bestätigt. Als weiterer Beleg wurde eine Kontroll-PCR mit FB011 und SH002 durchgeführt. Diese erzeugte ein Amplikon der erwarteten Größe (562 bp) und verifizierte somit die Korrektheit des erhaltenen Plasmids, welches mit pFB008 bezeichnet wurde.

5.1.6 Oberflächenexpression von V_H112

Die äußeren Membranen des Stammes *E. coli* UT5600(DE3) pFB008 wurden wie oben beschrieben isoliert und im SDS-Gel aufgetrennt, um die Expression von V_H112 zu überprüfen (Abb. 5.9). Da nur eine der beiden variablen Domänen an die Oberfläche transloziert wird, ist die Größe des Proteins entsprechend geringer als bei scFv112. Die theoretische Größe liegt bei ca. 63 kDa. Auch hier ist eine starke Expression des Proteins erkennbar. Auffällig ist die Tatsache, dass es als eine Doppelbande im Gel erscheint. Dieses Phänomen findet sich immer wieder bei SDS-Gelen von Isolaten der äußeren Membranen mit Autotransporterproteinen. Möglicherweise

ist es auf zwei unterschiedliche Konformationen des β -Fasses zurückzuführen, woraus unterschiedliche Beladung mit SDS resultierte. Eine abschließende Erklärung steht jedoch noch aus. Für ein anderes Projekt des Arbeitskreises konnte jedoch mittels Proteinsequenzierung gezeigt werden, dass die Proteine beider Banden die identische Primärstruktur aufweisen (noch nicht veröffentlicht). Die Oberflächenständigkeit des Proteins konnte im Gel nur teilweise belegt werden. Da V_H112 alleine jedoch nur von theoretischem Interesse ist, wurde dem nicht weiter nachgegangen.

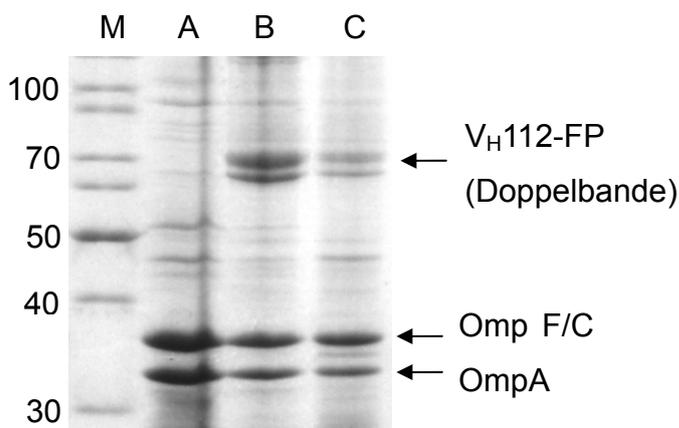


Abbildung 5.9: Expression von V_H112 -FP in der äußeren Membran von *E. coli*

Wie in Abb. 5.6 beschrieben, wurden die äußeren Membranen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB008 isoliert und im SDS-Gel analysiert.

M – Größenmarker

A – Kontrolle ohne Induktion

B – Proteinexpression induziert

C – wie B, aber zusätzlich Ganzzellverdau mit Trypsin

5.1.7 Vereinzelung der variablen Domäne V_L112

pFB008 kodiert für ein Autotransporter-Fusionsprotein, das mit V_H112 nur eine variable Domäne des monoklonalen Antikörpers Dü112 als Passagier enthält. Für volle Funktionalität eines variablen Antikörperfragments sind aber beide variablen Fragmente vonnöten (Holliger und Hudson 2005). Deshalb sollte nun auch V_L112 in einen Autotransporter-Vektor eingebaut werden. Hierbei ergibt sich nun ein Problem: Ziel ist es, V_H112 und V_L112 in einem Stamm zu vereinen, also die beiden Plasmide gleichzeitig dauerhaft in diesem Stamm zu halten. Dies bedeutet aber, dass nun nicht mehr auf ein Plasmid der pET-Reihe mit pMB1 origin zurückgegriffen werden kann. Der origin stellt den Replikationsursprung eines Plasmids dar, also die Erkennungssequenz für die Polymerasen von *E. coli*, die die Vervielfältigung des Plasmids und

dessen konstanten Bestand in der Zelle bewirken. Enthält eine Zelle nun zwei Plasmide mit identischem origin, so kann *E. coli* nicht zwischen deren Replikationsursprüngen unterscheiden und sie werden gleichwertig behandelt. Auf Dauer führt dies nach vielen Teilungszyklen aus statistischen Gründen zum Verlust eines der beiden Plasmide, so dass am Ende fast ausschließlich Bakterien vorliegen, die nur noch eines der beiden unterschiedlichen Plasmide tragen (del Solar et al. 1998).

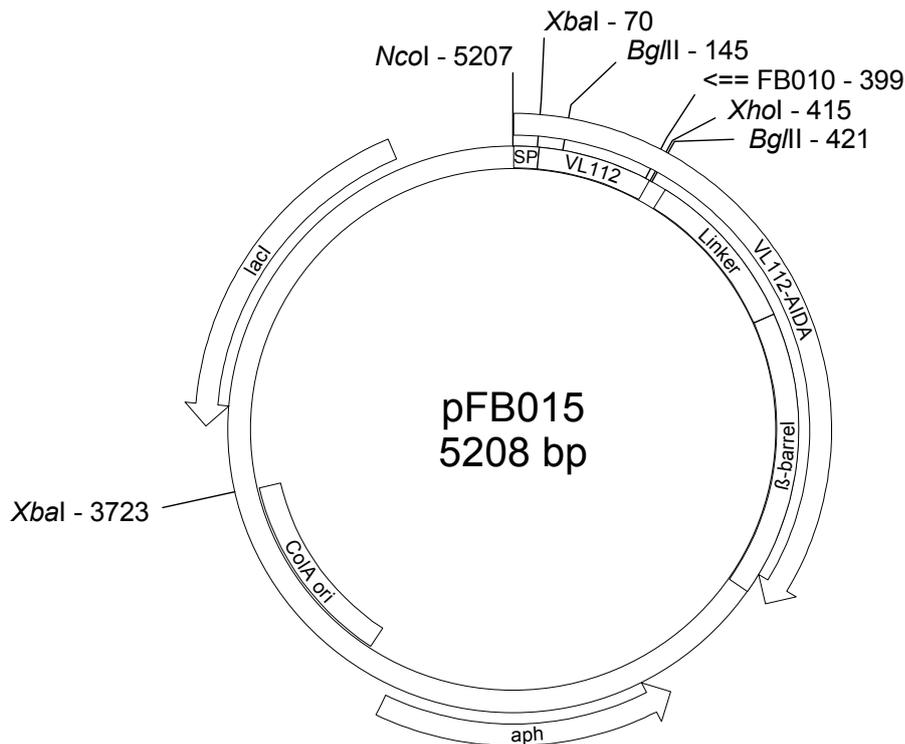


Abbildung 5.10: Plasmidkarte von pFB015, das für ein Autotransporter-Konstrukt mit V_L112 als Passagier kodiert

Markiert sind die Bindungsstellen relevanter Restriktionsenzyme und Primer, der Replikationsursprung des Plasmids sowie die Untereinheiten des Autotransportergens. SP=Signalpeptid. *lacI* kodiert wie *lacIq* für den Lac-Repressor, jedoch wird dieser nicht überexprimiert. *aph* kodiert für eine 3', 5'-Aminoglykosidphosphotransferase, die dem Bakterium Kanamycin-Resistenz verleiht.

Deshalb soll die leichte variable Kette nun in einen Vektor kloniert werden, der einen anderen origin und aus Gründen der Praktikabilität auch eine andere Antibiotikaresistenz aufweist. Hierfür eignet sich der Vektor pCOLADuet-1. Er weist mit *ColA* einen zu pMB1 kompatiblen Replikationsursprung auf und enthält das Gen *aph*, das für eine 3', 5'-Aminoglykosidphosphotransferase kodiert. Dieses Enzym inaktiviert Antibiotika der Aminoglykosidklasse und ermöglicht so die Anzucht transformierter Zellen auf kanamycinhaltigen Medien. Mit dem Plasmid pFB014 liegt ein Derivat von pCOLADuet-1 vor, das bereits den für AIDA kodierenden Bereich aus pET-SH4 enthält

(Einbau über NcoI/BlnI in pAG004, ein Derivat von pCOLA-Duet-1). Die Passagierregion wurde nach Amplifikation aus pFB006 mit den Primern SH024 und FB010 über die Schnittstellen NcoI und XhoI in pFB014 eingesetzt. Das mit den bereits beschriebenen Methoden erstellte und geprüfte Plasmid erhielt den Namen pFB015 (Abb. 5.10).

5.1.8 Oberflächenexpression von V_L112

Die Expression der variablen leichten Kette V_L112 wurde nun durch Isolierung der äußeren Membranen und SDS-PAGE analysiert (Abb. 5.11). Wieder zeigt sich eine starke Expression des gewünschten Proteins auf der Oberfläche von *E. coli*, wobei erneut das Phänomen der Bildung von Doppelbänden zu beobachten ist. Die Oberflächenständigkeit von V_L112 konnte durch Protease-Verdau ganzer Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Von Bedeutung ist hierbei außerdem, dass das Ausmaß der Expression nicht wesentlich von dem bei V_H112 abweicht. Beide sollten bei Coexpression möglichst in äquimolarem Verhältnis in der äußeren Membran vorliegen, um die Bildung von Heterodimeren zu begünstigen, was durch die gezeigten Expressionsstärken in guter Annäherung erreicht wird.

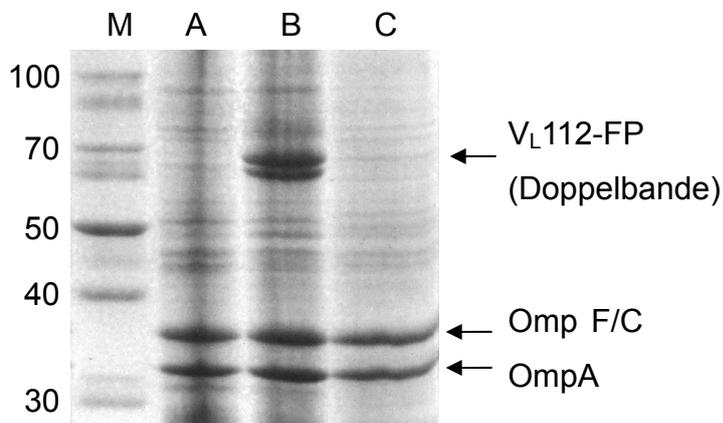


Abbildung 5.11: Expression von V_L112 -FP in der äußeren Membran von *E. coli*

Wie in Abb. 5.6 beschrieben, wurden die äußeren Membranen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB015 isoliert und im SDS-Gel analysiert.

M – Größenmarker

A – Kontrolle ohne Induktion

B – Proteinexpression induziert

C – wie B, aber zusätzlich Ganzzellverdau mit Proteinase K

5.1.9 Simultane Expression von V_H112 und V_L112 in einer *E. coli*-Zelle und Prüfen der Funktionalität

Es konnten zwei Plasmide erzeugt werden, die unabhängig voneinander V_H112 bzw. V_L112 auf die Oberfläche von *E. coli* transportieren. Um von der potenziellen Zusammenlagerung zu einem funktionellen Heterodimer in der äußeren Membran zu profitieren, sollten beide Plasmide nun in einem Stamm vereinigt werden. Hierzu wurden elektrokompente Zellen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB008 hergestellt, in die das Plasmid pFB015 transformiert wurde. Nach Selektion auf Agarplatten mit Ampicillin und Kanamycin wurden einzelne Transformanten angezogen. Die Plasmide wurden isoliert und durch Verdau mit BglIII bzw. XbaI auf ihre Korrektheit geprüft. Bereits beim ersten geprüften Transformanten zeigte sich das erwartete Bild: Der BglIII-Verdau führte zu einer Linearisierung beider Plasmide (7,1 kbp und 5,2 kbp), während XbaI pFB008 linearisierte und 1,6 kbp aus pFB015 herauschnitt. Alle erwarteten Banden wurden im Agarosegel sichtbar, so dass ein neuer Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pFB008 + pFB015 geschaffen wurde. Dieser sollte in der Lage sein, ein neuartiges Antikörperfragment mittels Autodisplay an seiner Oberfläche zu exprimieren. Es handelt sich um das Heterodimer aus beiden variablen Regionen des Antikörpers Dü112, die nicht wie in scFv112 kovalent miteinander verknüpft sind, sondern allein durch die stabilisierende Umgebung der äußeren Membran als ein Frag-

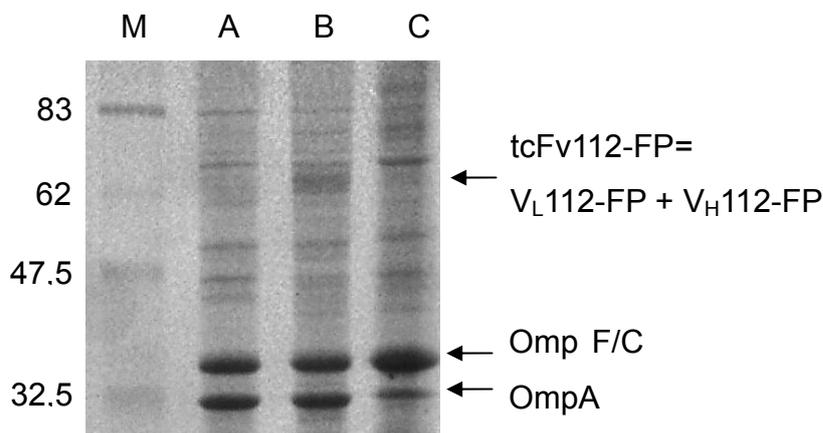


Abbildung 5.12: Expression von tcFv112-FP in der äußeren Membran von *E. coli*

Wie in Abb. 5.6 beschrieben, wurden die äußeren Membranen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB008 + pFB015 isoliert und im SDS-Gel analysiert. Mit tcFv112 wird das Heterodimer aus V_H112 und V_L112 bezeichnet, deren Banden sich im SDS-Gel überlagern.

M – Größenmarker

A – Kontrolle ohne Induktion

B – Proteinexpression induziert

C – wie B, aber zusätzlich Ganzzellverdau mit Trypsin

ment darstellbar sind. Dabei bewirken die „framework regions“ der beiden variablen Fragmente deren Affinität zueinander und ermöglichen so die Formation des neuen Fragments. Dieses wird im Folgenden als „twin chain variable fragment“ (tcFv) bezeichnet.

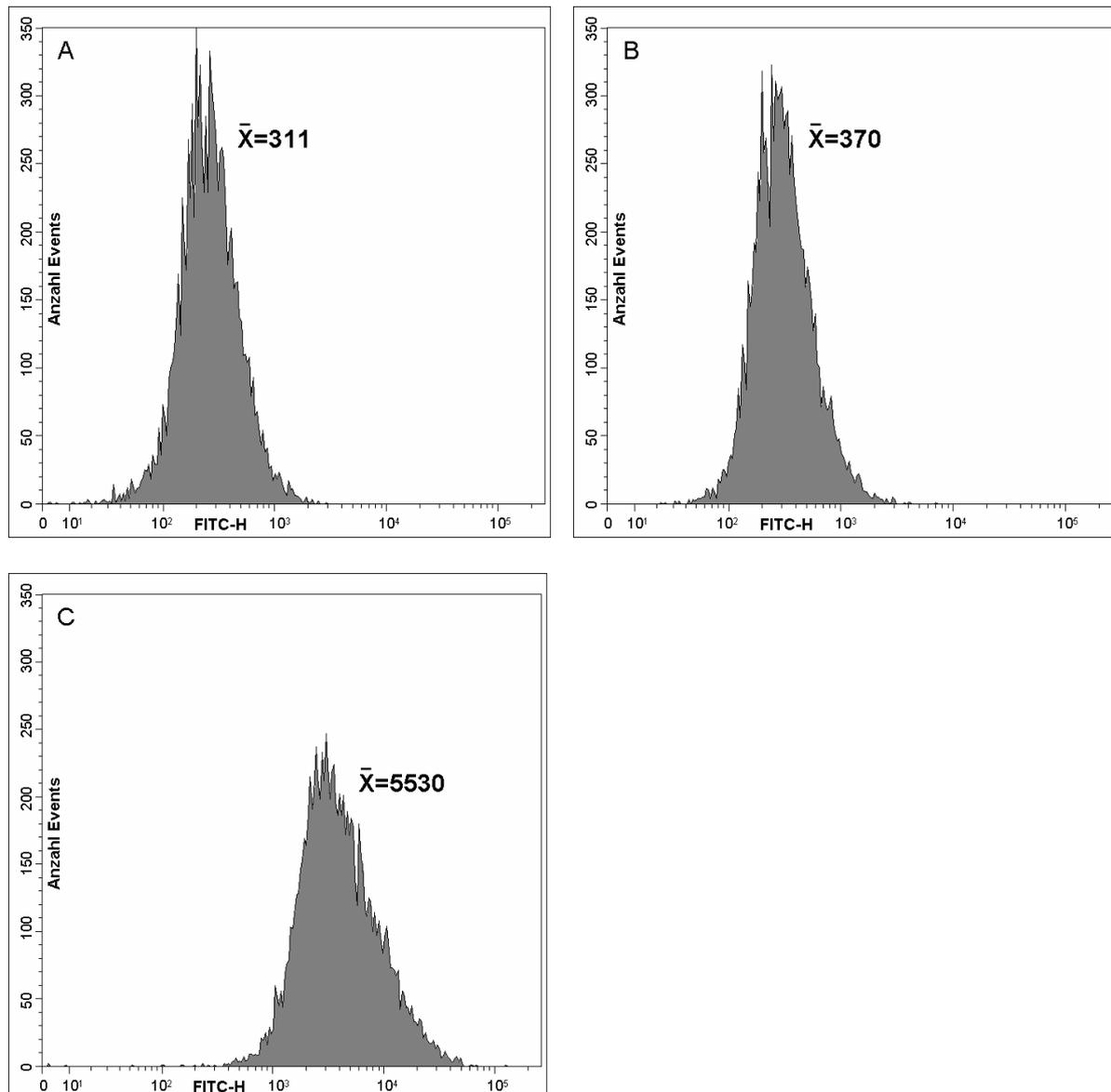


Abbildung 5.13: Durchflusszytometrische Analyse der relativen Fluoreszenz tcFv112-tragender Zellen, die mit dem fluoreszenzmarkierten Epitop GAASRD L markiert wurden

Gezeigt sind Histogramm-Plots der durchflusszytometrischen Analyse von je 10.000 Events im FACS Aria®. Die halblogarithmische Darstellung bildet die Anzahl detektierter Zellen gegen die Intensität der grünen Fluoreszenz ab. Der Fluoreszenz-Mittelwert ist jeweils angegeben. Markiert wurden die Zellen nach Standard-Zellanzucht durch Zugabe von FB1, einem Fluorescein-markierten Heptapeptid (GAASRD L). Die Plots der beiden Negativkontrollen sind identisch, da das gezeigte Experiment am gleichen Tag wie jenes für scFv112 durchgeführt wurde.

