

Analytische Chemie

**Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente für die
Immun-PCR und Aufklärung der Primärstruktur der
Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Shiela Srivastav
aus Viersen

2007

Dekan: Prof. Dr. E. Hahn
Erster Gutachter: Prof. Dr. K. Cammann
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Klempnauer
Tag der mündlichen Prüfungen: 23.02.2007, 28.02.2007, 09.03.2007
Tag der Promotion: 09.03.2007

Meinen Eltern

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	3
3	EINLEITUNG	6
3.1	Antikörper	6
3.1.1	Funktion und Struktur von Antikörpern	6
3.1.2	Rekombinante Antikörperfragmente	8
3.2	Immun-PCR	11
3.3	PCR-ELISA	13
3.4	Humanes H-FABP	16
3.5	Tumormarker Carcinoembryonales Antigen (CEA)	17
3.6	Maltosephosphorylase	19
4	ZIELE DER ARBEIT	22
5	EXPERIMENTELLER TEIL	23
5.1	Geräte und Materialien	23
5.1.1	Geräte	23
5.1.2	Materialien	25
5.1.3	Wasseraufbereitung	32
5.1.4	Kulturmedien	32
5.1.5	Standardpuffer	33
5.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	34
5.2.1	Allgemeine Methoden	34
5.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
5.2.1.2	DNA-Elektrophorese	35
5.2.1.3	Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen	36
5.2.1.4	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	36
5.2.1.5	Reinigung von DNA durch Filterblattdialyse	37
5.2.1.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	37
5.2.1.7	Transformationstechniken	38
5.2.1.8	Stammhaltung von Bakterienkulturen	40
5.2.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
5.2.1.10	Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit	40
5.2.1.11	Doppelstrangsequenzierung	41
5.2.1.12	Elektronische Verarbeitung von Sequenzdaten	42
5.2.1.13	Sondenherstellung durch Biotinylierung von DNA	42

5.2.1.14	Southern Blot-Analyse	43
5.2.1.15	Sicherheitsbestimmungen	44
5.2.2	Spezielle Methoden: rekombinante Antikörper	44
5.2.2.1	Isolierung von RNA aus Hybridomzellen	44
5.2.2.2	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	45
5.2.2.3	PCR zur Amplifikation von V _H - und V _L -Sequenzen.....	45
5.2.2.4	Modifikation des Expressionsvektors pASK84-D1,3 zur F _{ab} -Produktion.....	47
5.2.2.5	<i>Splice Overlap Extension</i> (SOE)-PCR zur Amplifikation von scF _v -Fragmenten	48
5.2.2.6	PCR zur Amplifikation von scF _v -Fusions-Fragmenten.....	49
5.2.2.7	Modifikation des Expressionsvektors pASK84-D1,3 zur scF _v -Produktion	50
5.2.2.8	Anzucht und Expression rekombinanter Antikörperfragmente	51
5.2.3	Spezielle Methoden: Kern-Streptavidin	51
5.2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Streptomyces avidinii</i>	51
5.2.3.2	PCR zur Amplifikation von Kern-Streptavidin-Sequenzen (CSav)	52
5.2.3.3	Erzeugung eines pET3c abgeleiteten Expressionsvektors zur CSav-Produktion	53
5.2.3.4	Anzucht und Expression des rekombinanten Kern-Streptavidins (CSav).....	53
5.2.4	Spezielle Methoden: PCR-ELISA	54
5.2.4.1	PCR zur Reamplifikation von PCR-ELISA-Proben.....	54
5.2.4.2	Reverse Hybridisierung	55
5.2.5	Spezielle Methoden: Maltosephosphorylase	56
5.2.5.1	Anzucht und morphologische Charakterisierung von <i>Lactobacillus brevis</i>	56
5.2.5.2	Isolierung genomischer DNA aus <i>Lactobacillus brevis</i>	56
5.2.5.3	PCR zur Sequenzanalyse des Maltosephosphorylase-Gens (<i>mapA</i>).....	57
5.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden.....	59
5.3.1	Allgemeine Methoden	59
5.3.1.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	59
5.3.1.2	Western-Blot.....	59
5.3.1.3	MALDI-TOF	60

5.3.2	Spezielle Methoden: rekombinante Antikörperfragmente	61
5.3.2.1	Periplasmatische Isolierung von Antikörperfragmenten	61
5.3.2.2	ELISA zur Detektion rekombinanter F _{ab} -IT1-Antikörperfragmente	62
5.3.2.3	ELISA zur Detektion rekombinanter F _{ab} -Lysozym-Antikörperfragmente	62
5.3.2.4	ELISA zur Detektion rekombinanter scF _v -IT1-Antikörperfragmente	63
5.3.3	Spezielle Methoden: Kern-Streptavidin	63
5.3.3.1	Aufarbeitung und Renaturierung des rekombinanten Kern-Streptavidins (CSav)	63
5.3.3.2	Detektion funktionellen, rekombinanten Kern-Streptavidins (CSav)	63
6	ERGEBNISSE	65
6.1	Klonierung und heterologe Expression rekombinanter Antikörperfragmente	65
6.1.1	Rekombinante Antikörperfragmente aus Tumor-Hybridoma der monoklonalen Antikörper IT-1 3B8/E6 und IT-1 3B8 gegen humanes H-FABP	65
6.1.1.1	Isolierung von RNA und Amplifikation von IT-1 3B8/E6 V _H - und V _L -Sequenzen	65
6.1.1.2	Analyse des parentalen Klons IT-1 3B8 zur Verifizierung der IT-1 3B8/E6 V _H - und V _L -Sequenzen	69
6.1.1.3	Aminosäuresequenzen der V _H - und V _L -Regionen des mAK IT-1 3B8/E6	71
6.1.1.4	Konstruktion des Vektors pASKIT1 zur heterologen Expression rekombinanter IT-1 F _{ab} -Fragmente	73
6.1.1.5	Isolierung und Detektion rekombinanter IT-1 Antikörperfragmente aus dem Periplasma	75
6.1.1.6	Etablierung eines ELISA-Verfahrens zur Detektion rekombinanter IT-1 Antikörperfragmente	77
6.1.1.7	Detektion rekombinanter Anti-Lysozym-F _{ab} -Fragmente als interne Kontrolle	82
6.1.1.8	Expressionsanalyse rekombinanter Anti-Lysozym- F _{ab} -Fragmente	85
6.1.1.9	<i>Splice Overlap Extension</i> (SOE)-PCR zur Amplifikation von scF _v -Fragmenten	88

6.1.1.10	Klonierung des Vektors pASKscFvIT1 zur heterologen Expression rekombinanter IT1 scF _v -Fragmente	91
6.1.1.11	Detektion rekombinanter IT1 scF _v -Fragmente	93
6.1.2	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper CEA2-4.4 und CEA3-55.4 gegen carcinoembryonales Antigen	97
6.1.2.1	Isolierung von RNA und Amplifikation von CEA3-55.4 und CEA2-4.4-V _H - und -V _L - Sequenzen	97
6.2	Klonierung und heterologe Expression von Kern-Streptavidin (CSav) in <i>E. coli</i>	102
6.2.1	Klonierung des Expressionsvektors pETCS	103
6.2.2	Expression und Aufreinigung von Kern-Streptavidin (CSav)	107
6.2.3	Funktioneller Nachweis von Kern-Streptavidin (CSav)	108
6.3	Optimierung eines PCR-ELISA-Verfahrens zur Detektion von Reporter-DNA aus der Immun-PCR	110
6.4	Bestimmung der Nukleotidsequenz der Maltosephosphorylase aus <i>Lactobacillus brevis</i>	116
6.4.1	Auswahl der Oligonukleotide zur Amplifikation des 3'-Terminus des Maltosephosphorylase-Gens (<i>mapA</i>) durch taxonomische Homologievergleiche	116
6.4.2	Auswahl der Oligonukleotide zur Amplifikation des 3'-Terminus des Maltosephosphorylase-Gens (<i>mapA</i>) durch Röntgenstrukturanalysen	122
6.4.3	Bestimmung der molekularen Masse der Maltosephosphorylase von <i>Lactobacillus brevis</i> durch MALDI-TOF	131
7	DISKUSSION	133
7.1	Klonierung und heterologe Expression rekombinanter Antikörperfragmente	133
7.2	Klonierung und heterologe Expression von Kern-Streptavidin (CSav) in <i>E. coli</i>	141
7.3	Optimierung eines PCR-ELISA-Verfahrens zur Detektion von Reporter-DNA aus der Immun-PCR	142
7.4	Bestimmung der Nukleotidsequenz der Maltosephosphorylase aus <i>Lactobacillus brevis</i>	143
8	LITERATURVERZEICHNIS	148

1 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
bp	Basenpaar
β -PGM	β -Phosphoglucomutase
Bio	Biotin
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
CDR	complementarity determining regions
CEA	Carcinoembryonales Antigen (engl.: carcinoembryonic antigen)
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunassay (engl.: enzyme linked immunosorbent assay)
F _{ab}	Antikörperfragment bestehend aus V _H , C _{H1} , V _L , C _L (engl.: fragment antigen binding)
F _v	Antikörperfragment bestehend aus V _H , V _L (engl.: fragment antigen binding)
FPLC	Schnellauflösende Flüssigkeitschromatographie (engl.: fast performance liquid chromatography)
H-FABP	Herz-Fettsäurebindungsprotein (engl.: heart fatty acid binding protein)
ICB	Institut für Chemo- und Biosensorik
IMAC	Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (engl.: immobilised metal ion affinity chromatography)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kb	Kilobasen
LB-Medium	Nährmittel nach Luria und Bertani
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of Flight
<i>mapA</i>	Maltosephosphorylase-Gen
MCS	Multi Cloning Site
MP	Maltosephosphorylase
Ni-NTA	Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: open reading frame)

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PGM	Phosphoglucomutase
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure (engl: ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl: rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
scF _v	Antikörper-Fragment, bestehend aus V _H und V _L , die über einen Polypeptidlinker miteinander verknüpft sind (engl.: single chain fragment variable)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SOE-PCR	Splice overlap PCR
ssDNA	einzelsträngig (engl.: single strand)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ULISA	Ultra sensitive multianalyte immunoassay based on DNA sensor
V _H	variable Region der schweren Kette
V _L	variable Region der leichten Kette

2 Zusammenfassung

Immunoassays werden heutzutage vielfach zur Detektion von Biomolekülen in der medizinischen Diagnostik, der Umwelt- und Nahrungsmittelanalytik eingesetzt. Insbesondere im klinischen Bereich ist ein stetig anwachsendes Interesse an der Verwendung ultrasensitiver und gleichzeitig spezifischer Immunoassays zu verzeichnen. Diese Anforderungen werden durch die Immun-PCR-Methode erfüllt, bei der anstelle eines Enzyms ein Reporter-DNA-Fragment an den Detektor-Antikörper gebunden wird. Durch die Kopplung des ELISA-Verfahrens mit der *in vitro*-Amplifikation der an den Antikörper gebundenen Reporter-DNA kann das Amplifikat anschließend durch DNA-Nachweismethoden, wie z.B. PCR-ELISA detektiert werden.

Im Rahmen des von der EU geförderten Projektes BE 97-428 *Ultra-sensitive Multianalyte Immunoassay based on DNA-Sensor* (ULISA) wurden monoklonale Antikörper gegen humanes H-FABP (*heart-fatty acid binding protein*) und CEA (carcinoembryonales Antigen) untersucht. Zur Charakterisierung der Antikörper wurde in der vorliegenden Arbeit die Primärstruktur der Antigenbindungsregionen aufgeklärt und rekombinante Antikörperfragmente funktionell exprimiert. Zu diesem Zweck wurden aus monoklonalen Antikörpern der Hybridomzelllinien IT1-3B8/E6 (gegen humanes H-FABP) und CEA 2-4.4 und CEA 3-55.4 die codierenden Bereiche revers transkribiert, die variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Ketten amplifiziert und sequenziert.

Die variablen Regionen des monoklonalen anti-H-FABP-Antikörpers IT1 wurden zur funktionellen Expression rekombinanter F_{ab} -Antikörperfragmente im Periplasma von *Escherichia coli* in den Expressionsvektor pASK84 kloniert. Dieser beinhaltet bereits die konstanten Regionen der schweren und leichten Kette im korrekten Leserahmen und erleichtert durch die Kopplung eines His-Tags an die konstante Region der schweren Kette die Aufreinigung des F_{ab} -Fragmentes durch immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Funktionelle F_{ab} -Fragmente wurden mittels eines adaptierten ELISA-Verfahrens detektiert. Da die Ausbeute rekombinanten Proteins gering war und keine direkte Vergleichsmöglichkeit zu den monoklonalen Antikörpern bot, wurde das Expressions- und Aufreinigungsverfahren überprüft. Dazu wurde der Literatur-beschriebene Expressionsvektor pASK84 D-1,3 zur Expression eines anti-Lysozym- F_{ab} -Fragmentes eingesetzt. Durch erfolgreiche Expression und Aufreinigung wurden methodische Verfahrensfehler ausgeschlossen. Offenbar bedingen sequenzspezifische Faltungsprobleme, bzw. der Codon-Gebrauch die geringe Ausbeute rekombinanter F_{ab} -Fragmente. Zur Absicherung der V_H - und V_L -Sequenzen des F_{ab} -Fragmentes IT1 3B8/E6 wurde der parentale Hybridomzellklon IT1 3B8 zur Validierung herangezogen. Dabei wies einer der untersuchten Amplifikate eine hohe

Homologie zu einem kürzlich beschriebenen, nicht-produktiven V_H -Gen auf, welches durch Austausch einer Region entsteht, die stromaufwärts eines dafür charakteristischen Heptanukleotid-Motivs lokalisiert ist.

Zur Herstellung rekombinanter *single chain* Antikörperfragmente (scF_v) des mAK IT1 3B8/E6 wurden die Amplifikate der variablen Regionen zur *overlap*-PCR eingesetzt. Dabei war zu beobachten, dass die Amplifikation des Linkerpeptid-Bereiches einer hohen Mutationsrate unterliegt. Zur Expression in *Escherichia coli* wurde das korrekt amplifizierte scF_v -Fragment in den pET20b-Vektor kloniert. Aufgrund der massiven Bildung von Einschlusskörpern blieb ein Nachweis funktionellen Proteins, sowie eine Detektion via His-Tag versagt. Aus diesem Grund wurde das pASK-Expressions- und Aufreinigungsverfahren auch zur Herstellung von scF_v -Fragmenten angepasst. Neben dem zur IMAC erforderlichen His-Tag bietet der neue Vektor pASKscFvIT1 durch die Fusion eines c-myc-Tags mit dem scF_v -Fragment eine weitere Detektionsmöglichkeit. Er schafft ferner die Voraussetzungen zum Einzelaustausch von V_H - und V_L -Fragmenten, wodurch das Problem einer wiederholten, mutationsanfälligen *overlap*-PCR des Linkerpeptid-Bereiches zur Generation eines scF_v -Fragmentes gelöst wird. Zudem ermöglicht der Klonierungs- und Expressionsvektor pASKscFvIT1 die Insertion eines weiteren Gens. Hier sollte die Insertion des Kern-Streptavidin-Gens zur optionalen Expression eines scF_v -Streptavidin-Fusionsproteins vorbereitet werden. Funktionelles Kern-Streptavidin wurde nach Amplifikation und Klonierung in den pET3c-Vektor cytosolisch in *Escherichia coli* exprimiert und renaturiert.

Weiterer Bestandteil des ULISA-Projektes war die Optimierung und der Vergleich verschiedener DNA-Nachweismethoden zur Detektion der *in vitro*-Amplifikate der Reporter-DNA aus der Immun-PCR. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck ein PCR-ELISA-Verfahren optimiert. Die reverse Hybridisierung bietet eine sensitive Nachweismöglichkeit, die in einem Zeitraum von 5 min, bei 37°C (Hybridisierungsoptimum 50°C), bei einer Sondenkonzentration von 0,4 pmol/well die sichere Identifizierung von 5 ng/well des PCR-Produktes zulässt. Die Spezifität konnte durch Ausschluss von Kreuzreaktivitäten mit weiteren getesteten Sonden bestätigt werden.

Disaccharidphosphorylasen finden Anwendungsmöglichkeiten in verschiedenen quantitativen Analytikverfahren. Sie katalysieren unter Verbrauch von *ortho*-Phosphat die Spaltung glykosidischer Bindungen, woraus die Bildung von Glucose-1-phosphat und eines Monosaccharids resultieren. In unserer Arbeitsgruppe war auf dieser Grundlage ein sensitiver Nachweis von *ortho*-Phosphat für die Umweltanalytik entwickelt worden. Die zu dieser Enzymklasse gehörenden Maltosephosphorylasen zeichnen sich durch ihre hohe Substratspezifität aus. Im Rahmen eines Projektes zur Entwicklung eines 3-Enzym-Biosensorsystems ist der Einsatz der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* von

zentraler Bedeutung. Für das Verständnis des molekularen Mechanismus der Katalyse ist es wichtig, die räumliche Struktur des Enzyms aufzuklären. Erst durch Kenntnis der Primärstruktur wird eine Interpretation röntgenkristallographischer Strukturdaten ermöglicht. Proteinchemische Analysen und Homologievergleiche mit Maltosephosphorylasen taxonomisch nah verwandter Mikroorganismen führten zur Auswahl von Primern, durch welche zunächst die sequenzielle Amplifikation von ca. 72% des Maltosephosphorylase-Gens erzielt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, zwei bisher unaufgeklärte, überlappende DNA-Fragmente des codierenden Bereiches der Maltosephosphorylase zu amplifizieren und nach Klonierung eine Nukleotidsequenz zu ermitteln, die ca. 98,5% des nativen Maltosephosphorylase-Gens umfasst. Die Aufklärung des 3'-Terminus durch inverse PCR konnte im Rahmen der Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr erfolgen. Durch MALDI-TOF konnte die molekulare Masse genau bestimmt werden. Daraus ließ sich ableiten, dass sich weitere 10-12 Aminosäuren am C-Terminus der Maltosephosphorylase befinden. Somit konnten die röntgenkristallographischen Untersuchungen interpretiert und die Tertiärstruktur der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis* bestimmt werden.

3 Einleitung

3.1 Antikörper

3.1.1 Funktion und Struktur von Antikörpern

Das Immunsystem (lat.: *immunis* = frei, verschont, unberührt) dient dem Schutz des Organismus vor eindringenden, schädlichen Substanzen. Antikörper oder Immunglobuline sind lösliche Glykoproteine, die bei der humoralen Immunantwort Fremdstoffe erkennen und binden. Wenn ein körperfremdes Molekül durch seine Bindung eine Immunantwort auslöst, so nennt man dieses im physiologischen Zusammenhang Immunogen. Bindet das körperfremde Makromolekül gezielt an einen Antikörper, so bezeichnet man es als Antigen. Der Antikörper erkennt nur eine definierte Stelle des Antigens, die antigene Determinante oder das Epitop. Die spezifische Antigenbindungsstelle des Antikörpers nennt man Paratop. Die Affinität beschreibt die Bindungsstärke einer einzelnen Kontaktstelle. Die Wechselwirkungen mehrerer, unabhängiger Bindungsstellen zwischen Antikörpern und Antigenen wird als Avidität bezeichnet.

Die Sezernierung der Antikörper erfolgt aus einer Klasse weißer Blutzellen, d.h. zu Effektorzellen differenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen. Diese treten im Blut sowie in der extrazellulären Gewebeflüssigkeit auf (Stryer *et al.* 2003, Dübel *et al.* 2004). Bei Säugetieren unterscheidet man fünf verschiedene Immunglobulinklassen (Isotypen) (Kuby, 1997), die sich hinsichtlich ihrer Funktion, Größe, Aminosäurezusammensetzung (Roitt *et al.*, 1991) und ihrer Serumkonzentration unterscheiden. Das Immunglobulin M (IgM) wird oftmals zuerst gebildet und indiziert die akute Infektionsphase. Das IgM zeichnet sich durch seine Pentamer-Struktur und damit durch eine hohe Anzahl an Bindungsstellen aus. Die jeweiligen Anteile sind durch *Joining*-Peptide miteinander verbunden. Immunglobulin A (IgA) ist vor allem in den Sekreten der Bronchien, des Darms, des Urogenitaltraktes so wie im Speichel und in den Tränen lokalisiert und dient der Erkennung der Antigene von Viren und Bakterien. In der Nähe der Brustwarzen wird das IgA ebenfalls sezerniert und dient dem Schutz des Neugeborenen vor Pathogenen. Beim Kontakt mit Parasiten stimuliert das Immunglobulin E (IgE) die Mastzellen zur Histamin-Freisetzung, welches die Kontraktion der glatten Muskulatur, die Erweiterung der Gefäße und Schleimsekretion zur Folge hat. Das IgE nimmt allerdings auch eine Schlüsselfunktion bei allergischen Reaktionen ein. Die Funktion von Immunglobulin D (IgD) ist noch nicht aufgeklärt. Die höchste Konzentration im Serum weist das Immunglobulin G (IgG) auf.

Zur strukturellen Aufklärung des IgG wurde von Porter 1959 erstmals ein begrenzter, proteolytischer Verdau durchgeführt. Nach Spaltung mit Papain wird der Antikörper in drei Fragmente gespalten. Zwei der Fragmente binden das Antigen und werden daher als F_{ab}-Fragmente bezeichnet. Das dritte Fragment kristallisiert bereitwillig und wird somit F_c-Fragment genannt. Dieser Teil erfüllt eine Effektorfunktion, indem durch die Auslösung einer Komplementkaskade die Lyse oder Phagozytose der Zielzellen ausgelöst wird (Stryer *et al.* 2003, Dübel *et al.* 2004). Oberhalb des F_c-Fragmentes befindet sich eine Gelenkregion (*Hinge* Region). Diese ermöglicht dynamische Bindungen separater Moleküle desselben Antigens durch die F_{ab}-Fragmente (Searle *et al.*, 1995). Das IgG besteht aus multiplen Polypeptidketten, zwei identischen, leichten Ketten (25 kDa) und zwei identischen schweren Ketten (50 kDa) (Edelman und Poulik, 1961, Porter, 1962), die über kovalente Disulfidbrücken verbunden sind. Bei den leichten Ketten werden die Typen kappa (κ) und lambda (λ) unterschieden. Die Immunglobulin-Isotypen bestimmen die Nomenklatur der schweren Ketten, die in α , γ , δ , ϵ und μ differenziert werden (Clark, 1995). Systematische, interne Homologien der Aminosäuresequenzen lassen den Schluss zu, dass leichte und schwere Ketten sich aus unterschiedlichen Domänen zusammensetzen (Edelman, 1970). Man unterscheidet variable Domänen (V-Regionen), die in der Aminosäureabfolge stark voneinander abweichen. Die V-Region ist bei allen Immunglobulinen N-terminal lokalisiert (Poljak *et al.*, 1973, Kabat *et al.*, 1977, Kabat, 1978). Jede leichte Kette weist jeweils eine variable V_L-region auf, jede schwere Kette eine V_H-Region. An diese schließen sich konstante Regionen (C-Regionen) an. Die leichten Ketten besitzen eine C-Region (C_L), die schweren Ketten drei C-Regionen (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) (Deisenhofer *et al.*, 1976). Bei der Immunglobulinfaltung nehmen alle zwölf Domänen eine β -Faltblattstruktur ein. In den V-Regionen bilden die *Framework*-Regionen (FR1-FR3) die charakteristische Struktur, aus der drei exponierte Schleifen, die hypervariablen Regionen (CDRs, *complementary determining regions*) ragen (Wu und Kabat, 1970, Wu und Kabat, 1971). Die dreidimensionale Struktur des Immunglobulins G wurde durch Harris *et al.* (1992) beschrieben und ist schematisch in Abbildung 3.1 gezeigt.

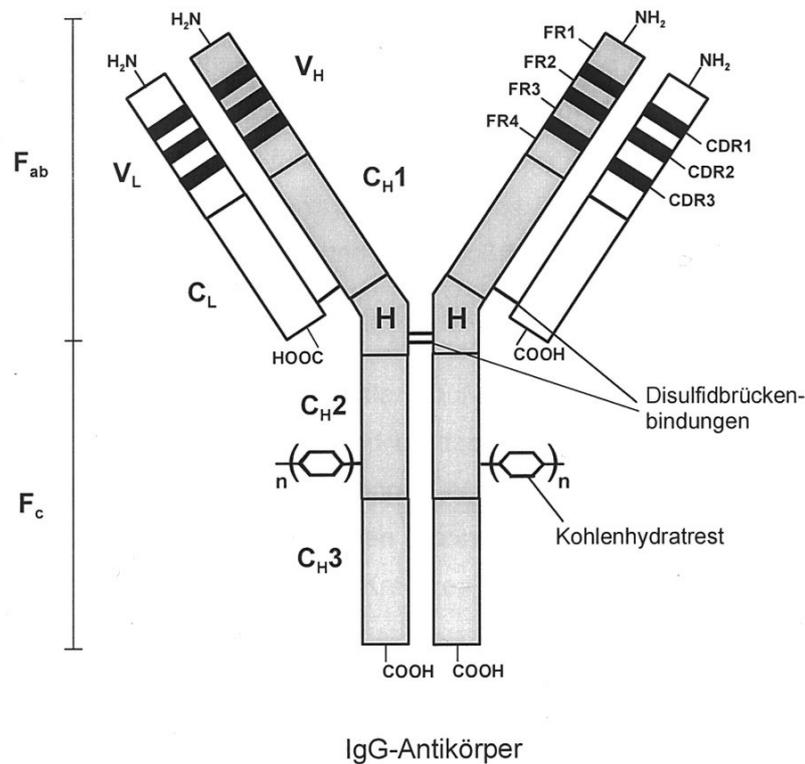


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des IgG-Antikörpers (Schmengler, 2000, nach Breitling und Dübel, 1997)

CDR = *complementarity determining region*; FR = *framework region*; H = *hinge region*.

3.1.2 Rekombinante Antikörperfragmente

Durch die selektiven Bindungseigenschaften von Antikörpern sind diese in verschiedensten technischen Applikationen von Bedeutung und werden in der Grundlagenforschung, in der Diagnostik und der medizinischen Therapeutik eingesetzt. Bei der Antikörperproduktion wird zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern unterschieden. Nach Immunisierung von Säugetieren werden polyklonale Antikörper aus dem Serum gewonnen. Monoklonale Antikörper weisen eine homogene Bindungsspezifität auf und können gezielter eingesetzt werden (Huse, 1992). Sie werden durch die Hybridom-Zell-Technik (Köhler und Milstein, 1975) gewonnen. Durch die Fusion einer antikörperproduzierenden B-Zell-Population mit Myelomzellen wird eine Zellproliferation erreicht, die monoklonale Antikörper in größeren Mengen verfügbar macht (Neuberger, 1983, Oi *et al.*, 1983, Ochi *et al.*, 1983). Die Hybridom-Zell-Technik ist jedoch auch Limitierungen ausgesetzt, da sie einer aufwendigen Technologie bedarf. Anfängliche Versuche ganze Antikörper in Mikroorganismen, wie Bakterien (Better

und Horwitz, 1989) und Hefen zu produzieren, erwiesen sich als schwierig, da die korrekte Proteinfaltung, Ausbildung der Disulfidbrückenbindungen und die heteromere Assoziation schwerer und leichter Ketten erreicht werden musste (Cabilly *et al.*, 1984, Boss *et al.*, 1984, Wood *et al.*, 1985). Beim therapeutischen Einsatz monoklonaler Antikörper beinhaltet der konstante Teil noch murine Proteinbestandteile, was zu Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem führen kann. Unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren, kann die konstante Region durch die von humanen Antikörpern ersetzt werden (Jones *et al.*, 1986, Riechmann *et al.*, 1988, Verhoeyen *et al.*, 1988, Queen *et al.*, 1989, Shalaby *et al.*, 1992, Tempest *et al.*, 1991, Co *et al.*, 1991, Maeda *et al.*, 1991, Kettleborough *et al.*, 1991). Die Produktion humanisierter Antikörper erfolgt in Hamster-Ovarial-Zellkulturen. Sie ist sehr aufwendig und wesentlich teurer, als die Produktion speziell designter Antikörperfragmente in Mikroorganismen (Dübel *et al.*, 2004). Die Expression kleinerer Antikörperfragmente führt zudem zu einer wesentlich höheren Anzahl korrekt gefalteter Moleküle. Für die Expression rekombinanter Antikörperfragmente wurden lymphoide Säugetierzellen (Neuberger *et al.*, 1984, Schnee *et al.*, 1987, Sharon *et al.*, 1984, Liu *et al.*, 1987, Morrison, 1985, Sun *et al.*, 1987, Boulianne *et al.*, 1984, Morrison *et al.*, 1984), Tabakpflanzen (Hiatt *et al.*, 1989) und mit *Baculovirus* infizierte Insektenzellen (Hasemann und Capra, 1990) eingesetzt.

F_{ab}-Fragmente können biochemisch durch proteolytischen Verdau hergestellt werden. Sie besitzen die gleichen Bindungseigenschaften wie intakte Antikörper, und durch die konstante Region wird das Molekül stabilisiert. Die Herstellung rekombinanter F_{ab}-Fragmente wurde Anfang der 90er Jahre etabliert und eröffnet viele Modifikationsmöglichkeiten und somit auch eine Optimierung der Einsatzmöglichkeiten (Better *et al.*, 1988, Bird und Walker, 1991, Anand *et al.*, 1991, Cattani *et al.*, 1995, Clark *et al.*, 1997, Hudson *et al.*, 1998). Zur Expression von F_{ab}-Fragmenten in *E. coli* werden die Gensequenzen für die V_H- und V_L-Fragmente in einen geeigneten Vektor kloniert. Denn für die korrekte Faltung des Antikörperfragmentes muss dieses vom stark reduzierenden Zytoplasma der Zelle in den oxidierenden periplasmatischen Raum zwischen innerer und äußerer Bakterienmembran transportiert werden. Der Transport wird durch ein N-terminal des F_{ab}-Fragmentes lokalisiertes *Leader*-Peptid (z.B. pelB, phoA oder ompA) ermöglicht (Carter *et al.*, 1992, Skerra und Plückthun, 1988, Skerra, 1993, Skerra, 1994, Somerville *et al.*, 1994).

Eine weitere, rekombinante DNA-Technik wird zur Produktion von *single chain*-Fragmenten (scF_v) eingesetzt. Die V_H- und V_L-Ketten sind dabei über einen Polypeptidlinker miteinander verknüpft. Es wurde eine Vielzahl an Linkern designed (Takkinen *et al.*, 1991, Pantoliano *et al.*, 1991, Tang *et al.*, 1996, Turner *et al.*, 1997, Robinson und Sauer, 1998, Hennecke *et al.*, 1998). Der gebräuchlichste Linker ist ein flexibles (Gly₄Ser)₃ Dekapentapeptid (Huston *et al.*, 1988, Nicholls *et al.*, 1993, Alfthan *et al.*, 1995). Eine schematische Darstellung der rekombinanten Antikörperfragmente zeigt die Abbildung 3.2. Um die Avidität der scF_v-

Fragmente zu steigern, werden Dimere oder *diabodies* (Dall'Acqua und Carter, 1998), Trimere (*triabodies*) (Atwell *et al.*, 1999) und auch tetravalente *tetrabodies* (LeGall *et al.*, 1999) generiert.

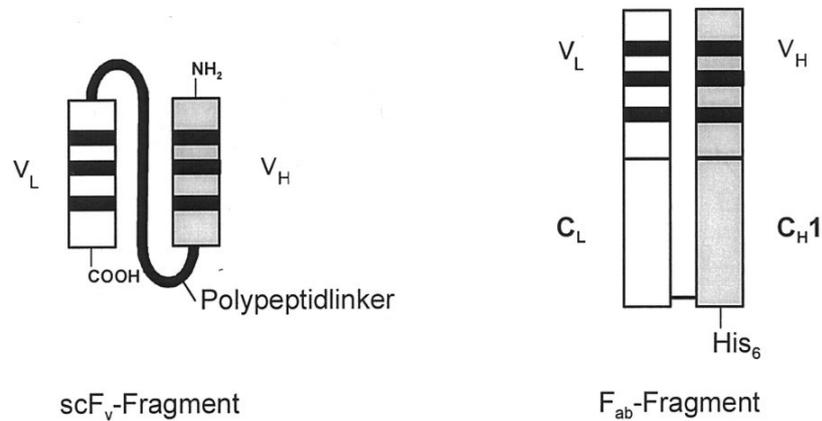


Abb. 3.2 Schematische Darstellung von rekombinanten scF_v- und F_{ab}-Fragmenten (Schmengler, 2000, nach Breitling und Dübel, 1997)

Das scF_v-Fragment besitzt einen N- oder C-terminalen Histidin-Tag.

Es wurde auch der Einsatz von F_v-Fragmenten, bei denen V_H- und V_L-Fragmente über Disulfidbrücken verknüpft sind, beschrieben (Almog *et al.*, 1998, Jäger und Plückthun, 1999). Eine bemerkenswerte Entdeckung war, dass bei kamelartigen Spezies, wie Kamelen, Lamas, Alpacas aber auch Haien, Antikörper produziert werden, die nur eine einzelne, hochaffine V_H-Kette beinhalten. Die Antigenbindung erfolgt nur durch die drei CDR-Schleifen (Decanniere *et al.*, 1999). Vermutlich stellt dabei die Größe der Schleife die kritische Komponente dar, die durch eine Disulfidbrücke in Form einer intramolekularen Schleife stabilisiert wird. Eine erste Adaptation erfolgte durch die Produktion einer humanisierten V-ähnlichen Domäne (Nuttall *et al.*, 1999). Um die Aufreinigungsmöglichkeiten rekombinanter Antikörperfragmente zu optimieren, können chimäre Proteine exprimiert werden. Weit verbreitet ist die Fusion von F_{ab}, F_v oder scF_v-Fragmenten mit einem Poly-Histidin-Schwanz (Molloy *et al.*, 1995). Weiterhin wurde das Peptid c-myc (Evan *et al.*, 1985) oder octa-Peptid FLAG Sequenzen (Hopp *et al.*, 1988) zur Detektion und Aufreinigung rekombinanter Antikörperfragmente eingesetzt. Für diverse diagnostische oder therapeutische Applikationen werden diese Moleküle auch mit Antikörpern, Enzymen oder anderen Peptid-Liganden verknüpft. Die Kopplung von Antikörperfragmenten mit Avidin oder Streptavidin bietet auf Grund der hochaffinen Bindung biotinylierter Agentien viele Einsatzmöglichkeiten. Um diese Produkte herzustellen, werden chemische Verfahren und auch Rekombinationstechniken zur Expression der Fusionsproteine in bakteriellen Systemen

eingesetzt (Sano *et al.*, 1992, Dübel *et al.*, 1995, Kipriyanov *et al.*, 1995, Kipriyanov *et al.*, 1996, Kipriyanov *et al.*, 1997, Pearce *et al.*, 1997, Li *et al.*, 1999).

3.2 Immun-PCR

In der Erforschung molekularer Hintergründe von Krankheiten bedarf es Techniken, die den Nachweis von Marker-Molekülen ermöglichen. Es werden Methoden entwickelt, die hohe Sensitivität mit schnellen, robusten und kosteneffizienten Verfahren kombiniert und sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der Routinediagnostik einsetzbar sind (Niemeyer *et al.*, 2005). Eine der am weitest verbreiteten Techniken zur sensitiven Detektion biologischer und klinisch signifikanter Marker ist die Immunanalytik (Diamandis *et al.*, 1996). Unterschiedlichste immunochemische Methoden wie Radioimmunassays (RIA) (Julesz, 1976), *flow injection* Immunanalytik (FIIA), fiberoptische Immunsensoren (Schobel *et al.*, 2000), optische Immunsensoren (Rabbany *et al.*, 1994) oder amperometrische Immunsensoren (Ivnitski und Rishpon, 1996, Meusel *et al.*, 1995, O'Daly *et al.*, 1992, Yao und Rechnitz, 1988) sind etabliert. Von besonderer Bedeutung sind die *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) (Engvall und Perlman, 1971), die, außer den medizinischen Applikationen, Anwendung in der Umwelt-, sowie in der Lebensmittelanalytik finden (Hennion und Barcelo, 1998, Harris, 1999, Gonzalez-Martinez *et al.*, 1999, Martlbauer, *et al.*, 1994, Jenks *et al.*, 1997). Um die Nachweisempfindlichkeit zu steigern, werden fluoreszierende Substrate und Lumineszenzfarbstoffe eingesetzt (Gudgin *et al.*, 1995). Dennoch wird das Verfahren durch die Signalamplifikation limitiert (Niemeyer und Blohm, 1996). Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis *et al.*, 1986) ermöglicht eine nahezu exponentielle Amplifikation von Nukleinsäuren, wodurch sehr kleine Mengen einer Ziel-DNA durch einfache Labormethoden detektiert und quantifiziert werden können (Saiki *et al.*, 1985).

Die Immun-PCR kombiniert die Vielseitigkeit des ELISA-Verfahrens mit der Effizienz und Sensitivität der PCR (Sano *et al.*, 1992, Baumler *et al.*, 1997, Case *et al.*, 1997) (Abb. 3.3). Die Nachweisgrenze wird, im Vergleich zum ELISA-Verfahren, um ein 100-10000-faches verbessert (Niemeyer *et al.*, 2005), weswegen das Immun-PCR-Verfahren für die extrem sensitive Detektion diverser Antigene eingesetzt wird (Sanna *et al.*, 1995, Kakizaki *et al.*, 1996).

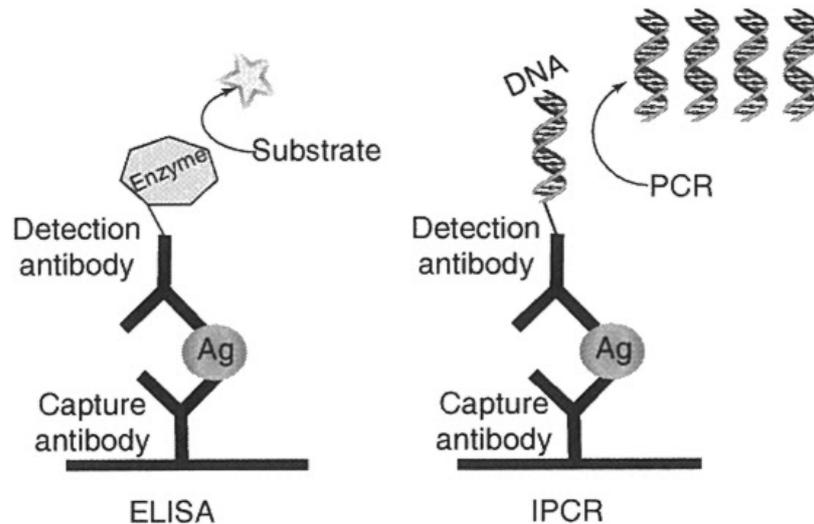


Abb. 3.3 Schematischer Vergleich von ELISA-Formates und Immun-PCR (Niemeyer et al., 2005)

Beim ELISA erfolgt die enzymatische Umsetzung eines Substrates zu einem detektierbaren Produkt. Bei der Immun-PCR (IPCR) wird ein Antikörper-DNA-Konjugat eingesetzt. Nach Amplifikation des DNA-Markers, wird das PCR-Produkt quantifiziert. *Capture antibody* = Fänger-Antikörper; *Ag* = Antigen; *Detection antibody* = Detektor-Antikörper.

In der Arbeit von Sano *et al.* (1992) wird zur Immun-PCR ein rekombinantes Fusionsprotein aus Protein A und Streptavidin als Linker zwischen Detektor-Antikörper und DNA-Marker eingesetzt. Protein A ist ein Membranbestandteil von *Staphylococcus aureus* und bindet selektiv an die F_c -Region des eingesetzten IgG-Detektor-Antikörpers. Streptavidin ist ein Proteintetramer (60 kDa), welches von *Streptomyces avidinii* produziert wird. Es bindet bis zu vier Biotin-Moleküle mit einer extrem hohen Affinität und Spezifität (Dissoziationskonstante $K_d \sim 10^{-15}M$) (Chalet und Wolf, 1964, Green, 1975, Wilchek und Bayer, 1989, Weber *et al.*, 1989). Das chimäre Protein A-Streptavidin-Fusionsprodukt wird in zahlreichen Immun-PCR-Verfahren als Linker eingesetzt (Quijada *et al.*, 1997, Ke und Warner, 2000, McElhinny *et al.*, 1998, McElhinny *et al.*, 2000, Ren *et al.*, 2001). Der Detektor-Antikörper, der Linker und die Marker DNA werden in einem stöchiometrischen Verhältnis gemischt. Dieses Format kann daher nicht in einem Sandwich-Format (Abb. 3.3), sondern nur bei direkten Immun-PCR-Assays angewendet werden, bei denen das Antigen nicht durch einen Fänger-Antikörper präsentiert wird.

Ruzicka *et al.* (1993) verwendete einen Ansatz, bei dem *in situ* biotinylierte, doppelsträngige DNA und ein biotinylierter Detektor-Antikörper über Avidin gekoppelt wurden. Die Reproduzierbarkeit und damit die Qualität des *in situ*-Verfahrens ist nicht optimal (Sano, 1993) und durch die erforderlichen, sukzessiven Inkubationsschritte sehr langwierig

(Crowther, 1995). Trotzdem war es die meist verwendete Methode (Zhou *et al.*, 1993, Maia *et al.*, 1995, Mweene *et al.*, 1996, Niemeyer *et al.*, 1997, Chang und Huang, 1997, Ren *et al.*, 2000).

Alternativ kann die DNA vorab direkt, kovalent an den Antikörper gebunden werden (Sperl *et al.*, 1995, Hendrickson *et al.*, 1995, McKie *et al.*, 2002, Sims *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2001, McKie *et al.*, 2002 (2), Henterich *et al.*, 2003). Die Antikörper werden jedoch oftmals durch die Bedingungen der chemischen Kopplung und der chromatografischen Aufreinigung in Mitleidenschaft gezogen. Ungekoppelte DNA oder Antikörper führen auch zur Reduktion der Signalintensität des Immun-PCR-Assays (Niemeyer *et al.*, 2005). Die Herstellung rekombinanter Antikörper oder Antikörperfragmente, die als Fusionsproteine exprimiert werden können, eröffnen eine unbegrenzte Fülle an Kombinationsmöglichkeiten. So wurden *single chain*-Antikörper (scF_v) mit Kernstreptavidin als Fusionsprotein exprimiert (Dübel *et al.*, 1994, Spooner *et al.*, 1994, Pearce *et al.*, 1997). Zusätzlich können diese zur Multiplex-Detektion verschiedener Antigene eingesetzt werden (Burbulis *et al.*, 2005, Takeda *et al.*, 2004, Lovrinovic *et al.*, 2003, Joerger *et al.*, 1995). Die kompetitive Co-Amplifikation eines DNA-Markers fungiert als interner Standard und steigert somit die Sensitivität und Präzision der Immun-PCR (Adler *et al.*, 2003).

3.3 PCR-ELISA

Zu den fundamentalen Kriterien eines neuen diagnostischen Testsystems gehören die Vertrauenswürdigkeit der Ergebnisse und die hohe Spezifität und Sensitivität des Nachweises. Weiterhin muss eine einfache Handhabung der Methode gewährleistet und das Verfahren muss kostengünstig sein, um den neuen Test in der Routinediagnostik zu etablieren. Die verwendeten Substanzen dürfen zudem weder für den Anwender, noch für die Umwelt eine Gefahr darstellen (Powell, 1987). Das PCR-Verfahren ist eine weit verbreitete Methode zur schnellen, sensitiven und spezifischen Detektion infektiöser Agentien. Die Verlässlichkeit der Methode wurde in vielen Studien in der Forschung und in der Routinediagnostik eingesetzt (Van Belkum und Niesters, 1995). Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt konventionell durch Agarose-Gelelektrophorese, gefolgt von Ethidiumbromid-Färbung und stellt eine schnelle und einfache Methode zur Visualisierung großer Amplikonmengen dar. Kleine Mengen amplifizierter DNA können jedoch oftmals gar nicht oder nur mit sehr schwachem Signal nachgewiesen werden, da die Sensitivität der Färbung mit Ethidiumbromid nicht ausreicht (Lichtinghagen *et al.*, 1994, Shawar *et al.*, 1993). Eine weitere Anforderung stellt die korrekte Amplifikation dar. Häufig treten unspezifische PCR-Nebenprodukte auf (O'Callaghan *et al.*, 1994). Die korrekten PCR-Produkte können

durch Hybridisierungsverfahren wie Southern Blot oder Dot Blot selektiert werden. Allerdings sind diese Methoden sehr zeitaufwendig und es kann nur eine sehr begrenzte Probenanzahl untersucht werden (Canepari *et al.*, 1994, Lehman *et al.*, 1995, Xia *et al.*, 1995, Roymans *et al.*, 1996). Die DNA-Chip-Technologie bietet die Möglichkeit gleichzeitig eine Vielzahl von DNA-Sequenzen in komplexen Nukleinsäuregemischen zu identifizieren. Dabei werden Sonden in einem geordneten Raster (array) in hoher Dichte auf einem DNA-Chip immobilisiert und werden daher auch als DNA-Mikroarrays bezeichnet (Flotho, 2005). Es wurden Arrays mit über 250000 Sonden oder 10000 unterschiedliche cDNAs pro cm² produziert (Lipschutz *et al.*, 1999). Der Auftrag der Oligonukleotide erfolgt durch lichtgesteuerte chemische Synthesen, die durch lichtgesteuerte Mikrofabrikationstechniken durchgeführt werden (Stryer, 2003). Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von *High-Speed* Robotern, durch die DNA-Sonden auf silanisierte Oberflächen aufgebracht werden. Die Sonden werden kovalent an reaktive Amine, Aldehyde oder Epoxidgruppen gebunden (Lettieri, 2006). Ein großes Einsatzgebiet ist die molekulare Toxikologie. Nachdem Zellen oder Gewebe toxischen Substanzen ausgesetzt wurden, wird die Genexpression analysiert. Dabei wird mRNA revers transkribiert und die resultierende fluoreszenzmarkierte cDNA im DNA-Array hybridisiert. Die hybridisierten Moleküle können anschließend fluorometrisch detektiert werden (DeRisi *et al.*, 1996, Lashkari *et al.*, 1997, Schena *et al.*, 1995). Über spezielle Bioinformatik-Software und Datenbankanalyse werden die Rohdaten ausgewertet. Auf diese Weise können Induktion und Repression der Genexpression, die Relevanz von Molekülen in biochemischen Stoffwechselfvorgängen und auch "genetische Signaturen" über SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) untersucht werden (Lettieri, 2006).

Neben der parallelen Detektion zahlreicher Sequenzen in komplexen Nukleinsäuregemischen bietet das PCR-ELISA-Verfahren für definierte Fragestellungen die immunoenzymatische Bestimmung ganz spezifischer PCR-Produkte und die einfache Analyse der Ergebnisse mittels eines ELISA-Readers. Dies ermöglicht eine parallele Detektion mit hohem Durchsatz und die Quantifizierung von PCR-Produkten (Cho *et al.*, 1995, Jonas *et al.*, 1995, Vekris *et al.*, 1995, Brunnert, 1997). Ein großer Anwendungsbereich des PCR-ELISA-Verfahrens findet sich in der Humanmedizin (Sakrauski *et al.*, 1994, Andréoletti *et al.*, 1996, Scott *et al.*, 1997). Die Methode ist bei der Krebsvorsorge bedeutsam. Sie wird zur Diagnose des Humanen Papilloma Virus (HPV) eingesetzt (Venturoli *et al.*, 1998, Adams *et al.*, 1996), welches eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs, der zweithäufigsten Krebsart bei Frauen spielt. Weitere Einsatzgebiete sind die Phytopathologie (Schonfelder *et al.*, 1996, Weeks *et al.*, 1996, Muatasa *et al.*, 1996, Poggi Pollini *et al.*, 1997) und die Lebensmittelanalytik (Baez *et al.*, 1995, Gutierrez *et al.*, 1996, Brunnert *et al.*, 2001). Die standardisierte Durchführung erfolgt nach zwei Assay-Formaten.

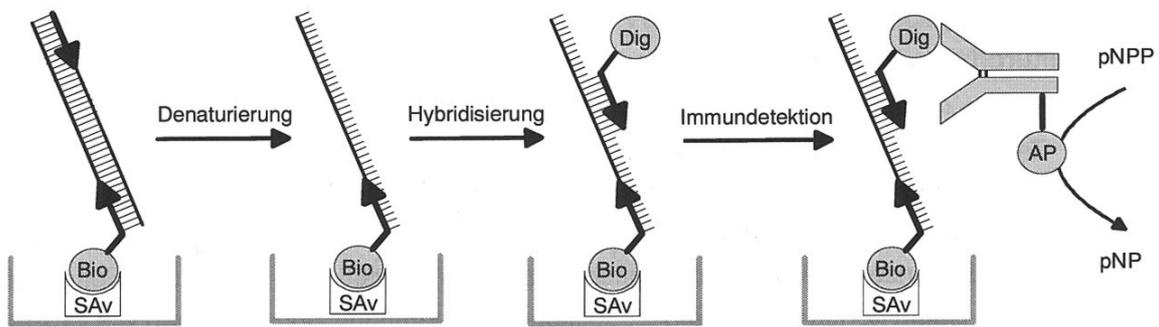


Abb. 3.4 Schematische Darstellung des PCR-ELISA-Verfahrens (Brunnert, 2002)

Nach Immobilisierung der biotinylierten Nukleinsäure an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte erfolgt ein Denaturierungsschritt und die anschließende Hybridisierung mit einer komplementären, Dig-markierten Nukleinsäure. Letztere kann durch ein entsprechendes anti-Dig-Antikörper-Konjugat enzymatisch nachgewiesen werden.

Im ersten Format wird eine biotinylierte Sonde in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten irreversibel immobilisiert. Die PCR erfolgt unter Verwendung eines Digoxigenin-markierten Primers. Nach thermischer oder alkalischer Denaturierung des PCR-Produktes kann dieses mit der komplementären Sonde hybridisieren und z.B. durch einen enzymmarkierten anti-Dig-Antikörper nachgewiesen werden (Keller *et al.*, 1990, Lahijani *et al.*, 1998, Scheu *et al.*, 1999, Soumet *et al.*, 1995). Das zweite Format sieht die Amplifikation unter Verwendung eines biotinylierten Primers vor, so dass das PCR-Produkt direkt über die Bindung an Streptavidin immobilisiert werden kann. Nach alkalischer Denaturierung erfolgt die Hybridisierung mit einer z.B. Dig-markierten Sonde (Inouye und Hondo, 1990, Siebert und Larrick, 1992, Guenther und Hart, 1998, Alard *et al.*, 1993, Gautheret *et al.*, 1996, Berg *et al.*, 1996, Dufour *et al.*, 1999). Anstelle des Einsatzes eines markierten Primers werden zur PCR auch Fluoreszein-markierte Nukleotide (Landgraf *et al.*, 1991) oder Antikörper gegen doppelsträngige DNA eingesetzt, die das Hybridisierungsereignis identifizieren (Ritzler und Atwegg, 1996, Gilligan *et al.*, 2000, Beyer *et al.*, 1999, Grimm *et al.*, 1989, Callens und De Clerq, 1999, Coutney *et al.*, 1999). Der Nachweis durch Chemilumineszenz führt zu einer weiteren Signalverstärkung (Baez *et al.*, 1996). Im Vergleich zur Analyse der PCR-Produkte durch Ethidiumbromid-Färbung und Southern-Hybridisierung, ist das PCR-Verfahren sensitiver und schneller in der Anwendung (Chinsangaram *et al.*, 1993, Sabbatini *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 1993).

3.4 Humanes H-FABP

Die drei häufigsten Todesursachen in Deutschland sind Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Die zweithäufigste Todesursache bei Männern wie Frauen ist der akute Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006). Die Entwicklung schneller Testsysteme zur Frühdiagnose eines akuten Myokardinfarktes ist daher von großem Interesse. Bei einem akuten, schweren Herzinfarkt werden die Herzmuskelzellen irreversibel geschädigt. Dabei kommt es zum Austritt intrazellulärer Proteine, wie z.B. Creatinkinase oder Myoglobin in den extrazellulären Raum und schließlich in den Blutstrom (Schreiber, 1999). Die Herzmuskelnekrose wird anhand einer Konzentrationserhöhung kardialer Proteine im Plasma detektiert (Sheffold *et al.*, 1994, Mair *et al.*, 1997).

Ein neu vorgeschlagener cytoplasmatischer Marker für Zellschädigungen ist das Protein H-FABP (*fatty acid binding protein*), das als Transporter hydrophober Fettsäuren in der Zelle dient (Börchers und Spener, 1994). Es gelangt auf Grund seiner geringen Molekularmasse schnell in das lymphatische System und kann daher bereits 1,5-3 h nach einem akuten Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Glatz *et al.*, 1993, Glatz *et al.*, 1994, Tanaka *et al.*, 1991). Die Ausscheidung des Proteins über die Nieren erfolgt innerhalb von 12-24 h, so dass sich H-FABP auch zur Erkennung von Reinfarkten eignet (Schreiber, 1999). Im humanen Blutplasma, Serum und Urin kann H-FABP als Herzinfarktmarker durch ELISA-Verfahren nachgewiesen werden (Ohkaru *et al.*, 1995, Kleine *et al.*, 1992, Wodzig *et al.*, 1997). Für die Detektion von H-FABP im Blutplasma wurden Immunsensoren, basierend auf dem Einsatz von monoklonalen anti-H-FABP-Antikörpern entwickelt (Siegmann-Thoss *et al.*, 1996, Schreiber *et al.*, 1997). Für die Entwicklung neuer immunologischer Diagnoseverfahren wurde die Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente gegen H-FABP am Institut für Chemo- und Biosensorik im Rahmen eines Projektes untersucht.

3.5 Tumormarker Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Als Tumormarker definiert man alle nachweisbaren oder messbaren Substanzen, die auf einen Tumor hinweisen oder zur Charakterisierung oder Detektion seiner Ausbreitung beitragen. Sie können auch in nicht-invasiver Weise bei pathologischem Ergebnis eine vermutete Diagnose bestätigen, ein höheres Stadium oder eine Metastasierung signalisieren oder auf ein Rezidiv hinweisen. Zirkulierende oder humorale Tumormarker werden in oder auf Tumorzellen oder in ihrer Umgebung gebildet und finden sich im Serum, in Flüssigkeitsansammlungen der freien Bauchhöhle (Aszites) oder in Ausscheidungen des Brutfells (Pleuraexsudat). Die Konzentration von Tumormarkern korreliert mit der Tumormasse, der Tumorausbreitung und ist primär von der Tumor-Blutversorgung abhängig. Konzentrationszunahmen ohne Korrelation zur Tumormasse können aus katabolen Störungen oder aus Freisetzungen nach Operationen, Radio- oder Chemotherapien resultieren. Das wichtigste Einsatzgebiet von Tumormarkern ist die Therapie- und Verlaufskontrolle nach Operationen, Radio-, Chemo- oder Hormontherapien (Lammerz und Stieber, 2004). Ein erkrankungsfreies Intervall kann durch die Beziehung zwischen prätherapeutischem Ausgangswert und Rezidivrisiko ermittelt werden.

Für den Tumormarker CEA (*carcinoembryonic antigen*, carcinoembryonales Antigen) ist diese Relation beim kolorektalen Karzinom (Duffy *et al.*, 2003, Reiter *et al.*, 1997), Magenkarzinom (Reiter *et al.*, 1996) und Lungenkarzinom (Lammerz und Stieber, 2004) eingehend untersucht worden. Der Ausgangsbasiswert von CEA ist essentiell zur Abschätzung der Prognose (EGTM, 1999, Fleisher *et al.*, 2002). Der CEA-Spiegel ist beim Kolon-/Rektumkarzinom bis zu 80% erhöht. Spiegelerhöhungen werden auch beim Magen- (45%), Bronchial- (71%) und metastasierenden Mammakarzinom (54%) beobachtet. Benigne Erkrankungen von Darm, Pankreas, Leber und Lunge führen zu Spiegelerhöhungen von bis zu 25%, was die Spezifität des Markers vermindern kann (Nakane *et al.*, 1994). Vor allem die Nachsorge anhand von CEA-Kontrollen erhöht den Gesamt-Überlebensvorteil von fünf Jahren nach kolorektalen Operationen (Jeffery *et al.*, 2004, Rosen *et al.*, 1998, Northover, 1986). Die primäre Rolle des Tumormarkers CEA zur Prognose von Rezidiven und als Verlaufskontrolle einer Therapie wurde von der American Society of Clinical Oncology (ASCO) anerkannt (Duffy *et al.*, 2003).

Gold und Freedman (1965) und Von Kleist *et al.* (1972) entdeckten unabhängig voneinander das carcinoembryonale Antigen CEA in entodermalen Tumoren und im fetalen Gastrointestinaltrakt (Fletcher, 1986). Neben dem normalen und neoplastischen Darmepithelien, tritt CEA in der Lunge, Leber, Brust und anderen Geweben in Erscheinung (Thompson und Zimmermann, 1988, Cournoyer *et al.*, 1988, Thompson *et al.*, 1993). Die Expression korreliert mit der Differenzierung und Architektur von normalen und

neoplastischen Epithelien (Thomas *et al.*, 1990). Die humane CEA Genfamilie codiert für das klassische CEA (180 kDa), BGP (*biliary glycoprotein*, 160 kDa), NCA-95 (*nonspecific crossreacting antigens*, 95 kDa) und NCA-90 (90 kDa) (Thompson und Zimmermann, 1988, Thompson *et al.*, 1991, Beauchemin *et al.*, 1989). Diese unterschiedlich gespleissten Varianten differieren bezüglich ihrer Größe, Anzahl der Immunglobulin-Domänen, posttranslationalen Modifikationen, Membranbindungsstellen und Glykosylierung (Thompson *et al.*, 1991). CEA Glykoproteine sind Bestandteile der Immunglobulin-Superfamilie, die eine Schlüsselrolle bei der Zelladhäsion und Zell-Oberflächenerkennung spielen (Katz *et al.*, 1991). Sie besitzen homo- und heterophile Zell-Adhäsionsfunktionen (Zhou *et al.*, 1990, Rojas *et al.*, 1990, Turbide *et al.*, 1991, Oikawa *et al.*, 1989, Benchimol *et al.*, 1989). Die Proteine weisen einen Glykosyl-phosphatidyl-inositol-Rest auf und beeinflussen wahrscheinlich Sekretionsmechanismen.

Die Freisetzung von CEA wird möglicherweise durch die Hydrolyse von Phospholipasen kontrolliert (Thompson *et al.*, 1991). Im Darm wurde die spezifische Bindung von CEA an Bakterien beobachtet, was auf eine putative Funktion als Kolonisierungsfaktor der mikrobiellen Flora hinweist (Sauter *et al.*, 1993, Leusch *et al.*, 1991, Sauter *et al.*, 1991).

Anti-CEA-Antikörper können zur Radioimmunanalytik und zur Radiotherapie CEA-assoziiierter Krebsarten eingesetzt werden (Abdul-Nabi *et al.*, 1987). Zu diesem Zweck wurden diverse, chimäre monoklonale anti-CEA-Antikörper produziert (Beidler *et al.*, 1988, Hardmann *et al.*, 1989, Neumaier *et al.*, 1990, Koga *et al.*, 1990). Antikörperfragmente haben gegenüber vollständigen Antikörpern Vorteile im Bezug auf bildgebende Verfahren *in vivo*, Targeting von Medikamenten, Toxinen und Radioisotopen und die Entfernung toxischer Radioimmunkonjugate aus dem Blutkreislauf (Huston *et al.*, 1993). Die beschriebenen Vorzüge der kleineren Antikörpermoleküle begründen sich auf die bessere Gewebepenetration, der schnelleren Ausscheidung aus dem Serum und der geringeren Retentionszeit im normalen Gewebe (Whitlow, 1990). Die Entwicklung bakteriell exprimierter anti-CEA-scF_v-, F_{ab}- und *diabody*-Fragmente wurde beschrieben (Ayala *et al.*, 1992, Duenas *et al.*, 1994, Abraham *et al.*, 1995, Chester *et al.*, 1994). Als Expressionssystem eignet sich jedoch auch die Hefe *Pichia pastoris* (Freyre *et al.*, 2000).

