

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Optimierung der Produktion und Aufreinigung von
Antikörperfragmenten**

Bachelorarbeit
im Studiengang B.Sc. Biotechnologie

vorgelegt von

Marie Christin Heim



Hamburg,
01 Juli 2024

Gutachter: Prof. Dr. Christian Kaiser (HAW Hamburg)
Gutachter: Dr. Stephan Kolkenbrock (altona Diagnostics GmbH)

Die Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Firma altona Diagnostics GmbH erstellt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit eigenständig und nur mit Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Sämtliche Stellen dieser Arbeit, die wörtlich oder dem Sinn nach den Publikationen anderer Autoren entnommen wurden, sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder gesamt noch in Teilen veröffentlicht und keinem anderem Prüfungsamt vorgelegt.



Hamburg, 01.07.2024

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	1
I. Abkürzungsverzeichnis.....	4
II. Tabellenverzeichnis	6
III. Abbildungsverzeichnis.....	7
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung.....	9
2.1. Polymerasekettenreaktion	9
2.2. Antikörper und Antikörperfragmente	11
2.3. <i>Inclusionbodies</i>	13
2.3.1. Solubilisierung durch Pufferoptimierung.....	13
2.3.2. <i>On-column Refolding</i>	14
2.3.3. Löslichkeits- <i>Tags</i>	15
3. Material.....	16
3.1. Geräte und Verbrauchsmaterial.....	16
3.2. Chemikalien	18
3.3. Medien und Puffer.....	21
3.4. <i>E. coli</i> Stämme und Plasmide.....	23
3.5. Enzyme, Kits und Software.....	25
4. Methoden	27
4.1. Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
4.2. Transformation	27
4.3. Produktion im Schüttelkolben und Herstellung von Glycerolstocks	27
4.4. SDS-PAGE und Quantifizierung	28
4.5. ELISA	29
4.6. Aufreinigung durch FPLC.....	30
4.7. <i>On-column Refolding</i>	30
4.8. Funktionstest	31
5. Ergebnisse.....	33
5.1. Pufferoptimierung	33
5.1.1. Solubilisierungsmittel	33
5.1.2. Konzentrationsoptimierung.....	35

5.1.3.	pH-Wert.....	35
5.1.4.	Antigenspezifität	36
5.1.5.	Aufreinigung	38
5.2.	<i>Refolding</i> und Löslichkeit- <i>Tag</i>	40
5.2.1.	<i>On-column Refolding</i>	40
5.2.2.	Löslichkeits- <i>Tag</i>	40
5.2.3.	ELISA	41
5.2.4.	Funktionstest	43
6.	Diskussion.....	45
6.1.	Löslichkeit durch Solubilisierungsmittel	45
6.2.	Solubilisierung durch Denaturierung und Löslichkeits- <i>Tag</i>	47
6.3.	Stabilität der Fragmente	49
7.	Fazit und Ausblick	50
8.	Literaturverzeichnis	51
9.	Anhang.....	54

I. Abkürzungsverzeichnis

AU	Absorptionseinheit
BFM	Biofeuchtmasse
C _H	konstante Region, schwere Kette
C _L	konstante Region, leichte Kette
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
g	Schwerebeschleunigung (9,81 m/s ²)
g _{BFM}	zu Beginn der Aufreinigung aufgeschlossene Menge an BFM in g
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
MBP	Maltose-Bindungsprotein
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NDSB	<i>non-detergent sulfobetaines</i>
ocR	<i>on-column Refolding</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RE	Rohextrakt
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
rpm	<i>rounds per minutes</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate-polyacylamide gel electrophoresis</i>

V_H variable Region, schwere Kette

V_L variable Region, leichte Kette

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	16
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	18
Tabelle 4: Verwendete Kultivierungsmedien.....	21
Tabelle 5: Verwendete Puffer	22
Tabelle 6: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	23
Tabelle 7: Verwendete Plasmide.....	25
Tabelle 8: Verwendete Antikörper und Antigene	25
Tabelle 9: Verwendete Enzyme	26
Tabelle 10: Verwendete Kits.....	26
Tabelle 11: Verwendete Softwares	26
Tabelle 12: Reaktionsansatz des Funktionstests	32
Tabelle 13: RFU-Verhältnisse der aufgereinigten Proben	43

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer PCR	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers und scFv-Fragments.....	12
Abbildung 3: Expressionsmuster von <i>E. coli</i> T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 in Lysepuffern mit verschiedenen Zusätzen	34
Abbildung 4: Löslichkeit der scFv-Fragmente bei verschiedenen Konzentrationen NDSB-201	35
Abbildung 5: Konzentration und Absorption der scFv_His6_StrepII-Fragmente in verschiedenen NDSB-Lysepuffern	37
Abbildung 6: Spezifische Absorptionen der scFv_AK-Fragmente im Rohextrakt und im gesamten Aufschluss bei verschiedenen NDSB-Lysepuffern.....	38
Abbildung 7: Expressionsmuster von <i>E. coli</i> T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 nach verschiedenen Aufreinigungsschritten	39
Abbildung 8: Expressionsmuster von <i>E. coli</i> T7 Shuffle Express pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII nach verschiedenen Aufreinigungsschritten.....	41
Abbildung 9: Spezifische Absorptionen der aufgereinigten scFv_AK- und MBP_scFv_His6_StrepII-Fragmente.....	42
Abbildung 10: Funktionstest der aufgereinigten scFv-Fragmente.....	44
Abbildung 11: Chromatogramme der Aufreinigung von scFv_AK in 4 M NDSB-Lysepuffer: Beladung und Elution der Ni-NTA Säule	54
Abbildung 12: Chromatogramme der Aufreinigung von scFv_AK in 4 M NDSB-Lysepuffer: Umpufferung über Entsalzungssäule.....	55
Abbildung 13: Chromatogramm zum <i>on-column Refolding</i> des scFv_AK	55
Abbildung 14: Chromatogramm zur Aufreinigung des MBP-scFv-His6-StreppII über eine Ni-NTA- und Entsalzungssäule	56

1. Zusammenfassung

Die *Hot-Start*-Polymerasekettenreaktion (*Hot-Start-PCR*) ist eine gängige Methode in der diagnostischen Molekularbiologie zum Nachweis von Krankheitserregern. Damit unspezifische Produkte minimiert werden, werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen mit Antikörpern inhibiert. Durch eine initiale Inkubation bei hoher Temperatur werden die Antikörper denaturiert und die Polymerasen freigesetzt, sodass die Amplifikation beginnen kann. Klassischerweise werden Antikörper mit der Hybridoma-Technologie in Zellkulturen hergestellt, um posttranslationale Modifikationen zu gewährleisten. Zellkulturen bringen einen hohen Kosten- und Zeitaufwand mit sich, weshalb eine Produktion in *Escherichia coli* (*E. coli*) bevorzugt wird.

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* ist die Formation von *Inclusionbodies* ein weitverbreitetes Phänomen. In *Inclusionbodies* liegen die Proteine aggregiert, überwiegend fehlgefaltet und ohne biologische Aktivität vor. Nicht immer lässt sich die Aggregation der rekombinanten Proteine verhindern, weshalb verschiedene Methoden zur Gewinnung von nativen Proteinen aus *Inclusionbodies* entwickelt wurden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein scFv-Fragment gegen eine DNA abhängige DNA-Polymerase zu produzieren und aufzureinigen. Die scFvs wurden überwiegend als *Inclusionbodies* produziert, weshalb in dieser Arbeit drei Methoden zur Solubilisierung und Aufreinigung der Antikörperfragmente getestet wurden. Getestet wurden die Solubilisierung durch Solubilisierungsmittel im Lysepuffer, die Solubilisierung durch Fusion eines Löslichkeits-Tags und die Solubilisierung mit *Refolding* durch ein *on-column Refolding*.

Durch die Fusion mit einem Löslichkeits-Tag, sowie mit dem *on-column Refolding* konnten die scFv-Fragmente erfolgreich aufgereinigt werden. Insbesondere der Löslichkeits-Tag führte zu Fragmenten mit stark gesteigerter Antigenbindung. Problematiken traten bei der Stabilität der Fragmente im Lagerpuffer, sowie bei der Inhibierung der Amplifizierfähigkeit der Polymerase auf.

Die Arbeit erbrachte wichtige Erkenntnisse über Problematiken der Produktion von scFv-Fragmenten in *E. coli* und bietet Ansätze für weiteres Vorgehen.

2. Einleitung

2.1. Polymerasekettenreaktion

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich geringste Mengen an Desoxyribonukleinsäure (DNA) *in vitro* amplifizieren. Die Möglichkeit über die Amplifikation verschiedenster Erreger und Krankheiten schnell nachzuweisen und zu identifizieren machte die PCR zu einer der wichtigsten angewandten Methoden der molekularen Diagnostik [1]. Das Prinzip der PCR basiert auf der Amplifikation der DNA durch eine thermostabile Polymerase [1,2]. Im ersten Schritt werden doppelsträngige DNA-Fragmente bei 95°C denaturiert (Abbildung 1). Da die Polymerasen eine freiliegende 3'-Hydroxygruppe benötigen, um die Synthese des neuen Stranges beginnen zu können, wird die Temperatur im anschließenden Schritt so weit gesenkt, dass komplementäre Oligonukleotide, genannt Primer, an die Zielsequenz anlagern können. Die benötigte Temperatur hängt von der Schmelztemperatur der Bindungen zwischen Primer und DNA-Strang ab. Im letzten Schritt erfolgt die Elongation des Stranges, indem die Polymerase komplementäre Nukleotide anfügt [1,2]. Da die Polymerasen die Amplifikation jedoch nicht erst bei ihrer optimalen Arbeitstemperatur starten, sondern bereits bei Raumtemperatur aktiv sind, können unspezifische Nebenprodukte und Primerdimere entstehen. Das Ansetzen der Reaktionen auf Eis ist eine leicht umsetzbarere Methode, um die Aktivität der Polymerasen zu senken und unspezifische Produkte zu verringern. Effizienter und besser kontrollierbarer ist es jedoch, modifizierte Polymerasen, genannt *Hot-Start*-Polymerasen, zu verwenden, die erst mit einer bestimmten Temperatur aktiv werden [1,2]. Die Inaktivierung dieser Polymerasen erfolgt durch die Bindung eines Aptamers oder eines monoklonalen Antikörpers an die aktive Bindungsstelle der Polymerase. Durch eine initiale Inkubation bei hohen Temperaturen, die als *Hot-Start* bezeichnet wird, werden die Inhibitoren denaturiert und setzen die Polymerasen irreversibel frei [3,4].

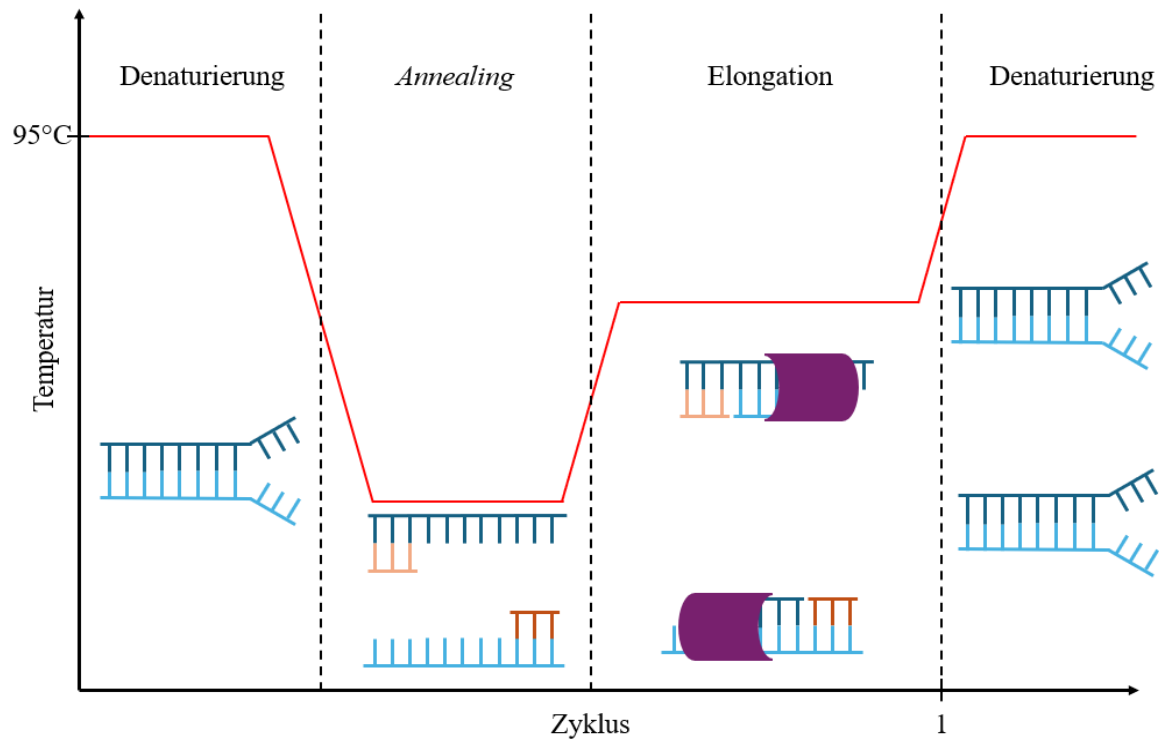


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer PCR Im ersten Schritt eines PCR-Zyklus wird doppelsträngige DNA (blau) denaturiert, indem die Reaktionen auf 95°C erhitzt werden. Im *Annealing* wird die Temperatur der Reaktionen auf die Schmelztemperatur der Primer (orange) gesenkt, sodass diese an die einzelsträngige DNA anlagern können. Im letzten Schritt wird die Temperatur auf die optimale Synthese-Temperatur der DNA-Polymerase (lila) gestellt. Die Polymerase beginnt die Synthese an der freien 3'-OH-Gruppe des Primers. Abbildung erstellt von C. Heim.

2.2. Antikörper und Antikörperfragmente

Die Familie der Antikörper wird in die fünf Isotypen Immunglobulin A, D, E, G und M unterteilt, die sich in ihrer Funktion und ihrem Aufbau unterscheiden [5]. Das Immunglobulin G (IgG) macht mit 75% den größten Anteil der im Serum vorliegenden Antikörper des Säugersystems aus und ist als Teil der spezifischen Immunität von großem Interesse für die Forschung und Diagnostik [6]. IgG ist ein Y-förmiges Heterotetramer aus zwei leichten und zwei schweren Ketten (Abbildung 2), die jeweils in eine konstante und eine variable Domäne unterteilt werden. Die leichte Kette der konstanten Region (C_L) und schwere Kette der konstanten Region (C_H) bilden ein Grundkonstrukt, das sich innerhalb eines Antikörper-Isotypen nicht unterscheidet und die Effektorfunktion der Antikörper bestimmt [7]. Die variablen Domänen (V_L & V_H) unterscheiden sich innerhalb der Antikörperklassen voneinander und bilden die spezifische Bindungsstelle gegen ein Antigen [8]. Ein vollständiger IgG Antikörper wird von insgesamt 16 Disulfidbrücken, davon vier intermolekular und zwölf intramolekular, stabilisiert und an den C_H^1 und C_H^2 Domänen glykosyliert [5]. Da die Glykosylierung auf eine Produktion in Säugerzellen angewiesen ist, werden statt der vollständigen Antikörper vermehrt Fragmente verwendet. Eines der verbreitetsten Fragmente ist das *single chain fragment variable* (scFv) aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette (Abbildung 2). Diese Fragmente benötigen für die Antigenerkennung keine Glykosylierung, weshalb sie auch in prokaryotischen Systemen produziert werden können [6].

Als gut erforschter und einfach modifizierbarer Organismus bietet *E. coli* eine kostengünstige Alternative gegenüber Zellkulturen. Das Cytoplasma von *E. coli* bildet ein reduzierendes Milieu, in welchem Disulfidbrücken schlecht ausgebildet werden können. Hostproteine, die auf die Bildung von Disulfidbrücken angewiesen sind, werden in das oxidierende Milieu des Periplasmas transportiert. Dort liegen zusätzlich katalysierende Disulfidisomerasen vor. Da das Periplasma ein deutlich kleineres Volumen fasst und Peptide mit Signalsequenzen versehen werden müssen, um dort hin transportiert zu werden, wird eine Produktion im Cytoplasma bevorzugt [9]. Um die Bildung von Disulfidbrücken zu vereinfachen, entwickelte J. Lobstein (2012) ein *E. coli* BL21 Derivat mit oxidierendem Cytoplasma und cytoplasmatischer Disulfidisomerase, genannt *E. coli* Shuffle [10]. Das oxidierende Milieu sowie die katalytischen Enzyme bieten ein Umfeld, in dem stabile Disulfidbrücken im Cytoplasma ausgebildet werden können und vermindern so Fehlfaltungen und das Ausfallen der Fragmente als *Inclusionbodies*.