A – 1. Negativkontrolle: *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid

B – 2. Negativkontrolle: *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 (trägt Kontroll-scFv auf seiner Oberfläche)

C – *E. coli* UT5600(DE3) pFB008 + pFB015: exprimiert tcFv112, das das Peptid FB1 bindet

Die Präparation der äußeren Membranen lässt aufgrund der nahezu identischen Molekulargewichte beider durch den Stamm exprimierten Fusionsproteine keine Differenzierung im Proteingel zu. Es zeigt eine Expressionsstärke, die etwas schwächer war als von anderen Präparationen gewohnt (Abb. 5.12). Dennoch liegt die Zahl der Moleküle in ähnlicher Größenordnung wie bei scFv112, so dass die Funktionalität von tcFv112 im Kontext ganzer Zellen geprüft werden konnte. Hierzu wurden analoge Experimente wie für scFv112 beschrieben durchgeführt, indem tcFv112-tragende Zellen durch Zugabe des fluoreszenzmarkierten Antigens markiert und durchflusszytometrisch analysiert wurden.

Die in Abb. 5.13 gezeigten Histogramm-Plots weisen wie bei scFv112 eine deutlich erhöhte Fluoreszenz tcFv112-tragender Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen aus. Zum ersten Mal konnte die Funktionalität des neuartigen Antikörperfragments tcFv am Beispiel des tcFv112 demonstriert werden. Es ist nicht nur möglich, mittels Auto-display funktionelle variable Antikörperfragmente in Form von Einzelketten zu exprimieren, sondern auch als funktionelles Heterodimer, welches sich posttranslational affinitätsbedingt in der äußeren Membran formiert.

5.2 Antikörperfragmente gegen EGFR

Nachdem die prinzipielle Eignung des Autodisplay-Systems zur funktionellen Oberflächenexpression von Antikörperfragmenten gezeigt werden konnte, sollte nun in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob durch dieses Verfahren das gezielte Ansteuern von Tumoren mittels Bakterien möglich ist, um diese in Zukunft einmal als Wirkstofffähren nutzen zu können. Hierzu bedurfte es eines zweiten Antikörpers, der sich diesmal gegen eine tumorassoziierte Oberflächenstruktur richten sollte. scFv425, der ebenfalls aus früheren Arbeiten (Maurer 1998) übernommen werden konnte, richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), der auf einer Reihe epithelialer Tumoren überexprimiert wird. Er eignet sich somit zur Prüfung, ob eine Ausweitung des Prinzips in Richtung „Bakterielles Tumortargeting“ möglich ist.

Der zu Grunde liegende monoklonale Antikörper mab425 (Murthy et al. 1987) erkennt ein konformationelles Epitop innerhalb der extrazellulären Domäne des memb-

ranständigen Proteins EGFR. Eine Feinlokalisierung dieses Epitops ist nicht möglich, da proteolytische Fragmentierung zum Verlust der antigenen Eigenschaften führt. Ausgehend von mab425 wurde scFv425 durch Amplifikation der einzelnen variablen Domänen und Verknüpfung derselben mit einem peptidischen Spacer erstellt (Horn et al. 1996). Dem Gen wurde das Signalpeptid *peIB* aus *Erwinia carotovora* vorgeschaltet (Lei et al. 1987). Das so erhaltene Plasmid pHKK diente Maurer zur Konstruktion von pJM1072.

5.2.1 Charakterisierung des für scFv425 kodierenden Plasmids

Das Plasmid pJM1072 (Abb. 5.14) ist durch Einbau der für den Lac-Promotor, das *peIB*-Signalpeptid und scFv425 kodierenden Sequenz aus pHKK über die Schnittstellen *Clal* und *BglII* in pJM369 entstanden. Durch die Wahl der Schnittstellen wurden die ursprünglich in pJM369 enthaltenen Sequenzen für den PTK-Promotor und das *ctxB*-Signalpeptid ersetzt. Das Plasmid lag im Stamm *E. coli* JK321 vor. Zunächst sollte überprüft werden, ob in diesem Stamm eine Proteinexpression an der Oberflä

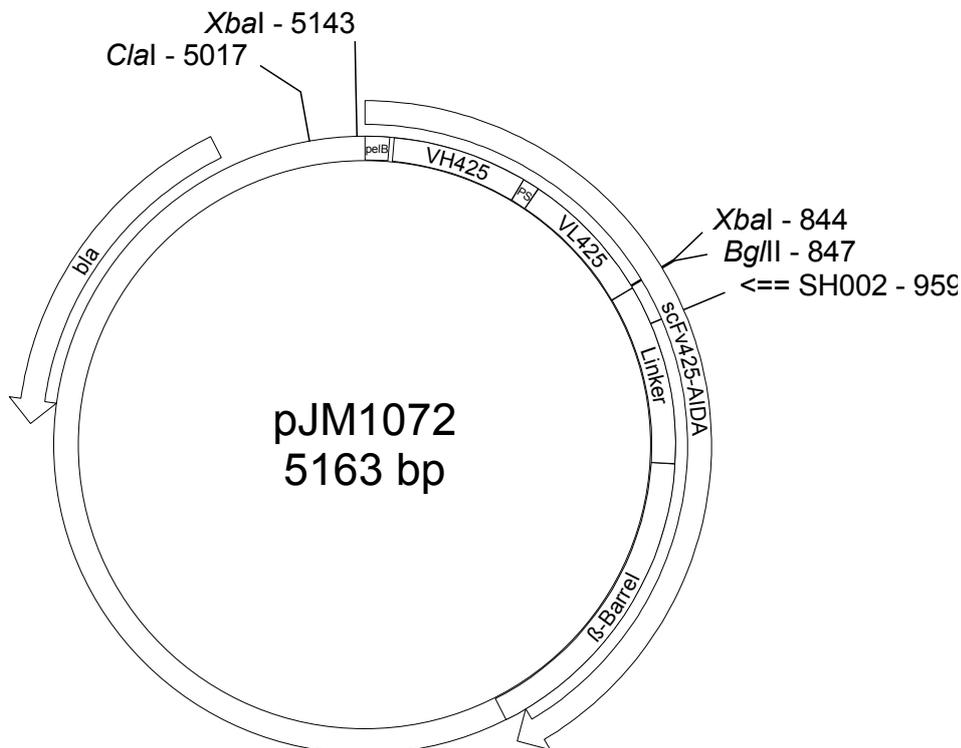


Abbildung 5.14: Plasmidkarte von pJM1072, das für ein Autotransporter-Konstrukt mit scFv425 als Passagier kodiert (gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors) Markiert sind die Bindungsstellen relevanter Restriktionsenzyme und Primer sowie die Untereinheiten des Autotransportergens. SP=Signalpeptid, PS=peptidischer Spacer.

che von *E. coli* erkennbar war. Hierzu wurden die Zellen angezogen und die Proteinexpression induziert. Die äußeren Membranen mitsamt der hierin verankerten Proteine wurden isoliert und anschließend mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt.

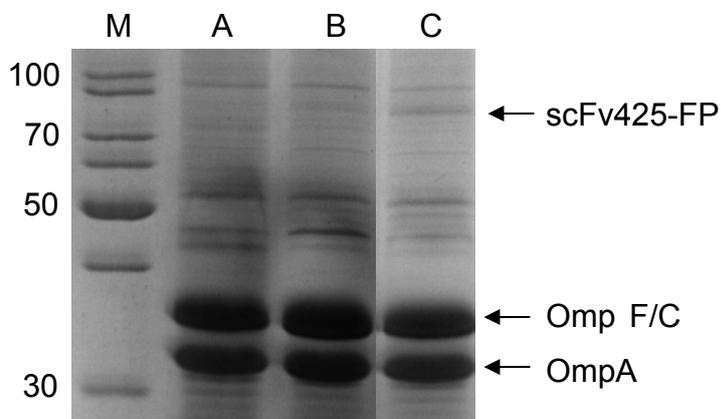


Abbildung 5.15: Expression von scFv425-FP in der äußeren Membran von *E. coli*, gesteuert durch den Lac-Promotor

Wie in Abb. 5.6 beschrieben, wurden die äußeren Membranen von *E. coli* UT5600(DE3) pJM1072 isoliert und im SDS-Gel analysiert.

M – Größenmarker

A – 1. Kontrolle *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid

B – 2. Kontrolle *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 ohne Induktion

C – wie B, aber induziert

Da das gesamte Fusionsprotein mit Ausnahme des Signalpeptids detektiert würde, lag die Höhe der erwarteten Bande im SDS-Gel bei 85 kDa. Jedoch konnte eine solche Bande nicht identifiziert werden (ohne Abb.). Um auszuschließen, dass dies am Stamm *E. coli* JK321 lag, wurde das Plasmid in den Stamm *E. coli* UT5600(DE3) transformiert, der sich als vorteilhaft erwiesen hatte (Jose und von Schwichow 2004a). Auch *E. coli* UT5600(DE3) pJM1072 wies jedoch nur eine schwache Expression des gewünschten Proteins auf (Abb. 5.15).

5.2.2 Optimierung der Expressionsstärke von scFv425

Mögliche Erklärungen für die im Vergleich zu anderen Autotransporter-Konstrukten schwache Expressionrate von scFv425-FP sind die Unterschiede in Bezug auf den eingesetzten Promotor und das Signalpeptid. Im vorliegenden Konstrukt pJM1072 wird die Expression durch den induzierbaren Lac-Promotor gesteuert, wohingegen andere Konstrukte meist unter der Kontrolle des (ebenfalls induzierbaren) T7-Promotors stehen. Im Unterschied zu den meisten anderen Autotransporter-

Fusionsproteinen, die das CTB-Signalpeptid enthalten (Jose et al. 2001; Jose und Handel 2003; Jose und von Schwichow 2004a; Jose und von Schwichow 2004b), findet man in pJM1072 ferner das Signalpeptid der Pektatlyase von *Erwinia carotovora*, PeIB (Lei et al. 1987). Zur Steigerung der Expression wurde deshalb der für scFv425 kodierende Bereich in ein Plasmid eingesetzt, das bereits seine Eignung für Autodisplay gezeigt hat. Mittels PCR mit den Primern FB002, der lateral eine XbaI-Schnittstelle einfügt, und SH002 wurde der für scFv425 kodierende Teil des Inserts von pJM1072 amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen

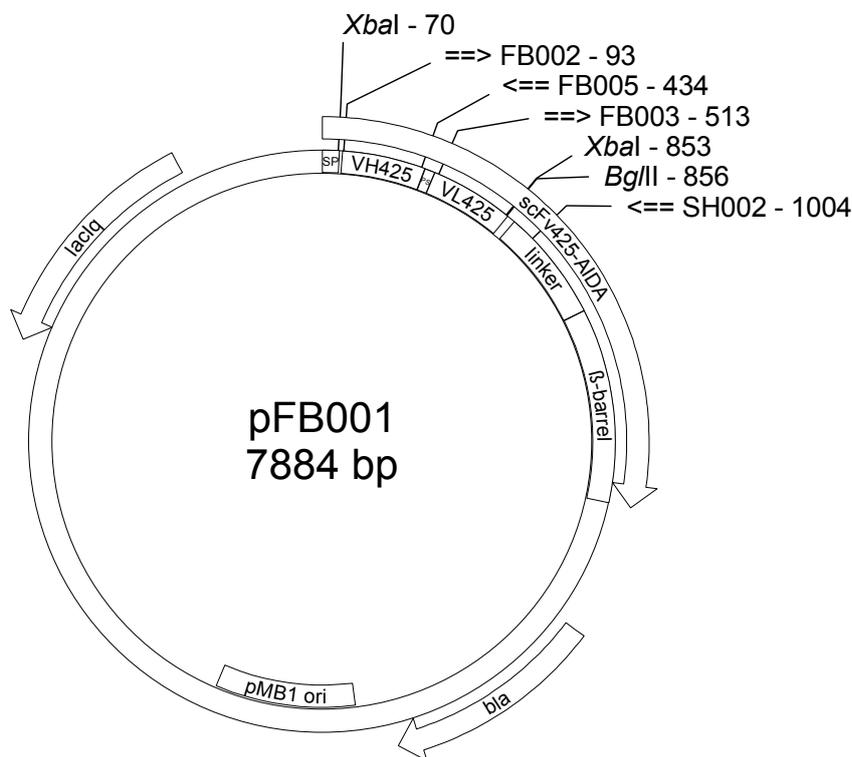


Abbildung 5.16: Plasmidkarte von pFB001, das für scFv425-FP kodiert, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors

Markiert sind die Bindungsstellen relevanter Restriktionsenzyme und Primer sowie die Untereinheiten des Autotransportergens. SP=Signalpeptid, PS=peptidischer Spacer.

XbaI/BglII verdaut. Anschließend wurde dieser DNA-Abschnitt in den genau so behandelten Vektor pET-SH3SDH08 ligiert, wodurch das Plasmid pFB001 erhalten wurde (Abb. 5.16). Dieses enthält den induzierbaren T7-Promotor, der nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Die Expression dieser von *E. coli* UT5600(DE3) chromosomal kodierten Polymerase wiederum wird erst durch Zugabe von IPTG ermöglicht, so dass vorher keine Expression zu erwarten ist. Die Präparation der äußeren Membranen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 zeigte nun eine deutlich gesteigerte

te Expressionrate und indizierte die vollständige Oberflächenständigkeit des Fusionsproteins (Abb. 5.17). Legt man die relativ konstante Anzahl an OmpA-Molekülen zugrunde (200.000/Zelle), die im SDS-Gel eine schwächer gefärbte Bande ergeben, so ergibt sich aufgrund der Differenzen im Molekulargewicht eine Zahl von ca. $1-2 \times 10^5$ oberflächenständigen single chain-Fragmenten pro Zelle (Cole et al. 1982).

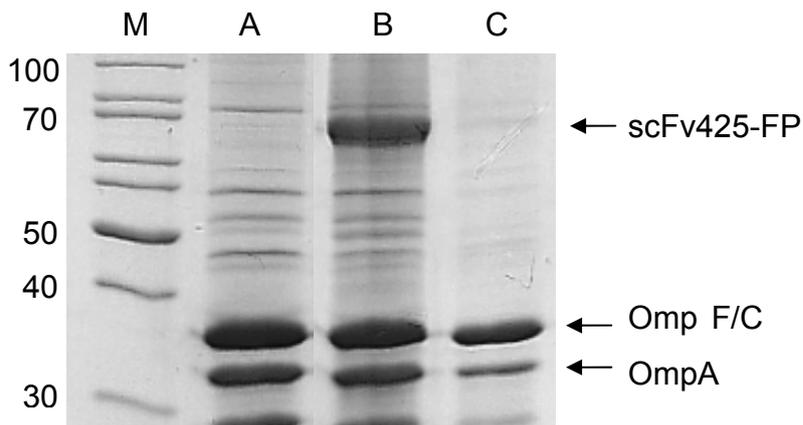


Abbildung 5.17: Expression von scFv425-FP in der äußeren Membran von *E. coli*, gesteuert durch den T7-Promotor

Wie in Abb. 5.6 beschrieben, wurden die äußeren Membranen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 isoliert und im SDS-Gel analysiert.

M – Größenmarker

A – Kontrolle ohne Induktion

B – Proteinexpression induziert

C – wie B, aber zusätzlich Ganzzellverdau mit Trypsin

5.2.3 Tumoraффinität scFv425-exprimierender Zellen

Der neu erstellte Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 trägt nach Induktion der Proteinexpression Antikörperfragmente gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors auf seiner Oberfläche. Diese sollten in der Lage sein, an Tumorzellen zu binden, die dieses Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die humane Zelllinie A431 ausgewählt (Giard et al. 1973). Es handelt sich um eine adhären wachsende Epidermis-Zelllinie mit tumorigenen Eigenschaften, die eine starke Überexpression des EGFR aufweist. Diese wurde durch Western-Blot und Immunzytochemie bestätigt (Abb. 5.22, 5.23).

Um die Bakterien in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sichtbar zu machen, wurde zusätzlich zu pFB001 ein weiteres Plasmid, pKE19 (Abb. 5.18), in den Stamm transformiert. Dieses kodiert für das „green fluorescent protein“ (GFP), das

dem Stamm eine permanente grüne Fluoreszenz verleiht. Der p15A origin von pKE19 ist kompatibel zu pMB1, so dass eine parallele Expression beider Proteine in einem Stamm möglich ist. Die auf diese Weise veränderten Bakterien wurden durch Induktion zur Produktion des scFv425-FP und dessen Translokation auf ihre Oberfläche angeregt. Die auf Deckgläschen angezogenen A431-Zellen wurden dann mit der Bakteriensuspension versetzt, um nach Waschen die Adhärenz der Bakterien an die eukaryontischen Zellen mikroskopisch beurteilen zu können. Zur Kontrolle wurde ein Stamm eingesetzt, der auf seiner Oberfläche mit SDH ein dimeres Protein trägt, *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3SDH08 (Abb. 5.19).

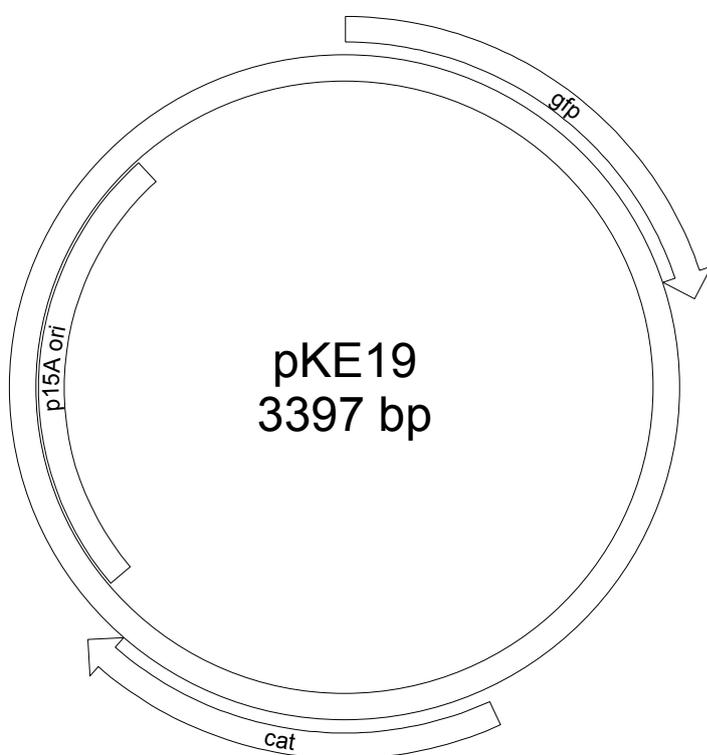


Abbildung 5.18: Plasmidkarte von pKE19, das für eine Variante des „green fluorescent protein“ (GFP) kodiert

p15A ist ein zu pMB1 und pColA kompatibler Replikationsursprung. *cat* kodiert für die Chloramphenicol-Acetyltransferase, ein Enzym, das dem transformierten Stamm Chloramphenicolresistenz verleiht.

Es zeigte sich, dass tatsächlich eine starke Bindung der Bakterienzellen an die Tumorzellen stattgefunden hatte. Kontrollzellen hingegen hatten im Vergleich dazu keine deutliche Affinität zu A431-Zellen. Dieses Ergebnis war reproduzierbar bei mehrfacher Wiederholung und bestätigte zum ersten Mal die Erwartung, dass es möglich ist, durch Einsatz des Autodisplay-Systems Bakterienzellen gezielt an Tumorzellen

zu adressieren. Dies stellt den ersten Schritt auf dem Weg zum bakteriellen Tumor-targeting dar.