3.6 Maltosephosphorylase

Die intrazelluläre Mobilisierung von Kohlehydraten zur Energiegewinnung wird durch Phosphorylasen ermöglicht, die zur Gruppe der *ortho*-Phosphatglycosyltransferasen gehören. Sie katalysieren die Phosphorolyse, bei der die glycosidische Bindung von Poly- oder Disacchariden unter Verwendung von *ortho*-Phosphat gespalten wird. Ein Teil der Energie der glycosidischen Bindung bleibt im freigesetzten Glucose-Phosphat-Ester erhalten (Klein und Helmreich, 1985). Phosphorylasen unterscheiden sich anhand ihrer Substratspezifität, Kinetik und Abhängigkeit von Cofaktoren (Firnges, 1997). Die α -Glucanophosphorylasen katalysieren die sequentielle, phosphorolytische Spaltung α -1,4-glycosidischer Bindungen unter Bildung von Glucose-1-phosphat. Sie katalysieren zudem die Synthese von Polysacchariden ausgehend von Glucose-1-phosphat (Palm *et al.*, 1990). Jede Enzymuntereinheit weist kovalent gebundenes Pyridoxal-5'-phosphat auf, welches als Säurekatalysator fungiert (Feldmann *et al.*, 1978, Klein *et al.*, 1981).

Disaccharidphosphorylasen unterscheiden sich durch unterschiedliche stereochemische Katalyse. Ein Leitenzym ist die Saccharosephosphorylase, die unter Verbrauch von *ortho*-Phosphat die Umsetzung von Saccharose zu D-Fructose und α -Glucose-1-phosphat katalysiert. Zu den Disaccharidphosphorylasen gehört eine Untergruppe, die eine Phosphorolyse katalysiert, bei der die Konfiguration am anomeren C-Atom einer glycosidischen Bindung umgekehrt wird. Durch eine Konfigurationsinversion am Reaktionszentrum erfolgt eine Substitutionsreaktion zweiter Ordnung (Mieyal und Abeles, 1972). Die bekanntesten Vertreter sind Cellobiose Phosphorylase, Laminaribose Phosphorylase, Trehalose Phosphorylase und Maltose Phosphorylase. Letztere ist u.a. in zahlreichen Mikroorganismen, wie *Nesseira meningitidis* (Fitting und Doudoroff, 1952), *Nesseira perflava* (Selinger und Schramm, 1961), *Bacillus sp.* RK-1 (Inoue *et al.*, 2002, Inoue *et al.*, 2001) *Bacillus stearothermophilus* SK-1, (Inoue *et al.*, 2002 (2)), *Lactococcus lactis* (Nilsson und Radström, 2001, Andersson *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* (Tangney *et al.*, 1992), nicht spezifizierten Lactobacilli aus Bier (Wood und Rainbow, 1961), *Lactobacillus sanfrancisciensis* (Ehrmann *et al.*, 1998) und *Lactobacillus brevis* (Kamogawa *et al.*, 1973) identifiziert und beschrieben worden.

Die Maltosephosphorylase wird für verschiedene Applikationen genutzt. Für die Diagnose von Pankreatitis kann die Aktivität der α -Amylase durch Umsetzung der freigesetzten Maltose durch Maltosephosphorylase in Gegenwart anderer Oligo- und Disaccharide detektiert werden (Kamogawa *et al.*, 1974, Gauhl und Seidel, 1977, Poudrier und Oyen *et al.*, 1991). Maltosephosphorylase wird in Kombination mit Trehalosephosphorylase zur Trehalosesynthese eingesetzt (Murao *et al.*, 1985). Die Phosphatsensorik spielt eine wichtige Rolle in der Umweltanalytik. Die Maltosephosphorylase wird dabei als

Schlüsselenzym verwendet. Die Entwicklung eines 4-Wege-Enzymsensors gelang erstmals Conrath *et al.*, 1995, basierend auf einem Patent von Warsinke und Gründig (1992). Zur Bestimmung von *ortho*-Phosphat wurde ein Einwegenzymensensor entwickelt, durch den proportional gebildetes Wasserstoffperoxid amperometrisch bestimmt wird (Hüwel *et al.*, 1996, Hüwel, 1998).

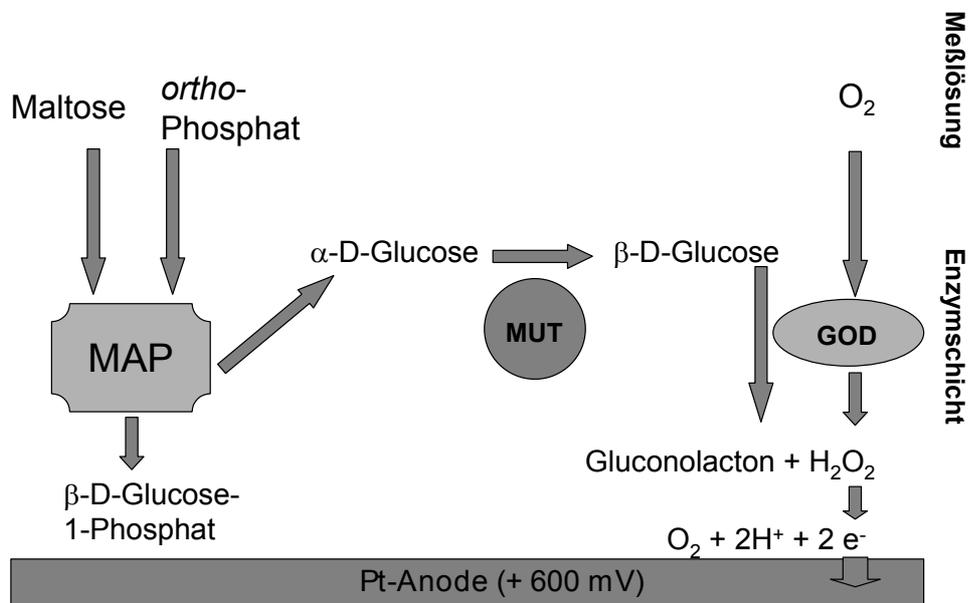


Abb. 3.5 Schematische Darstellung des 3-Wege Einwegsensors zur Bestimmung von *ortho*-Phosphat (nach Hüwel, 1998).

MAP = Maltosephosphorylase; MUT = Mutarotase; GOD = Glucoseoxidase.

Die optimale Aktivität erreicht die Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* bei 36°C und einem pH-Wert von 6,5 (Hüwel *et al.*, 1997). Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus (Doudoroff, 1961), wobei Phosphat jedoch durch Arsenat ersetzt werden kann (Kamogawa *et al.*, 1974). Unter Verwendung von β -D-Glucose-1-fluorid wird die reversible Reaktion in Richtung Maltosesynthese verlagert (Tsumuraya *et al.*, 1990). Die Maltosephosphorylase katalysiert die Phosphorolyse von Maltose zu α -D-Glucose und β -D-Glucose-1-phosphat (Fitting und Doudoroff, 1952, Mieyal und Abeles, 1972). Der putative Reaktionsmechanismus beinhaltet, dass der glycosidische Sauerstoff der Maltose von einer Carboxylgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms protoniert wird. Auf der gegenüberliegenden Seite der Maltosephosphorylase fungiert eine Carboxylgruppe als Base und deprotoniert das angreifende Phosphat. Dabei bildet die axiale Hydroxylgruppe eine essentielle Wasserstoffbrückenbindung aus. Die Phosphorolyse der Maltose erfolgt im anschliessend konzertierten Prozess (Tsumuraya *et al.*, 1990).

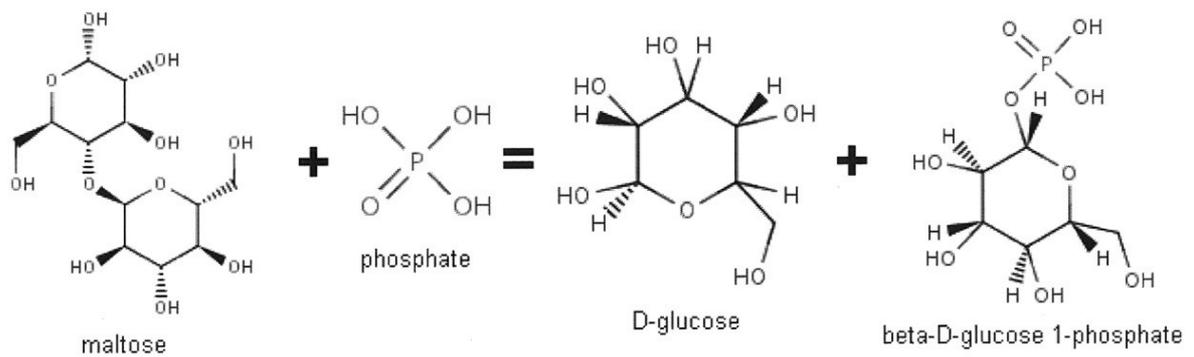


Abb. 3.6 Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Maltosephosphorylase (nach Tsumuraya, 1990)

Für die Aufklärung der molekularen Prozesse während der Katalyse ist die Identifizierung der räumlichen Struktur der Maltosephosphorylase essentiell. Zur Interpretation röntgenkristallographischer Analysen des Enzyms bedarf es zwingend der Kenntnis der Primärstruktur. Erste Analysen der Aminosäuresequenz der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* erfolgten durch Imer (1996). Unter Berücksichtigung des Codon-Gebrauches von *Lactobacillus brevis*, konnten erste Primer zur Sequenzanalyse von Teilen des Maltosephosphorylase-Gens ausgewählt werden, was zur Identifizierung von ca. 72% des Genlocus führte (Firnges, 1997).

4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen des EU-Projektes (CT97-0502) *Ultra-sensitive Multianalyte Immunoassay based on DNA-Sensor* (ULISA) sollte mit sechs Kooperationspartnern ein ultrasensitives Immun-PCR-Verfahren etabliert werden. Dabei handelt es sich um die Kombination eines ELISA-Verfahrens mit der *in vitro*-Amplifikation eines an den Detektor-Antikörper gebundenen DNA-Fragmentes.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der antigenbindenden Regionen der eingesetzten, monoklonalen Modellantikörper gegen H-FABP (*heart-fatty acid binding protein*) und CEA (carcinoembryonales Antigen, *carcinoembryonic antigen*) und die Expression funktioneller, rekombinanter F_{ab}- und scF_v-Antikörperfragmente für die Immun-PCR. Ein wichtiger Aspekt für das Verfahren ist die Anbindung der Marker-DNA an den Detektor-Antikörper. Neben einer direkten, chemischen Kopplung bot sich die Verknüpfung über das Streptavidin-Biotin-System an. In dieser Arbeit sollte die Eignung von Protein *engineering* für die Erzeugung dieser neuartigen, rekombinanten Antikörper-DNA-Fusion für die Immun-PCR untersucht werden. Dazu sollten in einem ersten Schritt die Expression funktionellen, rekombinanten Kern-Streptavidins erreicht und die genetische Fusion eines scF_v-Antikörperfragmentes mit Kern-Streptavidin ermöglicht werden. Zur einfachen und sensitiven Detektion der in der Immun-PCR amplifizierten Marker-DNA sollte in dieser Arbeit zudem ein PCR-ELISA-Verfahren optimiert werden, welches im Rahmen des Projektes routinemäßig eingesetzt werden sollte.

Im Rahmen eines weiteren Projektes am Institut für Chemo- und Biosensorik in Münster stellte die Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* das Schlüsselenzym für die Entwicklung eines 3-Enzym-Biosensorsystems zur Detektion von *ortho*-Phosphat dar. Die Analyse der Nukleotidsequenz und damit der Primärstruktur ist für die Ermittlung der Tertiärstruktur und letztendlich für die Aufklärung des katalytischen Mechanismus der Maltosephosphorylase essentiell. Aufbauend auf den Arbeiten von Irmer (1996) und Firnges (1997) sollte in dieser Arbeit, unter Verwendung von Homologievergleichen mit taxonomisch nah verwandten Mikroorganismen, eine größere, bislang unbekannte 3'-terminale Region des Maltosephosphorylase-Gens bestimmt werden und die komplette, konsolidierte Sequenz den kooperierenden Kristallographen zur Aufklärung der Tertiärstruktur zur Verfügung gestellt werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte und Materialien

5.1.1 Geräte

Dialyse

Dialyseplättchen

Millipore (Eschborn)

Dialyseschlauch, Ausschlussgrenze 10 kDa

Medicell (London, GB)

Elektrophorese

Constant Power Supply 2297 Macrodrive S

LKB Bromma (Freiburg im Breisgau)

Elektrophoresis-Power Supply-EPS 600

Pharmacia (Freiburg im Breisgau)

Gelkammer für Agarosegele

MWG-Biotech GmbH (Ebersberg)

Minigel Twin-Kammer

Biometra (Göttingen)

Power Supply PPS 200-1D

MWG-Biotech GmbH (Ebersberg)

Standard Power Pack P25

Biometra (Göttingen)

Western Blot Apparatur

Werkstatt des Organisch-Chemischen
Instituts, WWU Münster

FPLC und Säulenmaterialien

BioPilot-System

Pharmacia (Freiburg im Breisgau)

HiLoad System, Steuereinheit GP 10,

UV-Detektor UVicord SII, Pumpe P-50,

Kollektor Frac-100, Einkanal Schreiber REC102

Pharmacia (Freiburg im Breisgau)

10/10 Leersäule

Pharmacia (Freiburg im Breisgau)

Ni-NTA-Agarose

Qiagen (Hilden)

Variperm Dialysesäule

bitop-Gesellschaft für biologische
Optimierung mbH (Witten)

Nukleinsäure-Blotting

Hybridisierungssofen

Biometra (Göttingen)

Hybridisierungsröhren

Biometra (Göttingen)

Nylon-Membran

Qiagen (Hilden)

Whatman-Papier GB002

Schleicher und Schuell (Dassel)

Turboblott-Apparatur

Schleicher und Schuell (Dassel)

MALDI

VISION 2000

Finnigan MAT (Bremen)

Pulsed Nitrogen Laser

LSI (Newton, USA)

pH Messgerät

Einstabmesskette U 402-M3-S7/60

Mettler (Toledo, USA)

Knick-Serie pH-Meter 763 Multi Calmatic

Knick (Berlin)

Pipetten

Research Pipette, Mehrkanal-Pipette, Multipette

Eppendorf (Hamburg)

Polymerasekettenreaktion

Hybaid Thermoblock

MWG-Biotech (Ebersberg)

GeneAmp 5700

Perkin Elmer (Weiterstadt)

Schüttler und Inkubatoren

Blockthermostat BT200

Kleinfeld (Gherden)

Schüttelinkubator Certomat R mit Inkubationshaube Certomat H

Braun (Melsungen)

Thermomixer 5437

Eppendorf (Hamburg)

Trockenbrutschrank

WTB Binder Labortechnik (Tuttlingen)

Vortex Genie Mixer

Bender & Holbein (Zürich, CH)

Photometer

Photometer Lambda 11/Bio

Perkin Elmer (Weiterstadt)

ELISA Reader MR5000

Dynatech (Denkendorf)

Ethanol	Sigma (Deisenhofen)
Dithiothreit	Sigma (Deisenhofen)

Elektrophorese

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	Roth (Karlsruhe)
Agarose (ultra pure)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat	Serva (Heidelberg)
Borsäure	Fluka (Neu-Ulm)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Dithiothreit	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Ethylendiamintetraacetat	Sigma (Deisenhofen)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Harnstoff	Sigma (Deisenhofen)
Natriumcarbonat	Fluka (Neu-Ulm)
ServaBlue R250	Serva (Deisenhofen)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Sigma (Deisenhofen)
Xylenxyolanol	Sigma (Deisenhofen)

Größenmarker

λ -Marker, λ -DNA, <i>EcoRI/Hind III</i> geschnitten	Appligene (Heidelberg)
pUC19-Marker, <i>Msp I</i> geschnitten	MBI (Fermentas)
DNA-Marker λ -Mix II λ -DNA, <i>Hind III</i> geschnitten	Molekularbiologisches und biochemisches Labor Dr. Bartling (Bielefeld)
Molekulargewichtsmarker LMW	Pharmacia (Freiburg im Breisgau)
100 bp-Leiter	Genecraft (Münster)
pBR 328 Mix I, pBR 328, <i>Hinf I/Bgl I</i> geschnitten	Molekularbiologisches und biochemisches Labor Dr. Bartling (Bielefeld)

FPLC

Betain (wasserfrei)	Sigma (Deisenhofen)
Diaminobiotin	Sigma (Deisenhofen)
Dikaliumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck (Darmstadt)
Imidazol	Sigma (Deisenhofen)
3-Indolessigsäure	Sigma (Deisenhofen)
Kaliumchlorid	Sigma (Deisenhofen)

Natriumazid	Sigma (Deisenhofen)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka (Neu-Ulm)
Saccharose	Sigma (Deisenhofen)

Aufkonzentrierung von Proteinen

Aufkonzentrierungsröhrchen 2 und 10 ml	Eppendorf (Hamburg)
--	---------------------

Proteinblotting

Nitrocellulosemembran	Schleicher Schuell (Dassel)
Blottingpapiere GB002	Schleicher Schuell (Dassel)
Methanol	Fluka (Ulm)
Tween 20	Fluka (Ulm)
4-Chlor-1-naphthol	Sigma (Deisenhofen)
bovines Serum Albumin	Sigma (Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid	Sigma (Deisenhofen)
Schwefelsäure	Sigma (Deisenhofen)
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma (Deisenhofen)
Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma (Deisenhofen)
anti-Maus-IgG (F _{ab} -spezifisch)	
Peroxidase-Konjugat	Sigma (Deisenhofen)
Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure- alkalische Phosphatase-Konjugat (Ni-NTA-AP)	Qiagen (Hilden)
schwarze Tinte	Pelikan (Hannover)

Nukleinsäureblotting

N-Lauroylsarcosin	Sigma (Deisenhofen)
Blocking Reagenz	Roche Applied Science (Mannheim)
Streptavidin-alkalische Phosphatase- Konjugat	Roche Applied Science (Mannheim)
Tween 80	Sigma (Deisenhofen)
BCIP	Sigma (Deisenhofen)
NBT	Sigma (Deisenhofen)

Bakterien und Vektoren

<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Novagen (Madison, WI, USA)
<i>E. coli</i> DH 5α	Clontech (Heidelberg)

<i>E. coli</i> JM 83	Prof. Dr. A. Skerra (Darmstadt)
<i>E. coli</i> XL 10 gold	Stratagene (Heidelberg)
<i>Lactobacillus brevis</i> Nr. 20556	DSMZ (Braunschweig)
<i>Streptomyces avidinii</i> Nr. 40526	DSMZ (Braunschweig)

pET3c, pET20b	Novagen (Madison, WI, USA)
pGEM-T Easy	Promega (Mannheim)
pCR Script (Amp, Cam)	Stratagene (Heidelberg)

Kulturmedien

Agar	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Chloramphenicol	Sigma (Deisenhofen)
Rubidiumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Manganchlorid	Sigma (Deisenhofen)
3-Morpholino-1-propansulfonsäure	Sigma (Deisenhofen)
Caseinhydrolysat	Invitrogen (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-thiogalactosid	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
5-Chlor-4-brom-3-indolyl- β -D-galactopyranosid	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Fleischextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
Glucose	Sigma (Deisenhofen)
Tween 80	Sigma (Deisenhofen)
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Diammoniumcitrat	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumsulfat	Sigma (Deisenhofen)
Mangansulfat	Sigma (Deisenhofen)
Malzextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
Calciumcarbonat	Sigma (Deisenhofen)

Gram-Bestimmung

Kristallviolett	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumoxalat	Sigma (Deisenhofen)
Kaliumjodid	Fluka (Neu-Ulm)

Jod

Fluka (Neu-Ulm)

DNA-Isolierung

Easypure Gel Extraction Kit

Biozym (Hessisch Oldendorf)

Jet Quick Kit

Genomed (Bad Oeynhausen)

GFX Micro Plasmid Kit

Pharmacia (Freiburg im Breisgau)

High Pure Plasmid Isolation Kit

Roche Applied Science (Mannheim)

Nucleobond Kit

Clontech (Heidelberg)

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

Sigma (Deisenhofen)

Phenol

Fluka (Neu-Ulm)

Isopropanol

Sigma (Deisenhofen)

RNase A

Sigma (Deisenhofen)

Lysozym

Roche Applied Science (Mannheim)

Ethylendiamintetraacetat

Sigma (Deisenhofen)

Proteinase K

Roth (Karsruhe)

E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit

peq lab (Erlangen)

RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Diethylpyrocarbonat

Sigma (Deisenhofen)

peqGold RNA Pure

peq lab (Erlangen)

Oligotex mRNA Kit

Qiagen (Hilden)

Reverse Transkriptase Superscript II

Invitrogen (Karlsruhe)

First-Strand cDNA Synthesis Kit

Pharmacia (Freiburg im Breisgau)

Polymerasekettenreaktion

Primer	Sigma (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe), Geneset (Paris, F)
Biotherm <i>Taq</i> -Polymerase	Genecraft (Münster)
Nukleotid-Mix	Genecraft (Münster)
Neotherm <i>Taq</i> -Polymerase	Genecraft (Münster)
bio-11-dUTP	Genecraft (Münster)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Perkin Elmer (Weiterstadt)
<i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)

DNA-Sequenzierung

Big Dye Sequencing Kit	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Speedvac Alpha RVC	Christ (Osterode)
Kühlfalle Alpha 2-4	Christ (Osterode)
Vakuumpumpe (<i>High Vacuum Pump</i>)	Edwards (Sussex, UK)
Gelfiltrationskartusche	MoBiTech (Göttingen)
Enzyme	
Restriktionsenzyme	Roche Applied Science (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach, Taunus), Stratagene (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Roche Applied Science (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach, Taunus), Stratagene (Heidelberg), Genecraft (Münster)

ELISA

4-Chlor-1-naphthol	Sigma (Deisenhofen)
goat-anti-mouse-anti-IgG (F _{ab} -spezifisch)	
Peroxidase-Konjugat	Sigma (Deisenhofen)
rabbit-anti-mouse-anti-IgG alkalische	
Phosphatase-Konjugat	Dakopats (Hamburg)
c-myc-Antikörper	Sigma (Deisenhofen)
bovines Serum Albumin	Sigma (Deisenhofen)
Rotiblock	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Polystyrol Mikrotiterplatten, F96 MaxiSorb	Nunc (Wiesbaden)
2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure	Laboratory of the Government Chemist

	(Teddington Middlesex, UK)
<i>ortho</i> -Phenyldiamin	Sigma (Deisenhofen)
Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten	Steffens (Eberingen)
<i>para</i> -Nitrophenylphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Dinatriummethyldiamintetraacetat	Sigma (Deisenhofen)
Triton X-100	Fluka (Neu-Ulm)
Ficoll 400	Sigma (Deisenhofen)
Polyvinylpyrrolidon	Sigma (Deisenhofen)
Tween 20	Fluka (Neu-Ulm)
Blocking Reagenz	Roche Applied Science (Mannheim)
Hering Sperma DNA	Sigma (Deisenhofen)
Anti Dig F _{ab} -Fragment alkalische	
Phosphatase-Konjugat	Roche Applied Science (Mannheim)
Zinkchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Streptavidin	IBA (Göttingen)
Biotin-Meerrettichperoxidase-Konjugat	Invitrogen (Karlsruhe)

MALDI

Eichlösung Carboanhydrase	Finnigan MAT (Bremen)
Eichlösung BSA	Finnigan MAT (Bremen)
Eichlösung monoklonale Antikörper	Finnigan MAT (Bremen)
ZipTip Kit	Millipore (Eschborn)
2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure	Sigma (Deisenhofen)
6-Azathiothymin	Sigma (Deisenhofen)

5.1.3 Wasseraufbereitung

Zur Herstellung von Lösungen, Medien und Reaktionsansätzen wurde Aqua bidest. verwendet (Wasseraufbereitung Seralpur Pro 90 CN, Seral (Ransbach-Baumbach)).

Beim Einsatz von RNA wurden die Lösungen und Reaktionsansätze mit H₂O angesetzt, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurde. Dazu wurde 1 l H₂O mit 100 µl DEPC ü.N. inkubiert und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

5.1.4 Kulturmedien

LB-Medium (Luria Bertani)

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
A. bidest	ad 1000 ml
pH	7,5

Zur Herstellung von LB-Festmedium wurden 1,5 % Agar (w/v) zugesetzt.

GYM-Medium

Glucose	4 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
CaCO ₃	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH	7,2 mit KOH eingestellt

Zur Herstellung von LB-Festmedium wurden 1,5 % Agar (w/v) zugesetzt.

DSMZ-Medium 11

Glucose	20 g
Hefeextrakt	5 g
Fleischextrakt	10 g
Caseinhydrolysat	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Na-Acetat	5 g

(NH ₄) ₂ -Citrat	2 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,05 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH	6,2-6,5

Zur Herstellung von LB-Festmedium wurden 1,5 % Agar (w/v) zugesetzt.

5.1.5 Standardpuffer

TBE-Puffer

Tris	45 mM
Borsäure	45 mM
EDTA	2 mM
pH	8,0

TBS-Puffer

Tris	50 mM
NaCl	15 mM
pH	7,5

PBS-Puffer

NaCl	137 mM
KCl	2,86 mM
Na ₂ HPO ₄	7,99 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
pH	7,5-7,4

TE-Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH	8,0

5.1.6 Stammlösungen

Ampicillin

50 mg/ml; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C; Arbeitskonzentration: 50 µg/ml

Kanamycin

30 mg/ml; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C; Arbeitskonzentration: 30 µg/ml

Chloramphenicol

25 mg/ml; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C; Arbeitskonzentration: 25 µg/ml

Ethidiumbromid

50 mg/ml in TBE-Puffer; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C; Arbeitskonzentration: 50 µg/ml

5.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**5.2.1 Allgemeine Methoden****5.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; engl.: *polymerase chain reaction*) ermöglicht die *in vitro*-Amplifikation von DNA. Für die Durchführung benötigt man zwei Oligonukleotide (Primer), die antiparallel an die komplementären DNA-Einzelstränge binden. Die zu amplifizierende DNA wird zunächst hitzedenaturiert. Durch diesen Schritt werden eventuell vorliegende Sekundärstrukturen der Primer- und Template-DNA aufgelöst, da diese die spezifische Bindung der Primer inhibieren können. Nach Abkühlung auf eine spezifische Temperatur binden die im Überschuss zugegebenen Primer an die entstandene einzelsträngige DNA.

Die Hybridisierungstemperatur (T) der Primer lässt sich näherungsweise nach folgender Formel berechnen (Itakura *et al.*, 1984):

$$T = 4^{\circ}\text{C} \times \text{GC-Paar} + 2^{\circ}\text{C} \times \text{AT-Paar} - 5^{\circ}\text{C}$$

Die Elongation der DNA-Stränge, ausgehend vom 3'-Ende der Primer, wird durch eine hitzestabile, Mg^{2+} -abhängige DNA-Polymerase katalysiert. Eingesetzt wurden *Taq*-Polymerasen aus *Thermus aquaticus* und *Pfu*-Polymerasen aus *Pyrococcus furiosus* (Lundberg *et al.*, 1991). Die *Pfu*-Polymerase verfügt über eine 3' - 5'-Exonuklease-Aktivität, wodurch die Fehlerrate durch den Einbau falscher Nukleotide reduziert werden kann.

Eingesetzte *Pfx*-Polymerasen bilden einen *Pfu*-Antikörper-Komplex, welcher sich erst bei Überschreitung der Hybridisierungstemperatur löst und somit die Synthese unspezifischer PCR-Produkte sowie den Verdau des 5'-Terminus unterbindet. Zum Abschluss des PCR-Programms erfolgt die Elongation unvollständiger PCR-Produkte.

Standard-PCR-Ansätze enthielten je 200 μM dNTPs, je 0,4 μM Primer, 1,5 mM Mg^{2+} -Ionen, 0,5 U DNA-Polymerase sowie den zugehörigen DNA-Polymerase-Puffer in H_2O .

5.2.1.2 DNA-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Durch die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich, in einem bestimmten Größenbereich, umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Helling *et al.*, 1974). Die Trenneigenschaft der Agarosegele ist abhängig von der Porengröße des Gels und lässt sich durch eine Variation der Agarosekonzentration verändern. Je nach Verwendungszweck werden 0,6 - 2 %ige Gele eingesetzt, die eine gute Auftrennung von DNA-Molekülen im Bereich von 0,1 - 20 kb erlauben (Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 0,7 - 2 % Agarose (w/v) durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst und die Agaroselösung auf spezielle, in Elektrophorese-Kammern platzierte Gelträger gegossen. Zur Erzeugung von Probenaschen wurden im Abstand von 0,5 - 1,5 mm über dem Träger senkrecht aufgesetzte Kämmen platziert. Nach Erstarren der Gele wurden diese mit TBE-Puffer überschichtet.

Die DNA-Proben wurden 10 %ig mit Gelladepuffer (Saccharose 40 % (w/v), Bromphenolblau 0,25 % (w/v), Xylenxylanol 0,25 % (w/v), EDTA 20 mM, pH 8,0) versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Die im Gelladepuffer enthaltene Saccharose erhöht die Dichte der DNA-Proben, wodurch das Absinken der Proben in die Probenaschen erleichtert wurde. Die zugesetzten Farbstoffe Bromphenolblau und Xylenxylanol ermöglichten es, den Verlauf der Gelelektrophorese zu kontrollieren.

Die Agarose-Gelelektrophorese eignet sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 21 kbp und 80 bp. Zur Auftrennung kleinerer Fragmente bietet sich die Verwendung von Polyacrylamidgelen (8-12 % Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch (C= 2,7 %), 0,2 % N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 0,08 % Ammoniumperoxosulfat) in einer PAGE (*polyacrylamid gel electrophoresis*) an. Die Elektrophoresen erfolgten bei Spannungen zwischen 20 und 120 Volt.

Zur Visualisierung der DNA wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung (50 µg/ml) inkubiert und anschließend auf einem Transilluminator betrachtet. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, dessen planare Struktur eine Interkalation zwischen benachbarten Basenpaaren doppelsträngiger Nukleinsäuren ermöglicht. Bei Anregung von Ethidiumbromid-DNA-Komplexen mit UV-Licht geeigneter Wellenlänge (302 nm) zeigen diese eine charakteristische, rötlich-orange Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur Nukleinsäuremenge im Gel.

Zur Ermittlung der Größe unbekannter DNA-Fragmente werden diese mit den Banden von Molekulargewichtsstandards verglichen oder anhand von Eichgeraden bestimmt.

5.2.1.3 Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen können in drei Klassen unterteilt werden. Klasse-II-Restriktionsendonukleasen wurden zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA eingesetzt. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse spezifischer, meist palindromischer Erkennungssequenzen. Alle Klasse-II-Restriktionsendonukleasen benötigen Mg^{2+} als Cofaktor. Je nach Restriktionsenzym erfolgt die Spaltung versetzt, wobei 5'- oder 3'-überstehende Einzelstrangenden (klebrige Enden oder *sticky ends*) entstehen, oder die Spaltung erfolgt in der Mitte der Erkennungsstelle, so dass glatte Enden (*blunt ends*) entstehen.

Die Restriktionen erfolgten nach Protokollen der Hersteller der eingesetzten Endonukleasen. Bei Doppelrestriktionen wurde gemäß der Puffersystem-Tabellen der Firmen Roche Applied Science und New England Biolabs ein kompatibler Puffer verwendet oder sequenzielle Restriktionen nach Filterblattdialyse durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden in der Regel 60-90 min bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

5.2.1.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Restriktionsfragmente und PCR-Produkte wurden, unter Verwendung von Gelextraktions-Kits (Jet Quick oder Easy Pure), nach einer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 5.2.1.2) aus einem 1% igen Agarosegel isoliert und auf diese Weise aufgereinigt. Nach Konzentrationsabschätzung aus einem Polyacrylamid- oder einem Agarosegel wurde im präparativen Agarosegel oft eine größere Menge der zu isolierenden Nukleinsäure aufgetragen, um die Ausbeute des Isolats zu steigern. Die DNA-Fragmente wurden, nach Auftrennung im Agarosegel und Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid, so kurz wie möglich durch UV-Licht lokalisiert und die entsprechenden Gelareale mit einem Skalpell

ausgeschnitten. Um eine saubere Excision zu ermöglichen, wurden benachbarte Spuren freigelassen. Die isolierte Agarose wurde vor der Aufreinigung gewogen.

5.2.1.5 Reinigung von DNA durch Filterblattdialyse

Wenn bei Restriktion (Kap. 5.2.1.3) mit verschiedenen Enzymen die Kompatibilität der einzusetzenden Puffer nicht gegeben war und die Restriktionsschritte sequenziell durchgeführt werden mussten, wurde die DNA-Lösung durch eine Filterblattdialyse von störenden niedermolekularen Substanzen befreit.

Ein Celluloseester-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,025 µm (Millipore) wurde mit der glänzenden Seite nach oben auf die Oberfläche eines mit H₂O gefüllten Becherglases gelegt. Die DNA-Probe wurde auf das Filterblättchen aufgebracht und nach einer Dialysezeit von 10-30 min wieder abpipettiert.

5.2.1.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Moleküle wird durch DNA-Ligasen katalysiert.

Unter Verwendung von *Taq*-Polymerasen entstehen PCR-Produkte mit 3'-terminalen, überhängenden Adenosinresten. Der linearisierte Vektor pGEM-T Easy (Promega) bot durch seine 3'-Thymidin-Überhänge die Möglichkeit zur Hybridisierung mit dem *Taq*-PCR-Produkt und zur erleichterten Ligation nach Herstellerangaben.

Wurde *Pfu*-Polymerase oder *Pfx*-Polymerase zur PCR eingesetzt, entstehen *blunt end* -Produkte. Sollten diese Produkte in den pGEM-T Easy Vektor ligiert werden, wurden die Adenosin-Überhänge durch Zugabe von 2,5 U *Taq*-Polymerase nach Beendigung der *Pfu*-, bzw. *Pfx*-PCR zum Ansatz und 20 minütiger Inkubation bei 72°C synthetisiert.

Für eine effiziente *blunt end*-Ligation eines *Pfu*- oder *Pfx*-PCR- Produktes wurde der Vektor pCR Script (Stratagene) eingesetzt. Der Vektor enthält eine *blunt-end* Restriktionsschnittstelle für *SrfI* und wird im Ligationsschritt, in Anwesenheit des zu inserierenden DNA-Fragmentes, ständig linearisiert. Da durch die Insertion die *SrfI*-Schnittstelle in der Regel nicht wiederhergestellt wird, ergibt sich so eine effiziente Ligation.

Zur Ligation von Restriktionsfragmenten (Kap. 5.2.1.3) wurde die ATP-abhängige DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 eingesetzt. Je nach Ligationserfolg wurden von der Ligase 1-

400 U/Ansatz eingesetzt. Um den Anteil unerwünschter Nebenprodukte, wie z. B. Religate des Vektors zu reduzieren, sollte das molare Verhältnis von Vektor- und *Insert*-DNA zugunsten des *Inserts* verschoben sein (1 : 5).

Die einzusetzenden Mengen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge Insert} = \frac{(\text{rG Insert} \times \text{mA Insert})}{(\text{rG Insert} \times \text{mA Insert} + \text{mA Vektor})} \times M_{\text{DNA}}$$

rG relative Größe

mA molarer Anteil

M_{DNA} Gesamtmenge an DNA im Ligationsansatz

Die Konzentration der Insert-DNA wurde nach Gelelektrophorese und Vergleich mit dem verwendeten Marker abgeschätzt. Gegebenenfalls erfolgte eine Aufreinigung des Inserts aus dem Agarosegel.

Zur thermischen Auftrennung der DNA-Enden wurde die zu ligierende DNA für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Abhängig von der eingesetzten Ligase und entsprechenden Herstellerangaben wurden die Ligationsansätze 1-16 h bei Temperaturen zwischen 4-16°C inkubiert.

5.2.1.7 Transformationstechniken

Unter Transformation versteht man in der Gentechnik im allgemeinen die Übertragung gereinigter, auch rekombinanter DNA auf Bakterien oder höhere Zellen (Winnacker, 1990). Viele Bakterienarten können DNA mit geringer Effizienz aus dem Medium aufnehmen. Durch eine chemische oder physikalische Vorbehandlung kann die Transformationseffizienz der Zellen gesteigert werden. Man spricht dabei von der Herstellung kompetenter Zellen.

Zur Herstellung dauerkompetenter *E. coli* DH5 α oder *E. coli* XL10 Gold nach der RbCl-Methode (Hanahan *et al.*, 1985) wurden 10 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie einer LB-Agar-Stammpalte inokuliert und über Nacht inkubiert (180 rpm, 37°C). *E. coli* XL10 Gold ermöglicht, auf Grund des episomalen TN10-Transposons, den Einsatz eines Kanamycin-Selektionsmediums. Mit 2,5 ml dieser Übernacht-Vorkultur wurden 250 ml LB-Medium, das mit 20 mM MgSO₄ versetzt war, beimpft (200 rpm, 37°C). Erreichte die Hauptkultur eine OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 wurden die Zellen geerntet (5 min, 4500 x g, 4°C). Das Pellet wurde in

100 ml eiskaltem TFB1-Puffer (10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15 % (w/v) Glycerol, 30 mM KAc, pH 5,8; eingestellt mit 1 M Essigsäure) resuspendiert und nach Inkubation (5 min, 4°C) erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Pellets in 10 ml TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, Glycerol, 15 % (w/v), pH 6,5, eingestellt mit 1 M KOH) und eine Inkubation (15 - 60 min) auf Eis. Die kompetenten Zellen wurden zu je 50 µl aliquotiert, in einem Trockeneis/Ethanol-Gemisch schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nach der CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972; Mandel und Higa, 1970) wurden 50 ml LB-Medium 3 %ig mit der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{546nm} von 0,7 geschüttelt (200 rpm, 37°C). Nach Zellernte (7 min, 3800 x g, 4°C) wurde das Pellet in 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Der Ansatz wurde auf Eis inkubiert (30 min) und erneut zentrifugiert (7 min, 3800 x g, 4°C). Nach Aufnahme der Zellen in 0,6 - 1 ml eisgekühlter CaCl₂-Lösung (100 mM) wurden die kompetenten Zellen in 50-200 µl-Aliquots direkt zur Transformation eingesetzt.

Zur Transformation wurden 200 µl, auf Eis aufgetaute, kompetente Zellen jeweils mit 0,5 - 7,5 µl des Ligationsansatzes oder 0,5 - 2 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt. Die Ansätze wurden für 30 min auf Eis gelagert und anschließend für 45 s einer Inkubation bei 42°C (Hitzeschock) unterzogen (Rodriguez und Tait, 1983). Zur Regeneration der Zellen wurden den Ansätzen je 500 µl LB-Medium zugesetzt und anschließend ohne Selektionsdruck inkubiert (90 min, 37°C, 180 rpm). Aliquots von 50 µl bzw. 200 µl der Transformationsansätze wurden abschließend auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Detektion positiver Klone erfolgte über Blau-Weiß-Selektion (Sambrook *et al.*, 1989). Das F'-episomale β-Galaktosidase-Gen von *E. coli* ist im *lac*-Operon (Jacob und Monod, 1961) lokalisiert. Die zur Transformation eingesetzten *E. coli*-Wirtszellen wiesen eine N-terminale Deletion des *lacZ*-Gens auf (*lacZ*ΔM15), welches für das α-Peptid der β-Galaktosidase codiert. Die verwendeten Vektorsysteme ermöglichten eine α-Komplementierung (*lacZ'*) und somit die funktionelle Expression der β-Galaktosidase. Das *lac*-Operon unterliegt der Kontrolle des *lac*-Promotors/Operators. Das *lacI*-Gen codiert für ein Repressor-Protein, welches die Operator-Region besetzt. IPTG bindet als Induktor das LacI-Protein und löst so den Repressor-Operator-Komplex und ermöglicht die Transkription des Operons. Durch DNA-Insertion in die MCS des Vektors disruptiert das *lacZ'*-Gen. Religiert der Vektor ohne Insertion des DNA-Fragmentes, wird die β-Galaktosidase exprimiert und setzt das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff um. Bei Ligationserfolg bleiben die Klone weiß. Bei Verwendung von Vektoren pCRScript oder pGEM-T Easy wurde das Medium mit Ampicillin, X-Gal (0,002 %) und IPTG (40 µM) supplementiert. Im Falle des pCRC Script

wurde statt Ampicillin Chloramphenicol eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Transformationsansatz mit einer definierten Menge ungeschnittener Plasmid-DNA (Positivkontrolle).

5.2.1.8 Stammhaltung von Bakterienkulturen

Zur Stammhaltung von Bakterien wurden Vereinzelungsausstriche auf Nährböden hergestellt. Bakterien aus Einzelkolonien eines Transformationsansatzes wurden unter Selektionsdruck ausplattiert. Die Agarplatten werden nach Anzucht der Mikroorganismen mit Parafilm verschlossen und bei 4°C verwahrt. Es empfiehlt sich eine wochenweise Überimpfung auf frische Nährmedien. Zur Kryokonservierung von Bakterienkulturen wird ein Aliquot einer Flüssigkultur 30 %ig mit 87 %igem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

5.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmidäre und genomische DNA differieren bezüglich ihrer Konformation und weisen dadurch ein unterschiedliches Renaturierungsvermögen auf, was bei dieser Methode ausgenutzt wird. Bei der Präparation kann die kleinere, überspiralisierte Plasmid-DNA nach alkalischer Denaturierung und anschließender Neutralisierung wieder renaturieren und in Lösung gehen. Die hochmolekulare, genomische DNA ist nicht überspiralisiert und wird irreversibel denaturiert und ausgefällt. Die genomische DNA, sowie präzipitierte Zelltrümmer und Proteine, können durch Zentrifugation beseitigt werden. Die im Überstand verbleibende Plasmid-DNA wird anschließend gereinigt und aufkonzentriert.

Für Plasmidisolierungen wurden der „GFX Micro Plasmid Prep Kit“ der Fima Pharmacia, der „High Pure Plasmid Isolation Kit“ der Fima Roche Applied Science oder der „Nucleobond Kit“ der Firma Clontech nach jeweiligen Herstellerangaben verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in Tris-Puffer aufgenommen und bei 4°C bis -70°C gelagert. Auf den Zusatz von EDTA wurde verzichtet, um nachfolgende Mg²⁺-abhängige Enzymreaktionen nicht zu behindern.

5.2.1.10 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit

Die photometrische Bestimmung der genauen Konzentration einer Nukleinsäure-Probe erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke:

1 cm). Da die Messwerte durch Verunreinigungen mit Proteinen verfälscht werden können, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt, wurde die Reinheit der Nukleinsäure-Probe aus dem Quotienten der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Das Verhältnis liegt bei einer reinen DNA-Probe zwischen 1,8 und 2,0. Ist die Reinheit einer Probe gewährleistet, entspricht eine optische Dichte von 1, gemessen bei 260 nm, einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und einer Konzentration von 40 µg/ml für RNA.

Die Konzentration einer Nukleinsäure-Probe ergab sich nach dem Lambert Beer'schen Gesetz:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (A_{260} - A_{310}) \times \varepsilon \times \text{VF}$$

c Konzentration der Nukleinsäure-Probe

A_{260} Absorption bei 260 nm

A_{320} Absorption bei 320 nm

ε massenbezogener Extinktionskoeffizient

(für DNA = 50 ml/(µg x cm), für RNA = 40 ml/(µg x cm))

VF Verdünnungsfaktor

Der bei A_{310} gemessene Wert entspricht der Grundabsorption.

5.2.1.11 Doppelstrangsequenzierung

Die Identifizierung plasmidärer DNA-Sequenzen erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Es handelt sich um ein zyklisches Amplifikationsverfahren (vgl. Kap. 5.2.1.1), bei dem es durch Einbau zugesetzter 2', 3'-Didesoxyanalogons (ddNTPs) zum Kettenabbruch kommt.

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „Big Dye Sequencing Kit“ der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Dieser beinhaltet neben Puffern, dNTPs und Thermosequenase vier verschiedene Fluorophor-markierte Didesoxynukleotide. Zum „Big Dye Mix“ (4 µl) wurden Plasmid-DNA (500 ng) und Sequenzierprimer (7,5 pmol) gegeben und mit H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Das Amplifikations-Programm lautete wie folgt: Denaturierung, 94°C für 30 s; Hybridisierung, 43-50°C für 15 s; Elongation 60°C für 4 min; 25 Zyklen. Nach Abschluss der Reaktion wurde der Ansatz, unter Verwendung von Gelfiltrationskartuschen (0,7 ml) der Firma MoBiTech, nach Herstellerangaben aufgereinigt, in der SpeedVac-Anlage getrocknet und abschließend in Formamid-Lösung aufgenommen.

Die Auftrennung der ssDNA-Fragmente durch Kapillarelektrophorese und die Detektion erfolgten mittels des ABI Prism 310 der Firma Perkin Elmer.

5.2.1.12 Elektronische Verarbeitung von Sequenzdaten

Die durch die Sequenzanalyse generierten Elektropherogramme wurden mit Hilfe des Programmes „Chromas“ (Version 1.45, Technelysium Pty Ltd., <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) ausgewertet. Zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen und für Homologievergleiche wurden das Programmpaket und die Datenbanken des HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, Version 4.0, DKFZ Heidelberg), „Clustal X Multiple Sequence Alignment Program“ (Version 1.8, The National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet. Für Homologievergleiche von Antikörpersequenzen wurde die „Kabat-Datenbank“ (Kabat et al., 1987; <http://immuno.bme.nwu.edu>) herangezogen. Zur Charakterisierung und Auswahl von Primern und Sonden wurden die Programme „Primer Calculator“ (Williamstone Enterprises, <http://www.williamstone.com>) und „Primer3“ (<http://www-genome.wi.mit.edu>) eingesetzt. Virtuelle Klonierungen und Restriktionen konnten mit Hilfe des Programms „Clone Manager 5.03“ durchgeführt werden und entsprechende Plasmide durch das Programm „Enhance“ (Scientific & Educational Software) dargestellt werden.

5.2.1.13 Sondenherstellung durch Biotinylierung von DNA

Bei diesem PCR-Verfahren (Kap. 5.2.1.1) wurden mit einem biotinylierten Linker fusionierte dUTPs zur Synthese eines PCR-Amplikons eingesetzt. Der Anteil der bio-11-dUTPs am dNTP-Mix betrug 20 %. Die PCR erfolgte unter Verwendung von 0,5 U Neotherm-*Taq*-Polymerase der Firma Gencraft (Münster). Die Sonde wurde bis zur Verwendung im Nukleinsäure-Blot (5.2.1.14) bei -20°C gelagert.

5.2.1.14 Southern Blot-Analyse

Spezifische DNA-Sequenzen können durch Hybridisierung mit markierten Nukleinsäuremolekülen (Sonden) nachgewiesen werden. Eine direkte Hybridisierung von Nukleinsäuren im Agarosegel führt zu starken unspezifischen Hintergrundhybridisierungen (Brown, 1993). Mittels eines Southern-Blots (Southern, 1975) wird DNA aus einem Agarosegel zunächst auf eine Nylonmembran transferiert.

Nach Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese mit einer sequenzspezifischen, markierten Sonde hybridisiert. Der Nachweis des DNA-Sonden-Hybrids wurde mittels eines Antikörperkonjugats geführt. Der Detektion liegt eine Farbreaktion zugrunde, bei der ein an den Antikörper gebundenes Enzym ein spezifisches Substrat unter Präzipitation eines Farbstoffes umsetzt.

Nach der Gelelektrophorese (Kap. 5.2.1.2) wurde das Agarosegel mit 0,1 M HCl überschichtet und die DNA für 10 min depurinisiert. Die dabei entstehenden Strangbrüche in der DNA erleichtern den Transfer der DNA-Fragmente auf die Membran. Das Gel wurde anschließend für je 30 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und Neutralisierungspuffer (2 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 5,5) inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gel in H₂O gewaschen.

Für den Transfer wurde die Turboblott-Apparatur (Schleicher und Schuell, Dassel) mit saugfähigem Zellstoff und drei Lagen GB002-Papier präpariert. Eine vierte Lage Whatman-Papier wurde vor Auflage für 10 min in SSC-Puffer (20 x, 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) inkubiert. Eine Nylon-Membran (Qiagen) wurde luftblasenfrei auf dem Papier platziert und das vorbehandelte Agarosegel und drei weitere Lagen GB002-Papier auf diesem aufgelegt. Nach Auffüllen des Turboblotter mit SSPE-Puffer (20 x) wird eine Papierbrücke aus Whatman-Papier über den Blotaufbau gelegt und die Enden in das Pufferreservoir getaucht.

Nach vierstündigem Kapillartransfer der DNA auf die Nylonmembran wurde diese zur Fixierung für fünf Minuten mit UV-Licht bestrahlt (302 nm). Die Membran wurde anschließend entweder in Folie eingeschweißt oder direkt für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt und bei 4°C gelagert. Dazu wurde sie in einer Hybridisierungsröhre platziert und mit 30 ml Hybridisierungslösung (5 x SSC, 0,02 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, 1 % (w/v) Blocking Reagenz, zu lösen bei 70°C) für eine Stunde bei 60°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Währenddessen wurden 20 µl des Sondenamplifikats 10 min bei 95°C denaturiert, anschließend für 5 bis 10 min auf Eis gelagert und in 25 ml Hybridisierungslösung aufgenommen. Nach der Prähybridisierung wird die

Sondensuspension gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht. Die anschließende Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60-68°C.

Die Nylonmembran wurde nach der Hybridisierung zunächst zweimal für 5 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer I (2 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS) und anschließend zweimal für 15 min bei 60-68°C mit Waschpuffer II (SSC 0,1 x, SDS 0,1 % (w/v)) gewaschen. Die Immundetektion orientierte sich an den Angaben des NBT-BCIP-Protokolls der Firma Roche Applied Science. Die Membran wurde für 40 min bei Raumtemperatur mit *Immuno-Blocking*-Lösung (TBS-Puffer mit 0,5 % (w/v) Blocking Reagenz, zu lösen bei 70°C) behandelt, daraufhin dreimal für je 10 min in 30 ml TBS-Puffer gewaschen und anschließend für 60 min in Streptavidin-AP-Lösung (5 µl Streptavidin-AP-Konjugat in 10 ml TBS-Tween (0,1 % (w/v) Tween 80)) inkubiert. Das Streptavidin-Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen der Membran mit je 30 ml TBS-Tween entfernt und die Membran zur Farbreaktion aus der Hybridisierungsröhre in eine Schale überführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml NBT/BCIP-Lösung (200 µl NBT/BCIP-Stammlösung in NBT/BCIP-Puffer mit 0,1 M Tris, 0,05M MgCl₂, 0,1 M NaCl, pH 7,5) initiiert und durch Zugabe von Stopp-Lösung (2 M H₂SO₄ in 1:1000-Verdünnung) beendet.

5.2.1.15 Sicherheitsbestimmungen

Alle gentechnischen Arbeiten wurden gemäß dem „Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik“ (Gentechnikgesetz) vom 1. Juli 1990 unter Berücksichtigung der in § 7, Absatz 1 aufgeführten Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt. Die Anmeldung der Arbeiten erfolgte gemäß § 8, Absatz 1 und § 11 des Gentechnikgesetzes.

5.2.2 Spezielle Methoden: rekombinante Antikörper

5.2.2.1 Isolierung von RNA aus Hybridomzellen

Aus verschiedenen Hybridomzelllinien (Köhler und Milstein, 1975) wurde Gesamt-RNA der monoklonalen Antikörper IT-1 3B8, IT-1 3B8/E6 gegen humanes Herz-Fettsäurebindungsprotein und CEA 2-4.4, CEA 3-55.4 gegen carcinoembryonales Antigen isoliert. Die Hybridomzellen wurden von der Gruppe Immuntechnik des ICB Münster in einer Spinner-Kultur unter Verwendung von RPMI 1640-Fertigmedium, dem 10 % FCS (*fetal calf serum*, 10 % (v/v)) zugesetzt wurde zur Verfügung gestellt.

Zur Isolierung mit dem peqGold RNA Pure-Kit der Firma peqLab wurden 8×10^6 bis 1×10^7 Zellen eingesetzt. Bei diesem Verfahren wird zur Denaturierung der Proteine, unter geringem RNA-Verdau, Guanidiniumisothiocyanat eingesetzt und die RNA anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt.

Für die anschließende Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde das Oligotex mRNA Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Dessen zufolge werden 1-3 % mRNA aus der eingesetzten Gesamt-RNA gewonnen. Die Lagerung der isolierten Gesamt-RNA und der mRNA erfolgte bei -80°C .

5.2.2.2 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Die reverse Transkription und cDNA-Synthese von Gesamt-RNA und mRNA wurde mittels der reversen Transkriptase Superscript II der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Reaktion wurde der Primer Oligo (dT)_{12,18} -Not I aus dem First-Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Pharmacia verwendet. Zunächst erfolgte eine Präinkubation des Ansatzes, bestehend aus 0,5 µg Oligo (dT)_{12,18} -Not I-Primer, 1-5 µg Gesamt-RNA oder 50-500 ng mRNA, 5 x First Strand-Puffer, 0,1M DTT und 2,5 mM dNTPs, für 2 min bei 42°C . Anschließend wurden 300 U Superscript II-RT zugegeben und die cDNA-Synthese für 50 min bei 42°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Hitze (15 min, 72°C) gestoppt. Die cDNA wurde entweder sofort zu weiteren PCR-Reaktionen eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

5.2.2.3 PCR zur Amplifikation von V_H- und V_L-Sequenzen

Zur Amplifizierung (vgl. Kap. 5.2.1.1) der V_H- und V_L-Sequenzen monoklonaler Antikörper, ausgehend von revers transkribierter cDNA, wurden nach Literaturangaben (Orlandi *et al.*, 1989, Clackson *et al.*, 1991, Schmengler, 2000) Primer ausgewählt, die mit konservierten Sequenzbereichen dieser funktionellen Regionen hybridisieren. Diese wurden entweder in ihrer Originalsequenz verwendet oder es wurden modifizierte Primer von ihnen abgeleitet.

Tab. 5.1: Primer zur Amplifikation von V_H- und V_L-Sequenzen

Schnittstellenregionen der Primer sind unterstrichen. Modifikationen sind kursiv gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)	Schnittstelle
5'-VH1BACK ^{b)}	aggtsmar <u>ctgcags</u> sagtcwgg	22	<i>Pst</i> I
5'-V _H BASPEZ ^{b, a)}	agggtccag <u>ctgcag</u> cagtcagg	22	<i>Pst</i> I
5'-V _H Nsil ^{b, d)}	aggtsmar <u>atgcats</u> sagtcwgg	22	<i>Nsi</i> I
3'-VH1FOR ^{b)}	tgaggagac <u>ggtgacc</u> gtggtcacctggccccag	34	<i>Bst</i> EII
3'-BstEII ^{d)}	gac <u>ggtgacc</u> gtggtcacctggccccagacatcga agtaccgataaccatc	48	<i>Bst</i> EII
5'-VK2BACK ^{c)}	gacattgag <u>ctc</u> accagtcctcca	24	<i>Sac</i> I
3'-V _K 4FOR ^{a, c)}	ccgttttat <u>ctcgag</u> cttggtccc	24	<i>Xho</i> I

s = g/c, m = a/c, r = a/g, w = a/t

^{a)}Schmengler, 2000, ^{b)}Orlandi *et al.*, 1989, ^{c)}Clackson *et al.*, 1991, ^{d)}diese Arbeit

Zur PCR wurden je Ansatz 10 nmol dNTP-Mix, je 25 pmol eines 5'-, bzw. 3'-Primers, 2 µl cDNA aus mRNA und 5 µl Gesamt-RNA, 1,25 U *Pfu*-Polymerase und 5 µl des 10 x *Pfu*-Polymerase-Reaktionspuffers eingesetzt. Das Endvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 50 µl.

Nach Herstellerangaben des „Mouse ScF_v Module/Recombinant Phage Antibody SystemKit“ (Pharmacia) wurde folgendes PCR-Programm abgeleitet:

Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	}	30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min		
Hybridisierung	50 °C	2 min		
Elongation	72 °C	2 min		
terminale Elongation	72 °C	10 min		

Der Erfolg der Amplifikationen wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Zur weiteren Charakterisierung der PCR-Produkte wurden diese in pGEM-T Easy- oder pCRScript-Vektoren kloniert (Kap. 5.2.1.5). Nach Transformation in *E. coli* DH5 α oder *E. coli* XL10 Gold (Kap. 5.2.1.7) wurden die Plasmide Restriktionsanalysen unterzogen (Kap. 5.2.1.3) und anschließend sequenziert (Kap. 5.2.1.11).

5.2.2.4 Modifikation des Expressionsvektors pASK84-D1,3 zur F_{ab}-Produktion

Zur periplasmatischen Expression rekombinanter F_{ab}-Fragmente wurden die amplifizierten und charakterisierten V_H- und V_L-Fragmente in den Expressionsvektor pASK84-D1,3 (Skerra, 1994) gerichtet kloniert. Der Vektor pASK84-D1,3 beinhaltet die variablen Regionen des anti-Lysozym-Antikörpers D1,3, welche durch Restriktionen (Kap. 5.2.1.3, Kap. 5.2.1.5) sukzessive durch V_H- und V_L-Fragmente der hier interessierenden Antikörper ausgetauscht wurden. Im ersten Schritt wurden durch *Bst*EII- und *Pst*I-Restriktionen des Vektors pASK-D1,3 das D1,3-V_H-Fragment isoliert und der linearisierte Restvektor über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (Kap. 5.2.1.4). Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration des Fragmentes nach Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Zwischenklonierte V_H-Fragmente anderer Antikörper (s. Kap. 5.2.2.3), welche die gleichen oder kompatible Restriktionsschnittstellen aufwiesen, wurden auf gleiche Weise vom Restvektor abgetrennt und zur Ligation (Kap. 5.2.1.6) mit dem linearisierten Expressions-Restvektor mit einem Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit Hilfe von T4-DNA-Ligase bei 14°C über Nacht. Nach Charakterisierung des Zwischenproduktes durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung (Kap. 5.1.2.11) wurde im zweiten Schritt zur Substitution der V_L-Fragmente in gleicher Weise verfahren, wie beim Austausch der V_H-Fragmente. Zur Isolierung der V_L-Fragmente wurden die Restriktionsenzyme *Sac*I und *Xho*I eingesetzt. Das Klonierungs-Endprodukt wurde nach Transformation in *E. coli* DH5 α oder *E.*

coli XL10 (Kap. 5.2.1.7), sowie per Restriktions- und Sequenzanalysen (Kap. 5.2.1.3, Kap. 5.2.1.11) überprüft.

5.2.2.5 *Splice Overlap Extension (SOE)-PCR zur Amplifikation von scF_v-Fragmenten*

Mit Hilfe der SOE-PCR (Horton *et al.*, 1990, Lefebvre *et al.*, 1995) wurden V_H- und V_L- Fragmente über eine Linker-Sequenz (93 bp), deren Termini komplementär zum 3'-Ende des V_H- Fragmentes, bzw. zum 5'-Ende des V_L- Fragmentes sind, miteinander verknüpft (Deng *et al.*, 2003, Cheng *et al.*, 2003). Dabei wird ein Linker-Primer-Mix des „Mouse ScF_v Module/Recombinant Phage Antibody System Kits“ (Pharmacia, 1992) eingesetzt, der für ein (Gly₄Ser)₃-Motiv codiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)	Schnittstelle
5'-Linker-Primer	ggcaccac <u>gggtcaccgtctcctca</u>	24	<i>BstEII</i>
3'- Linker-Primer	tggagactgagtgagctcgatgtc	24	<i>SacI</i>

Für die Auffüllreaktionen wurden äquimolare Mengen an geluierter V_H- und V_L-DNA, nach Abschätzung durch Agarose-Gelelektrophorese, eingesetzt. Für einen 50 µl-Reaktionsansatz wurden 3 µl des Linker-Primer-Mix und 2,5 U Biotherm *Taq*-Polymerase verwendet. Nach Herstellerangaben wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	1 min	} 20 Zyklen
Hybridisierung und Elongation	63 °C	4 min	

Die scF_v-Fragmente wurden in einer weiteren PCR vervielfältigt. Durch den Gebrauch des RS-Primer-Mix des „Mouse scF_v Module/Recombinant Phage Antibody System Kits“ (Pharmacia) wurden gleichzeitig durch den 5'-Primer eine *SfiI*- und durch den 3'-Primer eine *NotI*-Schnittstelle generiert. Dies wurde zur gerichteten Klonierung des scF_v-Fragmentes in ein pET-Expressionssystem genutzt. Je 1 µl der Auffüllreaktionen, so wie je 2 µl des RS-Primer-Mix und 2,5 U Biotherm *Taq*-Polymerase wurden zur Amplifikation eingesetzt.