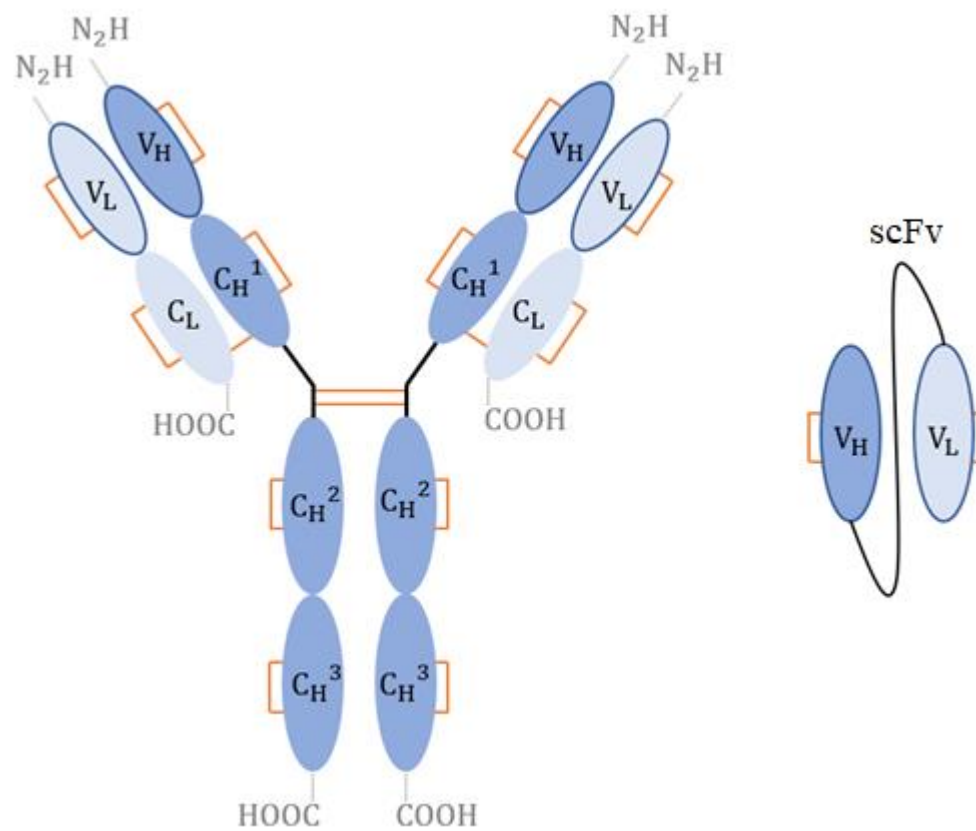


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers und scFv-Fragments
 Dargestellt ist ein IgG Antikörper, bestehend aus zwei Heterodimeren aus schwerer Kette (dunkelblau) mit konstanter (C_H^{1-3}) und variabler Region (V_H), sowie leichter Kette (hellblau) mit konstanter (C_L) und variabler Region (V_L). Verbunden sind die Ketten durch vier intermolekulare Disulfidbrücken (orange) und stabilisiert von zwölf intramolekularen Disulfidbrücken. Die variablen Regionen der Ketten dienen zur Antigenbindung. Im scFv-Fragment liegen allein die variablen Regionen der Ketten, über einen Linker (schwarz) verbunden und durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert, vor. Abbildung erstellt von C. Heim nach [6].

2.3. *Inclusionbodies*

Inclusionbodies sind als Produkt der Expression rekombinanter Gene in *E. coli* ein bekanntes Problem. Hohe Proteinkonzentrationen in der Zelle, sowie fehlende Möglichkeiten zur posttranslationalen Modifizierung führen zu Fehlfaltung und Aggregation der Proteine [11]. Unter optimalen Bedingungen führen hydrophobe Wechselwirkungen dazu, dass lipophile Bereiche freiliegender Polypeptidketten während der Proteinfaltung im Inneren des Proteins eingeschlossen und so vom wässrigen Milieu des Cytoplasmas abgegrenzt werden [12]. Während der Proteinfaltung nehmen die Polypeptidketten eine Vielzahl an unterschiedlichen Konformationen an, bis eine thermodynamisch günstige, stabile Form erreicht wird. Im Optimalfall entspricht dies der nativen Proteinstruktur. Die Faltung beginnt bereits während die Polypeptidsequenzen aus den Ribosomen naszieren. Die dadurch freiliegenden hydrophoben Bereiche tendieren bereits dann dazu sich intra- oder intermolekular aneinander anzulagern, was zu Fehlfaltungen und Aggregation führen kann [13,14]. Begünstigt wird dies, wenn stabilisierende Bindungen wie Disulfidbrücken, falsch oder gar nicht ausgebildet werden. Die hohe Konzentration, die bei der Produktion rekombinanter Proteine in der Zelle erzielt wird, führt zusätzlich dazu, dass sich die Polypeptidketten falsch aneinanderlagern. Ausgehend von einem Aggregationsnukleus werden weitere Sequenzen zu Fehlfaltungen angeregt. Die fehlgefalteten Proteine aggregieren zusammen zu amyloiden oder amorphen Strukturen und fallen als *Inclusionbodies* aus [11,13,15]. Klassische *Inclusionbodies* bestehen zwischen 70% bis 90% aus rekombinanten Proteinen, von denen der Großteil aufgrund der Fehlfaltungen biologisch nicht aktiv ist [13,14,16,17]. Nicht-klassische *Inclusionbodies* haben einen höheren Anteil an nativen Proteinen und eine porösere Struktur als klassische *Inclusionbodies* [17,18]. Um Kosten und Zeit zu sparen, sollte die Bildung von *Inclusionbodies* bereits während der Produktion minimiert werden, indem die Umgebungsbedingungen wie Produktionstemperatur, Induktionsstärke und -zeitpunkt sowie der Produktionsstamm etc. angepasst werden [6,19]. Lassen sich dadurch keine profitablen Mengen an löslichen und aktiven Proteinen erzielen, gibt es verschiedene Strategien aktive Proteine trotz der Bildung von *Inclusionbodies* zu gewinnen.

2.3.1. Solubilisierung durch Pufferoptimierung

Abhängig von der Beschaffenheit der *Inclusionbodies* kann die Konzentration der löslichen Proteine durch das Anpassen des pH-Wertes des Lyse- oder eines Waschpuffers sowie durch den Zusatz nicht denaturierender Solubilisierungsmittel erhöht werden [17,18]. Der pH-Wert nimmt sowohl auf die Dichte der *Inclusionbodies* als auch auf die Löslichkeit der

nativen Proteine Einfluss und sollte daher auf das Zielprotein angepasst werden. Auch eine Behandlung der Proben mit Ultraschall kann einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit der *Inclusionbodies* haben [18]. *Non-detergent sulfobetains* (NDSB) und Lauroyl-Aminosäuren sind schonende Solubilisierungsmittel, die auch in hohen Konzentrationen nicht denaturierend auf die Proteine wirken und durch Dialyse, Verdünnung oder Pufferaustausch einfach entfernt werden können. Darüber hinaus wirken sie stabilisierend auf Intermediate der Proteine und können die Faltung nativer Strukturen unterstützen [20–22]. NDSB-201 und N-Lauroyl-L-Glutaminsäure sind auf Grund ihrer Zwitterionen-Eigenschaft bzw. ihrer hydrophoben Seitenkette dazu fähig, in die amorphen Strukturen der *Inclusionbodies* einzudringen und diese zu lösen. Die Interaktionen der Solubilisierungsmittel mit *Inclusionbodies* beruhen wahrscheinlich auf hydrophoben Wechselwirkungen, die zu temporären Bindungen der Proteine an das Solubilisierungsmittel und daraus folgender Lösung aus den *Inclusionbodies* führen. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht umfassend erschlossen [21,23].

2.3.2. On-column Refolding

Das *on-column Refolding* (ocR) fasst die klassische Herangehensweise an *Inclusionbodies* aus Solubilisierung, Denaturierung, *Refolding* und Aufreinigung in einem Prozess zusammen. Klassischerweise werden *Inclusionbodies* nach der Zelllyse durch Zentrifugation vom Rohextrakt und Zellteilen abgetrennt. Das Pellet wird gewaschen und in einem Solubilisierungspuffer resuspendiert. Solubilisierungspuffer enthalten hohe Konzentrationen an Denaturierungsmitteln, wie Urea und Guanidin Hydrochlorid, sowie Reduktionsmitteln, um die fehlgefalteten Proteine zu denaturieren und in Lösung zu bringen. Anschließend werden die Detergenzien durch Dialyse oder starke Verdünnung entfernt, sodass die Proteine sich neu falten können. Für die Ausbildung von Disulfidbrücken sollten oxidierende Zusätze im *Refolding*-Puffer eingesetzt werden. Anschließend können die Proteine chromatographisch aufgereinigt werden [24,25]. Im *on-column Refolding* werden die bereits denaturierten Proteine im Solubilisierungspuffer auf die Säule aufgetragen. Dort werden sie aufgefangen und mit dem *Refolding*-Puffer umspült. Auf der Säule können hohe Konzentrationen an Proteinen gefaltet und aufgereinigt werden, was Zeit und Ressourcen spart. Zudem sind die einzelnen Proteine räumlich voneinander getrennt, wodurch intermolekulare Bindungen erschwert werden [26,27].

2.3.3. Löslichkeits-*Tags*

Eine weitere Möglichkeit die Löslichkeit der Proteine zu verbessern ist es, die Bildung von *Inclusionbodies* durch Löslichkeits-*Tags* zu verringern. Löslichkeits-*Tags* sind Proteine, die selbst eine gute Löslichkeit besitzen und durch eine Fusion an ein rekombinantes Protein dessen die Löslichkeit erhöhen. Ein häufig verwendeter *Tag* ist das aus *E. coli* stammende Maltose-Bindungsprotein (MBP), das N-terminal über eine Linkersequenz mit dem Zielprotein verbunden wird. Neben der Löslichkeit zeigte sich, dass auch die Faltung des Fusionspartners durch einen MBP-*Tag* verbessert werden kann. Die genauen Mechanismen hinter den Interaktionen zwischen MBP und seinen Fusionspartnern werden noch erforscht. Vermutet wird, dass das MPB ähnlich zu Chaperonen Faltungsintermediate der rekombinanten Proteine stabilisiert, bis eine stabile Form erreicht wird. Je nach Anwendungszweck des Zielproteins muss der *Tag* jedoch abgespalten werden, bevor das Protein eingesetzt werden kann, was einen zusätzlichen Aufwand in der Herstellung bedeutet [28,29].

3. Material

3.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verwendete Geräte Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	HV-50L	HMC Europe
Autoklav	VX-95	Systec
Elektrophoresegerät	Power Source	VWR
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Cell	Tetra Bio-Rad
Entsalzungssäule	HiPrep 26/10	cytiva
Flüssigkeitschromatograph	ÄKTA 150L pure	cytiva
Gefrierschrank, -20°C	-	Bosch
Geldokumentationssystem	Gel Doc EZ	Bio-Rad
Inkubator	HeraTherm™	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank, 4°C	-	Liebherr
Magnetrührer	RH basic 2	IKA
Mehrfachdispenser	Multipipette® M4	Eppendorf
Mikroplatten Reader	Infinite 200 PRO	Tecan
NanoDrop Spektrometer	NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific
Ni-NTA Säule	HisTrap excel, 5 mL	cytiva
pH-Meter	pH 1100L	VWR
Pipetten	2.5 µL/ 10 µL/ 20 µL/ 100 µL/ 200 µL/ 1.000 µL	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy 2	Integra

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
PCR Cycler	CFX96	Bio-Rad
Schüttelinkubator	HAT Multitron Standard	Infors HAT
Schüttelheizblock	BioShake iO	Analytik Jena
Schüttelheizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Sterilwerkbank	HeraSafe TM KS18	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	Biometra TAdvanced	Analytik Jena
Ultraschallhomogenisator	Sonopuls 2000	Bandelin
Ultraschallsonotrode	KE-76	Bandelin
Ultraschallsonotrode	MS-72	Bandelin
Ultratiefkühlschrank, -80°C	HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Instruments
Wippschüttler	PS-M3D	Grant-Bio
Zentrifuge	FV-2400 Micro-Spin	BioSan
Zentrifuge	Pico 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Avanti JXN-26	Beckman Coulter

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatte	High-Profile 96-Well PCR Plates	Bio-Rad
Mikrotiterplatte	96-Wells PS, F-Bottom	Greiner
Pipetten, serologisch	5 mL/ 10 mL/ 25 mL/ 50 mL	Corning
Proteingel, SDS-PAGE	10% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Protein Gels	Bio-Rad
Sterilfilter	Whatman GD/X sterile	cytiva

3.2. Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Name	Spezifikation	Artikelnummer	Hersteller
α -Laktose Monohydrat	Für die Mikrobiologie	6868	Carl Roth
Bovine Serum Albumin Flüssigstandards	2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL	-	altona Diagnostics
Chloramphenicol	20 mg/mL	-	altona Diagnostics
DTBA	100 mM	-	altona Diagnostics
DTT	1 M	-	altona Diagnostics
Glukose	Für die Mikrobiologie	6887	Carl Roth

Name	Spezifikation	Artikelnummer	Hersteller
Glycerol	≥99,5%, für die Molekularbiologie	49767	Sigma-Aldrich
Guanidin Hydrochlorid	≥99,5 %, für die Biochemie	0037	Carl Roth
H ₂ O, Nuklease-frei	Nicht DEPC-behandelt	AM9937	Ambion
Imidazol	≥99%	3899	Carl Roth
IPTG	≥99%, für die Biochemie	2316	Carl Roth
	≥99 %	3899	Carl Roth
Kanamycin	50 mg/mL	-	altona Diagnostics
KH ₂ PO ₄	≥99 %, p.a., ACS	3904	Carl Roth
4x Laemmli Proben Puffer	für SDS-PAGE	1610747	Bio-Rad
L-Arabinose	≥99%, für die Biochemie	5118	Carl Roth
LB-Agar (Lennox)	Für die Molekularbiologie	X965	Carl Roth
LB (Lennox), granuliert	Für die Molekularbiologie	6669	Carl Roth
MgCl ₂	≥99%, wasserfrei	KK36	Carl Roth
NaCl	Für die Molekularbiologie	S3014	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	≥99%, p.a. ACS	P030	Carl Roth
Na ₂ SO ₄	≥99%, p.a., ACS, ISO	8560	Carl Roth

Name	Spezifikation	Artikelnummer	Hersteller
NH ₄ Cl	≥99,5 %, Ph. Eur., USP, BP	P726	Carl Roth
NDSB-201	-	480005	Merck
N-Lauroyl-L-Glutaminsäure	95%	BD144930	BLD Pharmatech Ltd.
PCR-Mastermix	DNA-Mastermix	-	altona Diagnostics
Precision Plus Protein Unstained Standards	Für SDS-PAGE, 250 kDa Leiter	1610363	Bio-Rad
S.O.C. Medium	Rückgewinnungs- medium für <i>E. coli</i>	15544034	Invitrogen
10x TGS	Ready-to-use, El- ektrophorese Laufpuffer	161-0772	Bio-Rad
TRIS	≥99,9 %, Ultra Qualität	5429	Carl Roth
Triton-X 100	Reinst	3051	Carl Roth
Urea	Für die Molekular- biologie	U5378	Sigma-Aldrich

3.3. Medien und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Kultivierungsmedien Verwendet wurden die Medien zur Produktion der Antikörperfragmente im Schüttelkolben, sowie zur Herstellung von Glycerolstocks. Die Zusammensetzung des LB-Mediums bezieht sich auf Flüssigkulturen sowie Agarplatten. Mit * versehene Zusätze wurden abhängig vom kultivierten Stamm verwendet.

Lösung	Zusätze	Konzentrationen
LB-Medium	Glukose	2% (w/v)
	Kanamycin*	50 µg/mL
	Chloramphenicol*	20 µg/mL
LB-M-5052-Medium	M-Lösung	1 x
	5052-Lösung	1 x
	Glukose	2% (v/w)
	L-Arabinose	0,5 mg/mL
	Kanamycin	50 µg/mL
	Chloramphenicol	20 µg/mL
50 x M	Na ₂ HPO ₄	1,25 M
	KH ₂ PO ₄	1,25 M
	NH ₄ Cl	2,5 M
	Na ₂ SO ₄	0,25 M
50 x 5052	Glycerol	25% (v/v)
	Glukose	2,5% (w/v)
	α-Laktose Monohydrat	10% (w/v)

Tabelle 5: Verwendete Puffer Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer.

Lösung	Zusätze	Konzentrationen
<i>FPLC-Aufreinigung:</i>		
Elutionspuffer	Tris/HCl	20 mM
	NaCl	500 mM pH 8,0
Waschpuffer	Tris/HCl	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	300 mM pH 8,0
Lagerpuffer	Tris/HCl	20 mM pH 8,0
Glycerolstammlösung	Glycerol	80% (w/v)
	NaCl	150 mM
	Glucose	20 mM Glucose
2x Laemmli Proben Puffer	DTT	25 mM
	4x Laemmli Proben Puffer	50% (v/v)
Lysepuffer	Tris/HCl	50 mM
	NaCl	20 mM
	MgCl ₂	4 mM
		pH 8,0
<i>On-column Refolding:</i>		
Bindepuffer	Guanidin Hydrochlorid	6 M
	Tris/HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	5 mM
	DTBA	1 mM pH 8,0

Lösung	Zusätze	Konzentrationen
Elutionspuffer	Tris/HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	0,5 M
	DTBA	1 mM
Isolationspuffer	Urea	2 M
	Tris/HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Triton-X 100	2% (v/v) pH 8,0
<i>Refolding</i> -Puffer	Tris/HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	5 mM
	DTBA	1 mM pH 8,0
Resuspensionspuffer	Tris/HCl	20 mM pH 8,0

3.4. *E. coli* Stämme und Plasmide

Tabelle 6: Verwendete *E. coli* Stämme Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Stämme.