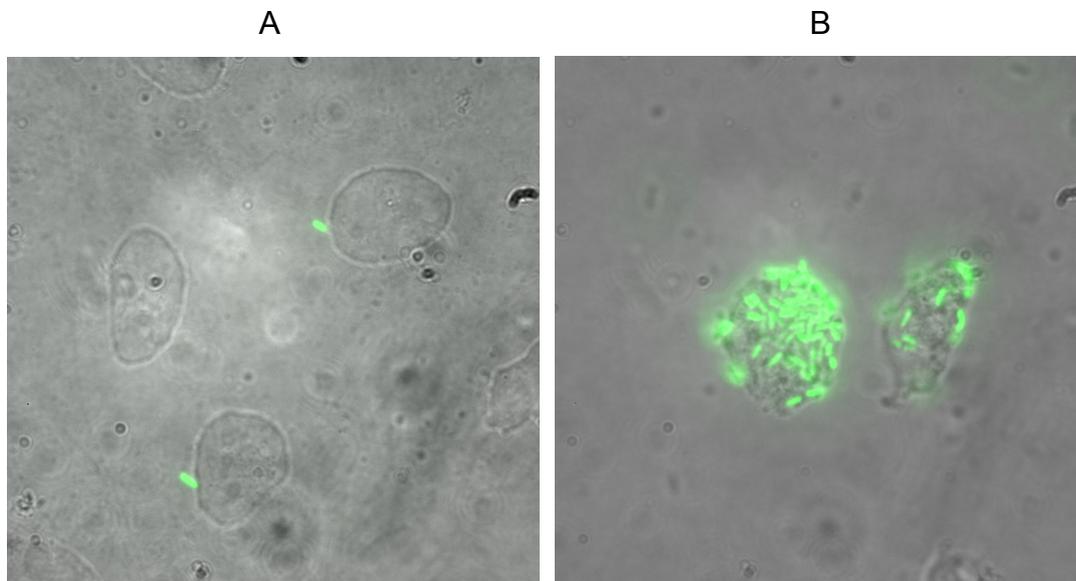


Abbildung 5.19: Bindung von scFv425-FP-exprimierenden *E. coli*-Zellen an EGFR-überexprimierende Tumorzellen

A431-Zellen wurden mit nach Standard-Prozedur angezogenen Bakterien inkubiert und nach Waschen im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der Überlagerung von Durchlichtaufnahmen und Aufnahmen im grünen Fluoreszenzkanal.

A – A431-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3SDH08 + pKE19

B – A431-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 + pKE19

5.2.4 Vereinzelung der variablen Domänen V_{H425} und V_{L425}

Die für scFv425 gefundenen Resultate sollten im Folgenden für tcFv425 bestätigt werden. Es galt zunächst, V_{H425} und V_{L425} getrennt zu exprimieren. Hierbei wurde analog zu scFv112 vorgegangen. Die für V_{L425} (leichte Kette von scFv425 gegen EGFR) kodierende Region aus pFB001 wurde mit FB003 und SH002 amplifiziert und über BglIII/XbaI in pET-SH3SDH08 eingesetzt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pFB003. Die für V_{H425} kodierende Sequenz wurde zunächst mit FB002 und FB005 und pFB001 als Template amplifiziert und über BglIII/XbaI in pET-SH3SDH08 eingesetzt, so pFB002 erhaltend. Anschließend wurde die komplette Autotransporterregion samt Passagier aus pFB002 über die Schnittstellen NcoI und BlnI in pAG004 eingesetzt. pAG004 ist ein Derivat von pCOLADuet-1 ohne Agel-Schnittstelle. Das resultierende Plasmid heißt pFB012. Der Hybridstamm *E. coli* UT5600(DE3) pFB003 +

pFB012 kodiert nun für tcFv425, die Kombination der beiden variablen Fragmente V_H425 und V_L425 .

5.2.5 Dimerisierung an der Oberfläche von *Escherichia coli*

Die Proteinexpression von V_L425 -FP durch *E. coli* UT5600(DE3) pFB003 sowie jene von V_H425 -FP durch *E. coli* UT5600(DE3) pFB012 war in ihrer Stärke jeweils vergleichbar mit der von V_L112 -FP und V_H112 -FP durch die analogen Stämme aus Kapitel 5.1 (nicht gezeigt). Abb. 5.20 zeigt die Präparation der äußeren Membranen des Hybridstamms, der tcFv425 an seiner Oberfläche exprimiert.

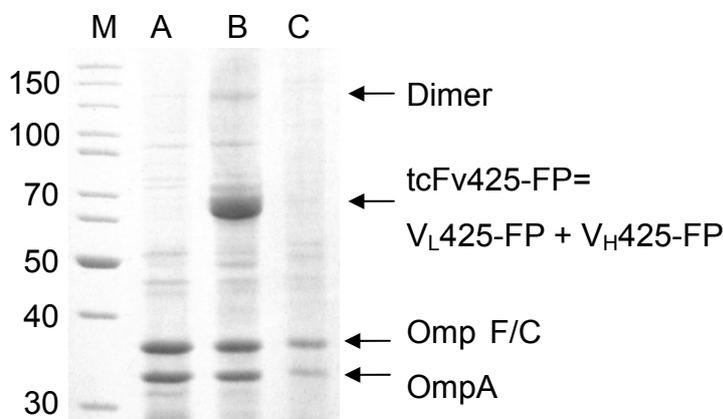


Abbildung 5.20: Expression von tcFv425-FP in der äußeren Membran von *E. coli*

Wie in Abb. 5.6 beschrieben, wurden die äußeren Membranen von *E. coli* UT5600(DE3) pFB003 + pFB012 isoliert und im SDS-Gel analysiert. Mit tcFv425 wird das Heterodimer aus V_H425 und V_L425 bezeichnet, deren Banden sich im SDS-Gel überlagern. Die Dimerbande in Spur B ist gekennzeichnet.

M – Größenmarker

A – Kontrolle ohne Induktion

B – Proteinexpression induziert

C – wie B, aber zusätzlich Ganzzellverdau mit Proteinase K

Im Unterschied zu tcFv112 erkennt man hier nun eine weitere Bande auf Höhe des Dimers. Die postulierte Zusammenlagerung der beiden variablen Fragmente in der äußeren Membran wird hier sogar im SDS-Gel sichtbar. Möglicherweise war auch bei tcFv112 in Kapitel 5.1 eine solche Dimerbande vorhanden, aber aufgrund der geringen Expressionsstärke dieses tcFv mit der gewählten Methode nicht nachweisbar.

5.2.6 Tumortargeting mit tcFv425-exprimierenden *E. coli*-Zellen

Der Hybridstamm zur Expression beider variablen Fragmente des anti-EGFR-Antikörpers mab425 wurde nun ebenfalls zur fluoreszenzmikroskopischen Prüfung

der Affinität zu A431-Zellen eingesetzt. Nach Transformation des für GFP kodierenden Plasmids enthielt der Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pFB003 + pFB012 + pKE19 drei verschiedene Plasmide, die aufgrund ihrer kompatiblen Replikationsursprünge dauerhaft in den Zellen fortbestehen konnten. Die grün fluoreszierenden Bakterien wurden analog zu den Experimenten mit scFv425 präsentierenden Zellen (Kapitel 5.2.3) zu A431-Zellen hinzugegeben. Nach der Inkubation und Waschschrritten wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch beurteilt (Abb. 5.21).

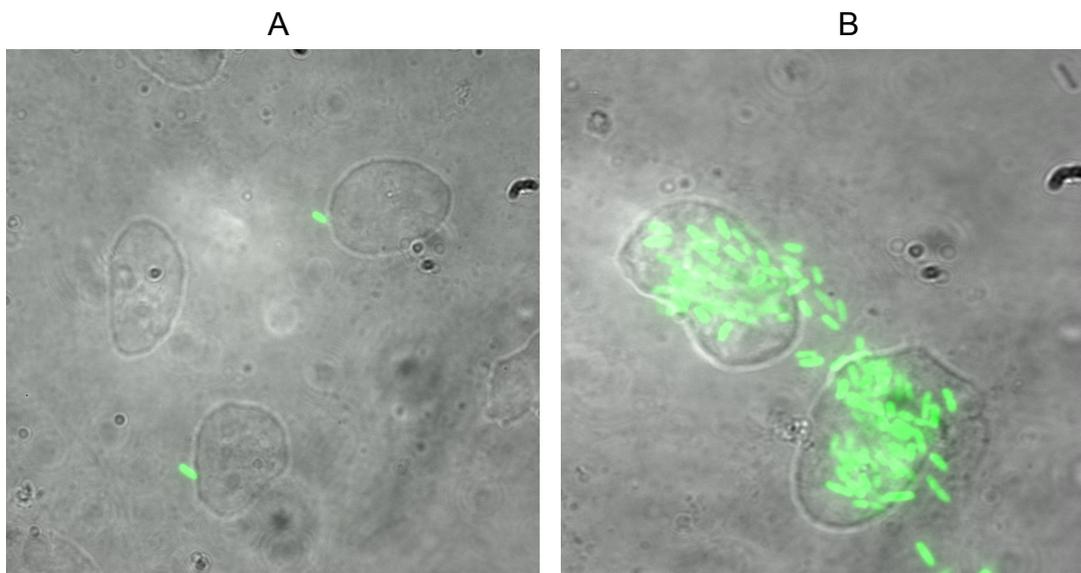


Abbildung 5.21: Bindung von tcFv425-exprimierenden *E. coli*-Zellen an EGFR-überexprimierende Tumorzellen

Vorgehensweise wie in Abb. 5.19 beschrieben.

A – A431-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3SDH08 + pKE19

B – A431-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pFB003 + pFB012 + pKE19

Wie für scFv425 ließ sich auch für tcFv425-präsentierende Zellen eine deutlich gesteigerte Affinität zu A431-Zellen feststellen. Dies belegt erneut die funktionelle Expression des Heterodimers, wie auch schon für tcFv112 gezeigt. Um zweifelsfrei die korrekte Antigenpezifität der Bakterienzellen festzustellen, bedurfte es jedoch noch eines weiteren Kontrollexperimentes.

5.2.7 Silencing des EGFR mit siRNA und erneute Kontrolle der Bindungsaffinität scFv425- und tcFv425-exprimierender Bakterien

Sowohl Bakterien mit scFv425 als auch jene mit tcFv425 als oberflächenständig prä-sentierete Passagierdomäne in ihrer äußeren Membran zeigen eine im Vergleich zu

Kontrollzellen deutlich gesteigerte Affinität zu der Tumorzelllinie A431, für die eine starke Überexpression des EGFR belegt ist. Um auszuschließen, dass die Bindung aufgrund einer anderen Oberflächenstruktur der eukaryontischen Zellen zustande gekommen ist, wurde die Expression des EGFR durch Einsatz von short interfering RNA (siRNA) herunterreguliert. siRNAs binden zytosolisch an einen Proteinkomplex mit Helikase- und Nukleaseaktivität. Der so gebildete RISC (RNA-induced silencing complex) erkennt die zur siRNA komplementäre Sequenz bestimmter mRNAs und entfaltet an ihnen seine enzymatische Aktivität. Setzt man siRNA ein, die an die für EGFR kodierende mRNA bindet, so wird diese ATP-abhängig hydrolysiert. Durch diese Unterbindung der Translation entstehen A431-Zellen ohne EGFR mit ansonsten unveränderter Zellarchitektur. Die Herunterregulation des Rezeptors wurde im Western Blot geprüft (Abb. 5.22), wobei als Kontrolle Zellen dienten, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt wurden. Als zusätzlicher Beleg für die erfolgreiche Herunterregulation des EGFR wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt (Abb. 5.23).

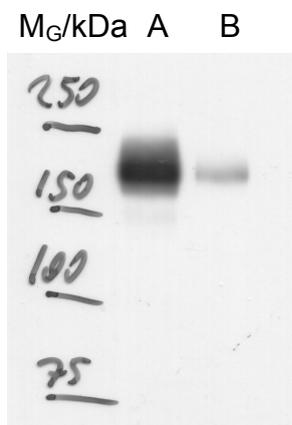


Abbildung 5.22: Westernblot von A431-Ganzzellprotein nach EGFR-Silencing

Proteine des Ganzzelllysats der A431-Zelllinie wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit polyklonalem EGFR-Antikörper und sekundärem Antikörper behandelt. EGFR ist ein Glykoprotein von 170 kDa Molekulargewicht.

A – A431-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA behandelt

B – A431-Zellen wurden mit EGFR-siRNA behandelt

Das anschließende Kontrollexperiment fand unter identischen Bedingungen wie die oben genannten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen statt. Bakterien, die scFv425, tcFv425 oder SDH auf ihrer Oberfläche tragen, wurden zu A431-Zellen gegeben, die entweder mit Kontroll-siRNA oder mit EGFR-siRNA behandelt wurden. Mit

Kontroll-siRNA bestätigte sich das bekannte Bild, dass scFv425- und tcFv425-, nicht aber SDH-präsentierende Bakterien Bindung an die eukaryontischen Zellen zeigten (nicht gezeigt). Eine Affinität zu Zellen, die mit EGFR-siRNA behandelt worden waren, konnte für keine der drei Bakterienstämme gefunden werden (Abb. 5.24).

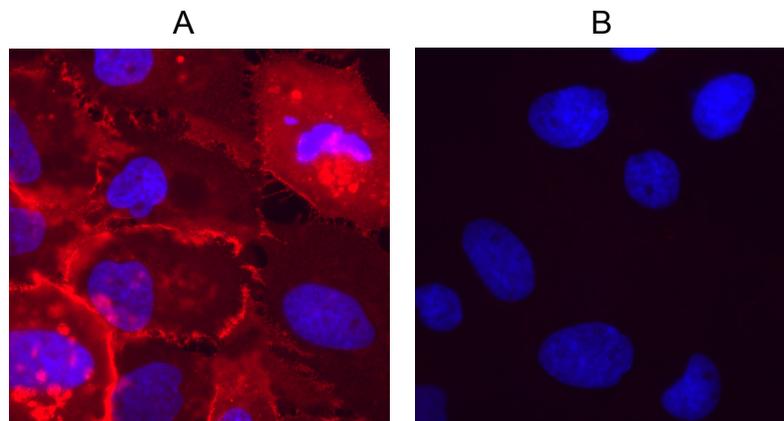


Abbildung 5.23: Immunzytochemische Färbung nach EGFR-Silencing von A431-Zellen

Die Verteilung des EGFR auf mit siRNA behandelten A431-Zellen wurde durch Zugabe eines polyklonalen anti-EGFR-Antikörpers und Rotfärbung durch einen sekundären Antikörper visualisiert. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) blau markiert. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der Überlagerung von Aufnahmen im roten und blauen Fluoreszenzkanal.

A – A431-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA behandelt

B – A431-Zellen wurden mit EGFR-siRNA behandelt

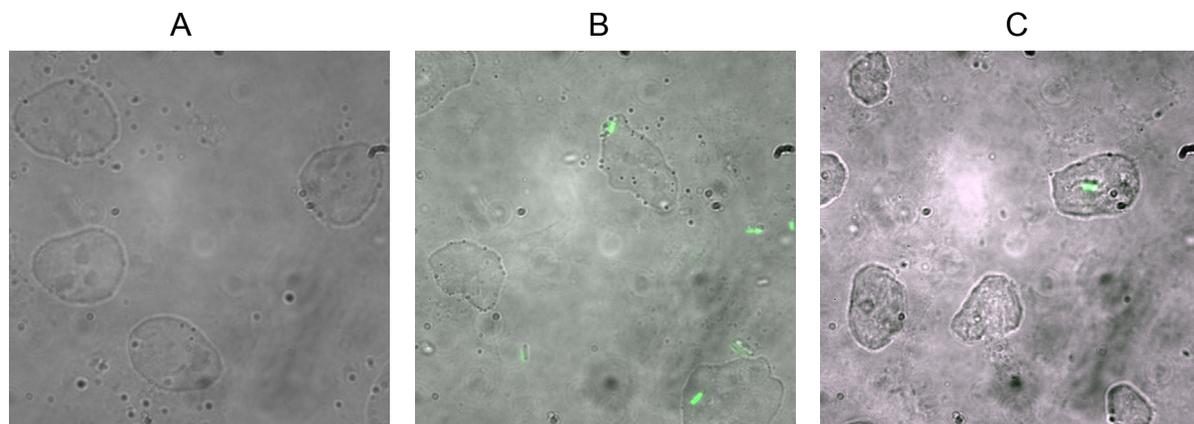


Abbildung 5.24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit A431-Tumorzellen nach Downregulation des EGFR

Vorgehensweise wie in Abb. 5.19 beschrieben. Durch Behandlung mit EGFR-siRNA wurde die Expression des AGFR in A431-Zellen vor den Bindungsexperimenten herunterreguliert.

A – A431-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pET-SH3SDH08 + pKE19

B – A431-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 + pKE19

C – A431-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pFB003 + pFB012 + pKE19

Die in Abb. 5.19 und 5.21 gezeigte Bindung der Bakterien mit Antikörperfragment auf ihrer Oberfläche an A431-Zellen war tatsächlich auf den EGF-Rezeptor zurückzuführen

ren. Daraus wird auch deutlich, dass die Spezifität der Antikörperfragmente für das Antigen bei der oberflächenständigen Expression in *E. coli* erhalten bleibt.

Die Summe dieser Experimente belegt die Eignung des Autodisplay-Systems zur funktionellen Oberflächenexpression von Antikörperfragmenten. Hierbei wurden neben den bereits bekannten single-chain Fragmenten völlig neuartige funktionelle Fragmente eingesetzt, die sogenannten twin-chain variablen Fragmente, deren Ausbildung erst durch die Wahl des Autodisplay als Expressionssystem ermöglicht worden ist.

5.3 Kombinatorik und Identifizierung neuer Antikörpersequenzen

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anwendung des Autodisplay-Systems das spezifische Targeting von Tumoren mit Bakterien ermöglicht. Im abschließenden Teil sollte dieses Prinzip auf ein tumorassoziiertes Antigen angewendet werden, für das ein Antikörper benötigt wird und zu dem es keinen monoklonalen Antikörper gibt. Zu diesem Zweck sollte eine rekombinante Bibliothek verschiedener tcFv mittels Zellsortierung auf eine Variante gescreent werden, die in der Lage ist, spezifisch an dieses Antigen zu binden.

5.3.1 Prinzip der zufälligen Variation der CDR3 von V_H und V_L

Da für die neu erstellten tcFv gezeigt wurde, dass sie vergleichbare Affinität zu ihrem Antigen aufweisen wie die zugehörigen scFv, sollten für die Erstellung einer Antikörperbibliothek die erstgenannten Fragmente eingesetzt werden. Hierbei würde durch getrennte Variation der beiden Ketten die Möglichkeit zur Erstellung einer kombinatorischen Bibliothek geschaffen, deren Variabilität die einer gewöhnlichen Bibliothek deutlich übersteigen sollte.