Die Reaktion erfolgte nach folgendem PCR-Protokoll:

Denaturierung	94 °C	2 min	}	30 Zyklen
Hybridisierung	50 °C	2 min		
Elongation	72 °C	2 min		

Die Amplikons wurden anschließend gelelektrophoretisch durch Zwischenklonierungen in pGEMT easy- oder pCRScript-Vektoren (Kap. 5.2.1.5), sowie Restriktions- und Sequenzanalysen (Kap. 5.2.1.3, Kap. 5.2.1.11), nach Transformation von *E. coli* DH5 α oder *E. coli* XL10 (Kap. 5.2.1.7) überprüft.

5.2.2.6 PCR zur Amplifikation von scF_V-Fusions-Fragmenten

Ausgehend von einem scF_V-Fragment (vgl. Kap. 5.2.2.4) wurde der Linker-, sowie der V_L-Bereich erneut amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden sowohl ein His-Tag, als auch ein c-myc-Tag und diverse Restriktionsschnittstellen generiert, welche die Excision dieser Tags, die Insertion eines CSav-Tags und die gerichtete Klonierung des Linker- und des V_L-Bereiches eines scF_V-Fragmentes in den Expressionsvektor pASK84 ermöglichten.

Tab. 5.2: Primer zur Amplifizierung von scF_V-Fusions-Fragmenten

Schnittstellenregionen der Primer sind unterstrichen. Für den c-myc-Tag codierende Regionen sind fett, die des His-Tags ist fett kursiv gedruckt, das inserierte Stop-Codon ist kursiv markiert .

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)	Schnittstelle
5'-BstEIIRev	ggccaagggaccacggtcaccgtc	24	BstEII
3'-Mega1	ttctgagatgagtttttgttc <u>ggagatctccatggc</u>	60	<i>Bgl</i> II <i>Nco</i> I
	cogttttatctcgagcttgggtccc		<i>Xho</i> I
3'-Mega2	<u>ttaagctttca</u> atgatgatgatgatg <u>gtcgacc</u>	62	<i>Hind</i> III <i>Sal</i> I
	agatcctcttctgagatgagtttttg		

Da ein einzelner 3'-Primer, welcher alle Attribute beinhaltet, auf Grund seiner Länge eine effiziente Amplifizierung beeinträchtigen könnte, wurde eine Zwei-Stufen-PCR durchgeführt, bei der zunächst der 3'-Primer Mega1 mit dem 5'-Primer BstEIIRev eingesetzt und das Amplikon als Matrize für eine anschließende PCR mit der Primerkombination 5'-BstEIIRev/3'-Mega2 verwendet wurde. Weiterhin enthielten die Reaktionsansätze, bei einem

25 µl Endvolumen, 5 nmol dNTP-Mix, je 12,5 pmol der 5'-, bzw. 3'-Primer, 0,63 U *Pfu*-Polymerase und entsprechende Mengen des 10 x *Pfu*-Polymerase-Puffers. Das PCR-Programm entsprach dem zur Amplifikation von V_H - und V_L -Fragmenten (Kap. 5.2.2.3), als Hybridisierungstemperatur wurde 55°C gewählt.

Zur weiteren Charakterisierung der PCR-Produkte wurden diese in pGEMT Easy-Vektoren kloniert (Kap. 5.2.1.5), die Plasmide nach Transformation von *E. coli* DH5 α isoliert (Kap. 5.2.1.9) und sequenziert (Kap. 5.2.1.11).

5.2.2.7 Modifikation des Expressionsvektors pASK84-D1,3 zur scF_V-Produktion

Die Verwendung eines pET-Expressionssystems zur scF_V-Produktion erfordert die Renaturierung des Proteins aus Einschlusskörpern. Daher wurde durch die Modifikation des Vektors pASKIT1 (Kap. 6.1.1.4) ein Expressionsvektor konstruiert, welcher die Möglichkeit zur periplasmatischen Expression von IT1- scF_V-Fragmenten bietet. Die Detektion des scF_V-Fragmentes kann durch den His-Tag oder den c-myc-Tag erfolgen. Restriktionsschnittstellen gewährleisten die Excision dieser Tags und die Insertion eines CSav-Tags zur Aufreinigung des Antikörperfragmentes. Der Vektor pASKIT1 wurde mittels *Bst*EII/*Hind*III-Restriktionen (Kap. 5.2.1.3) von den C_{H1} -, V_L - und C_{L1} -Sequenzen befreit und der linearisierte Restvektor über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (Kap. 5.2.1.4). Der Vektor pGscIT1 (Kap. 6.1.1.5) diente als Matritze zur Amplifikation von scF_V-Fusions-Fragmenten (Kap. 5.2.2.5). Das entstandene Linker- V_L -Tag-Produkt wurde, nach einer Zwischenklonierung in pGEM-T Easy (pGMegIT1, Kap. 6.1.1.6) und Überprüfung durch Restriktions- und Sequenzanalyse, ebenfalls mit *Bst*EII und *Hind*III geschnitten und somit zur Ligation mit dem pASKIT1-Fragment präpariert. Das Ligationsprodukt pASKscFvIT1 wurde nach Transformation in *E. coli* DH5 α charakterisiert (Kap. 5.2.1.7).

Die SOE-PCR (Kap. 5.2.2.4) weist im Linkerbereich eine hohe Mutationsanfälligkeit auf (s. Kap. 6.1.1.3). Wird die für den pASKscFvIT1 beschriebene Klonierungsstrategie auf die Modifikation des Vektors pASK84-D1,3 appliziert, bietet sie, ausgehend von einem korrekt amplifizierten, inserierten scF_V-Fragment, nun die Möglichkeit des beliebigen Austausches von V_H - und V_L -Fragmenten weiterer Antikörper, ohne dass es weiterer Amplifikationen des Linkerbereiches bedarf. Im Falle des pASKscFvIT1 ist ein weiterer Austausch des V_H -Fragmentes durch *Pst*I/*Bst*EII-Restriktionen nicht möglich, da die *Pst*I-Schnittstelle im Vektor zerstört wurde.

5.2.2.8 Anzucht und Expression rekombinanter Antikörperfragmente

Die Anzucht und Expression rekombinanter Antikörperfragmente mittels des Expressionsvektors pASK84 erfolgte nach Literaturangaben (Skerra, 1994). Zur periplasmatischen Expression wurde *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) mit den entsprechenden Vektoren transformiert. Die Vorbereitung der Expression erfolgte durch Vorkultur in 30 ml LB-Ampicillin-Medium im 100 ml Schikanekolben, die über Nacht bei 180 rpm und 37°C geschüttelt wurde. Zur Hauptkultur wurden sechs 1 l-Schikanekolben mit einem Gesamtvolumen von zwei Litern LB-Ampicillin-Medium beschickt. Die Inkubation erfolgte bei 220 rpm und 22°C bis zu einer OD_{550nm} von 0,6 bis 0,8. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (finale Konzentration) induziert und die Zellen weiter kultiviert. Die Bakterienernte erfolgte nach 3 h Inkubation durch Zentrifugation (15 min, 2740 x g, 4°C) und vorsichtigem Abdekantieren des Überstandes. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellpellets bei -20°C gelagert.

5.2.3 Spezielle Methoden: Kern-Streptavidin

5.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *Streptomyces avidinii*

Zur Anzucht von *Streptomyces avidinii* DSMZ Nr. 40526 wurden zwei DSMZ-Stammkulturblättchen in je einem 100 ml-Schikanekolben mit jeweils 50 ml GYM-Medium über Nacht bei 180 rpm und 28°C kultiviert. Von der Zellenfeuchtmasse wurden 2 g nach Zellernte (10 min, 3800 x g, 4°C) durch Zugabe von 20 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8,0) und 100 mg Lysozym resuspendiert und für 25 min bei 37°C protoplastiert. Nach Zugabe von 2 ml SDS-Lösung (10 % (w/v)) und 100 µl Proteinase-K-Lösung (10 mg/ml in Lyse-Puffer) wurden die Protoplasten für 30 min bei 70°C im Wasserbad lysiert, bis die Zellsuspension klar und viskos war. Das Lysat wurde auf Eis abgekühlt und mit 5 ml Neutralisierungspuffer (5 M Kaliumacetat) versetzt und nach vorsichtigem Invertieren des Reaktionsgefäßes für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (10 min, 3800 x g, 4°C), der die genomische DNA enthaltende Überstand zu je 350 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert und mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol (-20°C) versetzt. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die genomische DNA in Form eines weißen Flockens präzipitiert und durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde in 600 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 2 µl RNase-Lösung (20 mg/ml (w/v)) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die wässrige

Nukleinsäure-Lösung wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987) von Proteinen, Polysacchariden und SDS befreit. Sie wurde dazu in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen mit je einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Die wässrige Phase wurde anschließend durch 5-minütige Zentrifugation bei 12000 x g von der organischen Phase getrennt und ohne die Interphase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde erneut mit dem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch extrahiert. Um anschließend Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurde der Ansatz zweimal mit je einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase befindliche DNA wurde einer Alkoholpräzipitation unterzogen und mit einem Volumen Isopropanol nach erneuter Zentrifugation (30 min, 4000 x g, 4°C) als weißlicher Flocken gefällt. Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer überführt und über Nacht bei 37°C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

5.2.3.2 PCR zur Amplifikation von Kern-Streptavidin-Sequenzen (CSav)

Zur Amplifizierung (vgl. Kap. 5.2.1.1) der Kern-Streptavidin-Sequenz (CSav) (Sano, 1995), ausgehend von genomischer DNA, wurden nach Literaturangaben Primer ausgewählt. Um eine Klonierung in den Expressionsvektor pET3c (Novagen) zu ermöglichen, enthielten die Primer Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI*.

Tab. 5.3: Primer zur Amplifizierung von CSav-Sequenzen

Schnittstellenregionen der Primer sind unterstrichen. Das inserierte Stopp-Codon ist kursiv markiert .

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)	Schnittstelle
5'-Strep5	aac <u>atat</u> tgggcatcaccggcacctggta	28	<i>NdeI</i>
3'-Strep3	ttggatcc <u>ct</u> acaccttggtgaaggtggtgctcgt	34	<i>BamHI</i>

Für die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 25 µl wurden 5 nmol dNTP-Mix, je 12,5 pmol der 5'-, bzw. 3'-Primer, 0,63 U *Pfu*-Polymerase und entsprechende Mengen des *Pfu*-Polymerase-Puffers eingesetzt. Das PCR-Programm entspricht dem zur Amplifikation von V_H- und V_L-Fragmenten (Kap. 5.2.2.3), mit einer Hybridisierungstemperatur von 58°C. Der Erfolg der Amplifikationen wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden diese in pGEMT Easy-Vektoren kloniert (Kap. 5.2.1.5) und nach Transformation in *E. coli* DH5α (Kap. 5.2.1.7) sequenziert (Kap. 5.2.1.11).

5.2.3.3 Erzeugung eines pET3c abgeleiteten Expressionsvektors zur CSav-Produktion

Zur cytosolischen Expression rekombinanten Kern-Streptavidins (CSav) wurden amplifizierte und charakterisierte CSav-Fragmente gerichtet in den Expressionsvektor pET 3c (Novagen) kloniert. Das zu inserierende Fragment wurde nach Restriktion (Kap. 5.2.1.3) des Vektors pGCSav mit *NdeI* und *BamHI* über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (Kap. 5.2.1.4). Der Vektor pET 3c wurde durch eine ebensolche Restriktion linearisiert und zur Ligation (Kap. 5.2.1.6) mit dem restringierten CSav-Fragment eingesetzt. Das Konstrukt pETCSav wurde nach Transformation in *E. coli* DH5α (Kap. 5.2.1.7) isoliert und per Restriktions- und Sequenzanalysen (Kap. 5.2.1.3, Kap. 5.2.1.11) überprüft.

5.2.3.4 Anzucht und Expression des rekombinanten Kern-Streptavidins (CSav)

Zur cytosolischen Expression des rekombinanten CSav wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mit dem Vektor pETCS transformiert. Die Anzucht und Expression erfolgte zunächst in 100 ml-Schikanekolben, welche mit 30 ml LB-Ampicillin-Chloramphenicol-Medium versetzt waren, nachfolgend wurde 1 l Medium 2 %ig mit einer frischen Übernacht-Kultur beimpft. Die Kulturen wurden bei 180 rpm und 37°C bis zu einer OD_{550nm} von 0,6 inkubiert und die

Expression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Nach 3-stündiger Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 3800 x g, bzw. 15000 x g, 4°C) geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

5.2.4 Spezielle Methoden: PCR-ELISA

5.2.4.1 PCR zur Reamplifikation von PCR-ELISA-Proben

Die beim PCR-ELISA-Verfahren verwendeten Marker-DNAs Label 1 und Label 2 wurden im Rahmen des EU-Projektes ULISA von der Firma Pharmagen (Madrid, Spanien) in pGEMT-Vektoren (Promega) kloniert und freundlicherweise in dieser Form zur Entwicklung eines PCR-ELISA erhalten. Zur Detektion des Amplifikats im PCR-ELISA wurde ein Dig-markierter 5'-Primer eingesetzt.

Tab. 5.4: Marker-DNA zur Optimierung des PCR-ELISA-Verfahrens

Die Primer-Regionen sind kursiv markiert .

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)
Label 1	<i>tagattggactcggcagcagcagcagataccacgtttacgatagccaagtt</i> <i>ccttccg</i>	46
Label 2	<i>tagattggactcggcagcagcagtttacgcagttacgacgatagccaagtt</i> <i>ccttccg</i>	46

Für die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 25 µl wurden 5 nmol dNTP-Mix, je 12,5 pmol der 5'-, bzw. 3'-Primer, 1,25 U *Taq*-Polymerase und 2,5 µl des 10 x des *Taq*-Polymerase-Puffers eingesetzt.

Das PCR-Programm wurde ebenfalls von der Firma Pharmagen vorgegeben:

Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	}	30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 sec		
Hybridisierung	50 °C	30 sec		
Elongation	72 °C	30 sec		
terminale Elongation	72 °C	4 min		

Der Erfolg der Amplifikationen wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

5.2.4.2 Reverse Hybridisierung

Für das PCR-ELISA-Verfahren wurden die Kavitäten Streptavidin beschichteter Mikrotiterstrips (Steffens) mit je 4 pmol biotinylierter Sonde in 100 µl Bindepuffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, pH 7,5, 0,15 % (w/v) Triton X-100) beschickt und die Sonde für 2 h bei Raumtemperatur immobilisiert. Zur alkalischen Denaturierung des PCR-Produktes wurden 25 µl des Amplikons mit 25 µl Denaturierungspuffer (125 mM NaOH, 20 mM Na₂EDTA) vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die Sondensuspension durch je 100 µl Hybridisierungspuffer (2,5 x SSC (375 mM NaCl, 37,5 mM Natriumcitrat), 2 x Denhardt's Reagenz (je 0,4 g/l Ficoll 400, Polyvinylpyrrolidon, BSA), 1 x Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA) ersetzt und 10 µl des denaturierten PCR-Produktes zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50°C für 30-60 min. Zur Entfernung nicht gebundener Amplikons wurden die Strips durch Ausschütten der Lösung und Ausklopfen über mehrere Lagen Zellstoff entleert und viermal für je 1 min bei 50°C mit Waschpuffer 1 (0,1 x SSC, 2 x Denhardt's Reagenz, 1 x Tris-EDTA) inkubiert. Die Immundetektion des Amplifikats erfolgte durch Zugabe von 100 µl Anti-Dig-F_{ab}-Fragmenten in Waschpuffer 2 (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,05 % (w/v) Tween20, 0,5 % (w/v) Blocking Reagenz zu lösen bei 70°C, 100 mg/l Hering Sperma-DNA) in einer Verdünnung von 1:3000 und wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Es folgten vier Waschschrte mit Waschpuffer 2 (1 min, RT). Zum colorimetrischen Nachweis des Anti-Dig-F_{ab}-Fragmentes, wurden je 200 µl pNPP-Lösung (pNPP 1 mg/ml in Reaktionspuffer (Glycin 100 mM, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM, pH 10,4) eingesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte bei OD_{405nm} im ELISA-Reader.

5.2.5 Spezielle Methoden: Maltosephosphorylase

5.2.5.1 Anzucht und morphologische Charakterisierung von *Lactobacillus brevis*

Zwei 100 ml-Schikanekolben mit jeweils 100 ml DSMZ-Medium 11 wurden mit je einem *Lactobacillus brevis* DSMZ Nr. 20556-Stammkulturblättchen inokuliert und über Nacht bei 180 rpm und 30°C kultiviert.

Zur morphologischen Identifizierung von *Lactobacillus brevis* und Differenzierung von *E. coli* wurde überprüft, ob die Zellen Gram-positiv sind. Bei der Gram-Färbung wurde die Eigenschaft ausgenutzt, dass Kristallviolett mit Jod Lacke bildet, die nicht mit Ethanol aus dem 40-schichtigen Mureinnetz der Zellwand Gram-positiver Bakterien entfernt werden können. Zur Gram-Färbung (Gram, 1884) wurden Lactobacilli und *E. coli* (Kontrolle) auf einen Objektträger aufgetropft und über offener Flamme hitzefixiert. Der Objektträger wurde für eine Minute in Oxalat-Gentianaviolettlösung (Ammoniumoxalat 0,8g in 80 ml H₂O, Gentianaviolett (Kristallviolett) 2g in 20ml 96 %igem Ethanol; beide Lösungen gut vermischen) getaucht und kurz mit H₂O abgespült. Danach wurde der Objektträger für eine Minute in Lugol'sche Lösung getaucht (KJ 0,3 g, J₂ 0,17g in 50 ml Aqua bidest.) und abschließend zur Zelldifferenzierung in 96 %iges Ethanol getaucht. Im Lichtmikroskop erschienen die Gram-positiven Zellen dunkelviolett, die Gram-negativen Zellen hellblau.

Beim KOH-Schnelltest wurde ein Tropfen KOH-Lösung (3 %ig) zu je einem Tropfen der zu testenden Bakterienkultur (*Lactobacillus brevis*, *E. coli*) gegeben. Mit einer Impföse wurde geprüft, ob durch eine Zell-Lysis und damit Freisetzung der DNA, die Viskosität der Ansätze erhöht wurde. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien wurde nicht lysiert, die Viskosität wurde nicht erhöht.

5.2.5.2 Isolierung genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis* wurde der „E.Z.N.A. Bacterial DNA-Kit“ der Fima peqlab nach Herstellerangaben eingesetzt. Aus einer ü.N.-Kultur wurden 3 ml zur Aufarbeitung verwendet. Der Zellverdau und die Lyse erfolgten unter Zugabe von Lysozym, BTL-Puffer und Proteinase K. Nach anschließendem RNase-Verdau wurde die Nukleinsäurelösung mit BDL und EtOH versetzt und auf eine HiBind-Zentrifugensäule gegeben. Von dieser wurde die DNA, nach zwei Waschschrinen, mit Tris-Puffer eluiert. Die isolierte genomische DNA wurde in Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5) aufgenommen und bei 4°C bis -70°C gelagert.

5.2.5.3 PCR zur Sequenzanalyse des Maltosephosphorylase-Gens (*mapA*) von *Lactobacillus brevis*

Zur Aufklärung der Primärstruktur des Maltosephosphorylase-Gens (*mapA*) von *Lactobacillus brevis* wurde der Genlocus sequenziell amplifiziert. Die Primerauswahl erfolgte nach Homologievergleichen bereits bekannter Bereiche des *mapA*-Gens (Firnges, 1997) mit den Nukleotidsequenzen der Maltosephosphorylase-Loci von *Lactobacillus sanfranciscensis* (Accession Nr. AJ224340), *Lactococcus lactis* (Accession Nr. AF039082) und *Bacillus subtilis* (Accession Nr. Z94043). Ferner wurden zur Primerauswahl röntgenkristallografische Untersuchungen zur Aufklärung der Primärstruktur auf Aminosäureebene (Egloff *et al.* 2001) herangezogen. Eine weitere Zugangsmöglichkeit zu unbekanntem Sequenzregionen bietet die inverse PCR. Die Methode basiert auf der Ligation linearer Restriktionsfragmente und der Amplifikation mit Primern, die spezifisch für bekannte Regionen sind und sich von diesen nach außen orientieren. So können Produkte erhalten werden, in denen bekannte Sequenzen unbekannte Sequenzbereiche einrahmen.

Um die Expression rekombinanter Maltosephosphorylase zu ermöglichen, wurde ein 2,2 kb-großes *mapA*-Fragment amplifiziert, welches gerichtet in pET15b- oder pET3d-Vektoren kloniert werden kann.

Tab. 5.5: Primer zur Amplifizierung von *mapA*-Sequenzen

Schnittstellenregionen der Primer sind unterstrichen. Das inserierte Stopp-Codon ist kursiv markiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)	Schnittstelle
5'-MPFOR2	caagacattgtcgcgacgg	18	
3'-MPREV1	agccaggcaccgcgtcattgamgtgatrtg	29	
5'-MPFOR3	aattgtattcacggacggcacg	22	
5'-K-FOR	aacgtaattacgcatact	18	
3'-TERM2	nacrtydatngtyaanggytcncc	24	
5'-MAPARECFOR	a <u>actcgaggccatggggaagcgtat</u> tttcgaagttc aaccttggaacgtaattacgcatacttttg	66	<i>XhoI NcoI</i>
3'-TERMREC	tt <u>ggatccc</u> ctaaacgtcgattgttaaaggct	31	<i>BstEII</i>
3'-TERMREC2	tt <u>ggatccc</u> ctanacrtydatngtyaanggytcncc	35	<i>BstEII</i>
5'-IMPEXFOR	cccaagacgtggacaagcta	20	
3'-IMPEXREV	tggagggaaatcgccactat	19	
5'-IMPINFOR	tccgtgatcgactgattgaa	20	
3'-IMPINREV	gcatccccatgtagccatta	20	

m = a/c, r = a/g, n = a/t/g/c, y = t/c, d = t/g/a

Für die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 25 µl wurden 5 nmol dNTP-Mix, je 12,5 pmol der 5'-, bzw. 3'-Primer, 0,63 U *Taq*-Polymerase und entsprechende Mengen des *Taq*-Polymerase-Puffers eingesetzt.

In Abhängigkeit von der Länge der Primer und der Größe der eingesetzten Matritze, wurden folgende PCR-Programme gewählt:

Initiale Denaturierung	94-95 °C	2-3 min	}	35 Zyklen
Denaturierung	94-95 °C	30-60 sec		
Hybridisierung	50-55 °C	30-120 sec		
Elongation	72 °C	2 min		
terminale Elongation	72 °C	10 min		

Der Erfolg der Amplifikationen wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

5.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden

5.3.1 Allgemeine Methoden

5.3.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel in einem Tris-Glycin-Puffersystem nach Lämmli (1970) durchgeführt. Die Sammelgel-Lösung wurde 10%ig mit Glycerin versetzt, um eine Durchmischung mit der überschichteten Trenngel-Lösung während der Polymerisation zu verhindern. Durch Dithiothreit (DTT) im Probenpuffer wurden reduzierende Bedingungen eingestellt. Die Proteinfixierung erfolgte in sauer-ethanolischer Lösung. Zur Visualisierung wurde eine Färbung mittels Comassie-Brilliant-Blau R250 durchgeführt (Börchers, 1987).

5.3.1.2 Western-Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE (Kap. 5.3.1.1) aufgetrennt wurden, konnten durch das Western-Blot-Verfahren immunchemisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck erfolgte ein Elektro-Transfer (100 mA pro 50 cm², 30 min) auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porengröße) mit einem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,5, 20% Methanol) nach Towbin *et. al* (1979). Nach dem Transfer wurde die Markerspur abgeschnitten und die

verbliebene Membran in TBS-BSA (3% BSA) geblockt (1-12 h, 37°C). Die Membran wurde anschließend dreimal in TBS-Tween (TBS mit 0,05 % (w/v) Tween20) gewaschen.

Zur Immundekoration wurden Antikörper-Peroxidase-Konjugate (Verdünnung 1:3000 in TBS mit 0,05 % (w/v) Tween20, 0,5 % (w/v) BSA) eingesetzt und für 1 h unter leichter Rotation mit der Membran inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-Tween (TBS mit 0,05 % Tween20) wurden zur Farbreaktion 12 mg 4-Chlor-1-Naphtol in 4 ml Methanol gelöst, mit 16 ml TBS-Lösung aufgefüllt und die Reaktion, unmittelbar vor Überschichtung der Membran, durch Zugabe von 12 µl H₂O₂ gestartet. Die Inkubation erfolgte unter leichter Rotation (1 h, RT) und wurde durch Waschen mit H₂O beendet.

Für die Detektion von His-tag Proteinen wurde Ni-NTA-AP-Konjugat der Firma Qiagen nach Herstellerangaben eingesetzt und die Farbreaktion unter Verwendung von NBT-BCIP durchgeführt.

Die abgetrennte Markerspür wurde einer Färbung mit Indian Ink (Holtzhauser, 1997) unterzogen. Zu diesem Zweck wurde die Membran viermal mit TBS-Tween (TBS mit 0,3 % (w/v) Tween20) gewaschen und anschließend über Nacht in einer TBS-Tween-Lösung mit 1 % Essigsäure und 0,1 % schwarzer Tinte inkubiert. Nach dem Färbevorgang wurde die Membran zweimal in TBS-Tween gewaschen (TBS mit 0,3 % (w/v) Tween20) und luftgetrocknet.

5.3.1.3 MALDI-TOF

Zur Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisierungs-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) wurden die Protein-Proben mit verschiedenen kristallisierenden Matrices versetzt, welche durch Laserimpulse angeregt wurden. Durch den Übertrag der Energieanregung auf die Proteinmoleküle erfolgte deren Ionisierung und Desorption. In einem elektrischen Feld wurden die ein- bis dreifach geladenen Kationen beschleunigt und deren Flugzeit detektiert, welche sich direkt proportional zum Quotienten aus Masse und Ladung (M_r/z) verhielt. Zur Minimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden 100 einzelne Spektren aufsummiert. Vor einer Messung wurde das Gerät mit Carboanhydrase, BSA und einem monoklonalen Referenz-Antikörper kalibriert.

Zur Bestimmung der Molekularmasse der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis*, wurde aufgereinigtes Protein (Hüwel, 1998), in einer Konzentration von 12,4 mg/ml (178,6 U/ml) in Citratpuffer (10 mM Citrat, pH 6,5) freundlicherweise von Hermann vom Bruch (ICB, Münster) zur Verfügung gestellt. Von dieser Probenlösung wurden 4 µl mit dem „Zip Tip-Kit“ der Firma Millipore nach Herstellerangaben aufgereinigt. Je 1 µl des Präparates

wurden mit 1,5 µl der Matrizes 6-Azathiothymin mit 0,1 % Trifluoressigsäure (6-ATT) oder 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (DHBS) auf den Probenträger aufgebracht.

Die Messungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Horneffer am Institut für Medizinische Physik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt.

5.3.2 Spezielle Methoden: rekombinante Antikörperfragmente

5.3.2.1 Periplasmatische Isolierung von Antikörperfragmenten

Nach Anzucht und Expression rekombinanter Antikörperfragmente (Kap. 5.2.2.8), erfolgte ihre Isolierung aus dem Periplasma von *E. coli* JM83. Die geernteten und tiefgefrorenen Zellpellets einer 2 l-Kultur wurden aufgetaut und anschließend in 20 ml Resuspensionspuffer (0,5 M Saccharose, 5 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8,0) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Sphäroblastensuspension wurde zentrifugiert (15 min, 2740 x g, 4°C) und der Überstand als periplasmatische Fraktion gegen 2 l Chromatographiepuffer (0,5 M Glycin, 50 mM H₂NaPO₄, pH 7,5) dialysiert (ü.N., 4°C). Nachfolgend wurde das Periplasma sterilfiltriert. Zur Vorbereitung der Isolierung rekombinanter Antikörperfragmente aus dem periplasmatischen Überstand wurden 5 ml Ni-NTA-Agarose zunächst regeneriert. Zu diesem Zweck wurde die Agarose auf eine Fritte, welche auf einer Absaugglasflasche platziert war, gegeben und sukzessive mit 20 ml Harnstoff (6 M), EDTA (50 mM) und NiCl₂ (10 mg/ml) aufgerührt und abgesaugt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Agarose mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde die Agarose drei- bis viermal mit je 60 ml Ni-NTA-Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) behandelt.

Um eine möglichst effiziente Anbindung der His-tag fusionierten Antikörperfragmente an die Ni-NTA-Agarose zu gewährleisten, wurde diese für 1 h mit dem periplasmatischen Überstand gerührt. Zur fraktionierten Aufreinigung der rekombinanten Antikörperfragmente wurde die beladene Agarose in eine HiLoad 10/10-Säule (Pharmacia) gefüllt und an eine FPLC-Anlage angeschlossen. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde das Säulenmaterial gewaschen, bis bei 280 nm ein konstant niedriger Wert detektiert wurde. Die Elution rekombinanter Antikörperfragmente erfolgte dann mittels eines Stufengradienten des Imidazolpuffers (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 8,0, Flussrate 0,2 ml/min). Um die Absorption des Imidazols bei 280 nm auszublenden, wurden die Fraktionen mit Hilfe einer Kapillarsäule (biotop) gegen PBS dialysiert.

5.3.2.2 ELISA zur Detektion rekombinanter F_{ab}-IT1-Antikörperfragmente

Zur Detektion von periplasmatisch isolierten F_{ab}-IT1-Antikörperfragmenten wurden die einzelnen Fraktionen der Ni-NTA-Chromatographie mittels dieses ELISA-Formates auf das Vorhandensein von Antikörperfragmenten untersucht.

Alle Inkubationsschritte wurden in einem Volumen von 200 µl/Kavität in F96 MaxiSorb Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc) durchgeführt. Nach jedem Reaktionsschritt wurden die Kavitäten dreimalig mit je 300 µl/Kavität PBS-Tween (PBS mit 0,05 % (w/v) Tween20) gewaschen.

Die Antigenbindung von humanem H-FABP wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml in PBS-Puffer (1h, RT) unter Schütteln durchgeführt. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte durch PBS-BSA (PBS mit 0,5 % (w/v) BSA) für 1h bei 37°C. Anschließend wurden die Proben und als Standard der monoklonale Antikörper 67D3 (50 µl/well) in PBS-Tween (PBS mit 0,05 % (w/v) Tween20) zugegeben (1h, RT, schütteln). Zur Detektion der Proben wurde *goat-anti-mouse-anti-F_{ab}-Peroxidase-Konjugat* (Sigma) in einer Verdünnung von 1:3000 in PBS-Tween-BSA (PBS mit 0,05 % (w/v) Tween 20, 0,5 % (w/v) BSA) eingesetzt. Der Peroxidase-Nachweis erfolgte in Detektionspuffer (0,1 M Citrat, 0,2 M Na₂PO₄, pH, 5,0) mit 1 mg/ml OPD nach Zugabe von 0,05 % H₂O₂ zum Reaktionsstart. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2M H₂SO₄ wurde die Mikrotiterplatte im ELISA-Reader bei OD_{490 nm} ausgelesen.

5.3.2.3 ELISA zur Detektion rekombinanter F_{ab}-Lysozym-Antikörperfragmente

Das ELISA-Protokoll zur Detektion rekombinanter F_{ab}-Lysozym-Antikörperfragmente entspricht weitgehend dem des ELISAs zur Identifizierung rekombinanter F_{ab}-IT1-Antikörperfragmente (Kap. 5.3.2.2).

Hühnereiweiß-Lysozym (Roche Applied Science) wurde als Antigen in einer Konzentration von 2,5 µg/ml gebunden. Im ersten Blockschrift wurde Rotiblock (Roth) in 10-facher Verdünnung in PBS-Puffer (1 h, RT) inkubiert. Anschließend wurde mit PBS-BSA (PBS mit 1 % (w/v) BSA) für 1h bei 37°C geblockt. Zur Detektion der Proben wurde *goat-anti-mouse-anti-F_{ab}-Peroxidase-Konjugat* (Sigma) und alternativ *rabbit-anti-mouse-anti-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat* (Dakopats) verwendet. Der Nachweis des letztgenannten Detektionsantikörper-Konjugats erfolgte durch pNPP (Kap. 5.2.4.2) bei OD_{405nm}.

5.3.2.4 ELISA zur Detektion rekombinanter scF_v-IT1-Antikörperfragmente

Der Assay zur Detektion periplasmatisch isolierter scF_v-IT1-Antikörperfragmente entspricht in der Durchführung dem ELISA zur Identifizierung von F_{ab}-IT1-Antikörperfragmenten (Kap. 5.3.2.2).

Als Antigen wurde humanes H-FABP in einer Konzentration von 50 µg/ml in den Kavitäten immobilisiert. Die mit dem c-myc-Tag fusionierten scF_v-Fragmente wurden mittels eines c-myc-Antikörpers (Sigma) erkannt. Zur Detektion der c-myc-Antikörper wurde *goat-anti-mouse-anti-F_{ab}-Peroxidase-Konjugat* (Sigma) eingesetzt.

5.3.3 Spezielle Methoden: Kern-Streptavidin

5.3.3.1 Aufarbeitung und Renaturierung des rekombinanten Kern-Streptavidins (CSav)

Für eine erste Aufarbeitung wurden die mit pETCS transformierten, geernteten *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Bakterien einer 30 ml-Anzucht in 1,5 ml Puffer A (50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM DTT) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen (3 x 20 sec, 80 % Intensität, 0,5 sec Ultraschalltakt, 0°C). Die Zelldebris inklusive der Einschlusskörper wurden nach Zentrifugation (30 min, 12000 x g, 4°C) in 1 ml Puffer A gewaschen und abschließend in Puffer B (50 mM Tris, pH 8,0, 2 M Urea) resuspendiert.

Zur Isolierung des Kern-Streptavidins aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pETCS wurde eine 1 l-Anzucht aufgearbeitet. Die Zellen wurden nach der Ernte in 20 ml Resuspensionspuffer (50 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0, Triton X-100 0,1%) aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 12000 x g, 4°C). Nach Aufschluss (3 x 20 sec, 80% Intensität, 0,5 sec Ultraschalltakt, 0°C) wurden die Einschlusskörper dreimal im Resuspensionspuffer gewaschen und in 5 ml 6 M GuHCl aufgenommen. Es folgte eine Dialyse gegen 2 l 6 M GuHCl (ü.N., 4°C) und zur Renaturierung eine Dialyse gegen PBS-Puffer (ü.N., 4°C).

5.3.3.2 Detektion funktionellen, rekombinanten Kern-Streptavidins (CSav)

Zur Detektion rekombinanten Kern-Streptavidins wurden die renaturierten Proteinfractionen verwendet.

Alle Inkubationsschritte wurden in einem Volumen von 100 μl /Kavität in F96 MaxiSorb Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc) durchgeführt. Nach jedem Reaktionsschritt wurden die Kavitäten dreimalig mit je 300 μl /Kavität PBS-Tween (PBS mit 0,1 % (w/v) Tween20) gewaschen.

Die Bindung von kommerziellem Streptavidin in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS-Puffer erfolgte für 2 h bei RT. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte durch PBS-BSA (PBS mit 0,5 % (w/v) BSA) für 3 h bei Raumtemperatur. Mit PBS-Tween-BSA (PBS mit 0,05 % (w/v) Tween20, 0,5 % (w/v) BSA) wurden verschiedene Verdünnungen, bzw. Konzentrationen des rekombinant produzierten Streptavidins, sowie des kommerziellen Streptavidins als Standard hergestellt. 10 μl der Verdünnungsansätze wurden jeweils mit 100 μl Biotin-HRP in einer Verdünnung von 1:30000 vorinkubiert (1h, RT). Anschließend wurden 100 μl der Präinkubate in die präparierte Mikrotiterplatte überführt (30 min, RT). Der Peroxidase-Nachweis erfolgte in Detektionspuffer (0,1 M Citrat, 0,2 M Na_2PO_4 , pH, 5,0) mit 1 mg/ml OPD nach Zugabe von 0,05 % H_2O_2 zum Reaktionsstart. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2M H_2SO_4 wurde die Mikrotiterplatte im ELISA-Reader bei $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ ausgelesen.

6 Ergebnisse

6.1 Klonierung und heterologe Expression rekombinanter Antikörperfragmente

Im Rahmen des ULISA-EU-Projektes (CT97-0502), das dieser Arbeit zugrunde liegt, wurden funktionelle, rekombinante F_{ab} -Fragmente und scF_V -Fragmente hergestellt. Durch die Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden auf molekularer Ebene Schlüsselinformationen zur Charakterisierung der im Projekt verwendeten, monoklonalen Antikörper gesichert.

6.1.1 Rekombinante Antikörperfragmente aus Tumor-Hybridoma der monoklonalen Antikörper IT-1 3B8/E6 und IT-1 3B8 gegen humanes H-FABP

Ein Ziel des ULISA-EU-Projektes (CT97-0502) war die Entwicklung rekombinanter Antikörperfragmente gegen humanes H-FABP. In der medizinischen Diagnostik dient humanes H-FABP als Markerprotein, das nach einem akuten Herzinfarkt im Serum nachgewiesen werden kann (Schreiber *et al.*, 1998). Der monoklonale Antikörper IT-1 gegen humanes H-FABP wurde von Hybridomzellen produziert, aus denen nach RNA-Isolierung, reverser Transkription und PCR die variablen Regionen amplifiziert wurden. Diese wurden zur Herstellung rekombinanter F_{ab} - und scF_V -Fragmente eingesetzt.

6.1.1.1 Isolierung von RNA und Amplifikation von IT-1 3B/E6 V_H - und V_L -Sequenzen

Mittels des peqGold RNA Pure-Kit der Firma peqLab und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987), wurde aus 8×10^6 Tumor-Hybridomzellen die Gesamt-RNA der monoklonalen Antikörper IT-1 3B8/E6 gegen H-FABP isoliert. Die Konzentration der Gesamt RNA der mAK IT-1 3B/E6 wurde photometrisch (UV-Spektrum von 220 bis 320 nm) bestimmt und betrug 2,5 mg/ml. Der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm betrug 1,82 und entsprach damit den Erwartungen für nicht durch Proteine verunreinigte DNA. Mit dem Oligotex mRNA Kit der Firma zur Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA des mAK IT-1 3B/E6 wurde aus 30 μ l Gesamt-RNA-Lösung eine Konzentration zwischen 25 und 75 ng/ μ l erzielt.

Zur cDNA-Synthese wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Nach Herstellerangaben beträgt die mRNA-Ausbeute 1-3% der zur Isolierung eingesetzten Gesamt-RNA. Zur reversen Transkription wurden zwischen 178,6 ng und 534,4 ng mRNA verwendet.

Die V_H - und V_L -Sequenzen der monoklonalen Antikörper, ausgehend von revers transkribierter cDNA, wurden mit Hilfe von Primern amplifiziert, welche mit den konservierten *Framework*-Regionen 1 und 4 der variablen Antikörperregionen hybridisieren (Orlandi *et al.*, 1989, Clackson *et al.*, 1991, Leung *et al.*, 1993). Die Vervielfältigung der V_H -Sequenz des mAK IT-1 3B8/E6 wurde mittels der Primer 5'- V_H BASPEZ und 3'- V_H 1FOR erreicht. Zur PCR der V_L -Region wurde die Primerkombination 5'- V_K 2BACK und 3'- V_K 4FOR gewählt (Kap. 5.2.2.3, Tab. 5.1) (Abb. 6.1).

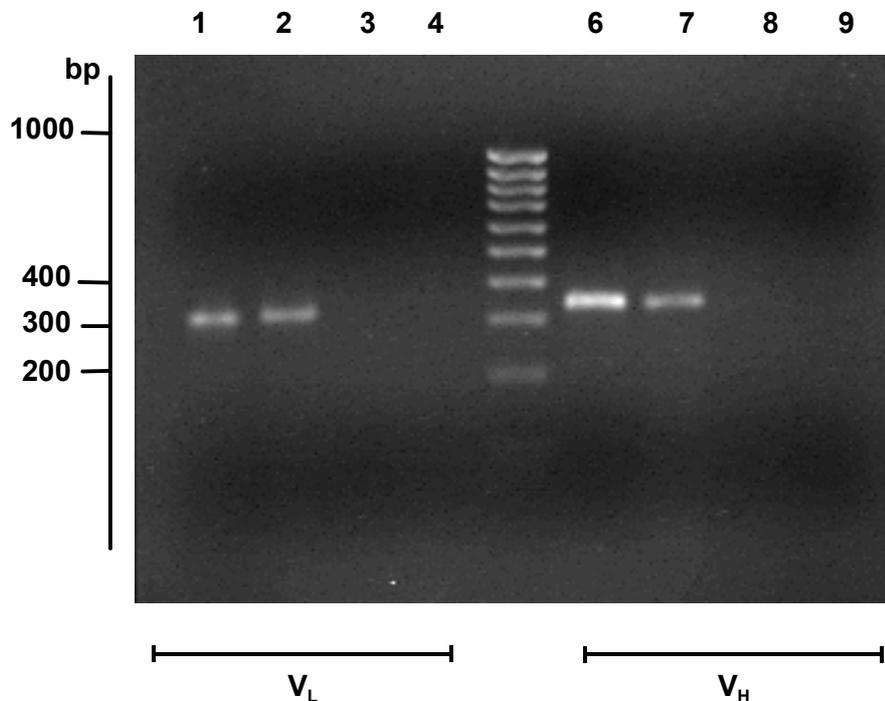


Abb. 6.1 Amplifikation von V_H - und V_L -Regionen des mAK IT-1 3B8/E6

Agarosegel (1,5 %); Als Matrizen wurde revers transkribierte cDNA aus mRNA (Spur 1, 6), so wie Gesamt-RNA (Spur 2, 7) eingesetzt. Die Wasserkontrolle der RT-PCR wurde zusätzlich mitgeführt (Spuren 3, 8). Die Wasserkontrolle der PCR wurde in den Spuren 4 und 9 aufgetragen. Marker: 100 bp-Leiter.

Die PCR verlief spezifisch, da weder die Wasserkontrolle der RT-PCR noch die der PCR zu Amplifikaten führten. Die Größe der V_H -Amplifikate von erwarteten 351 bp und die der V_L -Produkte von 336 bp wurde durch die Gelelektrophorese bestätigt. Die PCR-Produkte wurden zur weiteren Analyse über eine TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T Easy kloniert. Das V_H -Fragment sollte durch eine *Pst*I-/*Bst*EII-Restriktion, welche durch den Einsatz der Primer 5'- V_H 1BASPEZ und 3'- V_H 1FOR ermöglicht wurde, aus dem Vektor pGVHIT1A isoliert

werden. Die *Pst*I-/*Bst*EII-Restriktion diente der gerichteten Klonierung des V_H -Fragmentes in den Expressionsvektor pASK 84 (Skerra, 1994). Jedoch ergab die gelelektrophoretische Überprüfung der Restriktion, dass das V_H -Fragment unerwarteterweise mindestens zwei interne *Pst*I- oder *Bst*EII-Restriktionsschnittstellen aufwies, da statt eines erwarteten Fragments drei Fragmente zu sehen waren (Abb. 6.2 C, links). Die anschließende Sequenzierung des Vektors pGVHIT1A bestätigte das Vorhandensein zweier interner *Pst*I-Restriktionsschnittstellen (Positionen 212, 272), sowie zusätzlich eine interne *Bst*EII-Restriktionsschnittstelle (Position 298) in der Nähe des 3'-Terminus (Abb. 6.2 A, siehe auch Abb. 6.5 A). Die PCR unter Verwendung des Primers 5'-VH1BACK (Kap. 5.2.2.3, Tab. 5.1) ergab ebenfalls die Amplifikation dieser Produkte, wie die Zwischenklonierung in den resultierenden Vektor pGVHIT1A ergab (vgl. Abb. 6.2 C, links).

Aufgrund der Komplementarität der Schnittstellen *Pst*I und *Nsi*I wurde der Primer 5'- V_H *Nsi*I (Kap. 5.2.2.3, Tab. 5.1) entworfen und zur Amplifikation eingesetzt. Die interne *Bst*EII-Schnittstelle befand sich relativ nahe am 3'-Terminus des V_H -Fragmentes. Durch Auswahl des entsprechend verlängerten Primers 3'-*Bst*EII (Kap. 5.2.2.3, Tab. 5.1), der an Position 298 eine stille Mutation durch einen C→T-Austausch einführte, wurde die interne Schnittstelle entfernt. Nach Klonierung des PCR-Produktes konnte das vollständige V_H -Fragment (Abb. 6.2B rechts) durch *Nsi*I/*Bst*EII-Doppelrestriktion aus dem Vektor pGVH*Nsi*I isoliert werden.

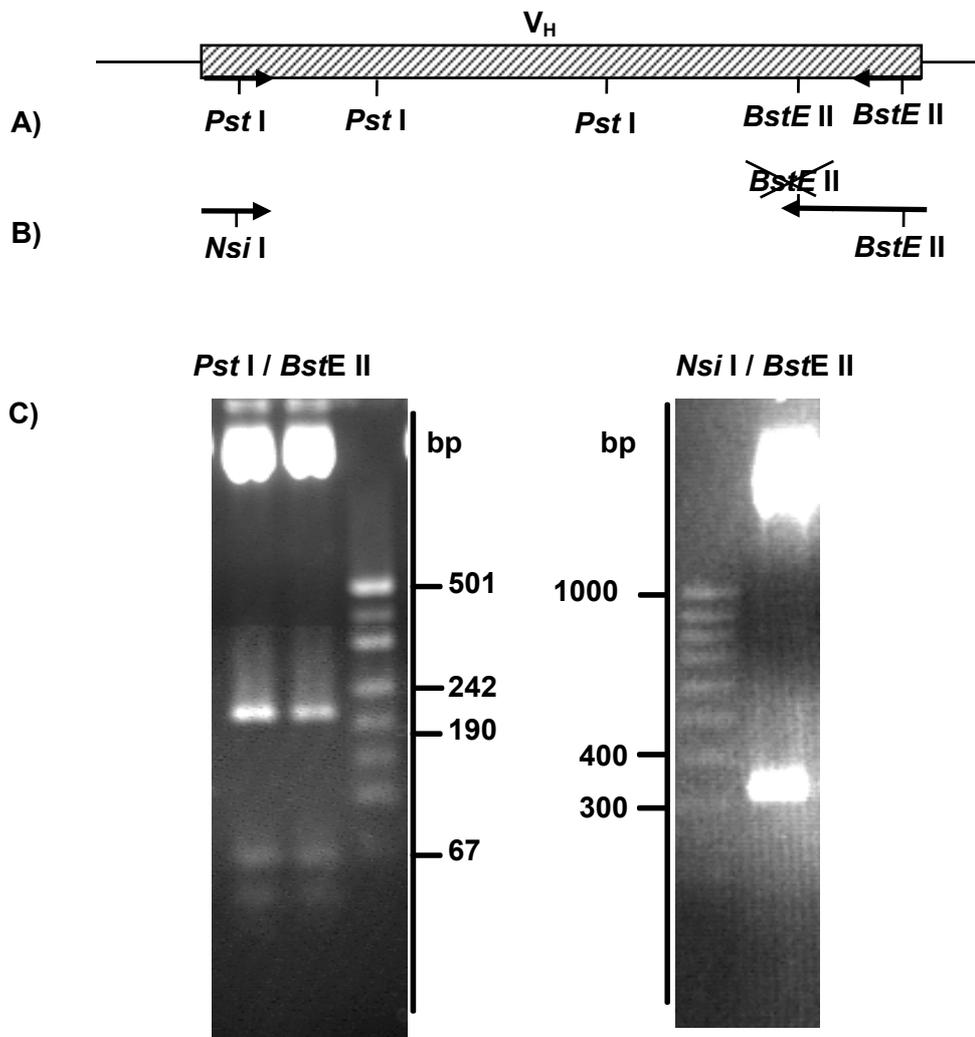


Abb. 6.2 Amplifikation der V_H -Region des mA K IT-1 3B8/E6 mittels verschiedener Primerkombinationen

A, Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen des V_H -Amplifikats unter Verwendung der Primer-Kombinationen 5'- V_H BASPEZ/3'- V_H 1FOR und 5'- V_H 1BACK/3'- V_H 1FOR. B, Schematische Darstellung der modifizierten Primer 5'- V_H *Nsi*I und 3'-*Bst*EII. C, Agarosegele (1,5 %); links: *Pst*I/*Bst*EII Doppelrestriktion des Vektors pGVHIT1A (Klon 1 und 2). Marker: pUC 19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II); rechts: *Nsi*I/*Bst*EII Doppelrestriktion des Vektors pGVHNSi. Marker: 100 bp-Leiter.

Mittels seiner *Sac*I-/*Xho*I-Restriktionsschnittstellen, die durch die verwendeten Primer 5'- V_K BACK und 3'- V_K 4FOR (Kap. 5.2.2.3, Tab. 5.1) generiert wurden, konnte das V_L -Fragment aus dem Sicherungsvektor isoliert und durch Agarosegelelektrophorese charakterisiert werden. Eine Sequenzanalyse des pGVLIT1 bestätigte die Amplifikation des gewünschten Fragmentes. An Nukleotidposition 66 befand sich eine *Pst*I-Restriktionsschnittstelle. Nach Translation konnten die CDR-Regionen identifiziert werden (Abb. 6.5).

6.1.1.2 Analyse des parentalen Klon IT-1 3B8 zur Verifizierung der IT-1 3B8/E6 V_H- und V_L-Sequenzen

Aus der Hybridomzelllinie des parentalen Antikörperklons IT-1 3B8, welcher gegen humanes H-FABP gerichtet ist, ging die Tochterzelllinie IT-1 3B8/E6 hervor. Zur Bestätigung der IT-1 3B8/E6 V_H- und V_L-Sequenzen wurden auch die entsprechenden funktionellen Regionen des parentalen Hybridomzellklons IT1-3B8 untersucht. Nach Isolierung von 2,8 mg/ml Gesamt-RNA aus 8×10^6 Zellen wurde der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm von 1,76 ermittelt. Die revers transkribierte cDNA wurde anschließend ebenfalls zur PCR mit den Primerkombinationen 5'-VH1BASPEZ und 3'-VH1FOR zur Amplifikation des V_H-Bereiches und 5'-VK2BACK und 3'-V_K4FOR zur Vervielfältigung der V_L-Sequenz eingesetzt (Kap. 5.2.2.3, Tab. 5.1). Zur Restriktions- und Sequenzanalyse wurden die Amplikons in den Vektor pCRScript Cam kloniert. Das Restriktionsmuster von vier klonierten V_L-Fragmenten entsprach dem des untersuchten Tochterklons IT-1 3B8/E6 und konnte durch Sequenzierung in allen Fällen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Nach *Pst*I/*Bst*EII-Restriktion von insgesamt acht Klonen pCRCVH3B8K1- pCRCVH3B8K8, welche die IT1 3B8-V_H-Regionen enthielten, zeigte lediglich das Plasmid von Klon 1 nicht das erwartete Muster der IT 3B8/E6-V_H-Sequenz (Abb. 6.3).

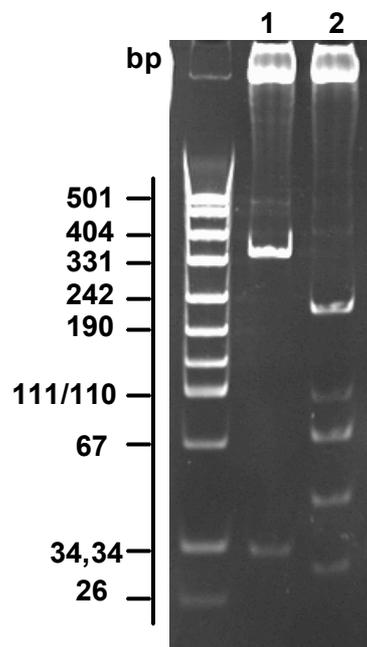


Abb. 6.3 Restriktion der V_H-Regionen des mAK IT-1 3B8

PAGE (11 %); *Pst*I/*Bst*EII Doppelrestriktion des Vektors pCRCVH3B8K1 (Spur 1), so wie des Vektors pCRCVH3B8K8 (Spur 3). Marker: pUC 19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II).

Eine Sequenzanalyse der Plasmide Klon 1 und Klon 8 ergab für den Klon pCRCVH3B8K8, dass dessen V_H-Region identisch mit der des mAK IT1 3B8/E6 ist. Die Sequenz des

pCRCVH3B8K1 konnte durch Homologievergleiche als V_H-Fragment identifiziert werden. Allerdings ist es eindeutig nicht identisch mit dem V_H-Fragment der Tochterzelllinie (Abb. 6.4). Es kann jedoch einem rearrangierten, nicht-produktiven V_H-Gen zugeordnet werden (Genbank-Eintrag M26981, M18308). In unmittelbarer Nähe eines stark konservierten Heptanukleotid-Motivs (5'-TACTGTG-3') wurde ein Segment des Genortes am 3'-Terminus der V_L-Region durch ein stromaufwärts lokalisiertes Fragment eines Keimbahn-Gens ersetzt (Kleinfield *et al.* 1989, Lawler *et al.* 1987).

b8vhk1	<i>agg</i> <u><i>tccagctgcagcagtcagg</i></u> <i>acctggcctagtg</i> <u><i>cagccctcacagagcctgtccatcac</i></u>
b8vhk8	<i>agg</i> <u><i>tccagctgcagcagtcagg</i></u> <i>gggctgaactggcaagacctggggcctcag</i> <u><i>tgaagatgtc</i></u> ***** ** * ** *
b8vhk1	<i>ctgcacag</i> <u><i>tctctgg</i></u> <u><i>tttctcattaactagctatgg</i></u> <i>tgtacag</i> <u><i>tgggttcgccag</i></u> <i>tctcc</i>
b8vhk8	<i>ctgcaagg</i> <u><i>cttctgg</i></u> <i>ctacaccttactagctacacgatgcactgggtaaaacagaggcc</i> ***** * ***** * * * ** ***** * ** ***** *** **
b8vhk1	<i>aggaaagg</i> <u><i>tctggag</i></u> <u><i>tggctggga---</i></u> <i>gtgatatggag</i> <u><i>tgg</i></u> <i>tggaa</i> <u><i>gcacagactataa</i></u>
b8vhk8	<i>tggacagg</i> <u><i>tctgga</i></u> <u><i>tggattggctacattaatcctagcag</i></u> <u><i>tgg</i></u> <u><i>tatactag</i></u> <u><i>ttacac</i></u> *** ***** ** * ** * * ** ***** ** ** * *
b8vhk1	<i>tgcagctttcatatccagactgagcatcagcaaggacaattccaagaccaag</i> <u><i>tttctt</i></u>
b8vhk8	<i>tcagaag</i> <u><i>ttcaaggacaaggccacattgactgcagacaattcctccagcacagcctacat</i></u> * **** ** * * * ***** * * ** * * *
b8vhk1	<i>taaaatgaacag</i> <u><i>tctgcaagg</i></u> <u><i>taatgacacagccatataa</i></u> <i>tactgtg</i> <u><i>ccagaaagg</i></u> <i>g--g</i>
b8vhk8	<i>gcaactgagcagcctgacatctgaggact</i> <u><i>ctgcag</i></u> <u><i>tctat</i></u> <i>tactgtg</i> <u><i>tacgagat</i></u> <u><i>ggtta</i></u> ** *** ** *
b8vhk1	<i>cgattacgacgactactggggccaagggaccac</i> <u><i>ggtcaccgtctcctca</i></u>
b8vhk8	<u><i>ccgg</i></u> <u><i>tacttcgatgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca</i></u> * *** ** *****

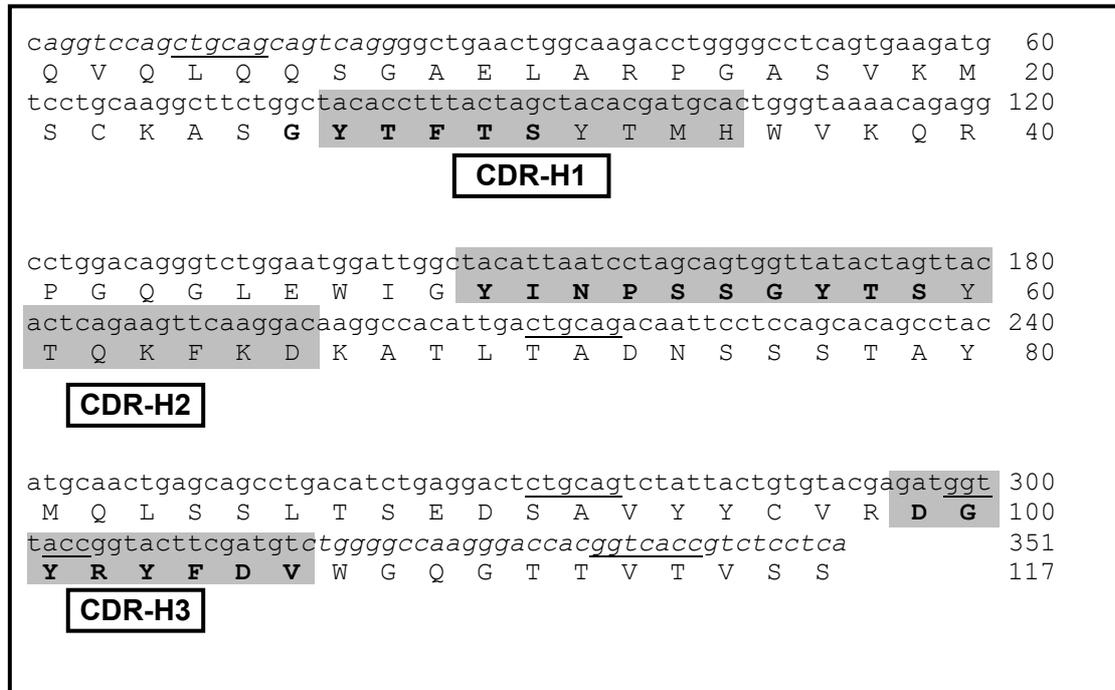
Abb. 6.4 Vergleich der V_H-Nukleotidsequenzen der Klone pCRCVH3B8K1 und pCRCVH3B8K8 des mAκ IT-1 3B8

Homologe Bereiche sind durch Asteriske gekennzeichnet. Das Heptanukleotid-Motiv ist fett hervorgehoben. Die Restriktionsschnittstellen für *Pst*I und *Bsf*II sind unterstrichen. Die Primer 5'-V_HBASPEZ und 3'-VH1FOR sind kursiv dargestellt.

6.1.1.3 Aminosäuresequenzen der V_H- und V_L-Regionen des mAK IT-1 3B8/E6

Nachdem die V_H- und V_L-Nukleotidsequenzen des mAK IT13B8/E6 nun vorlagen, wurde zu deren Translation das HUSAR-Programmpaket eingesetzt (Abb. 6.5).

A)



B)

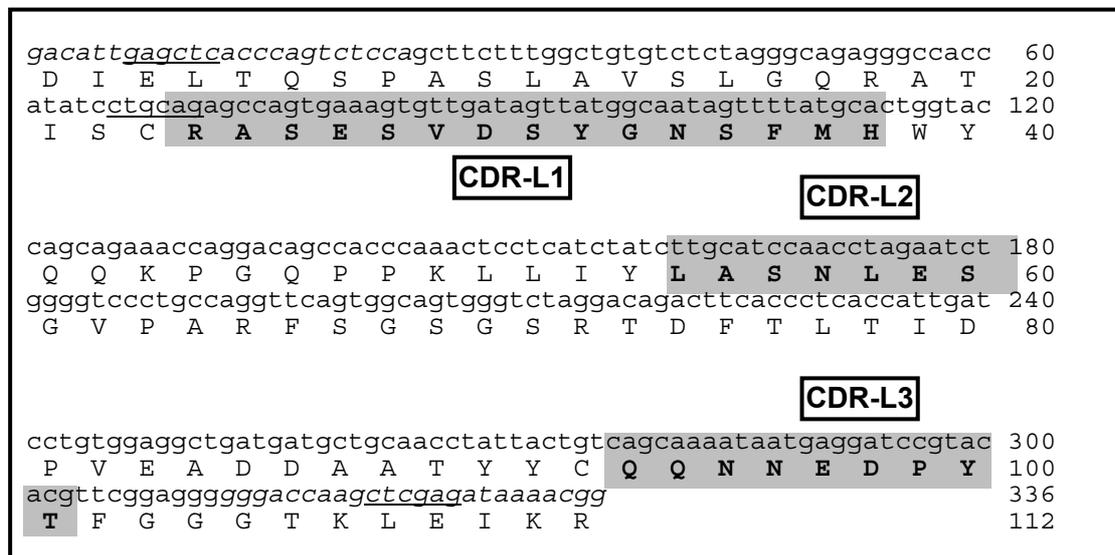


Abb. 6.5 Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der V_H- und V_L-Region des mAK IT-1 3B8/E6

A, V_H-Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz. B, V_L-Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz. CDRs nach Kabat (1987) sind grau nach Chothia (1997) fett markiert. Restriktionsschnittstellen *Pst*I/*Bst*EII (V_H) (Primer generiert, intern) und *Sac*I/*Xho*I (V_L) sind unterstrichen. Die Primer 5'-V_HBASPEZ, 3'-V_H1FOR, 5'-V_K2BACK und 3'-V_K4FOR sind kursiv dargestellt.