Stamm	Genotyp	Spezifikation	Hersteller
<i>E. coli</i> T7 Shuffle Express 30a::scFv_AK pGro7	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon]</i> <i>ompT ahpC gal latt::pNEB3-</i> <i>r1-cDsbC (Spec^R, lacI^q) ΔtrxB</i> <i>sulA11 R(mcr-73::miniTn10--</i> <i>Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10</i> <i>--Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-</i> <i>mrr)114::IS10</i> pET-30a::scFv_AK pGro7	Transformierte Zellen mit scFv- und Chaperon-Plasmid	altona Diagnostics

Stamm	Genotyp	Spezifikation	Hersteller
<i>E. coli</i> T7 Shuffle Express pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal latt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacI^q) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i> pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII	Transformierte Zellen mit MBP-getagtem scFv Fragment	In dieser Arbeit erstellt
<i>E. coli</i> NEB5α pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi1 hsdR17</i> pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII	Glycerol Stocks, Lagerstämme	altona Diagnostics
SHuffle® <i>E. coli</i> T7 Express Competent	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal latt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacI^q) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	Chemisch kompetente Zellen Oxidatives Cytoplasma	New England Biolabs

Tabelle 7: Verwendete Plasmide Die Angaben zum Molekulargewicht der Chaperone wurden dem User Manual [30] entnommen. Die Angaben zu den Antikörper Fragmenten wurden mit Clone Manager (Tabelle 11) berechnet.

Plasmid	Inducer	Tags	Marker	Produkt	Hersteller
pET-30a::scFv_AK	T7-Promotor: Laktose/ IPTG induziert	His ₆ , StrepII	Kanamycin	scFv-Fragment 28,8 kDa	GenScript Biotech Corp
pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII	T7-Promotor: Laktose/ IPTG induziert	His ₆ , StrepII	Kanamycin	scFv-Fragment 71,8 kDa	altona Diagnostics
pGro7	<i>araB</i> -Promotor, L-Arabinose induziert	-	Chloramphenikol	GroEL: 60 kDa GroES: 10 kDa	TaKaRa

3.5. Enzyme, Kits und Software

Tabelle 8: Verwendete Antikörper und Antigene Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Antigene.

Antikörper/Antigen	Spezifikation	Artikelnummer	Hersteller
AK42	Primärer Antikörper	-	██████████
Goat-anti-mouse IgG	HRP Konjugat	R-05071-500	advansta
Strep-Tactin	HRP Konjugat	2-1502-001	IBA
SSBs	0,8 µg/µL	-	altona Diagnostics

Tabelle 9: Verwendete Enzyme Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Enzym	Spezifikation	Artikelnummer	Hersteller
DNA-Polymerase	15 aU/ μ L	-	altona Diagnostics
Turbonuklease	Aus <i>Serratia marcescens</i> , rekombinant, exprimiert in <i>E. coli</i>	T4330	Sigma Aldrich

Tabelle 10: Verwendete Kits Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Kit	Artikelnummer	Hersteller
ELISA Buffer Kit	CNB0011	Thermo Fisher Scientific
GeneJET Plasmid-Miniprep-Kit	K0502	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 11: Verwendete Softwares Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Softwares.

Software	Version	Hersteller
CFX Manager Dx	3.1	Bio-Rad
Clone Manager	11.1	Sci Ed Software
Image Lab	5.2.1	Bio-Rad
Unicorn System Control	7.6	Cytiva

4. Methoden

4.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Plasmidisolierung wurden die benötigten Glycerolstocks der Lagerstämme (Tabelle 6) aufgetaut und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionszusätzen ausgestrichen (Tabelle 4). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dem Zellmaterial der Platten wurde 50 mL LB-Flüssigkultur angeimpft, die für 5 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert wurden. Um die Zellen zu ernten, wurden sie für 2 min bei 6800 x g zentrifugiert. Die Plasmide wurden mit dem GeneJET Plasmid-Miniprep-Kit von Thermo Fisher Scientific (Tabelle 10) aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration und Reinheit mit dem NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

4.2. Transformation

Zur Transformation wurde das *heat shock* Verfahren verwendet [31,32]. Hierfür wurden 50 µL der kompetenten Zellen (Tabelle 6) auf Eis aufgetaut, mit 50 ng Plasmid-DNA (Tabelle 7) vermischt und durch Anschnipsen gemischt. Um den Hitzeschock herbeizuführen, wurden die Zellen zunächst für 30 min auf Eis, in Folge für 30 s bei 42°C und im Anschluss für 5 min erneut auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden 300 µL SOC-Medium (Tabelle 3) zu den Zellen pipettiert, die anschließend für 60 min bei 37°C und 250 rpm auf dem Schüttelheizblock BioShake iO (Analytik Jena) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Selektionsplatten (Tabelle 4) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien der Stämme gepickt, auf neuen LB-Platten mit entsprechenden Selektionszusätzen (Tabelle 4) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

4.3. Produktion im Schüttelkolben und Herstellung von Glycerolstocks

Für die Produktion der scFv-Fragmente wurden 100 µL der Glycerolstocks auf LB-Platten mit benötigten Selektionszusätzen (Tabelle 4) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit dem Zellmaterial der Platten je 400 mL LB-Medium (Tabelle 4) mit entsprechenden Selektions- und Induktionszusätzen (Tabelle 6) in 1 L Kolben angeimpft. Sofern keine Glycerolstocks vorlagen, wurden die Kolben mit dem Zellmaterial der transformierten, gepickten Kolonien angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden zunächst für 4 h bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturen mit 0,5 mM IPTG induziert und für 20 h bei 30°C inkubiert. Für die Ernte der Zellen wurden

die Kulturen für 20 min bei $15.970 \times g$ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Biofeuchtmasse (BFM) in Falcon-Röhrchen entsprechender Größe zur Lagerung bei -20°C überführt.

Um Glycerolstocks zu erstellen, wurden je 5 mL LB-Medium mit Selektionszusatz (Tabelle 4) in 50 mL Falcons mit Zellmaterial der transformierten und gepickten Zellen angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen 1:1 mit 80%-iger (w/v) Glycerolstammllösung (Tabelle 5) vermengt, steril auf 200 μL aliquotiert und anschließend bei -80°C gelagert.

4.4. SDS-PAGE und Quantifizierung

Die *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) wurde verwendet, um die Zellproteine aufzutrennen und in Folge das Antikörper-Fragment in den Proben nachzuweisen und zu quantifizieren [33,34].

Zur Vorbereitung auf die SDS-PAGE wurden je 15 mg BFM in 1 mL Lysepuffer (Tabelle 5) gelöst und anschließend mittels Ultraschalls mit einer Amplitude von 10% für 2 min bei 10 s Puls und 10 s Pause aufgeschlossen. Für Volumina ≤ 5 mL wurde die Sonotrode MS-72 (Bandelin), für größere Volumina die Sonotrode KE-76 (Bandelin) verwendet. Die aufgeschlossene Suspension wurde für 5 min bei $17.000 \times g$ zentrifugiert, um die Zellbestandteile von den Proteinen zu trennen und das Rohextrakt zu gewinnen. Anschließend wurden 10 μL der Probe mit 10 μL 2x Laemmli-Puffer (Tabelle 4) vermischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Sollte das Pellet analysiert werden, wurden 1,5 mg in 10 μL 2x Laemmli-Puffer (Tabelle 4) resuspendiert und unter gleichen Bedingungen behandelt. Von den Proben und Standards wurden je 10 μL pro Tasche auf ein 10%-iges, vorgefertigtes Polyacrylamidgel aufgetragen (Tabelle 2). Als Standard wurde der Precision Plus Protein Unstained Standard von Bio-Rad (Tabelle 3) verwendet. Die SDS-Page lief für 25 min bei 250 V und 75 mA pro Gel. Das Gel wurde mit dem Geldokumentationssystem Gel Doc EZ (Bio-Rad) und der Software Image Lab (Tabelle 11) ausgewertet.

Für die Quantifizierung der Proteine wurden BSA-Standards (Tabelle 3) in den Konzentrationen 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL und 0,25 mg/mL zusammen mit den Proben vorbereitet und auf das Gel aufgetragen. Über Image Lab (Tabelle 11) wurden den Banden quantitative Werte entsprechend ihrer Tryptophangehalte zugewiesen, mit denen eine Standardkurve erstellt wurde. Über die Tryptophangehalte der Antikörperfragmente und die Standardkurve wurde die Konzentration der Fragmente berechnet [35].

4.5. ELISA

Das indirekte *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde verwendet, um die spezifische Bindung der produzierten Antikörpern zu dem Antigen, der DNA-Polymerase (Tabelle 9) zu vergleichen [36,37]. Alle benötigten Lösungen und Puffer stammen aus dem ELISA Puffer Kit von Thermo Scientific (Tabelle 10).

Für die Immobilisierung des Antigens wurde die DNA-Polymerase (Tabelle 9) im Beschichtungspuffer B zu 1 ng/ μ L verdünnt. Je 100 μ L der Verdünnung wurden in ein Well einer 96-Well-Mikroplatte von Greiner (Tabelle 2) pipettiert, die anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Zusätzlich wurden drei Wells mit Einzelstrang-bindenden Proteinen (SSB) (Tabelle 8) mit Strep-Tag beschichtet, die als Positivkontrolle der Bindung des sekundären Antikörpers dienen. Am nächsten Tag wurde der Puffer verworfen und die Wells wurden mit 250 μ L Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde der Blockierungspuffer verworfen und die Platte wurde dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen, zwischen den Schritten wurde die Platte im Puffer für 3 min inkubiert. Nach dem Waschen wurden 100 μ L der 1:1 mit Assay-Puffer versetzten primären Antikörper pro Well aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Als primäre Antikörper wurden Rohextrakte und die gesamten aufgeschlossenen Suspensionen in unbekannter Konzentration, sowie der AK42 (Tabelle 8) in einer Konzentration von 2,07 pg/ μ L verwendet. Der AK42 diente als Positivkontrolle der Bindung gegen die immobilisierte DNA-Polymerase. Auf die Negativ- und SSB-Positivkontrollen wurde ddH₂O aufgetragen. Nach der Inkubation wurden die Lösungen verworfen und die Platte erneut dreimal mit 5 min Inkubationszeit gewaschen. Als sekundärer Antikörper gegen den AK42 wurden 0,032 ng/ μ L Goat-anti-mouse IgG HRP Konjugat von advansta (Tabelle 8) verwendet. Für die übrigen Proben und Kontrollen wurden 0,1 ng/ μ L des Strep-Tactin HPR Konjugats von IBA (Tabelle 8) verwendet. Beide Konjugate wurden mit dem Assay-Puffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Es wurden 100 μ L pro Well aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper verworfen die Platte erneut dreimal mit 5 min Inkubationszeit gewaschen. 100 μ L des Tetramethylbenzidin Farbsubstrats wurden pro Well hinzu pipettiert. Nach 5 min wurde die Reaktion mit 100 μ L der Stopplösung pro Well gestoppt. Das Signal wurde bei 450 nm und 620 nm im Infinite 200 Pro (Tecan) gemessen. Die AU₆₂₀ wurde von der AU₄₅₀ abgezogen, um die Absorption des

Hintergrunds herauszurechnen. Die Nachweisgrenze wurde als dreifaches der Standardabweichung der Negativkontrolle plus die Absorption der Negativkontrolle definiert.

4.6. Aufreinigung durch FPLC

Die *fast protein liquid chromatography* (FPLC) über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Säule (Ni-NTA) wurde genutzt um die His₆-getaggten scFv-Fragmente aus dem Rohextrakt aufzureinigen [38,39].

Zunächst wurde BFM in 5 mL/g Lysepuffer (Tabelle 5) resuspendiert und mit dem Hochdruckhomogenisator Panda PLUS 2000 (Gea) bei 800 bar für 1 min / 100 mL aufgeschlossen. Abhängig von den Proben wurden die Suspensionen zusätzlich mit Ultraschall (KE-76, Bandelin) mit einer Amplitude von 10% bei 10 s Impuls und 10 s Pause für 2 min behandelt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit 2,5 µL Turbonuklease (Tabelle 9) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 600 mM NaCl versetzt und bei 24.000 x g für 15 min zentrifugiert. Vor der Aufreinigung wurden Schwebstoffe und restliche Mikroorganismen über Sterilfilter (Tabelle 2) entfernt. Während der Vorbereitung der Proben wurden nach verschiedenen Stritten 1 mL flüssige oder 15 mg feste Proben genommen, um den Verlust an Fragmenten beurteilen zu können.

Für die Aufreinigung über die ÄKTA 150L pure (cytiva) wurde abwechselnd ein Säulenvolumen an Rohextrakt auf die 5 mL Ni-NTA Säule HisTrap excel (cytiva) aufgetragen und mit Waschpuffer (Tabelle 5) gespült, bis die Probe vollständig aufgetragen wurde. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit dem Elutionspuffer (Tabelle 5) von der Ni-NTA Säule eluiert und über die 53 mL Entsalzungssäule HiPrep 26/10 (cytiva) in den Lagerpuffer (Tabelle 5) umgepuffert. Ein Teil des Eluats wurde in 50% Glycerol (Tabelle 3) bei -20°C gelagert, die verbliebende Menge im Lagerpuffer bei 4°C.

4.7. On-column Refolding

Das *on-Column Refolding* wurde verwendet, um die Aufreinigung der scFv-Fragmente zu verbessern und die Ausbeute an funktionellen Antikörpern zu erhöhen [27,40].

Zunächst wurde die BFM in 10 mL/g Resuspensionspuffer (Tabelle 5) resuspendiert und mit dem Hochdruckhomogenisator Panda PLUS 2000 (Gea) bei 800 bar für 1 min/100 mL aufgeschlossen. Die Suspension wurde für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert, woraufhin der Überstand verworfen und das Pellet in 7,5 mL/g_{BFM} Isolationspuffer (Tabelle 5) resuspendiert wurde. Die Suspension wurde mit Ultraschall bei einer Amplitude von 10% für 2 min mit 10 s Puls und 10 s Pause behandelt. Verwendet wurde die Sonotrode KE-76

(Bandelin). Anschließend wurde die aufgeschlossene Suspension für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Die Resuspension des Pellets im Isolationspuffer (Tabelle 5) und die Behandlung mit Ultraschall wurden unter gleichen Bedingungen wiederholt und die Suspension wurde erneut für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12,5 mL/g_{BFM} Bindepuffer für 1 h auf dem Magnetrührer RH basic 2 (IKA) resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension für 15 min bei 24.000 x g zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit Sterilfiltern (Tabelle 2) filtriert.

Zur Aufreinigung über die ÄKTA 150L pure (cytiva) wurde abwechselnd ein Säulenvolumen auf die 5 mL Ni-NTA Säule HisTrap excel (cytiva) aufgetragen und mit Bindepuffer (Tabelle 5) gespült, bis die Probe vollständig aufgetragen wurde. Anschließend wurde die Säule mit einem Gradienten aus Bindepuffer und *Refolding*-Puffer (Tabelle 5) für 15 min gespült bis 100% *Refolding*-Puffer (Tabelle 5) erreicht waren. Anschließend wurden vier Säulenvolumen mit dem *Refolding*-Puffer gespült. Eluiert wurde mit dem Elutionspuffer (Tabelle 5). Anschließend wurde die Probe über die 53 mL Entsalzungssäule HiPrep 26/10 (cytiva) in den Lagerpuffer (Tabelle 5) umgepuffert. Ein Teil des Eluats wurde in 50% Glycerol (Tabelle 3) bei -20°C gelagert, die verbliebende Menge im Lagerpuffer bei 4°C.

4.8. Funktionstest

Um die Funktionalität der aufgereinigten Fragmente in ihrer Anwendung als Inhibitor der DNA-Polymerase zu testen, wurden ein Funktionstest in Form einer Hot-Start-PCR [41,42] durchgeführt.

Die Reaktionen wurden nach Tabelle 12 angesetzt. Die Proben wurden in Triplikaten in Reihe A und H einer 96-well-Platte von Bio-Rad (Tabelle 2) überführt. Im Cycler CFX96 (Bio-Rad) wurde Reihe A wurden die Proben zur Aktivierung der DNA-Polymerase für 5 min bei 74°C und Reihe H als Negativkontrolle bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde isothermal bei 50°C für 120 Zyklen á 1 min inkubiert. Nach jedem Zyklus wurden die *relative fluorescence units* (RFU) gemessen. Ausführlichere Details unterliegen dem Firmenteilnahmegeheimnis.

Tabelle 12: Reaktionsansatz des Funktionstests Die Komponenten sind in Tabelle 3, Tabelle 8 und Tabelle 9 zu finden.

