

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

**Produktion eines anti-idiotypischen Antikörpers zur
Identifizierung neuer HNK-1 Rezeptoren**

Diplomarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Janina Sering

Hamburg-Bergedorf

am 08. Oktober 2010

Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)
Dr. habil. Ralf Kleene (ZMNH)

Die Diplomarbeit wurde betreut und erstellt im ZMNH
Institut für Biosynthese neuronaler Strukturen

Inhaltsverzeichnis

1.	ZIELSETZUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
2.1	Das HNK-1 Kohlenhydrat	2
2.2	Struktur des HNK-1 Kohlenhydrates	3
2.3	Antikörper gegen das HNK-1 Kohlenhydrat	3
2.4	Vorkommen und Funktion des HNK-1 Kohlenhydrates	4
2.4.1	Relevanz bei Erkrankungen	5
2.5	Problematik der Synthese des HNK-1 Kohlenhydrates und Alternativen	6
2.6	Idiotypische Netzwerktheorie	6
2.7	Anti-idiotypische Antikörper als inneres Abbild von Kohlenhydratepitopen	8
3.	MATERIAL	9
3.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	9
3.2	Lösungen und Puffer	10
3.3	Nährmedien für Bakterien	15
3.4	Bakterienstämme	16
3.5	Molekular- und Proteingewichtsstandards	16
3.6	Reaktionskits	17
3.7	Antikörper	18
3.7.1	Primäre Antikörper	18
3.7.2	Sekundäre Antikörper und Strep-Tactin HRP-Konjugat	18
3.8	Vektoren, Enzyme	19
3.9	Primer (von Metabion synthetisch hergestellt)	20
3.9.1.	Amplifikationsprimer	20
3.9.2	Sequenzierprimer	20
4.	METHODEN	21
4.1	Molekularbiologische Methoden	21
4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
	4.1.1.1 Amplifikation mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase	22
	4.1.1.2 Amplifikation mit der Taq DNA-Polymerase	22

4.1.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	23
4.1.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	23
4.1.4	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	24
4.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten in den pGEM-T Easy Vektor	25
4.1.6	Transformation von <i>E. coli</i>	25
4.1.7	Präparation von Plasmid-DANN	26
	4.1.7.1 <i>Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Plasmid-Minipräparation)</i>	26
	4.1.7.2 <i>Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Plasmid-Maxipräparation)</i>	26
4.1.8	Restriktionsverdau von DNA	27
4.1.9	Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA	28
4.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	28
4.1.11	DNA-Sequenzierung	29
4.2	Gentechnische Methoden	29
4.2.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	29
	4.2.1.1 <i>Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben</i>	29
	4.2.1.2 <i>Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter</i>	30
	4.2.1.3 <i>Messung der optischen Dichte von Bakterien</i>	32
4.2.2	Proteinbiochemische Methoden	32
	4.2.2.1 <i>Strep-tag / Strep-Tactin-System zur Antikörperaufreinigung</i>	32
	4.2.2.2 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	34
	4.2.2.3 <i>Western Blot</i>	35
	4.2.2.4 <i>Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen</i>	36
	4.2.2.5 <i>Ablösen gebundener Antikörper von dem Western Blot (Strippen)</i>	37
	4.2.2.6 <i>ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</i>	37
	4.2.2.7 <i>Umpuffern und Konzentrierung der anti-idiotypischen Antikörper mit Vivaspin-Säulen</i>	38
	4.2.2.8 <i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA Test)</i>	38
	4.2.2.9 <i>Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose 4B</i>	39
	4.2.2.10 <i>Affinitätschromatographie zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern</i>	40
	4.2.2.11 <i>Proteinfällung mit TCA</i>	41
	4.2.2.12 <i>Coomassie-Färbung von SDS-Gelen</i>	41
4.3	Maushirnpräparation und Homogenisierung	42
4.3.1	Gehirnentnahme	42
4.3.2	Gehirnhomogenisierung und Fraktionierung	42
4.4	Bioinformatische Analysen	43

5.	ERGEBNISSE	44
5.1	Expressionstest des HNK-1 anti-idiotypischen Antikörpers	44
5.2	Klonierung in Vektor pASK 118 mit Strep-tag	45
5.2.1	Klonierung des mittels Phusion Hot Start Polymerase amplifizierten PCR-Produkts	47
5.2.2	Subklonierung und Klonierung des mittels Taq Polymerase amplifizierten PCR-Produkts	50
5.3	Produktion des anti-idiotypischen Antikörpers in <i>E. coli</i>	54
5.3.1	Überprüfung der Expression des Klons im Schüttelkolben	54
5.3.2	Produktion im Laborfermenter	58
5.4	Aufreinigung des anti-idiotypischen Antikörpers	59
5.4.1	Antikörperaufreinigung mittels Gravity-Flow (Schwerkraft)	60
5.4.2	Antikörperaufreinigung mittels FPLC	61
5.5	Charakterisierung des anti-idiotypischen Antikörpers	64
5.5.1	Charakterisierung mittels Western Blot	64
5.5.2	Charakterisierung mittels ELISA	65
5.6	Identifizierung potentieller neuer HNK-1 Rezeptoren	67
5.6.1	Kopplung des anti-idiotypischen Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose 4B	67
5.6.2	Affinitätschromatographie zur Identifizierung neuer Rezeptoren	68
5.6.3	SDS-Gel-Analyse der TCA-gefällten Proteine	69
5.6.4	Massenspektrometrieergebnis	70
6.	DISKUSSION	72
6.1	Klonierung der anti-idiotypischen Antikörperfragmente in pASK 118	73
6.2	Produktion des anti-idiotypischen Antikörpers in <i>E. coli</i>	74
6.2.1	Überprüfung / Vergleich der Expression im Schüttelkolben	75
6.2.2	Fermenterlauf zur Produktion des anti-idiotypischen Antikörpers	76
6.3	Aufreinigung und Charakterisierung des anti-idiotypischen Antikörpers	76
6.3.1	Aufreinigung	76
6.3.2	Charakterisierung	77
6.4	Identifizierung potentieller HNK-1 Rezeptoren	78
7.	ZUSAMMENFASSUNG	79
8.	LITERATURVERZEICHNIS	81

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
10. DANKSAGUNG	86

1. Zielsetzung

Das HNK-1 Kohlenhydrat ist auf verschiedensten Zellerkennungsmolekülen des peripheren und zentralen Nervensystems und auf Zellen des Immunsystems lokalisiert.

Um die komplexen Vorgänge und biochemischen Prozesse, die im Zusammenhang mit dem HNK-1 Kohlenhydrat stehen, besser nachzuvollziehen, wurde anstelle der Gewinnung des Kohlenhydrates, ein ihm mimikrierender Antikörper verwendet. Solche anti-idiotypischen Antikörper dienen als inneres Abbild von Epitopen.

Es konnten in der eigenen Arbeitsgruppe HNK-1 anti-idiotypische Antikörperfragmente nach der Phage-Display-Methode isoliert werden. Diese Fragmente binden spezifisch an den monoklonalen HNK-1 Antikörper und konkurrieren mit dem Originalantigen um die Antigenbindungsstelle des HNK-1 Antikörpers, der ein Epitop des sulfatierten HNK-1 Kohlenhydrats erkennt. Es zeigte sich eine Immunreaktivität an Geweben mit potentiellen Bindungspartnern und eine hohe Affinität zum monoklonalen HNK-1 Antikörper. Dies waren Hinweise dafür, dass die isolierten anti-idiotypischen Antikörperfragmente das vom HNK-1 Antikörper erkannte Epitop mimikrieren. Somit könnten sie eine wichtige Rolle in der Aufklärung von biologischen Funktionen des HNK-1 Kohlenhydrates im Nerven- oder Immunsystem spielen.

Aufgrund der Ergebnisse war das Ziel dieser Diplomarbeit, die anti-idiotypischen Antikörperfragmente zur Identifizierung von noch unbekanntem Rezeptoren für das sulfatierte HNK-1 Kohlenhydrat heranzuziehen.

Hierzu müssen zunächst die anti-idiotypischen Antikörperfragmente in größerem Maßstab produziert und aufgereinigt werden. Des Weiteren solle die spezifische Bindung zum HNK-1 Antikörper gezeigt werden, um im Anschluss mit anti-idiotypischen-Antikörpern-gekoppelten Sepharose nach neuen Interaktionspartnern zu suchen. Potentielle neue Rezeptoren des HNK-1 Kohlenhydrates sollen im Gehirn von Mäusen isoliert und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

2. Einleitung

2.1 Das HNK-1 Kohlenhydrat

Auf der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix befindlichen Kohlenhydrat-tragende Glykoproteine, Glykolipide oder Proteoglykane sind Moleküle neuronaler Erkennung.

HNK-1 ist ein solches Glykan, das aufgrund dieser molekularen Erkennungsprozesse und seiner interessanten Funktionen ein viel untersuchter Vertreter dieser Art von Biomolekülen ist.