Nach Kabat (1987) konnten die hypervariablen Regionen (CDRs, *complementarity determining regions*) gemäß exakt definierter Aminosäureabfolgen zugeordnet werden. Eine Zuordnung der CDRs ist auch nach Chothia (Chothia *et al.*, 1992, Al-Lazikani *et al.*, 1997), AbM (Oxford Molekular's AbM antibody modelling software, <http://www.accelrys.com>) oder der Contact Definition möglich, die auf der Analyse komplexer Kristallstrukturen basiert (MacCallum *et al.*, 1996). Die CDR-H1 startet nach Kabat-Definition um Aminosäureposition 26, beginnt immer vier Aminosäuren nach einem Cystein, endet vor einem Tryptophan, typischerweise mit der Abfolge Tryptophan-Valin. Nach Chothia-Definition ist die Region um vier Aminosäuren verkürzt. Nach Ende des CDR-H1 startet in einem Abstand von 15 Aminosäuren und immer nach dem Motiv Leucin-Glutaminsäure-Tryptophan-Isoleucin-Glycin die CDR-H2-Region, die vor Lysin-Arginin-Threonin endet. Nach AbM und Chothia endet CDR-H2 sieben Aminosäuren früher. In einem Abstand von 33 weiteren Aminosäuren beginnt CDR-H3 immer zwei Aminosäuren nach einem Cystein und hört vor dem Motiv Tryptophan-Glycin-X-Glycin auf.

Die hypervariable Region CDR-L1 beginnt immer nach einem Cystein und schließt vor dem Motiv Tryptophan-Tyrosin-Glutamin ab. Die CDR-L2 beginnt immer 16 Aminosäuren nach CDR-L1 und ist grundsätzlich sieben Aminosäuren lang. Die CDR-L3 beginnt immer 33 Aminosäuren nach CDR-L2, nach einem Cystein. Nach dieser Domäne setzt sich die variable Region stets mit Phenylalanin-Glycin-X-Glycin fort. Die so charakterisierten Aminosäuresequenzen konnten eindeutig Immunglobulinen zugeordnet werden und zeigten, wie für einen neuen, monoklonalen Antikörper erwartet, keine völlige Übereinstimmung mit bereits bekannten, in der Kabat-Datenbank eingetragenen Sequenzen. Die Nukleotidsequenz der V_H -Region wies eine 97%ige Identität zu Maus IgG V_H -Domänen auf (KADBID 001970). Dabei handelt es sich um das Keimbahn Ig Gen H30 der Untergruppe V (H) II (Schiff *et al.*, 1985). Auf Aminosäureebene ist die V_H -Region des mAK IT1 3B8/E6 zu 90% identisch mit dem Kabat-Datenbankeintrag KADBID 002005, der dem Igh-6-Protein der Subfamilie IGv aus der Maus entspricht. Die Mitglieder der Mausfamilie sind Komponenten von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren (Strausberg *et al.*, 2002). Die Sequenzidentität der V_L -Nukleotidsequenz mit der variablen Region von Maus IgG kappa leichten Ketten vom Plasmazytom PC3741, welche eine Rolle bei der Immunantwort auf Influenza hemagglutinin eine Rolle spielt (KADBID 005960, Clarke *et al.*, 1985), so wie die der Aminosäuresequenz zum Kabat-Eintrag KADBID 005985, betragen 96%. Dem Kabat-Datenbankeintrag KADBID 005985 entspricht zu 99 % die kappa leichte Kette der V-III-Region ABPC 22/PC 9245 (McKean *et al.*, 1978).

6.1.1.4 Konstruktion des Vektors pASKIT1 zur heterologen Expression rekombinanter IT-1 F_{ab}-Fragmente

Zur heterologen Expression rekombinanter F_{ab}-Fragmente wurde der ursprünglich vom Expressionsvektor pASK84 (Skerra, 1994) abgeleitete Vektor pASK-D1,3 modifiziert. Dabei wurden die dort enthaltenen V_H- und V_L-Regionen des anti-Lysozym-Antikörpers D1,3 sukzessiv durch die V_H- und V_L-Fragmente des mAk IT-1 3B8/E6 ersetzt. Zunächst wurde der Vektor pASK-D1,3 durch *Bst*EII- und *Pst*I-Restriktionen vom D1,3-V_H-Fragment befreit. Das zu klonierende IT-1 V_H-Fragment wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Nsi*I- und *Bst*EII aus dem Sicherungsvektor pGVHIT1 herausgeschnitten. Der linearisierte Expressionsvektor, sowie das zu inserierende IT-1 V_H-Fragment wurden nach Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel ligiert. Durch die Ligation der komplementären Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Nsi*I wurde die Erkennungssequenz beider Schnittstellen eliminiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsprodukt pASKVHIT1 transformiert. Nach Charakterisierung des erhaltenen Zwischenproduktes pASKVHIT1 durch Restriktions- und Sequenzanalyse erfolgte eine Excision des D1,3-V_H-Fragments mittels *Sac*I/*Xho*I-Restriktion. Der Vektor pGVLIT1 wurde ebenfalls einer solchen Doppelrestriktion unterzogen, um das IT-1 V_L-Fragment zu gewinnen. Die zu ligierenden Fragmente wurden wieder über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Nach erfolgreicher Ligation wurde *E. coli* DH5α mit dem endgültigen Expressionskonstrukt pASKIT1 transformiert. In Abb. 6.6 ist das Klonierungsschema dargestellt.

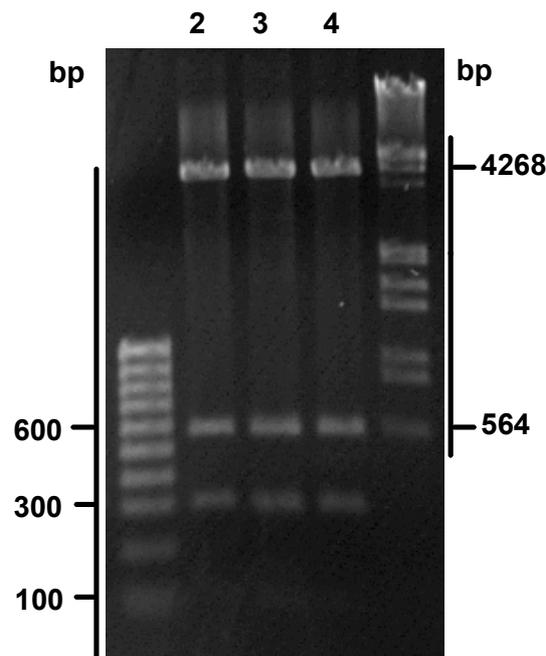


Abb. 6.7 Restriktionsanalyse des Expressionsvektors pASKIT1

Agarosegel (1,5 %); Marker: 100 bp-Leiter. *XbaI/PstI*-Restriktionen des Vektors pASKIT1, Klone 5-7 (Spuren 2-4). Marker: λ -Marker, (λ -DNA/*EcoRI/Hind III*).

6.1.1.5 Isolierung und Detektion rekombinanter IT-1 Antikörperfragmente aus dem Periplasma

Die Anzucht und Isolierung rekombinanter F_{ab} -Fragmente erfolgte nach einem Protokoll von Skerra (1994). Zwei Liter LB-Ampicillin-Medium wurden mit dem Stamm *E. coli* JM83/pASKIT1 inokuliert und die Produktion der Antikörperfragmente durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach Zellernte wurden 6-8 g Biofeuchtmasse mittels Resuspensionspuffers aufgeschlossen und der periplasmatische Überstand durch Zentrifugation von den Sphäroplasten getrennt. Um vor der Aufreinigung der rekombinanten Antikörperfragmente den Saccharoseanteil aus dem Resuspensionspuffer zu verringern und das Periplasma zu präequilibrieren, wurde die Lösung gegen Chromatographiepuffer dialysiert und sterilfiltriert.

Die His-tag fusionierten IT1 F_{ab} -Fragmente wurden durch Chromatographie an Ni-NTA-Agarose isoliert. Mittels FPLC erfolgte eine fraktionierte Elution mit UV-Detektion der rekombinanten Proteine (Abb. 6.8). Die Elutionsmittel für die rekombinanten F_{ab} -Fragmente wurde Imidazol verwendet. Da das Imidazol eine erhöhte Absorption bei 280 nm

verursachte, wurde dieses vor der UV-Detektion unter Verwendung der Variperm-Dialysesäule (bitop) aus den Fraktionen entfernt.

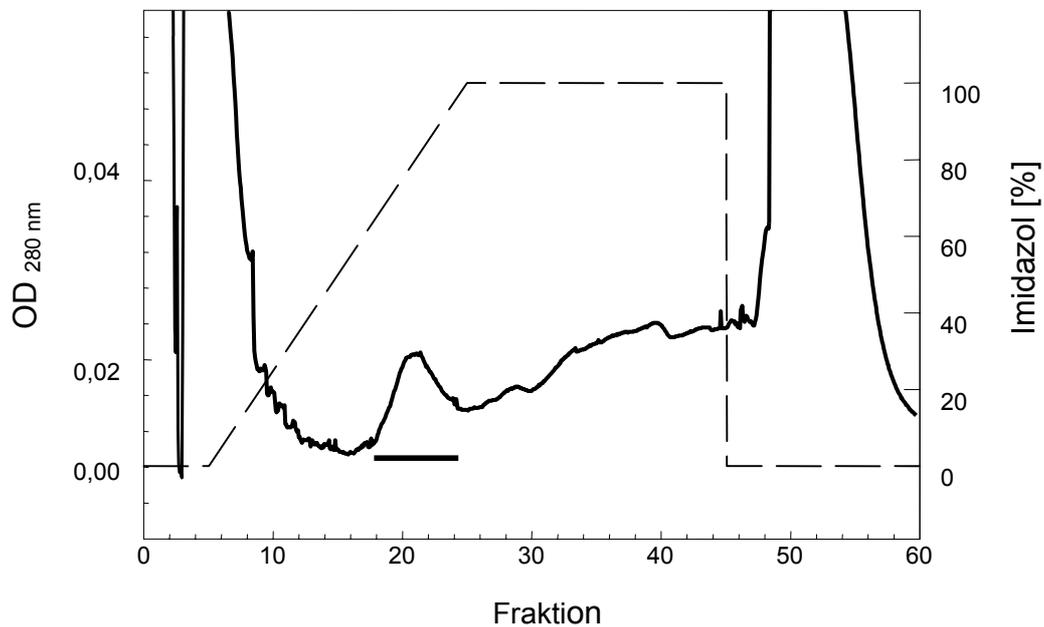


Abb. 6.8 Affinitätschromatographie rekombinanter IT-1 F_{ab}-Fragmente

Detektion rekombinanter IT-1 F_{ab}-Fragmente bei OD_{280nm}. Die Elution erfolgte durch einen Imidazol-Gradienten von Ni-NTA-Agarose. Fraktionen, von denen angenommen wurde, dass sie Antikörperfragmente enthalten, sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Säule: NAP-10, Flussrate: 1 ml/min.

Das Chromatogramm zeigte in den Fraktionen 20-25 eine erhöhte Absorption bei 280 nm. In diesen Fraktionen konnten rekombinante Antikörperfragmente enthalten sein, da dieser Peak in Testläufen ohne rekombinante F_{ab}-Fragmente mit His-tag nicht beobachtet wurde. Dies wurde in einem funktionellen Test überprüft.

6.1.1.6 Etablierung eines ELISA-Verfahrens zur Detektion rekombinanter IT-1 Antikörperfragmente

Zur Identifizierung funktionell exprimierter F_{ab} -Fragmente wurde ein ELISA (Format I) entwickelt, bei dem die Erkennung von direkt immobilisiertem H-FABP durch den mAK IT-1 ausgenutzt wurde. Um die Spezifität dieses Assays zu überprüfen, wurde zunächst der biotinylierte, monoklonale Antikörper IT-1 (IT-1bio) getestet, indem neben H-FABP auch intestinales (I)-FABP als Negativkontrolle eingesetzt wurde (Abb. 6.9). Die Antigene wurden direkt an die Mikrotiterplatte gebunden und die Detektion erfolgte durch Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.

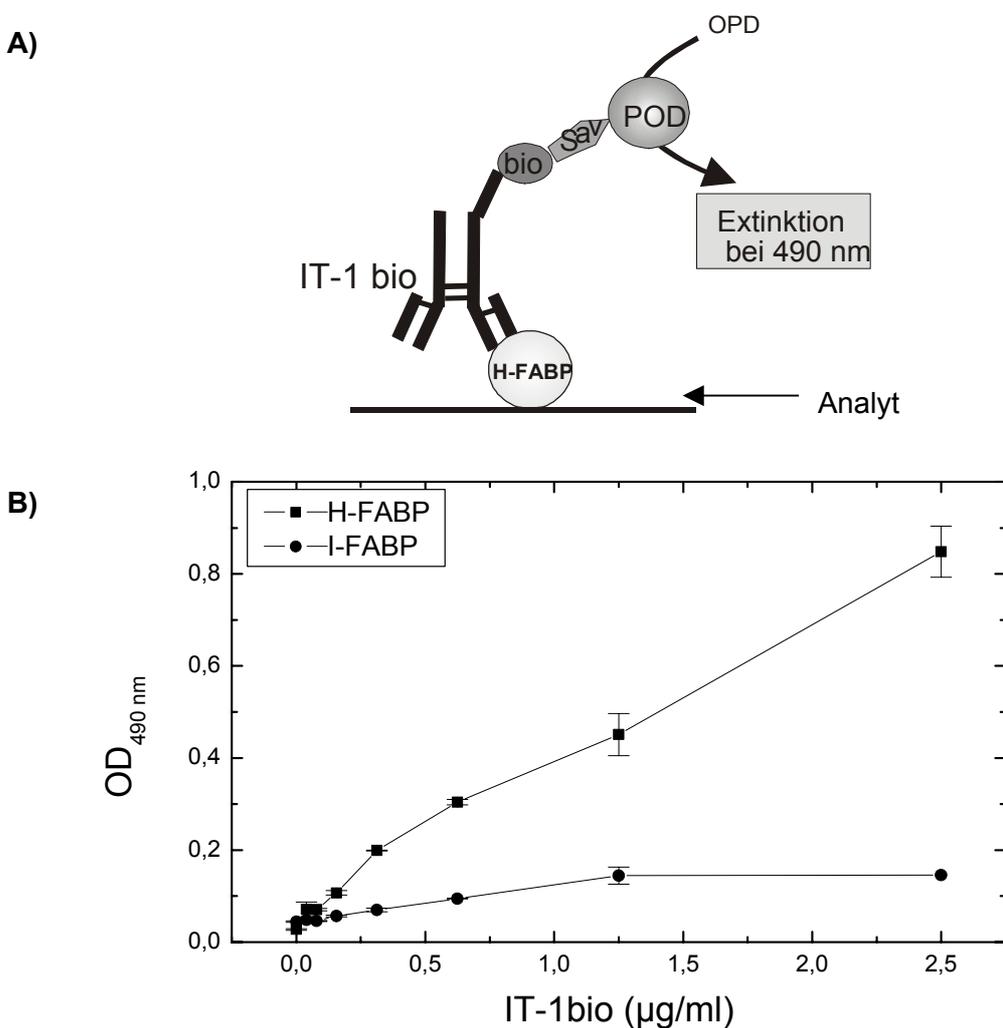


Abb. 6.9 Spezifität des mAK IT-1bio (Format I)

A, Schematische Darstellung des ELISA-Formates I zur Detektion von H-FABP durch den mAK IT-1bio. B, Antigen: H-FABP bzw., I-FABP (25 µg/ml); Detektion: Sav-POD-Konjugat (1:5000).

Wie erwartet reagiert das Antigen H-FABP am stärksten mit dem Antikörper IT-1. Das nahe verwandte I-FABP zeigte nur eine geringe Bindung.

Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen und weniger Antigen einsetzen zu können, wurde daraufhin ein *Sandwich*-ELISA-Format (Format II) getestet, bei welchem die Antigenpräsentation durch einen polyklonalen *rabbit-anti-mouse-H-FABP*-Antikörper erfolgte (Abb. 6.10). Dieser bildete den unteren Teil des *Sandwich* und wurde mit 100 ng/ml H-FABP beladen. Um Kreuzreaktivitäten zu erkennen, wurde in der Kontrolle kein Antigen präsentiert. Zur Überprüfung der Funktionalität dieses Formates wurde IT-1bio in variabler Konzentration verwendet (Abb. 6.10 A) und durch Streptavidin-Peroxidase-Konjugat detektiert.

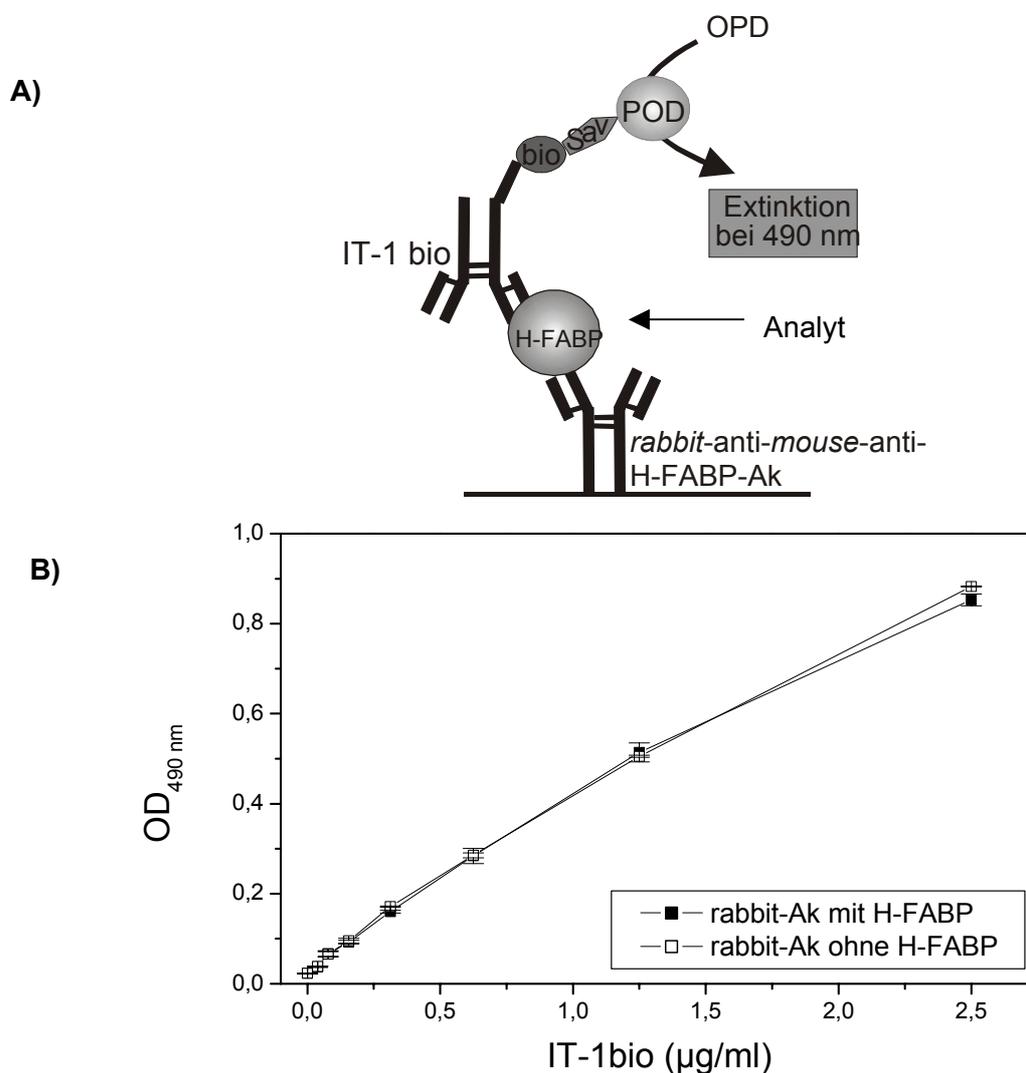


Abb. 6.10 Sandwich-ELISA (Format II)

A, Schematische Darstellung des ELISA-Formates II zur Detektion von H-FABP durch den mAK IT1bio. B, Fängerantikörper: *rabbit-anti-mouse-anti-H-FABP* (2,5 µg/ml); Antigen: H-FABP (100 ng/ml); Detektion: Sav-POD-Konjugat (1:5000).

Die Gegenüberstellung der Ansätze in An- und Abwesenheit des Antigens (Abb. 6.10 B) zeigte, dass der Antikörper IT-1bio unspezifisch an den polyklonalen Präsentationsantikörper bindet. Die Signalstärke wurde durch Zugabe des Antigens H-FABP nicht signifikant erhöht.

Im eigentlichen Assay (Format III) wurden die IT-1 F_{ab} -enthaltenden Fraktionen 16-23 der Aufreinigung aus dem Periplasma (s. Abb. 6.8) in 1:2 Verdünnung getestet (Abb. 6.11 B). Die Detektion der IT-1 F_{ab} -Fragmente erfolgte mittels *goat-anti-mouse-anti- F_{ab} -Peroxidase-Konjugat*.

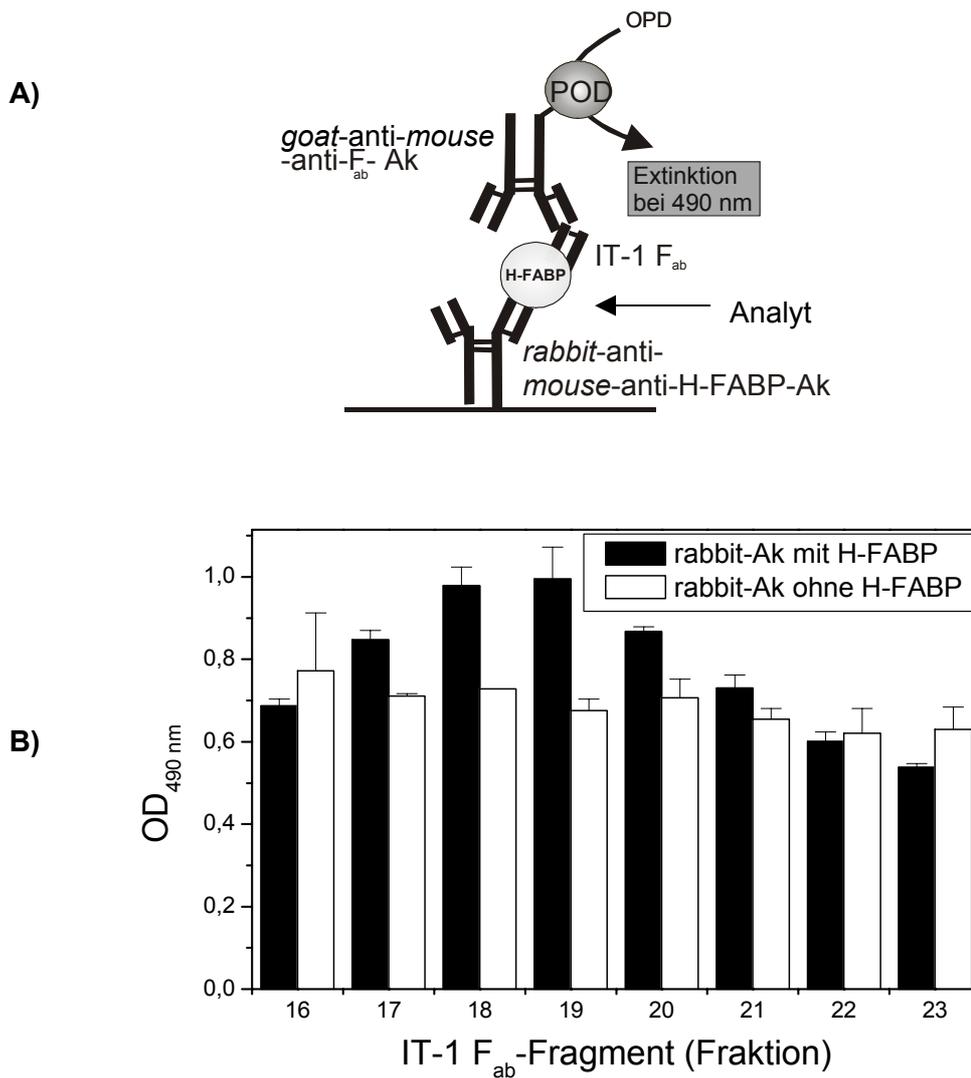


Abb. 6.11 Sandwich-ELISA (Format III)

A, Schematische Darstellung des ELISA-Formates III zur Detektion von H-FABP durch rekombinante IT1- F_{ab} -Fragmente. B, Fängerantikörper: *rabbit-anti-mouse-anti-H-FABP* (2,5 $\mu\text{g/ml}$); Antigen: H-FABP (100 ng/ml); Detektion: *goat-anti-mouse-anti- F_{ab} -Peroxidase-Konjugat* (1:3000).

Im Assay-Format III ist in Gegenwart des Antigens eine schwache, aber deutliche zusätzliche Bindung des mAK *goat-anti-mouse-anti-F_{ab}-Peroxidase-Konjugat* an das rekombinante Antikörperfragment zu erkennen (Abb. 6.11 B). Offensichtlich zeigt dieser monoklonale Antikörper eine größere Tendenz an den polyklonalen Antikörper zu binden, als der monoklonale Antikörper IT1-bio (s. Abb. 6.10 B). Das Sandwich-ELISA-Format eignet sich dennoch bedingt zur Detektion IT1-F_{ab}-haltiger Fraktionen.

Aufgrund dieser unspezifischen Bindung (s. ELISA-Format II und III) wurde das weniger komplexe ELISA-Format I gewählt. Mit Hilfe des mAK IT-1bio wurde abgeschätzt, in welcher Konzentration das Antigen H-FABP an die Mikrotiterplatte gebunden werden muss, um eine möglichst hohe Empfindlichkeit für den Detektorantikörper zu erzielen (Abb. 6.12).

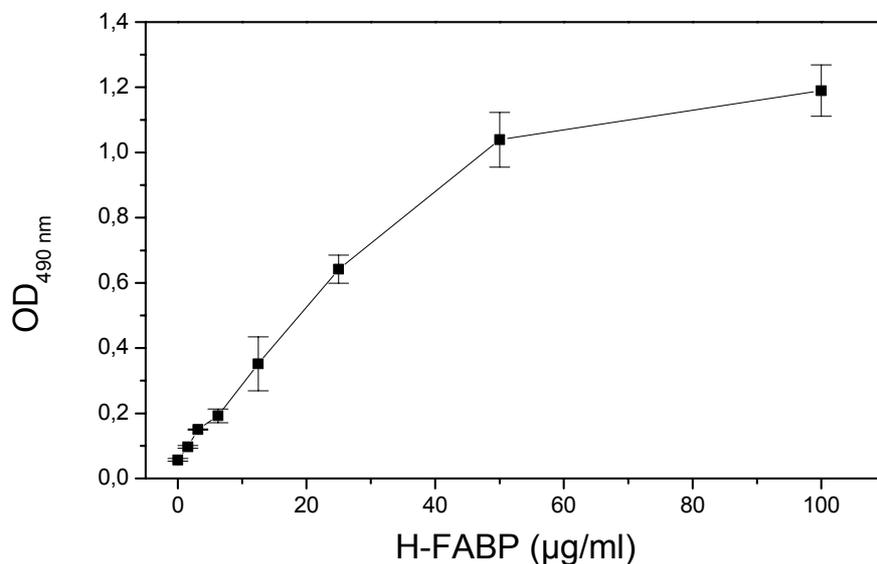


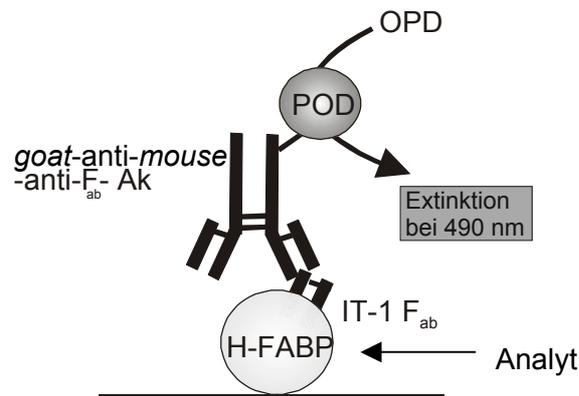
Abb. 6.12 ELISA zur Konzentrationsabschätzung des einzusetzenden Antigens H-FABP

Auswertung des ELISAs zur Konzentrationsabschätzung des zu bindenden H-FABPs. Detektorantikörper: IT1bio (2,5 µg/ml); Detektion durch Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:5000).

Bei einer H-FABP-Konzentration von 50 µg/ml für die direkte Bindung des Antigens an die Kavitäten der Mikrotiterplatten resultierte ein Signal ausreichender Stärke.

In Anlehnung an den ELISA (Format I, Abb. 6.9 A) wurde das ELISA-Format IV zur Detektion IT-1 F_{ab}-enthaltender Fraktionen eingesetzt (Abb. 6.13 A). Die nach der Aufreinigung durch Ni-NTA-Agarose gewonnenen Fraktionen wurden in 1:2 Verdünnung analysiert.

A)



B)

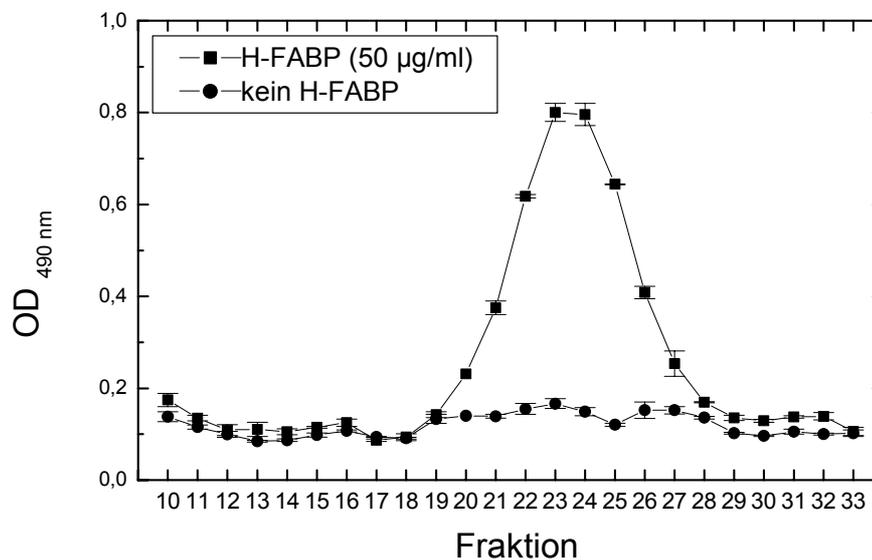


Abb. 6.13 ELISA zur Identifizierung IT1 F_{ab}-enthaltender Fraktionen (Format IV)

A, Schematische Darstellung des ELISA-Formats zur Detektion IT1 F_{ab}-enthaltender Fraktionen. B, Antigen: H-FABP (50 µg/ml); Detektion durch *goat-anti-mouse-anti-F_{ab}*-Peroxidase-Konjugat (1:3000).

Der ELISA (Format IV) zur Identifizierung F_{ab}-enthaltender Fraktionen zeigte, dass jetzt bei Präsentation des Analyten H-FABP ein deutlicher Peak bei den Fraktionen 20-27 zu beobachten war. Die Fraktionen außerhalb dieses Peaks wiesen dagegen nur geringe Signale auf, die denen des Hintergrundes, bestimmt in Abwesenheit von H-FABP, entsprachen. Im Chromatogramm war der Proteinpeak in den Fraktionen 20-25 vorläufig den rekombinanten F_{ab}-Fragmenten zugeordnet worden. Dies wurde somit größtenteils durch das Ergebnis des ELISA bestätigt.

6.1.1.7 Detektion rekombinanter Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente als interne Kontrolle

Da die Ausbeute funktionell exprimierter, rekombinanter IT-1 F_{ab}-Fragmente gering war, wurde das gewählte pASK84-Expressionssystem überprüft. Zu diesem Zweck wurde der *E. coli* JM83 mit dem Expressionsvektor pASK-D-1,3 transformiert. Analog zum IT-1 F_{ab}-Fragment wurden unter Einsatz von FPLC und Verwendung von Ni-NTA-Agarose Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente aus dem Periplasma fraktioniert aufgereinigt. (Abb. 6.14).

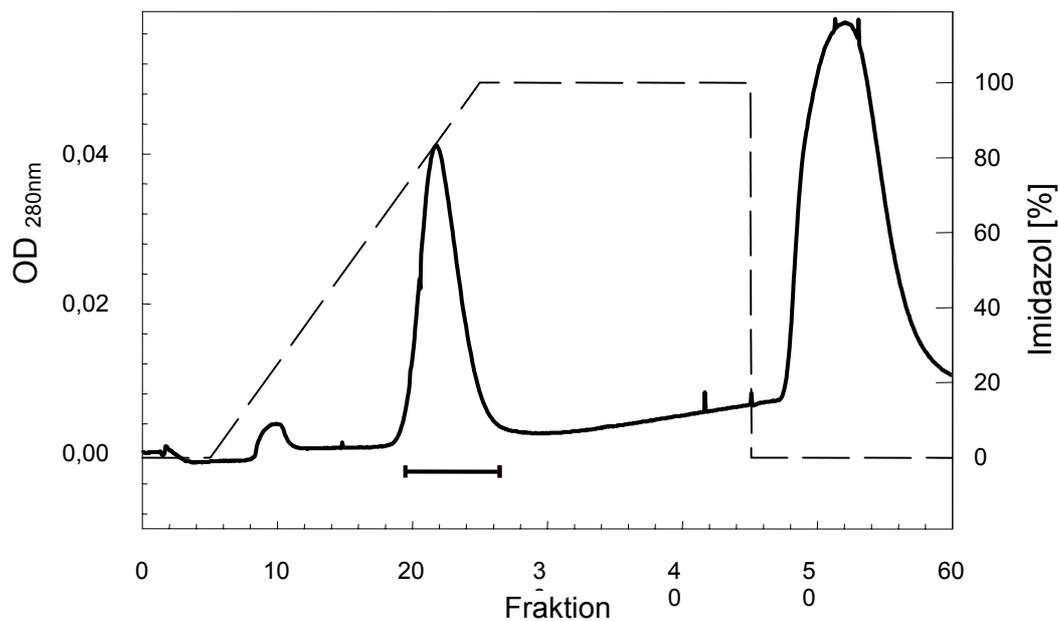


Abb. 6.14 Chromatogramm der Aufreinigung rekombinanter Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente

Detektion rekombinanter Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente bei OD_{280nm}. Die Elution erfolgt durch einen Imidazol-Gradienten von Ni-NTA-Agarose. Die Fraktionen, welche möglicherweise die Antikörperfragmente enthalten, sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Säule: NAP-10, Flussrate: 1 ml/min.

Im Vergleich zu der Aufreinigung der rekombinanten IT1 F_{ab}-Fragmente (Abb. 6.8), zeigt das Chromatogramm einen deutlich stärker ausgeprägten Peak.

Zur Identifizierung derjenigen Fraktionen, welche Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente enthielten, wurde das ELISA-Format IV gewählt. Als Antigen wurde Hühnereiweiß-Lysozym immobilisiert und die chromatografisch detektierten F_{ab}-Fraktionen in 1:2 Verdünnung eingesetzt (Abb. 6.15).

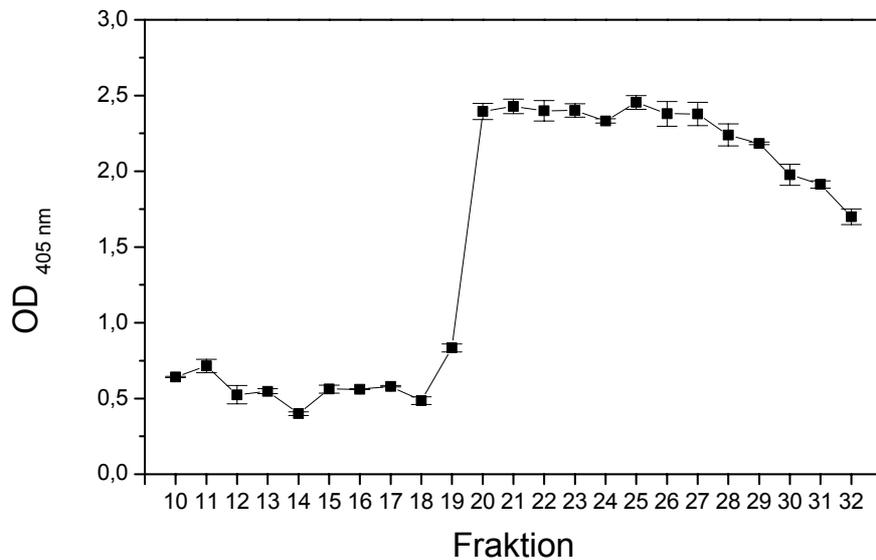


Abb. 6.15 ELISA zur Identifizierung Anti-Lysozym-F_{ab}-enthaltender Fraktionen (Format IV)

Antigen: Lysozym (2,5 µg/ml); Detektion durch *goat-anti-mouse-anti-F_{ab}-Peroxidase-Konjugat* (1:3000).

Der ELISA (Format IV) zur Identifizierung Anti-Lysozym-F_{ab}-enthaltender Fraktionen zeigte, dass bei der gewählten Verdünnung der Fraktionen 20-32 eine sehr hohe Extinktion zu beobachten war. Der im Chromatogramm beobachtete Proteinpeak der Fraktionen 20-26 (Abb. 6.14) erzielt somit in der Tat vergleichsweise hohe Konzentrationen Anti-Lysozym-F_{ab}. Offensichtlich war die Konzentration der eingesetzten rekombinanten Antikörperfragmente so hoch, dass der Detektionsbereich des ELISAs überschritten wurde.

Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und in 1:100-facher Verdünnung im ELISA getestet. Das Antigen Lysozym wurde in unterschiedlichen Konzentrationen immobilisiert (Abb. 6.16).

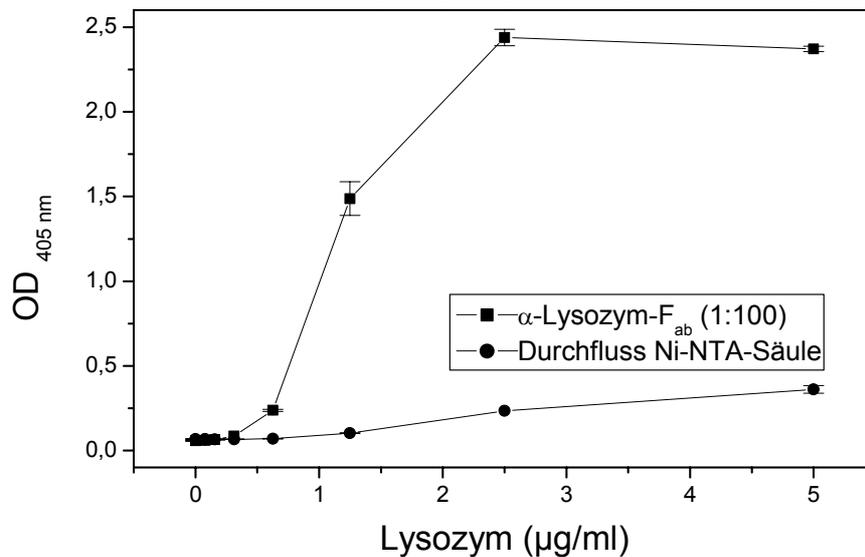


Abb. 6.16 ELISA zur Identifizierung von Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmenten

Auswertung des ELISAs nach Format IV (Abb. 6.13); Antigen: Lysozym aus Hühnereiweiß; Detektionsantikörper: Aufkonzentriertes Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragment (1:100); Durchfluss der Aufreinigung mittels Ni-NTA; Detektion durch anti-mouse-anti-F_{ab}-AP-Konjugat (1:3000).

Der ELISA zeigte, dass der Einsatz des pASK84-Expressionssystem eine gute Expression und der His-Tag eine effiziente Aufreinigung von F_{ab}-Fragmenten ermöglichte. Im Durchfluss der Ni-NTA-Säule wurde nur eine sehr geringe Menge an funktionellem Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragment detektiert, was darauf hinweist, dass der überwiegende Anteil der His-tag-Proteine an das Säulenmaterial gebunden wurde. Dies demonstriert die hohe Bindungskapazität der ebenfalls zur Aufreinigung von IT1 F_{ab}-Fragmenten eingesetzten Ni-NTA-Agarose. Das ELISA-Format IV eignete sich zur Abschätzung des an die Mikrotiterplatte zu bindenden Lysozyms. Für weitere Assays wurden 2,5 µg/ml Lysozym eingesetzt. Das Format bot auch die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung des aufgereinigten, funktionellen Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmentes.

Da auch in einer 100-fachen Verdünnung ein sehr hohes Signal im ELISA zu beobachten war, wurden in einem weiteren ELISA weitere Verdünnungen des rekombinanten Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmentes eingesetzt (Abb. 6.17).

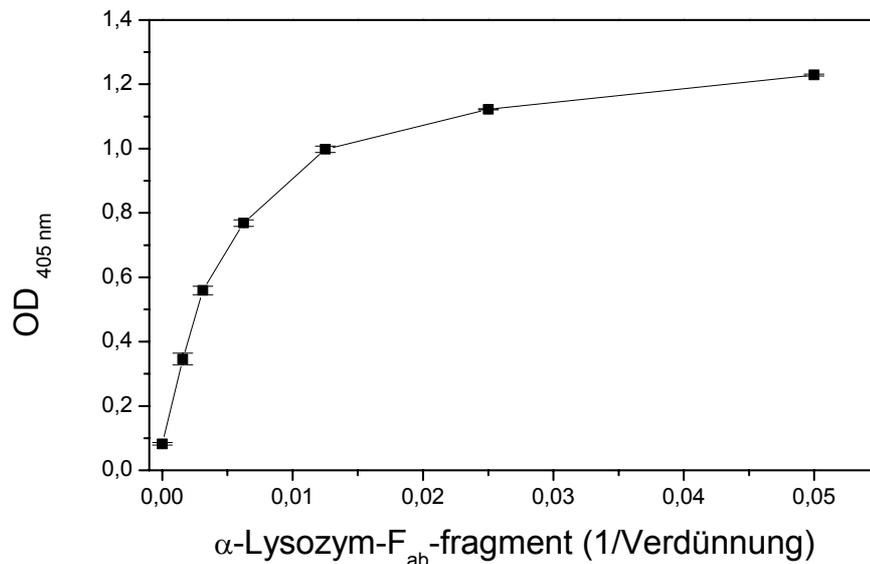


Abb. 6.17 ELISA zur Detektion von Anti-Lysozym- F_{ab} -Fragmenten unterschiedlicher Verdünnungen

Auswertung des ELISAs nach Format IV (Abb. 6.13); Antigen: Lysozym aus Hühnereiweiß (2,5 μ g/ml); Detektionsantikörper: Aufkonzentriertes Anti-Lysozym- F_{ab} -Fragment; Durchfluss der Aufreinigung mittels Ni-NTA; Detektion durch anti-mouse-anti- F_{ab} -AP-Konjugat (1:3000).

Das aufkonzentrierte Anti-Lysozym- F_{ab} -Fragment war bis zu einer Verdünnung von 1:640 im ELISA gut zu detektieren. Die Expression und die anschließenden Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritte führten somit zur Isolierung einer größeren Menge rekombinanter Antikörperfragmente.

6.1.1.8 Expressionsanalyse rekombinanter Anti-Lysozym- F_{ab} -Fragmente

Die Expression der Antikörperfragmente unterliegt der Transkriptionskontrolle durch den IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotor/Operator. Die Signalsequenzen *omp A* und *pho A* vermitteln daher die simultane Translokation der V_H - und V_L -Fragmente ins Periplasma, wo die Synthese zum funktionellen Protein erfolgt. Um die Induzierbarkeit der Transkription, die Effizienz des Transports und die der Synthese im Periplasma zu überprüfen, wurde eine Anzucht mit und ohne Zugabe von IPTG durchgeführt. Die nach Abtrennung des Periplasma erhaltene Sphäroblastensuspension wurde zudem durch Ultraschall homogenisiert und auf ihren Gehalt an anti-Lysozym- F_{ab} -Fragmenten untersucht. Die induzierten und nicht-induzierten Fraktionen wurden im ELISA getestet (Abb. 6.18).

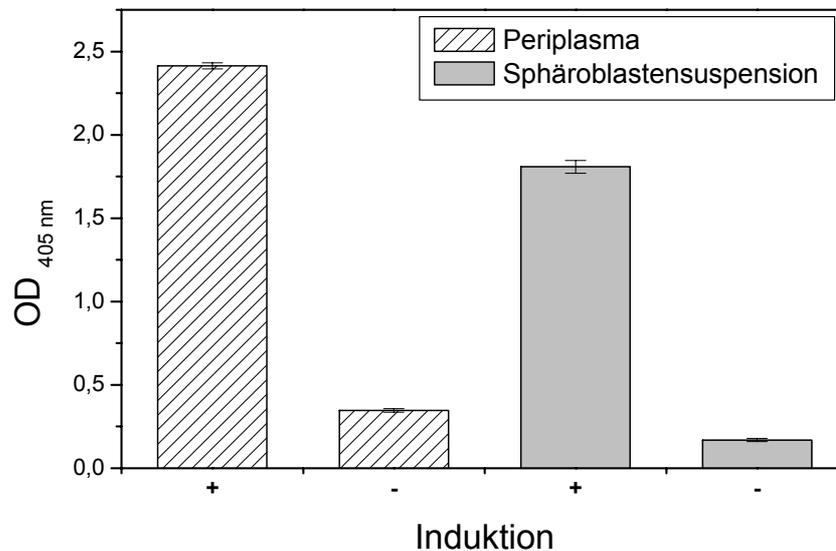


Abb. 6.18 ELISA zur Identifizierung von Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmenten in verschiedenen Zellkompartimenten, mit und ohne Induktion durch IPTG

Auswertung des ELISAs. Antigen: Lysozym aus Hühnereiweiß; Detektionsantikörper: Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragment (1:4) aus Periplasma und Sphäroblastensuspension. Die Zellernte erfolgte nach 3-stündiger Anzucht mit und ohne Zugabe von IPTG (0,5 mM). Detektion durch anti-mouse-anti-F_{ab}-AP-Konjugat (1:3000).

Aus dem Test ging hervor, dass der Expressionsvektor pASK84 in der Tat der induzierbaren Transkriptionskontrolle durch das gewählte Promotor/Operator-System unterlag. Jedoch erfolgte die Ausbildung der Disulfidbrücken-Bindung und die korrekte Faltung der Tertiärstrukturen nicht ausschließlich nach Transport der Komponenten in den periplasmatischen Raum. Die Aufarbeitung der Sphäroblastensuspension ergab eine relativ hohe Menge an funktionellen Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmenten.

Eine Analyse der aufkonzentrierten Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente im SDS-Gel bestätigte die effiziente Aufreinigung der Antikörperfragmente aus dem Periplasma. Die rekombinanten Antikörperfragmente konnten sauber isoliert und aufgereinigt werden und resultierten in Banden erwarteter Größen. Die unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragenen Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente bandierten bei ca. 40 kDa (Abb 6.19, Spur 3, 4). Unter reduzierenden Bedingungen wurde die Disulfid-Brückenbindung und damit die dimere Form der F_{ab}-Fragmente aufgelöst und V_H-/C_H- und V_L-/C_L-Fragmente des Antikörperfragmentes wurden getrennt voneinander, bei ca. 20-25 kDa detektiert (Abb 6.19, Spur 7, 8). Im Säulendurchfluss (Abb 6.19, Spuren 1, 5) konnten, auch nach Aufkonzentrierung (Abb 6.19,

Spur 2, 6), weder unter nicht-reduzierenden (Abb 6.19, Spur 1, 2), noch unter reduzierenden (Abb 6.19, Spur 5, 6) Bedingungen rekombinante Antikörperfragmente erkannt werden.

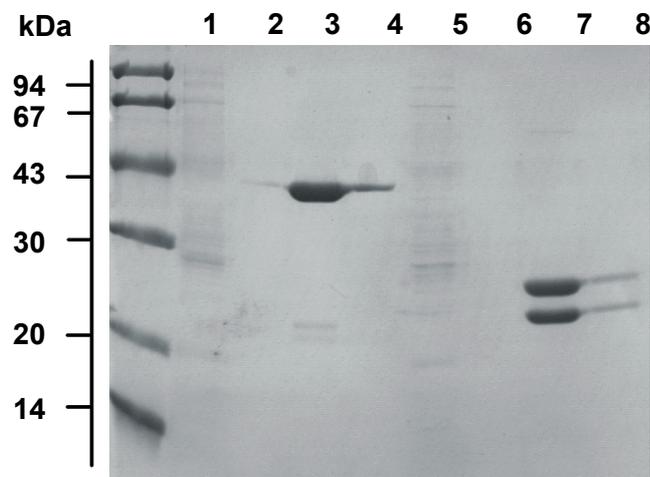


Abb. 6.19 SDS-PAGE zur Identifizierung von Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmenten

SDS-PAGE (11 %). Säulendurchfluss, nicht-reduzierende Bedingungen (Spur 1); Säulendurchfluss aufkonzentriert, nicht-reduzierende Bedingungen (Spur 2), aufkonzentrierte Fraktionen rekombinanten Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmentes, nicht-reduzierende Bedingungen (Spur 3); Fraktionen rekombinanten Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmentes vor Aufkonzentrierung, nicht-reduzierende Bedingungen (Spur 4); Säulendurchfluss, reduzierende Bedingungen (Spur 5); Säulendurchfluss aufkonzentriert, reduzierende Bedingungen (Spur 6); aufkonzentrierte Fraktionen rekombinanten Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmentes, reduzierende Bedingungen (Spur 7); Fraktionen rekombinanten Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmentes vor Aufkonzentrierung, reduzierende Bedingungen (Spur 8). Marker: LMW.

Die IT1 F_{ab}-Fragmente ließen sich, auch nach Aufkonzentrierung der positiv getesteten Fraktionen, per SDS-Gelelektrophorese und konventioneller Färbung nicht nachweisen (Abb. 6.20, Spur 7). Die Western-Blot-Analyse bot neben dem ELISA, eine weitere Möglichkeit, rekombinante F_{ab}-Fragmente zu detektieren. Es wurden das Periplasma, die Sphäroblastensuspension mit und ohne Induktion durch IPTG und die vereinigten F_{ab}-Fragmente-enthaltenden Fraktionen vor und nach Aufkonzentrierung getestet. Auf Grund der höheren Empfindlichkeit des Western-Blots konnte so auch die relative Menge der exprimierten IT1 F_{ab}-Fragmente mit der der Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente verglichen werden.

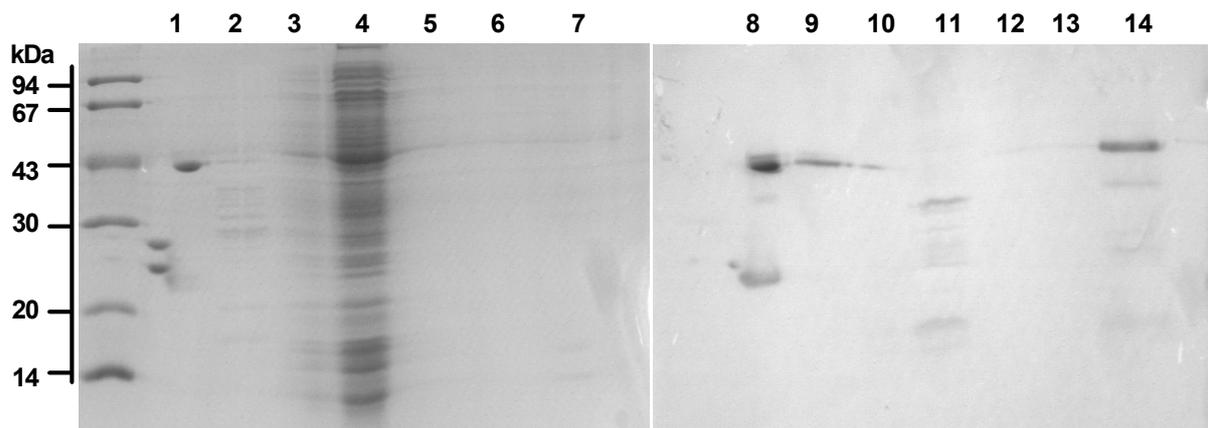


Abb. 6.20 SDS-PAGE und Western-Blot zum Vergleich von Anti-Lysozym- und IT1 F_{ab} -Fragmenten

links: SDS-PAGE (11%), nicht-reduzierende Bedingungen; Marker: LMW. rechts: Western-Blot auf Nitrocellulose; Detektion mit Anti- F_{ab} -Ak-POD-Konjugat (1:3000). Aufkonzentrierte Fraktionen rekombinanten Anti-Lysozym- F_{ab} -Fragmentes; (Spur 1, 8); Periplasma, nicht induziert (Spur 2, 9); Sphäroblastensuspension, nicht induziert (Spur 3, 10); Sphäroblastensuspension, induziert (Spur 4, 11); vereinigte Fraktionen rekombinanten IT1 F_{ab} -Fragmentes (Spur 5, 12); vereinigte Fraktionen rekombinanten IT1 F_{ab} -Fragmentes, 1. Aufkonzentrierung (Spur 6, 13); vereinigte Fraktionen rekombinanten IT1 F_{ab} -Fragmentes, 2. Aufkonzentrierung (Spur 7, 14).

Durch Diffusion des reduzierenden Probenpuffers des LMW-Markers erfolgte eine teilweise Dissoziation des benachbart aufgetragenen Anti-Lysozym- F_{ab} -Fragmentes (Abb. 6.20, Spur 1, 8). Die zweifach aufkonzentrierten IT1 F_{ab} -Fragmente ließen sich durch Western-Blot-Analyse visualisieren. Der Vergleich der Anti-Lysozym- F_{ab} -Fragmente mit den IT1 F_{ab} -Fragmenten zeigte, dass Erstere mit deutlich größerer Intensität nachzuweisen waren.

6.1.1.9 *Splice Overlap Extension (SOE)-PCR zur Amplifikation von scF_v-Fragmenten*

Die heterologe Expression von scF_v-Fragmenten in *E. coli* bot eine weitere Option zur Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente. Zur Amplifikation von scF_v-Fragmenten wurden V_H- und V_L-Fragmente des mAk IT13B8/E6 über eine Linker-Sequenz (93 bp) (Pharmacia, 1992), deren Termini komplementär zum 3'-Ende des V_H- Fragmentes, bzw. zum 5'-Ende des V_L- Fragmentes sind, mittels SOE-PCR miteinander verknüpft (Abb. 6.21 A). Dabei wird ein Linker-Primer-Mix des „Mouse ScF_v Module/Recombinant Phage Antibody System Kits“ (Pharmacia, 1992) eingesetzt, der für ein (Gly₄Ser)₃-Motiv codiert. Nach einer Auffüllreaktion erfolgte eine Vervielfältigung des scF_v-Fragmentes. Der verwendete RS-Primer-Mix des „Mouse ScF_v Module/Recombinant Phage Antibody System Kits“ (Pharmacia) führte zur Insertion einer NcoI-Schnittstelle durch den 5'-Primer und einer NotI-

Schnittstelle durch den 3'-Primer. Diese sollten zur gerichteten Klonierung des scF_V-Fragmentes in ein pET-Expressionssystem genutzt werden (Abb. 6.21 B), das eine pelB Leadersequenz für die Sekretion ins Periplasma und einen His-Tag für eine vereinfachte Aufreinigung bereitstellt.

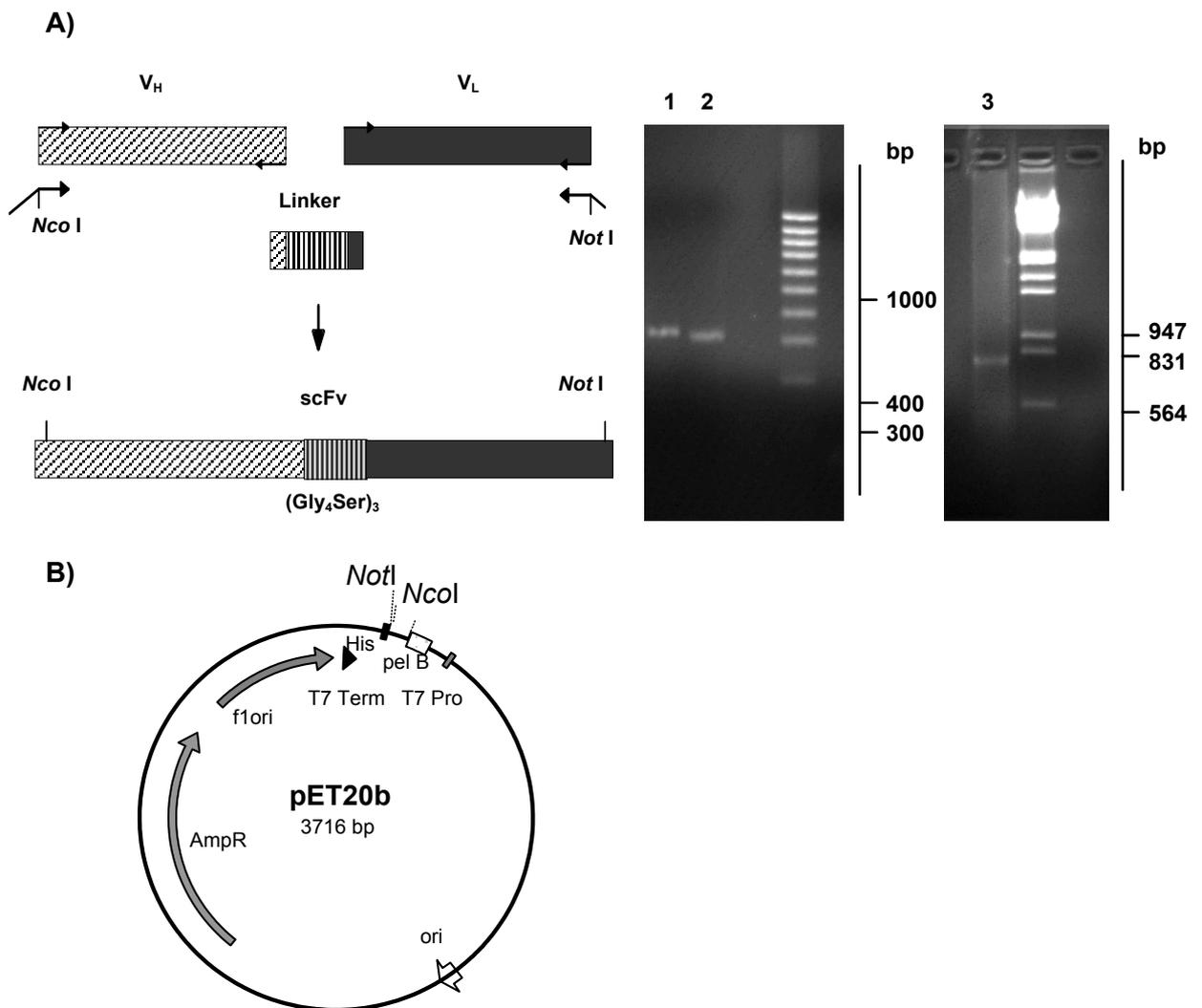


Abb. 6.21 SOE-PCR zur Amplifikation von scF_V-Fragmenten

A, Schematische Darstellung der Fusion von V_H- und V_L-Fragment mittels eines DNA-Linkers und der Insertion der Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Not*I durch entsprechende Primer. Agarosegele (1,5 %); links: V_H-Fragment des mAK IT13B8/E6 (Spur 1), V_L-Fragment des mAK IT13B8/E6 (Spur 2). Marker: 100 bp-Leiter; rechts: scF_V-Amplifikat des mAK IT13B8/E6 (Spur 3). Marker: λ-Marker, (λ-DNA/*Eco*RI/*Hind* III). B, pET20b-Vektor zur Expression von scF_V-Fragmenten.