Komponente	Konzentration / Volumen
PCR-Mastermix	40 $\mu\text{L}/\text{rxn}$
DNA-Polymerase	0,2 $\mu\text{g}/\text{rxn}$
Antikörperfragment	0,25 $\mu\text{g}/\text{rxn}$
H ₂ O, Nuklease-frei	Auf 60 μL auffüllen

Um die Inhibition der Polymerase durch die Antikörperfragmente qualitativ zu beurteilen, wurden die Verhältnisse der mittleren Start-/End-RFU bei 74°C bzw. aus dem 20. Zyklus zu End-RFU bei 50°C mit den Formeln 1 und 2 ermittelt. Kann die Polymerase nach der initialen Inkubation bei 74°C ungehemmt DNA synthetisieren, liegt das Verhältnis bei mindestens 2. In inhibierten Proben liegt das Verhältnis bei 50°C maximal bei 1,03.

$$74^{\circ}\text{C}: \frac{\bar{x}_{\text{RFU, end}}}{\bar{x}_{\text{RFU, start}}} \geq 2 \quad (1)$$

$$50^{\circ}\text{C}: \frac{\bar{x}_{\text{RFU, end}}}{\bar{x}_{\text{RFU, 20}}} \leq 1,03 \quad (2)$$

5. Ergebnisse

5.1. Pufferoptimierung

In vorangegangenen Arbeiten zeigte sich, dass scFv-Fragmente produziert werden konnten. Der überwiegende Anteil dieser Fragmente lag nach dem Aufschluss jedoch unlöslich und mit geringer Aktivität vor. Um dem entgegenzuwirken, sollte der Lysepuffer angepasst werden, um so die Löslichkeit der Fragmente durch Solubilisierungsmittel und pH-Wert Optimierung zu erhöhen.

5.1.1. Solubilisierungsmittel

Getestet wurden die Solubilisierungsmittel NDSB-201 und N-Lauroyl-L-Glutaminsäure (Tabelle 3). Dafür wurde zunächst *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 (Tabelle 6) in einem 1 L Schüttelkolben kultiviert (Kapitel 4.3) um die benötigte BFM zu produzieren. Von der BFM wurden je 15 mg in 1 mL Lysepuffer (Tabelle 5) mit NDSB-201 in den Konzentrationen 0,5 M (1x), 1,5 M (3x) und 4,5 M (9x), sowie Lysepuffer mit 2,5% (w/v) (1x), 7,5% (w/v) (3x) und 22,5% (w/v) (9x) N-Lauroyl-L-Glutaminsäure resuspendiert. Zusätzlich wurde der Lysepuffer (Tabelle 5) ohne Solubilisierungsmittel in 1x, 3x und 9x Konzentration getestet. Die Proben wurden mittels Ultraschalls aufgeschlossen und die lösliche Fraktion über eine SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 4.4).

Auf dem Gel der SDS-PAGE (Abbildung 3) zeigten die Proben im Lysepuffer ohne Solubilisierungsmittel (Tabelle 5) keine sichtbaren Änderungen in der Bandenintensität in Abhängigkeit der Konzentrationen des Puffers. Im Puffer mit NDSB-201 zeigten die Proben im 4,5 M NDSB-201 und 0,5 M die stärksten Fragmentbanden im Vergleich zu den weiteren Proben auf dem Gel. Zudem lagen in der Probe mit 4,5 M Puffer weniger Hostproteine vor. Dagegen war in der Probe im 1,5 M NDSB-Puffer keine stärkere Intensität der Fragmentbande gegenüber den Fragmentbanden im Lysepuffer ohne Zusätze zu erkennen. In den Proben mit verschiedener konzentrierter N-Lauroyl-L-Glutaminsäure zeigte sich eine schwache Abnahme der Bandenintensität mit steigender Konzentration des Solubilisierungsmittels.

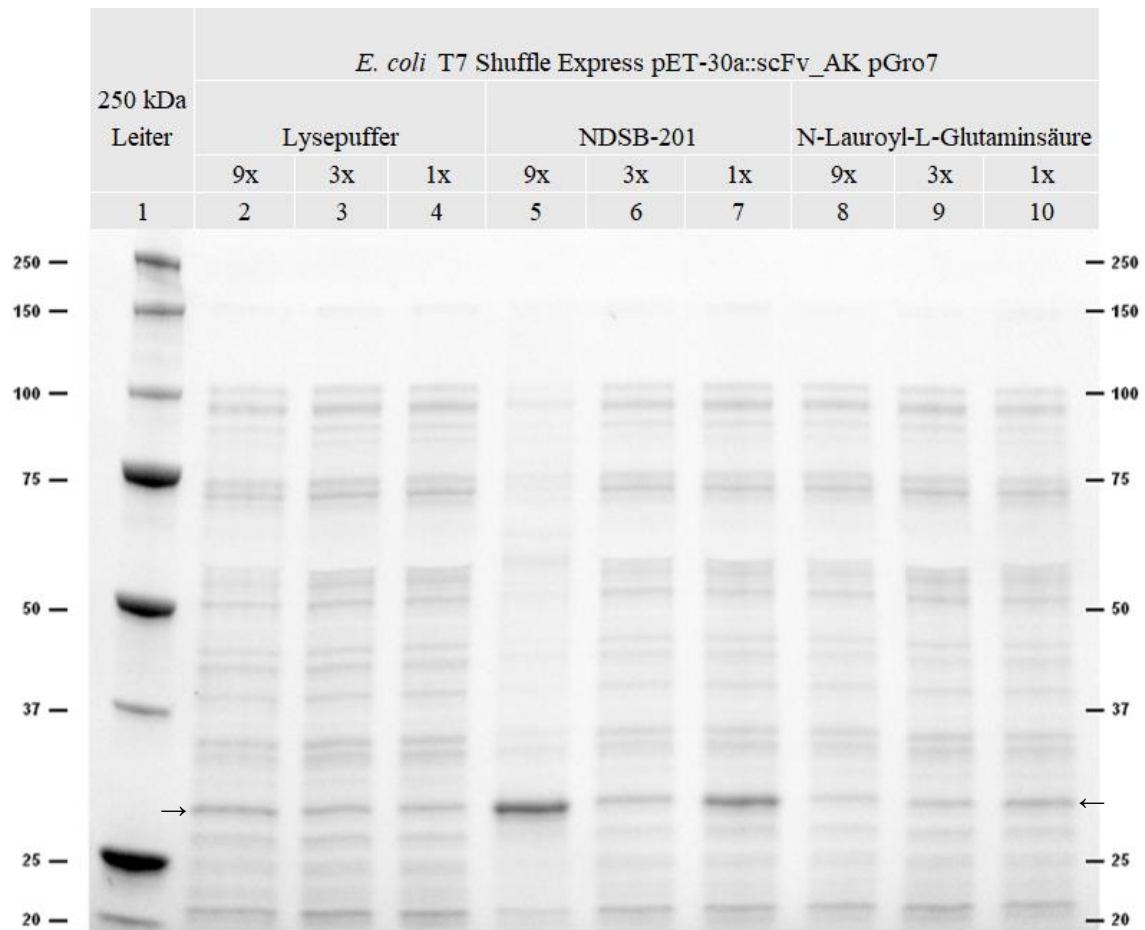


Abbildung 3: Expressionsmuster von *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 in Lysepuffern mit verschiedenen Zusätzen Untersucht wurde die Auswirkung verschiedener Zusätze und Konzentrationen im Lysepuffer auf die Konzentration der scFv-Fragmente in der löslichen Fraktion. Aufgetragen auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel wurden von links nach rechts: 1. 250 kDa Leiter, 2-10: *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 aufgeschlossen in: 2. 9x Lysepuffer, 3. 3x Lysepuffer, 4. 1x Lysepuffer, 5. Lysepuffer + 4,5 M NDSB-201, 6. Lysepuffer + 1,5 M NDSB-201, 7. Lysepuffer + 0,5 M NDSB-201, 8. Lysepuffer + 22,5 % (w/v) N-Lauroyl-L-Glutaminsäure, 9. Lysepuffer + 7,5 % (w/v) N-Lauroyl-L-Glutaminsäure, 10. Lysepuffer + 2,5 % (w/v) N-Lauroyl-L-Glutaminsäure. Erwartete Fragmentgröße: 28,8 kDa, durch → markiert.

5.1.2. Konzentrationsoptimierung

Um die optimale NDSB-Konzentration für die höchste Löslichkeit zu ermitteln, wurden je 15 mg BFM in 1 mL Lysepuffer mit 0,5-8 M NDSB-201 resuspendiert. Die Proben wurden anschließend mittels Ultraschalls (MS-72, Bandelin) aufgeschlossen. Die Rohextrakte wurden auf eine SDS-Page aufgetragen und die Fragmente quantifiziert (Kapitel 4.4). Die Probe im 4 M NDSB-Lysepuffer zeigte mit 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ die höchste Konzentration (Abbildung 4). Höhere und niedrigere NDSB-Konzentrationen führten zu geringeren scFv-Konzentrationen. Die Proben wurden als Unikate gemessen.

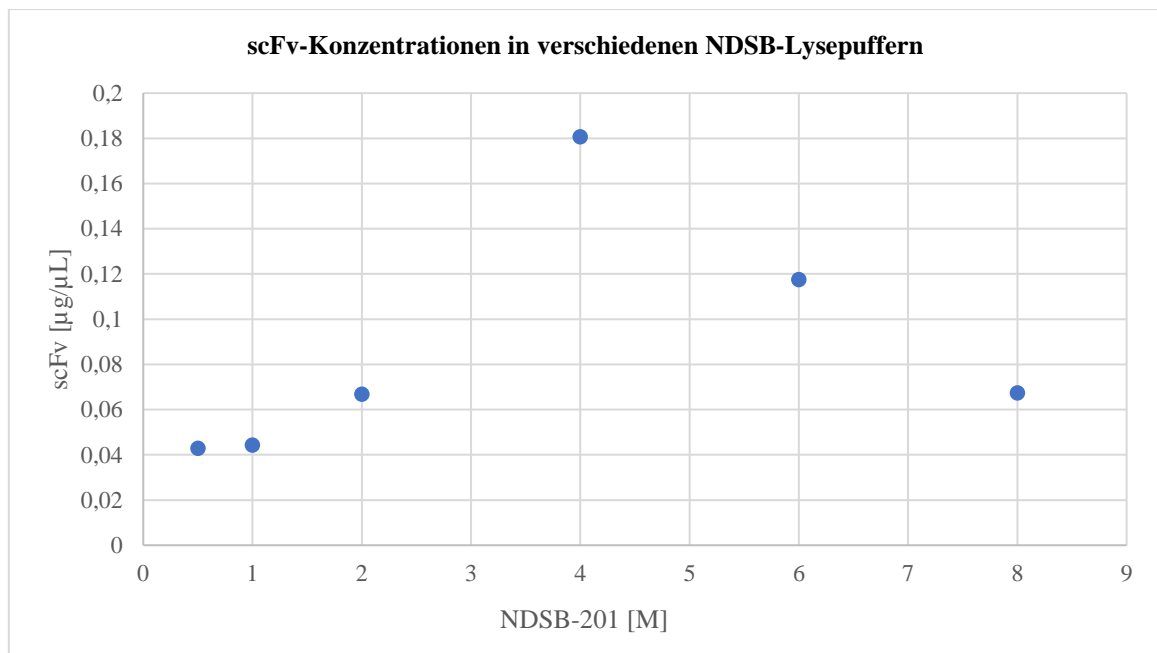


Abbildung 4: Löslichkeit der scFv-Fragmente bei verschiedenen Konzentrationen NDSB-201 15 mg BFM *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 wurden in 1 mL Lysepuffer mit 0,5 M, 1 M, 2 M, 4 M, 6 M und 8 M NDSB-2021 aufgeschlossen. Die Rohextrakte wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die scFv-Fragmente wurden quantifiziert. Im Diagramm aufgetragen wurde die scFv-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ gegen die NDSB-Konzentration in M.

5.1.3. pH-Wert

Da die Löslichkeit eines Proteins im Puffer durch den pI-Wert vom pH-Wert des Puffers beeinflusst wird, wurde der 4 M NDSB-Puffer mit verschiedenen pH-Werten getestet. Hierfür wurden je 15 mg BFM in 1 mL NDSB-Lysepuffer mit pH 7,0-9,0 in 0,5 Schritten resuspendiert, mittels Ultraschalls (MS-72, Bandelin) aufgeschlossen und über eine SDS-PAGE quantifiziert. Es konnte kein signifikanter Einfluss des pH-Wertes festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.4. Antigenpezifität

Um zu überprüfen ob neben der Konzentration auch die Antigenbindung der Fragmente durch die NDSB-Konzentration im Lysepuffer beeinflusst werden kann, wurde ein indirektes ELISA (Kapitel 4.5) durchgeführt. Zuvor wurde neue BFM des *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 (Tabelle 6) in einem Schüttelkolben (Kapitel 4.3) produziert. Je 15 mg der BFM wurden in 1 mL Lysepuffer mit den NDSB-Konzentrationen 2,5-5 M resuspendiert und über Ultraschall (MS-72, Bandelin) aufgeschlossen. Von den aufgeschlossenen Suspensionen wurden jeweils 500 μ L abgenommen, die übrigen 500 μ L wurden bei 17.000 x g zentrifugiert. Bevor die Rohextrakte und die aufgeschlossenen Suspensionen als Triplikate im ELISA (Kapitel 4.5) getestet wurden, wurden sie quantifiziert (Kapitel 4.4).

Die höchste Fragment-Konzentration im Rohextrakt lag mit 0,09 μ g/ μ L in der Probe mit 3,5 M NDSB vor (Abbildung 5, A). Höhere und niedrigere NDSB-Konzentrationen im Lysepuffer führten zu niedrigeren scFv-Konzentrationen. Die stärkste Absorption unter den Proben des Rohextraktes von 0,53 AU zeigte die Probe mit 2,5 M NDSB, obwohl mit 0,02 μ g/ μ L die geringste scFv-Konzentration vorlag. Mit steigender NDSB-Konzentration nahm die Absorption in den Proben ab. In den Suspensionen sank die Konzentration der Fragmente mit steigender NDSB-Konzentration, ebenso die Absorption im ELISA. Ausgenommen davon war die Probe im 4 M NDSB-Puffer, die mit 0,18 AU nach der 2,5 M Probe die stärkste Absorption zeigte (Abbildung 5, B).

Verglichen untereinander, zeigten alle Proben der aufgeschlossenen Suspensionen höhere scFv-Konzentrationen als ihre äquivalenten Rohextrakte. Abgesehen von der 2,5 M NDSB-Probe, zeigte sich diese Differenz auch in den Absorptionen des ELISAs. In der Probe mit 2,5 M NDSB-201 überlag die Absorption des Rohextrakts der Absorption der Suspension etwa um das Zweifache. Betrachtet man die Absorption der Proben bezogen auf die eingesetzte Fragmentmenge, wies die Rohextraktprobe mit 2,5 M NDSB-201 mit 0,18 AU/ μ g_{scFv} die höchste spezifische Absorption auf (Abbildung 6). Auch in den 3 M NDSB-Proben zeigte das Rohextrakt mit 0,01 AU/ μ g_{scFv} eine höhere spezifische Absorption als der gesamte Aufschluss. In den Proben mit höheren NDSB-Konzentrationen lagen die spezifischen Absorptionen der Rohextrakte unter denen der gesamten Aufschlüsse. Die höchste spezifische Absorption in den Suspensionen lag mit 0,02 AU/ μ g_{scFv} in der Probe mit 4 M NDSB-201 vor.