Wie beschrieben weisen V_H und V_L humaner Antikörper die größte Variabilität und den größten direkten Antigenkontakt in ihren CDR3-Regionen auf. Alle anderen genomisch kodierten framework und complementarity determining regions lassen sich konformationellen Gruppen zuordnen und sind in ihrer Variabilität engeren Grenzen ausgesetzt. Die Human Combinatorial Antibody Library (HuCAL, (Knappik et al. 2000)) nutzt diese Gruppen zur Erstellung eines Mastergenpools aus je sieben un-

terschiedlichen V_H - und V_L -„Gerüstsequenzen“, die zu 49 Genen für scFv kombiniert werden. In diese Gene wurden schließlich stark zufallsvariierte CDR3-Domänen eingebaut, wodurch letztendlich ein synthetischer Nachbau der humanen Antikörpervielfalt bzw. eine Ausweitung derselben resultiert. Diese Methodik ist mit immensem experimentellen Aufwand verbunden und im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Interessant ist jedoch die Vorgehensweise zur Erzeugung der Variabilität in der CDR3-Region. Hierbei greifen Knappik et al. auf vorliegende Sequenzdaten von 382 untersuchten humanen Antikörpern zurück und bilden für jede Position innerhalb der

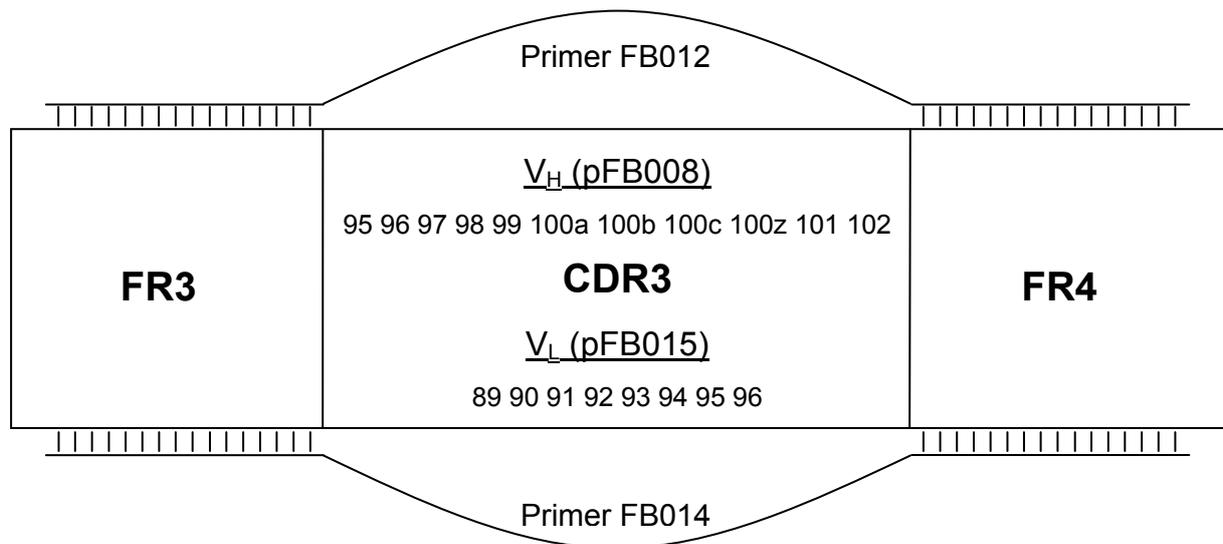


Abbildung 5.25: Bindestellen der Bibliotheksoligonukleotide und Details zur CDR3

Das Schema repräsentiert einen Ausschnitt aus den Plasmiden pFB008 und pFB015 bzw. aus den von ihnen kodierten Fragmenten V_H 112-FP und V_L 112-FP. Die Primer FB012 und FB014 zur Erstellung der scFv-Bibliothek binden am Rand der für FR3 und FR4 kodierenden Regionen, aber nicht im zentralen Bereich, der für die CDR3-Region kodiert. Die zentral dargestellte Bezifferung stellt die Nummerierung der Aminosäuren in CDR3 von V_H und V_L nach Kabat dar (Kabat 1991).

CDR3 die Häufigkeit für jede der 20 Aminosäuren ab. Auf dieser Grundlage basiert auch die in dieser Arbeit erzeugte Bibliothek von Antikörperfragmenten. Die CDR3 von V_H 112 und V_L 112 sollten so detailgetreu wie möglich an die natürliche Diversität angepasst werden, um die Wahrscheinlichkeit der Erzeugung immunkompetenter Antikörper zu vergrößern. Dies wurde durch den Einsatz sogenannter „spiked oligonucleotides“ erreicht. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide, die an einzelnen Positionen keine definierte Base enthalten, sondern ein Basengemisch vorher definierter Zusammensetzung. Auf diese Weise wird die benötigte genotypische Vielfalt der Bibliothek generiert. Das Prinzip der Klonierungen war die komplette Amplifizierung der Vektoren für V_H 112 und V_L 112, wobei durch den Einsatz der partiell degene-

rierten Primer Diversität in den für CDR3 kodierenden DNA-Abschnitten erreicht wurde (Abb. 5.25). Die Amplikons haben keine definierte Sequenz, sondern enthalten ein Gemisch verschiedener DNA-Abschnitte, die auch für unterschiedliche Aminosäuresequenzen kodieren. Diese wiederum wurden durch die Wahl der Basen so nah wie möglich an die natürliche Verteilung angenähert (Tab. 5.1). An Position 101 in V_H befindet sich mit Aspartat eine konservierte Aminosäure. Sie findet sich in 82 % aller Antikörper und bildet dort eine Salzbrücke mit dem ebenfalls hochkonservierten Arginin an Position 94. Diese Salzbrücke bedingt wichtige konformationelle Eigenschaften der variablen Region (Shirai et al. 1996; Morea et al. 1998). Die Basenfolge beim Oligonukleotid-Design wurde deshalb so gewählt, dass D_{H101} erhalten bleibt. Die leichte Kette wurde ebenfalls an einer Position unmutiert belassen. Q_{L90} findet sich in 87 % aller Antikörper des Sequenzpools und ragt mit seiner Seitenkette nicht in die Antigenbindungstasche, trägt zur Bindung nicht unmittelbar bei (Knappik et al. 2000).

	V_H 95-100c	V_H 100z	V_H 102	V_L 89	V_L 91	V_L 92	V_L 93	V_L 94/96	V_L 95
A	8%	5%	0%	0%	1%	0%	0%	6%	0%
C	2%	0%	0%	0%	7%	17%	0%	3%	0%
D	8%	3%	20%	0%	7%	17%	25%	3%	0%
E	8%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	0%
F	2%	16%	20%	0%	7%	0%	0%	3%	0%
G	8%	0%	0%	0%	1%	17%	25%	6%	0%
H	4%	0%	5%	5%	7%	0%	0%	3%	0%
I	3%	16%	5%	0%	1%	0%	0%	5%	0%
K	4%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	0%
L	6%	8%	5%	5%	1%	0%	0%	9%	0%
M	1%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	0%
N	4%	3%	5%	0%	7%	17%	25%	3%	0%
P	4%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	6%	80%
Q	4%	0%	0%	90%	0%	0%	0%	3%	0%
R	6%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	9%	0%
S	6%	5%	0%	0%	8%	17%	25%	9%	20%
T	4%	5%	0%	0%	1%	0%	0%	6%	0%
V	8%	23%	20%	0%	1%	0%	0%	6%	0%
W	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	0%
Y	4%	3%	20%	0%	49%	17%	0%	3%	0%
STOP	5%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%

Tabelle 5.1: Rechnerisch zu erwartende Verteilung der Aminosäuren in der kombinatorischen Bibliothek

Mit Hilfe des degenerierten genetischen Codes und der Verteilung der einzelnen Basen an jeder Position der spiked oligos wurde die antizipierte Verteilung der Aminosäuren ermittelt. Nummerierung der Aminosäuren nach Kabat (Kabat 1991).

5.3.2 Erstellen einer Bibliothek von variablen leichten Fragmenten (V_L)

Das einzelsträngig vorliegende spiked oligo FB014 wurde zunächst mit Hilfe des am 3'-Ende bindenden Primers FB015 zum Doppelstrang aufgefüllt. Der so erhaltene Primer bindet an beiden Enden jeweils am Randbereich der CD-Region 3 in pFB015 und enthält mittig den mutierten Bereich (Abb. 5.25). Er wurde zur Amplifizierung des kompletten Plasmids pFB015 eingesetzt. Im ersten Schritt sollten die optimalen PCR-Bedingungen ermittelt werden. Die PCR wurde weitestgehend nach Standardbedingungen durchgeführt, wobei zusätzlich zur Taq-Polymerase mit Vent eine Polymerase mit „proofreading“ Aktivität eingesetzt wurde. Dies sollte die Fehlerrate im nichtmutierten Teil bei den vergleichsweise großen Amplikons minimieren. Als erste variable Komponente wurde die Annealingtemperatur T_A mit Hilfe einer Gradienten-PCR optimiert (Abb. 5.26).

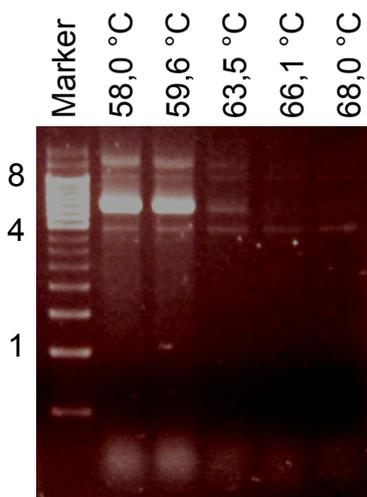


Abbildung 5.26: Agarosegel zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur (T_A) bei der PCR zur Erstellung der Bibliothek von V_L -FP

Zur Ermittlung der optimalen T_A wurden PCRs mit einer Elongationszeit (t_{el}) von 7 min mit einem Gradienten für T_A durchgeführt. Aufgetragen sind jeweils die erhaltenen Amplikons vor dem DpnI-Verdau. Oben ist die verwendete T_A , links die Bandengröße in kbp angegeben.

Ziel dieser Untersuchung war das Ermitteln der höchsten T_A , bei der noch eine ausreichende DNA-Konzentration erreicht wird. Je höher die Temperatur beim Annealingschritt, also der Zusammenlagerung von Primer und Template, innerhalb eines PCR-Zyklus, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit von Fehlpaarungen. Für V_L kann diese Temperatur anhand des vorliegenden Agarosegels eindeutig bestimmt werden, da bei Überschreiten von 60 °C eine deutlich reduzierte Intensität der DNA-

Bande festgestellt werden kann. Anschließend wurde die PCR mit den ermittelten Bedingungen ($T_A=59,6\text{ °C}$ und $t_{el}=7\text{ min}$) durchgeführt und der Ansatz mit DpnI verdaut. Dies diente dem Entfernen der unmutierten Template-DNA, die im Gegensatz zu PCR-Produkten methyliert vorliegt und damit DpnI-sensibel ist. Der Ansatz wurde mit Hilfe des Qiagen Miniprep-Kits aufgereinigt und direkt in elektrokompetente Zellen von *E. coli* UT5600(DE3) transformiert. Nach Inkubation in SOC-Medium wurden 10 % des Ansatzes zur Bestimmung der Bibliotheksgröße in einer Verdünnungsreihe auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert. Die dabei ermittelte Anzahl an Transformanden lag bei $3,4 \times 10^4$ (Tab. 5.2). Die restlichen 90 % des Ansatzes enthalten also hochgerechnet 3×10^5 Transformanden. Sie wurden in YT-Medium angezogen und gemäß Standardprotokoll zur Erstellung elektrokompetenter Zellaliquots verwendet.

Verdünnung	Anzahl Transformanden		hochgerechnet auf 10^0	Durchschnitt
	in 90 μl	in 100 μl		
10^0	nicht zählbar		---	34082
10^{-1}	1650	1833	18.330	
10^{-2}	342	380	38.000	
10^{-3}	45	50	50.000	
10^{-4}	---	3	30.000	

Tabelle 5.2: Ermittlung der Bibliotheksgröße für V_L

10 % (100 μl) des Ansatzes der Bibliothek von V_L wurde für die Bestimmung der Bibliotheksgröße verwendet. Zur Erstellung der Verdünnungsreihe wurden je 10 μl der höheren Konzentration in 90 μl LB-Medium überführt. Die jeweils verbleibenden 90 μl wurden ausplattiert und die Kolonien am nächsten Morgen gezählt. Die gefundene Anzahl wurde auf das ursprüngliche Volumen von 100 μl hochgerechnet, da je 10 % für die Verdünnungsreihe benötigt wurden (Ausnahme 10^{-4}). Hieraus errechnet sich eine Zahl von ca. $3,4 \times 10^4$ Transformanden, die in den 10 % des Gesamtansatzes enthalten waren, der für die Verdünnungsreihe genutzt wurde.

5.3.3 Erstellen einer Bibliothek von variablen schweren Fragmenten (V_H)

Zur Generierung einer Bibliothek von V_H -Fragmenten wurde analog vorgegangen. Das spiked oligo FB012 wurde mit FB013 zum Doppelstrang aufgefüllt. Der erhaltene Primer bindet ebenfalls an den Randbereichen der für CDR3 kodierenden Region und enthält zentral die variierte Sequenz (Abb. 5.25). Bei der Ermittlung der optimalen T_A war das Ergebnis nicht so eindeutig wie bei V_L (Abb. 5.27). Die Größe der

Amplikonbande war bei allen eingesetzten T_A ähnlich und im Vergleich zu V_L erheblich geringer.

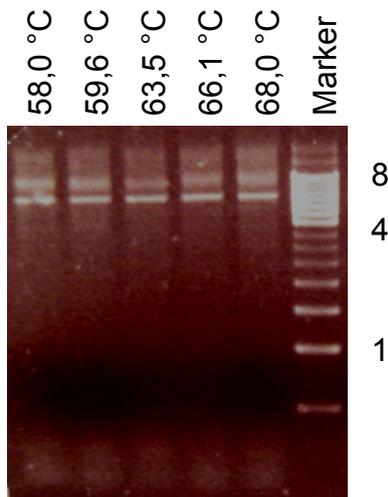


Abbildung 5.27: Agarosegel zur Ermittlung der optimalen T_A bei der PCR zur Erstellung der Bibliothek von V_H -FP

Zur Ermittlung der optimalen T_A wurden PCRs mit einer t_{el} von 7 min mit einem Gradienten für T_A durchgeführt. Aufgetragen sind jeweils die erhaltenen Amplikons vor dem DpnI-Verdau. Oben ist die verwendete T_A , rechts die Bandengröße in kbp angegeben.

In weiteren Versuchen wurde deshalb zunächst eine Anpassung von t_{el} vorgenommen. Das zu amplifizierende DNA-Stück ist im Falle des Templates pFB008 immerhin mehr als 2 kbp größer als bei pFB015. Durch diese Maßnahme konnte eine geringe Steigerung der Ausbeute erzielt werden. Nach mehreren weiteren Versuchen wurden die optimalen Bedingungen für V_H mit $t_{el}=14$ min und $T_A=54$ °C bestimmt (Abb. 5.28), obgleich die festzustellenden Unterschiede zwischen den verschiedenen gewählten Bedingungen im Vergleich zu V_L gering waren.

Die PCR wurde mit den optimierten Bedingungen durchgeführt und der Ansatz exakt so aufbereitet wie jener für V_L . Um die Ausbeute etwas zu steigern, wurde die PCR in einem zehnfach größeren Ansatz durchgeführt als bei V_L (10x50µl). Die gereinigte DNA wurde in die vorbereiteten elektrokompenten Zellen der Bibliothek von V_L transformiert und über Nacht zur für die durchflusszytometrischen Experimente nötigen optischen Dichte angezogen. Auch hier wurde die Bibliotheksgröße mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt, welche nun auf Agarplatten mit Ampicillin und Kanamycin ausplattiert wurde. Bei drei unterschiedlichen Ansätzen lag die Bibliotheksgröße jeweils im Bereich von $0,8-5 \times 10^5$ (für ein Beispiel Tab. 5.3). Die erhoffte Steigerung

der Variabilität durch den kombinatorischen Ansatz wurde durch den Transformations-schritt limitiert. Die Bibliotheksgröße lag dennoch in einem Bereich, der ausreichend viele Varianten für weitergehende Untersuchungen erwarten ließ.

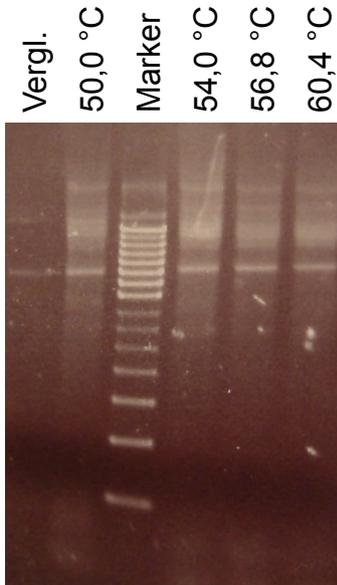


Abbildung 5.28: Optimierung von T_A für die PCR zur Erstellung der Bibliothek von V_H -FP
Aufgetragen sind die Proben einer Gradienten-PCR für V_H vor dem DpnI-Verdau bei t_{el} =14 min. Zum Vergleich (linke Spur) lief ein Ansatz ohne Primer-Zugabe bei T_A =50,0 °C mit.

Verdünnung	Anzahl Transformanden		hochgerechnet auf 10^0	Durchschnitt
	in 90 μ l	in 100 μ l		
10^0	nicht zählbar		---	42.600
10^{-1}	nicht zählbar		---	
10^{-2}	457	508	50.800	
10^{-3}	42	47	47.000	
10^{-4}	---	3	30.000	

Tabelle 5.3: Ermittlung der Gesamtbibliotheksgröße

Gezeigt sind die Zahlen des Ansatzes, aus dem schließlich eine positive Variante selektiert werden konnte. Die Vorgehensweise war wie in Tab. 5.2 beschrieben. Es errechnet sich eine Zahl von ca. $4,2 \times 10^4$ Transformanden. Die verbleibenden 90 %, die zum Einsatz in durchflusszytometrischen Experimenten genutzt wurden, enthalten also hochgerechnet ca. $3,8 \times 10^5$ Transformanden.

5.3.4 Identifizierung eines Epitops von GLEA2 zum Screenen der Bibliothek von tcFv-Fragmenten

Die erstellte Bibliothek von tcFv-exprimierenden *E. coli*-Zellen sollte nun auf Affinität zu einem vorgegebenen tumoralen Antigen getestet werden, um eine neue Antikör-

persequenz zu gewinnen. Mit GLEA2 wurde ein Protein als Antigen gewählt, dessen Tumorassoziation schon länger bekannt ist und für das sowohl diagnostische als auch therapeutische Relevanz postuliert wird.

Das Protein als Ganzes ist für durchflusszytometrische Untersuchungen jedoch nur bedingt geeignet. Zum einen kann es kaum in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden, zum anderen müsste es noch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Deshalb wurde mittels des Programms PeptideStructure aus dem GCG Wisconsin Sequence Analysing Package eine Lokalisierung der oberflächenständigen Bereiche des Proteins, die gleichzeitig antigenen Charakter haben, vorgenommen (Abb. 5.29), um diese als Epitop in FACS-Experimenten einsetzen zu können. Die verwendeten Algorithmen basierten auf Arbeiten von Emini und Jameson-Wolf (Emini et al. 1985; Jameson und Wolf 1988). Aufgrund dieser Untersuchungen wurde der Bereich von Aminosäure 256-261 des GLEA2-Proteins als besonders geeignetes Epitop identifiziert, da dieser neben einer hohen Wahrscheinlichkeit für Oberflächenständigkeit den stärksten antigenen Charakter aufweist. Die Aminosäurenfolge PKRKRG wurde mit N-terminaler FITC-Markierung synthetisiert. Das Peptid erhielt die Bezeichnung FB2.