Das nach SOE-PCR erhaltene Amplikon wurde zunächst zur weiteren Charakterisierung in den Vektor pGEM-T Easy kloniert. Das Linkerpeptid des scF_v-Fragmentes kodiert bei korrekter Amplifikation für eine definierte Aminosäure-Sequenz, bei der ein Motiv aus vier Glycinen, gefolgt von einem Serin, dreimal wiederholt wird. Durch sukzessive Sequenzierung von vier positiven Klonen wurden verschiedene Mutationen 5'-terminal im Linker-Bereich der scFv-Fragmente detektiert (Abb. 6.22). Der Klon pGsc22 wies in der Linker-Region einen g→t-Austausch auf, wodurch statt des zweiten Glycins ein Valin kodiert wurde (Abb. 6.22 A). Die Untersuchung des Klons pGsc10 ergab, dass durch eine fehlerhafte Amplifikation ein Aminosäure-Austausch erfolgte. Als Konsequenz wurde das erste Glycin des Linker-Bereiches durch ein Asparagin ersetzt. Ein a→g-Austausch ergab anstelle des dritten Glycins ein Serin (Abb. 6.22 B). Im Klon pGsc55 wurde ein t→g-Austausch identifiziert, welcher zu einem Cystein statt des ersten Glycins des Peptid-Linkers führte (Abb. 6.22 C).

<i>tggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtgtaggcgggtcaggcggaggtggc</i>	60	A)
W G Q G T T V T V S S G V G G S G G G G	20	
<i>tctggcgggtggcggatcggacattgagctcactcagtctcca</i>	102	
S G G G G S D I E L T Q S P	34	
<i>tggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaaatggaagcggttcaggcggaggtggc</i>	60	B)
W G Q G T T V T V S S N G S G S G G G G	20	
<i>tctggcgggtggcggatctgacattgagctcaccagctcca</i>	102	
S G G G G S D I E L T Q S P	34	
<i>tggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcatgtggaggcggttcaggcggaggtggc</i>	60	C)
W G Q G T T V T V S S C G G G S G G G G	20	
<i>tctggcgggtggcggatcggacattgagctcaccagctcca</i>	102	
S G G G G S D I E L T Q S P	34	
<i>tggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcagggggaggcggttcaggcggaggtggc</i>	60	D)
W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G	20	
<i>tctggcgggtggcggatcggacattgagctcactcagtctcca</i>	102	
S G G G G S D I E L T Q S P	34	

Abb. 6.22 Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenzen der scF_v-Linker-Region nach SOE-PCR

Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz der scF_v-Linker-Region der Klone: A, pGsc22; B, pGsc10; C, pGsc55; D, pGscIT1K12. Die Aminosäuresequenzen der Peptid-Linker sind grau markiert und die Aminosäure und Nukleinsäure-Mutationen sind fett hervorgehoben. Die Primer 3'-V_H FOR und 5'-V_K BACK sind kursiv dargestellt und die Restriktionsschnittstellen *Bst*EII (V_H) und *Sac*I (V_L) sind unterstrichen.

Schließlich konnte jedoch ein scF_v-Fragment ohne Mutation im Klon 12 (Vektor pGscIT1K12) identifiziert werden (Abb. 6.22 D). Das korrekt amplifizierte scF_v-DNA-Fragment wurde durch eine *Not*I/*Nco*I-Restriktion aus dem Sicherheitsvektor pGEM-T Easy gewonnen und nach Aufreinigung aus einem präparativen Agarosegel in den Expressionsvektor pET20b kloniert (vgl. Abb. 6.21) Beide Vektoren wurden durch Restriktions- und Sequenzanalysen überprüft.

6.1.1.10 Klonierung des Vektors pASKscFvIT1 zur heterologen Expression rekombinanter IT1 scF_v-Fragmente

In Kapitel 6.1.1.7 wurde geschildert, dass die SOE-PCR zur Amplifikation von scF_v-Fragmenten im Linkerbereich, äußerst mutationsanfällig ist. Alternativ zur SOE-PCR wurde der Vektor pASKIT1 (Kap. 6.1.1.4) weiter modifiziert, um eine vereinfachte Konstruktion rekombinanter IT1 scF_v-Fragmente zur späteren, heterologen Expression zu ermöglichen.

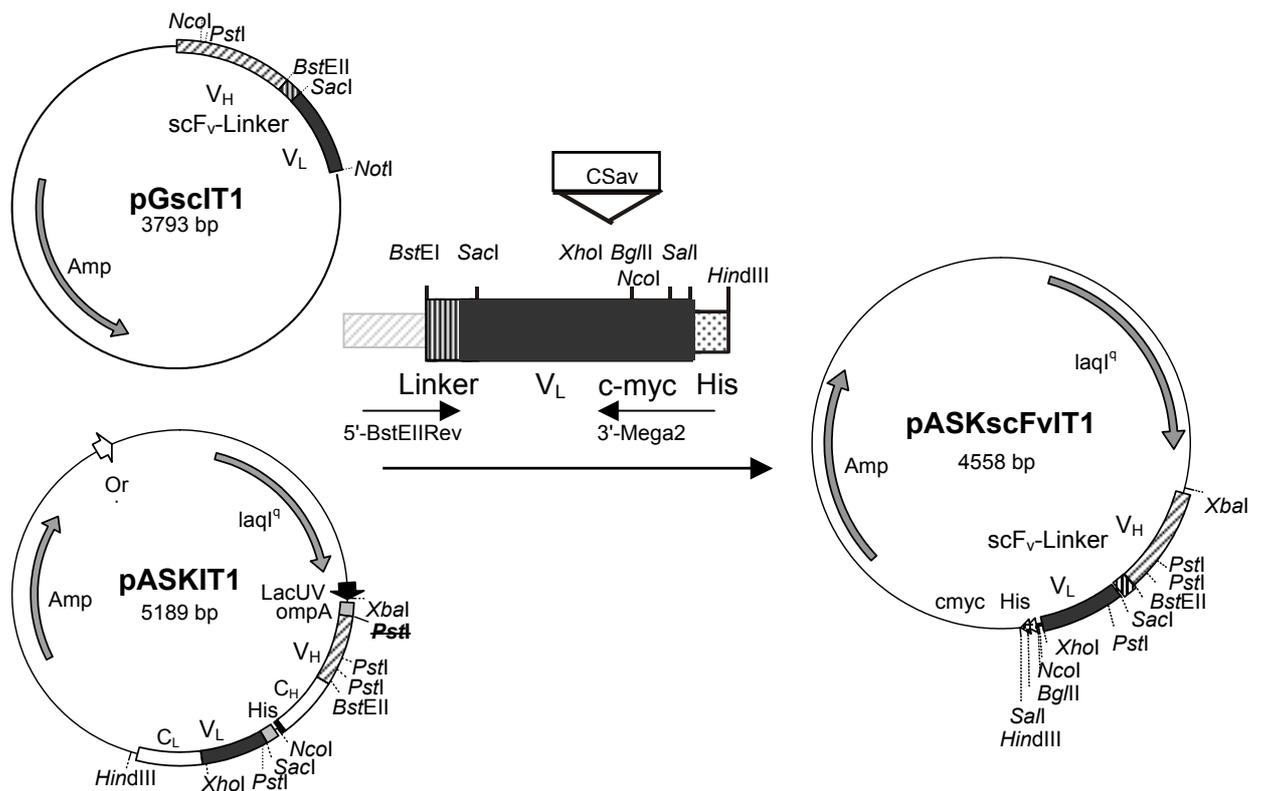


Abb. 6.23 Konstruktion des scF_v-Fusions-Fragmentes

Schematische Darstellung des scF_v-Fusions-Fragmentes im Vektor pASK84. Ausgehend von einem scF_v-Fragment wurden der Linker und das V_H-Fragment reamplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden ein His-Tag und ein c-myc-Tag generiert. Durch diverse Restriktionsschnittstellen wird die Excision dieser Tags, die Insertion eines CSav-Tags und der Austausch von V_H und V_L-Fragmenten ermöglicht.

Durch die Modifikation des Vektors pASKIT1 (Kap. 6.1.1.4) wurde zudem ein Expressionsvektor konstruiert, welcher die Möglichkeit zur periplasmatischen Expression von IT1 scF_v-Fragmenten bietet.

Nach Restriktion mit den Endonukleasen *BstEII* und *HindIII* wurden zunächst die C_{H1}-, V_L- und C_{L1}-Regionen von dem Vektor pASKIT1 abgetrennt und der linearisierte Restvektor über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Der Vektor pGscIT1 Klon 12, der keine Mutation in

der Linkerregion aufwies, wurde als Matrize zur Amplifikation des scF_V-Fusions-Fragmentes eingesetzt (Kap. 5.2.2.6). In einer Zwei-Stufen-PCR wurde zunächst der 3'-Primer Mega1 mit dem 5'-Primer BstEIIRev verwendet und das PCR-Produkt für eine anschließende PCR mit der Primerkombination 5'-BstEIIRev/3'-Mega2 eingesetzt. Das entstandene Linker-V_L-Tag-Produkt wurde, nach einer Zwischenklonierung in pGEM-T Easy, durch Restriktions- und Sequenzanalyse (Daten nicht gezeigt) überprüft und zur weiteren Charakterisierung, ebenfalls mit *BstEII* und *HindIII* geschnitten und nach Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel mit dem pASKIT1-Restvektor ligiert (Abb. 6.23). Die erfolgreiche Konstruktion des resultierenden Vektors pASKscFvIT1 wurde durch eine Restriktions- (Abb. 6.24) und Sequenzanalyse bestätigt.

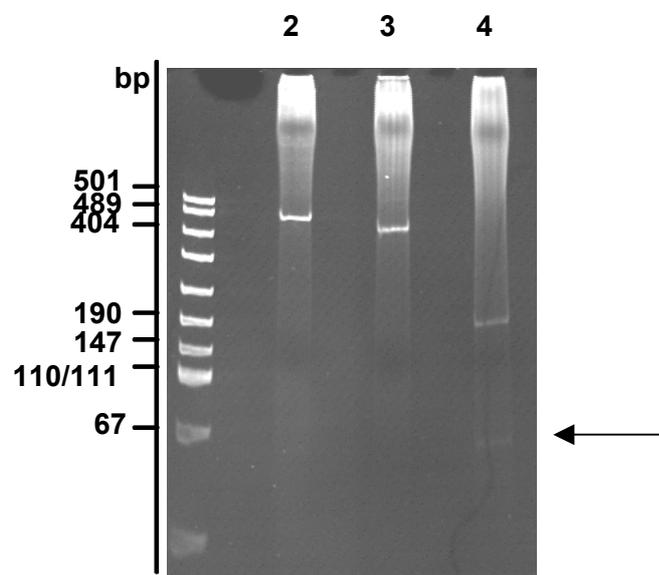


Abb. 6.24 Restriktionsanalyse des Expressionsvektors pASKscFvIT1

PAGE (10 %). Restriktionen des Vektors pASKscFvIT1: *BstEII/HindIII*-Restriktion (Spur 2) *XbaI/BstEII*-Restriktion (Spur 3), *PstI*-Restriktion (Spur 4). Marker: pUC 19 DNA/*MspI* (*HpaII*).

Die *BstEII/HindIII*-Doppelrestriktion des Expressionsvektors pASKscFvIT1 ergab wie erwartet ein 468 bp V_L-enthaltendes Fragment (Abb. 6.24, Spur 2), die *XbaI/BstEII*-Restriktion ein 422 bp großes V_H-enthaltendes Fragment (Abb. 6.24, Spur 3). Wurde der Vektor mit der Endonuklease *PstI* geschnitten, entstanden 4309 bp, 189 bp und 60 bp große Restriktionsfragmente, von denen die beiden kleineren Fragmente im Agarosegel (Abb. 6.24, Spur 4) detektiert wurden. Zur periplasmatischen Expression wurde *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) als Wirt gewählt.

Die Konstruktion des Vektors pASKscFvIT1 bietet die Möglichkeit zur Aufreinigung von scFv-Fragmenten anstelle der zuvor verwendeten (Kap. 6.1.1.4) F_{ab}-Fragmenten aus dem Periplasma. Die Detektion des rekombinanten Proteins kann durch einen der beiden

fusionierten His- und c-myc-Tags erfolgen. Durch die zusätzliche Bereitstellung der Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Nco*I wird die Insertion von CSav eröffnet und so die für das EU-Projekt erwogene Möglichkeit zur Verknüpfung des Antikörperfragmentes mit biotinylierter DNA.

6.1.1.11 Detektion rekombinanter IT1 scF_v-Fragmente

Mittels SOE-PCR wurden scF_v-Fragmente des mAk IT1 3B8/E6 amplifiziert (Kap. 6.1.1.9). Nach Identifizierung eines korrekt vervielfältigten Produktes wurde das IT1 scF_v-Fragment aus dem Vektor pGscIT1 in den Expressionsvektor pET20b kloniert. Die Familie der pET-Vektoren wurde für die Klonierung und Expression von Proteinen entwickelt. pET-Vektoren unterstehen der Kontrolle eines starken T7-Promotors (Studier *et al.*, 1990). Die heterologe Expression des Proteins erfolgt durch die Induktion mit IPTG. Die T7-RNA-Polymerase ist in das Genom des Wirtes *E. coli* BL21(DE3) pLysS integriert. Der schwache ϕ 3.8-Promotor des Plasmids pLysS sorgt für die Hintergrundexpression des bifunktionalen T7-Lysozyms. Das Enzym inhibiert die T7-RNA-Polymerase, damit die Expression nur nach Induktion stattfindet. Zudem wird die Mureinwand des Wirtsbakteriums verdaut, wodurch die Akkumulation zytotoxischer Proteine unterbunden wird. Nach cytosolischer Expression wird das Protein aus Einschlusskörpern renaturiert. Durch die pelB-Leadersequenz, die die Translokation des Proteins ins Periplasma ermöglicht, weisen die im Cytosol verbliebenen scF_v-Fragmente eine etwas größere Masse auf, als die löslichen Proteine im Periplasma, deren Leadersequenz zuvor abgespalten wird. Zur Detektion rekombinanter IT1 scF_v-Fragmente im Cytosol, wurden pelletierte Zellen einer 100 ml-Kultur aufgeschlossen. Dabei wurden Zellen eines mit IPTG induzierten, so wie die eines nicht-induzierten Ansatzes aufgearbeitet. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE auf das Vorhandensein von IT1 scF_v untersucht (Abb. 6.25).

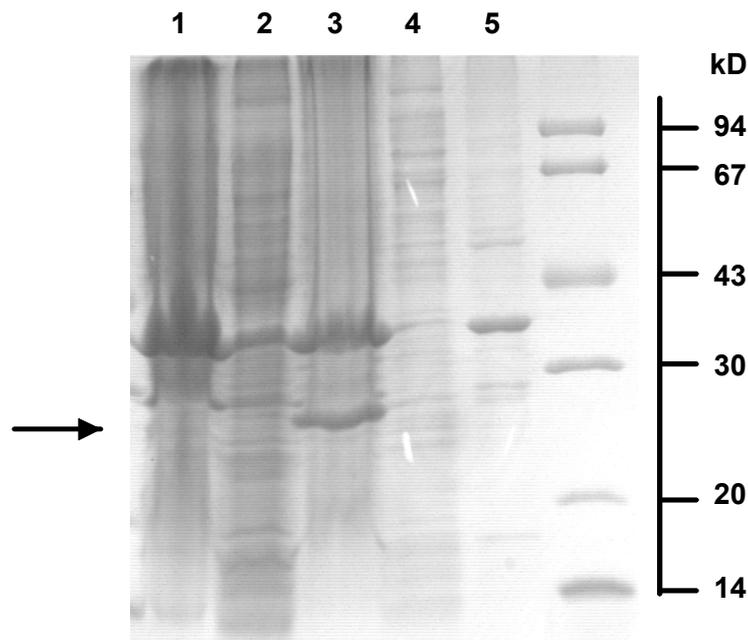


Abb. 6.25 SDS-PAGE zur Detektion von cytosolischen IT1 scF_V-Fragmenten

SDS-PAGE (11%); Sphäroblasten, nicht-induziert (Spur 1); Überstand, nicht-induziert (Spur 2); Sphäroblasten, induziert (Spur 3); Überstand, induziert (Spur 4); Überstand, induziert, reduzierende Bedingungen (Spur 5). Marker: LMW.

Die Sphäroblastensuspension des induzierten Ansatzes (Abb. 6.25, Spur 3) wies eine Bande auf, die der erwarteten Größe des scF_V-Fragmentes (ca. 25 kDa) entsprechen könnte. In den Überständen war, unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen, keine entsprechende Bande nachzuweisen. Das pET 20-System erforderte hier die Renaturierung des Proteins aus Einschlusskörpern und die Prozessierung der Leadersequenz pelB und erwies sich für die Expression von scF_V-Fragmenten als ungeeignet und wurde daher nicht weiter verfolgt, bzw. optimiert.

Um eine funktionelle, periplasmatische Expression von IT1 scF_V-Fragmenten zu ermöglichen, wurde der, auf der Basis des Vektors pASKIT1 konstruierte Vektor pASKscFvIT1 (Kap. 6.1.1.10) eingesetzt. Dieser erlaubte dann die Detektion des scF_V-Fragmentes sowohl durch den His-Tag als auch den c-myc-Tag.

Aus einer zwei-Liter-Anzucht des Stammes *E. coli* JM83/pASKscFvIT1 wurde das Periplasma aufgearbeitet und die His-Tag fusionierten, rekombinanten IT1 scF_V-Fragmente wurden unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose isoliert und mittels FPLC fraktioniert eluiert. Die Detektion der rekombinanten Proteine in den aufgefangenen Fraktionen erfolgte durch

ELISA (Abb. 6.26). unter Verwendung eines Anti-c-myc-Antikörpers. Der Nachweis des Anti-c-myc-Antikörpers erfolgte durch goat-anti-mouse-anti-F_{ab}-Peroxidase-Konjugat.

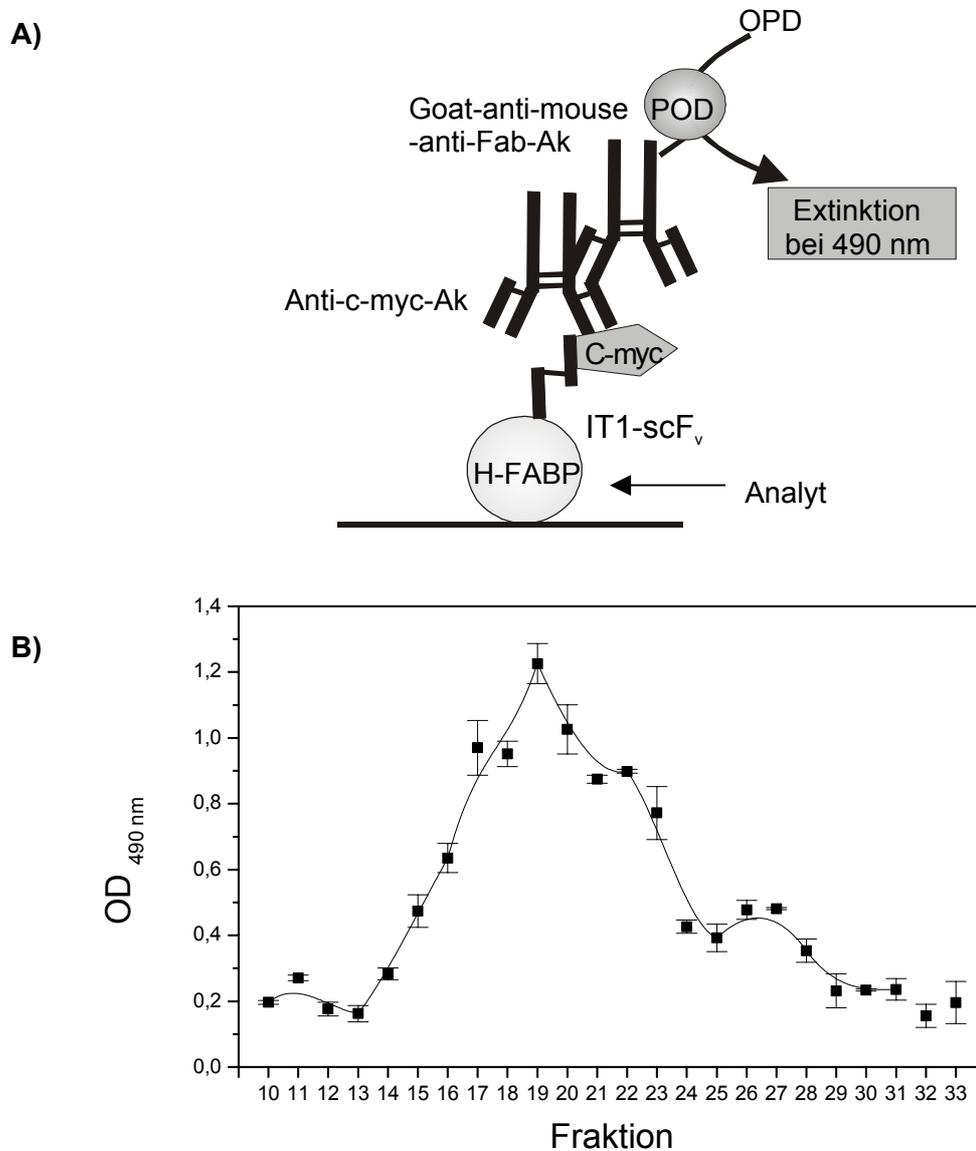


Abb. 6.26 ELISA zur Identifizierung IT1 scF_v-enthaltender Fraktionen

A, Schematische Darstellung des ELISA-Formates zur Detektion IT1 scF_v-enthaltender Fraktionen. B, Auswertung des ELISAs nach Format A; Antigen: H-FABP (50 µg/ml); Fänger: IT1 scF_v-Fragment (1:2); Detektion durch goat-anti-mouse-anti-F_{ab}-Peroxidase-Konjugat (1:3000).

Im Chromatogramm konnte in den Fraktionen 18-23 bei 280 nm eine höhere Extinktion gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Durch ELISA wurde der größte Anteil c-myc-Tag enthaltender IT1 scF_v-Fragmente in den Fraktionen 16-23 nachgewiesen. Der Peak im Chromatogramm konnte somit dem rekombinanten scF_v-Fragment zugeordnet werden.

Im SDS-PAGE konnten die IT1 scF_v-Fragmente in der Sphäroblastensuspension sowie im periplasmatischen Überstand auf Grund der geringen Konzentration nicht anhand einer distinkten Bande erkannt werden. Eine weitere, sensitivere Identifizierungsmöglichkeit, die auch schon bei der Expression rekombinanter IT1 F_{ab}-Fragmente und anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente erfolgreich eingesetzt wurde, bot die Western-Blot-Analyse (Abb. 6.27). Die Detektion erfolgte hier durch Ni-NTA-alkalische-Phosphatase-Konjugat, mit dessen Hilfe His-Tag-Proteine analog zu Immunoblots detektiert werden können.

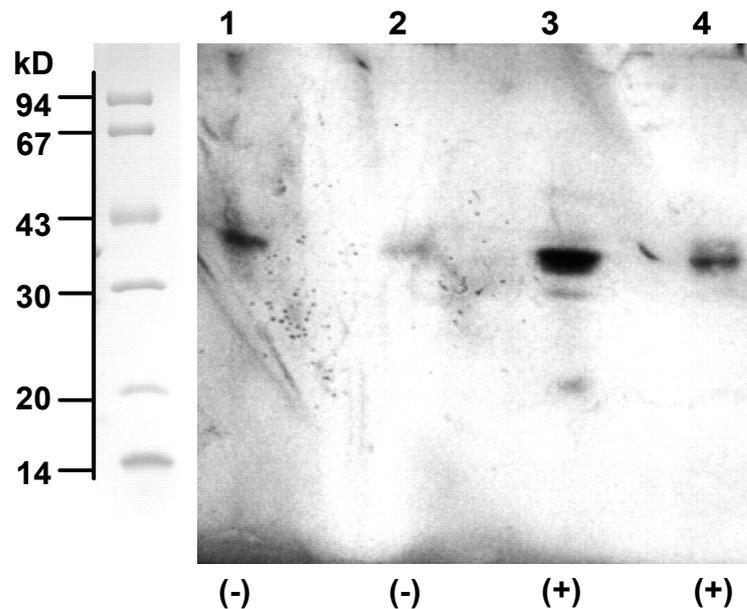


Abb. 6.27 Western-Blot zur Identifizierung von IT1 scF_v-Fragmenten

Western-Blot auf Nitrocellulose; Sphäroblasten, nicht-induziert (Spur 1); Überstand, nicht-induziert (Spur 2); Sphäroblasten, induziert (Spur 3); Überstand, induziert (Spur 4); Detektion mit Ni-NTA-AP-Konjugat.

Anhand dieses Western-Blots konnten die His-Tag-fusionierten scF_v-Fragmente detektiert werden. Das intensivste Signal ergab sich nach Aufarbeitung der Sphäroblasten und der periplasmatischen Fraktion des induzierten Ansatzes, allerdings wurde auch ohne Induktion mit IPTG eine gewisse basale Aktivität des Promotors beobachtet. Auch bei Verwendung des pASK-basierten Expressionssystems für scF_v, das einen deutlich schwächeren Promotor als das pET-System aufweist, reichte die intrazelluläre Konzentration an scF_v-Fragmenten aus, um im Cytosol wahrscheinlich die Aggregation zu Einschlußkörpern zu favorisieren.

6.1.2 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper CEA2-4.4 und CEA3-55.4 gegen carcinoembryonales Antigen

Im Rahmen des ULISA-EU-Projektes wurden zwei weitere monoklonale Antikörper, die gegen den Tumormarker carcinoembryonales Antigen (CEA) gerichtet waren, charakterisiert. CEA ist ein tumorassoziertes Antigen, das zur klinischen Diagnostik einer Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt wird. Die monoklonalen IgG1-Antikörper CEA2-4.4 und CEA3-55.4 finden vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in biologischen Assays, da sie simultan an CEA binden und somit unterschiedliche Epitope besetzen.

6.1.2.1 Isolierung von RNA und Amplifikation von CEA3-55.4 und CEA2-4.4 V_H - und V_L - Sequenzen

Aus jeweils 1×10^7 Tumor-Hybridomzellen wurde Gesamt-RNA der monoklonalen Antikörper CEA2-4.4 und CEA3-55.4 gegen carcinoembryonales Antigen (CEA) isoliert. Die RNA-Konzentrationen des mAK CEA2-4.4 betrug 2,7 mg/ml und die des mAK CEA3-55.4 2,5 mg/ml. Die Quotienten der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm betragen für CEA2-4.4 1,87 und für CEA3-55.4 1,88. Die RNA-Präparationen waren somit nicht durch Proteine verunreinigt. Zur reversen Transkription wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Zur Amplifikation der V_H - und V_L -Sequenzen wurden wiederum die Primer verwendet, welche mit den konservierten *Framework*-Regionen 1 und 4 der variablen Antikörperregionen hybridisieren (Kap. 6.1.1.1) und sich bei der Klonierung der variablen Regionen des IT1 monoklonalen Antikörpers bewährt haben. Durch den Einsatz der Primer 5'-VH1BACK und 3'-VH1FOR wurde die V_H -Sequenz vervielfältigt. Die V_L -Region wurde unter Verwendung der Primerkombination 5'-VK2BACK und 3'-VK4FOR amplifiziert. Die Überprüfung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 6.28) bestätigte die Vervielfältigung der V_L - und der V_H -Fragmente und zeigte die erwarteten Größen von 336 bp bzw. 351 bp.

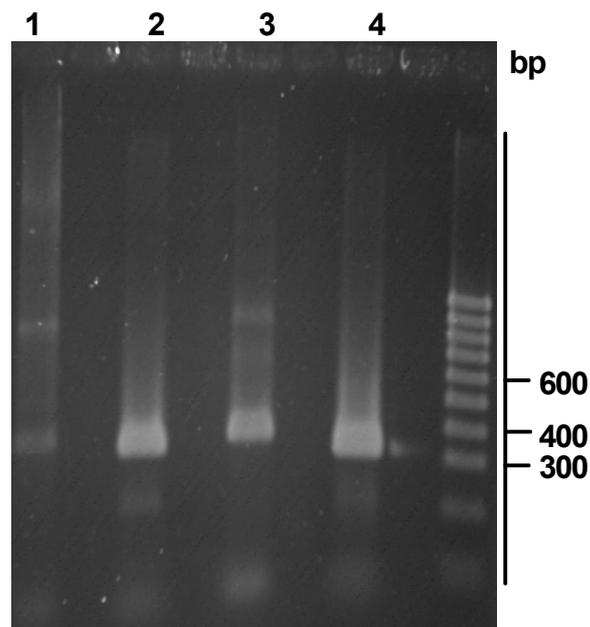


Abb. 6.28 Amplifikation von V_H - und V_L -Regionen der mAK CEA2-4.4 und CEA3-55.4

Agarosegel (1,5 %); Als Matrizen wurde revers transkribierte cDNA aus mRNA eingesetzt. V_H -Fragment CEA2-4.4, Hybridisierungstemperatur 52°C (Spur 1); V_L -Fragment CEA2-4.4, Hybridisierungstemperatur 50°C (Spur 2); V_L -Fragment CEA3-55.4, Hybridisierungstemperatur 50°C (Spur 3); V_H -Fragment CEA3-55.4, Hybridisierungstemperatur 50°C (Spur 4). Marker: 100 bp-Leiter.

Die Bande des CEA2-4.4- V_H -Amplikons erschien im Gel schwächer als die Amplifikate der übrigen Antikörper-Fragmente (Spur 1). Da einige PCR-Nebenprodukte die PCR-Ansätze verunreinigten, wurden die Produkte gewünschter Größen aus dem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt. Nach einer weiteren gelelektrophoretischen Überprüfung der gereinigten Produkte (Daten nicht gezeigt) wurden die V_H - und V_L -Fragmente jeweils über TA-Klonierung in den Vektor pGEMT Easy kloniert. Die resultierenden Sicherungsvektoren pGCEA2VH, pGCEA2VL, pGCEA3VH und pGCEA3VL wurden zunächst durch Restriktionsanalyse und anschließende Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Generierung der Restriktionsschnittstellen, *SacI* und *XhoI* durch die Verwendung der Primer 5'-VK2BACK und 3'-VK4FOR zur Amplifizierung der V_L -Fragmente von CEA2-4.4 und CEA3-55.4 wurde so bestätigt. Durch *SacI*/*XhoI*-Restriktionen wurden die V_L -Fragmente aus den Sicherungsvektoren isoliert (Abb. 6.31 Spuren 2, 3). Da sich auch in der MCS (*multicloning site*) des Vektors eine *SacI*-Schnittstelle befindet, wurden ferner 56 bp große Fragmente sichtbar. So konnte festgestellt werden, dass die V_L -PCR-Produkte in 5'-3'-Richtung in den Vektor inseriert waren. Die V_H -Region des mAK CEA 3-55.4 weist die durch die Primer 5'-VH1BACK und 3'-VH1FOR inserierten Schnittstellen *PstI* und *BstEII* auf. Das V_H -Fragment des mAK CEA3-55.4 wurde nach Restriktion mit diesen Restriktionsenzymen aus dem

Vektor pGCEA3VH geschnitten (Abb. 6.31, Spur 4). Durch die Insertion des Fragmentes in 5'-3'-Richtung ergibt sich zusätzlich ein 37 bp großes Fragment, da die MCS des Vektors eine *Pst*I-Schnittstelle beinhaltet. Die weitere Charakterisierung der variablen Regionen erfolgte durch Sequenzierung. Die Nukleotidsequenzen der V_H-Region von CEA3 und der V_L-Regionen von CEA2-4.4 und CEA3-55.4 sind in Abb. 6.29 dokumentiert.

CEA3-55.4- V_H	
<i>agg</i> <u><i>tcaagctgcaagg</i></u> <i>agctctggaggaggctggtacaggcctgggggttctatgagacttc</i>	60
<i>tcctgtgcaacttctgggttcaccttcagtgattactacatagctgggtcctgccagcat</i>	120
<i>ccaggaaaggcacttgagtgggtgggttttattagaacaaagctaattggttacacaacag</i>	180
<i>agttcagtgcatctgtgacgggtcgggttcaccatctctagagataattcccaaagcatcc</i>	240
<i>tctatcttcaaataaacaccctgagagctgaggacagtgccacttattactgtgcaagag</i>	300
<i>ataggggaatacgggtactactttgactactggggccaagggaccacgg</i> <u><i>tcaaccgtctcct</i></u> <i>ca</i>	360 362
CEA3-55- V_L	
<i>gacattgagctcacc</i> <u><i>cagctctccagcaatcctgtctgcatctccaggggagaggg</i></u> <i>tcaca</i>	60
<i>atgacttgcaggccaactcacgtgtaacttacatgcactggtagcagcagaagccagga</i>	120
<i>tcctcccccaaacctggatttatgccacatccaacctggcttctggagtccctgctcgc</i>	180
<i>ttcagtgccagtggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagagtgaggagctgaa</i>	240
<i>gatgctgccacttattactgccagcagtgaggtagtaaccacccacggtcgggtgctggg</i>	300
<i>accaagctcga</i> <u><i>gataaaaacgg</i></u>	321
CEA2-4- V_L	
<i>gacattgagctcacc</i> <u><i>cagctctccagcttcccttagctgtatctctggggcagagggccacc</i></u>	60
<i>atctcatgcagggccagcaaaagtgtcagtgcatctggctatagttatatgcacttggt</i>	120
<i>ccaacagaaaccaggtacagccacccaactcctcatctatcttgcatccaacctagaat</i>	180
<i>ctggggtccctgccaggttcagtgggcagtggtctgggacagacttcaccctcaacatc</i>	240
<i>catcctgtggaggaggatgctgcacctattactgtcagcacagtagggagcttccg</i>	300
<i>cttacggttcgggtgctgggaccaagctcga</i> <u><i>gataaaaacgg</i></u>	339

Abb. 6.29 Nukleinsäuresequenzen der V_H- und V_L-Regionen der mAK CEA2-4.4 und CEA3-55.4

Restriktionsschnittstellen *Pst*I/*Bst*EII (V_H) und *Sac*I/*Xho*I (V_L) sind unterstrichen. Primer 5'-VH1BACK, 3'-VH1FOR, 5'-VK2BACK und 3'-VK4FOR sind kursiv dargestellt.

Eine Restriktion des Vektors pGCEA2VH mit *Pst*I und *Bst*EII resultierte in einem sich unterscheidenden Restriktionsmuster (Abb. 6.31, Spur 6), welches sich jedoch auch von dem des Vektors pGVHIT1 (Abb. 6.31, Spur 7) unterschied. Im V_H-Fragment des mAK CEA2-4.4 wurden in der Restriktionsanalyse zudem, wie beim IT1-V_H-Fragment, außer dem Restvektor zusätzliche Fragmente erhalten, was auf interne *Pst*I-Restriktionsschnittstellen hinwies. Zur Verdeutlichung, dass es sich beim V_H-Fragment des mAK CEA2-4.4 tatsächlich um das gesuchte V_H-Fragment handelt, wurde diese Sequenz mit der des V_H-Fragmentes des mAK IT-1 3B/E6 verglichen (Abb. 6.30).

<i>Pst</i> I	
CEA2V _H : <u>agg</u> tccag <u>ctgcagg</u> agtcctggggcagagccttgtagggtcaggggcctcagtcaggttgctctg	64
IT-1V _H : <u>agg</u> tccag <u>ctgcagg</u> cagtcaggggctgaactggcaagacctgggggcctcagtcgaagatgtctctg	64
CEA2V _H : cacagcttctggcttcaacattaaagactactatatgcactgggtgaagcagaggcctga	124
IT-1V _H : caaggcttctggctacacctttactagctacacgatgcactgggtaaacagaggcctgg	124
CEA2V _H : acagggcctggagtgattggatggattgatcctgagaatggtgatactgaatatgcccc	184
IT-1V _H : acagggctctggaatggattggctacattaatccttagcagtggttatactagttacactca	184
<i>Pst</i> I <i>Pst</i>I	
CEA2V _H : gaacctccagggcaaggccactatgactgcagacacatcctccaacacagcctac <u>ctgca</u>	244
IT-1V _H : gaagttcaaggacaaggccacattgactgcagacaattcctccagcacagcctacatgca	244
CEA2V _H : gctcagcagcctgacatctgaggacactgccgtctattactgtaatgtaaggggctttac	304
IT-1V _H : actgagcagcctgacatctgaggactctgcagtctattactg tgtacgag	294
<i>Pst</i> I	
CEA2V _H : tacggctaccgtctactttgactactggggccaagggaccac <u>gggtca</u>	351
IT-1V _H : at <u>ggttaccg</u> gtacttcgatgtctggggccaagggaccac <u>gggtcac</u> cggtctcctca	350
<i>Bst</i> EII <i>Bst</i>EII	

Abb. 6.30 Vergleich der V_H-Nukleotidsequenzen der Klone pGVHIT1 des mAK IT13B8/E6 und pGCEA2VH des mAK IT-1 3B8

Restriktionsschnittstellen *Pst*I/*Bst*EII (V_H) sind unterstrichen.

Der Sequenzvergleich zeigte, dass sich die Sequenzen eindeutig bezüglich ihrer Nukleotidabfolge und der Position der Restriktionsschnittstellen unterschieden (Abb. 6.30). Die Sequenzen der V_H-Regionen waren zu 78% identisch. Eine der beiden internen *Pst*I-Schnittstellen lag bei beiden V_H-Fragmenten an identischer Position, die andere war beim CEA2-4.4-V_H um 31 nt zum 5'-Ende verschoben (Abb. 6.31). Eine interne *Bst*EII-Schnittstelle, wie im Falle des IT1-V_H-Fragmentes, wurde beim CEA2-4.4-V_H-Fragment nicht gefunden.

Die Strategie, die zur Amplifikation und Klonierung des IT1-V_H-Fragmentes verfolgt wurde (Kap. 6.1.1.4), wurde auf das CEA2-V_H-Fragment übertragen. Durch eine *Nsi*I/*Bst*EII-Restriktion wird die Umklonierung in einen mit *Pst*I/*Bst*EII geöffneten pASK-Vektor, und damit die periplasmatische Expression eines CEA-F_{ab}-Fragmentes, ermöglicht. Die Restriktionsschnittstellen *Nsi*I und *Pst*I weisen kompatible Nukleotidüberhänge auf, jedoch wird die Erkennungssequenz der Restriktionsschnittstellen nach erfolgreicher Klonierung zerstört. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung des Primers 5'-V_H*Nsi*I ein PCR-Produkt mit einer *Nsi*I-Restriktionsschnittstelle generiert und resultierte in einem Fragment erwarteter Größe (350 bp). Das Amplifikat wurde in den Sicherheitsvektor pGEMT Easy kloniert und der

so generierte Vektor pGCEA2VHN durch Restriktions- (Abb. 6.31, Spur 5) und Sequenzanalyse bestätigt .

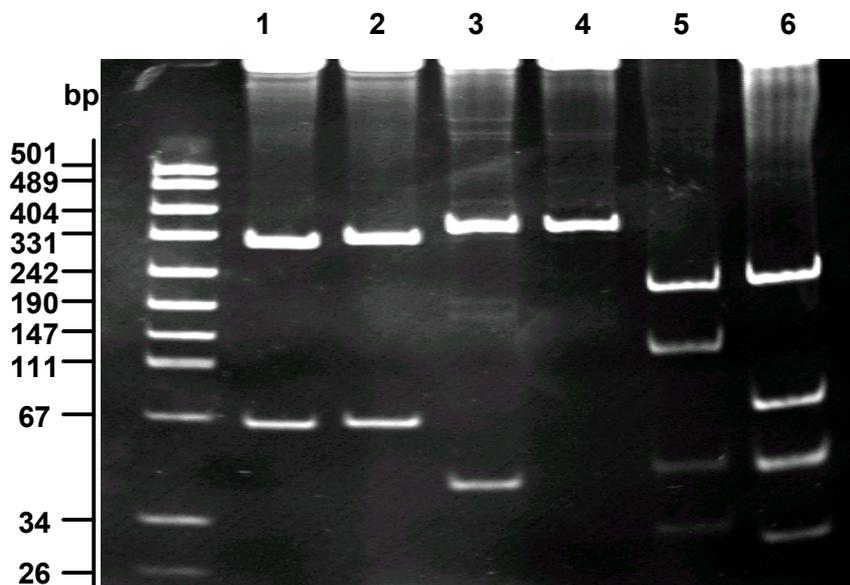


Abb. 6.31 Restriktionsanalyse der Plasmide pGCEA2VH, pGCEA2VL, pGCEA3VH, pGCEA3VL und pGVHIT1

PAGE (10 %); Marker: pUC 19 DNA/*MspI* (*HpaI*); *SacI/XhoI*-Restriktionen der Vektoren pGCEA3VL (Spur 1) und pGCEA2VL (Spur 2). *PstI/BstEII*-Restriktion des Vektors pGCEA3VH (Spur 3); *NsiI/BstEII*-Restriktion des Vektors pGCEA2VHN (Spur 4); *PstI/BstEII*-Restriktion der Vektoren pGCEA2VH (Spur 5) und pGVHIT1 (Spur 6).

Die variablen Regionen der mAK CEA2-4.4 und CEA3-55.4 sollten im Rahmen des EU-Projektes auch in Form von scF_v-Fragmenten zur Verfügung gestellt werden. Äquivalent zur Herstellung der scF_v-Fragmente des Modell-Antikörpers mAk IT13B8/E6 (Kap. 6.1.1.9), wurden die V_H- und V_L-Fragmente über eine (Gly₄Ser)₃-Linker-Sequenz mittels SOE-PCR miteinander verknüpft (Abb. 6.32).

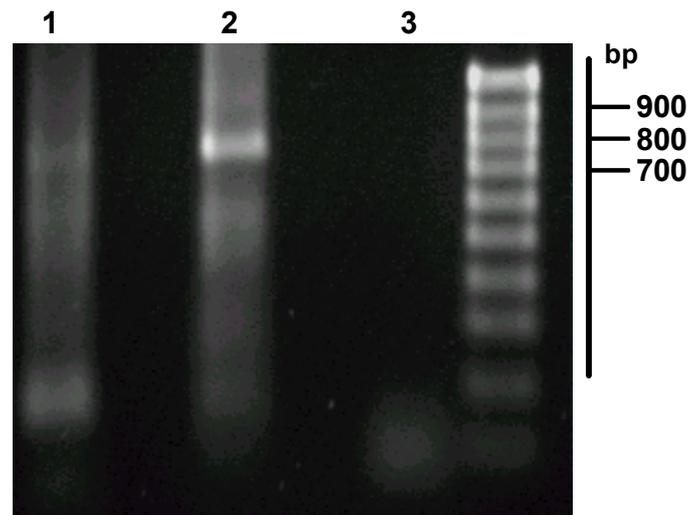


Abb. 6.32 SOE-PCR zur Amplifikation von CEA-scF_v-Fragmenten

Agarosegel (1%). scF_v-Amplifikat des mAK CEA2-4.4 (Spur 1). scF_v-Amplifikat des mAK CEA3-55.4 (Spur 2). Die Wasserkontrolle der PCR wurde in Spur 3 aufgetragen. Marker: 100 bp-Leiter.

Da die Modellantikörper CEA2-4.4 und CEA3-55.4 in der Immun-PCR nicht weiter verwendet wurden, wurde die Expression rekombinanter Anti-CEA-Antikörperfragmente im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

6.2 Klonierung und heterologe Expression von Kern-Streptavidin (CSav) in *E. coli*

Ziel des ULISA-EU-Projektes (CT97-0502) war die Etablierung eines Immun-PCR-Verfahrens, in dem optional rekombinante Antikörperfragmente eingesetzt werden konnten. Zur Erhöhung der Signalintensität kann ein biotinylierter DNA-Marker an den Detektorantikörper gekoppelt werden. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit funktionelles, rekombinantes Kern-Streptavidin exprimiert und auf seine Funktionalität getestet.

6.2.1 Klonierung des Expressionsvektors pETCS

Zur Herstellung von scF_v-Fragmenten wurde der Vektor pASKscFvIT1 konstruiert (Kap. 6.1.1.10). Die Möglichkeit, ein rekombinantes scF_v-Streptavidin-Fusionsprotein zu exprimieren, bietet die Insertion eines Kern-Streptavidin-Gens stromabwärts des scF_v-Gens. Nach Anzucht von *Streptomyces avidinii* wurden die gram-positiven Zellen unter Verwendung von Proteinase K und SDS lysiert und die DNA mittels einer Kaliumacetat-Lösung und eiskaltem Ethanol gefällt. Durch anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987) wurde die DNA aufgereinigt (Kap. 5.2.3.1). Photometrisch wurde die Konzentration in einer Höhe von 0,105 µg/ml bestimmt und eine Verunreinigung des Isolats durch Proteine konnte ausgeschlossen werden. Im Agarosegel konnte eine einzelne, hochmolekulare Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Aus der 159 Aminosäuren umfassenden, nativen Region wurde zur Produktion rekombinanten Streptavidins eine Kernsequenz von 118 Aminosäuren (CSav) nach Sano (1995) ausgewählt (Abb. 6.33).

Zur Amplifikation des CSav wurden die Primer 5'-Strep5 und 3'-Strep3 eingesetzt, die die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI beinhalten, um eine spätere Klonierung in den Expressionsvektor pET 3c (Novagen) zu ermöglichen.

<u>atg</u> cgcaagatcgctcgttgcagccatcgccgtttccctgaccacgggtctcgattacggcc	60
M R K I V V A A I A V S L T T V S I T A	20
<u>agc</u> gcttcgggcagaccctccaaggactogaaggccaggtctcggcccgaggcc <u>ggc</u>	120
S A S A D P S K D S K A Q V S A A E A G	40
<u>atc</u> accggcacctggtacaaccagctcggctogaccttcatcgtgaccgcgggcgcgac	180
I T G T W Y N Q L G S T F I V T A G A D	60
<u>ggc</u> gcctgaccggaacctacgagtcggccgctcggcaacgccgagagccgctacgtcctg	240
G A L T G T Y E S A V G N A E S R Y V L	80
<u>acc</u> ggtcgttacgacagcgcgcccgccaccgacggcagcggcaccgcctcggttgacg	300
T G R Y D S A P A T D G S G T A L G W T	100
<u>gtg</u> gcctggaagaataactaccgcaacgccactccgcgaccacgtggagcggccagtac	360
V A W K N N Y R N A H S A T T W S G Q Y	120
<u>gtc</u> ggcggcgcggaggcgaggatcaacaccagtggtgctgacctccggcaccaccgag	420
V G G A E A R I N T Q W L L T S G T T E	140
<u>gcc</u> aacgcctggaagtccacgctggtcggcca <u>cgacaccttccaagg</u> tgaaagccgtcc	480
A N A W K S T L V G H D T F T K V K P S	160
gccgcctccatcgacgcggcgaagaaggccggcgtcaacaacggcaaccgcctcgacgcc	540
A A S I D A A K K A G V N N G N P L D A	180
gttcagcagtag	552
V Q Q -	183

Abb. 6.33 Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen Kern-Streptavidin-Region von *Streptomyces avidinii*

Die Kern-Streptavidin-Region nach Sano (CSav) ist fett hervorgehoben. Das Startcodon ist kursiv dargestellt, das Signalpeptid ist gepunktet unterlegt und die Primerbindungsstellen unterstrichen.

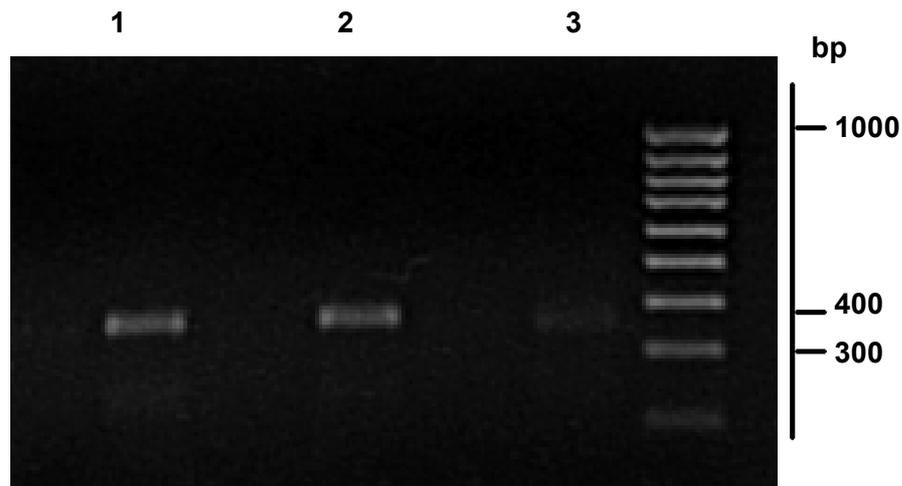


Abb. 6.34 Amplifikation der Kern-Streptavidin-Region (CSav) aus *Streptomyces avidinii*

Agarosegel (1,5 %); Als Matrize wurde genomische DNA aus *Streptomyces avidinii* eingesetzt. Hybridisierungstemperatur 55°C (Spur 1), Hybridisierungstemperatur 58°C (Spur 2) Hybridisierungstemperatur 61°C (Spur 3). Marker: 100 bp-Leiter.

Gemäß den Erwartungen wurden CSav-Amplifikate von 362 bp erhalten (Abb. 6.34). Die PCR-Produkte wurden zur weiteren Sequenzanalyse über eine TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und die korrekte Nukleotidsequenz konnte identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Der resultierende Vektor pGCS wurde mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Nach agarosegelelektrophoretischer Trennung der Restriktionsfragmente wurde das CSav-Fragment aus dem Gel aufgereinigt und gerichtet in den Vektor pET3c kloniert (Abb. 6.35).

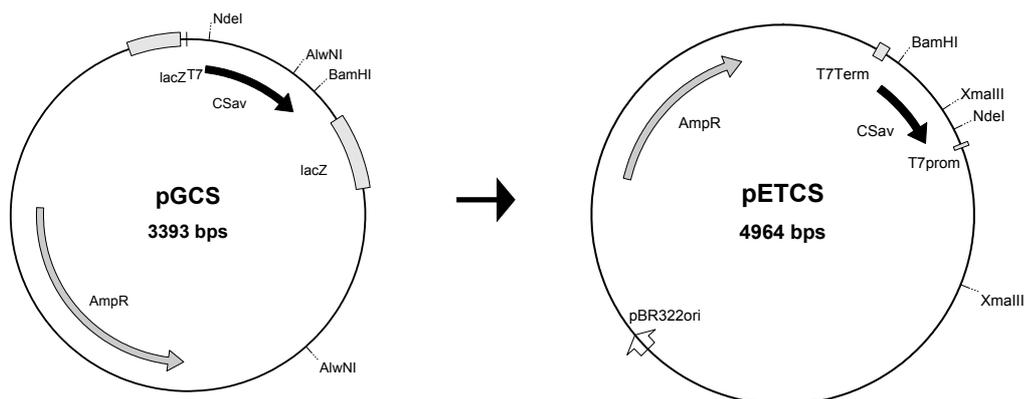


Abb. 6.35 Schema zur Konstruktion des Expressionsvektors pETCS

Ausgehend vom Vektor pGCS wurde durch gerichtete Klonierung des CSav-Fragmentes der Expressionsvektor pETCS hergestellt.

Das Ligationsprodukt pETCS wurde in den Stamm *E. coli* DH5 α transformiert und zur Charakterisierung aus diesem reisoliert. Die Konstruktionen des Ausgangsvektors pGCS sowie die des resultierenden Expressionsvektors pETCS wurden durch Restriktionsanalyse (Abb. 6.36) und Sequenzanalyse bestätigt.

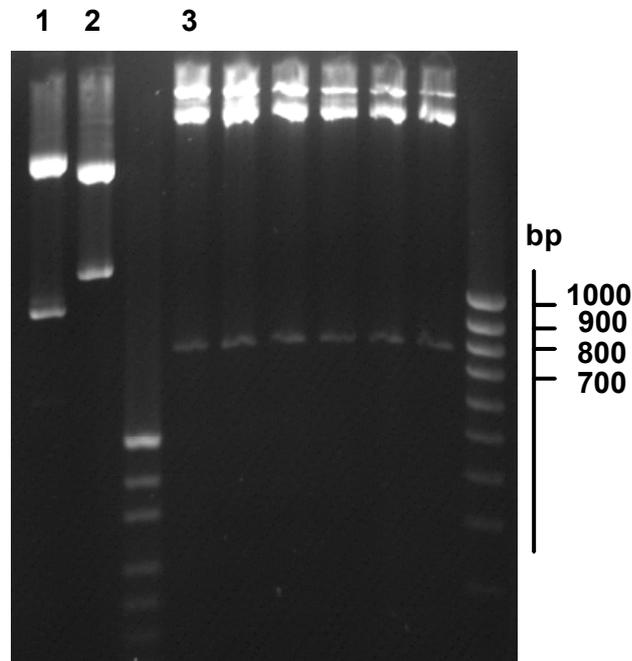


Abb. 6.36 Restriktionsanalyse der Plasmide pGCS und pETCS

Agarosegel (1,5 %); *A*/wNI-Restriktionen des Vektors pGCS, Klon 3 (Spur 1) und Klon 5 (Spur 2). *X*maIII-Restriktionen des Vektors pETCS, Klone 1-6 (Spuren 3, ff.); 100 bp-Leiter.

Den Erwartungen entsprechend ergab die Restriktion des Vektors pGCS mit *A*/wNI bei Insertion des CSav-Fragmentes in 5'-3'-Richtung ein 2433 bp und ein 960 bp großes Fragment (Abb. 6.36, Spur 1). Bei Insertion des CSav-Fragmentes in 3'-5'-Orientierung resultieren Fragmente der Größen 2235bp und 1158 bp (Abb. 6.36, Spur 2). Alle untersuchten Klone des modifizierten Expressionsvektors pETCS wiesen nach *X*maIII-Restriktion die erwarteten 4203bp und 761 bp großen Banden auf (Abb. 6.36, Spur 3ff.). Die Klone 1-3 wurden zur Expression in den Stamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert.

6.2.2 Expression und Aufreinigung von Kern-Streptavidin (CSav)

Zur Produktion rekombinanten Kern-Streptavidins wurden die Stämme *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pETCS der Klone 1-3 zunächst in 30 ml-Anzuchten kultiviert. Die Expression eines Ansatzes des Klon 1 wurde mit IPTG induziert, ein weiterer Ansatz desselben Klons wurde nicht induziert und als Kontrollansatz aufgearbeitet. Wie im Kapitel 6.1.1.11 beschrieben, wird das rekombinante Protein nach cytosolischer Expression aus Einschlusskörpern aufgereinigt

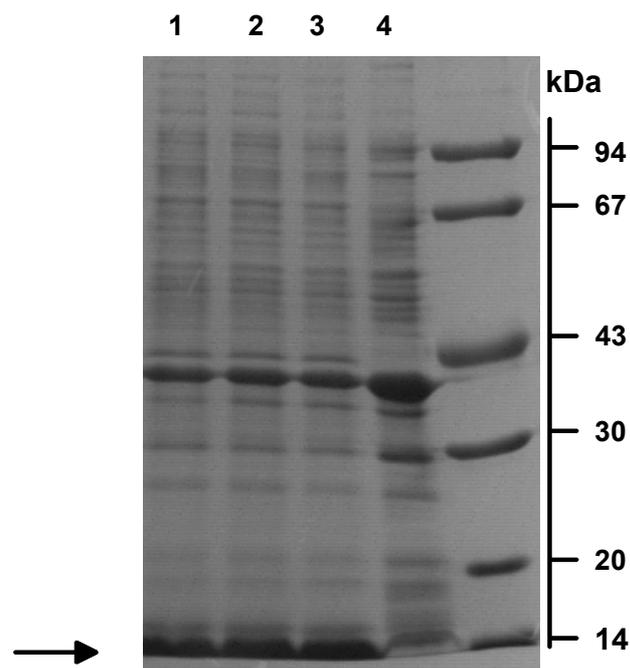


Abb. 6.37 SDS-PAGE zur Überprüfung der Kern-Streptavidin (CSav)-Klone

SDS-PAGE (11%); Sphäroblasten, induziert, Klon 1 (Spur 1); Sphäroblasten, induziert, Klon 2 (Spur 2); Sphäroblasten, induziert, Klon 3 (Spur 3); Sphäroblasten, nicht-induziert, Klon 1 (Spur 4); Sphäroblasten. Marker: LMW.

Sphäroblastenfractionen wurden im SDS-PAGE überprüft (Abb. 6.37) und wurden vor dem Gel-Auftrag für 5 min bei 102°C aufgeköcht. Das rekombinante, monomere Kern-Streptavidin hat eine berechnete Masse von 14 kDa. In den Sphäroblastensuspensionen aller induzierten Ansätze konnte im SDS-PAGE je eine Bande der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Im nicht-induzierten Ansatz des Klon 1 konnte keine prominente Bande bei 14 kDa nachgewiesen werden.

Der Klon 1 des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pETCS wurde für eine 1 l-Anzucht ausgewählt. Nach Aufreinigung des Proteins aus den Einschlusskörpern und Renaturierung des Kern-Streptavidins (Kap. 5.3.3.1) wurde die Expression im SDS-PAGE überprüft. Eine

Protein-Probe wurde vor Auftrag auf das Gel aufgeköcht, eine Probe wurde keiner Hitzebehandlung unterzogen (Abb. 6.38).

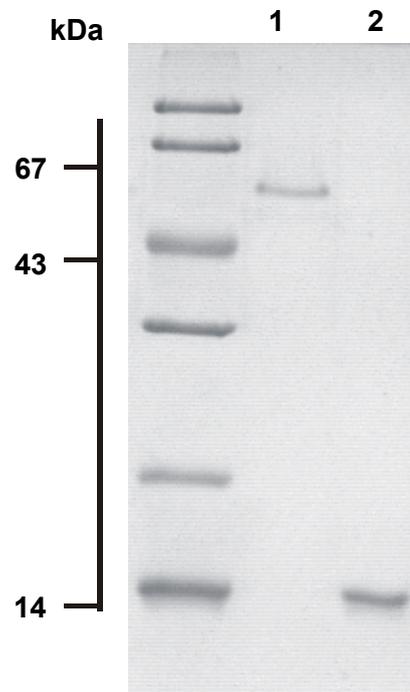


Abb. 6.38 SDS-PAGE zur Detektion von rekombinantem Kern-Streptavidin (CSav)

SDS-PAGE (11%); Kern-Streptavidin nicht aufgeköcht (Spur 1); Kern-Streptavidin aufgeköcht (Spur 2). Marker: LMW.

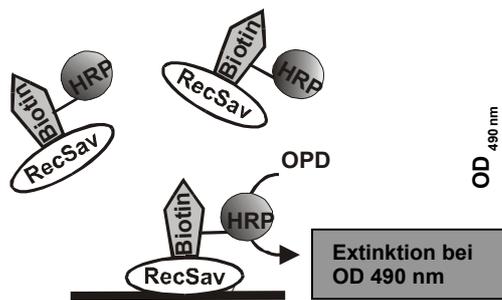
Das rekombinante Kern-Streptavidin wird aus der Renaturierung als Tetramer mit einer molekularen Masse von 56 kDa erhalten. Dies ist ein deutlicher Hinweis für eine funktionelle Faltung der renaturierten Einschlusskörper. Nach Hitzedenaturierung des isolierten, rekombinanten Proteins konnte im SDS-Gel die monomere Form mit einer Masse von 14 kDa detektiert werden.