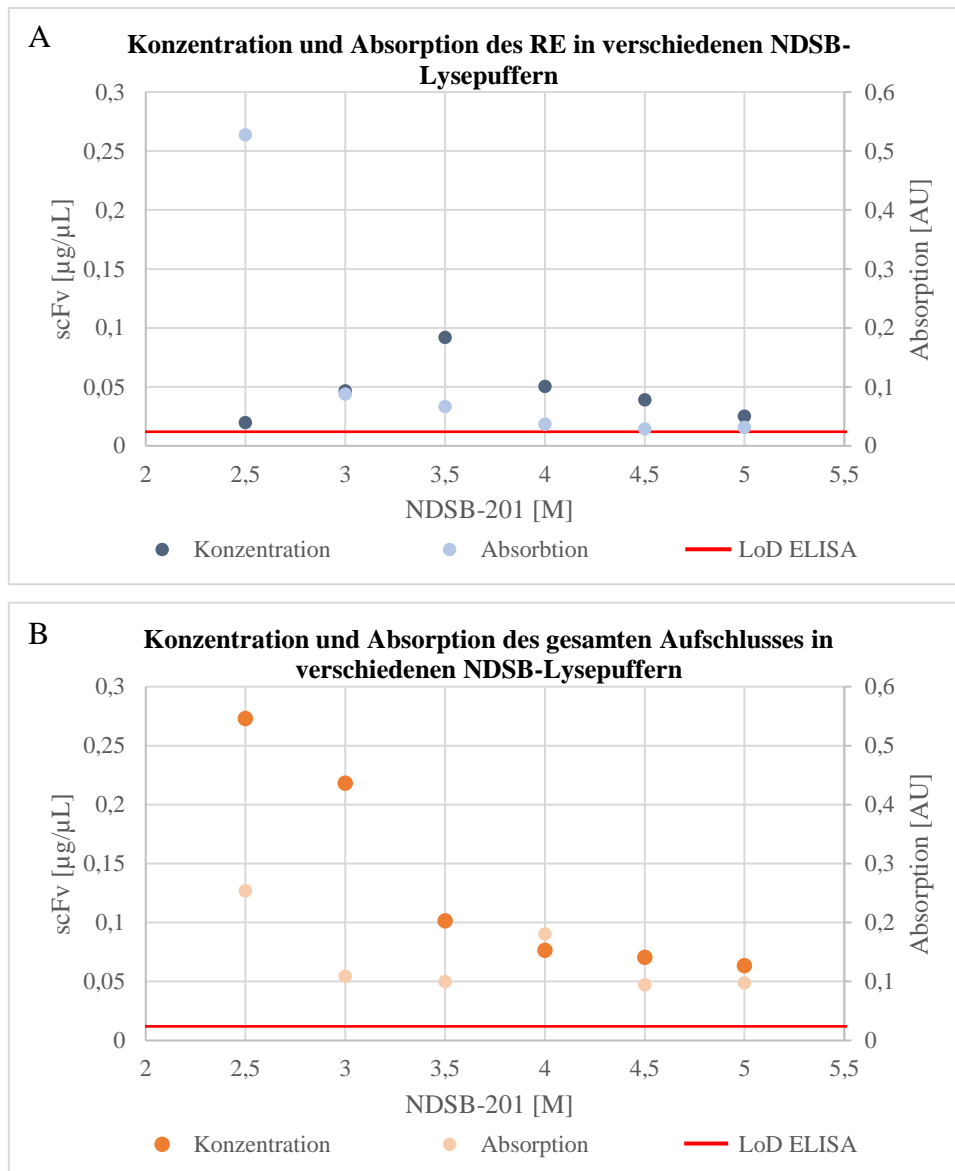


Abbildung 5: Konzentration und Absorption der scFv_His6_StrepII-Fragmente in verschiedenen NDSB-Lysepuffern 15 mg BFM von *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 wurden in 1 mL Lysepuffer mit 0,5 M, 1 M, 2 M, 4 M, 6 M und 8 M NDSB-201 aufgeschlossen. Das Rohextrakt und der gesamte Aufschluss wurden über eine SDS-PAGE quantifiziert und im ELISA auf die Bindung gegen ihr Antigen getestet. Im Diagramm aufgetragen wurde die scFv-Konzentration in µg/µL gegen die NDSB-Konzentration in M. A: Konzentrationen (blau, dunkel) und Absorptionen (blau, hell) im Rohextrakt, LoD des ELISAs (rot), B: Konzentrationen (orange, dunkel) und Absorptionen (orange, hell) im gesamten Aufschluss, LoD des ELISAs (rot).

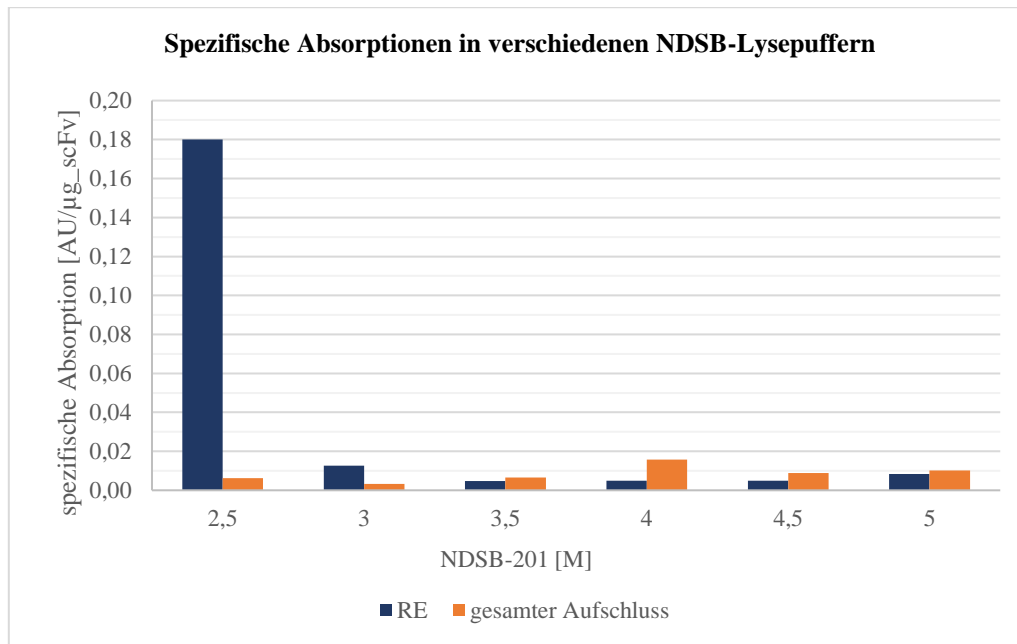


Abbildung 6: Spezifische Absorptionen der scFv_AK-Fragmente im Rohextrakt und im gesamten Aufschluss bei verschiedenen NDSB-Lysepuffern Aus absoluter Absorption, scFv-Konzentration und eingesetztem Volumen wurde die spezifische Absorption der Proben im ELISA berechnet. Die spezifische Absorption in $\text{AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$ wurde gegen die in den Proben vorliegende NDSB-201 Konzentration in M aufgetragen. Blau: Rohextrakt, orange: gesamter Aufschluss.

5.1.5. Aufreinigung

Um BFM für die Aufreinigung der scFv-Fragmente über die FPLC zu erhalten, wurde *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 (Tabelle 6) in acht Schüttelkolben kultiviert (Kapitel 4.3). Es wurden 8,89 g BFM produziert, die in 50 mL Lysepuffer mit 4 M NDSB-201 resuspendiert und für die FPLC vorbereitet (Kapitel 4.6). Die NDSB-Konzentration wurde gewählt, da damit zuvor die höchste Konzentration an Fragmenten im Rohextrakt erreicht wurde (Kapitel 5.1.2). Um die Löslichkeit von nicht klassischen *Inclusionbodies* (Kapitel 2.3) zu verbessern, wurde die Suspension nach dem Aufschluss mit Ultraschall behandelt (Kapitel 4.6).

Sowohl nach der Elution von der Ni-NTA Säule (Tabelle 1), als auch nach der Entsalzungssäule (Tabelle 1) waren im Chromatogramm (Abbildung 11, Abbildung 12) Peaks zu erkennen, die als Eluat aufgefangen wurden. Auf der SDS-PAGE (Kapitel 4.4) zeigte das Eluat jedoch keine Banden (Abbildung 7). Neben dem Eluat wurden die in der Vorbereitung genommenen Proben auf das Gel aufgetragen. Hier zeigte sich, dass nach dem Aufschluss eine $0,06 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ an scFv-Fragmenten im Rohextrakt vorlagen. Nach der

Ultraschallbehandlung lagen $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ vor. Bereits im Rohextrakt, dass auf die FPLC aufgetragen wurde, war keine Fragmentbande zu erkennen. Im Pellet dagegen lagen $0,96 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ vor. Das Fragment konnte nicht aufgereinigt werden.

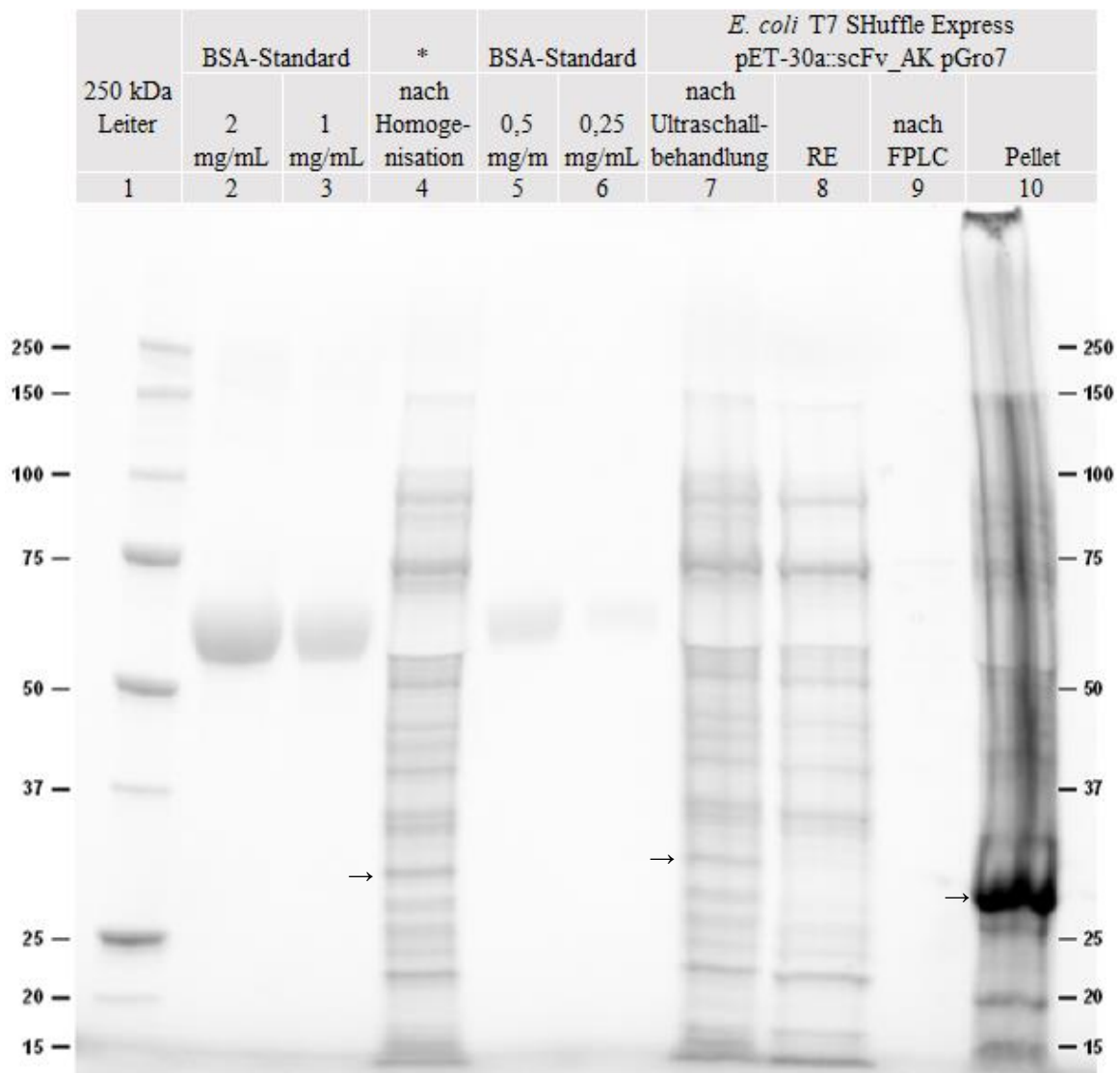


Abbildung 7: Expressionsmuster von *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 nach verschiedenen Aufreinigungsschritten Analysiert wurden Proben aus den verschiedenen Schritten der Aufreinigung über FPLC. Die flüssigen Proben wurden abzentrifugiert und die löslichen Fraktionen für die SDS-PAGE verwendet. Aufgetragen auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel wurden von links nach rechts: 1. 250 kDa Leiter, 2. 2 mg/mL BSA, 3. 1 mg/mL BSA, 4. *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 aufgeschlossen durch Homogenisation, 5. 0,5 mg/mL BSA, 6. 0,25 mg/mL BSA, 7. *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 nach Ultraschallbehandlung, 8. filtriertes Rohextrakt von *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7, 9. Eluat nach FPLC, 10. Pellet nach vollständiger Vorbereitung des RE. * *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7. Erwartete Fragmentgröße: 28,8 kDa, durch → markiert.

5.2. Refolding und Löslichkeit-Tag

5.2.1. On-column Refolding

Da die Optimierung des Lysepuffers zu scFv-Fragmenten mit geringer Antigenbindung (Kapitel 5.1.4) führte, welche nicht aufgereinigt werden konnten (Kapitel 5.1.5), sollten die Fragmente denaturiert auf die Säule aufgetragen und gebunden neu gefaltet werden. Für das *on-column Refolding* (Kapitel 4.7) wurde 12,82 g BFM des *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::scFv_AK pGro7 (Tabelle 6) in acht Schüttelkolben produziert (Kapitel 4.3). Die produzierten Fragmente wurden nach Kapitel 4.7 vorbereitet und behandelt. Von 160 mL Bindepuffer mit scFv-Fragmenten wurden 80 mL auf die FPLC ÄKTA 150L pure (cytiva) aufgetragen, neu gefaltet und aufgereinigt (Kapitel 4.7) (Abbildung 13). Im Anschluss an das *Refolding* wurden die Fragmente über eine Entsalzungssäule (Tabelle 1) in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 umgepuffert (Kapitel 4.6). Das Eluat wurde über eine SDS-PAGE quantifiziert (Kapitel 4.4). In 11 mL Eluat lagen 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ scFv-Fragmente vor, was einen Ertrag von 0,07 $\text{mg}_{\text{scFv}}/\text{g}_{\text{BFM}}$ entsprach.

5.2.2. Löslichkeits-Tag

Als weitere Möglichkeit die Löslichkeit der Fragmente im Lysepuffer zu erhöhen, sollte ein scFv-Fragment mit N-terminalen Löslichkeits-Tag produziert werden. Das pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII Plasmid wurde aus dem NEB 5 α Lagerstamm (Tabelle 6) extrahiert (Kapitel 4.1). Anschließend wurde das Plasmid in kompetente *E. coli* T7 Shuffle Express Zellen (Tabelle 6) transformiert (Kapitel 4.2). Für die weitere Verwendung des neu erstellten Stammes *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII (Tabelle 6) wurden Glycerolstocks erstellt (Kapitel 4.3). Für die Aufreinigung der Fragmente wurde 11,06 g BFM in acht Schüttelkolben produziert (Kapitel 4.3). Die Aufreinigung wurde, wie in Kapitel 4.6 beschrieben, durchgeführt. Das filtrierte Rohextrakt wurde auf die FPLC ÄKTA 150L pure (Cytiva) aufgetragen und aufgereinigt (Abbildung 14). Zusammen mit einer Probe des Eluats wurden alle genommenen Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen und quantifiziert (Kapitel 4.4).

Nach dem Aufschluss lagen 3,40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ scFv-Fragmente im Rohextrakt vor. Nach der Inkubation mit der Turbonuklease waren es 2,82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und im Rohextrakt, das auf die FPLC aufgetragen wurde 1,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Abbildung 8). Im Pellet lagen 6,45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ vor. Nach der

Aufreinigung lagen in 12 mL Eluat 0,65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ scFv-Fragmente vor. Somit konnte eine Ausbeute von 0,70 $\text{mg}_{\text{scFv}}/\text{g}_{\text{BFM}}$ erzielt werden.