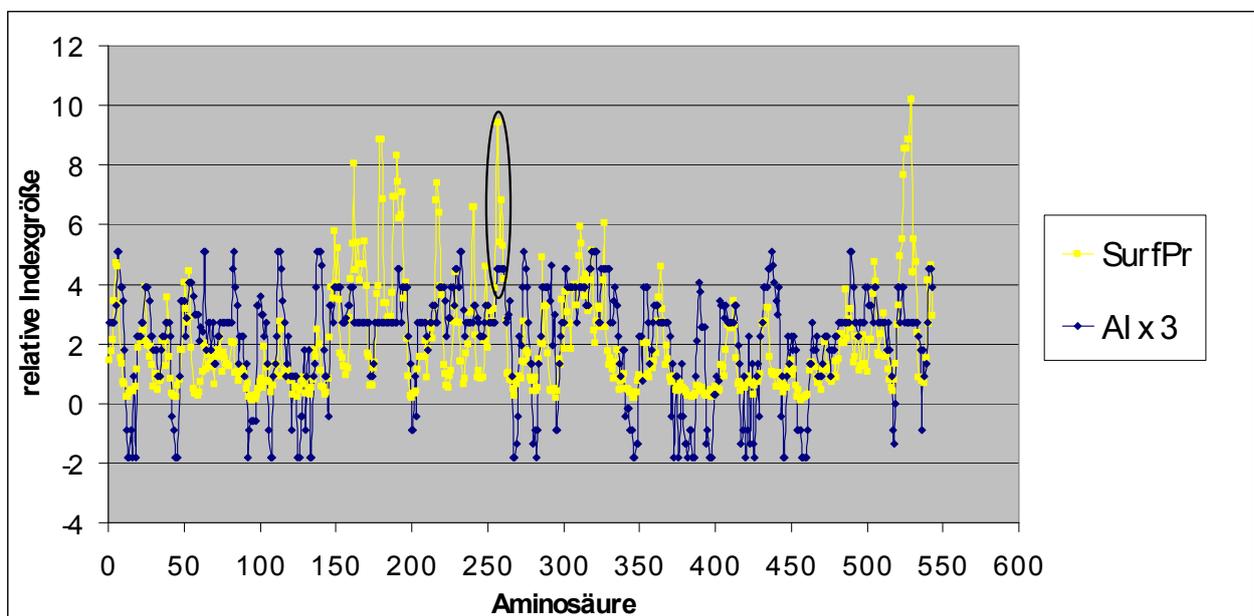


Abbildung 5.29: Lokalisierung eines geeigneten GLEA2-Epitops

Nach Analyse der Primärstruktur mit Hilfe des Programms PeptideStructure wurden die erhaltenen Werte für den antigenen Index (AI, blau) und die Oberflächenwahrscheinlichkeit (gelb) in Microsoft Excel® importiert und graphisch im Verlauf gegen die zugehörige Aminosäureposition dargestellt. Der markierte Bereich zeichnet sich durch hohe Werte für beide Indizes aus. (Um beide Indizes in einer Graphik anschaulich darstellen zu können, wurden die relativ kleinen Werte für AI mit 3 multipliziert).

5.3.5 Screening der Bibliothek auf Affinität zu einem GLEA2-Epitop und Selektion positiver Varianten mittels FACS

Die Bibliothek tcFv-tragender Bakterienzellen sollte auf Affinität zum GLEA2-Epitop FB2 getestet werden. Hierbei wurde analog vorgegangen wie zuvor bei der Analyse von Zellen, die gegen das Epitop FB1 gerichtet sind. Nach Zellanzucht, Waschen und Inkubation mit dem Peptid FB2 wurden die Proben im FACS analysiert. Wie man es für eine Bibliothek von Zellen erwarten würde, die eine hohe Diversität von tcFv-Fragmenten unterschiedlicher Sequenz auf ihrer Oberfläche tragen, zeigte sich im Histogrammplot eine sehr breite Verteilung in Bezug auf die gemessenen Fluoreszenzwerte. Eine andere DNA-Sequenz bedeutet eine andere Primärstruktur des Antikörpers, was wiederum eine abweichende Affinität zum Antigen zur Folge haben kann. Ein Bereich von Zellen im Dot Plot, die besonders starke Fluoreszenz aufwiesen, wurde als „sort gate“ definiert (Abb. 5.30). Der Begriff bezeichnet einen Bereich, den man anhand selbst gewählter Kriterien definieren kann, um Events von besonderem Interesse auszusortieren. Hier enthielt das sort gate nur 0,02 % aller aufgezeichneten Ereignisse, um lediglich die Zellen mit stärkster Bindung und deshalb stärkster Fluoreszenz weiter zu betrachten. Anschließend wurden hierin enthaltene Zellen auf eine kanamycin- und ampicillinhaltige Agarplatte aussortiert.

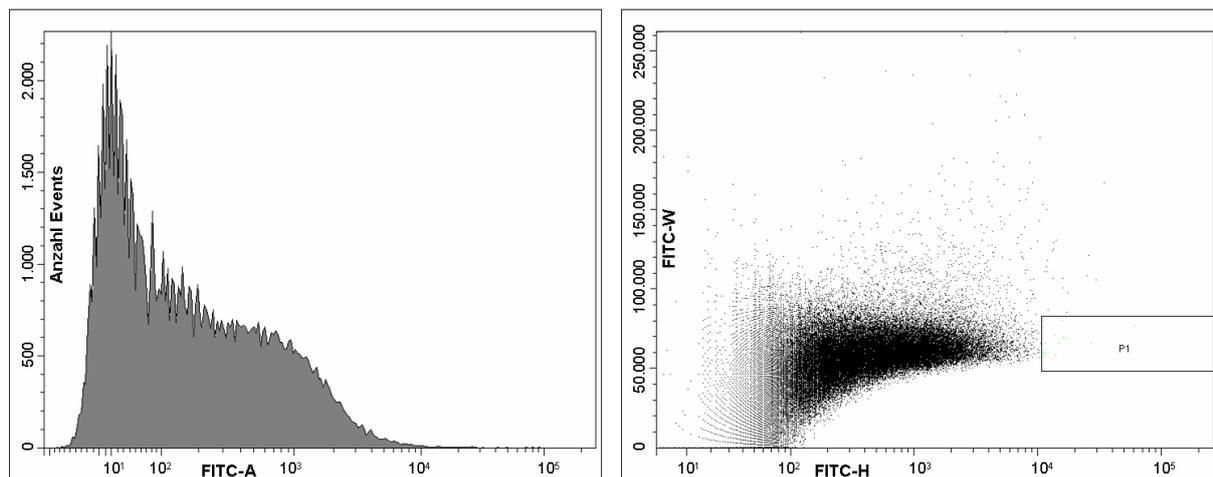


Abbildung 5.30: Analyse der tcFv-Bibliothek nach Inkubation mit einem GLEA2-Epitop und Definition eines sort gates

E. coli UT5600(DE3)-Zellen mit beiden Bibliotheksplasmiden wurden angezogen, induziert und mit FB2, einem FITC-markierten Hexapeptid inkubiert. Gezeigt sind Histogramm-Darstellung (links) und Dotplot (rechts) der durchflusszytometrischen Analyse. Im Dotplot markiert jeder Punkt ein gemessenes Ereignis. Aufgezeichnet wurden 100.000 Events. P1 bezeichnet die Region, aus der positive Varianten selektiert wurden, das „sort gate“. Diese wurden auf Agarplatten aussortiert und für nähere Betrachtung über Nacht angezogen.

Von den aussortierten Zellen wuchs schließlich etwa die Hälfte (46 von 96) wieder an. Aus den Kolonien wurden einige zur Reanalyse ausgewählt, um den zuvor gefundenen Befund erhöhter Fluoreszenz zu überprüfen. Die Zellen wurden gemeinsam mit einer Negativkontrolle nach gleichem Schema wie oben behandelt und erneut durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse waren unterschiedlich, die meisten der untersuchten Klone hoben sich jedoch deutlich von der Negativkontrolle ab.

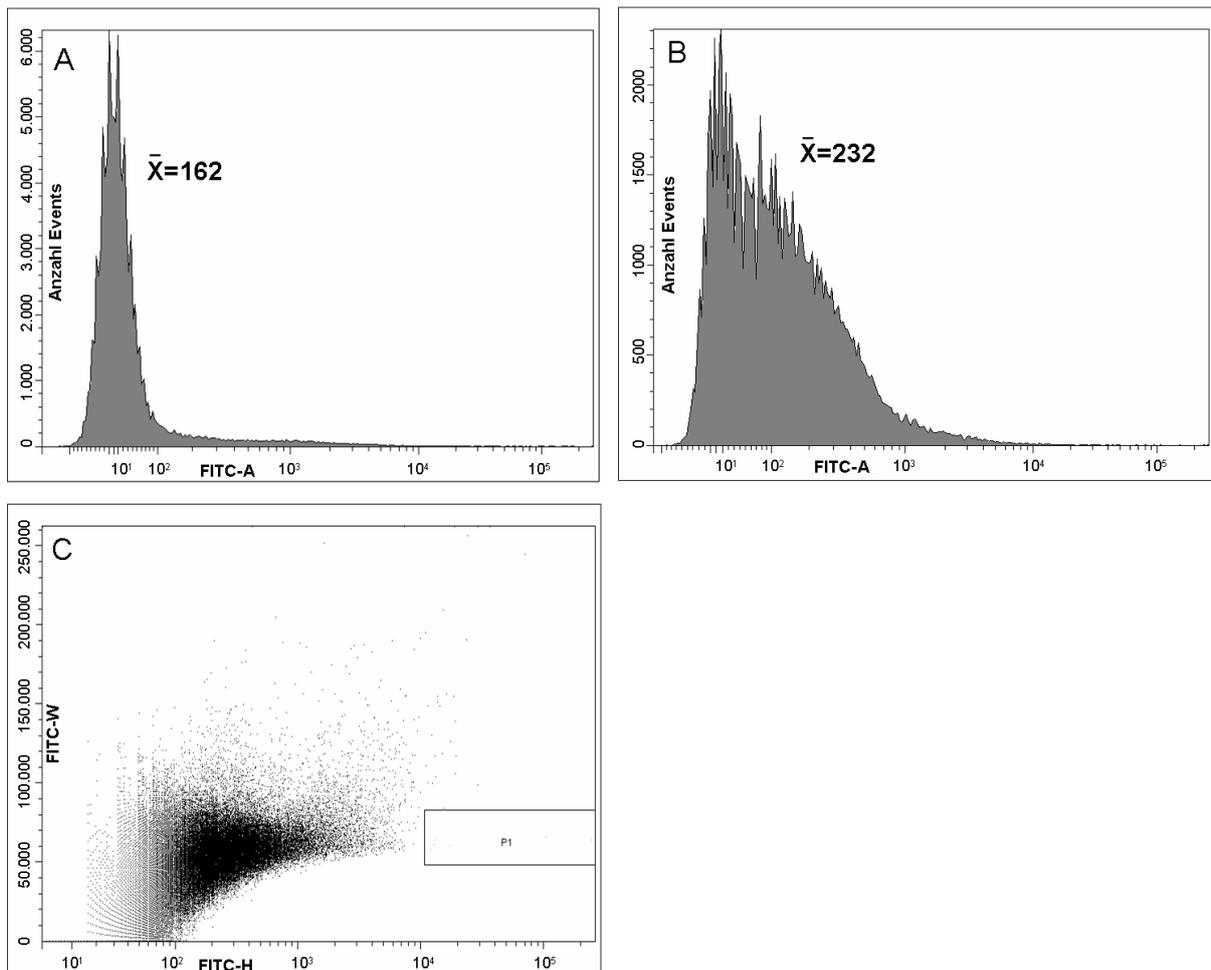


Abbildung 5.31: Reanalyse eines aussortierten Klons der Bibliothek

Zellen wurden wie in Abb. 5.29 beschrieben behandelt.

A – *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 als Negativkontrolle (exprimiert scFv425)

B – *E. coli* UT5600(DE3) mit Bibliotheksvariante 12 auf der Oberfläche

C – Dotplot zu B mit identischem sort gate wie in Abb. 5.29.

Wie Abb. 5.31 (Bild B) anhand von Klon 12 exemplarisch verdeutlicht, wiesen einige von ihnen einen für eine zusammengehörige Zellpopulation ungewöhnlichen Histogrammplot auf. Der in der Mitte des Peaks zu findende Einschnitt ließ vermuten,

dass sich eine zweite Zellpopulation in dem Ansatz befand, die nicht gefärbt werden konnte. Dies würde eine deutlich reduzierte mittlere Fluoreszenz zur Folge haben. Deshalb wurde aus dem Ansatz mit dem gleichen sort gate erneut ein Teil der stark fluoreszierenden Zellen aussortiert, um die eventuell beim ersten Sorting in die Probe gelangte Verunreinigung zu eliminieren.

Die Reanalyse von Klon 12 zeigte nun eine wesentlich deutlichere Verschiebung des Fluoreszenzmittelwertes im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 5.32). Die siebenfach erhöhte Fluoreszenz ist ein sehr deutlicher Hinweis auf Spezifität und Funktionalität des zugehörigen tcFv.

Auch in dieser Analyse finden sich - sogar noch deutlicher als zuvor - zwei Populationen, von denen eine offenbar nicht gefärbt wurde. Dies kann zwei Ursachen haben. Zum einen könnte es sich noch immer um eine Mischpopulation mit mindestens zwei verschiedenen Klone handeln. Oder die Population ist rein, aber ein Teil der Zellen lässt sich nicht anfärben, möglicherweise, weil er das gewünschte Protein nicht exprimiert. Da bereits ein Resorting vorgenommen wurde und die Anzucht stets in Selektivmedien erfolgte, ist dies die wahrscheinlichere Erklärung. Bedenkt man dies, so ist die Affinität der Zellen mit dem korrekten Fragment an der Oberfläche als noch höher einzuschätzen, da der Mittelwertquotient positiver und negativer Zellen als Maß für die Affinität durch die nicht gefärbten Zellen eine deutliche Reduktion erfährt.

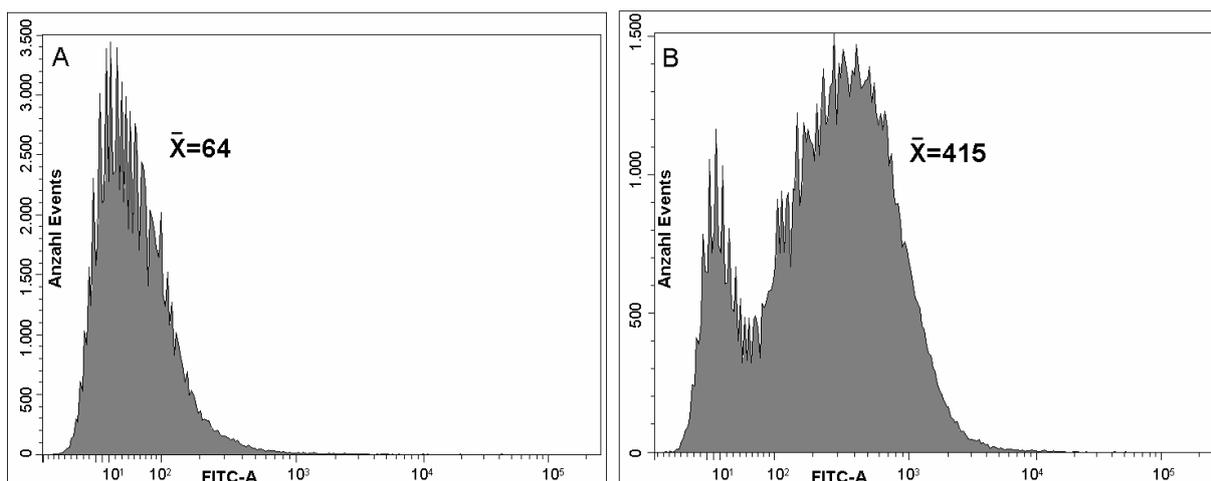


Abbildung 5.32: Reanalyse von Klon 12 nach erneutem Sorting

Einer der neu aussortierten Klone wurde nach beschriebener Prozedur gefärbt und vermessen.

A – *E. coli* UT5600(DE3) pFB001 als Negativkontrolle (scFv425)

B – *E. coli* UT5600(DE3) mit Bibliotheksvariante 12 auf der Oberfläche

Die Sequenzanalyse des nach Resorting erhaltenen Klons 12, der die besten Daten aller untersuchten Klone lieferte, zeigte, dass die angewandte Bibliotheksstrategie erfolgreich war (Abb. 5.33). Einzig die für CDR3 kodierende Region in beiden Plasmiden war durch die PCR mit den spiked oligos mutiert worden. Wie geplant nicht verändert worden waren die beiden Aminosäuren D_{H101} und Q_{L90} sowie Prolin an Position L95, dessen Konservierung auch mit 80 %-iger Wahrscheinlichkeit an dieser Position erwartet wurde (s. Tab. 5.1). Das Ergebnis der Sequenzierung bestätigt auch die Vermutung, dass nicht ein Mischklon aus zwei unterschiedlichen Zellen der tcFv-Bibliothek für die beiden Peaks im Histogramm-Plot verantwortlich war, da dieser keine eindeutige Sequenz geliefert hätte.

Zum Abschluss der Arbeiten konnte durch die isolierte Variation der CD-Region 3 der beiden variablen Antikörperdomänen eine Bibliothek von tcFv-tragenden Bakterien erstellt werden. Diese konnte anschließend erfolgreich auf Affinität zu einem Epitop von GLEA2 gescreent werden. Als Ergebnis wurde eine neue Antikörpersequenz erhalten, deren Funktionalität in weiteren Untersuchungen getestet werden soll. Hierzu werden derzeit Bakterien, die den neu erhaltenen tcFv exprimieren, auf Bindung an eine GLEA2-exprimierende Zelllinie sowie an freies GLEA2 geprüft.

V_Hursprüngliche Sequenz in pFB008

TGTGCAAGAG**GAACCAACTGGGACGGGAATATACTTCGATGTC**TGGGGCGCA
 370 0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0
 C A R **E P T G T G I Y F D V W G A**
 Kabat 95 96 97 98 99 100a 100b 100c 100z 101 102

mutierte Sequenz in Klon 12

TGTGCAAGAA**AAGGTCAGTCAGTACGATCAGATTTTCGATCTTT**TGGGGCGCA
 370 0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0
 C A R **K V S Q Y D Q I F D L W G A**
 Kabat 95 96 97 98 99 100a 100b 100c 100z 101 102

V_Lursprüngliche Sequenz in pFB015

GGAGTTTATTACTGC**TTTCAAGGTTACATGTTCCATTACGTT**CGGCTCG
 340 0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0
 G V Y Y C **F Q G S H V P F T F G S**
 Kabat 89 90 91 92 93 94 95 96

mutierte Sequenz in Klon 12

GGAGTTTATTACTGC**CAACAGGCTTATAGTCGACCTGTT**ACGTTCCGGCTCG
 340 0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0-----5-----0
 G V Y Y C **Q Q A Y S R P V T F G S**
 Kabat 89 90 91 92 93 94 95 96

Abbildung 5.33: Darstellung der Sequenzveränderung in Klon 12 durch die angewandte Bibliotheksstrategie

Zur Orientierung angegeben sind die Bezifferung der DNA-Abschnitte sowie der resultierenden Aminosäuren in CDR3 nach Kabat. Fettschrift kennzeichnet den mutierten Bereich in CDR3. Unterstrichen sind die beiden bewusst unverändert belassenen Aminosäuren D_{H101} und Q_{L90}.