Ein monoklonaler IgM Antikörper erkannte ein Epitop auf humanen natürlichen Killerzellen sowie Antikörper-abhängigen Killerzellen. Der monoklonale Antikörper wurde durch Immunisierung mit einem Membranantigen einer kultivierten humanen T-Zell-Linie produziert [Abo & Balch, 1981].

Aufgrund der spezifischen Interaktion des Antikörpers mit einem Antigen auf einer Untereinheit humaner natürlicher Killerzellen, leitete sich der Name HNK-1 (human natural killer cells) ab. Bei der vom HNK-1 Antikörper erkannten Struktur handelte es sich um ein Kohlenhydrat [Kruse et al., 1984].

Unmittelbar nach der Entdeckung konnten eine Reihe von Untersuchungen zeigen, dass der HNK-1 Antikörper mehrere Zelltypen des neuronalen Systems spezifisch zu markieren vermag [Lipinski et al., 1983]. Das Kohlenhydrat ist also nicht nur im Immunsystem, sondern auch im zentralen und peripheren Nervensystem von Menschen und Nagetieren zu finden [Schuller-Petrovic et al., 1983].

2.2 Struktur des HNK-1 Kohlenhydrates

Nach der Entdeckung des HNK-1 Kohlenhydrates [Chou et al., 1986] zeigten mehrere Untersuchungen, dass das HNK-1 Epitop, welches mit dem HNK-1 Antikörper interagiert, eine 3-Sulfoglucuronsäure-Einheit als Kopfgruppe enthält.

Bindungsstudien mit synthetischen Glykolipiden deuteten zusätzlich auf ein Neolactosyl-artiges Rückgrat von essentieller Bedeutung hin [Schmitz et al., 1994; Ariga et al., 1987].

Die Charakterisierung des Epitops gelang im Zuge der Strukturaufklärung des Membranglykoproteins P₀ und dem Vergleich mit bekannten Strukturen von Glykolipiden [Voshol et al., 1996]. Es handelt sich bei der hauptsächlich für die Immunreaktivität des Kohlenhydrates verantwortliche Struktur um das Trisaccharid 3-O-Sulfo-GlcA(β-1→3)Gal(β-1→4)GlcNAc am nicht reduzierenden Ende der Verbindung.

2.3 Antikörper gegen das HNK-1 Kohlenhydrat

Es gibt eine Reihe weiterer Antikörper neben dem HNK-1 Antikörper, der zur Entdeckung des Kohlenhydrates führte [Abo & Balch, 1981], die das Kohlenhydratepitop erkennen.

Nach Immunisierung mit verschiedenen Antigenen aus Gewebe und Membranen des embryonalen Nervensystems wurden weitere Antikörper gegen das HNK-1 Kohlenhydratepitop gefunden. Die Antikörper reagierten mit Glykoproteinen oder Glykolipiden, die das HNK-1 Epitop tragen, wodurch davon auszugehen war, dass die Antikörper die gleiche oder eine verwandte Kohlenhydrateinheit erkennen [Jungalwala, 1994; Schachner & Martini, 1995]. Strukturelle Differenzen der Epitope oder unterschiedliche Affinitäten geben die Unterschiede der Antikörper bei Immunreaktionen wieder [Noronha et al., 1986; Schachner, 1989].

Aus Ratten wurden unter anderem nach Immunisierung mit einer Plasmafraktion monoklonale 412 Antikörper, früher als L2 bezeichnet, 334 (IgM), 336 (IgG), 344 (IgM), 349 (IgM) und 392 (IgM) isoliert [Kruse et al., 1984; Noronha et al., 1986].

Der 412 Antikörper und HNK-1 Antikörper wurden auf ihre Bindungsfähigkeit an synthetische Glykolipide untersucht. Es zeigte sich, dass der 412 Antikörper die sulfatierte wie auch die unsulfatierte Kohlenhydrateinheit erkannte [Schmitz et al., 1994]. Hingegen war für die Immunreaktivität des HNK-1 Antikörpers die Sulfatgruppe unbedingt erforderlich [Ilyas et al., 1990].

2.4 Vorkommen und Funktion des HNK-1 Kohlenhydrates

Physiologisch findet sich das HNK-1 Kohlenhydrat auf verschiedensten Zellerkennungsmolekülen des peripheren und zentralen Nervensystems und auf Zellen des Immunsystems.

Das Vorkommen des HNK-1 Kohlenhydrates ist insbesondere im Nervensystem sehr heterogen und ist unter anderem vom Entwicklungsstadium des Organismus abhängig. Es zeigte sich, dass in der embryonalen Entwicklung das HNK-1 Kohlenhydrat im peripheren Nervensystem, dem Cerebellum und dem Kortex zu finden ist, jedoch mit zunehmender Entwicklung die Exprimierung im Kortex verschwindet [Chou et al., 1991].

Das HNK-1 Kohlenhydrat ist dabei an multiplen Funktionen im Nervensystem beteiligt. Insbesondere zeigte sich, dass das HNK-1 Kohlenhydrat als Epitop Bestandteil verschiedenster Zellerkennungsmoleküle ist. Diese sind an der Signaltransduktion zwischen den Zellen untereinander und zwischen Substrat und Zelle verantwortlich [Keilhauer et al., 1985; Künemund et al., 1988; Hall et al., 1993].

Nachgewiesen ist das Vorkommen des HNK-1 Proteins für Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) der Ig-Superfamilie L1, NCAM und MAG [McGarry et al., 1983; Kruse et al., 1984; Faissner, 1987; Pesheva et al., 1987; Bollensen & Schachner, 1987]

Eine am meisten erforschte Zell-Substratinteraktion ist die mit dem Extrazellulärmatrixprotein L1 (Laminin), dieses weist eine Bindungsstelle für das Epitop von HNK-1 auf und ist für die Erhaltung der Integrität von Geweben verantwortlich. Im zentralen Nervensystem sorgt es für die Interaktion von Neuronen und Astrozyten des Cerebellum mit Laminin und ist für die Integrität und die neuronale Differenzierung verantwortlich [Hall et al., 1997; Hall et al., 1995; Mohan et al., 1990].

Eine weitere Rolle in der neuronalen Entwicklung spielt HNK-1 in Interaktion mit MAG und NCAM. MAG (Myelin associated glykoprotein) ist als Bestandteil des Myelins während der Embryonalentwicklung für die Verknüpfung von Neuronen und Gliazellen verantwortlich und ermöglicht dadurch eine spätere schnelle Nervenleitfähigkeit durch saltatorische Erregungsleitung [Poltorak et al., 1987; Bartsch et al., 1989].

NCAM sorgt im Embryonalstadium für eine spezifische Bindung zwischen Neuronen untereinander und Neuronen mit Gliazellen. Es ist damit an der Entstehung und der Reparatur des Nervensystems beteiligt [Edelman, 1985; Edelman & Crossin, 1991].

2.4.1 Relevanz bei Erkrankungen

Ebenso wie in physiologische Prozesse ist das HNK-1 Kohlenhydrat an pathologischen Prozessen beteiligt und obliegt daher einem großen wissenschaftlichen Interesse. Es zeigte sich, dass sich in der demyelinisierenden Polyneuropathie, einer autoimmunen Erkrankung, pathophysiologisch anionische sulfatierte Glycuronylglycolipide (SGGLs) beteiligt sind, die als Epitop das HNK-1 Kohlenhydrat tragen. Bei dieser Erkrankung bilden entartete Plasmazellen eine vermehrte Zahl von monoklonalen IgM Antikörpern, die sog. Paraproteine. Diese wiederum binden an das Epitop vom HNK-1 Kohlenhydrat des zuvor schon erwähnten MAG und führen zu einer Demyelinisierung [Braun et al., 1982; Steck et al., 1983; Stefansson et al., 1983; Tatum, 1993].

Eine weitere medizinische Relevanz hat das HNK-1 Kohlenhydrat in neuroendokrinen und neuroektodermalen Tumoren [Caillaud et al., 1984; Tsutsumi, 1984; Bunn Jr. et al., 1985]. Es wird bei beispielsweise dem neuroendokrinen Lungenkarzinom oder dem Prostatakarzinom an der Oberfläche exprimiert. Diese Tatsache hat insbesondere eine diagnostische Relevanz, da mit Hilfe von HNK-1 Antikörpern diese Tumoren nachgewiesen werden können [Reifenberger et al., 1987].

2.5 Problematik der Synthese des HNK-1 Kohlenhydrates und Alternativen

Die vielfältigen Funktionen sowohl in physiologischen als auch pathologischen Prozessen des Nervensystems erklären das große wissenschaftliche Interesse und den Wunsch sich das HNK-1 Kohlenhydrat zu Nutze zu machen. Um die komplexen Vorgänge und biochemischen Prozesse, die in Zusammenhang mit dem HNK-1 Kohlenhydrat stehen, besser nachzuvollziehen wurde in letzter Zeit daher vermehrt versucht das HNK-1 Kohlenhydrat zu gewinnen.