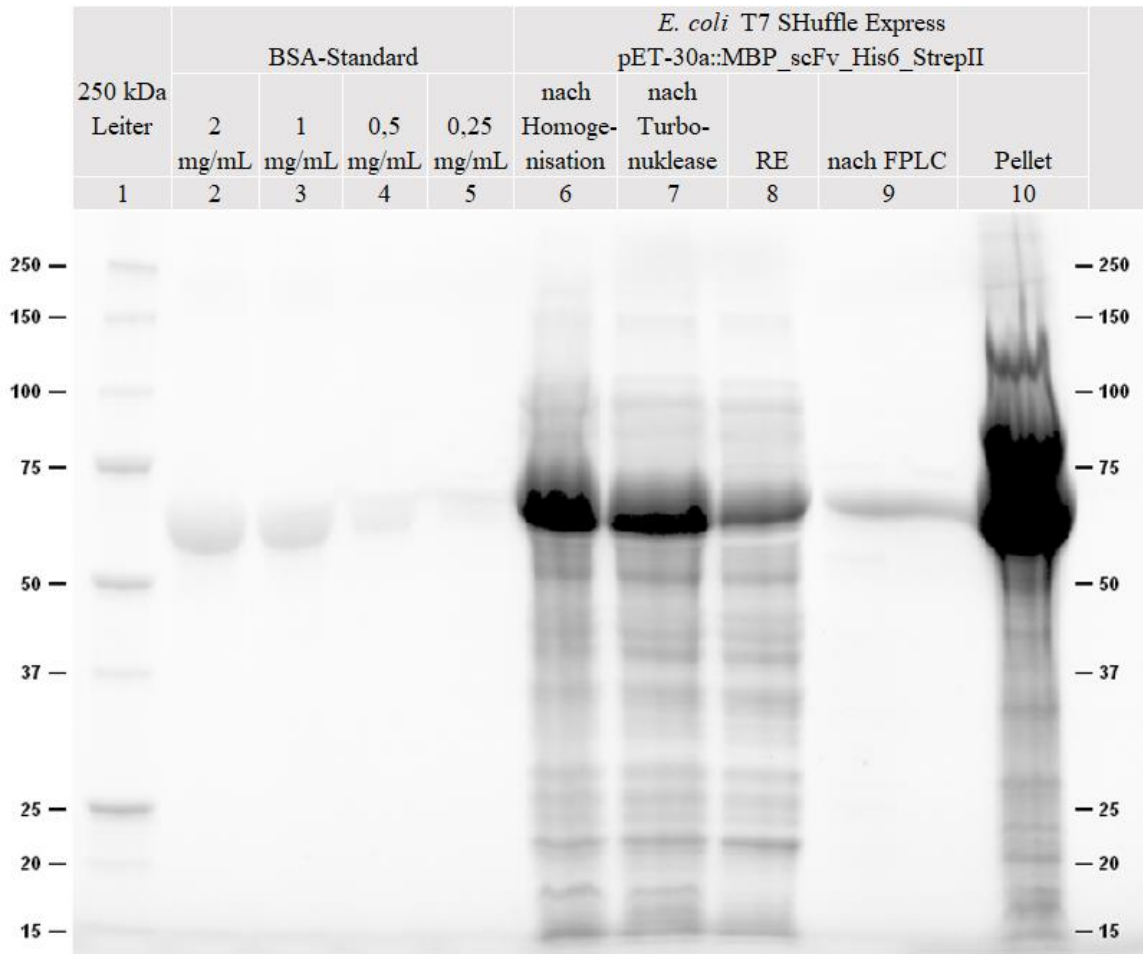


Abbildung 8: Expressionsmuster von *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII nach verschiedenen Aufreinigungsschritten Analysiert wurden Proben aus den verschiedenen Schritten der Aufreinigung über FPLC. Die flüssigen Proben wurden abzentrifugiert und die löslichen Fraktionen für die SDS-PAGE verwendet. Aufgetragen auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel wurden von links nach rechts: 1. 250 kDa Leiter, 2. 2 mg/mL BSA, 3. 1 mg/mL BSA, 4. 0,5 mg/mL BSA, 5. 0,25 mg/mL BSA, 6. *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII aufgeschlossen durch Homogenisation, 7. *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII nach 30 min Inkubation mit 2,5 μL Turbonuklease, 8. Filtriertes Rohextrakt von *E. coli* T7 Shuffle Express pET-30a::MBP_scFv_His6_StrepII, 9. Eluat nach FPLC, 10. Pellet nach vollständiger Vorbereitung des RE. Erwartete Fragmentgröße: 71,8 kDa.

5.2.3. ELISA

Die aufgereinigten scFv_His6_StrepII-Fragmente aus dem *on-column Refolding* und die MBP_scFv_His6_StrepII-Fragmente wurden in einem ELISA (Kapitel 4.5) getestet, um zu beurteilen, welche Methode Fragmenten mit höherer Antigenbindung hervorbrachte. Die gemessenen absoluten Absorptionen wurden auf die eingesetzte Konzentration bezogen und in Abbildung 9 dargestellt. Die Proben wurden zuvor erneut über eine SDS-PAGE

(Kapitel 4.4) quantifiziert. Da in der in Glycerol gelagerten Probe der MBP-getaggtten Fragmente eine Konzentration von $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ vorlag, wurde zusätzlich die in Tris/HCl gelagerte Probe (Kapitel 5.2.2) mit $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ mitgeführt. In der Probe des *on-column Refoldings* lag eine scFv-Konzentration von $0,18 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ vor. Der Referenzantikörper AK42 (Tabelle 8) wurde in einer Konzentration von $2,07 \text{ pg}/\mu\text{L}$ eingesetzt.

Die höchste spezifische Absorption der Fragment-Proben zeigten die MBP-scFv-His6-StrepII-Fragmente, welche in Glycerol gelagert wurden mit $0,40 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$. Die MBP-getaggtten Fragmente im Lagerpuffer (Tabelle 3) lagen bei $0,20 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$. Die scFv-His6-StrepII-Fragmente aus dem *on-column Refolding* zeigten mit $0,06 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$ die geringste spezifische Absorption. Die spezifische Absorption des AK42 (Tabelle 8) lag bei $10600 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$.

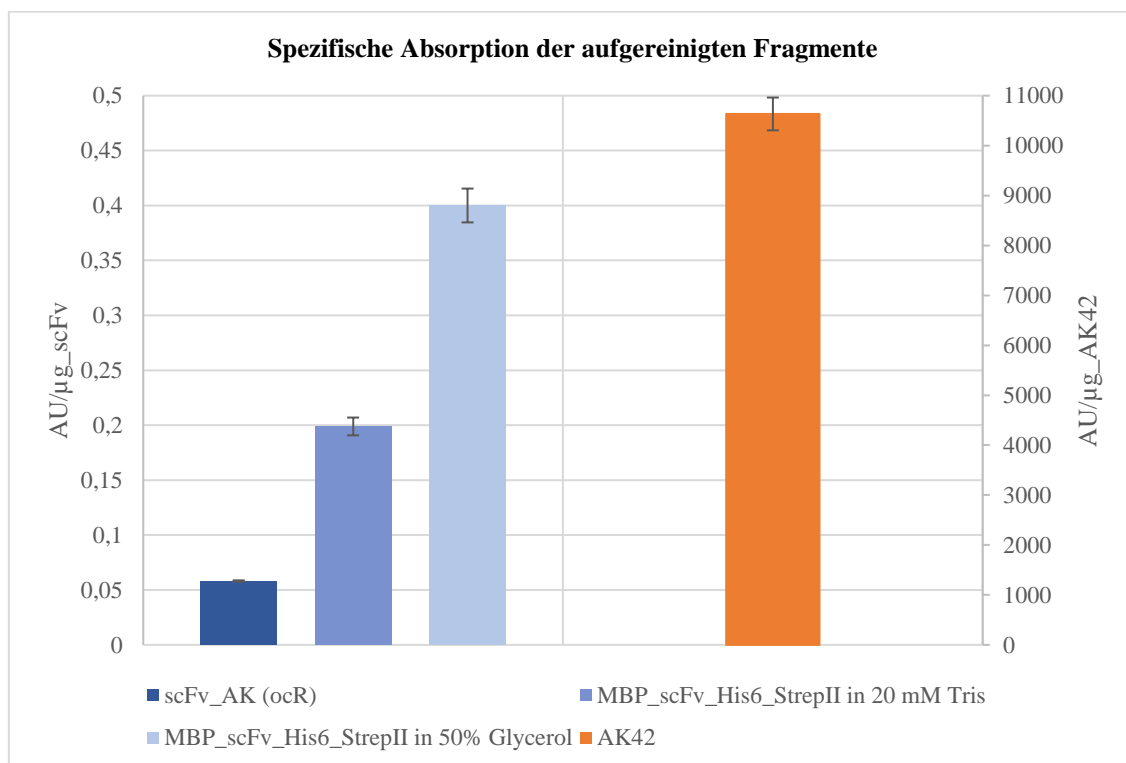


Abbildung 9: Spezifische Absorptionen der aufgereinigten scFv_AK- und MBP_scFv_His6_StrepII-Fragmente Aus absoluter Absorption, scFv-Konzentration und eingesetztem Volumen wurde die spezifische Absorption der Proben im ELISA berechnet. Dunkelblau: scFv_AK aus dem *on-column Refolding*, blau MBP_scFv_His6_StrepII gelagert in 20 mM Tris/HCl, hellblau: MBP_scFv_His6_StrepII gelagert in 50% Glycerol, orange: Referenzantikörper AK42.

5.2.4. Funktionstest

Da für die Anwendung der Antikörperfragmente nicht allein die Bindung gegen die DNA-Polymerase, sondern auch die Inhibierung der Polymeraseaktivität relevant ist, wurden die aufgereinigten und im ELISA getesteten Fragmente (Kapitel 5.2.3) in einem Funktionstest untersucht (Kapitel 4.8).

Nach einem Hot-Start bei 74°C wurde die Template DNA in den Proben der Fragmente aus dem *on-column Refolding*, der MBP-getaggtten Fragmente im Tris-Puffer, sowie in der Positivkontrolle des AK42 amplifiziert (Abbildung 10, A). Die Proben der MBP-getaggtten Fragmente, welche in 50% Glycerol gelagert wurden, wiesen keinen relevanten Anstieg der RFU auf. Nach Inkubation bei 50°C zeigte die Kontrolle keinen Anstieg der RFU (Abbildung 10, B). Die Proben der MBP-getaggtten Fragmente in 20 mM Tris und die Proben des *on-column Refoldings* zeigt bei 50°C ein Anstieg der RFU. In beiden Proben jedoch geringer als bei 74°C. Die Proben der MBP-getaggtten Fragmente in Glycerol zeigten weiterhin keine relevante Zunahme der RFU. Tabelle 13 zeigt die berechneten RFU-Verhältnisse bei 74°C und 50°C.

Tabelle 13: RFU-Verhältnisse der aufgereinigten Proben Berechnet wurde das Verhältnis aus mittlerer End- und Start-RFU (74°C) der getesteten Fragmente, sowie aus mittlerer End-RFU und mittlerer RFU des 20.Zyklus (50°C). Für funktionsfähige *Hot-Starts* liegen die Verhältnisse bei 74°C ≥ 2 und bei 50°C $\leq 1,03$.

Antikörper	74°C: $\frac{\bar{x}_{RFU,end}}{\bar{x}_{RFU,start}}$	50°C: $\frac{\bar{x}_{RFU,end}}{\bar{x}_{RFU,20}}$
AK42 (Kontrolle)	4,34 ($\pm 0,05$)	0,98 ($\pm 0,01$)
scFv_AK (ocR)	3,08 ($\pm 0,16$)	2,10 ($\pm 0,02$)
MBP_scFv_His6_StrepII in 20 mM Tris/HCl	2,56 ($\pm 0,09$)	1,65 ($\pm 0,01$)
MBP_scFv_His6_StrepII in 50% Glycerol	1,14 ($\pm 0,11$)	1,17 ($\pm 0,02$)

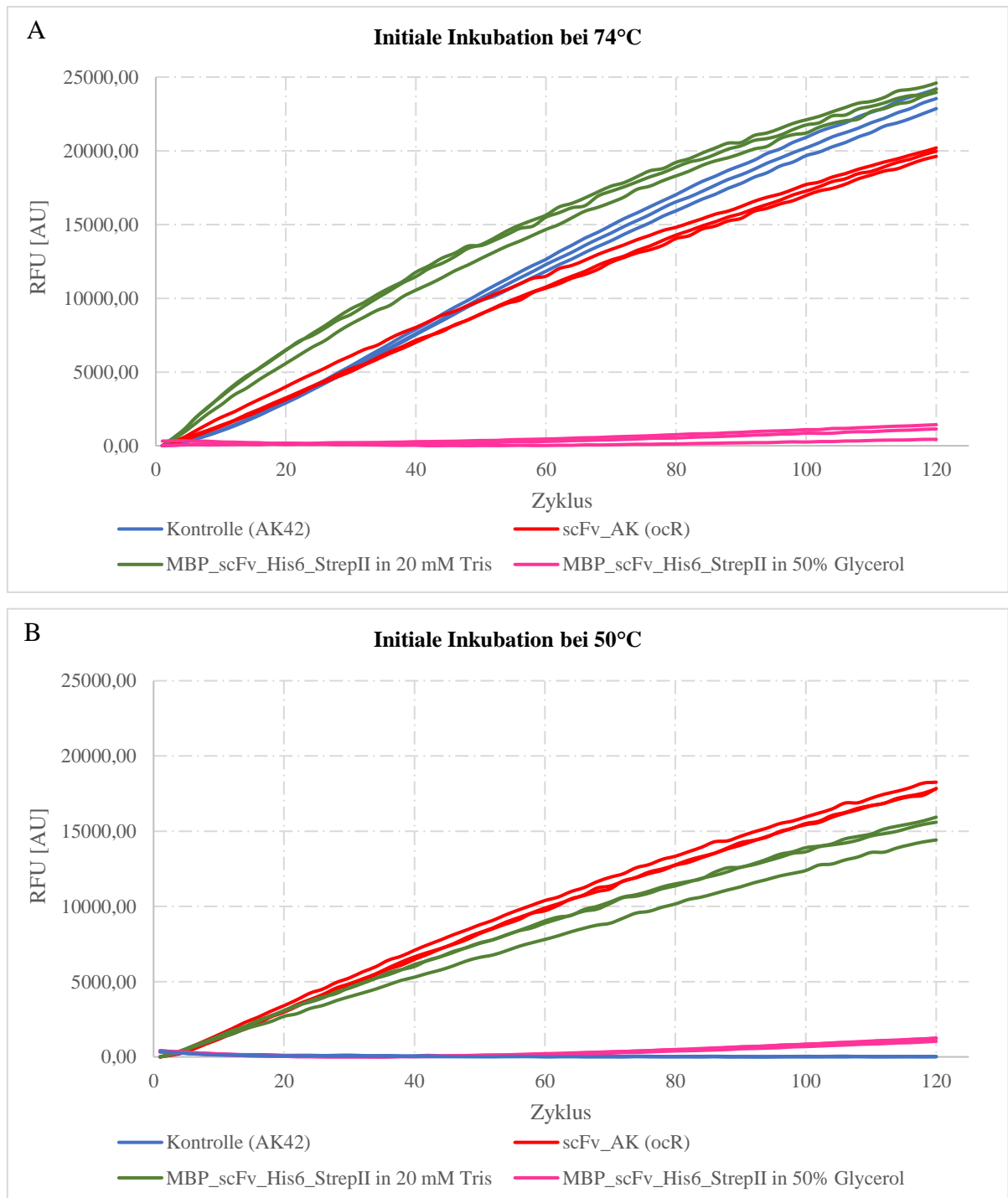


Abbildung 10: Funktionstest der aufgereinigten scFv-Fragmente Die Aufgereinigten Fragmente wurden in einer Real-Time-PCR getestet. Bei 74°C sollte das Fragment denaturieren und die DNA-Polymerase freigegeben, bei 50°C sollte die Polymerase inhibiert werden. Dargestellt sind die gemessenen RFUs in AU im Verlauf der Amplifikation über 2 h. Blau: Kontrolle AK42, rot: scFv_AK aus dem *on-column Refolding*, grün: MBP_scFv_His6_StrepII gelagert in 20 mM Tris/HCl, pink: MBP_scFv_His6_StrepII gelagert in 50% Glycerol. A: initiale Inkubation bei 74°C, B: initiale Inkubation bei 50°C.

6. Diskussion

6.1. Löslichkeit durch Solubilisierungsmittel

Die Optimierung des Lysepuffers konnte nur geringfügig zu einer Verbesserung der Löslichkeit der scFv-Fragmente führen. Es wurde NDSB-201 verwendet, da im ersten Screening (Kapitel 5.1.1) in den Proben mit NDSB-201 stärkere Banden im SDS-Gel zu erkennen waren als in den Proben mit N-Lauroyl-L-Glutaminsäure oder ohne Solubilisierungsmittel. Die Wirkung von NDSBs sowie die Wirkung von N-Lauroyl-L-Glutaminsäure auf *Inclusionbodies* sind nicht abschließend erklärt, beruhen jedoch zum Teil auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Solubilisierungsmitteln und den Proteinen [21,22]. Die Auswahl eines geeigneten NDSBs zur Solubilisierung eines Proteins hängt vom jeweiligen Protein und den Wechselwirkungen ab, die das NDSB aufgrund seiner Struktur damit eingehen kann [43]. Gleiches wird auf die N-Lauroyl-L-Glutaminsäure zutreffen, sodass dieses Solubilisierungsmittel aufgrund der auftretenden oder auch fehlenden Wechselwirkungen für das in dieser Arbeit produzierte scFv-Fragment nicht geeignet war. Zudem bildet N-Lauroyl-L-Glutaminsäure aufgrund ihrer langen hydrophoben Seitenkette in hohen Konzentrationen Micellen, die die Proteinlöslichkeit beeinflussen können [23].

In der Optimierung der NDSB-Konzentration im Lysepuffer zeigte sich, dass die scFv-Konzentration im Rohextrakt einen annähernd glockenförmigen Verlauf mit steigender NDSB-Konzentration annahm, deren Optimum bei 3,5 M bzw. 4 M NDSB-201 lag (Kapitel 5.1.2, Kapitel 5.1.4). Beginnend bei 0,5 M NDSB-201 im Lysepuffer lag eine scFv-Konzentration von 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ vor, die bei 4 M NDSB-201 im Puffer auf 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ gesteigert wurde. Bei 8 M NDSB-201, der höchsten getesteten Konzentration, lagen 0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ scFv-Fragmente im Rohextrakt vor (Kapitel 5.1.2). Dies spricht dafür, dass das NDSB-201 bis zu einer Konzentration von 4 M die Solubilisierung der scFv-Fragmente unterstützt. In dieser Arbeit wurde mit Konzentrationen von 2,5 M bis 8 M gearbeitet. Da es sich dabei um höhere Konzentrationen als üblich handelt, besteht die Möglichkeit, dass bei NDSB-Konzentrationen über 4 M die scFv-Fragmente durch die hohen Konzentrationen des NDSB-201 verdrängt wurden und somit die Konzentration sank [44].