6 Diskussion

Seit Köhlers und Milsteins Forschungen und der Entwicklung einer Methode zur Gewinnung monoklonaler Antikörper hat deren Bedeutung in Forschung, Diagnostik und Therapie stark zugenommen (Kohler und Milstein 1975). Dies hat eine Weiterentwicklung der Techniken zur Folge gehabt, die es heute ermöglicht, für eine große Vielzahl verschiedener Antigene einen maßgeschneiderten Antikörper zu finden, der ohne murinen Proteinanteil auskommt. Ziel dieser Arbeit war es, ein zelluläres System zur Oberflächenexpression von Antikörperfragmenten zu entwickeln, um die etablierten Methoden durch ein neues effizientes Verfahren zu ergänzen. Ferner sollte die Eignung von Bakterienzellen zum Targeting von Tumoren untersucht werden. Als Methode der Wahl wurde das Autodisplay-System genutzt, das bereits in einer Reihe vorangehender Untersuchungen seine Eignung zur Oberflächenexpression heterologer Proteine in *E. coli* unter Beweis gestellt hatte (Jose und Meyer 2007).

6.1 Autodisplay von Antikörperfragmenten

Zunächst wurde geprüft, ob Antikörperfragmente durch Einsatz des Autodisplay-Systems auf der Oberfläche von *E. coli* exprimiert werden können. Auf der Grundlage bereits existierender Konstrukte wurden neue Plasmide erstellt, die für Autotransporter-Fusionsproteine mit scFv oder einzelnen variablen Domänen als Passagier kodierten. Diese waren gegen ein Epitop des Nef-Proteins aus HIV-1 gerichtet. Als Stamm wurde in der Regel *E. coli* UT5600(DE3) eingesetzt, welcher nicht zuletzt aufgrund seiner OmpT-Defizienz besondere Eignung für die stabile Oberflächenexpression durch das Autodisplay-System besitzt. Beim Einsatz des single-chain Fragments als Passagier konnte durch Isolierung der äußeren Membranen und Auftrennung der hierin enthaltenen Proteine im SDS-Gel einwandfrei die Expression nachgewiesen werden. Die geschätzte Zahl an translozierten Proteinen lag mit geschätzten 1×10^5 Molekülen pro Zelle in der Größenordnung, wie sie vom Autodisplay anderer Passagiere bekannt war und somit höher als bei anderen Expressionssystemen. Der Proteaseverdau ganzer Zellen hatte vollständige Degradation des Passagiers zur Folge, was die Tatsache belegt, dass er nach außen gerichtet ist und die gewählte Strategie erfolgreich war. Mittels des fluoreszenzmarkierten peptidischen Epitops

konnte die Funktionalität dieser Zellen nachgewiesen werden, da sie bei durchflusszytometrischer Analyse deutlich stärkere Fluoreszenz aufwiesen als identisch markierte Kontrollzellen.

Zur Vorbereitung einer kombinatorischen Bibliothek wurde im Folgenden untersucht, ob der peptidische Spacer, der die beiden variablen Domänen eines scFv verbindet, essenziell ist bei der Expression mittels Autodisplay. Grundlage dieser Überlegung waren vorhandene Resultate, bei denen für SDH und Adrenodoxin gezeigt wurde, dass eine Zusammenlagerung zum funktionellen Homodimer in der äußeren Membran erfolgt, wenn lediglich ein Monomer als Passagier eingesetzt wird (Jose et al. 2001; Jose und von Schwichow 2004a). Dies liegt in der natürlichen Affinität beider Domänen zueinander begründet. Ergo wurden die variablen Domänen der leichten und der schweren Kette des Immunglobulins gegen das Nef-Epitop getrennt voneinander als Passagiere des Autotransporters eingesetzt. Dies wurde durch zwei Plasmide erreicht, die kompatible Replikationsursprünge aufweisen und somit stabil in einem Stamm gehalten werden konnten. Das Ergebnis war eindeutig. Zellen, die diese beiden Fragmente auf ihrer Oberfläche trugen, zeigten in Untersuchungen zu ihrer Funktionalität ähnliche Ergebnisse wie die Zellen mit scFv. Es war gelungen, ein völlig neuartiges funktionelles Antikörperfragment zu generieren, das allein aus den variablen Domänen besteht. In Anlehnung an scFv erhielt es die Bezeichnung twin-chain variable fragment (tcFv, Abb. 6.1).

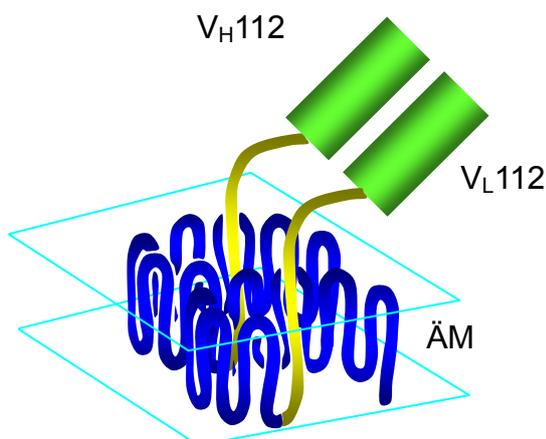


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Expression eines tcFv

Zwei membranäre Fusionsproteine lagern sich so in der äußeren Membran zusammen, dass ihre Passagierdomänen V_H und V_L affinitätsbedingt dimerisieren können, um ein funktionelles Heterodimer auszubilden.

ÄM = äußere Membran

Diese Arbeiten waren der Beleg dafür, dass Autodisplay die funktionelle Expression von Antikörperfragmenten ermöglicht. Sie stehen in Einklang mit Resultaten einer anderen Arbeitsgruppe (Veiga et al. 2003). Hier wurde das Fusionsprotein eines anti-Coronavirus scFv mit der IgA Protease-Translokationseinheit aus *Neisseria meningitidis* auf *E. coli* exprimiert und als funktionell bestimmt. Die Gruppe um de Lorenzo sieht dies als ersten Schritt auf dem Weg, Bakterien als Vakzine einzusetzen. Hierzu müssten Antikörper-präsentierende *E. coli*-Zellen dauerhaft den menschlichen Darm besiedeln, um dort Coronaviren oder andere Pathogene abzufangen und deren Eintritt in die Wirtszelle zu unterbinden. In einer weiteren Arbeit, in der ebenfalls ein scFv oberflächenständig exprimiert wurde, widerspricht die Gruppe der gängigen Annahme, dass nur ungefaltete Passagiere die durch das β -Fass gebildete Pore passieren können (Veiga et al. 1999). Auch in Stämmen mit DsbA-Aktivität konnten sie ohne Zusatz reduzierender Agenzien scFv an der Oberfläche detektieren, wenn auch in geringerem Ausmaß. Die durch Disulfidbrücken entstehende Tertiärstruktur verhindert laut Veiga et al. den Translokationsprozess über die äußere Membran zumindest nicht vollständig.

Die Gruppe um Georgiou nutzt ein anderes System zur oberflächenständigen Expression heterologer Proteine. Es werden Hybridproteine konstruiert, die aus den ersten neun Aminosäuren des *E. coli* Lipoproteins Lpp, 114 Aminosäuren von OmpA und dem zu exportierenden Protein bestehen. Der C-Terminus von OmpA ragt ins Extrazellulärumilieu und präsentiert so das heterologe Protein an der Zelloberfläche. Auf diese Weise konnte die Gruppe β -Laktamase, Zellulose-bindendes Protein und eine Alkalische Phosphatase oberflächenständig exprimieren (Francisco et al. 1992; Francisco et al. 1993a; Francisco et al. 1993b). In weiteren Arbeiten wurde ein gegen Digoxin gerichtetes scFv exprimiert und in durchflusszytometrischen Experimenten aus einer gemischten Zellpopulation wieder angereichert (Francisco et al. 1993a; Daugherty et al. 1998). Außerdem gelang es, durch Variation der scFv-Sequenz in der CDR3 der schweren Kette und wiederholte Selektionsrunden im FACS eine Affinitätssteigerung des Antikörpers zu erreichen (Daugherty et al. 1998). Das Expressionssystem erlaubt eine Expression von mehr als 1×10^5 Molekülen pro Zelle.

In Abgrenzung zu diesen beiden bakteriellen Expressions-Systemen hat das Autodisplay-System bereits für eine sehr breite Palette heterologer Proteine seine Eig-

nung zur Oberflächenexpression gezeigt. Ein wesentlicher Vorteil ist ferner der Beleg zur funktionellen Multimerisierung, der bisher nur für mittels Autodisplay translozierte Passagiere erbracht wurde.

6.2 Tumortargeting durch *Escherichia coli*

Im ersten Teil der Arbeit konnte zweifelsfrei belegt werden, dass Autodisplay die funktionelle Expression von Antikörperfragmenten ermöglicht. Um zu prüfen, ob dies das bakterielle Targeting von Tumoren erlaubt, wurde der Ansatz auf ein tumorales Antigen erweitert. Als solches wurde der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ausgewählt. Innerhalb der Reihe tumoral überexprimierter Proteine kommt dem EGFR eine besondere Bedeutung zu. Zum einen kann er genutzt werden, um mit Antikörpern degenerierte Zellen für die Vernichtung durch die körpereigene Immunabwehr zu markieren. Gleichzeitig ist auch seine Funktion im tumoralen Zellzyklus weitgehend aufgeklärt. Eine Blockade des EGFR verhindert die Bindung seiner Liganden und damit die Ausübung der Funktion als Wachstumsfaktor. Auf diese Weise kann die Vermittlung von Apoptose-Inhibition, Proliferation und Metastasierung verhindert werden. Therapeutische Antikörper gegen den EGFR weisen einen dualen Wirkungsmechanismus auf, sofern sie in der Lage sind, CDC oder ADCC zu vermitteln. Die hohe therapeutische Relevanz des EGFR resultiert ferner aus der Vielzahl an neoplastischen Veränderungen, die mit einer Überexpression dieses Rezeptors einhergehen (Salomon et al. 1995).

In Analogie zum ersten Teil der Arbeit wurde zunächst ein scFv gegen EGFR als Passagier des Autotransporters genutzt. Im Anschluss wurden die variablen Domänen getrennt voneinander in einem Stamm exprimiert, um so das entsprechende tcFv zu erhalten. Durch Präparation der äußeren Membranen konnte eine hohe Expressionsrate (etwa im Bereich von 10^5 Molekülen pro Zelle) und die Oberflächenständigkeit der Proteine gezeigt werden. Die Expressionsstärke hing dabei vom eingesetzten Vektor ab. Derivate des pET-11d mit T7-Promotor, die eine induzierbare Expression durch die T7-RNA-Polymerase erlauben, erwiesen sich als besonders geeignet.

Zur Kontrolle der Funktionalität wurde mit A431 die gleiche Tumorzelllinie eingesetzt, mittels derer der zu Grunde liegende monoklonale Maus-Antikörper mab425 entwi-

ckelt wurde (Murthy et al. 1987). Nach Inkubation der eukaryontischen Zellen mit *E. coli*-Zellen wurde deren Bindung im Fluoreszenzmikroskop geprüft. Sowohl Bakterien mit scFv auf ihrer Oberfläche als auch solche mit dem zugehörigen tcFv gegen EGFR wiesen eine starke Affinität zu der Tumorzelllinie auf, während Kontrollzellen mit SDH als Passagier keine Bindung zeigten. Das Konzept des Autodisplays erlaubt demzufolge, zumindest *in vitro*, die gezielte Ansteuerung von Tumoren durch Bakterien.

Im Folgenden soll diskutiert werden, inwieweit dies in Zukunft diagnostisch und therapeutisch ausgenutzt werden kann. So liegt es nahe, Bakterien für diagnostische Zwecke einzusetzen. Gewebeproben eines Patienten könnten mit fluoreszenzmarkierten Zellen, die Fragmente gegen das entsprechende Tumorantigen exprimieren, inkubiert werden. Eine Adhärenz würde dann darauf hindeuten, dass der Tumor das Protein von Interesse, z.B. einen Wachstumsfaktor-Rezeptor, exprimiert oder überexprimiert. Das Wissen, das aus solchen histologischen Befunden gewonnen wird, erlaubt eine exaktere Diagnosestellung sowie darauf aufbauend eine optimale Therapieplanung. Heute schon sind eine ganze Reihe solcher Tumorantigene identifiziert (Dalglish und Pandha 2007).

Intensiv erforscht wird aktuell das „konventionelle“ Drug Targeting, bei dem Wirkstoffe direkt an einen Antikörper gekoppelt werden, der dann dem Patienten in der Regel intravenös appliziert werden soll. Eine Reihe von Wirkstoffkonjugaten befindet sich derzeit in der klinischen Forschung. Während anfangs in der Regel ganze Antikörper zur Kopplung eingesetzt wurden, greift man heute zunehmend auf „Abkürzungen“ derselben wie scFv zurück, die eine bessere Tumorpenetration versprechen (Schrama et al. 2006). Neueste Ergebnisse lassen sogar eine weitere Verkürzung auf sogenannte „antibody mimetics“ erwarten (Qiu et al. 2007). Hierbei wird die Antigenbindung allein durch zwei der sechs CDRs eines scFv (je eine von V_H und V_L) vermittelt, welche über eine framework region verknüpft werden.

Die beiden bereits auf dem Markt befindlichen Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (nur eines hat derzeit eine Zulassung für Deutschland) wirken über unspezifische Prinzipien, nämlich erstens Yttrium-90 als β -Strahler und zweitens Ozogamicin als ein bakterielles Toxin (Fietz und Thiel 2007; Pagano et al. 2007). Antikörper-Konjugate mit

konventionellen Wirkstoffen („small molecules“) haben bisher in der klinischen Prüfung nur unbefriedigende Resultate erzielt. Schwierigkeiten in der Entwicklung bereitet hier vor allem der Kopplungsschritt. Die Bindung an den Antikörper muss stabil genug sein, um nicht bereits in der Peripherie gespalten zu werden, während am Wirkort eine Spaltung vonnöten ist, um eine Wirkung zu ermöglichen (Garnett 2001). Dies kann durch peptidische Bindungen oder Disulfidbrücken erreicht werden, die erst nach Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Tumorzelle von zytosolischen Enzymen gespalten werden (Sutherland et al. 2006; Chari 2008). Von besonderer Relevanz ist hierbei das Verhältnis der Zahl von Wirkstoff- zu Antikörpermolekülen. Ein Grund für die mitunter geringe klinische Effizienz einiger Chemo-Immunokonjugate ist die zu geringe Wirkstoffbeladung, die das Erreichen therapeutischer Wirkspiegel verhindert, da selten mehr als ein Wirkstoffmolekül gekoppelt werden kann (Allen 2002), während eine zu hohe Dosis ohne therapeutische Vorteile, dafür aber mit erhöhter Toxizität einhergeht (Hamblett et al. 2004). All diese Schwierigkeiten ließen sich umgehen, wenn man Bakterien zum Targeting der Tumoren nutzen würde.

Obwohl bereits 1893 erstmals die Behandlung von Tumoren mit Bakterien erfolgte (Coley 1991), ist das bakterielle Drug Targeting ein vollkommen neuartiges Therapieprinzip und steht erst am Beginn seiner Entwicklung. Gegenstand noch folgender Untersuchungen soll sein, inwieweit die Ansteuerbarkeit von Tumoren mittels scFv-präsentierender Bakterien für therapeutische Zwecke ausgenutzt werden könnte. So wäre es denkbar, diese als Wirkstofffähre einzusetzen. Gastrointestinale Tumoren könnten mit *E. coli*-Zellen angesteuert werden, die ein oberflächenständiges spezifisches Protein dieses Tumors erkennen. Am Wirkort angelangt, adhärirten sie dank der exprimierten Antikörperfragmente am tumoralen Gewebe, an dem dann die Produktion eines antitumoralen Wirkprinzips induziert werden könnte. Induzierbare Proteinexpression wird im Labor meist durch Promotoren erreicht, die das Ablesen nachgeschalteter Gene nach Zugabe von IPTG oder vergleichbarer Laktosederivate ermöglichen. Ein solches Prinzip wäre *in vivo* ungeeignet, da diese Substanzen die Darmpassage nicht unbeschadet überstehen würden. IPTG ist außerdem gesundheitsschädlich. Eine geeignete Alternative wäre der Einsatz hitzeinduzierbarer Promotoren (Chao et al. 2004). Nach Applikation der Bakterien würde durch eine lokale Hyperthermie das Ablesen nachgeschalteter Gene ausgelöst. So könnten - streng

lokal begrenzt - therapeutische Wirkprinzipien mittels Autodisplay exprimiert werden, wodurch die Schädigung gesunden Gewebes und damit einhergehende Nebenwirkungen stark limitiert würden. Als solche peptidischen Wirkstoffe eigneten sich beispielsweise Toxine, Zytokine oder Apoptose-fördernde Todesrezeptor-Liganden (Robinson et al. 1998; Frankel et al. 2000; Huerta et al. 2007). Eine noch spezifischere Alternative wäre angelehnt an die „antibody-directed enzyme prodrug therapy“ (ADEPT) (Sharma et al. 2005). Hier werden Antikörper nicht dazu eingesetzt, einen Wirkstoff zum Tumor zu transportieren, sondern ein Enzym, das einen Wirkstoff freisetzt. Bezogen auf Bakterien könnte man die Produktion eines solches Enzyms, beispielsweise einer spezifischen Esterase, am Wirkort induzieren. Ein Prodrug, das anschließend eingenommen wird, würde dann nur in Tumornähe zu seiner Wirkform umgesetzt. Ferner wäre denkbar, in Analogie zu bispezifischen Antikörpern oder den neueren „dual-variable domain immunoglobulins“ (DVD-Ig), zwei verschiedene Antikörper durch das Bakterium produzieren zu lassen (Wu et al. 2007). Während der eine das Targeting des Tumors bewirkte, würde der andere Immunzellen binden, die so in der Nähe des Tumors akkumulieren und diesen gezielt angreifen könnten.

Eine derartige Therapie durch bakterielles Drug Targeting ließe eine sehr geringe Rate an unerwünschten Wirkungen erwarten, da die therapeutische Intervention sich auf den Wirkort beschränkte. Sollte es dennoch Anlass zum Therapiabbruch geben, so wäre dieser jederzeit durch Einnahme eines adäquaten Antibiotikums gewährleistet. Dies würde einen Vorteil gegenüber einer anderen aktuell intensiv untersuchten Methode der Krebsbekämpfung darstellen, nämlich der viralen Gentherapie, deren Auswirkungen nicht ohne Weiteres abgestoppt werden können.