Die Problematik hierin besteht jedoch in den hohen Kosten und dem aufwendigen Verfahren. Es ließe sich zwar das an SGGL-2 gebundene Kohlenhydrat mit Hilfe eines Glykoheptosyl-Donors durch Kopplung an ein Ceramid und anschließender Sulfatierung gewinnen [Nakano et al., 1991]. Ebenso wurde bereits die Synthese eines HNK-1 immunreaktiven Pentasaccharids [Kornilov et al., 2000] beschrieben. Für Experimente wurde meist aus tierischen Geweben isolierte HNK-1 Kohlenhydrat-tragende Glykokonjugate verwendet.

Allen Methoden gemeinsam ist jedoch der oft sehr zeitaufwendige und kostenintensive chemische Syntheseprozess, der keine Herstellung des HNK-1 Kohlenhydrates in ausreichender Menge gewährleistet.

Eine alternative Lösung dieses Problems bietet hier die Synthese von Stoffen, die die Proteinstruktur, bzw. Funktion des HNK-1 Kohlenhydrates mimikrieren. Dies sind unter anderem die in dieser Arbeit verwendeten anti-idiotypischen Antikörper.

2.6 Idiotypische Netzwerktheorie

Die Idiotypennetzwerktheorie entspricht dem Konzept der strukturellen Nachahmung von Kohlenhydraten. Die Theorie des Idiotypennetzwerkes besagt, dass jeder Antikörper eine Doppelfunktion besitzt.

Das Immunsystem ist ein Netzwerk aus Antikörpern, die durch ihre variablen Bereiche oder Idiotypen untereinander und mit einer großen Anzahl an natürlichen Epitopen interagieren können.

Antikörper, die als Antwort auf das ursprüngliche Antigen (Ag) gebildet werden, werden als Ab1 (ursprünglicher Idiotyp) bezeichnet. Diese Antikörper werden selbst Antigene, die wiederum die Bildung eines Antikörpers induzieren, den Ab2 (anti-Idiotyp) usw. [Jerne, 1974]. Der anti-idiotypische Antikörper ist also gegen die alleinige, einzigartige variable Region eines anderen Antikörpers gerichtet, dem Idiotop (siehe Abb. 1-1).

Kohlenhydrate unterliegen einem sehr zeitaufwendigen und kostenintensiven chemischen Syntheseprozess (siehe 2.5). Eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen sind anti-idiotypische Antikörper, die das ursprüngliche Antigen imitieren. Das setzt voraus, dass der anti-idiotypische Antikörper die gleiche Form besitzt und die gleiche Bindungskonstante mit dem ursprünglichen Idiotyp (Ab1) eingeht wie das ursprüngliche Antigen.

Nach der idiotypischen Netzwerktheorie fungieren die individuell produzierten anti-idiotypischen Antikörper, um die spezifische "Antwort" gegen das originale Antigen zu modulieren.

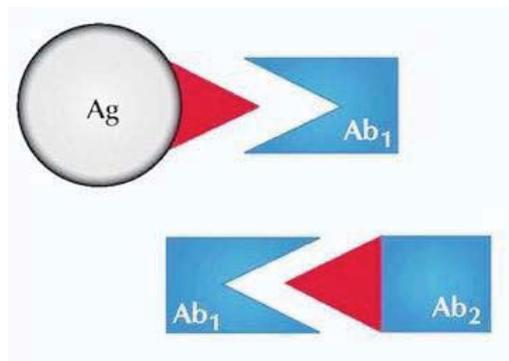


Abb. 1-1: Kette von Antikörpern

(Quelle: Yehuda Shoenfeld, *Nature Medicine* **10**, 17 – 18 (2004))

Ein Antikörper (Ab1) erkennt ein Epitop auf dem Antigen (Ag), an das der Antikörper (Ab1) spezifisch binden kann. Antikörper 1 wird selbst ein Antigen, das wiederum die Bildung eines Antikörpers induziert, Antikörper 2. Der anti-idiotypische Antikörper (Ab2) wird von demselben Antikörper (Ab1) wie das Epitop auf dem Antikörper. Anti-idiotypische Antikörper (Ab2) stellen somit ein inneres Abbild des Antigens für die Antikörper 1-Bindungsstelle dar.

Anti-idiotypische Antikörper sind gegen die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers gerichtet. Die drei hypervariablen Regionen der leichten und schweren Kette bilden die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers. Die Idiotope eines Antikörpers zusammen, bezeichnet man als Idiotyp. Dieser besitzt Antigeneigenschaften im Gegensatz zu dem Fc-Teil eines Antikörpers.

2.7 Anti-idiotypische Antikörper als inneres Abbild von Kohlenhydratepitopen

Kohlenhydratepitope können durch anti-idiotypische Antikörper mimikriert, also durch eine Aminosäure-Sequenz nachgeahmt werden. Es zeigte sich, dass bei genauerer Betrachtung molekularer Mimikry diese im Falle von Proteinen auf Sequenzhomologie beruhen kann.

Fast identische Konformationen mit identischer Funktion kann durch völlig verschiedene Primärstrukturen gebildet werden. Die Nachahmung von Kohlenhydraten durch Aminosäuresequenzen scheint durch die Bildung einer funktionellen Konformation zu erfolgen [Erlanger, 1989; Leu et al. 1994; Fields et al., 1995].

Die Produktion von anti-idiotypischen Antikörpern, die als inneres Abbild von Kohlenhydraten fungieren, ist unter anderem auch möglich, da Kohlenhydrate nicht mittels rekombinanter DNA-Technologie hergestellt werden können.

3. Material

3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fisher (Schwerte), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Die während der Diplomarbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, wie z.B. Küvetten aus Polystyrol, Reaktionsgefäße, Spritzen, Filterpapier oder ZelluTrans Dialyseschläuche wurden zusätzlich von den Firmen Henze Laborbedarf (Elmshorn), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Whatman (Dassel) und Bio-Rad (München) bezogen.

Der folgenden Auflistung sind die häufig verwendeten Laborgeräte sowie deren Hersteller zu entnehmen:

Agarose-Gelkammer	Sub-Cell GT, Bio-Rad
Blotapparatur	Mini Trans Blot, Bio-Rad
ELISA-Reader	µQuant, BioTek
FPLC-Anlage	BioLogic HR Workstation, Fraction Collector Model 2128, Bio-Rad
Gel-Dokumentations-System	Chroma 41 und E.A.S.Y.RH, Herolab
Heizblock	Schnipptherm, Schutron
Kühlzentrifugen	Megafuge 1.0 R, Heraeus Centrifuge 5417 R, Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf Sorvall RC 5C Plus
Netzteil für SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting	Power Pac 300, Bio-Rad
pH-Meter	320 pH Meter, Mettler Toledo
Photometer	BioSpec-mini, Shimadzu
Präzisionswaage	PB3002, Mettler Toledo
SDS-Gelelektrophoresekammer	Mini Trans Blot, Bio-Rad
Schüttelinkubator	Orbital Incubator S150, Stuart

Schüttler Raumtemperatur	Promax 2020, Heidolph
Thermocycler	Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 D, Eppendorf

3.2 Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt, soweit nicht anders angegeben.

Blockierungslösung (ELISA)	5% (w/v)	PBS BSA
Blockierungslösung (Western Blot)	5% (w/v)	PBST Magermilchpulver
Blockierungspuffer (Kopplung an Sepharose)	200 mM 500 mM	Glycin NaCl, pH 8,0
Coomassie-Waschlösung (Färbung von Proteinen)	25% (v/v)	Methanol
DNA-Probenpuffer (5x) (DNA-Gelelektrophorese)	50% (v/v) 100 mg/ml	TAE Glycerin Orange G
Dialysepuffer (Dialyse Periplasma-Aufschluss)	100 mM 150 mM 5 mM	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl EDTA

dNTP-stock Lösung (PCR)	je 25 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Elutionspuffer (Affinitätschromatographie)	50 mM 150 mM 0,2% (w/v)	Ethanolamin, pH 11,5 NaCl CHAPS
Elutionspuffer (Strep-tag Aufreinigung)	100 mM 150 mM 1 mM 2,5 mM	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl EDTA Desthiobiotin
Ethidiumbromid-Färbelösung (DNA-Gele)	0,5 µg/ml	TAE Ethidiumbromid
Homogenisierungspuffer (Gehirnhomogenisierung)	25 mM 150 mM 1 mM 1 mM 1 Tablette/10 ml	Tris/HCl, pH 7,4 NaCl MgCl ₂ CaCl ₂ Protease inhibitor cocktail (COMPLETE EDTA-frei, Roche)
Kolloidales Coomassie (Färbung von Proteinen)	20% (v/v) 20% (v/v) 60% (v/v)	Methanol Roti-Blue (5x) ddH ₂ O
Kopplungspuffer (Kopplung an Sepharose)	100 mM 500 mM	NaHCO ₃ NaCl, pH 8,3
Neutralisationspuffer (Affinitätschromatographie)	1 M	Tris/HCl, pH 6,8