Im ELISA nahmen die Absorptionen der Rohextrakt-Proben mit steigender NDSB-Konzentration im Puffer ab (Abbildung 5, A). Daraus erschließt sich, dass die Absorption nicht allein von der Konzentration der vorliegenden scFv-Fragmente abhing. Stattdessen wies die Probe mit der geringsten scFv- und der geringsten NDSB-Konzentration im Rohextrakt

die stärkste Absorption mit 0,53 AU auf (Kapitel 5.1.4). Im gesamten Aufschluss zeigte ebenfalls die Probe mit der geringsten NDSB-Konzentration im Puffer die höchste Absorption mit 0,25 AU, hier lag jedoch im Gegensatz zum Rohextrakt die höchste scFv-Konzentration der Reihe vor (Abbildung 5, B). Bezogen auf die eingesetzte scFv-Konzentration zeigten sich im Rohextrakt stärkere Absorptionen bei geringeren Fragment-Konzentrationen (Abbildung 6). Bei der Betrachtung der nicht abzentrifugierten Proben wies die Probe mit 4 M NDSB-Puffer mit 0,02 AU/ $\mu\text{g}_{\text{scFv}}$ die höchste spezifische Antigenbindung auf. Proben mit höheren oder niedrigeren NDSB-Konzentrationen zeigten maximal eine spezifische Absorption von 0,01 AU/ $\mu\text{g}_{\text{scFv}}$. Möglich ist, dass NDSB-201 in hohen Konzentrationen nicht nur die Fragmente aus der löslichen Fraktion verdrängt, sondern auch inhibierend auf das ELISA wirkte und dadurch mit steigender NDSB-Konzentration die Absorption sank. Dagegen spricht, dass die Probe des gesamten Aufschlusses im 4 M NDSB-Puffer eine stärkere Absorption als die Proben im 3 M und 3,5 M NDSB-Puffer aufwies (Abbildung 5, B). Außerdem zeigten die Proben in 3,5 M, 4,5 M und 5 M eine Absorption von 0,1 AU, anstatt weiter zu sinken. Eine andere Möglichkeit ist, dass durch das NDSB-201 mehr Fragmente gelöst werden können, diese Fragmente jedoch nicht nativ gefaltet sind. Teils gefaltete scFvs können an die Polymerasen binden, ohne eine Bindung des sekundären Antikörpers zuzulassen. Dadurch werden die Polymerasen gegenüber nativen Fragmenten blockiert [43]. Dies führt bei einer höheren vorliegenden scFv-Konzentration zu einer geringeren AU und somit zu einer geringeren spezifischen Absorption. NDSBs können unterstützend bei der Faltung von Protein wirken. Dafür sollten diese jedoch denaturiert vorliegen [21,22,43]. Da in diesem Ansatz auf die Denaturierung verzichtet wurde, hatte das NDSB-201 keinen sichtbar positiven Einfluss auf die Faltung der scFv-Fragmente. Wäre das der Fall, müsste mit steigender NDSB-Konzentration die spezifische Absorption steigen.

Die Veränderung des pH-Wertes des NDSB-Lysepuffers führte zu keinen relevanten Veränderungen der scFv-Konzentration im Rohextrakt (Kapitel 5.1.3). Werden nicht-klassische *Inclusionbodies* in Puffern verschiedener pH-Werte gelöst, zeigt sich, dass sich die Dichte der *Inclusionbodies* ändert [18]. So können nicht-klassische *Inclusionbodies* gelockert oder verdichtet werden. Unter Einfluss des Solubilisierungsmittels sollten weniger dichte *Inclusionbodies* besser löslich sein und somit nach dem Aufschluss eine höhere Konzentration an scFv-Fragmenten im Rohextrakt vorliegen. Da dies nicht der Fall war und nur geringe Menge an scFv-Fragmenten solubilisiert werden konnten, handelte es sich bei

den vorliegenden *Inclusionbodies* wahrscheinlich um klassische und weniger um nicht-klassische *Inclusionbodies*.

Des Weiteren zeigte sich bei dem Versuch die Fragmente aufzureinigen, dass durch die Inkubation mit der Turbonuklease und die Zentrifugation bei 24.000 x g zuvor lösliche Fragmente ausfielen, was auf eine schlechte Stabilität der Fragmente zurückzuführen ist. Aufgrund der Stabilitätsprobleme und da die Optimierung des Puffers wenige Fragmente solubilisierete, empfiehlt es sich andere Methoden, in denen auch klassische *Inclusionbodies* gelöst werden können, zu verwenden.

6.2. Solubilisierung durch Denaturierung und Löslichkeits-Tag

Es gibt verschiedene Ansätze die Effekte, durch die MBP die Aggregation seiner Fusionspartner inhibiert und die Faltung unterstützt, zu erklären. Zum einem wird angenommen, dass die MBP-*Tags* Mizellen formen können und ähnlich zum GroEL/Chaperon-System ihre Fusionspartner von cytoplasmatischen Proteinen abgrenzen und so die Aggregation mit anderen Proteinen verhindern. Ein weiterer Ansatz ist, dass der MBP-*Tag* die Bindung zu Chaperonen erleichtern, die wiederum die Faltung unterstützen [28,29,45]. Möglich ist ebenfalls, dass Intermediate der Fusionspartner vorübergehend an das MBP binden und so stabilisiert werden. So können die Fusionspartner nicht mit anderen rekombinanten Proteinen aggregieren, bis sie eine stabile Form annehmen [29]. Ungeachtet der Mechanismen ist es abhängig von dem Fusionsprotein, wie gut die Effekte wirken. Im optimalen Fall führen die genannten Theorien am Ende zu nativ gefalteten, stabilen Proteinen, die wie D. Waugh (2016) zeigte, auch nach der Abspaltung vom MBP weiterhin stabil sind [29]. Waugh zeigte auch, dass es Proteine gibt, deren Löslichkeit durch den MBP-*Tag* zwar erhöht wird, sie jedoch keine verbesserte Faltung durch die Fusion aufweisen, da sie nach einer Spaltung erneut als *Inclusionbodies* ausfallen [29,46]. Bezieht man diese Erkenntnisse auf die produzierten scFv-Fragmente, liegen diese dazwischen. Erkennbar ist dies daran, dass im Aufschluss durch Homogenisation die Bande des MBP-getaggten Fragments (Abbildung 8) deutlich stärker ist als die Bande des scFv-Fragments im einfachen Lysepuffer (Abbildung 4). Dennoch liegt der überwiegende Anteil weiterhin im Pellet vor (Abbildung 8).

Verglichen mit der Ausbeute von 0,07 mg_{scFv}/g_{BFM} des *on-column Refolding* (Kapitel 5.2.1) erzielte die Solubilisierung durch den MBP-*Tag* eine zehnfach höhere Ausbeute mit 0,70 mg_{scFv}/g_{BFM} (Kapitel 5.2.2). Ohne den MBP-*Tag* im optimierten Lysepuffer konnten keine Fragmente aufgereinigt und nur wenige solubilisiert werden, deren Bindung gegen

die Polymerase zudem schwach ausfiel (Kapitel 5.1). Die spezifische Bindung der MBP-getaggten Fragmente dagegen ist beträchtlich stärker (Kapitel 5.2.3), was zeigt, dass das MBP neben der Löslichkeit einen positiven Einfluss auf die Faltung und Aktivität der Fragmente hatte.

Betrachtet man die spezifischen Absorptionen der verschiedenen Fragmente, weist das scFv-Fragment aus dem *on-column* Refolding mit $0,06 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$ den geringsten Wert auf (Kapitel 5.2.3). Dies liegt unter der spezifischen Absorption des unaufgereinigten Rohextraktes im 2,5 M NDSB-Puffer mit $0,18 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$ (Kapitel 5.1.4). Das in 20 mM Tris gelagerte MBP_scFv-Fragment liegt mit $0,2 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$ schwach darüber (Kapitel 5.2.3). Die besten Ergebnisse konnten mit den in Glycerol gelagerten MBP_scFv-Fragmenten erzielt werden. Hier lag die spezifische Absorption bei $0,4 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{scFv}}$ (Kapitel 5.2.3). Vom Referenzantikörper AK42, dessen spezifische Absorption bei $10600 \text{ AU}/\mu\text{g}_{\text{AK}}$ lag (Kapitel 5.2.3), sind alle Proben eindeutig entfernt. Die geringe spezifische Absorption der scFv-Fragmente aus dem *on-column Refolding* wird auf eine unvollständige oder fehlerhafte Faltung im *Refolding* zurückzuführen sein. Für das *Refolding* wurden die auf der Säule gebundenen Fragmente für 15 min mit einem Gradienten aus Binde- und *Refolding*-Puffer und anschließend mit weiteren 20 mL *Refolding*-Puffer umspült (Abbildung 13). T. Arakawa (2012) zeigte in einer Arbeit zum *Refolding* eines scFv-Fragmentes, dass für die Gewinnung nativ-gefalteter scFvs mehrere Intermediate von den Fragmenten angenommen werden müssen, deren Faltung zeitintensiv ist [23]. Ein möglicher Ansatz die Faltung der Fragmente im *on-column Refolding* zu verbessern, ist es daher die Zeit, in der die Fragmente mit dem *Refolding*-Puffer gespült werden, zu verlängern. Zudem kann der *Refolding*-Puffer um Redox-Systeme ergänzt werden, die die Bildung von Disulfidbrücken unterstützen. Ein häufig genutztes System dafür ist der Einsatz von oxidiertem und reduziertem Glutathion [23,47]. Aufgrund der Chaperon-ähnlichen Wirkung auf denaturierte Proteine wäre auch ein Zusatz von NDSBs eine Möglichkeit zur Unterstützung der Faltung [21,43].

Im Funktionstest zeigte sich, dass keine der Fragmentproben die Polymerase inhibieren und wieder irreversibel freisetzen konnte (Kapitel 5.2.4). In den Proben des *on-column Refoldings* und der im Tris-Puffer gelagerten MBP_scFv-Fragment wurde bei 74°C sowie bei 50°C DNA amplifiziert, wenn auch bei 50°C etwas geringer. Die in Glycerol gelagerten MBP_scFv-Proben zeigten bei beiden Temperaturen keine nennenswerte Amplifikation, beide RFU-Verhältnisse lagen schwach über eins. Grund für die fehlende Amplifikation in

den MBP-Glycerol-Proben kann zum einem sein, dass die Fragmente die Polymerasen binden und inhibieren, jedoch nach dem *Hot-Start* nicht denaturieren und folglich die Polymerasen nicht freisetzen. Ein weiterer Grund kann sein, dass durch das hohe Probenvolumen, dass nötig war, um auf die benötigte Fragment-Konzentration zu kommen, zu viel Glycerol in den Ansätzen vorlagen, wodurch die Polymerasen inhibiert wurden.

6.3. Stabilität der Fragmente

Nach dem Aufschluss durch Homogenisation lagen $3,40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ an löslichen MBP_scFv-Fragmenten vor (Kapitel 5.2.2). Durch die Inkubation mit der Turbonuklease nahm die Konzentration auf $2,82 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ab, dies entsprach 17% der zuvor vorliegenden Konzentration. Durch die Zentrifugation bei $24.000 \times g$ gingen sank die Konzentration auf $1,75 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, was einem 19%-igem Verlust entspricht (Kapitel 5.2.2). Auch in der Aufreinigung des scFv-Fragments im optimierten Lysepuffer (Kapitel 5.1.5) traten Konzentrationsverluste durch die Inkubation mit der Turbonuklease und die Zentrifugation bei einer hohen Drehzahl auf. Dies zeigt, dass lösliche Proteine nicht gleichzusetzen sind mit stabilen, nativen Proteinen. Im Chromatogramm (Abbildung 14) der Aufreinigung des MBP-getaggtten Fragments zeigt sich, dass nach der Elution von der Ni-NTA ein klarer, symmetrischer Peak mit 1.000 mAu vorlag. Nach der Umpufferung erreichte der Peak eine Absorption von unter 100 mAu und wies eine stärkere Asymmetrie auf. Nach der Lagerung der MBP_scFv-Fragmente über Nacht in 20 mM Tris bei 4°C bzw. in 50% Glycerol bei -20°C beinhalteten die Proben Konzentrationen von $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bzw. $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Kapitel 5.2.3). Dies entsprach einem Verlust von 96%. Der Verlust der Fragmente über Nacht und der geteilte Elutionspeak der Entsalzungssäule deuten darauf hin, dass der Lagerpuffer nicht für die Fragmente geeignet war. Durch die Optimierung des Lagerpuffers und die Ergänzung von Additiven können die Fragmente stabilisiert werden. Eine Übersicht über mögliche Additive liefert H. Hamada (2009) [48]. Dort führt Hamada unter anderem NDSB als Aggregation-unterdrückendes und somit stabilisierendes Additiv auf. Die Ergebnisse aus Kapitel 5.1 zeigten, dass NDSB-201 einen positiven Effekt auf die Löslichkeit der scFv-Fragmente hatte. Dieser Effekt fiel jedoch sehr gering aus, weshalb verschiedene NDSBs in Betracht gezogen werden sollten.

7. Fazit und Ausblick

Es zeigte sich, dass nicht jede Solubilisierungsmethode gut geeignet ist, um die scFv-Fragmente aufzureinigen. Insbesondere die alleinige Optimierung des Lysepuffers zeigte wenig Effizienz. Größeres Potenzial haben sowohl das *on-column Refolding* als auch die Fusion mit einem Löslichkeits-*Tag*. Beides führte zu einer Verbesserung der Löslichkeit und Aktivität im ELISA. Dennoch benötigen beide Methoden weitere Optimierungen, um lukrative Mengen zu produzieren. Der wichtigste Punkt wird es sein, die Faltung und Stabilität der Fragmente in Lösung zu verbessern. Da die größte Ausbeute und höchste Bindungsaffinität gegen die Polymerase durch die Fusion an einen MBP-*Tag* erreicht wurden, sollten diese Fragmente zunächst für die weitere Optimierung verwendet werden.

Um höhere Ausbeuten zu erlangen, können die verwendeten Methoden kombiniert werden, indem die MBP_scFv-Fragmente über ein optimiertes *on-column Refolding* aufgereinigt werden. Durch Ergänzung von Redox-Systemen im Puffer und eine Verlängerung der Dauer, kann das *Refolding* optimiert werden und die Konzentration an nativ gefalteten, aktiven scFv-Fragmenten erhöht werden. Ohne ein *Refolding* sollte der Lagerpuffer optimiert werden, um den Verlust der Fragmente zu verringern. Die Ergänzung von NDSB-201 kann hier zu einer Stabilisierung der Fragmente führen.

Führen stabilere Fragmente dazu, dass die Polymerasen inhibiert werden, jedoch nicht durch Denaturierung der scFv-Fragmente bei einem *Hot-Start* freigegeben werden können, können höhergeordnete Antikörperfragmente als Alternative getestet werden. Ein Beispiel dafür ist das *Fragment antigen binding*, kurz Fab, das aufgrund einer komplexeren Struktur leichter zu denaturieren ist.

Sollten durch die Optimierungen stabilere Fragmente produziert werden können, die die Polymerase inhibieren und nach einem *Hot-Start* freigegeben, ist die Produktion der Fragmente im Bioreaktor ein weiterer Schritt, der angegangen und optimiert werden muss.