Der Einsatz von *E. coli* als Wirkstofffähre wäre jedoch mit einem bedeutenden Nachteil verbunden. Als gramnegatives Bakterium weist es in seiner äußeren Membran Lipopolysaccharide auf. Deren Bestandteil Lipid A besitzt großes immunogenes Potenzial (Seydel et al. 2003). Deswegen wäre der Einsatz auf den Darmtrakt limitiert, in dem *E. coli* auch natürlicherweise zu finden ist. Die beschriebene Methodik auch bei anderen als gastrointestinalen soliden Tumoren zu nutzen, verböte sich, da dies eine starke Reaktion des körpereigenen Immunsystems bis hin zum septischen Schock zur Folge hätte (Heine et al. 2001). Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass ein LipidA-negativer Stamm von *Salmonella typhimurium* ohne toxische Effekte

im Mausmodell intravenös appliziert werden kann (Loeffler et al. 2007). Denkbar wäre deshalb ein Ausweichen auf einen solch attenuierten Stamm, um die Vorteile bakteriellen Drug Targetings weitergehend nutzen zu können und auch andere solide Tumoren auf diese Weise zu behandeln. Für einen fakultativen Anaerobier wie *S. typhimurium* scheint es ferner wahrscheinlich, dass er auch in hypoxischen Tumorebenen seine Wirkung entfalten würde, die gegenüber konventioneller Radio- oder Chemotherapie häufig resistent sind.

6.3 Entwicklung neuer Antikörper durch High-throughput-Screening von tcFv-Bibliotheken

Wenn *E. coli*-Zellen künftig dazu eingesetzt werden sollen, gezielt Tumoren anzu-steuern, so ist es zunächst notwendig, geeignete Antikörpersequenzen für das ge-wählte Antigen zu finden. Hierbei erweist sich die Expressionsstrategie über Autodis-play als ausgesprochen nützlich. Da auch die twin chain Fragmente ihre Funktionali-tät unter Beweis gestellt haben, kann man durch getrennte Variation der beiden vari-ablen Fragmente eine kombinatorische Bibliothek aufbauen. Im Gegensatz zum Phagendisplay lässt sich diese unmittelbar auf positive Varianten „screenen“, da die Bakterien die resultierenden tcFv nicht periplasmatisch exprimieren, sondern auf ih-rer Oberfläche präsentieren. Sie sind deshalb unmittelbar für eine Markierung mit dem korrespondierenden Antigen und anschließendes Durchmustern der Bibliothek beispielsweise mittels Durchflusszytometrie zugänglich.

Dieses Verfahren wurde exemplarisch am tumoralen Antigen GLEA2 getestet. Die-ses wurde im Institut für Humangenetik Homburg bei der Erforschung der Molekular-biologie des humanen Glioblastoms, einer der aggressivsten malignen Entartungen, durch die SEREX-Methodik identifiziert (Fischer et al. 2001). Obgleich bisherige For-schungen darauf hindeuten, dass es sich um ein kernständiges Protein handelt, wei-sen Patienten mit positiver Immunantwort eine erhöhte Lebenserwartung gegenüber seronegativen Patienten auf. Die Entwicklung eines neuen Antikörpers gegen GLEA2 ist deshalb mindestens aus diagnostischer Sicht von Interesse. Die Variation von V_H und V_L wurde an die Human Combinatorial Antibody Library angelehnt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich die CDR3 beider Ketten getrennt voneinander zufallsvari-iert. Beide Bibliotheksplasmide wurden dann wieder in einem Stamm vereint, um die

kombinatorischen tcFv zu erhalten. Hierbei wurde eine Bibliotheksgröße von ca. 4×10^5 erzielt, obgleich beide Bibliotheken für sich genommen bereits eine vergleichbare Dimension aufwiesen. Die erwartete Diversitätssteigerung durch den kombinatorischen Ansatz wurde durch den Transformationsschritt limitiert.

Die Bibliothek von tcFv-exprimierenden Zellen wurde im Folgenden auf Affinität zu einem Epitop des GLEA2 geprüft. Dieses Epitop wurde auf Basis theoretischer Werte für die Wahrscheinlichkeit von Oberflächenständigkeit und Antigenität der einzelnen Aminosäuren ermittelt. Nach mehrfacher durchflusszytometrischer Analyse konnte ein Klon identifiziert werden, der deutlich gesteigerte Bindung an das fluoreszenzmarkierte Epitop aufwies. Die Primärstruktur dieses tcFv konnte ohne große Mühe bestimmt werden, da hierzu nur die DNA der enthaltenen Plasmide sequenziert werden musste. Es zeigte sich, dass die angewendete Bibliotheksstrategie erfolgreich war.

Obgleich die Diversität der erstellten Bibliothek vergleichsweise gering war, gelang es, ein neues tcFv zu finden, das auf das gewählte GLEA2-Epitop anspricht. Es wurden bereits erste Untersuchungen zur Funktionalität des Fragments mit dem GFP-markierten tcFv-exprimierenden Stamm durchgeführt. Am Institut für Humangenetik in Homburg wird eine Glioblastozelllinie (T6575) kultiviert, die für diese Experimente genutzt wurde. Deckgläschen mit fixierten Zellen wurden hierzu mit Bakteriensuspension inkubiert. Als Kontrollstamm wurde *E. coli* UT5600(DE3) pKE19 verwendet, der nur GFP exprimiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Es zeigte sich, dass die Bakterien an die Zellkerne gebunden hatten, was als erster Beleg für die Funktionalität des neu erhaltenen tcFv gewertet werden kann (Abb. 6.2)

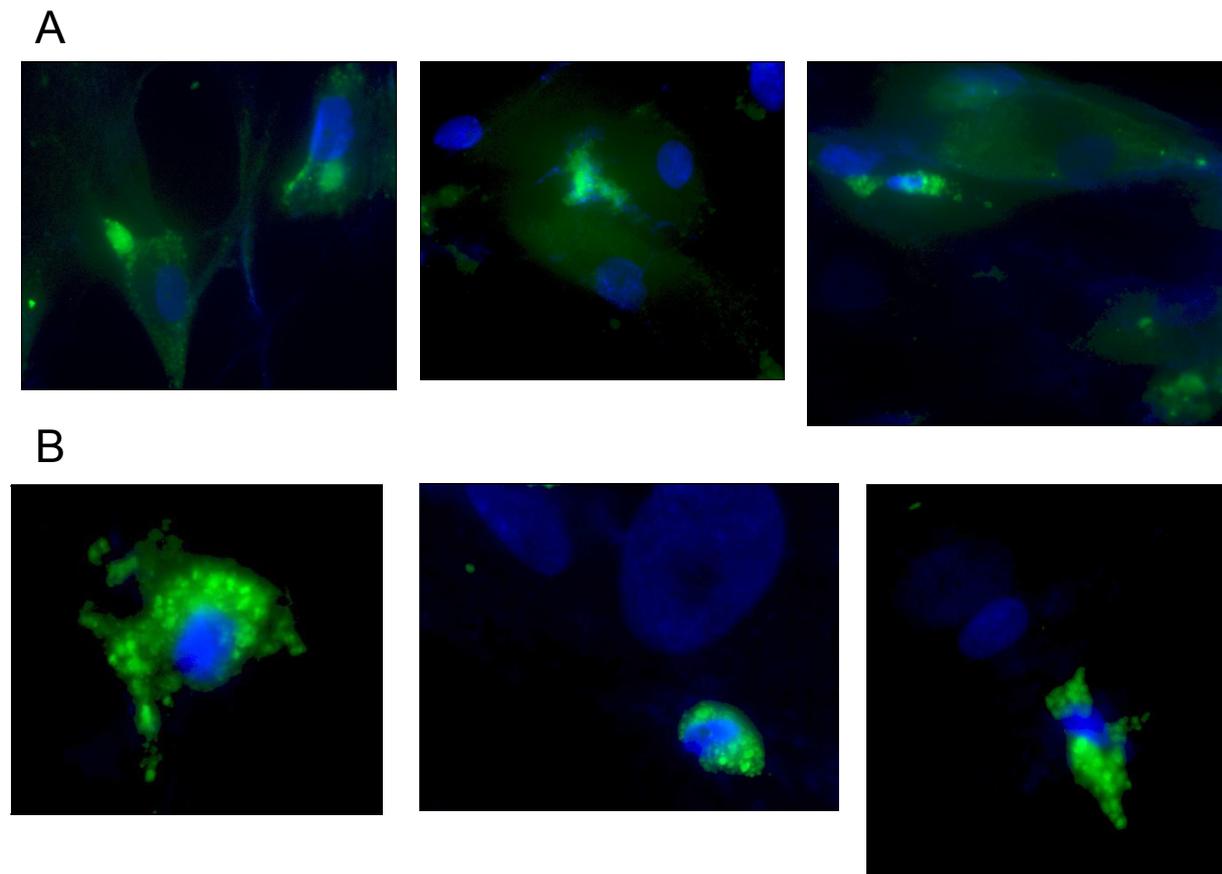


Abbildung 6.2: Bindung des positiven Bibliotheksklons 12 an GLEA2-exprimierende Tumorzellen

T6575-Zellen wurden fixiert, mit nach Standard-Prozedur angezogenen GFP-markierten Bakterien inkubiert und nach Waschen im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der Überlagerung von Aufnahmen im blauen und grünen Fluoreszenzkanal. Die eukaryontischen Zellkerne sind mit DAPI gefärbt.

A – T6575-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pKE19

B – T6575-Zellen mit *E. coli* UT5600(DE3) pFB008 + pFB015 (Klon12) + pKE19

Für künftige Bibliotheken ist eine noch weitergehende Anpassung an die HuCAL denkbar, die das menschliche Immunrepertoire nahezu optimal widerspiegelt (Knappik et al. 2000). Bisher wurde lediglich eine der drei CDR jeder variablen Domäne zufallsvariiert. So sollte es nach deutlicher Steigerung der Diversität möglich sein, die entwickelte Technologie zum Auffinden neuer Antikörper gegen vorgegebene Antigene einzusetzen. Die vielen Vorteile, die mit Phagendisplay verbunden sind, werden so ergänzt um die der zellulären Expression, die einen noch schnelleren und einfacheren Weg zu einem monoklonalen Antikörper humaner Sequenz ermöglichen, da der Umgang mit nicht selbstreplikativen Phagen entfällt.

In vitro-Antikörperselektionstechniken erfordern keine *in vivo*-Immunantwort und er-

möglichen deshalb die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen toxische, nicht immunogene oder instabile Proteine. Neben Phagendisplay und Autodisplay gibt es weitere derartige Selektionsstrategien zur Entdeckung neuer (humaner) Antikörpersequenzen (Hoogenboom 2005; Mondon et al. 2008). Beim Ribosomendisplay formieren Antikörperfragmente (bzw. andere Proteine) einen stabilen Komplex mit ihrer kodierenden mRNA (Lipovsek und Pluckthun 2004; Yan und Xu 2006). Für den Selektionsschritt ist hier wie beim Phagendisplay immobilisiertes Antigen vonnöten. Die mRNA affiner Hybride wird anschließend revers transkribiert und die erhaltene cDNA amplifiziert, um für den nächsten Selektionsschritt erneut transkribiert werden zu können. Diese Technologie wird auch für die Affinitätssteigerung von Antikörpern eingesetzt.

Hefendisplay ist ein zelluläres Expressionssystem, bei dem zufallsvariierte Proteine als Fusion mit dem wirtseigenen Aga2p auf der Hefenoberfläche exprimiert werden (Boder und Wittrup 1997). Hefen eignen sich aufgrund ihrer Größe wie Bakterien für die Hochdurchsatz-Methode FACS und ermöglichen so ein schnelles und effizientes Screening. Die erzielbaren Bibliotheksgrößen sind in der Regel geringer als für prokaryontische Systeme. Das Glykosilierungsmuster der erhaltenen Proteine differiert von dem des Menschen, was jedoch für Affinitätsuntersuchungen ohne Folgen bleiben sollte. Die bis heute niedrigste bekannte Dissoziationskonstante ($K_d=48$ fM) für ein gentechnisch manipuliertes Protein wurde für ein scFv berichtet, das mit dieser Technologie entwickelt wurde (Boder et al. 2000). Für das Targeting von Tumoren ist es jedoch nicht unbedingt erforderlich, derart hohe Affinitäten zu erreichen. Es kann sogar zum Nachteil gereichen, wenn dies zur Folge hat, dass das scFv nur die Tumorpheripherie erreicht (Adams et al. 2001).

Kürzlich wurde eine weitere Möglichkeit publiziert, Antikörpervarianten zu selektionieren (Mazor et al. 2007). Hierbei werden vollständige leichte und schwere IgG-Antikörperketten ins Periplasma von *E. coli* sezerniert, wo sie sich zu einem Antikörper zusammenlagern. Ein F_c -bindendes Protein, das in der inneren Membran verankert ist, bindet die Antikörper. Durch anschließende Permeabilisierung der äußeren Membran erhält man Sphäroplasten, die nun auf ihrer Oberfläche das IgG präsentieren. Sie sind wie Hefen und (vollständige) Bakterien durchflusszytometrischer Analyse zugänglich, was die Ermittlung positiver Varianten erleichtert. Eine Wiederanzucht

der Zellen ist aufgrund der fehlenden äußeren Membran allerdings nicht möglich, was den Aufwand für die folgenden Selektionsrunden erhöht. Am Ende des Prozesses stehen unglykolisierte sogenannte „E-clonal antibodies“.

6.4 Fazit und Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren ermöglicht die funktionelle Expression von Antikörperfragmenten mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli*. So manipulierte Bakterien können zum gezielten Ansteuern von tumoralem Gewebe genutzt werden, wenn dieses ein bestimmtes Antigen überexprimiert. Durch die Erstellung einer kombinatorischen Bibliothek von tcFv gelang es außerdem, einen neuen Antikörper zu entwickeln, der gegen ein vorgegebenes Tumorantigen gerichtet ist. Hierbei konnte dank der zellulären Expression eine Hochdurchsatz-Screening-Methode zum Einsatz gebracht werden, die das Auffinden positiver Varianten stark beschleunigt.

Das inhärente Potenzial dieser Technologie umfasst aber nicht nur die effiziente Entwicklung neuer Antikörper gegen nahezu beliebige Antigene. Bakterienzellen könnten künftig auch einen Beitrag in der Tumordiagnostik und -therapie leisten. Diese Ideen erfordern noch sehr viel weitere Forschungsarbeit, um einmal zur Marktreife gebracht werden zu können. Die Vorteile, die mit ihnen verbunden sind, lassen diesen Aufwand aber gerechtfertigt erscheinen.

7 Literaturverzeichnis

- Adams GP et al. (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res* 61:4750-4755
- Allen TM (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2:750-763
- Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35:425-445
- Benz I, Schmidt MA (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57:1506-1511
- Benz I, Schmidt MA (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 6:1539-1546
- Bird RE et al. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423-426
- Blank I (2006) Krebsfrüherkennung mit Tumormarker. *Deutsche Apotheker Zeitung* 146:2960-2964
- Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10701-10705
- Boder ET, Wittrup KD (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 15:553-557
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113
- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312:643-646
- Brekke OH, Sandlie I (2003) Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2:52-62
- Bruell D et al. (2003) The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line. *Int J Oncol* 23:1179-1186
- Carballeira N, Nazabal M, Brito J, Garcia O (1990) Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB8, useful in the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 9:276-281
- Carelle N, Piotto E, Bellanger A, Germanaud J, Thuillier A, Khayat D (2002) Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer* 95:155-163
- Chan SK, Gullick WJ, Hill ME (2006) Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer -- search and destroy. *Eur J Cancer* 42:17-23
- Chao YP, Wen CS, Wang JY (2004) A facile and efficient method to achieve LacZ overproduction by the expression vector carrying the thermoregulated promoter and plasmid copy number. *Biotechnol Prog* 20:420-425

- Charbonneau ME, Mourez M (2007) Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* 189:9020-9029
- Chari RV (2008) Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res* 41:98-107
- Cole ST, Bremer E, Hindennach I, Henning U (1982) Characterisation of the promoters for the ompA gene which encodes a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 188:472-479
- Coley WB (1991) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*:3-11
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20:448-455
- Dalgleish A, Pandha H (2007) Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines. *Adv Cancer Res* 96:175-190
- Daugherty PS, Chen G, Olsen MJ, Iverson BL, Georgiou G (1998) Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng* 11:825-832
- Daugherty PS, Iverson BL, Georgiou G (2000) Flow cytometric screening of cell-based libraries. *J Immunol Methods* 243:211-227
- Daugherty PS, Olsen MJ, Iverson BL, Georgiou G (1999) Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein Eng* 12:613-621
- De Cian A et al. (2008) Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* 90:131-155
- del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:434-464
- Di Lorenzo G et al. (2002) Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8:3438-3444
- Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA (2008) Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev*
- Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55:836-839
- Engel K (2006) Untersuchungen zur Rolle der äußeren Membranproteine bei der Adhärenz von *Helicobacter pylori*, München.
- Fietz T, Thiel E (2007) Antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: the role of rituximab, 90Y-ibritumomab tiuxetan, and alemtuzumab. *Recent Results Cancer Res* 176:153-163
- Fischer P et al. (1999) Platelet-reactive IgG antibodies cloned by phage display and panning with IVIG from three patients with autoimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 105:626-640

- Fischer U, Struss AK, Hemmer D, Pallasch CP, Steudel WI, Meese E (2001) Glioma-expressed antigen 2 (GLEA2): a novel protein that can elicit immune responses in glioblastoma patients and some controls. *Clin Exp Immunol* 126:206-213
- Francisco JA, Campbell R, Iverson BL, Georgiou G (1993a) Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10444-10448
- Francisco JA, Earhart CF, Georgiou G (1992) Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2713-2717
- Francisco JA, Stathopoulos C, Warren RA, Kilburn DG, Georgiou G (1993b) Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Biotechnology (N Y)* 11:491-495
- Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA (2000) Targeted toxins. *Clin Cancer Res* 6:326-334
- Garnett MC (2001) Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev* 53:171-216
- Ghetie V, Ward ES (2000) Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol* 18:739-766
- Giard DJ et al. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51:1417-1423
- Green LL et al. (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 7:13-21
- Grodberg J, Dunn JJ (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170:1245-1253
- Hamblett KJ et al. (2004) Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res* 10:7063-7070
- Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182:288-292
- Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, Day J, Greenwood A, McPherson A (1992) The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature* 360:369-372
- Heine H, Rietschel ET, Ulmer AJ (2001) The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol* 19:279-296
- Held D, Yaeger, K, Novy, R (2004) pCOLADuet-1, a lower copy, KanR vector option for coexpression in *E. coli*. *inNovations* 19:17-19
- Henderson IR, Nataro JP (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69:1231-1243
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:692-744

- Holliger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23:1126-1136
- Holzgrabe U (2007) An old drug as a carcinostatic. The new career of thalidomide. *Pharm Unserer Zeit* 36:446-449
- Hoogenboom HR (2002) Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol* 178:1-37
- Hoogenboom HR (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23:1105-1116
- Horn U et al. (1996) High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:524-532
- Huerta S et al. (2007) Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF. *J Surg Res* 142:184-194
- Huston JS et al. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5879-5883
- Jameson BA, Wolf H (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* 4:181-186
- Janeway C, Travers, P, Walport, M (2002) *Immunologie*, 5. Auflage.
- Johnson G, Wu TT (2000) Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res* 28:214-218
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321:522-525
- Jose J (2006) Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:607-614
- Jose J, Bernhardt R, Hannemann F (2001) Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *Chembiochem* 2:695-701
- Jose J, Betscheider D, Zangen D (2005) Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Anal Biochem* 346:258-267
- Jose J, Handel S (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *Chembiochem* 4:396-405
- Jose J, Jahnig F, Meyer TF (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* 18:378-380
- Jose J, Kramer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178:107-110
- Jose J, Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:600-619