6.2.3 Funktioneller Nachweis von Kern-Streptavidin (CSav)

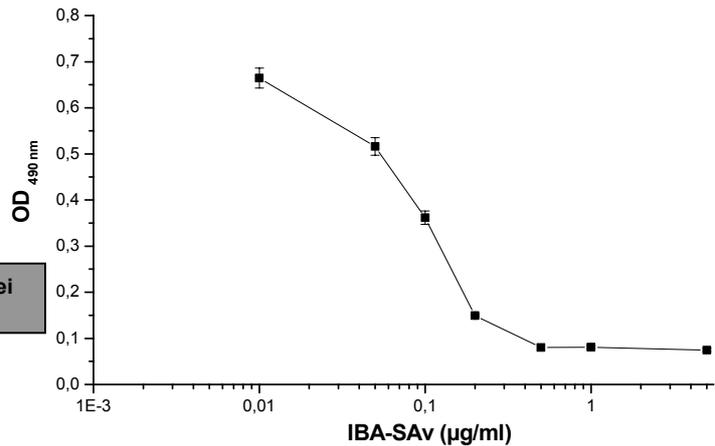
Nach Aufreinigung des Kern-Streptavidins aus der 1 l-Anzucht, wurde in 5 ml des Renaturierungsansatzes ein Gesamtproteingehalt von 49,5 mg photometrisch bestimmt. Für die Detektion funktionell gefalteten Kern-Streptavidins wurde die Bindungskapazität für Biotin genutzt. Zu diesem Zweck erfolgte eine Präinkubation des rekombinanten CSav mit einem Biotin-HRP-Konjugat. Nach Reaktion wurde der Ansatz auf eine mit kommerziellem Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte aufgebracht. Das noch freie Bio-HRP-Konjugat wird an die Mikrotiterplatte gebunden und durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen.

Die Zellen wurden nach der Ernte resuspendiert und per Ultraschall aufgeschlossen. Danach wurden die Einschlusskörper im Resuspensionspuffer gewaschen. Der Pellet-Überstand des ersten Waschschrittes wurde ebenfalls im ELISA überprüft. Als Standard wurde kommerzielles Streptavidin bekannter Konzentration eingesetzt (Abb. 6.39).

A)



B)



C)

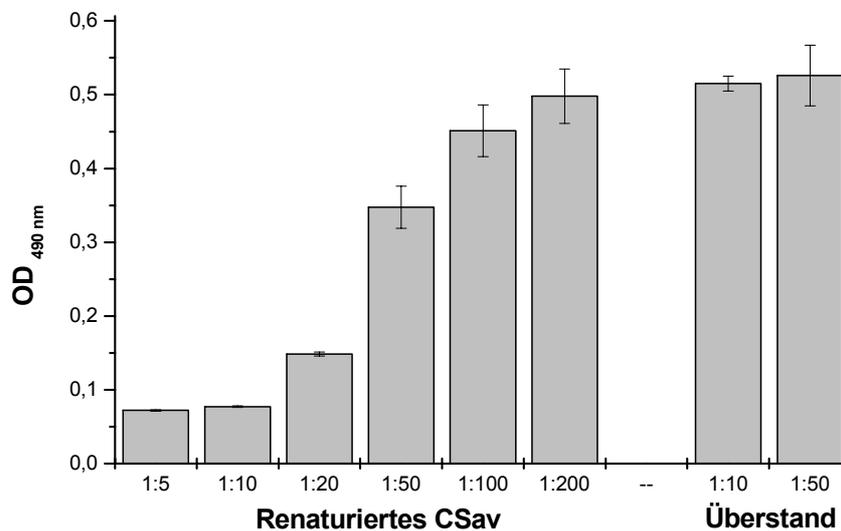


Abb. 6.39 Detektion und Konzentrationsbestimmung funktionellen, rekombinanten CSav

A, Schematische Darstellung des Tests zur Detektion funktionellen CSav. B, Kalibration mit kommerziellem Sav; C, Detektion durch Bio-HRP-Konjugat (1:30000) und Konzentrationsbestimmung.

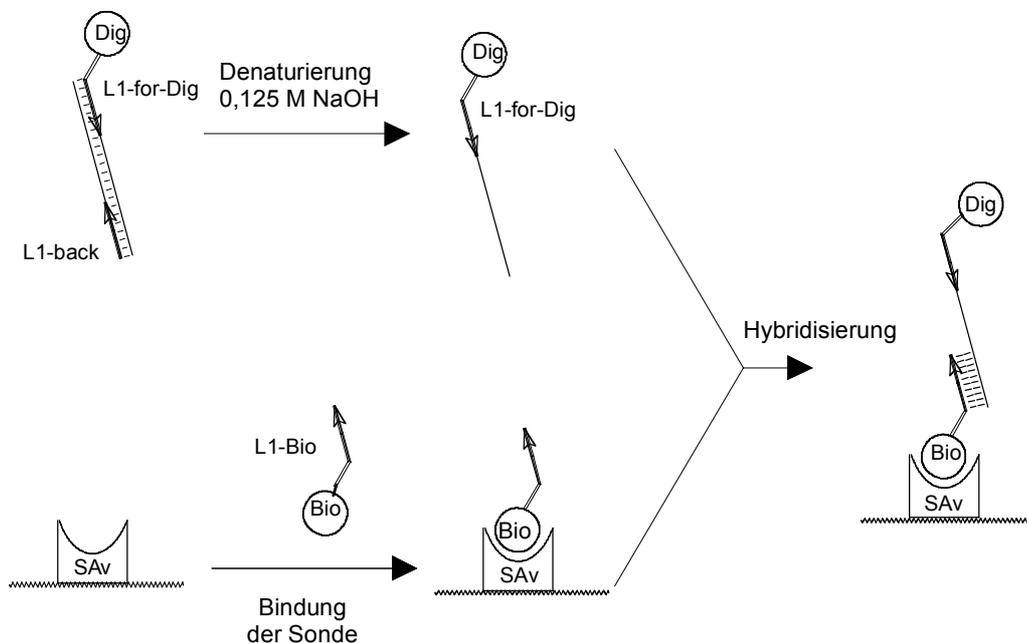
Die Streptavidinkonzentration verhält sich umgekehrt proportional zur detektierten optischen Dichte. Durch die Kalibration mit kommerziellem Streptavidin konnte eine gut detektierbare

Menge funktionellen, rekombinanten Kern-Streptavidins nachgewiesen werden. Der größte Anteil funktionellen Proteins wird in Form von Einschlusskörpern akkumuliert. Im Überstand sind nur geringe Mengen funktionellen Kern-Streptavidins zu identifizieren.

6.3 Optimierung eines PCR-ELISA-Verfahrens zur Detektion von Reporter-DNA aus der Immun-PCR

In der anschließenden Immun-PCR wird die ELISA-typische Detektion eines Antigens durch Antikörper mit einer DNA-Amplifikation gekoppelt. Die exponentielle Vervielfältigung der DNA bietet in der PCR eine enorme Signalverstärkung und damit eine hoch sensitive Nachweismöglichkeit. Die Detektion der in der Immun-PCR entstandenen PCR-Produkte sollten im vorliegenden EU-Projekt durch PCR-ELISA erfolgen. Beim PCR-ELISA-Verfahren wird eine DNA-Hybridisierung mit der ELISA-Technik kombiniert. Das hier gewählte PCR-ELISA-Verfahren beruht auf einer reversen Hybridisierung (Abb. 6.40).

A)



B)

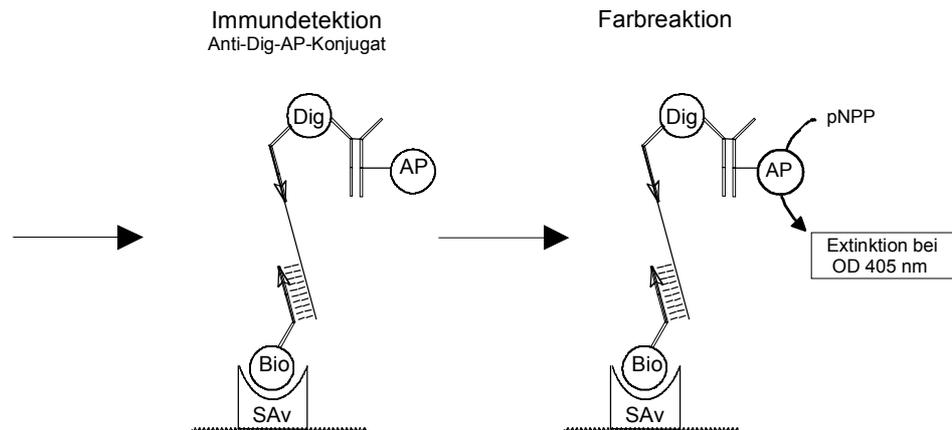


Abb. 6.40 Reverse Hybridisierung

Schematische Darstellung der reversen Hybridisierung (PCR-ELISA). A, Immobilisierung der biotinylierten Fangsonde, Hybridisierung mit Dig-markiertem PCR-Produkt. B, Immundetektion mit Anti-Dig- F_{ab} -Fragmenten.

Zu diesem Zweck wurde eine biotinylierte Sonde immobilisiert und mit dem Dig-markierten Amplikon nach alkalischer Denaturierung hybridisiert. Die Immundetektion erfolgte durch den Einsatz von Anti-Dig- F_{ab} -Fragmenten, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt waren und daher durch eine Farbreaktion mit pNPP nachgewiesen werden konnten.

Im Vorfeld der Optimierungsarbeiten wurde die Marker-DNA vom Projektpartner Pharmagen (Madrid, Spanien) in pGEMT-Vektoren zur Verfügung gestellt. Die Marker-Regionen Label 1 und Label 2 wurden amplifiziert, um zur Etablierung des PCR-ELISA-Verfahrens eine ausreichende Menge an PCR-Produkten zur Verfügung zu haben. Dabei wurde ein Dig-markierter Primer verwendet. Die Überprüfung der Amplifikation sowie die Abschätzung der Konzentration erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese.

Zunächst wurde untersucht, wie hoch die einzusetzende Menge an PCR-Produkt ist, um eine sichere Detektion zu gewährleisten (Abb. 6.41).

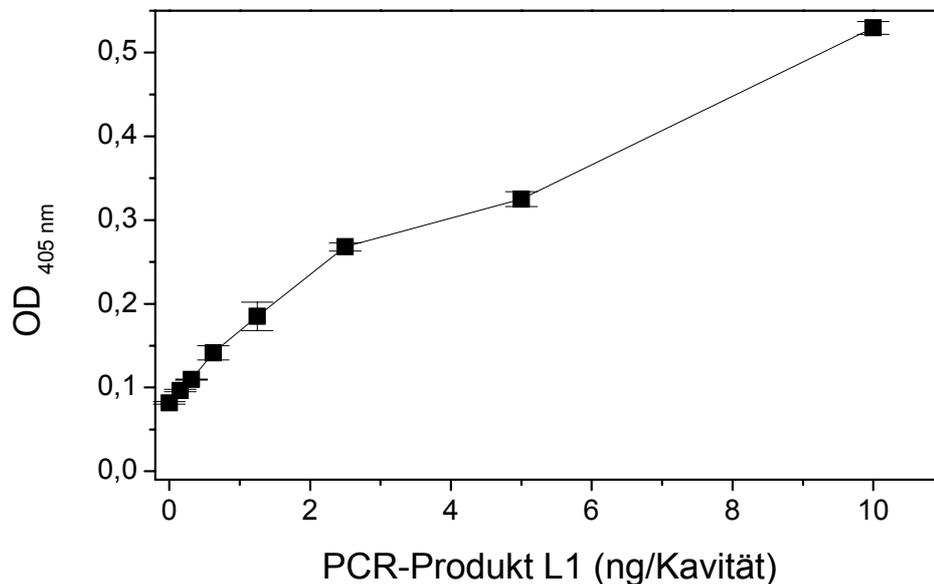


Abb. 6.41 PCR-ELISA zur Abschätzung der einzusetzenden Menge an PCR-Produkt

Auswertung des PCR-ELISAs zur Mengenabschätzung des nachzuweisenden PCR-Produktes L1; C_{Sonde} : 0,2 pmol/Kavität; Hybridisierungstemperatur: 37°C; Hybridisierungszeit: 45 min.

Für die folgenden Optimierungsschritte wurden 5 ng des nachzuweisenden PCR-Produktes pro Kavität gewählt, da beim Einsatz dieser Menge eine sichere Detektion gewährleistet wurde.

Als weiterer Parameter wurde untersucht, welche Sondenkonzentration ein optimales PCR-ELISA-Ergebnis liefert. Ferner wurde getestet, ob Kreuzreaktivitäten zwischen der Sonde für das PCR-Produkt L1 und weiteren PCR-Produkten erkennbar sind. Daher wurden zur Hybridisierung auch das PCR-Produkt L2 und der interne Standard, welche bei der Immun-PCR Verwendung finden, verwendet. Alle getesteten Amplifikate wurden mit 0 ng und 5 ng/Kavität eingesetzt (Abb. 6.42).

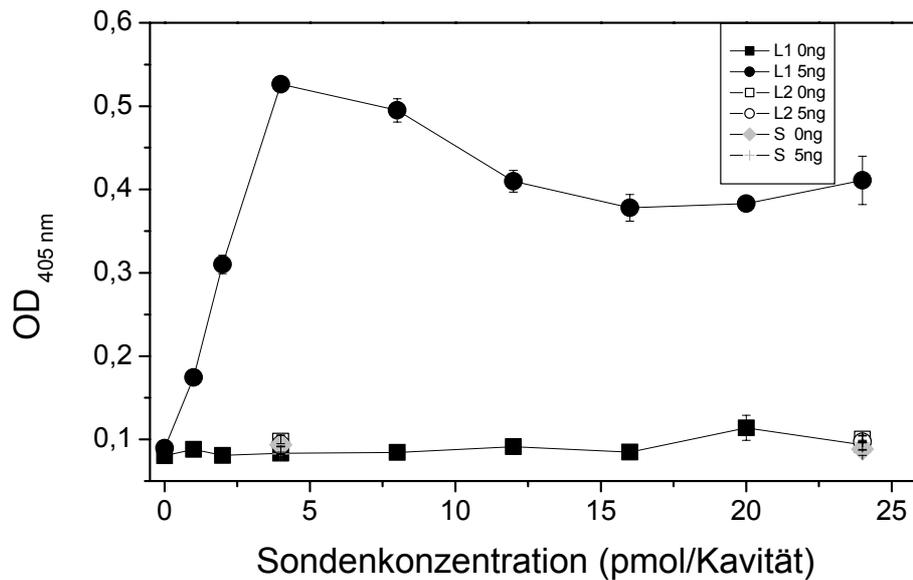


Abb. 6.42 PCR-ELISA zur Abschätzung der einzusetzenden Sondenkonzentration

Auswertung des PCR-ELISAs zur Abschätzung der einzusetzenden Sondenkonzentration. PCR-Produkt L1: 0 bzw. 5 ng/Kavität; PCR-Produkt L2: 0 bzw. 5 ng/Kavität; interner Standard S: 0 bzw. 5 ng/Kavität; Hybridisierungstemperatur: 50°C; Hybridisierungszeit: 35 min.

Das Ergebnis zeigte, dass keine unspezifischen Hybridisierungsreaktionen zwischen der Sonde für das PCR-Produkt L1 und weiteren PCR-Produkten auftraten. Bei Erhöhung der Sondenkonzentration konnte ein linearer Anstieg verzeichnet werden, beim Einsatz von 4 pmol der Sonde L1 war jedoch bereits eine Sättigung zu beobachten. Es wurde vermutet, dass die Bindung biotinylierter DNA, sterisch oder elektrostatisch behindert wurde.

Die optimale Hybridisierungszeit wurde ebenfalls untersucht. Zu diesem Zweck kamen 4 pmol der Sonde L1 und 5 ng des PCR-Produktes pro Kavität zum Einsatz (Abb. 6.43).

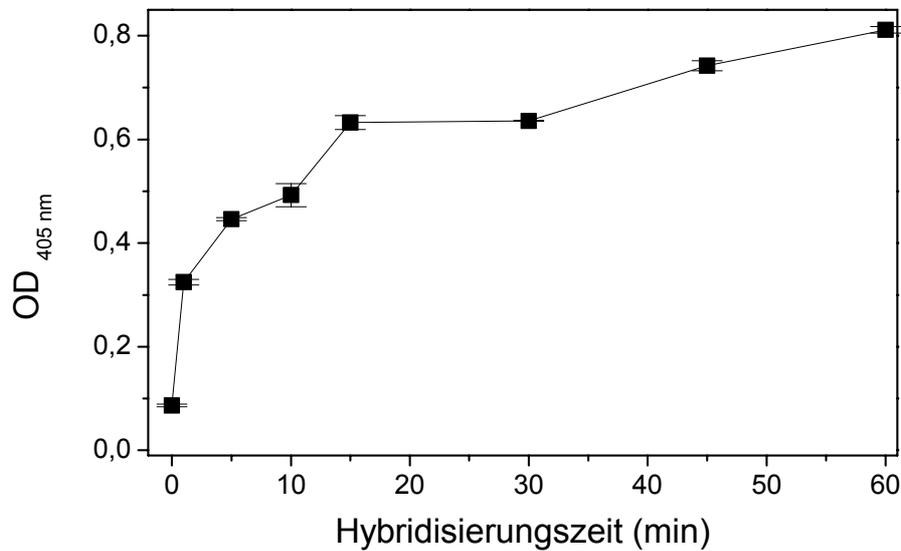


Abb. 6.43 PCR-ELISA zur Abschätzung der einzusetzenden Hybridisierungszeit

Auswertung des PCR-ELISAs zur Abschätzung der einzusetzenden Hybridisierungszeit. PCR-Produkt L1: 5 ng/Kavität; Hybridisierungstemperatur: 50°C; Sondenkonzentration: 4 pmol/Kavität.

Bereits eine Hybridisierungszeit des alkalisch denaturierten PCR-Produktes von nur 5 min resultiert in einer photometrisch gut auswertbaren Farbreaktion und damit in einer sicheren Detektion des PCR-Produktes.

Auch dieses Ergebnis wurde bei der Optimierung eines weiteren Parameters, der Hybridisierungstemperatur, berücksichtigt (Abb. 6.44).

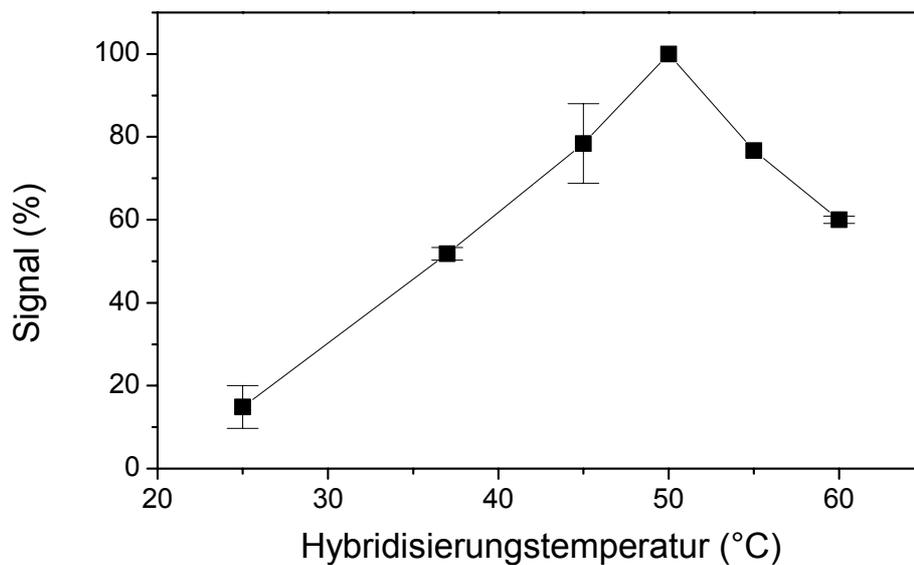


Abb. 6.44 PCR-ELISA zur Abschätzung der einzusetzenden Hybridisierungstemperatur

Auswertung des PCR-ELISAs zur Abschätzung der einzusetzenden Hybridisierungstemperatur. PCR-Produkt L1: 5 ng/Kavität; Hybridisierungszeit: 5 min; Sondenkonzentration: 4 pmol/Kavität.

Die maximale Signalstärke wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C erreicht. Da bei 60°C die Signalstärke wieder abnimmt, ist zu vermuten, dass bei dieser Temperatur bereits wieder eine Dissoziation der hybridisierten DNA erfolgt. Um das Verfahren zu vereinfachen, wurde die Hybridisierungs- sowie die Waschlösung im Kryostaten auf die entsprechenden Temperaturen präequilibriert. Um den Temperaturabfall während der Hybridisierungszeit von 5 min zu minimieren, wurde die Mikrotiterplatte auf einem Styroporblock platziert.

Der so optimierte PCR-ELISA wurde im Rahmen des EU-Projektes ULISA routinemäßig zur Detektion der Immun-PCR-Produkte eingesetzt.

6.4 Bestimmung der Nukleotidsequenz der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis*

Die Detektion von Phosphaten findet in zahlreichen Bereichen der medizinischen Diagnostik und auch in der Umweltanalytik Anwendung. Im Institut für Chemo- und Biosensorik wurde ein Einwegenzymensensor zur Bestimmung von ortho-Phosphat in Oberflächengewässern entwickelt. Schlüsselenzym des Sensors ist das Enzym Maltosephosphorylase. Die Primärstruktur der Maltosephosphorylase wurde in dieser Arbeit fast vollständig aufgeklärt. Diese Sequenzinformationen trugen dazu bei, die Tertiärstruktur der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis* aufzuklären.

Um eine ausreichende Menge genomischer DNA zur Sequenzanalyse zur Verfügung zu stellen, wurde *Lactobacillus brevis* DSMZ Nr. 20556 in DSMZ-Kulturmedium Nr. 11 angezogen. Der Nachweis des Gram-positiven Bakterienstammes erfolgte durch Gram-Färbung und KOH-Test. Unter Verwendung des „E.Z.N.A. Bacterial DNA-Kit“ der Firma peqlab wurden 14,74 µg genomischer DNA isoliert, die als Matritze zur PCR eingesetzt wurde.

6.4.1 Auswahl der Oligonukleotide zur Amplifikation des 3'-Terminus des Maltosephosphorylase-Gens (*mapA*) durch taxonomische Homologievergleiche

Im Rahmen der Diplomarbeit von Firnges (1997) konnten 1638 bp der Maltosephosphorylase-Nukleotidsequenz identifiziert werden. Die erste Primerkombination für die Amplifikation stromabwärts liegender *mapA*-Genbereiche bestand aus dem 5'-Primer MPFOR2 und den 3'-Primern MPREV1 und MPREV2. Der 5'-Primer entspricht der *mapA*-Sequenz in Position 1603-1620 bp am 3'-Ende der bereits durch Firnges aufgeklärten Sequenz. Zur Auswahl der 3'-Primers wurden Homologievergleiche der gram-positiven und zur Ordnung *Bacillales* zugehörigen Arten *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus sanfrancisciensis* durchgeführt. Alle Bakterienstämme besitzen einen Genlocus für das Maltosephosphorylase-Gen und weisen am 3'-Terminus der *mapA*-Region einen stark konservierten Bereich auf. Dieser Sequenzabschnitt variiert in den drei Organismen in wenigen Nukleotidpositionen. Das Design des Primers erfolgte vor allem gemäß der konservierten Sequenz des gattungsgleichen *Lactobacillus sanfrancisciensis*. Der erste 3'-Primer MPREV1 ist unter Berücksichtigung der Nukleotidvariationen vierfach "gewobbelt" (Tab. 6.1)

Tab. 6.1: Taxonomische Homologievergleiche der 3'-Termini der *mapA*-Gene

Die divergierenden Bereiche sind fett markiert. y = c/t; k = g/t

Organismus	Protein	Nukleotidsequenz (5' → 3')
<i>Lactobacillus sanfrancisciensis</i>	mapA	ca cat cac gt caatgac gggtg cc tggct
<i>Lactococcus lactis</i>	MP	ca t atcact t caatgac aggt tcg tggct
<i>Bacillus subtilis</i>	YvdM	ca t at t act t caatgac gggt acg tggct
3'-MPREV1 (3' → 5')		ca y atcack t caatgac gggtg cc tggct

Zudem ist der Genbereich der Maltosephosphorylase operonähnlich organisiert. Stromabwärts wird das Maltosephosphorylase-Gen (*mapA*) bei *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus sanfrancisciensis* von einem Phosphoglucomutase-Gen (*pgmA*) flankiert. Auch *Bacillus subtilis* besitzt eine *pgmA*-Sequenz. Jedoch befindet sich zwischen dieser und der *mapA*-Sequenz ein ca. 1 kb großer Genbereich, der für das Protein Oligo-1,6-Glucosidase codiert. Aufgrund dieser Annahmen ergaben Homologievergleiche eine Konsensus-Sequenz (Tab. 6.2).

Tab. 6.2: Taxonomische Homologievergleiche der flankierenden Bereiche des *mapA*-Gens auf Aminosäureebene

Die übereinstimmenden Bereiche sind fett markiert.

Organismus	Protein	Sequenz
<i>Lactobacillus sanfrancisciensis</i>	PgmA	MTKFSEIKGF AFDL DGVI TD TAKFHTQAWH
<i>Lactococcus lactis</i>	β-Pgm	FKAVL FDL DG ITD TAE
<i>Bacillus subtilis</i>	YvdM	MKAV IFDL DG VI TD TA EYHFLA
Konsensus-Sequenz		FDL DG VI TD TA

Aus dieser Konsensus-Sequenz wurde der Primer 3'-MPREV2 abgeleitet. Da der genetische Code degeneriert ist, resultierte ein 432-fach "gewobelter" Primer (Tab. 6.3).

Tab. 6.3 Taxonomische Homologievergleiche der flankierenden Bereiche des *mapA*-Gens auf Nukleotidebene

Die divergierenden Bereiche sind fett markiert. y = c/t; r = g/a; h = a/c/t; v = a/g/c;

Organismus	Protein	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Konsensus-Sequenz		F D L D G V I T D T A
<i>Lactobacillus sanfrancisciensis</i>	PgmA	tttgactt ggatggc ggtcat cacgg acaccgct
<i>Lactococcus lactis</i>	β-Pgm	tttgat tttagatgg tgt aat ta ca gataccgca
<i>Bacillus subtilis</i>	YvdM	tttgat tttagac ggagtgata aac agatactgct
3'-MPREV2 (3' → 5')		tttgay tr g atgg hgt vath acrgay acc gc

Anhand der Homologievergleiche der verwandten Organismen, ließ sich ein erstes Modell für die *mapA*-Region von *Lactobacillus brevis* erstellen (Abb.6.45):



Abb. 6.45 Modell zur Organisation der *mapA*-Region von *Lactobacillus brevis*.

Schematische Darstellung der *mapA*-Genregion von *Lactobacillus brevis*. Die vermuteten Positionen der ausgewählten Primer sind durch Pfeile dargestellt.

Die Schmelztemperaturen betragen für den Primer 5'-MPFOR2 46,3°C, für den Primer 3'-MPREV1 65,3°C und für den Primer 3'-MPREV2 62,6°C. Für die PCRs wurden daher die Hybridisierungstemperaturen 50°C, 55°C und 60°C gewählt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese und PAGE überprüft. Die Amplifikation unter Verwendung der Primerkombination 5'-MPFOR2 und 3'-MPREV2 ergab eine Vielzahl von PCR-Produkten, die sich nicht differenzieren ließen. Bei der Primerkombination 5'-MPFOR2 und 3'-MPREV1 und einer Hybridisierungstemperatur von 50°C (Ansatz LQ3) wurde nach Agarosegelelektrophorese eine prominente Bande bei ca. 450 bp detektiert (Abb. 6.46). Zur Charakterisierung des Amplifikats wurde dieses aus dem Gel aufgereinigt, das gereinigte Fragment überprüft und in den Vektor pGEM-T Easy kloniert.

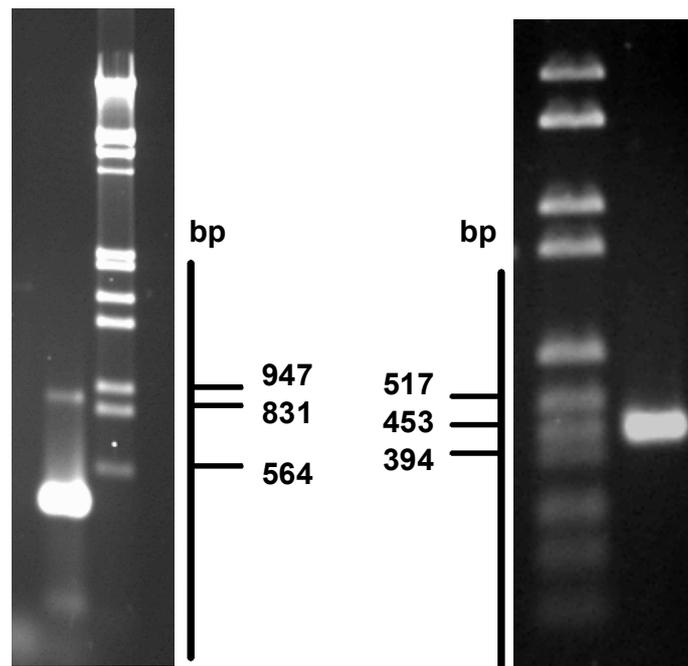


Abb. 6.46 Überprüfung des PCR-Produktes LQ3 vor und nach Aufreinigung

Agarosegel (1,5 %); links: PCR-Produkte der Primerkombination 5'-MPFOR2, 3'-MPREV1. Marker: λ -Marker. rechts: Aufreinigung des ca. 450 bp großen PCR-Produktes LQ3. Marker: pBR328 Mixl.

Nach Sequenzierung des resultierenden Vektors pGLQ3 konnte die exakte Größe der klonierten Sequenz von 440 bp identifiziert werden. Aus dem anschließenden Homologievergleich ergab sich eine 80%ige Übereinstimmung mit der Maltosephosphorylase-Sequenz von *Lactobacillus sanfrancisciensis*. In der Arbeit von Irmer (1996) wurde nach Spaltung der Maltosephosphorylase mit der Endoproteinase Lys-C und anschließender, proteinchemischer Analyse, die Aminosäure-Sequenz des Peptids LysC3 aufgeklärt. Dieser Proteinabschnitt konnte im PCR-Produkt LQ3 identifiziert werden. Somit erstreckte sich der bekannte Bereich der Nukleotidsequenz des *mapA*-Gens von *Lactobacillus brevis* über 2043 bp (Abb. 6.47).

```
1  atgaagcgta ttttcgaagt tcaaccttgg aacgtaatta cgcatacttt
   M K R   I F E   V Q P W   N V I   T H T
51  tgaccccaaa gacaaacgtc ttcaagaatc catgaccagt ttaggtaatg
   F D P K   D K R   L Q E   S M T S   L G N
101 gctacatggg gatgcggggg gactttgaag aaggctatag tggcgattcc
   G Y M   G M R G   D F E   E G Y   S G D S
151 ctccaaggca tttacttggg tgggtgtctgg tatccagaca aaacccgggt
   L Q G   I Y L   G G V W   Y P D   K T R
201 tggttgggtg aagaatggct atccgaagta ctttggttaag gtcgtcaatg
   V G W W   K N G   Y P K   Y F G K   V V N
251 ccgtcaatth tatcaagtta ccgattgaaa ttaacgggtga acccgttgat
   A V N   F I K L   P I E   I N G   E P V D
301 ttggcaaaaag ataagattag tgactttacc ttagaccttg atatgcatca
   L A K   D K I   S D F T   L D L   D M H
351 ggggtgtcttg aaccgggtctt ttgtcgttga acgcgggtgcc gttcgcgtag
   Q G V L   N R S   F V V   E R G A   V R V
401 ccttgaatth ccaacgttht ttaagtgttg ctcagccaga attgtccgta
   A L N   F Q R F   L S V   A Q P   E L S V
451 caaaaagtaa cggtcaaaaa cctgagcgat gctgagggtg acgtgaccct
   Q K V   T V K   N L S D   A E V   D V T
501 aaagccaagt atcgatgccg atgtgatgaa cgaagaagct aattacgatg
   L K P S   I D A   D V M   N E E A   N Y D
551 aacgcttctg ggatgtcttg gccactgacc aacaggcaga tcgggggagc
   E R F   W D V L   A T D   Q Q A   D R G S
601 atcgttgcca agaccacgcc taatccatth gggacacccc ggthtacttc
   I V A   K T T   P N P F   G T P   R F T
651 cgggatggaa atgcgggttg taacggactt aaagaacgta gccatcacgc
   S G M E   M R L   V T D   L K N V   A I T
701 aaccaaataa aaaagaagtt acgacggcgt ataccggtta gctggcccca
   Q P N   E K E V   T T A   Y T G   K L A P
751 caggcaagcg ctgaattaga aaagcgcgtg attgtggtta cgtcacggga
   Q A S   A E L   E K R V   I V V   T S R
801 ttacgacaca caagaaagct taacggcagc catgcatcag ttgagcgaca
   D Y D T   Q E S   L T A   A M H Q   L S D
851 aagtggccca atcttcatat gaagatttgt tgaacgcaca tacggccatc
   K V A   Q S S Y   E D L   L N A   H T A I
901 tgggccaac ggtgggagaa gtcggatggt gtgatcaaag gtgacgatga
   W A Q   R W E   K S D V   V I K   G D D
951 gtcgcaacaa gggattcgtt ttaatctatt ccagttgttc tccacgtact
   E S Q Q   G I R   F N L   F Q L F   S T Y
1001 atggtgaaga tgcgcgcttg aatatcggac ctaaaggctt tacgggtgag
   Y G E   D A R L   N I G   P K G   F T G E
1051 aagtatgggtg gtgcaactta ttgggatacc gaagcctttg ccttccctgt
   K Y G   G A T   Y W D T   E A F   A F P
```

1101	ttatctgggg	attaccgatac	ctaagggtcac	tcgcaacctc	ttgatgtacc
	V Y L G	I T D	P K V	T R N L	L M Y
1151	gttacaagca	attagacggt	gcttacatca	acgcacaaga	acaagggtt
	R Y K	Q L D G	A Y I	N A Q	E Q G L
1201	aaaggggcct	tgttcccaat	ggtgaccttc	gatggaattg	aatgccataa
	K G A	L F P	M V T F	D G I	E C H
1251	tgaatgggaa	atcaccttcg	aagaaattca	ccgaaatggt	gacattgcct
	N E W E	I T F	E E I	H R N G	D I A
1301	ttgccatcta	caattacaca	cgttacaccg	gtgatgacag	ttacgtcttg
	F A I	Y N Y T	R Y T	G D D	S Y V L
1351	catgaagggg	ccaaggtgct	gaccgaaatt	tctcgcttct	gggccgaccg
	H E G	A K V	L T E I	S R F	W A D
1401	ggttcacttc	agtaagcgta	ataaccagta	catgattcat	ggggttacgg
	R V H F	S K R	N N Q	Y M I H	G V T
1451	gtgccgatga	gtatgaaaac	aacgttgata	acaactggga	taccaacatg
	G A D	E Y E N	N V D	N N W	D T N M
1501	ttggctcagt	ggacgttgaa	gtatacacta	gaaatthtgg	gtaaggttga
	L A Q	W T L	K Y T L	E I L	G K V
1551	tcaggatact	gccaaagcaat	tgatgttttc	cgatgaggag	aagacgaagt
	D Q D T	A K Q	L D V	S D E E	K T K
1601	<u>ggcaagacat</u>	<u>tgctgatcgg</u>	<u>atgtatctgc</u>	cttacgataa	ggacctgaac
	W Q D	I V D R	M Y L	P Y D	K D L N
1651	atthtctgttc	aacacgatgg	gthtcttgat	aaagacatcg	aacctgtcag
	I F V	Q H D	G F L D	K D I	E P V
1701	ctcaattcca	gcggatcaac	ggccaattaa	ccaaaactgg	tcgtgggata
	S S I P	A D Q	R P I	N Q N W	S W D
1751	agatctttcg	gtcgccttac	attaagcaag	gggatgtctt	gcaaggaatc
	K I L	R S P Y	I K Q	G D V	L Q G I
1801	tgggacttta	ttgatgacta	cacgccagaa	caaaagaagg	ccaactttga
	W D F	I D D	Y T P E	Q K K	A N F
1851	cttctacgaa	ccactgacgg	tgcacgaatc	tagtttgtcc	ccggcaatcc
	D F Y E	P L T	V H E	S S L S	P A I
1901	actcgggtatt	agctgctgac	ttacattacg	aggataaggc	cgtagaattg
	H S V	L A A D	L H Y	E D K	A V E L
1951	tattcacgga	cggcaccgatt	agacttgat	aactacaata	atgacacgac
	Y S R	T A R	L D L D	N Y N	N D T
2001	ggatggccta	<u>cacatcacgt</u>	<u>caatgacggg</u>	<u>tgccctggtc</u>	
	T D G L	H I T	S M T	G A W	

Abb. 6.47 Nukleotidsequenz des *mapA*-Gens nach Sequenzierung des Amplifikats LQ3

Die Primerbindungsstellen 5'-MPFOR2, und 3'-MPREV1 sind unterstrichen. Der überlappende 5'-Bereich mit der bekannten Sequenz ist kursiv dargestellt. Das Peptid LysC3 ist grau unterlegt.

6.4.2 Auswahl der Oligonukleotide zur Amplifikation des 3'-Terminus des Maltosephosphorylase-Gens (*mapA*) von Röntgenstrukturanalysen

Im Rahmen einer Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe wurde die Struktur der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis* röntgenkristallographisch untersucht. Aus dieser Analyse konnte eine putative, C-terminale Aminosäureabfolge ermittelt werden (von Tillbeurgh, persönliche Mitteilung). Homologievergleiche der vorhergesagten Aminosäuresequenz mit den C-Termini der *mapA*-Sequenzen von *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus sanfrancisciensis* ergaben die größte Übereinstimmung mit *L. brevis*. Auch die Länge der terminalen Sequenz von *L. brevis* ist der von *L. sanfrancisciensis* am ähnlichsten (Tab. 6.4).

Tab. 6.4: Homologievergleiche der C-terminalen Aminosäuresequenz der Maltosephosphorylase

Die Aminosäuresequenz von *Lactobacillus brevis* wurde aus röntgenkristallographischen Daten vorgeschlagen.

Organismus	C-terminale Aminosäuresequenz
<i>Bacillus subtilis</i>	LVKGEPLHMNVYEEFVVLQGRGRTPNG
<i>Lactobacillus lactis</i>	LLRGQALSLEYIYAETVGLSDSYITKTR
<i>Lactobacillus sanfrancisciensis</i>	LLSGEPLTIDLAGEKLTLEA
<i>Lactobacillus brevis</i>	LLSGE/QPLTIN/DV?G?KV?L??

Das Ergebnis der Röntgenkristallographie wurde zum Primerdesign genutzt. Allerdings wurden die letzten zwölf Aminosäuren nur unsicher oder nicht identifiziert und nicht für die Primerauswahl berücksichtigt. Da der genetische Code degeneriert ist, wurde der stark degenerierte Primer 3'-TERM2 ausgewählt (Abb. 6.48).

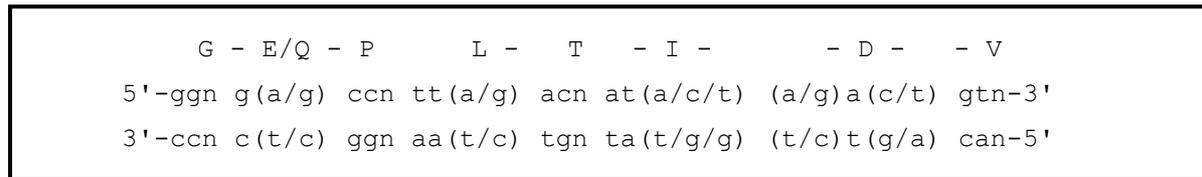


Abb. 6.48 Design des Primers 3'-TERM2

Nach röntgenkristallographischer Untersuchung abgeleitete Aminosäuresequenz des C-Terminus der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis*. Die korrespondierende Nukleinsäuresequenz ist unter der Aminosäuresequenz abgebildet.

Die neu gewonnene Sequenzinformation aus der Amplifikation mit der Primerkombination 5'-MPFOR2 und 3'-MPREV1 (Kap. 6.4.1) wurde genutzt, um einen Primer auszuwählen, der mit dem 3'-Terminus des identifizierten 440 bp-Bereichs hybridisierende Primer 5'-MPFOR3 wurde in einer PCR-Reaktion mit dem 3'-Primer TERM2 eingesetzt (Abb. 6.49).

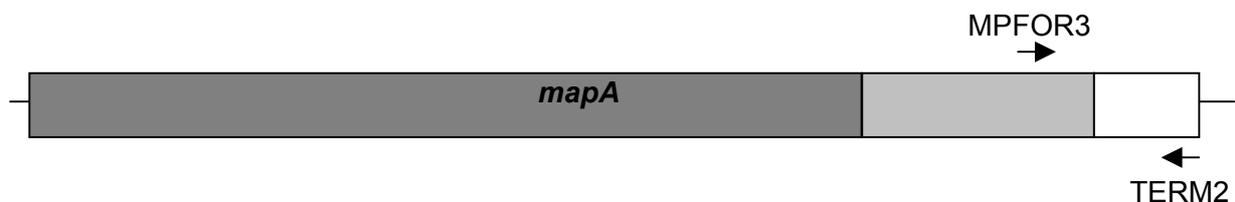


Abb. 6.49 Modell zur Amplifikation des 3'-Terminus der *mapA*-Region von *Lactobacillus brevis*.

Schematische Darstellung des 3'-Terminus des *mapA*-Gens von *Lactobacillus brevis*. Die vermuteten Positionen der ausgewählten Primer sind durch Pfeile dargestellt.

Der Primer 5'-MPFOR3 ist im *mapA*-Gen in Position 1945 bp-1966 bp lokalisiert. Übertragen auf das Maltosephosphorylase-Gen von *Lactobacillus sanfranciscensis*, würde bei einer PCR-Reaktion unter Verwendung ähnlich lokalisierter Primer ein 276 bp großes Amplifikat resultieren. Zur Amplifikation wurden zwei Isolate genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis* verwendet. Die Hybridisierungstemperaturen wurden zwischen 50°C und 60°C gewählt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. 6.50).

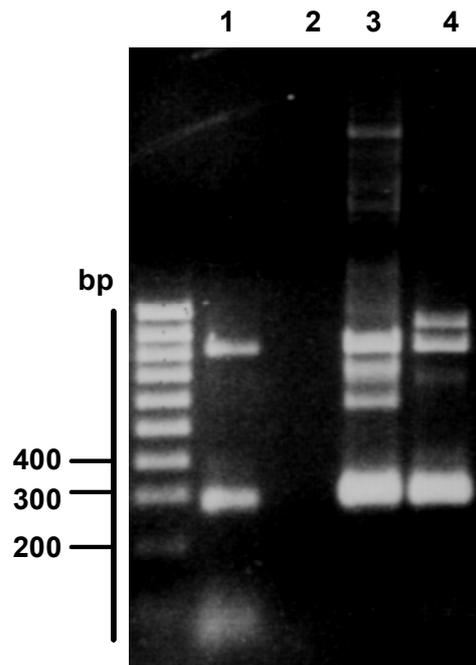


Abb. 6.50 Überprüfung des PCR-Produktes 179 vor und nach Aufreinigung

Agarosegel (1 %); Marker: 100 bp-Leiter; PCR-Produkt 176 der Primerkombination 5'-MPFOR3/3'-TERM2, Template LBD5 (*L. brevis*, genom. DNA), Hybridisierungstemperatur 55°C (Spur 1). PCR-Produkt 177, Hybridisierungstemperatur 60°C (Spur 2). PCR-Produkt 178, Template DNAIII (*L. brevis*, genom. DNA), Hybridisierungstemperatur 50°C (Spur 3). PCR-Produkt 179, Template DNAIII (*L. brevis*, genom. DNA), Hybridisierungstemperatur 55°C (Spur 4).

Der Einsatz beider DNA-Isolate, mit der Primerkombination 5'-MPFOR3/3'-TERM2, führte bei den Hybridisierungstemperaturen 50°C und 55°C (Spuren 1, 3, 4) zu erfolgreichen Amplifikationen. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 55°C (Spuren 1, 4) wurde die Produktanzahl im Vergleich zur Reaktion bei 50°C reduziert. In allen Ansätzen zwischen 50°C-55°C wurden im Agarosegel je eine Bande bei ca. 300 bp detektiert. Ansatz 179 (Spur 4) wies in der erwarteten Laufhöhe die prominenteste Bande auf. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel isoliert und zur Charakterisierung in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und sequenziert. Homologievergleiche zwischen dem Amplifikat 179 und der *mapA*-Sequenz von *Lactobacillus sanfrancisciensis* ergaben eine Übereinstimmung von 70 %. Insgesamt konnten somit 2230 bp der *mapA*-Sequenz entschlüsselt werden (Abb. 6.51).

	MAPARECFOR	K-FOR							
1	atggaagcgtata	ttttcgaagt	tcaaccttgg	aacgtaatta	cgcatacttt				
	M K R I F E	V Q P W	N V I	T H T					
51	tgaccccaaaa	gacaaacgtc	ttcaagaatc	catgaccagt	ttaggtaatg				
	F D P K	D K R	L Q E	S M T S	L G N				
101	gctacatggg	gatgcggggg	gactttgaag	aaggctatag	tggcgattcc				
	G Y M	G M R G	D F E	E G Y	S G D S				
151	ctccaaggca	tttacttggg	tgggtgtctgg	tatccagaca	aaacccgggt				
	L Q G	I Y L	G G V W	Y P D	K T R				
201	tggttgggtg	aagaatggct	atccgaagta	ctttggtaag	gtcgtcaatg				
	V G W W	K N G	Y P K	Y F G K	V V N				
251	ccgtcaatth	tatcaagtta	ccgattgaaa	ttaacgggtga	acccgttgat				
	A V N	F I K L	P I E	I N G	E P V D				
301	ttggcaaaaag	ataagattag	tgactttacc	ttagaccttg	atatgcatca				
	L A K	D K I	S D F T	L D L	D M H				
351	gggtgtctttg	aaccggctctt	ttgtcgttga	acgcgggtgcc	gttcgcgtag				
	Q G V L	N R S	F V V	E R G A	V R V				
401	ccttgaatth	ccaacgtttt	ttaagtgttg	ctcagccaga	attgtccgta				
	A L N	F Q R F	L S V	A Q P	E L S V				
451	caaaaagtaa	cggtcaaaaa	cctgagcgat	gctgaggttg	acgtgaccct				
	Q K V	T V K	N L S D	A E V	D V T				
501	aaagccaagt	atcgatgccg	atgtgatgaa	cgaagaagct	aattacgatg				
	L K P S	I D A	D V M	N E E A	N Y D				
551	aacgcttctg	ggatgtcttg	gccactgacc	aacaggcaga	tcggggggagc				
	E R F	W D V L	A T D	Q Q A	D R G S				
601	atcgttgcca	agaccacgcc	taatccatth	gggacacccc	ggtttacttc				
	I V A	K T T	P N P F	G T P	R F T				
651	cgggatggaa	atgcggttgg	taacggactt	aaagaacgta	gccatcacgc				
	S G M E	M R L	V T D	L K N V	A I T				
701	aaccaaata	aaaagaagtt	acgacggcgt	ataccggtaa	gctggcccca				
	Q P N	E K E V	T T A	Y T G	K L A P				
751	caggcaagcg	ctgaattaga	aaagcgcgtg	attgtggtaa	cgtcacggga				
	Q A S	A E L	E K R V	I V V	T S R				
801	ttacgacaca	caagaaagct	taacggcagc	catgcatcag	ttgagcgaca				
	D Y D T	Q E S	L T A	A M H Q	L S D				
851	aagtggccca	atcttcatat	gaagatttgt	tgaacgcaca	tacggccatc				
	K V A	Q S S Y	E D L	L N A	H T A I				
901	tgggccaac	ggtgggagaa	gtcggatggt	gtgatcaaag	gtgacgatga				
	W A Q	R W E	K S D V	V I K	G D D				
951	gtcgcaacaa	gggattcgct	ttaatctatt	ccagttgttc	tccacgtact				
	E S Q Q	G I R	F N L	F Q L F	S T Y				
1001	atggtgaaga	tgcgcgcttg	aatatcggac	ctaaaggctt	tacgggtgag				
	Y G E	D A R L	N I G	P K G	F T G E				
1051	aagtatgggtg	gtgcaactta	ttgggatacc	gaagcctttg	ccttccctgt				
	K Y G	G A T	Y W D T	E A F	A F P				

1101 ttatctgggg attaccgatc ctaagggtcac tcgcaacctc ttgatgtacc
 V Y L G I T D P K V T R N L L M Y
 1151 gttacaagca attagacggg gttacatca acgcacaaga acaagggtt
 R Y K Q L D G A Y I N A Q E Q G L
 1201 aaaggggcct tgttcccaat ggtgaccttc gatggaattg aatgccataa
 K G A L F P M V T F D G I E C H
 1251 tgaatgggaa atcaccttcg aagaaattca ccgaaatggg gacattgcct
 N E W E I T F E E I H R N G D I A
 1301 ttgccatcta caattacaca cgttacaccg gtgatgacag ttacgtcttg
 F A I Y N Y T R Y T G D D S Y V L
 1351 catgaagggg ccaaggtgct gaccgaaatt tctcgcttct gggccgaccg
 H E G A K V L T E I S R F W A D
 1401 ggttcacttc agtaagcgta ataaccagta catgattcat ggggttacgg
 R V H F S K R N N Q Y M I H G V T
 1451 gtgccgatga gtatgaaaac aacgttgata acaactggga taccaacatg
 G A D E Y E N N V D N N W D T N M
 1501 ttggctcagt ggacgttgaa gtatacacta gaaatthttg gtaaggttga
 L A Q W T L K Y T L E I L G K V
 1551 tcaggatact gccaaagcaat tggatgtttc cgatgaggag aagacgaagt
 D Q D T A K Q L D V S D E E K T K
 1601 ggcaagacat tgtcgatcgg atgtatctgc cttacgataa ggacctgaac
 W Q D I V D R M Y L P Y D K D L N
 1651 attttcgctc aacacgatgg gttcttggat aaagacatcg aacctgtcag
 I F V Q H D G F L D K D I E P V
 1701 ctcaattcca gcggatcaac ggccaattaa ccaaaactgg tcgtgggata
 S S I P A D Q R P I N Q N W S W D
 1751 agatcttgcg gtgcgcttac attaagcaag gggatgtctt gcaaggaatc
 K I L R S P Y I K Q G D V L Q G I
 1801 tgggacttta ttgatgacta cacgccagaa caaaagaagg ccaactttga
 W D F I D D Y T P E Q K K A N F
 1851 cttctacgaa ccaactgacgg tgcacgaatc tagtttgtcc ccggcaatcc
 D F Y E P L T V H E S S L S P A I
 1901 actcgggtatt agctgctgac ttacattacg aggataaggc cgtagaaattg
 H S V L A A D L H Y E D K A V E L
 MPFOR3
 1951 tattcacgga cggcaccgatt agacttggat aactacaata atgacacgac
 Y S R T A R L D L D N Y N N D T
 2001 ggatggccta cacattacgg ccatgactgg tggctggatt gcggtagttc
 T D G L H I T A M T G G W I A V V
 2051 aaggcttcgc gggcatgcgg gttcgcgatg ggcaattgca ttatgcccc
 Q G F A G M R V R D G Q L H Y A P
 2101 ttcttgccca agacgtggac aagctacacc ttccggcaag tcttccgtga
 F L P K T W T S Y T F R Q V F R
 2151 tcgactgatt gaagtcagcg ttcacgcaga tggccctcac ttcaagctac
 D R L I E V S V H A D G P H F K L

	TERM2/TERMREC2											
2201	tcagtggaga	gcctttaaca	atcgacggt									
	L	S	G	E	P	L	T	I	D	V		
	S	V	E	S	L	-	Q	S	T			
	T	Q	W	R	A	F	N	N	R	R		

Abb. 6.51 Nukleotidsequenz des *mapA*-Gens nach Sequenzierung des Amplifikats 179

Die Primerbindungsstellen 5'-MPFOR3, 3'-TERM2 5'-K-FOR, 5'-MAPARECFOR und 3'-TERMREC2 (s.u.) sind unterstrichen.

Die erhaltene Sequenzinformation kann optional für die Generierung rekombinanter Maltosephosphorylase zur Verwendung in verschiedenen Anwendungsbereichen genutzt werden. Durch den Einsatz der Primerkombination 5'-K-FOR/3'-TERM2 konnte ein 2,2 kb großes Fragment amplifiziert werden. Nach Klonierung in den Vektor pGEM-T Easy wurde die Insertion des Amplifikats in das resultierende Plasmid pG99K9 (Abb. 6.52) durch Restriktions- und Sequenzanalyse bestätigt. Dieses Fragment kann für eine weitere Amplifikation mit den Primern 5'-MAPARECFOR/3'-TERMREC oder 5'-MAPARECFOR/3'-TERMREC2 genutzt werden um, nach gerichteter Insertion in die Expressionsvektoren pET15b- oder pET3d rekombinante Maltosephosphorylase zu exprimieren. Optional könnte ein chimäres Protein unter Verwendung der bekannten *mapA*-Sequenz von *Lactobacillus brevis*, ergänzt durch den 3'-Terminus des *mapA*-Gens von *Lactobacillus sanfrancisciensis* generiert werden.

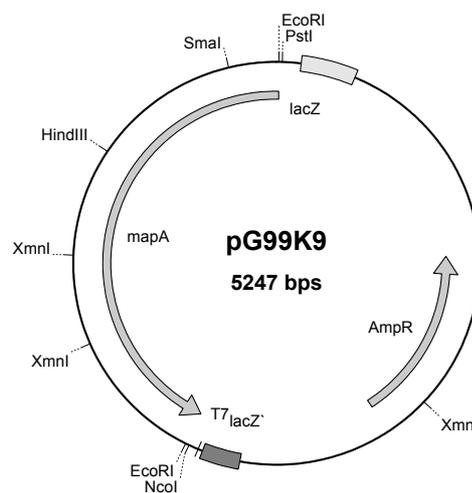


Abb. 6.52 Schematische Darstellung des 2,2 kb *mapA*-Sequenz enthaltenden Plasmids pG99K9.

Um den 3'-Terminus des *mapA*-Gens weiter aufzuklären, wurden Primer für inverse PCR-Reaktionen ausgewählt. Bei diesem Verfahren wird genomische DNA restringiert und mittels einer Sonde Fragmente detektiert, die die aufzuklärende *mapA*-Sequenz beinhalten. Zu diesem Zweck wurde Biotin-11-dUTP in einer PCR mit den Primern 5'-MPFOR2 und 3'-MPREV1 eingesetzt, um eine Sonde entsprechend des 440 bp-*mapA*-Fragmentes zu generieren. Die Überprüfung der Biotinylierung des PCR-Produktes erfolgte über einen Southern-Dot-Blot (Abb. 6.53).

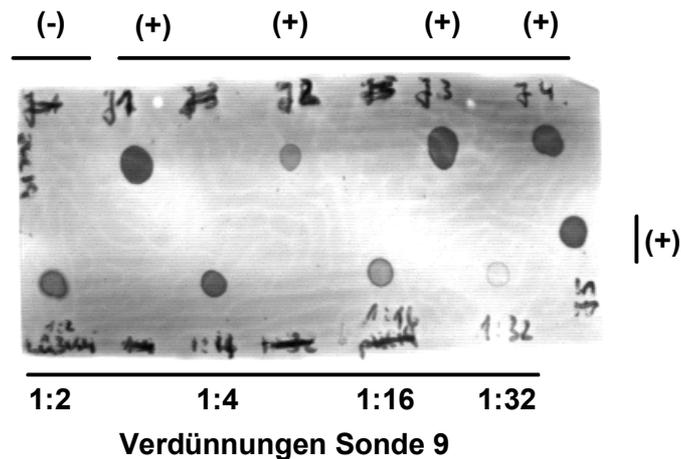


Abb. 6.53 Überprüfung der Sonde 9

Southern-Dot-Blot auf Nylonmembran. Negativkontrolle: pUC19-DNA, 50 ng (-), Positivkontrollen biotinylierte PCR-Produkte J1-5 (+). Verdünnungen der Sonde 9.

Der Nachweis der biotinylierten Sonde erfolgte über die Bindung eines Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugates. Durch NBT/BCIP wurde ein violetter Farbstoff auf der Membran präzipitiert. Auf diese Weise konnten noch 8 ng der Sonde 9 (Verdünnung 1:32) nachgewiesen werden.

Um die Hybridisierungsreaktion der generierten Sonde 9 mit der Zielsequenz des *mapA*-Gens zu überprüfen, wurde das Plasmid pGLQ3 Klon 4 ungeschnitten, sowie nach verschiedenen Restriktionen in einem Southern-Blot eingesetzt. Das Plasmid wurde zuvor zur Reisolierung des 440bp-*mapA*-Fragmentes mit *EcoRI* geschnitten und durch Restriktion mit *BglII* linearisiert. Zudem wurden 10 µg genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis* mit *HindIII*, *BglII* und *EcoRI* restringiert (Abb. 6.54).

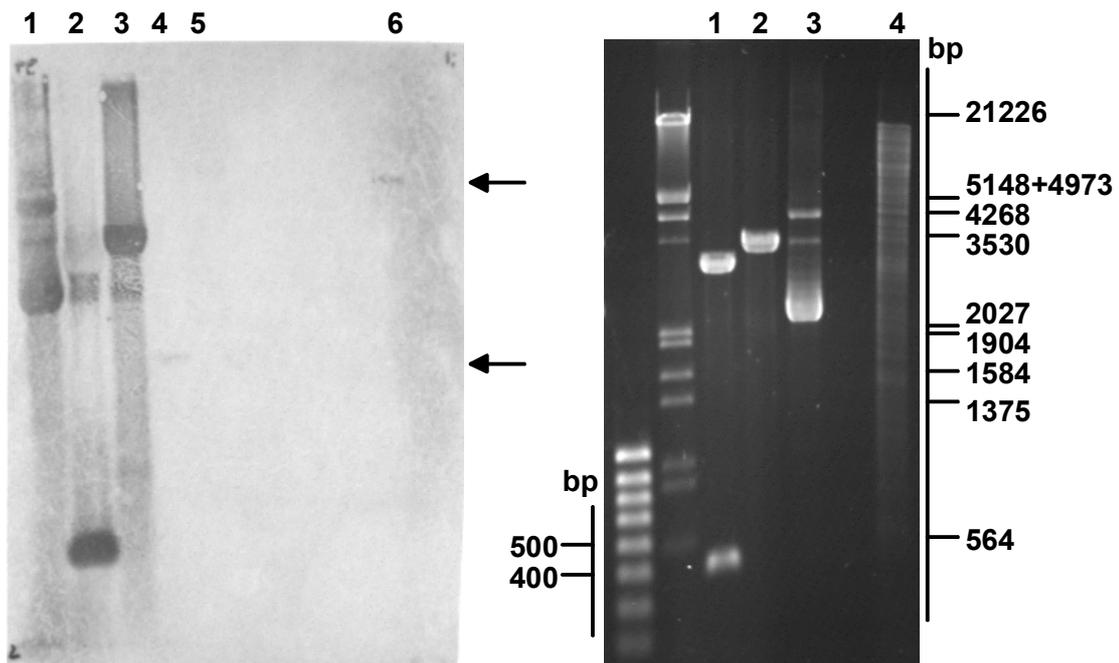


Abb. 6.54 Southern-Blot zur Identifizierung des *mapA*-Gens

Southern-Blot auf Nylonmembran; links: pGLQ3K4 ungeschnitten (Spur 1); pGLQ3K4/*EcoRI* (Spur 2); pGLQ3K4/*BglII* (Spur 3); *L. brevis* genom. DNA/*HindIII* (Spur 4); *L. brevis* genom. DNA/*BglII* (Spur 5); *L. brevis* genom. DNA/*EcoRI* (Spur 6). rechts: Agarosegel (1%); Marker: 100 bp-Leiter, λ -Marker; pGLQ3K4/*EcoRI* (Spur 1); pGLQ3K4/*BglII* (Spur 2); pGLQ3K4 ungeschnitten (Spur 3); *L. brevis* genom. DNA/*EcoRI* (Spur 4).

Um die Restriktionsmuster im Blot identifizieren zu können, wurden einige der Restriktionsansätze zum Vergleich im Agarosegel aufgetragen. Die Zielsequenzen aus dem Plasmid pGLQ4K4 wiesen im Southern-Blot die prominentesten Banden auf und konnten durch den Einsatz der Sonde 9 detektiert werden (Spuren 1-3). Im *HindIII*-Restriktionsansatz genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis* ist in einem ca. 1,5 kb großen Fragment eine schwache Bande zu erkennen (s. Pfeil, Spur 4). Nach Restriktion mit *EcoRI* zeigt sich im Blot eine ca. 5 kb große Bande, welche wahrscheinlich die *mapA*-Sequenz beinhaltet (s. Pfeil, Spur 6).