OPD Färbelösung (ELISA)	1 mg/ml 10% (v/v)	ortho-Phenylendiamin (OPD) stable Peroxide Substrate Buffer (Pierce)
PBS	137 mM 2,7 mM 8 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBST	0,05% (v/v)	PBS Tween 20
Periplasma-Aufschlusspuffer (Isolierung von Proteinen)	100 mM 500 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8,0 Saccharose EDTA
Quelllösung (Kopplung an Sepharose)	1 mM	HCl
Regenerationspuffer (Strep-tag Aufreinigung)	100 mM 150 mM 1 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl EDTA HABA (hydroxy-azophenyl- benzoic acid)
Regenerationspuffer A (Affinitätschromatographie)	100 mM 500 mM	Tris/HCl, pH 8,5 NaCl
Regenerationspuffer B (Affinitätschromatographie)	100 mM 500 mM	Natriumacetat, pH 4,5 NaCl
Regenerationspuffer C (Affinitätschromatographie)	0,01% (w/v)	PBS NaN ₃

SDS-Laufpuffer (10x) (SDS-PAGE)	250 mM 1,92 M 1% (w/v)	Tris/HCl, pH 8,3 Glycin SDS
SDS-Probenpuffer, nativ (5x) (SDS-PAGE)	125 mM 20% (v/v) 0,05% (w/v)	Tris/HCl, pH 6,8 Glycerin Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer, reduzierend (5x) (SDS-PAGE)	125 mM 4% (w/v) 20% (v/v) 10% (v/v) 0,05% (w/v)	Tris/HCl, pH 6,8 SDS Glycerin β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
Stopp-Lösung (ELISA)	2,5 M	H ₂ SO ₄
Stripping-Lösung (Western Blot)	0,5 M 0,5 M	Essigsäure NaCl
TAE (50x) (Agarose-Gelelektrophorese)	2 M 1 M 50 mM	Tris, pH 8,0 Essigsäure EDTA
TBS (ELISA)	50 mM 150 mM	Tris/HCl, pH 7,4 NaCl
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM 192 mM 10% (v/v)	Tris/HCl, pH 8,3 Glycin Methanol
Tris pH 6,8 – 8,8	1 M	Tris

(SDS-PAGE)	je nach pH-Wert	HCl
Waschpuffer	100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
(Strep-tag Aufreinigung)	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Waschpuffer I	100 mM	Natriumacetat
(Kopplung an Sepharose)	500 mM	NaCl, pH 4,0
Waschpuffer II	100 mM	NaHCO ₃
(Kopplung an Sepharose)	500 mM	NaCl, pH 8,3
Waschpuffer III		1x PBS
(Kopplung an Sepharose)		
Waschpuffer A	25 mM	Tris/HCl, pH 7,4
(Affinitätschromatographie)	150 mM	NaCl
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
Waschpuffer B	25 mM	Tris/HCl, pH 7,4
(Affinitätschromatographie)	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1% (v/v)	Triton X-100
	0,02% (w/v)	NaN ₃
Waschpuffer C	25 mM	Tris/HCl, pH 7,4
(Affinitätschromatographie)	500 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Triton X-100
	0,02% (w/v)	NaN ₃

3.3 Nährmedien für Bakterien

Die Nährmedien wurden autoklaviert und hitzelabile Zusätze wie Antibiotika und Kaliumdihydrogenphosphat sterilfiltriert und nach Abkühlung auf weniger als 55°C zugesetzt.

LB-Medium	10 g/l	Pepton
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
LB-Ampicillin-Medium	100 mg/l	Ampicillin
	in	LB-Medium
LB-Ampicillin-Platten	1,5% (w/v)	Agar-Agar
	100 mg/l	Ampicillin
	in	LB-Medium
LB-Chloramphenicol-Medium	50 mg/l	Chloramphenicol
	in	LB-Medium
LB-Chloramphenicol-Platten	1,5% (w/v)	Agar-Agar
	50 mg/l	Chloramphenicol
	in	LB-Medium
LB-Amp-X-Gal-Platten	1,5% (w/v)	Agar-Agar
	100 mg/l	Ampicillin
	100 mg/l	X-Gal
	in	LB-Medium
TB-Medium	12 g/l	Pepton
	24 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	Glycerol
	23,14 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat

	125,41 g/l	(anhydrous, monobasic) Kaliumdihydrogenphosphat (anhydrous, dibasic)
TB-Chloramphenicol-Medium	50 mg/l in	Chloramphenicol TB-Medium

3.4 Bakterienstämme

Es kamen folgende *E. coli*-Stämme zur Anwendung:

<i>E. coli</i> DH5α (aus ZMNH-Stammsammlung)	Genotyp: F ⁻ , deoR, endA1, gyrA96, hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argFV169), Φ 80lacZ Δ M15
<i>E. coli</i> HB2151 (aus ZMNH-Stammsammlung)	Genotyp: nalr thi-1 ara Δ (lac-proAB) [F' proAB+ lacIq lacZ Δ M15]
<i>E. coli</i> JM83 (aus ZMNH-Stammsammlung)	Genotyp: F ⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lac-proAB) ara rpsL

3.5 Molekular- und Proteingewichtsstandards

1 kb Plus DNA Leiter (Invitrogen)	Der Standard enthält 12 Markerbanden, die folgende Molekulargewichte zeigten: 12 kbp, 5 kbp, 2 kbp, 1,65 kbp, 1 kbp, 850 bp, 650 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp und 100 bp.
---	--

Precision Plus Protein™ folgende	Der Standard enthält 10 Markerproteine, die
Standards All Blue (Bio-Rad)	Molekulargewichte zeigen: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa und 10 kDa.

3.6 Reaktionskits

Folgende Kits fanden Anwendung:

BCA-Protein Testkit (Pierce)	Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration
PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit (Invitrogen)	Zur Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)	Zur Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)	Aufreinigung von PCR-Produkten

3.7 Antikörper

3.7.1 Primäre Antikörper

HNK-1 Antikörper 412 (IgG) (im ZMNH hergestellt)	Monoklonaler Antikörper (Maus)
HNK-1 Antikörper (IgM) (im ZMNH hergestellt)	Monoklonaler Antikörper (Maus)
HNK-1 anti-idiotypischer Antikörper (im ZMNH hergestellt)	Monoklonaler Antikörper aus Phage-Display
5F4 Antikörper (im ZMNH hergestellt)	Monoklonaler Antikörper (Maus)
Strep-MAB HRP (IBA)	Monoklonaler Antikörper (Maus)
L5 Antikörper (im ZMNH hergestellt)	Monoklonaler Antikörper (Ratte)

3.7.2 Sekundäre Antikörper und Strep-Tactin HRP-Konjugat

Anti Maus HRP (Jackson ImmunoResearch)	Polyklonaler Antikörper mit Peroxidase konjugiert
Anti Ratte HRP (Jackson ImmunoResearch)	Polyklonaler Antikörper mit Peroxidase konjugiert

Strep-Tactin HRP-Konjugat (IBA)	Zur Detektion des Strep-tags
------------------------------------	------------------------------

3.8 Vektoren, Enzyme

pGEM-T Easy (Promega, Mannheim)	Vektor zur Subklonierung von PCR amplifizierten DNA-Fragmenten mittels T/A-Klonierung
------------------------------------	--

pASK 118	Expressionsvektor aus „Vektorsammlung Institut Schachner“
----------	--

Phusion Hot Start DNA-Polymerase (Finnzymes)	für die PCR-Amplifikation
---	---------------------------

Taq DNA-Polymerase (New England BioLabs)	für die PCR-Amplifikation
---	---------------------------

Sbf I (New England BioLabs)	für die Restriktionsklonierung
--------------------------------	--------------------------------

Xho I (New England BioLabs)	für die Restriktionsklonierung
--------------------------------	--------------------------------

Pst I (Isoenzym zu Sbf I) (New England BioLabs)	für die Restriktionsklonierung
--	--------------------------------

T4 DNA Ligase (New England BioLabs)	für die Ligation von DNA-Fragmenten
--	-------------------------------------

3.9 Primer (von Metabion synthetisch hergestellt)

3.9.1. Amplifikationsprimer

Klon22_SbfI (forward):

5'-ACC TGC AGG AGT CTG GGG GAG GTG TGG TAC GG-3'

Klon22_XhoI (reverse):

5'-TCT CGA GCT TGG TCC CTC CGC CGA ATA CCA CA-3'

3.9.2 Sequenzierprimer

p88_XBAI (forward):

5'-GTG AAA TGA ATA GTT CGA CAA AAA TCT AGA-3'

p88_NAEI (reverse):

5'-GAG CCC CCG ATT TAG AGC TTG ACG GGG AAA-3'

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wird zur Amplifikation von linearer DNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthält zu amplifizierende doppelsträngige DNA, ein Mix aus den vier Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs), DNA-Polymerase, PCR-Reaktionspuffer, um die geeigneten Bedingungen für die Polymerase bereit zu stellen und $MgCl_2$, wobei die Mg^{2+} -Ionen die negativ geladenen Triphosphate der dNTPs stabilisieren. Außerdem enthält der Ansatz forward und reverse-Oligonukleotid-Primer, die synthetisch hergestellt wurden (Metabion, Martinsried) und in einer vielfachen Konzentration im Vergleich zur DNA-Vorlage zugegeben wurden. Für PCR-Produkte, die in Plasmidvektoren kloniert wurden, enthielten die Primer spezifische Erkennungssequenzen des für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzym.