- Jose J, von Schwichow S (2004a) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chem-biochem* 5:491-499
- Jose J, von Schwichow S (2004b) "Cystope tagging" for labeling and detection of recombinant protein expression. *Anal Biochem* 331:267-274
- Jose J, Zangen D (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1218-1226
- Jung HC, Lebeault JM, Pan JG (1998) Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat Biotechnol* 16:576-580
- Kabat EA, Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., Foeller, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91
- Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF (1994) Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15:42-52
- Kim S, Ikeuchi K, Byrn R, Groopman J, Baltimore D (1989) Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9544-9548
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1990) Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *Embo J* 9:1991-1999
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *Embo J* 11:2327-2335
- Klenk J, Rapp K, Buchele G, Keil U, Weiland SK (2007) Increasing life expectancy in Germany: quantitative contributions from changes in age- and disease-specific mortality. *Eur J Public Health* 17:587-592
- Knappik A et al. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (Hu-CAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296:57-86
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37:239-253
- Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497
- Konthur Z, Hust M, Dubel S (2005) Perspectives for systematic in vitro antibody generation. *Gene* 364:19-29
- Kontsekova E, Kontsek, P (2003) Monoclonal antibodies as tools for structural, functional and evolutionary analyses of protein. *Biologia* 58:307-312
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, King CR (1987) Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *Embo J* 6:605-610
- Kushi LH et al. (2006) American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 56:254-281; quiz 313-254

- Kuus-Reichel K, Grauer LS, Karavodin LM, Knott C, Krusemeier M, Kay NE (1994) Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin Diagn Lab Immunol* 1:365-372
- Kyritsis AP, Saya H (1993) Epidemiology, cytogenetics, and molecular biology of brain tumors. *Curr Opin Oncol* 5:474-480
- Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer TF (2000) Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I auto-transporter. *J Bacteriol* 182:3726-3733
- Lei SP, Lin HC, Wang SS, Callaway J, Wilcox G (1987) Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol* 169:4379-4383
- Levitzki A (2003) EGF receptor as a therapeutic target. *Lung Cancer* 41 Suppl 1:S9-14
- Lin WC, Desiderio S (1995) V(D)J recombination and the cell cycle. *Immunol Today* 16:279-289
- Lipovsek D, Pluckthun A (2004) In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J Immunol Methods* 290:51-67
- Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, Reed JC (2007) Attenuated *Salmonella* engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12879-12883
- Maihle NJ et al. (2002) EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 107:247-258
- Mamot C, Rochlitz C (2006) Targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR)--a new therapeutic option in oncology? *Swiss Med Wkly* 136:4-12
- Maurer J (1998) Typ IV Sekretion: Charakterisierung des Proteinexports durch den Autotransporter AIDA-I in *Escherichia coli*, Tübingen
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:794-804
- Mazor Y, Van Blarcom T, Mabry R, Iverson BL, Georgiou G (2007) Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 25:563-565
- McCafferty J (1996) Phage display of peptides and proteins: A laboratory manual. Academic Press
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348:552-554
- Minino AM, Heron MP, Murphy SL, Kochanek KD (2007) Deaths: final data for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 55:1-119
- Mirick GR, Bradt BM, Denardo SJ, Denardo GL (2004) A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 48:251-257
- Misra D, Seo PH, Cohen HJ (2004) Aging and cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2:457-465

- Mondon P, Dubreuil O, Bouayadi K, Kharrat H (2008) Human antibody libraries: a race to engineer and explore a larger diversity. *Front Biosci* 13:1117-1129
- Morea V, Tramontano A, Rustici M, Chothia C, Lesk AM (1998) Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. *J Mol Biol* 275:269-294
- Muller D, Benz I, Tapadar D, Buddenborg C, Greune L, Schmidt MA (2005) Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* 73:3851-3859
- Murthy U, Basu A, Rodeck U, Herlyn M, Ross AH, Das M (1987) Binding of an antagonistic monoclonal antibody to an intact and fragmented EGF-receptor polypeptide. *Arch Biochem Biophys* 252:549-560
- Mutschler E, Geisslinger, G, Kroemer, HK, Schaefer-Korting, M (2001) *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1:841-845
- Neye H (2006) Ximab, Zumab und Umab als Arzneimittel. *Pharmazeutische Zeitung*
- Novy R, Yaeger, K, Held, D (2002) Coexpression of multiple target proteins in *E. coli*. *inNovations* 15:2-6
- O'Connor R, Clynes M, Dowling P, O'Donovan N, O'Driscoll L (2007) Drug resistance in cancer - searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3:805-817
- Oomen CJ, van Ulsen P, van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* 23:1257-1266
- Osei AK (2002) Superantigen-like interaction of IVIG with antibody Fab fragments cloned by phage display technology.
- Pagano L, Fianchi L, Caira M, Rutella S, Leone G (2007) The role of Gemtuzumab Ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia patients. *Oncogene* 26:3679-3690
- Pallasch CP et al. (2005) Autoantibodies against GLEA2 and PHF3 in glioblastoma: tumor-associated autoantibodies correlated with prolonged survival. *Int J Cancer* 117:456-459
- Panchagnula R, Dey CS (1997) Monoclonal antibodies in drug targeting. *J Clin Pharm Ther* 22:7-19
- Pantoliano MW et al. (1991) Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30:10117-10125
- Paschke M (2006) Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:2-11
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325:458-462
- Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108:945-956

- Qiu XQ, Wang H, Cai B, Wang LL, Yue ST (2007) Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. *Nat Biotechnol* 25:921-929
- Rajewsky K (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381:751-758
- Robert-Koch-Institut (2006) Krebs in Deutschland- Häufigkeiten und Trends, 5. Auflage. In:
- Robinson BW et al. (1998) Cytokine gene therapy or infusion as treatment for solid human cancer. *J Immunother* (1997) 21:211-217
- Roccaro AM, Vacca A, Ribatti D (2006) Bortezomib in the treatment of cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 1:397-403
- 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
- Said SM, Hahn J, Koops S, Puschel K (2007) [How reliable are our cancer statistics? Cancer cases in Hamburg's autopsy material]. *Dtsch Med Wochenschr* 132:2067-2070
- Saiki RK et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183-232
- Sambrook J, Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York
- Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5:147-159
- Schultheiss E, Paar, C., Schwab, H., Jose, J. (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *J. Mol. Catal.:*89-97
- Seydel U et al. (2003) The generalized endotoxic principle. *Eur J Immunol* 33:1586-1592
- Sharma SK, Bagshawe KD, Begent RH (2005) Advances in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 6:611-615
- Shepherd FA et al. (2005) Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353:123-132
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59:223-239
- Shirai H, Kidera A, Nakamura H (1996) Structural classification of CDR-H3 in antibodies. *FEBS Lett* 399:1-8
- Silverstein AM, Jovanovich, H.B. (1988) A history of immunology. 1-383
- Skerra A, Pluckthun A (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240:1038-1041
- Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317

- Spohn R, Gombert FO, Jung G (1992) B-cell epitopes of the Nef protein. *Res Virol* 143:70-72
- St Geme JW, 3rd, Cutter D (2000) The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol* 182:6005-6013
- Strauss A, Gotz F (1996) In vivo immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Mol Microbiol* 21:491-500
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60-89
- Sutherland MS et al. (2006) Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. *J Biol Chem* 281:10540-10547
- Thurber GM, Zajic SC, Wittrup KD (2007) Theoretic criteria for antibody penetration into solid tumors and micrometastases. *J Nucl Med* 48:995-999
- Tipton KF (1994) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. *Eur J Biochem* 223:1-5
- Tomassen J (2007) Biochemistry. Getting into and through the outer membrane. *Science* 317:903-904
- Tonegawa S (1988) Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 8:3-26
- Vaupel JW, von Kistowski, K.G. (2005) The notable increase of life expectancy and its influence on medicine. *Bundesgesundheitsblatt* 48:586-592
- Veiga E, de Lorenzo V, Fernandez LA (1999) Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol* 33:1232-1243
- Veiga E, De Lorenzo V, Fernandez LA (2003) Neutralization of enteric coronaviruses with *Escherichia coli* cells expressing single-chain Fv-autotransporter fusions. *J Virol* 77:13396-13398
- Verhoeyen ME, Windust, J. H. C. (1996) Advances in antibody engineering
- Verma N, Kumar K, Kaur G, Anand S (2007) L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Crit Rev Biotechnol* 27:45-62
- VFA (2007) Zulassungen für gentechnisch hergestellte Arzneimittel (Verband der forschenden Arzneimittelhersteller). <http://www.vfa.de/de/forschung/am-entwicklung/amzulassungen-gentec.html>
- Wang W, El-Deiry WS (2008) Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol* 20:90-96
- Wernerus H, Stahl S (2004) Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* 40:209-228
- WHO (1997) Guidelines on the use of international nonproprietary names (INNs) for pharmaceutical substances.
- Williams AF, Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6:381-405

-
- Williams M, Roeth JF, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Nef domains required for disruption of major histocompatibility complex class I trafficking are also necessary for coprecipitation of Nef with HLA-A2. *J Virol* 79:632-636
- Wu C et al. (2007) Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 25:1290-1297
- Yan X, Xu Z (2006) Ribosome-display technology: applications for directed evolution of functional proteins. *Drug Discov Today* 11:911-916
- Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG (2001) Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 38:17-23
- Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52:3402-3408
- Zverev VV, Khmel IA (1985) The nucleotide sequences of the replication origins of plasmids ColA and ColD. *Plasmid* 14:192-199

8 Anhang

8.1 Wichtige Antikörpersequenzen dieser Arbeit

8.1.1 Sequenz von scFv112

Gezeigt ist die DNA-Sequenz von pFB006 und die Translation bis zum Ende der für scFv112 kodierenden Sequenz. Framework Regions sind grün, complementarity determining regions blau und der Peptidspacer gelb gekennzeichnet.

```

1 ATGGTTAAAT TAAAATTTGG TGTTTTTTTT ACAGTTTAC TATCTTCAGC
  M V K L K F G V F F T V L L S S A
51 ATATGCACAT GAAACACCTT CTAGAAAAAT TGTGCTGACT CAGTTTCCAC
  Y A H E T P S R K I V L T Q F P L
101 TCTCCCTGCC TGTCAGTCTT GGAGATCAAG TCTCCATCTC TTGCAGATCT
  S L P V S L G D Q V S I S C R S
151 AGTCAGAGCA TTGTACATAG TAATGGAAAC ACCTATTTAG AATGGTACCC
  S Q S I V H S N G N T Y L E W Y P
201 ACAGAAACCA GGCCAGTCTC CAAAGCTCCT GATCTACAAA GTTTCCAACC
  Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R
251 GATTTTCTGG GGTCCTGAC AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGGACAGAT
  F S G V P D R F S G S G S G T D
301 TTCACACTCA AGATCAGCAG TGTGGAGGCT GAGGATCTGG GAGTTTATTA
  F T L K I S S V E A E D L G V Y Y
351 CTGCTTTCAA GGTTACATG TTCCATTAC GTTCGGCTCG GGGACCAAGC
  C F Q G S H V P F T F G S G T K L
401 TGGAGCTGAA ACGGGGTGGT GGTGGTTCTG GTGGTGGTGG TTCTGGCGGC
  E L K R G G G G S G G G G S G G
451 GCGGCTCCT GTGGTGGTGG ATCCCAGGTG CAGCAATCTG GGGCTGAACT
  G G S C G G G S Q V Q Q S G A E L
501 GGTGAAGCCT GGGGCTTCAG TGAAGCTGTC CTGCAAGGCT TCTGGCTACA
  V K P G A S V K L S C K A S G Y T
551 CCTTCACCAG CTACTGGATA CACTGGGTGA AGCAGAGGCC AGGACAAGGC
  F T S Y W I H W V K Q R P G Q G
601 CTTGAGTGGA TTGGAGAGAT TAATCCTAGC AACGGTCGTA CTA ACTACAA
  L E W I G E I N P S N G R T N Y N
651 TGAGAAGTTC AAGACCAAGG CCACACTGAC TGTAGACAAA TCCTCCAGCA
  E K F K T K A T L T V D K S S S T
701 CAGCCTACAT GCAACTCAAC AGCCTGACAT CTGAGGACTC TGCGGTCTAT
  A Y M Q L N S L T S E D S A V Y
751 TACTGTGCAA GAGAACCAAC TGGGACGGGA ATATACTTCG ATGTCTGGGG
  Y C A R E P T G T G I Y F D V W G
801 CGCAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCG
  A G T T L T V S S

```

8.1.2 Sequenz von scFv425

Gezeigt ist die DNA-Sequenz von pFB001 und die Translation bis zum Ende der für scFv425 kodierenden Sequenz. Framework Regions sind grün, complementarity determining regions blau und der Peptidspacer gelb gekennzeichnet.

```

1 ATGGTTAAAT TAA AATTTGG TGT TTTT TTTT ACAGTTT TAC TATCTTCAGC
  M V K L K F G V F F T V L L S S A
51 ATATGCACAT GAAACACCTT CTAGAGACTA CAAAGACGAA GTGCAACTGC
  Y A H E T P S R D Y K D E V Q L Q
101 AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GTGAAGCCTG GGGCTTCAGT GAAGTTGTCC
  Q S G A E L V K P G A S V K L S
151 TGCAAGGCTT CCGGCTACAC CTT CACCAGC CACTGGATGC ACTGGGTGAA
  C K A S G Y T F T S H W M H W V K
201 GCAGAGGGCT GGACAAGGCC TTGAGTGGAT CGGAGAGTTT AATCCCAGCA
  Q R A G Q G L E W I G E F N P S N
251 ACGGCCGTAC TAACTACAAT GAGAAATTCA AGAGCAAGGC CACCCTGACT
  G R T N Y N E K F K S K A T L T
301 GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG CAACTCAGCA GCCTGACATC
  V D K S S S T A Y M Q L S S L T S
351 TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCCAG TCGGGACTAT GATTACGACG
  E D S A V Y Y C A S R D Y D Y D G
401 GACGGTACTT TGACTACTGG GGCCAAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCCTCA
  R Y F D Y W G Q G T T V T V S S
451 GGTGGCGGTG GCTCGGGCGG TGGTGGGTCG GGTGGTGGCG GATCTGACAT
  G G G G S G G G G S G G G G S D I
501 CGAGCTCACC CAGTCTCCAG CAATCATGTC TGCATCTCCA GGGGAGAAGG
  E L T Q S P A I M S A S P G E K V
551 TCACTATGAC CTGCAGTGCC AGCTCAAGTG TAACTTACAT GTATTGGTAC
  T M T C S A S S S V T Y M Y W Y
601 CAGCAGAAGC CAGGATCCTC CCCCAGACTC CTGATTTATG ACACATCCAA
  Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N
651 CCTGGCTTCT GGAGTCCCTG TTCGTTTCAG TGGCAGTGGG TCTGGGACCT
  L A S G V P V R F S G S G S G T S
701 CTTACTCTCT CACAATCAGC CGAATGGAGG CTGAAGATGC TGCCACTTAT
  Y S L T I S R M E A E D A A T Y
751 TACTGCCAGC AGTGGAGTGG TCACATATTC ACGTTCGGCT CGGGGACAGA
  Y C Q Q W S G H I F T F G S G T E
801 ACTCGAGATC AAACGG
  L E I K R

```

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AIDA-I	Adhesin involved in diffuse adherence
aph	Gen für Aminoglykosidphosphotransferase (Kanamycin-Resistenz)
B	C, G oder T (nicht A)
bla	Gen für β -Laktamase (Ampicillin-Resistenz)

C	Cytosin
CDC	complement-dependent cytotoxicity
CDR	complementarity determining region
CTB	Choleratoxin B Untereinheit
D	A, G oder T (nicht C)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	fragment antigen-binding (antigenbindendes Fragment)
FC	fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
FP	Fusionsprotein
FR	framework region
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
H	A, C oder T (nicht G)
h	Stunde
HAMA	human anti-mouse antibody
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanolsulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
K	T oder G (Ketogruppe)
kDa	Kilodalton (10 ³ g/mol)
LB	Luria-Bertani
M	C oder A (Aminogruppe)
MCS	multiple cloning site
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OM	outer membrane (äußere Zellmembran)
OmpA	Outer membrane protein A, Protein der äußeren Zellmembran von <i>E. coli</i>
OmpT	Outer membrane protein T, Protease der äußeren Zellmembran von <i>E. coli</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Purinbase (A oder G)
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	G oder C (strong, starke Wechselwirkung)
scFv	single-chain variable fragment
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
T	Thymin
tcFv	twin-chain variable fragment
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-propandiol
V	A, C oder G (nicht T)
W	A oder T (weak, schwache Wechselwirkung)
X/N	A, C, G oder T
Y	Pyrimidinbase (C oder T)

8.3 Firmenverzeichnis

Firma	Standort	Land	URL
Becton-Dickinson	Heidelberg	Deutschland	www.bd.com
Eppendorf	Hamburg	Deutschland	www.eppendorf.de
Fermentas	St.Leon-Rot	Deutschland	www.fermentas.com
GLSChina	Shanghai	China	www.glschina.com
Hamamatsu	Herrsching	Deutschland	www.hamamatsu.com
Hettich	Kirchlengern	Deutschland	www.hettich.com
Invitrogen	Carlsbad	USA	www.invitrogen.com
Merck	Darmstadt	Deutschland	www.merck.de
Millipore	Billerica	USA	www.millipore.com
NEB	Frankfurt am Main	Deutschland	www.neb.com
Peqlab	Erlangen	Deutschland	www.peqlab.de
Qiagen	Hilden	Deutschland	www1.qiagen.com
Roth	Karlsruhe	Deutschland	www.carl-roth.de
Sigma-Aldrich	München	Deutschland	www.sigma-aldrich.com
Thermo Biosciences	Waltham	USA	www.thermo.com
Zeiss	Jena	Deutschland	www.zeiss.de

8.4 Publikationen

Poster

Blasshofer F, Jose J, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (4. - 7. Oktober 2006), Marburg, Autodisplay of variable fragments of different antibodies in *Escherichia coli*.

Blasshofer F, Klotz LO, Sauerbier E, Jose J, Frontiers in Medicinal Chemistry (18. - 21. März 2007), Tumour cell targeting by cells of *E. coli* displaying functional single chain and "twin chain" antibody fragments against EGFR.

Kurzvorträge

Doktorandentagung (6. - 8. September 2006), Heroldsberg. Oberflächenexpression funktioneller Antikörperfragmente in *Escherichia coli*.

Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses (22. Juni 2007), Düsseldorf, Targeting von Tumorzellen durch *E. coli*.

Manuskripte

Blasshofer F, Jose J, Autodisplay of functional single-chain and “twin-chain” variable antibody fragments in *Escherichia coli*.

Blasshofer F, Jose J, Klotz LO, Tumour cell targeting by cells of *Escherichia coli* displaying functional single-chain and “twin chain” variable antibody fragments against EGFR.