8. Literaturverzeichnis

1. Busch, U., ed. (2010) Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: grundlegende Methoden und Anwendungen. Springer, Heidelberg Berlin.
2. Müller, H.-J., and D.R. Prange (2016) PCR - Polymerase-Kettenreaktion. (2. Auflage.), Springer Spektrum, Berlin Heidelberg.
3. Dang, C., and S.D. Jayasena (1996) Oligonucleotide Inhibitors of TaqDNA Polymerase Facilitate Detection of Low Copy Number Targets by PCR. *J. Mol. Biol.* 264: 268–278.
4. Mizuguchi, H., M. Nakatsuji, S. Fujiwara, M. Takagi, and T. Imanaka (1999) Characterization and Application to Hot Start PCR of Neutralizing Monoclonal Antibodies against KOD DNA Polymerase. *J. Biochem. (Tokyo)* 126: 762–768.
5. Chiu, M.L., D.R. Goulet, A. Teplyakov, and G.L. Gilliland (2019) Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* 8: 55.
6. Huleani, S., M.R. Roberts, L. Beales, and E.H. Papaioannou (2022) Escherichia coli as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: significance and expression. *Crit. Rev. Biotechnol.* 42: 756–773.
7. Murphy, K.M., C. Weaver, C. Janeway, P. Travers, and M. Walport (2018) Janeway Immunologie. (9. Auflage.), Springer Spektrum, Berlin [Heidelberg].
8. Feige, M.J., L.M. Hendershot, and J. Buchner (2010) How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* 35: 189–198.
9. Gaciarz, A., J. Veijola, Y. Uchida, M.J. Saaranen, C. Wang, S. Hörkkö, and L.W. Ruddock (2016) Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of E. coli. *Microb. Cell Factories* 15: 22.
10. Lobstein, J., C.A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, and M. Berkmen (2012) SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb. Cell Factories* 11: 753.
11. Bhatwa, A., W. Wang, Y.I. Hassan, N. Abraham, X.-Z. Li, and T. Zhou (2021) Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9: 630551.
12. Anfinsen, C.B. (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* 181: 223–230.
13. Hartl, F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324–332.
14. Lund, P.A. (2001) Microbial molecular chaperones. pp. 93–140. *Advances in Microbial Physiology*. 44. Elsevier.
15. Morell, M., R. Bravo, A. Espargaró, X. Sisquella, F.X. Avilés, X. Fernández-Busquets, and S. Ventura (2008) Inclusion bodies: Specificity in their aggregation process and amyloid-like structure. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1783: 1815–1825.
16. Freydell, E.J., M. Ottens, M. Eppink, G. Van Dedem, and L. Van Der Wielen (2007) Efficient solubilization of inclusion bodies. *Biotechnol. J.* 2: 678–684.
17. Fahnert, B., H. Lilie, and P. Neubauer (2004) Inclusion Bodies: Formation and Utilisation. pp. 93–142. *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*. 89. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
18. Peternel, Š., M. Bele, V. Gaberc-Porekar, and V. Menart (2006) Nonclassical inclusion bodies in Escherichia coli. *Microb. Cell Factories* 5: P23.
19. Kim, S.J., G.S. Ha, G. Lee, S.I. Lim, C.M. Lee, Y.H. Yang, J. Lee, J.E. Kim, J.H. Lee, Y. Shin, C. Kim, and D.E. Lee (2018) Enhanced expression of soluble antibody

- fragments by low-temperature and overdosing with a nitrogen source. *Enzyme Microb. Technol.* 115: 9–15.
20. Kudou, M., R. Yumioka, D. Ejima, T. Arakawa, and K. Tsumoto (2011) A novel protein refolding system using lauroyl-l-glutamate as a solubilizing detergent and arginine as a folding assisting agent. *Protein Expr. Purif.* 75: 46–54.
 21. Vuillard, L., T. Rabilloud, and M.E. Goldberg (1998) Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate *in vitro* protein renaturation. *Eur. J. Biochem.* 256: 128–135.
 22. Vuillard, L., C. Braun-Breton, and T. Rabilloud (1995) Non-detergent sulphobetaines: a new class of mild solubilization agents for protein purification. *Biochem. J.* 305: 337–343.
 23. Arakawa, T., Y. Kita, and D. Ejima (2012) Refolding Technology for scFv Using a New Detergent, N-Lauroyl-L-glutamate and Arginine. *Antibodies* 1: 215–238.
 24. Burgess, R.R. (2009) Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. pp. 259–282. *Methods in Enzymology.* 463. Elsevier.
 25. Rudolph, R., and H. Lilie (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 10: 49–56.
 26. Jungbauer, A., W. Kaar, and R. Schlegl (2004) Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 487–494.
 27. Nabiél, A., Y. Yosua, S. Sriwidodo, and I.P. Maksum (2022) Overview of refolding methods on misfolded recombinant proteins from Escherichia coli inclusion bodies. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* DOI: 10.7324/JABB.2023.112204.
 28. Nallamsetty, S., and D.S. Waugh (2006) Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expr. Purif.* 45: 175–182.
 29. Waugh, D.S. (2016) The remarkable solubility-enhancing power of Escherichia coli maltose-binding protein. *Postepy Biochem.* 62: 377–382.
 30. Chaperone plasmid set[Online]. Available: <https://www.takarabio.com/products/protein-research/expression-vectors-and-systems/protein-folding-kits/chaperone-plasmid-set>. [Accessed: 05-Feb-2024].
 31. Froger, A., and J.E. Hall (2007) Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *J. Vis. Exp.* DOI: 10.3791/253.
 32. Steinbüchel, A., F.B. Oppermann-Sanio, C. Ewering, and M. Pötter (2021) Mikrobiologisches Praktikum: Versuche und Theorie. (3. Auflage.), Springer Spektrum, Berlin [Heidelberg].
 33. Nowakowski, A.B., W.J. Wobig, and D.H. Petering (2014) Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Met. Integr. Biometal Sci.* 6: 1068–1078.
 34. Follmann, H. (2001) Biochemie: Grundlagen und Experimente. (1. Auflage.), Teubner, Stuttgart Leipzig Wiesbaden.
 35. Holzmüller, W., and U. Kulozik (2016) Protein quantification by means of a stain-free SDS-PAGE technology without the need for analytical standards: Verification and validation of the method. *J. Food Compos. Anal.* 48: 128–134.
 36. Lottspeich, F., ed. (2009) Bioanalytik. (2. Aufl., [Nachdr.]), Spektrum Akademischer Verl, Heidelberg.
 37. Matson, R.S., ed. (2023) ELISA: methods and protocols. Humana Press, New York, NY.
 38. Spriestersbach, A., J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block, and B. Maertens (2015) Purification of His-Tagged Proteins. pp. 1–15. *Methods in Enzymology.* 559. Elsevier.

39. Kielkopf, C.L., W. Bauer, and I.L. Urbatsch (2020) Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2020: pdb.prot102194.
40. Xi, H., R. Yuan, X. Chen, T. Gu, Y. Cheng, Z. Li, C. Jiang, W. Kong, and Y. Wu (2016) Purification and on-column refolding of a single-chain antibody fragment against rabies virus glycoprotein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 126: 26–32.
41. Dahiya, R., G. Deng, K. Chen, P.C. Haughney, G.R. Cunha, and P. Narayan (1995) Terms and techniques: New approach to hot-start polymerase chain reaction using Taq DNA polymerase antibody. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 1: 42–46.
42. Paul, N., J. Shum, and T. Le (2010) Hot Start PCR. pp. 301–318. In: King, N. (ed.). *RT-PCR Protocols*. 630. Humana Press, Totowa, NJ.
43. Expert-Bezançon, N., T. Rabilloud, L. Vuillard, and M.E. Goldberg (2002) Physical–chemical features of non-detergent sulfobetaines active as protein-folding helpers. *Biophys. Chem.* 100: 469–479.
44. NDSB-201 A non-detergent sulfobetaine. Reported to prevent protein aggregation and facilitate the renaturation of chemically and thermally denatured proteins. Zwitterionic over a wide pH range. Easily removed by dialysis. | Sigma-Aldrich[Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/>. [Accessed: 19-Jun-2024].
45. Sigler, P.B., Z. Xu, H.S. Rye, S.G. Burston, W.A. Fenton, and A.L. Horwich (1998) STRUCTURE AND FUNCTION IN GroEL-MEDIATED PROTEIN FOLDING. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 581–608.
46. Fox, J.D., K.M. Routzahn, M.H. Bucher, and D.S. Waugh (2003) Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. *FEBS Lett.* 537: 53–57.
47. Langenhof, M., S.S.J. Leong, L.K. Pattenden, and A.P.J. Middelberg (2005) Controlled oxidative protein refolding using an ion-exchange column. *J. Chromatogr. A* 1069: 195–201.
48. Hamada, H., T. Arakawa, and K. Shiraki (2009) Effect of Additives on Protein Aggregation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10: 400–407.

9. Anhang

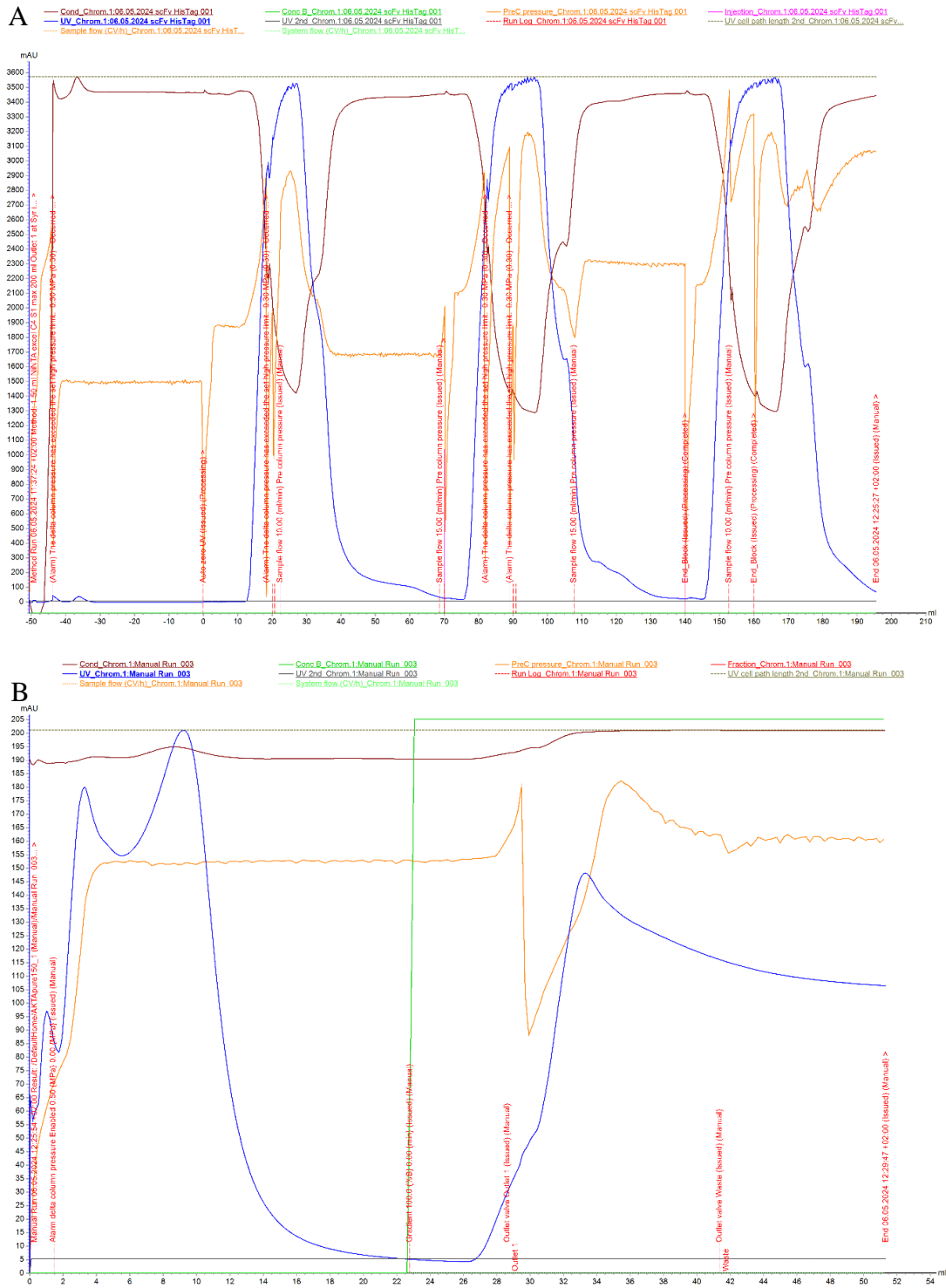


Abbildung 11: Chromatogramme der Aufreinigung von scFv_AK in 4 M NDSB-Lysepuffer: Beladung und Elution der Ni-NTA Säule A: Beladung der Ni-NTA-Säule. Um unspezifische Bindungen zu verringern, wurde die Säule mit einem Säulenvolumen der Probe beladen und anschließend mit einem Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Nach dreimaliger Wiederholung war die Probe vollständig aufgetragen. B: Elution von der Ni-NTA-Säule. Die gebundenen Proteine wurden mit dem Elutionspuffer von der Säule gespült und auf die Entsalzungssäule aufgetragen.

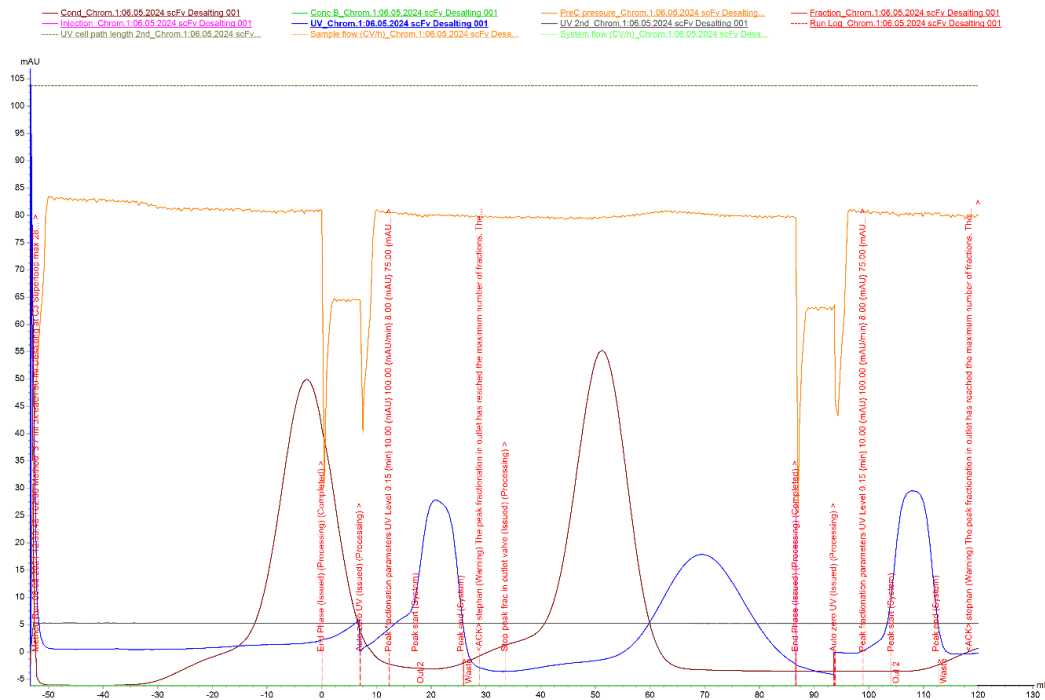


Abbildung 12: Chromatogramme der Aufreinigung von scFv_AK in 4 M NDSB-Lysepuffer: Umpufferung über Entsalzungssäule Die von der Ni-NTA-Säule eluierten Proteine wurden in zwei Schritten auf die Entsalzungssäule aufgetragen. Nach dem Beladen wurde die Säule mit dem Lagerpuffer gespült, in dem die Proteine eluierten. Anschließend wurde die Säule ein zweites Mal mit Beladen und gespült.

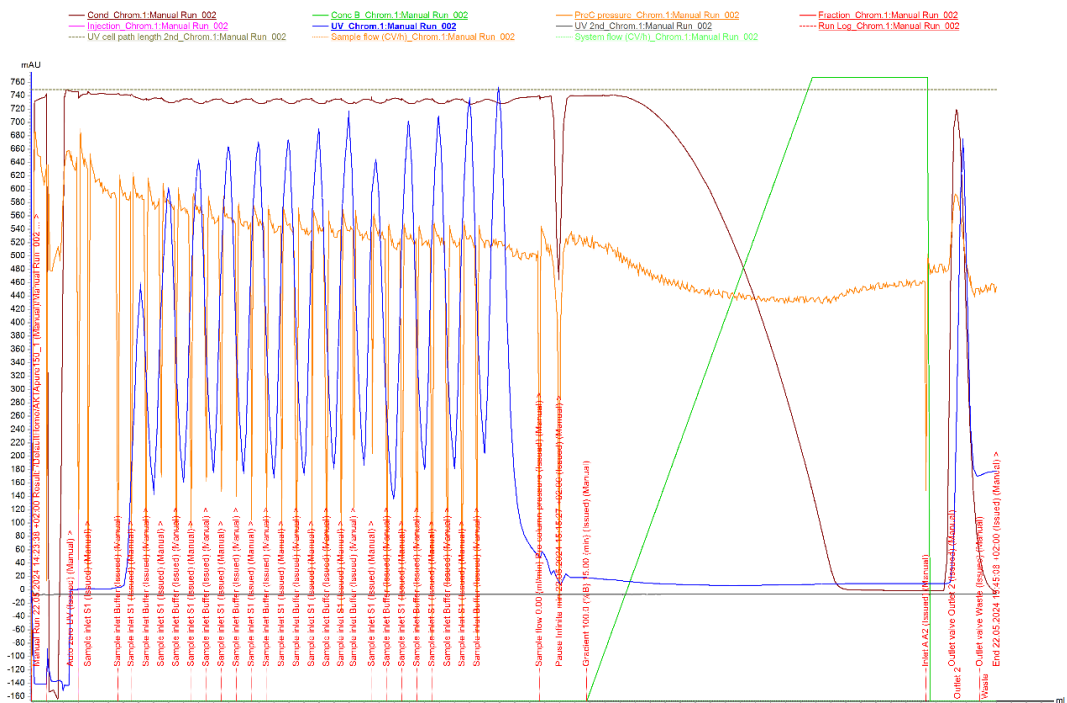


Abbildung 13: Chromatogramm zum on-column Refolding des scFv_AK Um unspezifische Bindungen zu verringern, wurde die Ni-NTA-Säule mit einem Säulenvolumen der Probe beladen und anschließend mit einem Säulenvolumen Bindepuffer gespült. Dies wurde wiederholt, bis die Probe vollständig aufgetragen war. Im Anschluss wurde die Säule in steigenden Gradienten mit Refolding-Puffer gespült. Die Proteine wurden mit dem Elutionspuffer eluiert und aufgefangen.