Die erste der drei sich wiederholenden Phasen der PCR ist die Denaturierungsphase, in welcher die DNA denaturiert wird und zwei Einzelstränge entstehen. In der darauffolgenden Anlagerungsphase binden die Primer an die DNA-Einzelstränge. Anschließend wird der DNA-Strang in der Elongationsphase verlängert und in einer einmaligen Endphase werden die Stränge aufgefüllt.

Je nach Fragestellung wurden für die Amplifikation der DNA zwei unterschiedliche DNA-Polymerasen verwendet: Phusion Hot Start und Taq DNA-Polymerase.

4.1.1.1 Amplifikation mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase

Bei nachfolgender Ligation der PCR-Fragmente in ein Plasmid wurde die Phusion Hot Start DNA-Polymerase (Finnzymes) gewählt, die sich durch eine verringerte Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden auszeichnet.

Die 50 µl Reaktionsansätze wurden auf Eis angesetzt, enthielten x µl DNA (< 10 ng), 10 µl 5x Phusion HF Buffer, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl vom Primer-Mix (1 µl Primer (forward) + 1 µl Primer (reverse) + 8 µl Nuklease-freies H₂O), 1,5 µl DMSO, 0,5 µl Phusion Hot Start DNA-Polymerase (2 U/µl) und mit Nuklease-freiem H₂O auf 50 µl aufgefüllt.

Die Anlagerungstemperatur wurde mit dem "Tm calculator" (www.finnzymes.us) berechnet. Die Reaktion im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research) lief mit folgendem Programm ab:

Initiale Denaturierung	98°C	30 sek	
Denaturierungsphase	98°C	5 sek	} 30 Zyklen
Anlagerungsphase	70°C	20 sek	
Elongationsphase	72°C	20 sek	
Auffüllreaktion	72°C	10 min	

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben kurzfristig bei 4°C gelagert. Aufgrund der hohen Präzision der Phusion Hot Start DNA-Polymerase war eine Aufreinigung des PCR-Produkts aus dem Gel nicht nötig.

4.1.1.2 Amplifikation mit der Taq DNA-Polymerase

Bei nachfolgender Ligation der PCR-Fragmente in den pGEM-T Easy Vektor wurde die Taq DNA-Polymerase (New England BioLabs) gewählt. Die Taq-Polymerase ermöglicht eine T/A-Klonierung (siehe 4.1.5), reagiert aber im Vergleich zur Phusion Hot Start DNA-Polymerase weniger empfindlich auf Verunreinigungen, besitzt eine höhere Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden und die mit der Taq DNA-Polymerase erhaltenen Fragmente wurden nach der PCR aus dem Gel aufgereinigt (siehe 4.1.4).

Die 50 µl Reaktionsansätze wurden auf Eis angesetzt, enthielten x µl DNA (< 50 ng), 25 µl Taq PCR Master Mix, 2 µl vom Primer-Mix (1 µl Primer (forward) + 1 µl Primer (reverse) + 8 µl Nuklease-freiem H₂O) und mit Nuklease-freiem H₂O auf 50 µl aufgefüllt.

Die Reaktion im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research) lief mit folgendem Programm ab:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierungsphase	94°C	45 sek	} 30 Zyklen
Anlagerungsphase	63°C	1 min	
Elongationsphase	72°C	1 min	
Auffüllreaktion	72°C	10 min	

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben kurzfristig bei 4°C gelagert. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel aufgereinigt und mit dem pGEM-T Easy Vektor ligiert.

4.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für weitere Arbeiten mit den PCR-Produkten mussten diese von verbliebenen Primern und Nukleotiden gereinigt und umgepuffert werden. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß den Angaben im Hersteller-Handbuch.

4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Bei der Methode der Gelelektrophorese werden unterschiedlich große DNA-Fragmente getrennt. Durch die negative Eigenladung von DNA-Fragmenten wandern diese im elektrischen Feld durch ein Gel zur Anode, wobei kleine Fragmente mit niedrigem molekularem Gewicht schneller als große Fragmente mit hohem Gewicht wandern.

Von der Größe der aufzutrennenden Fragmente abhängig, wurden Gele mit verschiedenen Agarosekonzentrationen (0,5 - 2%ig (w/v)) hergestellt, indem die Agarose abgewogen, in 1x TAE-Puffer zu einer homogenen Lösung aufgeköcht und das flüssige Agarose-Gel in einen Gelschlitten gegossen wurde.

Zur Auftrennung wurden horizontale Agarose-Gele in einer Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT, Bio-Rad) gegossen, nach dem Auspolymerisieren mit 1x TAE-Puffer überschichtet und mit Proben beladen, die zuvor mit DNA-Probenpuffer versetzt wurden.

Als Referenz für das Molekulargewicht wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) verwendet, der parallel zu den Proben gelaufen ist. Die Elektrophorese erfolgte je nach Anwendung und Gelgröße bei 80 - 120 Volt.

Die Gele wurden nach der Auftrennung der Fragmente 20 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und durch Anregung mit UV-Licht (Chroma 41, Herolab) wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Mittels eines Gel-Dokumentationsgeräts (E.A.S.Y.RH, Herolab) wurden die Banden im UV-Licht detektiert und zur Dokumentation ein Ausdruck erstellt (Video Copy Processor, Mitsubishi).

4.1.4 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Zu klonierende DNA-Fragmente wurden nach der PCR oder dem Restriktionsverdau (siehe 4.1.8) elektrophoretisch in einem Agarose-Gel separiert und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel isoliert. Dazu lagen die Gele unter UV-Licht (Chroma 41, Herolab), die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet. Die DNA wurde mit 30 µl vorgewärmten EB-Puffer eluiert und für die Ligation (siehe 4.1.10) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten in den pGEM-T Easy Vektor

Die PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) über T/A-Klonierung subkloniert.

Amplifiziert wurden die PCR-Fragmente mit der Taq-Polymerase. Die Taq-Polymerase adenyliert das PCR-Produkt am 3'-Ende, wodurch die Polymerase einen sogenannten 3'-A-Überhang einfügt. Der pGEM-T Easy Vektor hingegen weist T-Überhänge an der Insertionsstelle auf, wodurch sich das Insert leicht in den Vektor ligieren lässt. Dies ermöglicht direktes Klonieren von PCR-Produkten in einen linearisierten Vektor.

Die Ligation erfolgte nach Handbuch des Herstellers und der gesamte Ansatz wurde in kompetente *E. coli*-Zellen DH5 α transformiert. Durch blau/weiß Selektion können Plasmide, die das gewünschte Insert aufgenommen haben (weiße Kolonie), von denen, die kein Insert tragen (blaue Kolonie), unterschieden werden.

Der Vektor enthält Basensequenzen häufiger Restriktionsenzyme. Mit Hilfe der Schnittstellen (z.B. *sbfl* und *xhoI*) wurde das Fragment wieder aus dem pGEM-T Easy Vektor herausgeschnitten, um anschließend in den Zielvektor kloniert zu werden.

4.1.6 Transformation von *E. coli*

Für Klonierungen und Standard-Anwendungen molekularbiologischer Arbeiten wurde die DNA primär in kompetente *E. coli* DH5 α Bakterien transformiert. Für Expressionen (siehe 4.2.1) wurde meist in kompetente *E. coli* HB2151 Bakterien transformiert.

50 μ l der bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 50 - 100 ng Plasmid-DNA oder 10 μ l eines Ligationsansatzes versetzt. Die Zellsuspension inkubierte 30 min auf Eis, bevor der Ansatz 90 sek einem Hitzeschock von 42°C im Heizblock ausgesetzt wurde.

Hierbei erleichtert die Anwesenheit von positiv geladenen Ca²⁺-Ionen die Aufnahme der DNA in die Zelle, indem die negativen Ladungen der DNA und der Bakterienmembran neutralisiert werden.

Nach 2 min Abkühlung auf Eis wurde der Zellsuspension zur Regeneration 800 μ l LB-Medium zugesetzt und der Ansatz für mindestens 1 h bei 37°C geschüttelt.

Von der Zellsuspension wurden 100 µl und anschließend die restlichen 700 µl 30 sek bei 12.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet im Restüberstand resuspendiert und auf zwei antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.1.7 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA kann aus Bakterienzellen isoliert und aufgereinigt werden. Hierzu wurden Kits verwendet, die mittels alkalischer Lyse der Zellen und anschließender Aufreinigung über einen Filter bei bestimmten Salzkonzentrationen die Plasmid-DNA freisetzen.

4.1.7.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Plasmid-Minipräparation)

Hierzu wurden 5 - 7 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in einem Anzuchtröhrchen (13 ml, Sarstedt) mit einer Kolonie einer bewachsenen LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde die Übernachtskultur mit dem PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet.

Die mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluierte DNA wurde durch Restriktionsverdau charakterisiert oder bei -20°C gelagert.

4.1.7.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Plasmid-Maxipräparation)

Hierzu wurden 100 - 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie einer bewachsenen LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde nach der Elution in 100 - 250 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme erkennen eine palindrome Sequenz von 4 - 8 Basen und führen innerhalb oder außerhalb dieser Sequenz eine hydrolytische Spaltung durch. Bei dieser Spaltung entstehen glatte (blunt) oder überhängende (sticky) Enden der DNA.