Bei der inversen PCR wird nach Restriktion genomischer DNA das Fragment, welches die *mapA*-Sequenz beinhaltet durch Southern Blot identifiziert. Nach Isolierung und Aufreinigung des Restriktionsfragmentes aus dem Agarosegel würde dieses ligiert und durch eine Restriktion mit *BstEII* wieder geöffnet. Die *BstEII*-Restriktionsschnittstelle ist im *mapA*-Gen bei 1221 bp lokalisiert. Somit befände sich die *mapA*-Sequenz an den Enden des *BstEII*-Fragmentes und die Randbereiche des zu analysierenden *mapA*-Gens innerhalb des Fragmentes (siehe Abb. 6.55). In einer anschließenden PCR-Reaktion könnte der ligierte 5'-/3'-terminale Bereich des *mapA*-Gens amplifiziert werden. Für diese Amplifikationen wurden

die Primer 5'-IMPEXFOR und 3'-IMPEXREV ausgewählt. Die Verifizierung der Amplifikation bietet eine nested-PCR mit den Primern 5'-IMPINFOR und 3'-IMPINREV.

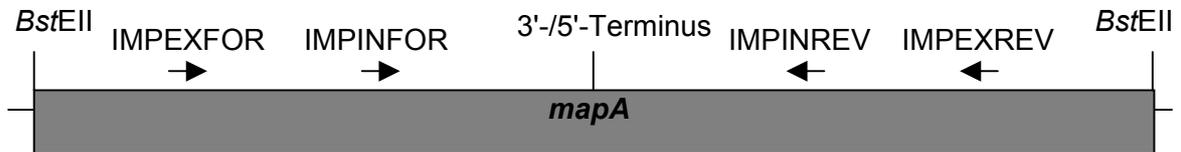


Abb. 6.55 Modell zur inversen PCR der *mapA*-Region von *Lactobacillus brevis*.

Schematische Darstellung des *mapA*-Gens von *Lactobacillus brevis* nach Ligation und anschließender Restriktion mit *BstEII*. Die Positionen der ausgewählten Primer sind durch Pfeile dargestellt.

Um die Hybridisierung der Primer für die inverse PCR mit der *mapA*-Zielsequenz zu überprüfen, wurde das Plasmid pG99K9 als Positivkontrolle, in verschiedenen Verdünnungen, in einer PCR eingesetzt (Abb. 6.56).

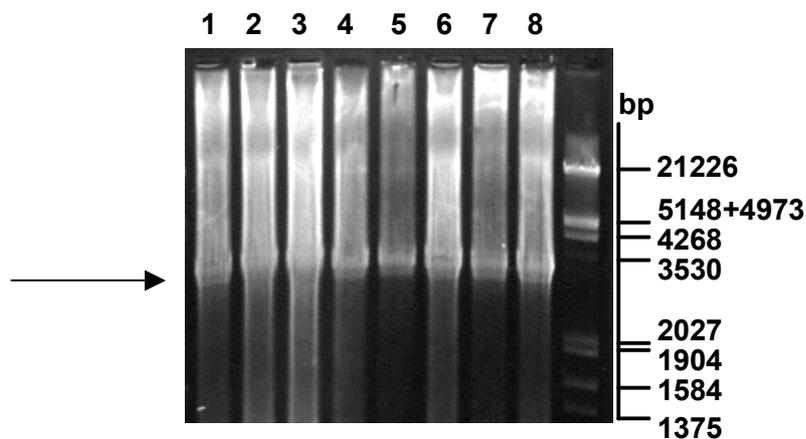


Abb. 6.56 PCR zur Überprüfung der Positivkontrolle bei inverser PCR

Agarosegel (1 %); Marker: λ -Marker; PCR-Produkte der Primerkombination 5'-IMPEXFOR/3'-IMPEXREV (Spuren 1, 2), Primerkombination 5'-IMPINFOR/3'-IMPINREV (Spuren 3, 4), Primerkombination 5'-IMPINFOR/3'-IMPEXREV (Spuren 5, 6), Primerkombination 5'-IMPEXFOR/3'-IMPINREV (Spuren 8, 9).

Unter Verwendung der Primer wurde der 5'- und 3'-terminale Bereich der inserierten *mapA*-Sequenz, sowie der Vektorbereich des pGEMT-Easy amplifiziert. Daraus resultierten, je nach Primerkombination, PCR-Produkte zwischen 3246 bp und 3169 bp, 5'-IMPEXFOR/3'-IMPEXREV 3246 bp, 5'-IMPINFOR/3'-IMPINREV 3169 bp, 5'-IMPINFOR/3'-IMPEXREV 3209 bp, 5'-IMPEXFOR/3'-IMPEXREV 3246 bp, 5'-IMPEXFOR/3'-IMPINREV 3206 bp.

Die inverse PCR unter Verwendung von mit *EcoRI*, bzw. *HindIII* restringierter, genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis*, konnte aus Zeitgründen nicht mehr umgesetzt werden.

6.4.3 Bestimmung der molekularen Masse der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis* durch MALDI-TOF

Um zu überprüfen, ob die bekannte Sequenz der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* das nahezu gesamte Gen abdeckt oder ob im *mapA*-Genlocus stromabwärts noch größere, unbekannte Bereiche zu erwarten sind, musste die Molekularmasse genau bestimmt werden.

Die Bestimmung der Molekularmasse der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* erfolgte durch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierungs-Massenspektrometrie (MALDI-TOF). Für die Untersuchung wurden 49,6 µg des gereinigten Proteins mit dem „Zip Tip-Kit“ aufgearbeitet. Je 1 µl des Präparats, sowie 1 µl der unaufgereinigten Proteinprobe, wurden anschliessend zur Kristallisierung mit 6-ATT (6-Azathiothymin, 0,1 % Trifluoressigsäure) oder DHBS (2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure) versetzt und in drei separaten Tropfen auf einem Probenträger platziert. Durch Lasereinwirkung wurden die kristallinen Proteinproben ionisiert. Nach Desorption der Kationen wurde die Flugzeit im elektrischen Feld spektrometrisch bestimmt. Aus dem Verhältnis von Masse und Ladung der eingesetzten Maltosephosphorylase konnte anhand der Kalibrierung mit Carboanhydrase, BSA und monoklonalem Antikörper bekannter Molekularmassen, auf die Masse der Maltosephosphorylase geschlossen werden.

Zur Optimierung des Verhältnisses Signal-Rauschen wurden zunächst je 50 Spektren aufsummiert. Das Molekulargewicht des Maltosephosphorylase-Monomers, versetzt mit 6-ATT, betrug bei der Messung im Mittel 86290 Da. Die mit DHBS vorbereiteten Proben resultierten in einer Masse von 86112 Da. In einem weiteren Durchgang wurden 60 Spektren addiert wobei die Molekularmasse zwischen 86245 Da (in 6-ATT) und 85974 Da (in DHBS) variierte. Abschließend wurden fünfmal je 100 Spektren einer Maltosephosphorylase-Probe in DHBS aufaddiert (Abb. 6.57).

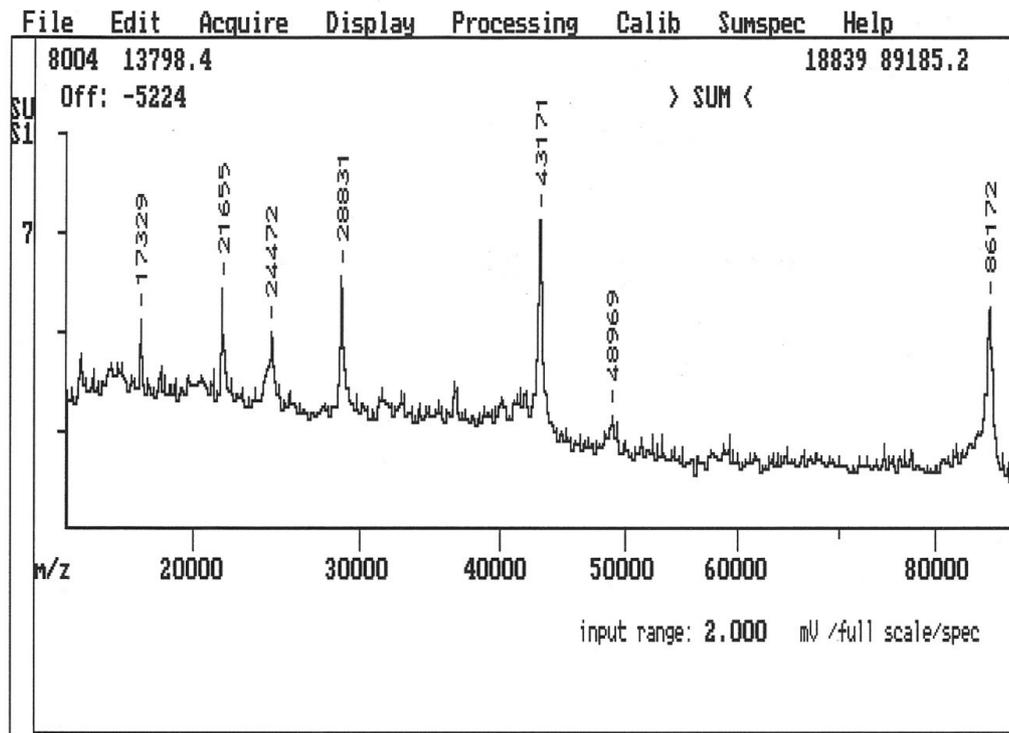


Abb. 6.57 Bestimmung des Molekulargewichtes der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis* durch MALDI-TOF

Gereinigte Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis*. Matrix: DHBS, 100 Spektren aufsummiert.

Das Molekulargewicht der aufgereinigten Maltosephosphorylase betrug nach Auswertung der Spektren 86166 Da. Durch die Sequenzanalysen konnten 2230 nt des *mapA*-Genlocus aufgeklärt werden. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 84911,41 Da. Die Analyse der Maltosephosphorylase durch MALDI-Massenspektroskopie ergab, dass das gemessene Molekulargewicht bei 86 kDa liegt. Somit beträgt die errechnete Größe des *mapA*-Gens 2254-2260 bp. Aus den Daten der Röntgenstrukturanalyse und dem Vergleich zum *mapA*-Gen von *Lactobacillus sanfrancisciensis* werden noch 12 Aminosäuren, bzw. 36 nt am 3'-Terminus vermutet. Die massenspektrometrisch ermittelte Größe entsprach somit den Erwartungen.

7 Diskussion

7.1 Klonierung und heterologe Expression rekombinanter Antikörperfragmente

Im Rahmen des EU-Projektes (CT97-0502) *Ultra-sensitive Multianalyte Immunoassay based on DNA-Sensor* (ULISA) wurden monoklonale Antikörper als spezifische Erkennungselemente zur Etablierung einer ultrasensitiven Immun-PCR-Methode verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden die eingesetzten Modellantikörper gegen humanes H-FABP (*heart-fatty acid binding protein*) und CEA (carcinoembryonales Antigen, *carcinoembryonic antigen*) durch die Analyse der antigenbindenden Regionen charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden die Nukleotidsequenz und die Aminosäureabfolge der V_H - und V_L -Fragmente aufgeklärt. Durch die Klonierung funktioneller, rekombinanter Antikörperfragmente, die optional als Fusionsproteine exprimiert werden können, bieten sich Einsatzmöglichkeiten, sowohl für die Optimierung der Immun-PCR-Methode, als auch für weitere Anwendungsbereiche.

Ausgehend von Antikörper-produzierenden Tumor-Hybridoma der Zelllinie IT1-3B8/E6, wurde die Gesamt-RNA der monoklonalen Antikörper gegen H-FABP isoliert. Der Einsatz des peqGold RNA Pure Kit der Firma peqLab mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987) resultierte in der effizienten Aufreinigung eines sauberen RNA Ausgangsmaterials. Dies war die Voraussetzung, um in einem weiteren Schritt eine ausreichende Menge an mRNA zu isolieren und zur reversen Transkription und cDNA-Synthese zur Verfügung zu stellen. Die konservierten Framework-Regionen 1 und 4 der variablen Antikörperregionen V_H - und V_L wurden als Primerbindungsstellen ausgewählt, um die entsprechenden Regionen zu amplifizieren. Die in der Literatur beschriebenen Primer 5'- V_{H1} BASPEZ und 3'- V_H FOR (Orlandi *et al.*, 1989, Clackson *et al.*, 1991, Leung *et al.*, 1993) wurden erfolgreich zur PCR der V_H -Sequenz des Antikörpers IT-1 eingesetzt und führten zur Synthese eines spezifischen PCR-Produktes. Dabei wurde unabhängig vom Einsatz von Gesamt-RNA oder mRNA ein gleich gutes Ergebnis erzielt. Die Amplifikation der IT1- V_L -Region gelang unter Verwendung der Primerkombination 5'- V_k BACK und 3'- V_{K4} FOR, die nach den gleichen Literaturangaben gewählt wurden, wie die Primer zur V_H -Amplifikation.

Für die Amplifikation variabler Regionen, die zur Klonierung und Expression von Antikörperfragmenten eingesetzt werden, müssen Amplifikationsfehler, die zu Basenaustausch führen, vermieden werden. Andernfalls können fehlerhafte Aminosäureabfolgen entstehen, die die Funktionalität des exprimierten Proteins

beeinträchtigen. Um eine korrekte Amplifikation zu gewährleisten, wurde zur PCR eine *proof reading* DNA-Polymerase eingesetzt. Die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* besitzt eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Dadurch wird in der PCR während der Synthese eine geringere Fehlerrate erreicht, als unter Verwendung der Taq-Polymerase.

Nach Sequenzanalyse und Homologievergleich der erhaltenen Sequenzen konnten diese als erstmals beschriebene V_H - und V_L -Fragmente bestätigt werden. Zur Produktion rekombinanter IT1 F_{ab} -Fragmente bedurfte es der Klonierung der untersuchten V_H - und V_L -Fragmente in einen Expressionsvektor. Ein bewährter Expressionsvektor ist der pASK 84 (Skerra, 1994), der die periplasmatische Expression rekombinanter F_{ab} -Fragmente ermöglicht. Durch die Verwendung der Primer wurden im IT1- V_L -Fragment die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *XhoI* inseriert, welche eine gerichtete Insertion des Fragmentes in den Expressionvektor gewährleisten. Die amplifizierte V_H -Region sollte durch eine sukzessive *PstI*/*BstEII*-Restriktion zur Umklonierung in den Vektor pASK 84 vorbereitet werden. Daher beinhalteten die zur PCR verwendeten Primer 5'- V_H BASPEZ eine *PstI*- und 3'-VH1FOR eine *BstEII*- Schnittstelle. Nachdem das V_H -Amplifikat mit dem Enzym *PstI* geschnitten wurde, ergab die elektrophoretische Überprüfung der Restriktion unerwarteterweise, dass das IT1- V_H -Fragment zwei interne *PstI*-Restriktionsstellen aufweist. Um einen Amplifikationsfehler auszuschließen, wurde die PCR unter Verwendung des Primers 5'-VH1BACK wiederholt. Der degenerierte 5'-Primer beinhaltete ebenfalls eine *PstI*-Restriktionsschnittstelle. Die anschließende Restriktionsanalyse mit *PstI*, die nachfolgende Sequenzanalyse und der Homologievergleich der PCR-Produkte bestätigten die Amplifikation identischer IT1- V_H -Fragmente. Die Sequenzierung beider V_H -Amplifikate zeigte zudem, dass sich in der Nähe des 3'-Terminus eine interne *BstEII*-Restriktionsschnittstelle befand. Um trotzdem die heterologe Expression eines rekombinanten IT1 F_{ab} -Fragmentes zu erreichen, wurde der Primer 5'- V_H Nsil designt und für eine weitere PCR eingesetzt. Die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *Nsil* sind komplementär und ermöglichten die gerichtete Klonierung des V_H -Fragmentes in den Expressionsvektor pASK 84. Zudem wurde zur Amplifikation der V_H -Region der 3'-Primer 3'-*BstEII* verwendet, der durch eine Verlängerung die stromaufwärts lokalisierte, interne *BstEII*-Schnittstelle eliminiert. Durch diese Maßnahmen konnte dann in der Tat ein V_H -Fragment enthaltendes Plasmid gewonnen werden, das die Klonierung des geplanten Expressionsvektors erlaubte (s.u.).

Die Ausgangsbasis zur Charakterisierung der antigenbindenden Domänen und zur Herstellung der rekombinanten Antikörperfragmente des monoklonalen anti-H-FABP-Antikörpers IT1 bildete die Tumor-Hybridom-Zelllinie IT1-3B8/E6. Um zum einen die ermittelten Sequenzen der V_H - und V_L -Bereiche zu bestätigen und zum anderen der Gruppe Zellkulturtechnik Informationen über die erfolgte Subklonierung bereitzustellen, wurden die variablen Regionen der parentalen Zelllinie IT1-3B8 amplifiziert, um die Nukleotidabfolgen zu

vergleichen. Für die PCR wurden ebenfalls die Primer 5'-V_HBASPEZ und 3'-VH1FOR für die Vervielfältigung des V_H-Fragmentes und 5'-V_K2BACK und 3'-V_K4FOR für die des V_L-Fragmentes verwendet. Die Untersuchung von vier V_L-Plasmidklonen die ausgehend von der parentalen Zelllinie erhalten wurden, ergab nach Restriktionsanalysen und Ermittlung der Nukleotidsequenz, dass diese mit den V_L-Fragmenten der Zelllinie IT1 3B8/E6 übereinstimmen. Die *Pst*I/*Bst*EII-Restriktion von acht V_H-Plasmidklonen, ausgehend von der Zelllinie IT1 3B8, resultierte in sieben Übereinstimmungen des erwarteten Restriktionsmusters. Diese entsprachen denen der V_H-Fragmente des untersuchten Tochter-Antikörperklons IT1 3B8/E6. Exemplarisch wurde eines dieser Amplifikate sequenziert und die Identität mit dem Tochterklon auch auf diese Weise belegt. Ein kloniertes PCR-Produkt des Elternklons wies nicht das erwartete Restriktionsmuster auf. Nach Sequenzanalyse dieser Amplifikate zeigten sich Homologien zu einem rearrangierten, nicht-produktiven V_H-Gen auf (Genbank-Einträge M26981, M18308).

Die frühen Stadien der B-Zell Differenzierung zeichnen sich durch eine Reihe von Rekombinationsereignissen in den schweren und leichten Immunglobulinketten aus (Tonegawa, 1983, Yancopoulos *et al.*, 1986). Diese sind für die Generierung der V_H- und V_L-Regionen aus Gensegmenten der Keimbahn essentiell (Kleinfield *et al.*, 1986). Bestimmt wird die Diversität der V_H-Region durch drei verschiedene genetische Mechanismen - den evolutionären Anstieg der Anzahl der V-, D- und J-Keimbahn-Segmente, die somatische Rekombination zwischen V-, D- und J-Segmenten und das Auftreten somatischer Punktmutationen (Honjo, 1983, Tonegawa, 1983, Honjo und Habu, 1985). Die Rekombinationen der V_H-codierenden Region wird durch eine charakteristische Nukleotidsequenz vermittelt, welche aus einem hochkonservierten Heptamer (5'-TACTGTG-3') besteht und nahe des 3'-Terminus lokalisiert ist (Early *et al.*, 1982, Bothwell *et al.*, 1981, Crews *et al.*, 1981, Givol *et al.*, 1981, Kaartinen *et al.*, 1981, Loh *et al.*, 1983, Near *et al.*, 1984, Sims *et al.*, 1982, Kaartinen *et al.*, 1983, Early *et al.*, 1980). Im untersuchten V_H-Fragment des parentalen IT1-Klons sowie in den V_H-Regionen des Tochterklons und des monoklonalen Antikörpers CEA3-55.4 wurde das hochkonservierte Nukleotidheptamer im letzten Drittel des V_H-Genbereiches identifiziert. Das Signal-Heptamer findet sich auch in vielen D_H-Segmenten (Kurosawa und Tonegawa, 1982). Zudem beinhaltet diese Region einen nicht-konservierten Spacer von 12 bp oder 23 bp und ein A-T-reiches Nanomer (Bernard *et al.*, 1978, Sakano *et al.*, 1979, Sakano *et al.*, 1980, Kleinfield *et al.*, 1989). Die Formation der gesamten V_H-Kette erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende Rekombinationsereignisse. Das D- und das J_H-Segment bilden ein DJ_H-Intermediat, gefolgt von einer Addition des V_H-Segments (Alt *et al.*, 1984, Early *et al.*, 1980). Die rekombinatorischen Verbindungen (junctions) zwischen V_HD-Segment und DJ_H-Segment bleiben entsprechend der Sequenzvariabilität erhalten oder werden deletiert (Alt *et al.*, 1982,

Sakano *et al.*, 1981). Zudem wurde eine neue Klasse an rekombinatorischen Ereignissen im Genlocus der schweren Kette beobachtet (Kleinfeld *et al.*, 1986, Reth *et al.*, 1986). Diese Rekombinationen resultieren im Austausch der meisten oder aller kodierenden Sequenzen der schweren Kette durch die stromaufwärts lokalisierten Keimbahn-Gensegmente. Es wird vermutet, dass der randomisierte Gebrauch des V_H -Repertoires und der Ersatz von V_H -Genen für die große Diversität während der B-Zell-Ontogenese verantwortlich ist (Yancopoulos *et al.*, 1984). Die V_H -Gene werden auch bei Adulten fortwährend in den Prä-B-Zellen des Knochenmarks rearrangiert. Die Rekombinationsfrequenz ist bei fetalen B-Zellen höher als im Knochenmark, da sich mehr von ihnen in einem synchronen Entwicklungsstadium befinden (Lawler *et al.*, 1987). Das Auftreten verschiedener V_H -Sequenzen aus einem Zellkulturklon ist hypothetisch auf die B-Zell-Vereinzelung während der Zellkultur zurückzuführen. Durch PCR und Sequenzanalyse konnte in dieser Arbeit ein spezifischer Nachweis erfolgen.

Die CDR-Regionen (*complementarity determining regions*) weisen mehr Mutationen (Nukleotidaustausche) auf, die zum Austausch von Aminosäuren führen, wohingegen in den *Framework*-Regionen mehr stille Mutationen zu beobachten sind (Kodaira *et al.*, 1986). Die Hypervariabilität der CDR-H3-Region ist dabei auf die Rekombination der V-, D- und J-Segmente zurückzuführen. Die Diversität von CDR-H1 und CDR-H2 hängt von der Variabilität des V-Segmentes und somatischen Mutationen nach den Rekombinationsereignissen ab (Early, *et al.*, 1980, Sakano *et al.*, 1980, Kim *et al.*, 1981, Kataoka *et al.*, 1981). Die Nukleotidsequenzen der V_H - und V_L -Regionen des anti-HFABP-Antikörpers IT1 3B8/E6 wurden translatiert. Die CDRs konnten nach Kabat *et al.* (1987) und Chothia (Chothia *et al.*, 1992, Al-Lazikani *et al.*, 1997) zugeordnet werden. Die Bereiche, die nach Kabat CDR-H1 und CDR-H1 zugeordnet werden, sind dabei länger, als die nach Chothia definierten Bereiche. Die Identifizierung der CDRs konnte auch nach *Oxford molecular's AbM antibody modelling software* und nach der *contact definition* (MacCallum *et al.*, 1996) erfolgen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den Einträgen der Kabat-Datenbank (Kabat *et al.*, 1987) ergab, dass die IT1- V_H -Region auf Nukleotidebene zu 97% mit einer murinen IgG V_H -Region übereinstimmt (KABID 001970). Die Aminosäuresequenz der IT1- V_H -Region entspricht zu 90% dem Eintrag KABID 002005. Die IT1- V_L -Sequenz ist zu 96% identisch mit der murinen κ -Region eines IgG-Moleküls (KABID 005960) und dem Eintrag KABID 005985. Dies ist ein Beispiel, dass die endgültige Spezifität eines monoklonalen Antikörpers durch Kombinationen der V-Regionen bestimmt wird, die alle im Detail große Ähnlichkeiten zu anderen Antikörpern aufweisen. Dies ist auch die Grundlage für die Selektion neuer, rekombinanter Antikörper über Phage Display aus einem relativ begrenzten Repertoire von V_H - und V_L -Sequenzen.

Zur heterologen Expression des IT1 F_{ab}-Fragmentes wurden die charakterisierten V_H- und V_L-Regionen gerichtet in den Expressionsvektor pASK 84 kloniert. Die Konstruktion des resultierenden Vektors pASKIT1 wurde durch Restriktions- und Sequenzanalysen überprüft. Zur periplasmatischen Produktion der F_{ab}-Fragmente wurde der Stamm *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ausgewählt. Nach einem Protokoll von Skerra (1994) erfolgte die Isolierung der periplasmatischen Fraktion. Die Aufreinigung der rekombinanten F_{ab}-Fragmente erfolgte chromatographisch unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose. Die erwarteten Proteinfractionen konnten im Rahmen der FPLC detektiert werden. Die Spezifität der H-FABP-Erkennung wurde anhand eines ELISAs unter Verwendung von biotinylierten, monoklonalen Detektorantikörpern überprüft und mit der Bindung an I-FABP verglichen. Durch Antigenpräsentation mittels eines Fängerantikörpers soll gemeinhin die Sensitivität und Spezifität der Reaktion erhöht werden. Allerdings beeinträchtigte der Einsatz des *rabbit*-*anti*-*mouse*-*anti*-H-FABP-Fängerantikörpers die Selektivität dieses H-FABP-Sandwich-ELISAs beträchtlich, da die monoklonalen IT1-Antikörper unspezifisch an die Kanninchenantikörper binden. Der Einsatz rekombinanter IT1 F_{ab}-Fragmente resultierte zwar in einer eindeutigen, aber dennoch nur geringfügigen Erhöhung der Signalstärke unter Verwendung des Antigens H-FABP. Das führte zu dem Schluss, dass offensichtlich die antigenbindenden Regionen des Antikörpers IT1 auch den *rabbit*-*anti*-*mouse*-*anti*-H-FABP-Antikörper erkennen. Aus diesem Grund wurde auf die Antigenpräsentation zur Detektion des F_{ab}-Antikörpers verzichtet. Mit Hilfe eines alternativ etablierten Assays, in dem das Antigen H-FABP direkt auf der Mikrotiterplatte präsentiert würde, konnten in den proteinhaltenden Fraktionen der Metall-Chelat-Chromatographie funktionelle IT1 F_{ab}-Fragmente nachgewiesen werden.

Um die Durchführung der angewendeten Methoden zu überprüfen und somit Verfahrensfehler auszuschließen, wurde der unmodifizierte Expressionsvektor pASK-D-1,4 zur Produktion von Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmenten eingesetzt. Dabei wurden alle Abläufe genau der Anzucht, Isolierung und Detektion der IT1 F_{ab}-Fragmente entsprechend durchgeführt. Insbesondere konnte die korrekte Funktion der auch bei der Reinigung der IT1 F_{ab}-Fragmente genutzten Ni-NTA-Säule demonstriert werden. Nach chromatographischer Aufreinigung des isolierten Periplasmas wurde eine deutlich höhere Extinktion bei 280 nm als nach Aufreinigung des IT1-Expressionsproduktes detektiert. Diese Beobachtung wies bereits auf eine größere Menge an rekombinanten Antikörperfragmenten hin. Im ELISA wurde Hühnereiweiß-Lysozym als Antigen eingesetzt. In den eluierten Fraktionen hoher Proteinkonzentration konnten funktionelle Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente sehr deutlich nachgewiesen werden. Um die Effizienz der Bindung des Histidin-gekoppelten F_{ab}-Fragmentes an die Ni-NTA-Agarose zu überprüfen, wurde im Vergleich zu den eluierten Fraktionen der Durchfluss im ELISA getestet. In Letzterem ließen sich rekombinante Anti-

Lysozym-F_{ab}-Fragmente kaum nachweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass auch bei hoher Expressionsrate eine starke Bindung der rekombinanten Antikörperfragmente an die Ni-NTA-Agarose erfolgt und durch die anschließende Elution eine effiziente Aufreinigung der Proteine erfolgt.

Der Vektor pASK 84 bietet eine kontrollierte Expression durch IPTG-Induktion des *lacUV*Promotors/Operators. Daher wurden Anzuchten mit und ohne Induktion der Expression durch IPTG untersucht. Die Resultate zeigten, dass die Transkription der Induktionskontrolle unterlag. Ein weiterer, kritischer Schritt ist zudem die simultane Translokation der V_H- und V_L-Fragmente ins Periplasma von *E. coli* JM83, wo unter Ausbildung der Disulfidbrückenbindung die Synthese der F_{ab}-Fragmente erfolgt. Zu diesem Zweck wurde der periplasmatische Überstand sowie die Sphäroblastensuspension auf das Vorhandensein rekombinanter F_{ab}-Fragmente untersucht. In der Sphäroblastensuspension konnten diese durch ELISA sehr deutlich nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass ein kleiner Teil löslichen Proteins im Cytoplasma verbleibt. Dort können unter reduzierenden Bedingungen keine Disulfidbrücken und somit ein funktionelles F_{ab}-Fragment ausgebildet werden. Eventuell kann durch die Aufarbeitung der Zellen eine Oxidation durch Luftsauerstoff erfolgen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Sphäroblastensuspension durch periplasmatische Reste verunreinigt wurde. Somit könnte eine Schwäche des gewählten Expressionssystems oder aber des Aufarbeitungsschemas vorliegen. Der Nachweis von IT1 F_{ab}-Fragmenten über SDS-Gelelektrophorese ist nicht gelungen. Das Protein konnte in einem Western-Blot nur anhand einer sehr schwachen Bande detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten Anti-Lysozym-F_{ab}-Fragmente sowohl im SDS-Gel als auch im Western-Blot deutlich nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann belegt werden, dass der verwendete Vektor für die Expression rekombinanter F_{ab}-Fragmente geeignet ist und dass auch bezüglich der Aufreinigung der Antikörperfragmente keine Verfahrensfehler vorlagen. Geringere Expressionsraten unter Verwendung des pASK-Expressionssystems nach Skerra (1994) wurden auch bei der Produktion rekombinanter Anti-2,4-D-F_{ab}-Fragmente beobachtet (Schmengler, 2000). Ursache für die Minderung der Expressionsrate könnte die eventuelle Zytotoxizität der exprimierten, rekombinanten Antikörperfragmente für *Escherichia coli* sein. Ein weiterer Aspekt kann der divergierende Codon-Gebrauch von *E. coli* darstellen (Skerra und Plückthun, 1991, Humphreys, 1996). Die Akkumulation des rekombinanten Proteins in periplasmatischen Einschlusskörpern könnte ebenfalls dazu führen, dass nur eine geringe Menge an Antikörperfragmenten zu detektieren war (Kipriyanov et al., 1995).

scF_v-Fragmente haben den Vorteil, dass die beiden Dimerisierungsdomänen bereits auf einer Polypeptidkette vorliegen. Rekombinante IT1 scF_v-Fragmente sollten über *splice overlap extension* (SOE)-PCR (Chen, et al., 2002) generiert werden. Dabei wurden die V_L-

und V_H -Fragmente über eine Linkerregion (Huston, *et al.*, 1988, Bird, *et al.*, 1988) miteinander verknüpft. Der Auffüllreaktion schloss sich eine Amplifikation des kompletten scF_V -Fragmentes an. Die SOE-PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEMT Easy kloniert und zur Überprüfung der inserierten scF_V -Fragmente sequenziert. In drei von vier untersuchten Klonen wurde eine Mutation im Linker-DNA-Bereich nachgewiesen. Die Produktion rekombinanter IT1 scF_V -Fragmente erfolgte unter Verwendung des Vektors pET20b. Dieser beinhaltet eine *pelB*-Leadersequenz durch welche die Translokation des Proteins über die innere Membran und somit die periplasmatische Expression ermöglicht wird. Die Expressionskontrolle erfolgt hier durch einen starken T7-Promotor und die Induktion durch IPTG (Studier, *et al.*, 1990). Die heterolog exprimierten Proteine akkumulieren in diesem Fall im Cytosol in Form von Einschlußkörpern. Die eigentlich gewünschte Sekretion ins Periplasma war vernachlässigbar wie durch SDS-Gelelektrophorese gezeigt werden konnte.

Der Transport von scF_V -Fragmenten in den periplasmatischen Raum via Sekretions-Signal-Sequenzen wurde bereits beschrieben (Movva *et al.*, 1980, Lei *et al.*, 1987). Da die Renaturierung cytosolischer Einschlusskörper ein sehr aufwändiges Verfahren erfordert (Martineau, *et al.*, 1998, Sanchez *et al.*, 1999) und in diesem Fall die *pelB*-Leadersequenz noch entfernt werden müsste wurde ein anderes Verfahren zur periplasmatischen Expression von scF_V -Fragmenten gewählt. Für die Produktion rekombinanter IT1 scF_V -Fragmente, wurde der Vektor pASKIT1, welcher für die periplasmatische Expression rekombinanter IT1 F_{ab} -Fragmente eingesetzt wurde, modifiziert. Das korrekt amplifizierte IT1 scF_V -Fragment wurde als Matrize verwendet, um ein Fusions-Fragment zu generieren, welches aus der Linker-Region, dem V_L -Fragment, einem c-myc-Tag (Evan *et al.*, 1985) und einem His-Tag bestand. Das im Vektor vorhandene V_L -Fragment wurde durch das neu generierte Modul ausgetauscht. Damit wurde der Vektor pASKscFvIT1 generiert, der auch in späteren Anwendungen durch simplen Austausch der V_H - und V_L -Fragmente die Expression von scF_V -Fragmenten ermöglicht, ohne dass es der mutationsanfälligen SOE-PCR zur Generierung der Linker-Region bedarf. Das Fusionsprotein ermöglicht durch den His-tag die Aufreinigung des rekombinanten scF_V -Fragmentes über Ni-NTA-Agarose. Die Erkennung durch Western-Blot-Analyse kann z.B. durch Ni-NTA-AP erfolgen. Der inserierte c-myc-Tag ermöglicht zusätzlich die Detektion des Antikörperfragmentes durch einen Anti-c-myc-Antikörper im ELISA. Beide Tags wurden, wie in der Literatur beschrieben, zur Aufreinigung und Detektion des generierten scF_V -Fragmentes eingesetzt (vergl. Ward, *et al.*, 1989, Lilley, *et al.*, 1994, Malby, *et al.*, 1993) und auch in dieser Arbeit erfolgreich verwendet. Im Western-Blot wurde das intensivste Signal nach Aufarbeitung der Sphäroblastensuspension detektiert, was analog zur Expression der IT1 F_{ab} -Fragmente darauf hinweist, dass die Translokation über die innere Bakterienmembran nicht vollständig

erfolgt und ein Rest löslichen Proteins im Cytoplasma verbleibt oder dass die Sphäroblastensuspension durch das Aufreinigungsverfahren durch die periplasmatische Fraktion verunreinigt wurde.

Im Rahmen des ULISA-EU-Projektes wurden zur Immun-PCR die monoklonalen IgG1-Antikörper CEA2-4.4 und CEA3-55.4 eingesetzt. Diese wurden in der Zellkulturgruppe des Instituts für Chemo- und Biosensorik in Kultur gehalten und zu Testzwecken produziert und im ELISA eingesetzt (Yunis, 2001). Sie sind gegen das carcinoembryonale Antigen (*carcinoembryonic antigen*, CEA) gerichtet, dessen Diagnostik eine große Relevanz besitzt, da auf diesem Wege eine Vielzahl an Erkrankungen detektiert werden kann (Lammerz und Stieber, 2004). Zur Charakterisierung der mAK CEA2-4.4 und CEA3-55.4 wurden die antigenbindenden Regionen analysiert. Entsprechend des Protokolls, welches zur Isolierung von Gesamt-RNA des mAK IT1 verwendet wurde, gelang die Isolierung der RNA der beiden CEA-Antikörper. Nach reverser Transkription wurde die gewonnene cDNA zur Amplifikation der V_H- und V_L-Regionen mittels der Primer 5'-VH1BACK und 3'-VH1FOR, bzw. 5'-VK2BACK und 3'-VK4FOR eingesetzt. Die Analyse der Amplifikate der CEA3-55.4-V_H-, CEA3-55.4-V_L-, CEA2-4.4-V_H-, CEA2-4.4-V_L-Fragmente erfolgte durch Agarosegelelektrophorese und Restriktionen. Bei der Restriktionsanalyse des CEA2-4.4-V_H-Gens wurden wiederum interne *Pst*I-Schnittstellen erkannt. Um auszuschließen, dass versehentlich die cDNA des mAK IT1 zur PCR eingesetzt wurde oder Kontaminationen zu einer Fehlampifikation führten, wurden die V_H-Fragmente einem Homologievergleich unterzogen. Die Nukleotidsequenzen sind lediglich zu 78% identisch und nur eine der *Pst*I-Schnittstellen ist an der gleichen Stelle lokalisiert. Die Sequenz stellt also ein authentisches CEA-V_H-Fragment dar. Eine interne *Bst*EII-Schnittstelle weist das V_H-Fragment des mAK CEA2-4.4 nicht auf. Um optional F_{ab}-Fragmente der Antikörper CEA2-4.4 und CEA3-55.4 zu generieren, die über das pASK-Expressionssystem produziert werden können, wurde zur Reamplifikation der CEA2-4.4-V_H-Region der 5'-Primer 5'-VHNSil erfolgreich eingesetzt. Zur Generierung von CEA-scFv-Fragmenten wurde die SOE-PCR durchgeführt, durch welche jedoch keine sauberen Amplifikate erhalten werden konnten. Die Konstruktion des Expressionsvektors pASKscFvIT1 bietet jedoch die Möglichkeit, unter Verwendung der generierten CEA-V_H- und CEA-V_L-Fragmente ein funktionelles scFv-Fragment für verschiedenste Applikationen herzustellen. Im Rahmen des Projektes wurde nicht weiter mit den monoklonalen Antikörpern CEA2-4.4 und CEA3-55.4 gearbeitet und daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

7.2 Klonierung und heterologe Expression von Kern-Streptavidin (CSAV) in *E.coli*

Streptavidin ist ein natürlich auftretendes, tetrameres Protein (ca. 60 kDa), welches von *Streptomyces avidinii* produziert wird (Chaiet und Wolf, 1964) und eine hochaffine Bindung zu Biotin eingeht (Dübel, *et al.*, 1995). Diese Eigenschaft wird in zahlreichen biologischen und analytischen Systemen genutzt (Sano und Cantor, 1991, Sano, *et al.*, 1992). Die Fusion von Antikörperfragmenten mit Streptavidin wird zur Modellierung diagnostisch und therapeutisch einsetzbarer Moleküle verwendet (Pearce, *et al.*, 1997) und wird in ELISAs (Schmidt und Skerra, 1993), Western Blots (Tsiotis *et al.*, 1995) oder in der Elektronenmikroskopie (Kleymann *et al.*, 1995) eingesetzt. Die Trunkierung des nativen Streptavidins verändert nicht signifikant die Biotin-Bindungseigenschaften, jedoch wird die Bindung biotinylierter Makromoleküle durch die Entfernung der terminalen Aminosäuren verbessert (Sano, *et al.*, 1995). Die lineare Fusion von scF_v-Fragmenten mit Kern-Streptavidin und Expression in *E. coli* wurde bereits beschrieben (Kipriyanov *et al.*, 1995, Kipriyanov *et al.*, 1996). Durch die Klonierung in Phase wird die chemische Kopplung von biologisch aktiven Antikörperfragmenten und Streptavidin überflüssig. Es wurde jedoch oftmals nur eine geringe Ausbeute des Fusionsproteins erhalten, da der überwiegende Anteil des exprimierten Produktes in Form von Einschlusskörpern aggregierte (Pearce, *et al.*, 1997). Für die Klonierung und Expression rekombinanten Streptavidins wurde der Vektor pASK60-Strep beschrieben. Dieser eignet sich zur periplasmatischen Sekretion des Genproduktes und beinhaltet eine Kasette zur N-Terminalen Insertion eines korrespondierenden Struktur-Gens zum Streptavidin (Schmidt und Skerra, 1993). Die Möglichkeit zur heterologen, periplasmatischen Expression rekombinanter scF_v-Streptavidin-Fusionsproteine bietet die Verwendung des Vektors pASKscFvIT1. Dieser erlaubt durch bereits vorhandene Restriktionsschnittstellen die Insertion von Kern-Streptavidin-Sequenzen. Nach Isolierung genomischer DNA aus *Streptomyces avidinii* wurde im Rahmen dieser Arbeit die von Sano *et al.* (1995) beschriebene Kernsequenz amplifiziert, nach Sequenzanalyse in den Expressionsvektor pET3c kloniert. Anschließend wurde das Kern-Streptavidin durch die spezifische Bindung an ein Biotin-HRP-Konjugat im ELISA auf seine Funktionalität überprüft. Der Einsatz von Vektoren des pET-Systems zur Expression rekombinanten Kern-Streptavidins führt zu hohen Proteinausbeuten (Thompson und Weber, 1993). Das rekombinante Kern-Streptavidin-Protein fiel hier als Einschlusskörper an und nach Renaturierung und Faltung konnte die erwartete Größe des tetrameren sowie des monomeren Proteins nach Hitzedenaturierung, durch SDS-Gelelektrophorese sicher erkannt werden. Der Nachweis, dass die Transkription der Kontrolle von IPTG unterstand, wurde dadurch bestätigt, dass in einer nicht-induzierten Anzucht kein Protein entsprechender

Größe detektiert werden konnte. Bei Trennung der Zellkompartimente in Sphäroblasten und lösliche Fraktion, wurde im Wasch-Überstand der Sphäroblastensuspension ebenfalls eine geringe Menge funktionellen Streptavidins nachgewiesen, was zu dem Schluss führte, dass keine ausschließliche Akkumulation des rekombinanten Proteins in Einschlusskörpern stattfand.

7.3 Optimierung eines PCR-ELISA-Verfahrens zur Detektion von Reporter-DNA aus der Immun-PCR

Ziel des ULISA-EU-Projektes war die Etablierung eines Immun-PCR-Verfahrens. Zur Detektion der dabei anfallenden PCR-Produkte wurde ein PCR-ELISA-Verfahren optimiert. Auf diese Weise kann mit hohem Durchsatz ein sensitiver Nachweis der Amplifikate erfolgen. Das Assay-Format nutzt die hohe Bindungsaffinität zwischen Streptavidin und Biotin aus. Bei der reversen Hybridisierung wurde eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte mit einer biotinylierten Sonde beschickt und mit einem Dig-markierten, alkalisch denaturierten PCR-Produkt hybridisiert. Durch die Optimierungsarbeiten konnte dem Projekt ein sensitives Nachweisverfahren bereitgestellt werden, das den Einsatz von nur 5 ng des PCR-Produktes erfordert, um ein gut erkennbares Signal zu erhalten. Im Vergleich dazu können in der Agarosegelelektrophorese oder PAGE nur ca. 30-100 ng DNA sicher detektiert werden. Das PCR-ELISA-Verfahren steigert die Sensitivität des Nachweises um ein Vielfaches. Bei Verwendung von 4 pmol der korrespondierenden Sonde pro Kavität wurde eine Sättigung detektiert. Möglicherweise wurde die Bindung der biotinylierten Sonden-DNA an die Streptavidin-beschichtete Oberfläche im Vergleich zu freiem Biotin sterisch oder elektrostatisch behindert. Allerdings resultierte der Einsatz der Sonde in einer Konzentration von 4 pmol/well in einer sehr gut detektierbaren Extinktion.

Das Temperaturoptimum der Hybridisierung belief sich auf 50°C. Das Optimum ist vermutlich durch die positive Temperaturabhängigkeit der Hybridisierungsreaktion und vermutlich auch der Diffusionsgeschwindigkeit und damit dem Transport an die feste Phase gekennzeichnet (Flotho, 2005). Oberhalb von 60°C kam es vermutlich zur Dissoziation des Nukleinsäurehybrids, da ab dieser Temperatur ein Abfall der Signalstärke beobachtet werden konnte. Hier ist bereits die Schmelztemperatur der hybridisierten Sonde überschritten ($T_m = 49^\circ\text{C}$). Bei 37°C wurden noch ca. 50% des Signals detektiert und führten ebenfalls noch zu einem gut auswertbaren Ergebnis. Die Handhabung des Assays wurde durch die Präequilibrierung von Hybridisierungs- und Waschlösungen vereinfacht. Die Spezifität der Reaktion konnte durch den Einsatz einer Reihe von weiteren PCR-Produkten verifiziert werden, die keinerlei Hybridisierungsreaktion mit der eingesetzten Sonde erkennen

ließen. Mit einer Hybridisierungszeit von nur fünf Minuten bot das gewählte Verfahren nicht nur ein spezifisches und sensitives Mittel zur Detektion der Immun-PCR-Produkte, sondern es zeichnete sich auch durch die Schnelligkeit der Hybridisierungsreaktion aus.

7.4 Bestimmung der Nukleotidsequenz der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis*

Maltosephosphorylase wird in der Biotechnologie auf Grund seiner hohen Substratspezifität für die Detektion von Maltose in Gegenwart anderer Oligosaccharide (Kamogawa *et al.*, 1974, Shirokane *et al.*, 2000) und die Bestimmung der Amylaseaktivität eingesetzt (Poudrier und Oyen, 1991). Maltosephosphorylase wird auch für die Synthese von Trehalose aus Maltose enzymatisch mit Trehalose Phosphorylase gekoppelt (Murao *et al.*, 1985, Yoshida *et al.*, 1995). Für diesen Zucker gibt es eine Vielzahl von Anwendungen, wie z.B. Süßungsmittel, als Stabilisator für getrocknete oder gefrorene Lebensmittel (Totsuka *et al.*, 1994), Kosmetika (Hata *et al.*, 1992) und Pharmazeutika (Kato *et al.*, 1989, Fujita *et al.*, 1990). Die Maltosephosphorylase stellt zudem das Schlüsselenzym für Phosphatbiosensoren (Hüwel *et al.*, 1997) dar.

Die reversible Phosphorolyse von Maltose in β -D-Glucose-1-phosphat und α -D-Glucose in Gegenwart von ortho-Phosphat erfolgt unter Konfigurationsinversion des C-Atoms, welches an der glycosidischen Bindung beteiligt ist (Fitting und Doudoroff, 1952, Hüwel *et al.*, 1997, Tsumuraya *et al.*, 1990, Wood und Rainbow, 1961). Dabei induziert die Substratanbindung hypothetisch eine Konformationsänderung der Maltosephosphorylase und stabilisiert so den Übergangszustand (Koshland und Neet, 1968, Tsumuraya *et al.*, 1990). Die Aufklärung des tatsächlichen, katalytischen Mechanismus erforderte die Analyse der Tertiärstruktur des Enzyms, die durch röntgenkristallographische Untersuchungen in Kooperation unseres Instituts für Chemo- und Biosensorik und dem Arbeitskreis von Prof. H. v. Tillbeurgh (Marseille) erfolgte (Egloff *et al.*, 2001). Zur korrekten Interpretation dieser Daten bedurfte es der Kenntnis der Primärstruktur, wozu durch diese Arbeit entscheidend beigetragen wurde.

In den Arbeiten von Irmer (1996) und Firnges (1997) wurden erste Untersuchungen zur Aminosäuresequenz auf Proteinebene zur Bestimmung des N-Terminus der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis* vorgenommen. Basierend auf dem Codon-Gebrauch von *Lactobacillus brevis* entwickelte Firnges (1997) Primer und entschlüsselte auf diese Weise 1638 bp des Maltosephosphorylase-Gens. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Aufklärung der restlichen Nukleotidsequenz Primer mit Hilfe von taxonomischen Homologievergleichen generiert. Die Struktur und die Eigenschaften der Maltosephosphorylase wurde von einigen Gram-positiven Mikroorganismen der Ordnung

Bacillales beschrieben. Die Maltosephosphorylase-Sequenz (MPase) von *Bacillus sp.* RK-1 umfasst beispielsweise 2655 bp. Das Enzym hat dabei eine theoretische Größe von 88,460 kDa (Inoue *et al.*, 2002), welche durch SDS-PAGE belegt wurde. Die Maltosephosphorylase von *Lactococcus lactis* wurde ebenfalls durch SDS-Gelelektrophorese als monomeres Enzym, allerdings mit einer deutlich geringeren Masse von 75 kDa bestimmt. Die ersten N-terminalen Aminosäuren weisen signifikante Übereinstimmungen mit den ersten 20 Aminosäuren der Maltosephosphorylase von *Lactobacillus brevis* und den entsprechenden Aminosäuresequenzen von *Lactobacillus sanfrancisciensis* (Ehrmann und Vogel, 1998), *Bacillus sp.* (Genbank-Eintrag E17377) und *Nesseira meningitidis* (Genbank-Eintrag AAF40830) auf. Der interne Bereich der Aminosäuresequenz von *Lactococcus lactis* ist einem trunkeierten ORF (open reading frame, offener Leserahmen) der *Lactococcus lactis* Subspezies *cremosis* MG 1363 (Genbank-Eintrag AF03982) sehr ähnlich. Letzterer zeigt eine Homologie von 69% zur Maltosephosphorylase von *Lactobacillus sanfrancisciensis* (Nilsson und Rådström 2001).

Die Maltose wird durch ein ATP-abhängiges Permease-System in *Lactococcus lactis* transportiert (Law *et al.*, 1995). Intrazellulär wird die Maltose durch die phosphatabhängige Maltosephosphorylase (MP) und β -Phosphoglucomutase (β -PGM) α -D-Glucose und β -D-Glucose-1-phosphat degradiert (Qian *et al.*, 1994). Die kodierenden Gene für MP und β -PGM sind dort in zwei verschiedenen Operons lokalisiert (Nilsson und Rådström 2001) und unterstehen beide der Repression von Kohlenstoff-Kataboliten (Qian *et al.*, 1997). Bei *Lactobacillus sanfrancisciensis* DSM20451 sind die Gene für Maltosephosphorylase (*mapA*) und Phosphoglucomutase (*pgmA*) in einem Abstand von nur einem Nukleotid in einem Operon organisiert. *MapA* kodiert dort für ein Polypeptid mit 754 Aminosäuren und einer kalkulierten Masse von 85,723 kDa (Ehrmann und Vogel, 1998). Die Aminosäuresequenz von *pgmA* weist eine 41 %ige Übereinstimmung mit der Phosphoglucomutase (PgmB, EMBLZ70730) von *Lactococcus lactis* und eine 42 %ige Übereinstimmung mit YvdM von *Bacillus subtilis* (EBMLO06993) auf (Qian *et al.*, 1997). Die Nukleotidsequenz der *mapA*-Sequenz von *Lactobacillus sanfrancisciensis* weist eine signifikante Homologie zum *yvdK*-Gen von *Bacillus subtilis* (EMBLO06993) auf, welches in einem Operon lokalisiert ist, ähnlich den ORFs von Maltose-bindenden Proteinen, Maltosepermease und anderen Kohlenhydrat-degradierenden Enzymen (Ehrmann und Vogel, 1998).

Lactobacillus sanfrancisciensis, *Lactococcus lactis* und *Bacillus subtilis* weisen am 3'-terminalen Ende des Maltosephosphorylase-Gens einen stark konservierten Bereich auf. Auf dieser Grundlage wurde der Primer 3'-MPREV1 zur Amplifizierung des ungeklärten *mapA*-Bereiches von *Lactobacillus brevis* ausgewählt. Zudem wurde eine Konsensus-Sequenz der Genloci PgmA aus *Lactobacillus sanfrancisciensis*, β -PGM aus *Lactococcus lactis* und YvdM aus *Bacillus subtilis* ermittelt und zum Design des Primers 3'-MPREV2

verwendet. Die Einsatz des Primers 3'-MPREV2 führte jedoch nicht zur Detektion einer distinkten Bande bei der Überprüfung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese. Es blieb unklar, ob *Lactobacillus brevis* eine andere Operonstruktur aufweist oder ob der Einsatz des stark degenerierten Primers für die PCR-Reaktion ungeeignet war. Unter Verwendung des Primers 3'-MPREV1, in Kombination mit dem Primer 5'-MPFOR2, welcher in der bereits bekannten *mapA*-Sequenz lokalisiert ist, wurde ein 440 bp großes Amplifikat erhalten. Dieses wies eine 80 %ige Nukleinsäure-Sequenzhomologie zum Maltosephosphorylase-Gen von *Lactobacillus sanfranciscensis* auf. Somit waren 2043 bp des *mapA*-Gens von *Lactobacillus brevis* bekannt. Die Röntgenkristallstruktur der Maltosephosphorylase, komplexiert mit dem Kosubstrat Phosphat, wurde in der Zwischenzeit mit einer Auflösung von 2,15 Å ermittelt (Egloff *et al.*, 2001). Die putative, C-terminale Aminosäureabfolge wurde zur Generierung des 3'-TERM2 verwendet. Innerhalb des zuvor identifizierten 440 bp großen Amplifikats wurde als Gegenstück der 5'-Primer MPFOR3 designt. Eine PCR mit ähnlich lokalisierten Primern unter Verwendung von *Lactobacillus sanfranciscensis* hätte ein Produkt von 276 bp ergeben. Der Einsatz genomischer *Lactobacillus brevis*-DNA resultierte in der Synthese eines 187 bp großen PCR-Produktes mit einer Homologie von 70 % zur *mapA*-Sequenz von *Lactobacillus sanfranciscensis*. Damit wurden insgesamt 2230 bp des Maltosephosphorylase-Gens von *Lactobacillus brevis* identifiziert. Die erhaltene Information wurde genutzt, um ein zusammenhängendes 2,2 kb großes *mapA*-Fragment zu amplifizieren, welches die Option eröffnet, ein rekombinantes Maltosephosphorylase-Protein für verschiedenste Anwendungen zu exprimieren.

Die röntgenkristallographischen Untersuchungen ließen vermuten, dass sich am C-Terminus noch weitere 12 Aminosäuren befinden und somit noch 36 bp der Nukleotidsequenz aufzuklären wären. Eine Möglichkeit zur Analyse bietet die Inverse PCR. Dabei wird ein Restriktionsfragment mit der aufzuklärenden Region zirkularisiert und in einer PCR die Primer so lokalisiert, dass die Extension über den bekannten Bereich hinaus erfolgt, so dass die flankierenden Bereiche des Gens amplifiziert werden (Silver, 1991). Diese Methode wurde zunächst verwendet, um integrierte Retroviren (Silver und Keerikatte, 1989), bakterielle Insertionselemente (Ochman *et al.*, 1988), Segmente des Malaria-Gens (Triglia *et al.*, 1988) und chromosomale DNA von Hefen (Ochman *et al.*, 1990) zu untersuchen. Die zu amplifizierenden Fragmente sollten eine Größe von 200-3000 bp aufweisen, damit eine Zirkularisierung gewährleistet werden kann (Shore *et al.*, 1981). Für eine Anwendung zur Analyse des Maltosephosphorylase-Gens von *Lactobacillus brevis* müsste genomische DNA restringiert werden. Zur Identifizierung eines genomischen Restriktionsfragmentes in einem Southern-Blot, welches die flankierenden Regionen des *mapA*-Gens enthält, wurde eine biotinylierte Sonde generiert, deren Spezifität mittels Dot-Blot nachgewiesen wurde. Die bekannte *mapA*-Sequenz beinhaltet keine interne *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle. Im

Southern-Blot wurde ein ca. 5 kb-großes Restriktionsfragment detektiert. Allerdings war dieses nur als schwache Bande auf der Membran zu erkennen. Zur Überprüfung des Produktes aus der inversen PCR wurden Primer für eine nested-PCR gewählt. Die Hybridisierung der Primer, sowohl für die inverse PCR, als auch für die nested PCR mit der *mapA*-Sequenz, wurde durch den Einsatz einer Positivkontrolle bestätigt. Als Positivkontrolle fungierte das Plasmid mit dem inserierten, bekannten 2,2 kb großen *mapA*-Bereich. Die Optimierung der inversen PCR unter Verwendung genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis*, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

Um die Vermutung, resultierend aus der Röntgenstrukturanalyse zu bestätigen, dass am C-Terminus lediglich weitere 12 Aminosäuren lokalisiert sind, wurde die genaue molekulare Masse der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* via Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisierungs-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ermittelt. Die berechnete, molekulare Masse des hier bestimmten 2230 bp großen *mapA*-Bereiches betrug 84911,41 Da. Aus insgesamt 500 aufaddierten Spektren ließ sich eine mittlere Masse von 86,166 kDa errechnen. Im Rückschluss auf die Nukleotidsequenz des *mapA*-Gens betrug diese zwischen 2254 bp und 2260 bp. Die Sequenz der genomischen DNA aus *Lactobacillus brevis* Stamm ATCC 367 (American Type Culture Collection) wurde kürzlich aufgeklärt (Genbankeintrag NC 008497.1; Makarova *et al.*, 2006). Die Nukleotidsequenz dieses *mapA*-Gens aus diesem Stamm umfasst demnach 2268 bp. Bei einem Homologievergleich auf Nukleinsäureebene ergibt sich eine Übereinstimmung von nur 96 %. Die Aminosäuresequenz ist dagegen zu 99 % identisch mit der in dieser Arbeit ermittelten Sequenz. Mit 756 Aminosäuren ist die tatsächliche Größe der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* ATCC 367 um 13 Aminosäuren größer als die in dieser Arbeit ermittelte Sequenz. Die Diskrepanz von 1 % auf Aminosäureebene bedeutet, dass ca. 7-8 Aminosäuren nicht übereinstimmen. Dies unterstreicht die Annahme, dass es sich nicht um dieselben Proteine handelt. Die Divergenzen bezüglich der Homologie sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Quellen der jeweiligen Bakterienstämme zurückzuführen. Der in dieser Arbeit analysierte Stamm trägt die Bezeichnung DSMZ 20556 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Heidelberg). Nach Sohler *et al.* (1999) wurde der Stamm aus grünen Oliven isoliert und entspricht dem Stamm ATCC 8287.

Durch die Identifizierung der Primärstruktur anhand dieser Arbeit und den Arbeiten von Irmer (1996) und Firnges (1997) ließen sich die Daten der Röntgenkristallstruktur erst interpretieren und die Tertiärstruktur der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* aufklären. Mit diesen Ergebnissen gelang unserem Team erstmalig eine Strukturanalyse einer Disaccharidphosphorylase (Egloff *et al.*, 2001). Sie stärkten die Hypothese, dass die Maltosephosphorylase als Dimer vorliegt. Die Struktur besteht demnach aus einem N-terminalen β -sandwich, einem helikalen Linker, einer katalytischen $(\alpha/\alpha)_6$ barrel Domäne und

einem C-terminalen β -Faltblatt. Die $(\alpha/\alpha)_6$ *barrel* Domäne wies unerwarteterweise eine hohe strukturelle und funktionelle Analogie zur katalytischen Domäne der Glucoamylase von *Aspergillus awamori* auf. Diese Beobachtungen führten zu der starken Annahme, dass sich die Maltosephosphorylase aus der Glucoamylase entwickelt hat, bzw. dass sich beide Enzyme aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben. Die Maltosephosphorylase hat vermutlich eine Carboxylgruppe aus der Glucoamylase für die saure Katalyse konserviert und hat die katalytische Base, charakteristisch für die Glucosidase, verloren. Stattdessen sind an dieser Stelle mehrere, phosphatbindende Schleifen zu finden. Die relativ kurze Distanz zwischen der sauren, katalytischen Gruppe und dem gebundenen *ortho*-Phosphat deuten auf einen Mechanismus hin, bei dem das Phosphat die glycosidische Bindung nukleophil angreift. Dabei erfolgt eine Inversion der Konfiguration am anomeren C-Atom. Bei der beschriebenen, reversiblen Phosphorolyse von Maltose bedarf es keiner weiteren Cofaktoren. Dies ist Grund zur Annahme, dass der katalytische Mechanismus sich stark von dem der Glycanphosphorylasen, wie z.B. der Muskel-Glycogenphosphorylase und der verwandten, bakteriellen Maltosedextrinphosphorylase unterscheidet. Diese Divergenzen und die fehlende Sequenzhomologie zu den Glycogenphosphorylasen ließen den Schluß zu, dass die Maltosephosphorylasen eine eigene Enzymfamilie bilden. Hinsichtlich der Strukturdaten von Egloff *et al.* (2001) wurde die Aminosäuresequenz der Maltosephosphorylase von *Bacillus sp.* RK-1 mit der von *Lactobacillus brevis* verglichen. Die Bereiche der hypothetisch katalytischen Säure und der phosphatbindenden Regionen stimmten dabei völlig überein (Inoue *et al.*, 2002).