Abhängig von der DNA-Sequenz, die geschnitten werden soll, wird ein passendes Enzym ausgewählt.

Alle Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reaktionspuffer wurden von der Firma New England BioLabs (Frankfurt/Main) bezogen. Die Menge an eingesetzter DNA variierte je nach Konzentration der DNA-Lösung. Für einen Verdau wurden jeweils 50 µl Ansätze hergestellt. Bei Vektorverdauen wurden volumenanteilig 10% Puffer, 1 – 2 µl Restriktionsenzyme und 1 – 5 µg Vektor verwendet. Beim Verdau von PCR-Produkten setzte sich der 50 µl Ansatz volumenanteilig aus 50 – 70% PCR-Produkt, 10% Puffer und 1 – 2 µl Restriktionsenzymen zusammen.

Die Reaktionsspaltungen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die vom "Double Digest Finder" (www.neb.com) vorgeschlagenen Pufferbedingungen gewählt. Bei schlechter Kompatibilität der Enzyme wurden sie nacheinander zum Verdau eingesetzt.

Das Restriktionsprodukt wurde nach Separation im Agarose-Gel aus dem Gel eluiert (siehe 4.1.4).

4.1.9 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die Absorption einer Lösung ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz direkt proportional zur Konzentration der gelösten Substanz. Diese Beziehung wird zur spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA genutzt.

Das Spektralphotometer (BioSpec-mini, Shimadzu) wurde zuerst mit einer Eichprobe (Nuklease-freies Wasser) geeicht. Konzentration und Reinheitsgrad von DNA-Präparationen wurden durch Messung der OD_{260} bzw. OD_{260}/OD_{280} in einer Quarzküvette bestimmt. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren aufgrund der enthaltenen Purin- und Pyrimidinbasen. Ein OD_{260} Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich durch den Wert des Quotienten OD_{260}/OD_{280} beurteilen, indem das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt. Bei einer guten Reinheit der DNA sollte der Quotient mindestens 1,8 betragen.

4.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden die isolierten und gereinigten DNA-Fragmente mit einer Ligase kovalent verknüpft.

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte mit der T4 DNA Ligase (New England BioLabs), die sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden verknüpfen kann. Um ein optimales Verhältnis der beiden Fragmente zueinander sicherzustellen, wurde ein molares Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA von 1:3 und 1:5 sichergestellt.

50 – 100 ng geschnittener Vektor-DNA sollten für die Ligation eingesetzt werden und 20 μl Ligationsansätze aus 1 μl T4 DNA-Ligase, 10% Reaktionspuffer, Insert und Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Zur Kontrolle wurden parallel 50 – 100 ng des Vektorfragments ohne Insert-DNA ligiert.

Der Ansatz inkubierte im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research) für 1,5 – 2 h bei 16°C. Die Vermehrung des rekombinanten Plasmids erfolgte durch Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* (siehe 4.1.6) und einer anschließenden Minipräparation (siehe 4.1.7.1).

4.1.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mittels ABI PRISM Protokoll von der Sequenzierabteilung des ZMNH. Zur Vorbereitung wurde 250 - 500 ng der zu analysierenden DNA mit 5 - 10 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers (Metabion, Martinsried, siehe 3.9.2) gemischt und 5% DMSO in der Endkonzentration zugegeben. Ein Reaktionsansatz betrug 8 µl.

Zum Abgleich auf eventuelle Sequenzhomologien wurden Internet-Datenbanken genutzt (siehe 4.4).

4.2 Gentechnische Methoden

4.2.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

4.2.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

Mit der Transformation des rekombinanten Plasmids in den *E. coli* Expressionsstamm HB2151 und das anschließende Animpfen einer 7 ml Vorkultur (LB-Medium mit 50 mg/l Chloramphenicol) wurde begonnen.

Die Anzucht erfolgte im 1 l Erlenmeyerkolben in 200 ml LB- oder TB-Medium, versetzt mit 50 mg/l Chloramphenicol. Das Medium wurde 3,5%ig mit der Übernachtvorkultur des mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft.

Während der Inkubation der Kultur bei 37°C und 180 rpm wurde das Wachstum durch regelmäßige Messung der optischen Dichte überprüft (siehe 4.2.1.3).

Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression mit 20 µl (1:10.000) Anhydrotetracyclin-Lösung 2 mg/ml in DMF (Acros Organics) gestartet. Die induzierte Kultur wurde für 3 h bzw. über Nacht bei 30°C weiter inkubiert und anschließend geerntet.

Zum Ernten wurde die Kultur 15 min bei 8.000 g und 4°C in der Sorvall-Zentrifuge (Sorvall RC-5C, GRA-Rotor, Model SLA-1500) abzentrifugiert. Der Medienüberstand wurde abgenommen und das Zellsediment in maximal 5 ml (3 h Kultur) bzw. 10 ml

(Übernachtskultur) 4°C kaltem Periplasma-Aufschlusspuffer auf Eis resuspendiert und für 30 min inkubiert.

Der Periplasma-Aufschlusspuffer führt durch einen osmotischen Schock zur Destabilisierung der äußeren Bakterienzellmembran, wodurch es zum Austritt der löslichen periplasmatischen Proteine kommt. Durch erneute Zentrifugation (15 min bei 4°C und 11.000 rpm) wurden die Proteine von den anderen Zellbestandteilen getrennt und fanden sich im Überstand wieder.

4.2.1.2 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Zur Produktion ausreichender Mengen des zu charakterisierenden HNK-1 anti-idiotypischen Antikörpers wurde ein Fermentationslauf im Laborfermenter (Biostat B 10 l, B. Braun Biotech) mit einem Mediumsvolumen von 6 l gestartet. Die Bakterienzellen des Stamms *E. coli* HB2151 wurden in dem Komplexmedium TB kultiviert, dem Glycerol als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde.

Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck wurden über Elektroden und Regeleinheiten überwacht.

Für die Vorvorkultur wurden 6 ml LB-Medium mit 50 mg/l Chloramphenicol versetzt, mit einer transformierten Einzelkolonie angeimpft und für mindestens 6 h bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 300 ml TB-Medium (Terrific Broth-Medium) mit 50 mg/l Chloramphenicol, Salzen und Glycerol (siehe 3.3). TB-Medium ist ein reichhaltiges Medium zur Anzucht von *E. coli*. Terrific Broth erlaubt im Vergleich zu LB-Medium eine höhere Zelldichte. Die Vorkultur wurde 2%ig, also mit der kompletten Vorvorkultur, angeimpft und über Nacht (mindestens 19 h) bei 30°C und 120 rpm inkubiert. In der Zwischenzeit wurden der Fermenter, das Medium und alle mit dem Medium in Kontakt tretenden Gegenstände autoklaviert und die Elektroden nach Herstellerangaben kalibriert.

Zum Zeitpunkt des Animpfens des Laborfermenters, enthielt dieser 6 l TB-Medium, bestehend aus:

72 g Pepton

144 g Hefeextrakt

600 ml Kaliumhydrogenphosphat (anhydrous und anhydrous); separat sterilisiert

3 ml Chloramphenicol

30 ml 1 M MgSO₄ (5 mM)

30 ml Glycerol; separat autoklaviert

600 µl Antischaummittel

+

300 ml dicht angewachsener Vorkultur

Über Nacht wurde der Fermenter auf eine Temperatur von 26°C, einen pH-Wert von 7,0 und eine Rührerdrehzahl von 250 rpm eingestellt.

Am nächsten Morgen wurde der Rührer auf 350 rpm, der Feed (autoklaviertes Glycerol mit ddH₂O, 50:50) erst auf 7 ml/h und danach auf 14 ml/h erhöht.

Im Verlauf der Fermentation wurde mit Druckluft und Sauerstoff (0,5 – 1 bar) begast, der pH-Wert auf 7,0 nachreguliert, die Rührergeschwindigkeit auf 450 rpm und die Temperatur auf 28°C erhöht.

Während der Fermentation wurde kontinuierlich die optische Dichte gemessen und das Zellfeuchtgewicht "Wet Cell Weight" (WCW) notiert, wodurch es möglich war den optimalen Zeitpunkt der Induktion der Proteinproduktion mit 1:10.000 Anhydrotetracyclin (2 mg/ml in DMF) bestimmen zu können. Induziert wurde bei einer optischen Dichte von 14,60 und einem WCW von 64,2 mg.

Die Kultivierung wurde für weitere 3 h bei 28°C fortgesetzt. Zum Ernten wurde die Kultur 15 min bei 8.000 g und 4°C in der Sorvall-Zentifuge (Sorvall RC-5C, GRA-Rotor, Model SLA-1500) abzentrifugiert. Der Medienüberstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 300 ml 4°C kaltem Periplasma-Aufschlusspuffer auf Eis resuspendiert und für 30 min rührend inkubiert bis das komplette Zellpellet gelöst war. Der Periplasma-Aufschlusspuffer führt zur Destabilisierung der äußeren Bakterienzellmembran, wodurch es zum Austritt der löslichen periplasmatischen Proteine kommt. Durch Einstellen der Suspension auf 200 µg/ml Lysozym und 10 mM

EDTA wurde der enzymatische Aufschluss der Bakterienzellen zusätzlich unterstützt und der Periplasma-Aufschluss forciert.