8 Literaturverzeichnis

- Abdul-Nabi, H. H., Schwartz, A. N., Wecher, D. G., Onger, M. W. Colorectal carcinoma: detection with Indium-111 anti-CEA monoclonal antibody ZCEO15. *Radiology* **164**, 517-624 (1987).
- Abraham, R., Buxbaum, S., Link, J., Smith, R., Venti, C. et al. Screening and kinetic analysis of recombinant anti-CEA antibody fragments. *J Immunol Methods* **183**, 119-125 (1995).
- Adams, V., Moll, C., Schmid, M., Rodrigues, C., Moos, R. et al. Detection and typing of human papillomavirus in biopsy and cytological specimens by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: a method suitable for semiautomation. *J Med Virol* **48**, 161-170 (1996).
- Adler, M., Langer, M., Witthohn, K., Eck, J., Blohm, D. et al. Detection of rViscumin in plasma samples by immuno-PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 757-763 (2003).
- Alard, P., Lantz, O., Sebagh, M., Calvo, C. F., Weill, D. et al. A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells. *Biotechniques* **15**, 730-737 (1993).
- Alfthan, K., Takkinen, K., Sizmann, D., Soderlund, H., Teeri, T. T. Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides. *Protein Eng* **8**, 725-731 (1995).
- Al-Lazikani, B., Lesk, A. M., Chothia, C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **273**, 927-948 (1997).
- Almog, O., Benhar, I., Vasmatazis, G., Tordova, M., Lee, B. et al. Crystal structure of the disulfide-stabilized Fv fragment of anticancer antibody B1: conformational influence of an engineered disulfide bond. *Proteins* **31**, 128-138 (1998).
- Alt, F. W., Baltimore, D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-J_H fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4118 (1982).
- Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Blackwell, T. K., Wood, C. R., Thomas, E. et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* **3**, 1209-1219 (1984).
- Anand, N. N., Dubuc, G., Phipps, J., MacKenzie, C. R., Sadowska, J. et al. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of cistronic DNA encoding an antibody fragment specific for a Salmonella serotype B O-antigen. *Gene* **100**, 39-44 (1991).
- Andersson, U., Radstrom, P. Physiological function of the maltose operon regulator, MalR, in *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiol* **2**, 28 (2002).
- Andreoletti, L., Hober, D., Belaich, S., Lobert, P. E., Dewilde, A. et al. Rapid detection of enterovirus in clinical specimens using PCR and microwell capture hybridization assay. *J Virol Methods* **62**, 1-10 (1996).
- Atwell, J. L., Breheney, K. A., Lawrence, L. J., McCoy, A. J., Kortt, A. A. et al. scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng* **12**, 597-604 (1999).

- Ayala, M., Duenas, M., Santos, A., Vazquez, J., Menendez, A. et al. Bacterial single-chain antibody fragments, specific for carcinoembryonic antigen. *Biotechniques* **13**, 790-799 (1992).
- Baez, L. A., Juneja, V. K., Sackitey, S. K. Chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of PCR-amplified enterotoxin A from *Clostridium perfringens*. *Int J Food Microbiol* **32**, 145-158 (1996).
- Baumler, A. J., Heffron, F., Reissbrodt, R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J Clin Microbiol* **35**, 1224-1230 (1997).
- Beauchemin, N., Turbide, C., Afar, D., Bell, J., Raymond, M. et al. A mouse analogue of the human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **49**, 2017-2021 (1989).
- Beidler, C. B., Ludwig, J. R., Cardenas, J., Phelps, C. G., Papworth, E. et al. Cloning and high level expression of a chimeric antibody with specificity for human carcinoembryonic antigen. *J Immunol* **141**, 4053-4060 (1988).
- Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K. et al. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* **57**, 327-334 (1989).
- Berg, S., Luneberg, E., Frosch, M. Development of an amplification and hybridization assay for the specific and sensitive detection of *Mycoplasma fermentans* DNA. *Mol Cell Probes* **10**, 7-14 (1996).
- Bernard, O., Hozumi, N., Tonegawa, S. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell* **15**, 1133 (1978).
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., Horwitz, A. H. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**, 1041-1043 (1988).
- Better, M., Horwitz, A. H. Expression of engineered antibodies and antibody fragments in microorganisms. *Methods Enzymol* **178**, 476-496 (1989).
- Beyer, W., Pocivalsek, S., Bohm, R. Polymerase chain reaction-ELISA to detect *Bacillus anthracis* from soil samples-limitations of present published primers. *J Appl Microbiol* **87**, 229-236 (1999).
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W. et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426 (1988).
- Bird, R. E., Walker, B. W. Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol* **9**, 132-137 (1991).
- Börchers, T. Enzym-Immuno-Assay für kardiales Fettsäurebindungsprotein aus Rinderherz - Entwicklung und erste Anwendungen. Diplomarbeit. Universität Münster. (1987)
- Börchers, T., Spener, F. Fatty acid binding proteins, in *Cell lipids* (ed. Hoekstra, D.) 261-294 (Academic Press, San Diego, 1994).
- Boss, M. A., Kenten, J. H., Wood, C. R., Emtage, J. S. Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **12**, 3791-3806 (1984).

- Bothwell, A. L. et al. Heavy chain variable region contribution to the NPb family of antibodies: somatic mutation evident in a gamma 2a variable region. *Cell* **24**, 625-637 (1981).
- Boulianne, G. L., Hozumi, N., Shulman, M. J. Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* **312**, 643-646 (1984).
- Breitling, F., Dübel, S. *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1997).
- Brown, T. A. *Gentechnologie für Einsteiger: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1993).
- Brunnert, H. J. Heterologe Expression der Neomycinphosphotransferase Typ II und Entwicklung eines PCR-ELISA für den CaMV35S Promotor zum Nachweis gentechnisch veränderter Lebensmittel. Diplomarbeit. Westfälische Wilhelms-Universität Münster (1997).
- Brunnert, H. J. Quantitative Nachweismethoden für Proteine und DNA aus gentechnisch veränderten Organismen in Lebensmitteln. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2002).
- Brunnert, H. J., Spener, F., Borchers, T. PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup ready soybeans. *Eur Food Res Technol* **213**, 366-371 (2001).
- Burbulis, I., Yamaguchi, K., Gordon, A., Carlson, R., Brent, R. Using protein-DNA chimeras to detect and count small numbers of molecules. *Nat Methods* **2**, 31-37 (2005).
- Cabilly, S., Riggs, A. D., Pande, H., Shively, J. E., Holmes, W. E. et al. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3273-3277 (1984).
- Callens, M., De Clercq, K. Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J Virol Methods* **77**, 87-99 (1999).
- Canepari, P., Di Stefano, C. F., Lleo, M. M. Rapid detection of PCR products of hepatitis C virus (HCV) with a non-radioactive oligoprobe. *New Microbiol* **17**, 9-14 (1994).
- Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M. et al. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology (N Y)* **10**, 163-167 (1992).
- Case M., Major G.N., Bassendine M.F., Burt, A. D., The universality of immuno-PCR for ultrasensitive antigen detection. *Biochem Soc Trans* **25**, 374 (1997).
- Cattani, P., Plaisant, P., Manzara, S., Capodicasa, N., Burioni, R. et al. Cloning and characterization of human recombinant antibody Fab fragments specific for types 1 and 2 herpes simplex virus. *New Microbiol* **18**, 135-142 (1995).
- Chalet, L., Wolf, F. J. The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomycetes. *Arch Biochem Biophys* **106**, 1-5 (1964).
- Chang, T. C., Huang, S. H. A modified immuno-polymerase chain reaction for the detection of beta-glucuronidase from *Escherichia coli*. *J Immunol Methods* **208**, 35-42 (1997).

- Chen, L., Li, G., Tang, L. et al. The inhibition of lung cancer cell growth by intracellular immunization with LC-1 ScFv. *Cell Research* **12**, 47-54 (2002).
- Cheng, L., Liu, A., Yang, J., Dong, Y., Li, L. et al. Construction, expression and characterization of the engineered antibody against tumor surface antigen, p185(c-erbB-2). *Cell Research* **13**, 35-48 (2003).
- Chester, K. A., Robson, L., Keep, P. A., Pedley, R. B., Boden, J. A. et al. Production and tumour-binding characterization of a chimeric anti-CEA Fab expressed in *Escherichia coli*. *Int J Cancer* **57**, 67-72 (1994).
- Chinsangaram, J., Akita, G. Y., Castro, A. E., Osburn, B. I. PCR detection of group A bovine rotaviruses in feces. *J Vet Diagn Invest* **5**, 516-521 (1993).
- Cho, S. N., van der Vliet, G. M., Park, S., Baik, S. H., Kim, S. K. et al. Colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of amplified Mycobacterium tuberculosis DNA from sputum samples. *J Clin Microbiol* **33**, 752-754 (1995).
- Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159 (1987).
- Chothia, C., Lesk, A. M., Gerhardi, E., Tomlinson, i. M., Walter, G. et al. Structural repertoire of the human V_H segments. *J Mol Biol* **227**, 799-817 (1992).
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-628 (1991).
- Clark, M. *Monoclonal antibodies: principles and applications*. John Wiley & Sons Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore (1995).
- Clark, M. A., Hammond, F. R., Papaioannou, A., Hawkins, N. J., Ward, R. L. Regulation and expression of human Fabs under the control of the *Escherichia coli* arabinose promoter, PBAD. *Immunotechnology* **3**, 217-226 (1997).
- Clarke, S., Huppi, K., Ruezinsky, D., Staudt, L., Gerhard, W. et al. Inter- and intraclonal diversity in the antibody response to influenza hemagglutinin. *J Exp Med* **161**, 687-704 (1985).
- Co, M. S., Deschamps, M., Whitley, R. J., Queen, C. Humanized antibodies for antiviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2869-2873 (1991).
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69** (1972).
- Conrath, N., Gründig, B., Hüwel, S., Cammann, K. *Anal Chim Acta* **309**, 47-52 (1995).
- Cournoyer, D., Beauchemin, N., Boucher, D., Benchimol, S., Fuks, A. et al. Transcription of genes of the carcinoembryonic antigen family in malignant and nonmalignant human tissues. *Cancer Res* **48**, 3153-3257 (1988).
- Courtney, B. C., Smith, M. M., Henchal, E. A. Development of internal controls for probe-based nucleic acid diagnostic assays. *Anal Biochem* **270**, 249-256 (1999).
- Crews, S., Griffin, J., Huang, H., Calame, K., Hood, L. A single V_H gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: somatic mutation is correlated with the class of the antibody. *Cell* **25**, 59-66 (1981).

- Crowther, J. R. ELISA. Theory and practice. *Methods Mol Biol* **42**, 1-218 (1995).
- Dall'Acqua, W., Carter, P. Antibody engineering. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 443-50 (1998).
- Decanniere, K., Desmyter, A., Lauwereys, M., Ghahroudi, M. A., Muyldermans, S. et al. A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure* **7**, 361-370 (1999).
- Deisenhofer, J., Colman, P. M., Epp, O., Huber, R. Crystallographic structural studies of a human Fc fragment. II. A complete model based on a Fourier map at 3.5 Å resolution. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **357**, 1421-1434 (1976).
- Deng, X., Nesbit, L., Morrow, K. J. Recombinant single-chain variable fragment antibodies directed against *Clostridium difficile* toxin B produced by use of an optimized phage display system. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 587-595 (2003).
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S. et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* **14**, 457-460 (1996).
- Diamandis, E. P. in *Immunoassay* (ed. Christopoulos, T. K.) Academic Press, San Diego, CA (1996).
- Doudoroff, M. *The Enzymes* (ed. Boyer, P. D.) Academic Press, New York, London (1961).
- Dübel, S., Rohrbach, P., Schmiedl, A. Rekombinante Antikörper: Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? *Biologie in unserer Zeit* **34**, 372-379 (2004).
- Dübel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Zewe, M., Gotter, S. et al. Isolation of IgG antibody F_v-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers. *J Immunol Methods* **178**, 89-95 (1994).
- Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A. et al. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J Immunol Methods* **178**, 201-209 (1995).
- Duenas, M., Ayala, M., Vazquez, J., Ohlin, M., Soderlind, E. et al. A point mutation in a murine immunoglobulin V-region strongly influences antibody yield in *Escherichia Coli*. *Gene* **158**, 61-66 (1995).
- Duffy, M. J., van Dalen, A., Haglund, C., al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer. European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* **39**, 718-727 (2003).
- Dufour, V., Arnauld, C., Lantz, O., Peguillet, I., Morvilliers, K. et al. Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection. *J Immunol Methods* **229**, 49-60 (1999).
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L. An immunoglobulin heavy chain variable region is generated from three segments of DNA: V_H, D and J_H. *Cell* **19**, 981-992 (1980).
- Early, P., Nottenburg, C., Weissman, I., Hood, L. Immunoglobulin gene rearrangements in normal mouse B cells. *Mol Cell Biol* **2**, 829-836 (1982).

- Edelman, G. M. The covalent structure of the human gamma-immunoglobulin. XI. Functional Implications. *Biochemistry* **9**, 3197 (1970).
- Edelman, G. M., Poulik, M. D. Studies on structural units of the gamma-globulins. *J Exp Med* **113**, 861-884 (1961).
- Egloff, M. P., Uppenberg, J., Haalck, L., van Tilbeurgh, H. Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: unexpected evolutionary relationship with glucoamylases. *Structure* **9**, 689-697 (2001).
- Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. Maltose metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and heterologous expression of the key enzymes, maltose phosphorylase and phosphoglucomutase. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 81-86 (1998).
- Engvall, E., Perlman, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-874 (1971).
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., Bishop, J. M. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-3616 (1985).
- Feldman, K., Hörl, M., Klein, H. W., Helmreich, E. J. *Proc FEBS Meet* **42**, 204-207 (1978).
- Firnges, M. Proteinchemische und molekularbiologische Untersuchung zur Primärstruktur der Maltose Phosphorylase aus *Lactobacillus brevis*. Diplomarbeit. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (1997).
- Fitting, C., Doudoroff, M. Phosphorolysis of maltose by enzyme preparations from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* **199**, 153-163 (1952).
- Fleisher, M., Dnistrian, A. M., Sturgeon, C. M., Lamerz, R., Wittliff, J. L. in *Tumor markers - Physiology, pathobiology, technology and clinical applications* (http://www.nacb.org/LMPG/Monograph_TumorMarkers.pdf) (eds. Diamandis, E. P., Fritsch, H. A., Lilja, H., Chan, D. W. & Schwartz, M. K.) 33-63 (AACCC Press, Washington, 2002).
- Fletcher, R. H. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* **104**, 66-73 (1986).
- Flotho, S. Der Einfluss nutritiver Lipide auf die differentielle Genexpression in humanen Monozyten und Zellkulturmodellen - Untersuchungen mit DNA-Chips und quantitativer PCR. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2005).
- Freyre, F. M., Vázquez, J. E., Ayala, M., Canaán-Haden, L., Bell, H. et al. Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **76**, 157-163 (2000).
- Fujita, T., Sugimoto, N., Oka, S., Yano, I. *Japan Kokai Tokyo Koho* **0278623** (1990).
- Gauhl, H., Seidel, H. α -Amylase determination with bacterial maltose phosphorylase and/or β -phosphoglucomutase. *DE-Patent* 2748036 (1977).
- Gautheret, A., Aubin, J. T., Poirel, L., Chopineau, S., Agut, H. et al. Detection and variant identification of HHV-6 by a non-radioactive hybridization microplate assay for amplimers detection. *J Virol Methods* **58**, 33-40 (1996).
- Gilligan, K., Shipley, M., Stiles, B., Hadfield, T. L., Sofi Ibrahim, M. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Mol Cell Probes* **14**, 71-78 (2000).

- Givol, D. et al. Diversity of germ-line immunoglobulin VH genes. *Nature* **292**, 426-430 (1981).
- Glatz, J. F. C., Kleine, A. H., van Nieuwenhoven, F. A., Hermens, W. T., van Dieijn-Visser, M. P. et al. Fatty-acid-binding protein as plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans. *Br Heart J* **71**, 35-140 (1994).
- Glatz, J. F. C., van Nieuwenhoven, F. A., van Dieijn-Visser, M. P., Hermens, W. T., van der Vusse, G. J. Fatty acid-binding protein and myoglobin as plasma marker for the early assessment of acute myocardial infarction in man. *Tijdschr Ned Ver Klin Chem* **18**, 144-150 (1993).
- Gold, P., Freedman, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* **121**, 439-462 (1965).
- Gonzalez-Martinez, M. A., Puchades, R., Maquieira, A. *Trends Anal Chem* **18**, 204-218 (1999).
- Gram, C. Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin* **2**, 185-189 (1885).
- Green, N. M. Avidin. *Adv Protein Chem* **29**, 85-133 (1975).
- Grimm, C., Geisen, R. A PCR-ELISA for the detection of potential fumonisin producing *Fusarium* species. *Lett Appl Microbiol* **26**, 456-462 (1998).
- Gudgin Dickson, E. F., Pollak, A., Diamandis, E. P. *Pharmac Ther* **66**, 207-235 (1995).
- Guenther, P. C., Hart, C. E. Quantitative, competitive PCR assay for HIV-1 using a microplate-based detection system. *Biotechniques* **24**, 810-816 (1998).
- Gutierrez, R., Garcia, T., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez, P. E. et al. A quantitative PCR-ELISA for the rapid enumeration of bacteria in refrigerated raw milk. *J Appl Microbiol* **83**, 518-523 (1997).
- Hanahan, D. J., Weintraub, S. T., Friedberg, S. J., Tokumura, A., Ayer, D. E. A novel approach to structure proof of glyceryl ether-containing glycerophospholipids. Base-catalyzed methanolysis of platelet-activating factor (AGEPC) at 60 degrees C. *J Lipid Res* **26**, 1345-1355 (1985).
- Hardman, N., Gill, L. L., De Winter, R. F., Wagner, K., Hollis, M. et al. Generation of a mouse-human chimeric antibody directed against human carcinoembryonic antigen. *Int J Cancer* **44**, 424-433 (1989).
- Harris, A., Chang, G., Vadas, M., Gillis, D. ELISA is the superior method for detecting antineutrophil cytoplasmic antibodies in the diagnosis of systemic necrotising vasculitis. *J Clin Pathol* **53**, 644-645 (1999).
- Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., Day, J., Greenwood, A. et al. The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature* **360**, 369-372 (1992).
- Hasemann, C. A., Capra, J. D. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3942-3946 (1990).

- Hata, T., Nishimori, Y., Okochi, Y., Suzuki, Y., Sato, M. et al. *Japan Kokai Tokyo Koho 04290808* (1992).
- Helling, R. B., Goodman, H. M., Boyer, H. W. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **14**, 1235-1244 (1974).
- Hendrickson, E. R., Truby, T. M., Joerger, R. D., Majarian, W. R., Ebersole, R. C. High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **23**, 522-529 (1995).
- Hennecke, F., Krebber, C., Plückthun, A. Non-repetitive single-chain Fv linkers selected by selectively infective phage (SIP) technology. *Protein Eng* **11**, 405-410 (1998).
- Hennion, M. C., Barcelo, D. *Anal Chim Acta* **362**, 3-34 (1998).
- Henterich, N., Osman, A. A., Mendez, E., Mothes, T. Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung* **47**, 345-348 (2003).
- Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76-78 (1989).
- Holtzhauser, M. *Biochemische Labormethoden* (Springer, Berlin, 1997).
- Honjo, T. Immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* **1**, 499-528 (1983).
- Honjo, T., Habu, S. Origin of immune diversity: genetic variation and selection. *Annu Rev Biochem* **54**, 803-830 (1985).
- Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. et al. *Bio/Technology* **6**, 1204-1210 (1988).
- Horton, R. M., Cai, Z. L., Ho, S. N., Pease, L. R. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**, 528-535 (1990).
- Hudson, P. J. Recombinant antibody fragments. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 395-402 (1998).
- Humphreys, D. P., Weir, N., Lawson, A., Mountain, A., Lund, P. A. Co-expression of human protein disulphide isomerase (PDI) can increase the yield of an antibody F_{ab}' fragment expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **380**, 194-197 (1996).
- Huse, W. in *Antibody engineering* (ed. Borrebaeck, C. A. K.) 103-120 (W.H. Freeman and Company, New York, 1992).
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J. et al. 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 (1988).
- Huston, J. S., McCartney, J., Tai, M. S., Mottola-Harshorn, C., Jin, D. et al. Medical applications of single-chain antibodies. *Int Rev Immunol* **10**, 195-217 (1993).
- Hüwel, S. Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis* - Reinigung und Charakterisierung für die Entwicklung eines Einwegsensors zur Bestimmung von ortho-Phosphat. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (1998).

- Hüwel, S., Haalck, L., Conrath, N., Spener, F. Production and stabilization of pure maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis* for sensing inorganic phosphate. *Ann N Y Acad Sci* **799**, 701-706 (1996).
- Hüwel, S., Haalck, L., Conrath, N., Spener, F. Maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: purification, characterization, and application in a biosensor for ortho-phosphate. *Enzyme Microb Technol* **21**, 413-420 (1997).
- Inoue, Y., Ishii, K., Tomita, T., Fukui, F. Purification and characterization of maltose phosphorylase from *Bacillus* sp. RK-1. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 2644-2649 (2001).
- Inoue, Y., Ishii, K., Tomita, T., Yatake, T., Fukui, F. Characterization of trehalose phosphorylase from *Bacillus stearothermophilis* SK-1 and nucleotide sequence of corresponding gene. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 1835-1843 (2002).
- Inoue, Y., Yasutake, N., Oshima, Y., Yamamoto, Y., Tomita, T. et al. Cloning of the maltose phosphorylase gene from *Bacillus* sp. strain RK-1 and efficient production of the cloned gene and the trehalose phosphorylase gene from *Bacillus stearothermophilis* SK-1 in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 2594-2599 (2002).
- Inouye, S., Hondo, R. Microplate hybridization of amplified viral DNA segment. *J Clin Microbiol* **28**, 1469-1472 (1990).
- Irmer, S. Untersuchungen zur Primärstruktur der Maltosephosphorylase aus *Lactobacillus brevis*. Diplomarbeit. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (1996).
- Itakura, K., Rossi, J. J., Wallace, R. B. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu Rev Biochem* **53** (1984).
- Ivnitski, D., Rishpon, J. A one-step, separation-free amperometric enzyme immunosensor. *Biosens Bioelectron* **11**, 409-417 (1996).
- Jacob, F., Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318-356 (1961).
- Jäger, M., Plückthun, A. Folding and assembly of an antibody Fv fragment, a heterodimer stabilized by antigen. *J Mol Biol* **285**, 2005-2019 (1999).
- Jefferey, G. M., Hickey, B. E., Hider, P. in *The Cochrane Library* John Wiley & Sons, Chichester, UK (2004).
- Jenks, B. M., Roeth, F. W., Martin, A. R. Comparison of an enzyme immunoassay with gas chromatography for atrazine determination in water and soil. *Bull Environ Contam Toxicol* **58**, 696-703 (1997).
- Joerger, R. D., Truby, T. M., Hendrickson, E. R., Young, R. M., Ebersole, R. C. Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Clin Chem* **41**, 1371-1377 (1995).
- Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S., Bhakdi, S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *legionellae* in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol* **33**, 1247-1252 (1995).
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522-525 (1986).

- Julesz, J. Radioimmunoassay of the gastrointestinal hormones. *Acta Physiol Acad Sci Hung* **47**, 355-367 (1976).
- Kaartinen, M. et al. Anti-oxazolone hybridomas and the structure of the oxazolone idio type. *J Immun* **130**, 937-945 (1983).
- Kaartinen, M., Griffiths, G. M., Martham, A. F., Milstein, C. *Nature* **304**, 320-324 (1981).
- Kabat, E. A. The structural basis of antibody complementarity. *Adv Protein Chem* **32**, 1-75 (1978).
- Kabat, E. A., Wu, H. C., Reid-Miller, M., Peery, H. M., Gottesman, K. S. *Sequences of proteins of immunological interest* (U.S. Dept. Health and Services, 1987).
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Bilofsky, H. Unusual distributions of amino acids in complementarity-determining (hypervariable) segments of heavy and light chains of immunoglobulins and their possible roles in specificity of antibody-combining sites. *J Biol Chem* **252**, 6609-6616 (1977).
- Kakizaki, E., Yoshida, T., Kawakami, H., Oseto, M., Sakai, T. et al. Detection of bacterial antigens using immuno-PCR. *Lett Appl Microbiol* **23**, 101-103 (1996).
- Kamogawa, A., Fukui, T. Inhibition of -glucan phosphorylase by bisulfite competition at the phosphate binding site. *Biochim Biophys Acta* **302**, 158-166 (1973).
- Kamogawa, A., Yokobayashi, K., Fukui, T. An enzymatic method for the determination of maltose in the presence of other oligosaccharides. *Anal Biochem* **57**, 303-305 (1974).
- Kataoka, T., Miyata, T., Honjo, T. Repetitive sequences in class-switch recombination regions of immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **23**, 357-368 (1981).
- Kato, K., Natsuhara, Y., Oka, S., Yano, I. *Japan Kokai Tokyo Koho* **01207237** (1989).
- Katz, A. M., Rosenthal, D., Sauder, D. Cell adhesion molecules. Structure, function, and implication in a variety of cutaneous and other pathologic conditions. *Int J Dermatol* **30**, 153-160 (1991).
- Ke, X., Warner, C. M. Regulation of Ped gene expression by TAP protein. *J Reprod Immunol* **46**, 1-15 (2000).
- Keller, G. H., Huang, D. P., Shih, J. W., Manak, M. M. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol* **28**, 1411-1416 (1990).
- Kettleborough, C. A., Saldanha, J., Heath, V. J., Morrison, C. J., Bendig, M. M. Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. *Protein Eng* **4**, 773-783 (1991).
- Kim, S. K., Davis, M., Sinn, E., Patten, P., Baltimore, D. *Cell* **27**, 573-581 (1981).
- Kipriyanov, S. M., Dubel, S., Breitling, F., Kontermann, R. E., Heymann, S. et al. Bacterial expression and refolding of single-chain Fv fragments with C-terminal cysteines. *Cell Biophys* **26**, 187-204 (1995).

- Kipriyanov, S. M., Little, M., Kropshofer, H., Breitling, F., Gotter, S. et al. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Eng* **9**, 203-211 (1996).
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Martin, A. C., Kupriyanova, O. A., Little, M. Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Eng* **10**, 445-453 (1997).
- Klein, H. W., Helmreich, E. J. The role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase catalysis. *Curr Top Cell Regul* **26**, 281-294 (1985).
- Klein, H. W., Schlitz, E., Helmreich, E. J. M. in *Cell Proliferation* Cold Spring Harbor Conf. 305-310 (1981).
- Kleine, A. H., Glatz, J. F. C., van Nieuwenhoven, F. A., van der Vusse, G. J. Release of heart type fatty acid binding protein into plasma after acute myocardial infarction in man. *Mol Cell Biochem* **116** (1992).
- Kleinfield, R., Hardy, R. R., Tarlington, D., Dangl, J., Herzenberg, L. A. et al. Recombination between an expressed immunoglobulin heavy-chain gene and a germline variable gene segment in a Ly 1⁺ B-cell lymphoma. *Nature* **322**, 840-842 (1986).
- Kleinfield, R., Weigert, M. Analysis of V_H gene replacement events in a B cell lymphoma. *J Immun* **142**, 4475-4482 (1989).
- Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A., Michel, H. Engineered F_V fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes. *Biotechnology* **13**, 155-160 (1995).
- Knappik, A., Plückthun, A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng* **8**, 81-89 (1995).
- Kodeira, M., Kinahi, T., Umemura, I., Matsuda, F., Noma, T. et al. Organization and evolution of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain. *J Mol Biol* **190**, 529-541 (1986).
- Koga, H., Kanda, H., Nakashima, M., Watanabe, Y., Endo, K. et al. Mouse-human chimeric monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA): in vitro and in vivo activities. *Hybridoma* **9**, 43-56 (1990).
- Kohler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- Koshland, D. E., Jr., Neet, K. E. The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu Rev Biochem* **37**, 359-410 (1968).
- Kuby, J. *Immunology* (Freeman, New York, 1997).
- Kurosawa, Y., Tonegawa, S. Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J Exp Med* **155**, 201-218 (1982).
- Lahijani, R., Duhon, M., Lusby, E., Betita, H., Marquet, M. Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Hum Gene Ther* **9**, 1173-1180 (1998).

- Lamerz, R., Stieber, P. [Tumour markers]. *Dtsch Med Wochenschr* **129**, 2722-2730 (2004).
- Lämmler, H. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Landgraf, A., Reckmann, B., Pingoud, A. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal Biochem* **198**, 86-91 (1991).
- Laskari, D. A., DeRisi, J. L., McCusker, J. H., Namath, A. F., Gentile, C. et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13057-13062 (1997).
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G. et al. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus Lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol* **177**, 7011-7018 (1995).
- Lawler, A. M. Adult B-cell repertoire is biased toward two heavy-chain variable region genes that rearrange frequently in fetal pre-B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2454-2458 (1987).
- Lefebvre, B., Formstecher, P., Lefebvre, P. Improvement of the gene splicing overlap (SOE) method. *Biotechniques* **19**, 186-188 (1995).
- LeGall, F., Kipriyanov, S. M. Di-, Tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on binding. *FEBS Lett* **453**, 164-168 (1999).
- Lehman, C. M., Sarago, C., Nasim, S., Comerford, J., Karcher, D. S. et al. Comparison of PCR with southern hybridization for the routine detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Am J Clin Pathol* **103**, 171-176 (1995).
- Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J., Wilcox, G. Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol* **169**, 4379-4383 (1987).
- Lettieri, T. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ Health Perspect* **114**, 4-9 (2006).
- Leung, S. O., Dion, A. S., Pellegrini, M. C., Goldenberg, D. M., Hansen, H. J. An extended primer set for PCR amplification of murine kappa variable regions. *Biotechniques* **15**, 286-292 (1993).
- Leusch, H. G., Drzeniek, Z., Marcos-Pusztal, Z., Wagener, C. Binding of *Escherichia Coli* and salmonella strains to members of the carcinoembryonic antigen family: Differential binding inhibition by aromatic α -glycoside of mannose. *Infect Immun* **59**, 2051-2057 (1991).
- Li, J. L., Sugimura, K., Boado, R. J., Lee, H. J., Zhang, C. et al. Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression, and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein. *Protein Engineering* **12**, 787-796 (1999).
- Lichtinghagen, R., Diedrich-Glaubitz, R., von Horsten, B. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs using the polymerase chain reaction: evaluation of detection methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **32**, 161-167 (1994).

- Lilley, G. G., Dolezal, O., Hillyard, C. J., Bernard, C., Hudson, P. J. Recombinant single-chain antibody peptide conjugates expressed in *Escherichia coli* for the rapid diagnosis of HIV. *Immunol Methods* **171**, 211-226 (1994).
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., Lockhart, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**, 20-24 (1999).
- Liu, A. Y., Robinson, R. R., Hellstrom, K. E., Murray, E. D., Jr., Chang, C. P. et al. Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3439-3443 (1987).
- Loh, D. Y., Bothwell, A. L. M., White-Scharff, M. E., Imanishi-Kari, T., Baltimore, D. Molecular basis of a mouse strain-specific anti-hapten response. *Cell* **33**, 85-93 (1983).
- Lovrinovic, M., Seidel, R., Wacker, R., Schroeder, H., Seitz, O. et al. Synthesis of protein-nucleic acid conjugates by expressed protein ligation. *Chem Commun (Camb)*, 822-823 (2003).
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A. et al. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6 (1991).
- MacCallum, R. M., Martin, A. C., Thornton, J. M. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* **262**, 732-745 (1996).
- Maeda, H., Matsushita, S., Eda, Y., Kimachi, K., Tokiyoshi, S. et al. Construction of reshaped human antibodies with HIV-neutralizing activity. *Hum Antibodies Hybridomas* **2**, 124-134 (1991).
- Maia, M., Takahashi, H., Adler, K., Garlick, R. K., Wands, J. R. Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen. *J Virol Methods* **52**, 273-286 (1995).
- Mair, J. Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians. *Crit Rev Clin Lab Sci* **34**, 1-66 (1997).
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A. et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15611-15616 (2006).
- Malby, R. L., Caldwell, J. B., Gruen, L. C., Harley, V. R., Ivancic, N. et al. Recombinant antineuraminidase single chain antibody: expression, characterization, and crystallization in complex with antigen. *Proteins: Struct Funct Genet* **16**, 57-63 (1993).
- Mandel, M., Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**, 159-162 (1970).
- Martineau, P., Jones, P. T., Winter, G. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J Mol Biol* **280** (1998).
- Martlbauer, E., Usleber, E., Schneider, E., Dietrich, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. *Analyst* **119**, 2543-2548 (1994).
- McElhinny, A. S., Exley, G. E., Warner, C. M. Painting Qa-2 onto Ped slow preimplantation embryos increases the rate of cleavage. *Am J Reprod Immunol* **44**, 52-58 (2000).

- McElhinny, A. S., Kadow, N., Warner, C. M. The expression pattern of the Qa-2 antigen in mouse preimplantation embryos and its correlation with the Ped gene phenotype. *Mol Hum Reprod* **4**, 966-971 (1998).
- McKean, D., Bell, M., Potter, M. Mechanisms of antibody diversity: multiple genes encode structurally related mouse kappa variable regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3913-3917 (1978).
- McKie, A., Samuel, D., Cohen, B., Saunders, N. A. A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *J Immunol Methods* **270**, 135-141 (2002).
- McKie, A., Samuel, D., Cohen, B., Saunders, N. A. Development of a quantitative immuno-PCR assay and its use to detect mumps-specific IgG in serum. *J Immunol Methods* **261**, 167-175 (2002).
- Meusel, M., Renneberg, R., Spener, F., Schmitz, G. Development of a heterogeneous amperometric immunosensor for the determination of a polypoprotein E in serum. *Biosens Bioelectron* **10**, 577-586 (1995).
- Mieyal, J. J., Simon, M., Abeles, R. H. Mechanism of action of sucrose phosphorylase. 3. The reaction with water and other alcohols. *J Biol Chem* **247**, 532-542 (1972).
- Molloy, P., Brydon, L., Porter, A.J., Harris, W.J. Separation and concentration of bacteria with immobilized antibody fragments. *J. Appl. Bact.* **78**, 359-365 (1995).
- Morrison, S. L. Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science* **229**, 1202-1207 (1985).
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6851-6855 (1984).
- Movva, N. R., Nakamura, K., Inouye, M. Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **255**, 27-29 (1980).
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273 (1986).
- Murao, S., Nagano, H., Ogura, S., Nishino, T. Enzymatic synthesis of trehalose from maltose. *Agric Biol Chem* **49**, 2113-2118 (1985).
- Mutasa, E., Chwarszczynska, D., Asher, M. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *Phytopathology* **86**, 493-497 (1996).
- Mweene, A. S., Ito, T., Okazaki, K., Ono, E., Shimizu, Y. et al. Development of immuno-PCR for diagnosis of bovine herpesvirus 1 infection. *J Clin Microbiol* **34**, 748-750 (1996).
- Nakane, Y., Okamura, S., Akehira, K., Boku, T., Okusa, T. et al. Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric cancer patients. *Cancer* **73**, 2703-2708 (1994).
- Near, R. I. et al. Expression and rearrangement of homologous immunoglobulin VH genes in two mouse strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2167-2171 (1984).

- Neuberger, M. S. Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *Embo J* **2**, 1373-13738 (1983).
- Neuberger, M. S., Williams, G. T., Fox, R. O. Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature* **312**, 604-608 (1984).
- Neumaier, M., Shively, L., Chen, F. S., Gaida, F. J., Ilgen, C. et al. Cloning of the genes for T84.66, an antibody that has a high specificity and affinity for carcinoembryonic antigen, and expression of chimeric human/mouse T84.66 genes in myeloma and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* **50**, 2128-2134 (1990).
- Nicholls, P. J., Johnson, V. G., Blanford, M. D., Andrew, S. M. An improved method for generating single-chain antibodies from hybridomas. *J Immunol Methods* **165**, 81-91 (1993).
- Niemeyer, C. M., Adler, M., Blohm, D. Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates. *Anal Biochem* **246**, 140-145 (1997).
- Niemeyer, C. M., Adler, M., Wacker, R. Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends in Biotechnology* **23**, 208-216 (2005).
- Niemeyer, C. M., Blohm, D. *Nachr Tech Lab* **44** (1996).
- Nilsson, U., Radstrom, P. Genetic localization and regulation of the maltose phosphorylase gene, *malP*, in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **147**, 1565-1573 (2001).
- Northover, J. Carcinoembryonic antigen and recurrent colorectal cancer. *Gut* **27**, 117-122 (1986).
- Nuttall, S. D., Rousch, M. J., Irving, R. A., Hufton, S. E., Hoogenboom, H. R. et al. Design and expression of soluble CTLA-4 variable domain as a scaffold for the display of functional polypeptides. *Proteins* **36**, 217-227 (1999).
- O'Callaghan, E. M., Tanner, M. S., Boulnois, G. J. Development of a PCR probe test for identifying *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia*. *J Clin Pathol* **47**, 222-226 (1994).
- Ochi, A., Hawley, R. G., Hawley, T., Shulman, M. J., Traunecker, A. et al. Functional immunoglobulin M production after transfection of cloned immunoglobulin heavy and light chain genes into lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6351-6355 (1983).
- Ochman, H., Gerber, A. S., Hartl, D. L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621 (1988).
- Ochman, H., Medhora, M. M., Garza, D., Hartl, D. L. in *PCR protocols, A guide to methods and applications* (eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J.) 219-227 (Academic Press, San Diego, California, 1990).
- O'Daly, J. P., Zhao, J., Brown, P. A., Henkens, R. W. Electrochemical enzyme immunoassay for detection of toxic substances. *Enzyme Microb Technol* **14**, 299-302 (1992).

- Ohkaru, Y., Asayama, K., Ishii, H., Nishimura, S., Sunahara, N. et al. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of human heart type fatty acid-binding protein in plasma and urine by using two different monoclonal antibodies specific for human heart fatty acid-binding protein. *J Immunol Methods* **178**, 99-111 (1995).
- Oi, V. T., Morrison, S. L., Herzenberg, L. A., Berg, P. Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 825-829 (1983).
- Oikawa, S., Inuzuka, C., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Kosaki, G. et al. Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHA cell surface: homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 39-45 (1989).
- Orlandi, R., Güssow, D. H., Jones, P. T., Winter, G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3833-3837 (1989).
- Palm, D., Klein, H. W., Schinzel, R., Buehner, M., Helmreich, E. J. M. The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* **29** (1990).
- Pantoliano, M. W., Bird, R. E., Johnson, S., Asel, E. D., Dodd, S. W. et al. Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**, 10117-10125 (1991).
- Pearce, L. A., Oddie, G. W., Coia, G., Kortt, A. A., Hudson, P. J. et al. Linear gene fusions of antibody fragments with streptavidin can be linked to biotin labelled secondary molecules to form bispecific reagents. *Biochem Mol Biol Int* **42**, 1179-1188 (1997).
- Pharmacia. *Färbemethoden für Gelelektrophorese-Gele* Pharmacia, Freiburg (1992).
- Poggi Pollini, C., Gionchedi, L., Bissani, R. Specific detection of D- and M-isolates of plum pox virus by immunoenzymatic determination of PCR products. *J Virol Methods* **67**, 127-133 (1997).
- Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P. et al. Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3305-3310 (1973).
- Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* **73**, 119-126 (1959).
- Porter, R. R., Press, E. M. Immunochemistry. *Annu Rev Biochem* **31**, 625-652 (1962).
- Poudrier, S. M., Oyen, M. T. Stable reagent and kinetic assay for α -amylase *Patent* (Beckman Instruments Inc., USA, 1991).
- Powell, C. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology* **77**, 306-309 (1987).
- Qian, N., Stanley, G. A., Hahn-Hägerdal, B., Radstrom, P. Purification and characterization of two phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* and their regulation in maltose and glucose-utilizing cells. *J Bacteriol* **176**, 5304-5311 (1994).

- Qian, N., Stanley, G. A., Radstrom, P. Product formation and phosphoglucomutase activities in *Lactococcus lactis*: cloning and characterization of a novel phosphoglucomutase gene. *Microbiology* **143**, 855-865 (1997).
- Queen, C., Schneider, W. P., Selick, H. E., Payne, P. W., Landolfi, N. F. et al. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 10029-10033 (1989).
- Quijada, L. et al. Detection of major histocompatibility complex class I antigens on the surface of a single murine blastocyst by immuno-PCR. *Biotechniques* **23**, 990-662 (1997).
- Rabbany, S. Y., Donner, B. L., Ligler, F. S. Optical immunosensors. *Crit Rev Biomed Eng* **22**, 307-346 (1994).
- Reiter, W., Stieber, P., et al. Preoperative levels of CEA and CA 19-9 and their prognostic significance in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* **17**, 2935-2938 (1997).
- Reiter, W., Stieber, P., Krämling, H. J. et al. Prognostische Faktoren bei Patienten mit Magenkarzinom - eine univariate und multivariate statistische Analyse klinischer und klinisch-chemischer Daten. *J Lab Med* **20**, 470-474 (1996).
- Ren, J., Chen, Z., Juan, S. J., Yong, X. Y., Pan, B. R. et al. Detection of circulating gastric carcinoma-associated antigen MG7-Ag in human sera using an established single determinant immuno-polymerase chain reaction technique. *Cancer* **88**, 280-285 (2000).
- Ren, J., Ge, L., Li, Y., Bai, J., Liu, W. C. et al. Detection of circulating CEA molecules in human sera and leukopheresis of peripheral blood stem cells with *E. coli* expressed bispecific CEAScFv-streptavidin fusion protein-based immuno-PCR technique. *Ann N Y Acad Sci* **945**, 116-118 (2001).
- Reth, M., Gehrmann, P., Petrac, E., Wiese, P. A novel V_H to V_HDJ_H joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* **322**, 840-842 (1986).
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323-327 (1988).
- Ritzler, M., Altwegg, M. Sensitivity and specificity of a commercially available enzyme-linked immunoassay for the detection of polymerase chain reaction amplified DNA. *J Microbiol Methods* **27**, 233-238 (1996).
- Robinson, C. R., Sauer, R. T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5929-5934 (1998).
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.K. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, N.Y. (1991).
- Rojas, M., Fuks, A., Stanners, C. P. Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca²⁺-dependent intercellular adhesion molecule. *J Biol Chem* **266**, 309-315 (1990).
- Rosen, M., Chan, L., Ceart, R. W., Anthone, G. Follow-up of colorectal cancer: a meta-analysis. *Dis Colon Rectum* **40**, 1116-1126 (1998).

- Roymans, R. T., Onland, G., Postma, B. H. One-day detection of PCR amplified *Chlamydia trachomatis* DNA in clinical samples: ELISA versus Southern blot hybridisation. *J Clin Pathol* **49**, 581-583 (1996).
- Ruzicka, V., Marz, W., Russ, A., Gross, W. Immuno-PCR with a commercially available avidin system. *Science* **260**, 698-699 (1993).
- Sabbatini, A. R., Werner, P. A., Guha, C., Paddock, G. V., Galbraith, R. M. The vitamin D-binding protein gene: quantitation of amplified nucleic acids by ELISA. *Biotechniques* **15**, 706-713 (1993).
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354 (1985).
- Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., Tonegawa, S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* **280**, 288 (1979).
- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M., Tonegawa, S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy chain genes. *Nature* **290**, 562 (1981).
- Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W., Tonegawa, S. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* **286**, 676-683 (1980).
- Sakrauski, A., Weber, B., Kessler, H. H., Pierer, K., Doerr, H. W. Comparison of two hybridization assays for the rapid detection of PCR amplified HSV genome sequences from cerebrospinal fluid. *J Virol Methods* **50**, 175-184 (1994).
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
- Sanchez, L., Ayala, M., Freyre, F. M., Pedroso, I., Bell, H. et al. High cytoplasmic expression in *E. coli*, purification, in vitro refolding of a single chain F_V antibody fragment against the hepatitis B surface antigen. *J Biotechnol* **72**, 13-20 (1999).
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467 (1977).
- Sanna, P. P., Weiss, F., Samson, M. E., Bloom, F. E., Pich, E. M. Rapid induction of tumor necrosis factor alpha in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 272-275 (1995).
- Sano, T., Cantor, C. A streptavidin-protein A chimera that allows one-step production of a variety of specific antibody conjugates. *Biotechnology (N Y)* **9**, 1378-1381 (1991).
- Sano, T., Pandori, M., Chen, X., Smith, C., Cantor, C. Recombinant core streptavidins. A minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *J Biol Chem* **270**, 28204-28209 (1995).
- Sano, T., Smith, C. L., Cantor, C. R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* **258**, 120-122 (1992).

- Sano, T., Smith, C. L., Cantor, C. R. A streptavidin mutant containing a cysteine stretch that facilitates production of a variety of specific streptavidin conjugates. *Biotechnology (N Y)* **11**, 201-206 (1993).
- Sauter, S. I., Rutherford, S. M., Wagener, C., Shively, J. E., Hefta, S. A. Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type I fimbriae from *Escherichia coli* on non-specific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. *J Biol Chem* **268**, 15510-15516 (1993).
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
- Scheu, P., Gasch, A., Berghof, K. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA. *Lett Appl Microbiol* **29**, 416-420 (1999).
- Schiff, C., Milili, M., Fougereau, M. Functional and pseudogenes are similarly organized and may equally contribute to the extensive antibody diversity of the IgVHII family. *Embo J* **4**, 1225-1230 (1985).
- Schmengler, K. Herstellung und Einsatz von rekombinanten Antikörperfragmenten und rekombinanter Merrettich-Peroxidase in der Immunanalytik. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität Münster (2000).
- Schmidt, T. G., Skerra, A. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig F_V fragment. *Protein Eng* **6**, 109-122 (1993).
- Schnee, J. M., Runge, M. S., Matsueda, G. R., Hudson, N. W., Seidman, J. G. et al. Construction and expression of a recombinant antibody-targeted plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6904-6908 (1987).
- Schobel, U., Barzen, C., Gauglitz, G. Immunoanalytical techniques for pesticide monitoring based on fluorescence detection. *Fresenius J Anal Chem* **366**, 646-658 (2000).
- Schonfelder, M., Adams, G., Maiss, F. Detection of plum pox polyvirus by DNA enzyme immunoassay. *Acta Horti* **386**, 391-395 (1995).
- Schreiber, A., Feldbrügge, R., Key, G., Glatz, J. F. C., Spener, F. An immunosensor based on disposable electrodes for rapid estimation of fatty acid-binding protein, an early marker of myocardial infarction. *Biosensors Bioelectron* **12**, 1131-1137 (1997).
- Schreiber, A., Specht, B., Pelsers, M. M., Glatz, J. F., Borchers, T. et al. Recombinant human heart-type fatty acid-binding protein as standard in immunochemical assays. *Clin Chem Lab Med* **36**, 283-288 (1998).
- Schreiber, G. A. Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. *Food Control* **10**, 351-352 (1999).
- Scott, D. A., Coulter, W. A., Biagioni, P. A., O'Neill, H. O., Lamey, P. J. Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescence herpes labialis. *J Oral Pathol Med* **26**, 305-309 (1997).

- Searle, S. J., Pedersen, J. T., Henry, A. H., Webster, D. M. Antibody structure and function, in: *Antibody engineering* (ed. Borreback, C. A. K.) (Oxford University Press, Inc., New York, 1995).
- Selinger, Z., Schramm, M. Enzymatic synthesis of the maltose analogues, glucosyl glucosamine, glucosyl N-acetyl-glucosamine and glucosyl 2-deoxyglucose by an extract of *Neisseria perflava*. *J Biol Chem* **236**, 2183-2185 (1961).
- Shalaby, M. R., Shepard, H. M., Presta, L., Rodrigues, M. L., Beverley, P. C. et al. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med* **175**, 217-225 (1992).
- Sharon, J., Gefter, M. L., Manser, T., Morrison, S. L., Oi, V. T. et al. Expression of a VHC kappa chimaeric protein in mouse myeloma cells. *Nature* **309**, 364-367 (1984).
- Shawar, R. M., el-Zaatari, F. A., Nataraj, A., Clarridge, J. E. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. *J Clin Microbiol* **31**, 61-65 (1993).
- Shirokane, Y., Ichikawa, K., Suzuki, M. A novel enzymatic determination of maltose. *Carbohydr Res* **329**, 699-702 (2000).
- Shore, D., Langowski, J., Baldwin, R. L. DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4833 (1981).
- Siebert, P. D., Larrick, J. W. Competitive PCR. *Nature* **359**, 557-558 (1992).
- Siegmann-Thoss, C., Renneberg, R., Glatz, J. F. C., Spener, F. *Sensor Actuators B* **30**, 149-155 (1996).
- Silver, J. in *Polymerase chain reaction: a practical approach* (eds. McPherson, M. J., Taylor, G. R. & Quirke, P.) Oxford University Press, New York (1991).
- Silver, J., Keerikatte, V. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J Virol* **63**, 1924-1928 (1989).
- Sims, J. Et al. Somatic mutation in genes for the variable portion of the immunoglobulin heavy chain. *Science* **216**, 309-311 (1982).
- Sims, P. W., Vasser, M., Wong, W. L., Williams, P. M., Meng, Y. G. Immunopolymerase chain reaction using real-time polymerase chain reaction for detection. *Anal Biochem* **281**, 230-232 (2000).
- Skerra, A. Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr Opin Immunol* **5**, 256-262 (1993).
- Skerra, A. A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* **141**, 79-84 (1994).
- Skerra, A. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135 (1994).
- Skerra, A., Plückthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041 (1988).

- Skerra, A., Plückthun, A. Secretion and in vivo folding of the F_{ab} fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Eng* **4**, 971-979 (1991).
- Sohier, D., Coulon, J., Lonvaud-Funel. Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *lactobacillus brevis*. *Int J Syst Bact* **49**, 1075-1081 (1999).
- Somerville, J. E. Jr., Goshorn, S. C., Fell, H. P., Darveau, R. P. Bacterial aspects associated with the expression of a single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 595-603 (1994).
- Soumet, C., Ermel, G., Boutin, P., Boscher, E., Colin, P. Chemiluminescent and colorimetric enzymatic assays for the detection of PCR-amplified *Salmonella* sp. products in microplates. *Biotechniques* **19**, 792-796 (1995).
- Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517 (1975).
- Sperl, J., Paliwal, V., Ramabhadran, R., Nowak, B., Askenase, P. W. Soluble T cell receptors: detection and quantitative assay in fluid phase via ELISA or immuno-PCR. *J Immunol Methods* **186**, 181-194 (1995).
- Spooner, R. A., Murray, S., Rowlinson-Busza, G., Deonarain, M. P., Chu, A. et al. Genetically engineered antibodies for diagnostic pathology. *Hum Pathol* **25**, 606-614 (1994).
- Strausberg, R., Feingold, E. et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16899-16903 (2002).
- Stryer, L. et al. *Biochemie Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York* (2003).
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorf, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol* **185**, 61-89 (1990).
- Sun, L. K., Curtis, P., Rakowicz-Szulczynska, E., Ghrayeb, J., Chang, N. et al. Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 214-218 (1987).
- Tait, R. C., Kado, C. I., Rodriguez, R. L. A comparison of the origin of replication of pSa with R6K. *Mol Gen Genet* **192**, 32-38 (1983).
- Takeda, S., Tsukiji, S., Nagamune, T. Site-specific conjugation of oligonucleotides to the C-terminus of recombinant protein by expressed protein ligation. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 2407-2410 (2004).
- Takkinen, K., Laukkanen, M. L., Sizmann, D., Alfthan, K., Immonen, T. et al. An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Eng* **4**, 837-841 (1991).
- Tanaka, T., Hirota, Y., Sohnia, K. I., Nishimura, S., Kawamura, K. Serum and urinary human heart fatty acid binding protein in acute myocardial infarction. *Clinical Biochem* **24**, 195-201 (1991).

- Tang, Y., Jiang, N., Parakh, C., Hilvert, D. Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *J Biol Chem* **271**, 15682-15686 (1996).
- Tangney, M., Buchanan, C. J., Priest, F. G., Mitchell, W. J. Maltose uptake and its regulation in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **76**, 191-196 (1992).
- Tempest, P. R., Bremner, P., Lambert, M., Taylor, G., Furze, J. M. et al. Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo. *Biotechnology (N Y)* **9**, 266-271 (1991).
- Thomas, P., Toth, C. A., Saini, K. S., Jessup, M., Steele, G. The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochem Biophys Acta* **1032**, 177-189 (1990).
- Thompson, J., Mössinger, S., Reichardt, V., Engels, U., Beauchemin, N. et al. A polymerase chain reaction assay for the specific identification of transcripts encoded by individual CEA gene family members. *Int J Cancer* **55**, 311-319 (1993).
- Thompson, J., Zimmermann, W. The carcinoembryonic antigen gene family structure, expression and evolution. *Tumor Biol* **9**, 63-83 (1988).
- Thompson, J. A., Grunert, F., Zimmermann, W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* **5**, 344-366 (1991).
- Thompson, L. D., Weber, P. C. Construction and expression of a synthetic streptavidin-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene* **136**, 243-246 (1993).
- Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-581 (1983).
- Totsuka, A., Nakakuki, T. *Japan Kokai Tokyo Koho* **062538101** (1994).
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354 (1979).
- Triglia, T., Peterson, M. G., Kemp, D. J. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res* **16**, 8186 (1988).
- Tsiotis, G., Haase, W., Engel, A., Michel, H. Isolation and structural characterization of trimeric cyanobacterial photosystem I complex with the help of recombinant antibody fragments. *Eur J Biochem* **231**, 823-830 (1995).
- Tsumuraya, Y., Brewer, C. F., Hehre, E. J. Substrate-induced activation of maltose-phosphorylase: Interaction with the anomeric hydroxyl group of α -maltose and α -D-glucose controls the enzymes's glucosyltransferase activity. *Arch Biochem Biophys* **281**, 58-65 (1990).
- Turbide, C., Rojas, M., Stanners, C. P., Beauchemin, N. A mouse carcinoembryonic antigen gene family member is a calcium-dependent cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **266**, 309-315 (1991).
- Turner, D. J., Ritter, M. A., George, A. J. Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. *J Immunol Methods* **205**, 43-54 (1997).

- Van Belkum, A., Niesters, H. G. Nucleic acid amplification and related techniques in microbiological diagnostics and epidemiology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**, 615-623 (1995).
- Vekris, A., Bauduer, F., Maillet, S., Bebear, C., Bonnet, J. Improved microplate immunoenzymatic assay of PCR products for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Cell Probes* **9**, 25-31 (1995).
- Venturoli, S., Zerbini, M., La Placa, M. Jr., D'Antuono, A., Negosanti, M. et al. Evaluation of immunoassays for the detection and typing of PCR amplified human papillomavirus DNA. *J Clin Pathol* **51**, 143-148 (1998).
- Verhoeyen, M., Milstein, C., Winter, G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* **239**, 1534-1536 (1988).
- Von Kleist, S., Chavanel, G., Burtin, P. Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69** (1972).
- Ward, E. S., Güssow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., Winter, G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **341**, 544-546 (1989).
- Warsinke, A., Gründig, B. Verfahren zum empfindlichen enzymatischen Nachweis von anorganischem Phosphat *Patent* DE 4227569 (1992).
- Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., Salemme, F. R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **243**, 85-88 (1989).
- Weekes, R., Barker, I., Wood, K. R. An RT-PCR test for the detection of tomato spotted wilt tospovirus incorporating immunocapture and colorimetric estimation. *J Phytopathol* **144**, 575-580 (1996).
- Whitlow, M. Single chain antigen (SCA) binding proteins: Recent results. Proceedings of the meeting "Antibody engineering: new technology & application implications *IBC USA Conferences* San Diego (1990).
- Wilchek, M., Bayer, E. A. Avidin-biotin technology ten years on: has it lived up to its expectations? *Trends Biochem Sci* **14**, 408-412 (1989).
- Wodzig, K. W., Pelsers, M. M., van der Vusse, G. J., Roos, W., Glatz, J. F. One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid-binding protein. *Ann Clin Biochem* **34 (Pt 3)**, 263-268 (1997).
- Wood, B. J., Rainbow, C. The maltophosphorylase of beer *Lactobacilli*. *Biochem J* **78**, 204-209 (1961).
- Wood, C. R., Boss, M. A., Kenten, J. H., Calvert, J. E., Roberts, N. A. et al. The synthesis and in vivo assembly of functional antibodies in yeast. *Nature* **314**, 446-449 (1985).
- Wu, H. C., Huang, Y. L., Lai, S. C., Huang, Y. Y., Shaio, M. F. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett Appl Microbiol* **32**, 321-325 (2001).

- Wu, T. T., Kabat, E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* **132**, 211-250 (1970).
- Wu, T. T., Kabat, E. A. An attempt to locate the non-helical and permissively helical sequences of proteins: application to the variable regions of immunoglobulin light and heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 1501-1506 (1971).
- Xia, J. Q., Yason, C. V., Kibenge, F. S. Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can J Vet Res* **59**, 102-109 (1995).
- Yancopoulos, G., Alt, F. W. Regulation of the assembly expression of variable region genes. *A Rev Immun* **4**, 339-368 (1986).
- Yancopoulos, G. D., Desiderio, S. V., Paskind, M., Kearney, J. F., Baltimore, D. et al. Preferential utilization of the most J_H-proximal V_H gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* **311**, 727-733 (1984).
- Yang, B., Viscidi, R., Yolken, R. Quantitative measurement of nonisotopically labeled polymerase chain reaction product. *Anal Biochem* **213**, 422-425 (1993).
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119 (1985).
- Yao, T., Rechnitz, G. A. Amperometric enzyme-immunosensor based on ferrocene-mediated amplification. *Biosensors* **3**, 307-312 (1987-1988).
- Yoshida, M., Nakamura, N., Horikoshi, K. Production and application of maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase by a strain of *Plesiomonas*. *Oyo Toshitsu Kagaku* **42**, 19-25 (1995).
- Yunis, M. Einsatz der Immun-PCR zur hochempfindlichen und simultanen Bestimmung von Tumormarkern. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2001).
- Zhou, H., Fisher, R. J., Papas, T. S. Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection. *Nucleic Acids Res* **21**, 6038-6039 (1993).
- Zhou, H., Fuks, A., Stanners, C. P. Specificity of intercellular adhesion mediated by various members of immunoglobulin supergene family. *Cell Growth Differ* **1**, 209-215 (1990).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Cammann danke ich für die Möglichkeit, die aktuelle und interessante Fragestellung zu bearbeiten und seine Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Torsten Borchers, dessen engagierte und fachliche Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlich danken möchte ich meinen Laborkollegen/Innen, der Arbeitsgruppe Molekularbiologie für die schöne Laborzeit: Andrea Schreiber, Kai Schmengler, Hans Brunnert, Janine Michel, Viola Podsadlowski und Silke Flotho.

Danken möchte ich weiterhin den Kollegen des Instituts für Chemo- und Biosensorik die für eine großartige Arbeitsatmosphäre sorgten: Eric Frauendorfer, Rainer Feldbrügge, Herman vom Bruch, Lutz Haalk, Carolin Peter, Paul Kemper, Karsten Schult und Mahmud Yunis.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Chemo- und Biosensorik danke ich für die hervorragende interdisziplinäre Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die freundschaftlich-familiäre Atmosphäre. Ich danke besonders den Kollegen, aus denen gute Freunde wurden.

Der StaVi-Clique danke ich für den Ausgleich zum Laboralltag: Hans Brunnert, Ansgar Erlenkötter, Ruth Ferfer, Carsten Gerdemann, Sebastian Horstmann, Kaan Toprak, Markus Kohlhoff, Ralf Dickhut, Nicola Wiethölter, Claudia Wenner, Kerstin Krause und Yvonne Hupka.

Tim Strey und seiner Familie danke ich dafür, dass sie unter allen Umständen zu mir hielten.

Ich danke Gerhard Weinbauer, der mir die Beendigung der Dissertation neben dem Beruf ermöglicht hat. Antje Fuchs und Michael Niehaus danke ich für die seelische Unterstützung während der Zeit in der Firma Covance. Silke Martin für die Hilfe im Kampf um Word und Elvira Vogelwedde danke ich für die wertvollen Tipps zur Bildbearbeitung.

Für Motivation und Unterstützung in der letzten Phase der Doktorarbeit, danke ich besonders Holger Freitag.