Durch erneute Zentrifugation (20 min bei 4°C und 8.000 g) wurden die Proteine von den anderen Zellbestandteilen getrennt und fanden sich im Überstand wieder.

Die klare Proteinlösung wurde bei -20°C eingefroren oder jeweils 50 ml für die Aufreinigung gegen 5 l Dialysepuffer, der 2 mal gewechselt wurde, dialysiert (siehe 4.2.2.1).

4.2.1.3 Messung der optischen Dichte von Bakterien

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde in einem Photometer (BioSpec-mini, Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen das entsprechende Kulturmedium gemessen. Ab einer OD_{600} größer 1,0 wurde die Zellsuspension vor der Messung in einer Küvette mit Kulturmedium verdünnt. 1 ml einer Bakteriensuspension mit einer OD_{600} von 0,6 enthält ungefähr $1,5 \times 10^8$ Bakterien.

4.2.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.2.1 Strep-tag / Strep-Tactin-System zur Antikörperaufreinigung

Der anti-idiotypische Antikörper wurde in einen Vektor mit einem Strep-tag kloniert. Dieser Tag ermöglicht die Aufreinigung des Antikörpers aus einer Proteinlösung, indem sich der Tag an eine Matrix binden lässt. Von der Firma IBA wurde das Strep-tag / Strep-Tactin-System entwickelt. An das dabei verwendete Säulenmaterial ist Strep-Tactin, ein Streptavidin-Derivat, gekoppelt. Der Strep-tag besteht aus den acht Aminosäuren WSH₂PQFEK, die eine hohe Strep-Tactin-Bindungsaffinität aufweisen. Die Reinigung des Fusionsproteins ist somit durch Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin-Sepharose möglich.

Jeweils 50 ml des Periplasma-Aufschlusses von der Produktion des anti-idiotypischen Antikörpers (siehe 4.2.1) wurden zur Aufreinigung eingesetzt. Dialysiert wurde die Proteinlösung über Nacht bei 4°C im Dialyseschlauch (ZelluTrans Dialyseschläuche, Roth) mit einer Ausschlussgröße von MWCO 4.000 – 6.000 gegen 5 l Dialysepuffer (siehe 3.2). Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung mit Avidin abgeblockt (1 - 2 mg Avidin für 50 ml Periplasma-Aufschluss) und zur Abtrennung ausgefallener Partikel und Proteine erfolgte eine Sterilfiltrierung mit 0,45 µm Filtern (Steril-Filter FP 30/0,45 CA-S, Whatman Schleicher & Schuell). Die so erhaltene Lösung wurde zur Strep-tag Aufreinigung eingesetzt.

Die Strep-Tactin Matrix und die Puffer (siehe 3.2) wurden von der Firma IBA bezogen und die Aufreinigung erfolgte mittels Gravity-Flow- (Schwerkraft-) und FPLC- (Fast Protein Liquid Chromatographie) Verfahren.

Beide Säulen wurden zuerst mit Waschpuffer äquilibriert, die Gravity-Flow-Säule bis die gelbe Farbe des Regenerationspuffers ausgewaschen war und die FPLC-Säule bis zu einer konstanten Extinktion/Basislinie.

Nach der Äquilibrierung der Säulen wurde die Lösung mit dem anti-idiotypische Antikörper auf die Säulen gegeben. Dabei wurde der anti-idiotypische Antikörper über den Strep-tag an die Strep-Tactinmatrix gebunden und durch die nachfolgenden Waschschritte, wurden von den spezifisch gebundenen Antikörpern noch vorhandene bakterielle Proteine entfernt. Die Gravity-Flow-Säule wurde 8x mit 10 ml Waschpuffer und die FPLC-Säule solange gewaschen, bis sich eine konstante Linie der UV-Messung eingependelt hatte. Die FPLC wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min betrieben und der Druck auf die Säule durfte einen Wert von 250 psi nicht überschreiten.

Mit Hilfe von Desthiobiotin, einem Biotin-Derivat, wurde der anti-idiotypische Antikörper von der Säule eluiert. Das Desthiobiotin bindet im Gegensatz zu Biotin reversibel an Strep-Tactin. Im Gravity-Flow-Verfahren wurde mit 4x 4 ml und 1x 9 ml Elutionspuffer eluiert, im FPLC-Verfahren bis ein Peak in der UV-Messung zu verzeichnen war.

Das im Regenerationspuffer enthaltene HABA dient der Regeneration der Sepharose und verdrängt Desthiobiotin, wobei sich das Säulenmaterial bei vollständiger Besetzung aller Bindungsstellen orange färbt.

4.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<u>Trenngel (12,5 ml, 15% Acrylamid):</u>		<u>Sammelgel (5 ml, 6% Acrylamid):</u>	
1,38 ml	ddH ₂ O	3,36 ml	ddH ₂ O
6,25 ml	30% Acrylamid	995 µl	30% Acrylamid
4,65 ml	1 M Tris/HCl (pH 8,8)	625 µl	1 M Tris/HCl (pH 6,8)
125 µl	10% SDS	50 µl	10% SDS
62,5 µl	10% APS	25 µl	10% APS
6,25 µl	TEMED	5 µl	TEMED

Proteingemische wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Hauptsächlich wurden Trenngele mit 15% Acrylamid verwendet. Nach der Affinitätschromatographie wurden die potentiellen neuen Rezeptoren zur Identifizierung auf 12 oder 8%ige Gele aufgetragen und zur Massenspektrometrie eingereicht (siehe 4.2.2.12).

Nach dem Gießen und vollständiger Polymerisierung wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in welches ein Probenaschen-Kamm eingesetzt wurde. Es wurden Kämmen mit 10 und mit 15 Taschen verwendet, die ein maximales Ladevolumen von 40 µl bzw. 25 µl besitzen. Um die Elektrophorese durchzuführen, wurde das Gel in eine Minigelkammer (Mini Trans Blot, Bio-Rad) eingeführt und das Pufferreservoir mit SDS-Laufpuffer befüllt.

Erst direkt vor Auftragung der Proben wurde der Kamm entfernt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert oder nativ mit nicht-reduzierendem Probenpuffer aufgetragen.

Die Proteine werden durch das im Probenpuffer enthaltene SDS, welches an die Aminosäuren der Proteine bindet, mit einer zu ihrer Größe proportionalen negativen Ladung versehen, was die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Gel ermöglicht. Außerdem bewirkt SDS und das Aufkochen auf 95°C die Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Moleküle.

Zusätzlich können reduzierende Thiole wie β -Mercaptoethanol, das die Disulfidbrücken der Tertiärstruktur der Proteine durch Reduzieren zerstört, dem Probenpuffer zugesetzt werden.

Als Referenz für die Proteingröße wurde der Molekulargewichtsstandard Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad) verwendet. Während sich die Lauffront im Sammelgel befand, wurde die Gelelektrophorese mit 100 V und im Trenngel mit 180 – 200 V betrieben. Der Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte durch eine Immunoblot-Analyse oder Coomassie-Färbung.

4.2.2.3 Western Blot

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse können Proteine durch einen spezifischen Antikörper in einem komplexen Gemisch von Proteinen nachgewiesen werden. Dies ermöglicht die Identifizierung des anti-idiotypischen Antikörpers unter den anderen in der Probe vorhandenen Proteinen und eine Größenabschätzung. Die Proteine werden hierfür zunächst durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihren relativen Größen aufgetrennt und danach auf eine Trägermembran transferiert. Es wird die negative Ladung der Proteine ausgenutzt, damit Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern. Der spezifische Nachweis erfolgt anschließend durch eine Immunoblot-Analyse.

Elektrophoretischer Transfer auf eine Nitrozellulosemembran

Für eine nachfolgende Immunoblot-Analyse wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch einen elektrophoretischen Transfer aus dem SDS-Gel auf eine Trägermembran zugänglich gemacht.

Die nachfolgenden Schritte wurden ausnahmslos in Transferpuffer durchgeführt. Das SDS-Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm, Protran BA 85, Whatman Schleicher & Schuell) gelegt, die sich ihrerseits auf zwei übereinandergelegten Whatman-Filterpapieren (Gel Blotting Papier, Whatman Schleicher & Schuell) befand und von zwei weiteren Papieren bedeckt wurde. Für einen fehlerfreien Transfer wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran befanden.

Bevor die Blotkammer geschlossen werden konnte, wurden auf der Ober- und Unterseite des Transfersandwichs Schwämme platziert.

Die Blotkammer wurde in die Transferzelle (Mini Trans Blot, Bio-Rad) positioniert und mit eiskaltem Transferpuffer befüllt. Zur unterstützenden Kühlung wurde ein Eisblock mit in die Transferzelle gegeben und der Transferpuffer zur besseren Wärmeverteilung gerührt. Der elektrophoretische Transfer fand bei 80 V (Power Pac 300, Bio-Rad) und 4°C für 90 min statt.

4.2.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nachdem der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western Blot beendet war, wurde die Membran mit PBS gewaschen, Blockierungslösung (5% Magermilchpulver in PBST) zugegeben und die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Alle folgenden Inkubations- oder Waschschrte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1 - 2 µg/ml für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf die Membran gebracht und inkubiert. Nachdem der ungebundene Primärantikörper durch 5x 5 min Waschen der Membran mit PBST entfernt worden war, wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (1:10.000 α -Maus HRP) inkubiert. Bei dem Strep-tag-Nachweis, der kein Antikörper-Nachweis war, wurde Strep-Tactin HRP (1:100.000) nach Herstellerangaben (IBA, Göttingen) eingesetzt und zuvor mit Hühnereineiweiß-Lösung oder mit Avidin erste Bindungen (Biotinyl Protein) abgeblockt.

Im letzten Schritt wurde erneut 5x 5 min mit PBST gewaschen und die Proteinbanden mit Hilfe verstärkter Chemilumineszenz nachgewiesen.

Die Meerrettichperoxidase (HRP engl. horseradish) ist eine Peroxidase aus dem Meerrettich und an die sekundären Antikörper gekoppelt, um ihre Bindung an die Primärantikörper mittels Chemilumineszenz nachweisen zu können.

Proteinnachweis mittels Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenzreaktion des Luminols lässt sich durch die Peroxidase aus dem Meerrettich (HRP) katalysieren. Die Membran mit dem gebundenen Strep-Tactin HRP oder α -Mouse HRP, wurde für 10 min mit Detektionssubstrat (Super Signal extended

West, Pierce) inkubiert. Danach wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Filmkassette (PL-B Type 24 x 30 cm, Okamoto) gelegt. Die Auswertung erfolgte durch Belichtung eines lichtempfindlichen Röntgenfilms (Biomax-MR, Kodak) in der Dunkelkammer. Die Exposition reichte je nach Bedarf von 5 sek bis zu mehreren Stunden. Nach der Belichtung wurde der Film bis zu 2 min in Entwicklerlösung entwickelt und darauf folgend für mehrere Minuten in Fixierlösung fixiert.

4.2.2.5 Ablösen gebundener Antikörper von dem Western Blot (Strippen)

Mit der Methode des Strippens wurden auf derselben Membran nacheinander verschiedene Antikörper inkubiert. Durch die Stripping-Lösung wurden die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Die Membran wurde 20 min mit Stripping-Lösung inkubiert, danach 5 min mit Tris/HCl pH 8,8 zur Neutralisation geschüttelt und abschließend 5x für 5 min mit PBST gewaschen. Danach war die Membran erneut bereit mit Blockierungs- und Antikörperlösung inkubiert zu werden (siehe 4.2.2.4).

4.2.2.6 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELISA ist eine Methode zum quantitativen Nachweis der Bindungsstärke von Proteinen zueinander. 50 µl pro Well, bei einem dreifach-Ansatz, potentieller Bindungspartner (5 µg/ml) wurden auf einer 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno Modules, Nunc) über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Eine 384-Well Platte wurden mit 25 µl/Well beschichtet. Die Verdünnungen wurden in PBS oder in TBS angesetzt. Am nächsten Tag wurde die restliche Lösung ausgeschlagen und die beschichteten Wells mit 200 µl Blockierungspuffer für 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden 50 µl Erstantikörper unverdünnt und verdünnt (1:20, 1:50, 1:100) in die Wells gegeben und für 1,5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Wells mit 200 µl Waschpuffer (PBS) 3x für 5 min gewaschen.

50 µl des HRP gekoppelten α -Maus-Zweitantikörpers (1:1.000 oder 1:5.000) oder Strep-MAB HRP (1:4.000) inkubierten 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Wieder schlossen sich drei Waschschritte mit PBS an. 50 µl OPD-Färbelösung (OPD in stable peroxide substrate buffer, Pierce) wurden nach dem Waschen in jedes Well gegeben. Die Peroxidase setzt das hinzugegebene Substrat in einer Farbreaktion um. Die Reaktion fand unter Ausschluss von Licht auf dem Schüttler statt. Falls eine starke Farbreaktion zu beobachten war, wurde die Reaktion auf der gesamten Platte mit 50 µl Stopp-Lösung beendet. Die Platte wurde im ELISA-Reader bei 490 nm (ohne Stopp-Lösung bei 450 nm) gelesen und ausgewertet.

4.2.2.7 Umpuffern und Konzentrierung der anti-idiotypischen Antikörper mit Vivaspin-Säulen

Zum Umpuffern und Konzentrieren der aufgereinigten anti-idiotypischen Antikörper wurden Vivaspin20-Konzentratoren (Sartorius, Göttingen) mit einem MWCO von 5 kDa verwendet. Die Säule wurde mit dem Eluat der Strep-tag Aufreinigung befüllt, bei 4°C und 5.000 g so lange zentrifugiert, bis das Endvolumen ca. 1 ml betrug. Während der Zentrifugation können lediglich Moleküle kleiner als 5 kDa, Salze und Lösungsmittel die Membran passieren. Die anti-idiotypischen Antikörper werden von der Membran zurückgehalten, das Volumen verringert sich und damit nimmt die Konzentration des Antikörpers zu. Zum Umpuffern wurde die Säule 4x mit 20 ml Kopplungspuffer durch Zentrifugation gewaschen. Das Endvolumen betrug erneut ca. 1 ml. Nach gemessener Proteinkonzentration (siehe 4.2.2.8) konnte der anti-idiotypische Antikörper an eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt werden (siehe 4.2.2.9).

4.2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA Test)

Die Konzentration von Proteinen kann mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt werden. Der Test (BCA-Protein Testkit, Pierce) basiert auf der unterschiedlichen Intensität einer Farbreaktion der BCA-Reagenzien (engl. bicinchoninic acid) in Abhängigkeit von der vorhandenen Proteinmenge in der Probe. Die Cu^{2+} -Ionen bilden mit Proteinen in alkalischer Lösung einen Komplex aus (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen dieses Komplexes werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bilden.

10 µl einer Proteinprobe wurden in einer Mikrotiterplatte in einem Dreifach-Ansatz, unverdünnt und 1:10 in ddH₂O, vorgelegt. Die Proben wurden mit 200 µl BCA-Lösung, die im Verhältnis 1:50 aus Reagenz A und Reagenz B entsteht, versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C auf einem Schüttler, erfolgte die Messung der Extinktion bei 560 nm mittels eines ELISA-Readers (µQuant, BioTek). Die Bestimmung der Konzentration wird durch eine BSA (Bovine Serum Albumin) Standardreihe, die ebenfalls auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und in ddH₂O angesetzt wurde, berechnet.

4.2.2.9 Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Vor der Kopplung des anti-idiotypischen Antikörpers an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Lösung in Kopplungspuffer umgepuffert. Mindestens 1 mg Antikörper sollte an 1 ml Gelmaterial gekoppelt werden. Alle folgenden Schritte fanden bei 4°C statt. Zu 600 mg CNBr-aktivierter Sepharose 4B (GE Healthcare) wurden 10 ml Quelllösung (ergibt ca. 2 ml Gel) gegeben um die Sepharose 15 min quellen zu lassen. Danach wurde 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das Gelmaterial wurde mit 5 ml Quelllösung für 15 min vertikal rotierend gewaschen und anschließend 5 min bei 200 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 3x wiederholt und anschließend 2x mit 5 ml Kopplungspuffer durchgeführt.

Die aufkonzentrierte Antikörperlösung in Kopplungspuffer wurde zu dem Gelmaterial gegeben und über Nacht vertikal rotierend inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gel für 5 min bei 200 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen (außer einem Aliquot zur Bestimmung der Kopplungseffizienz) und freie Bindungsstellen mit 5 – 10 ml Blockierungspuffer über Nacht blockiert. Nach Zentrifugation bei 200 g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die Gelmatrix gewaschen.

Es wurde alternierend je dreimal mit Waschpuffer I und Waschpuffer II für 15 min gewaschen und 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde die Matrix mit Waschpuffer III gewaschen und in Natriumazid gelagert oder zur Affinitätschromatographie zur Identifizierung potentieller Interaktionspartnern eingesetzt (siehe 4.2.2.10).

4.2.2.10 Affinitätschromatographie zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern

Die Affinitätschromatographie dient der Isolierung von Molekülen aus einem komplexen Gemisch. Die Säulenmatrix enthält einen kovalent gebundenen Liganden, an den der zu isolierende Stoff spezifisch bindet und von der er eluiert werden kann.

Die Affinitätschromatographie wurde im Batch-Verfahren durchgeführt, als Säulenmatrix diente die CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit gekoppeltem HNK-1 anti-idiotypischen Antikörper (siehe 4.2.2.9). Mit Hilfe der Matrix wurde nach potentiellen neuen Rezeptoren des HNK-1 anti-idiotypischen Antikörpers im 500 g Gehirnhomogenat-Überstand von Wildtypmäusen gesucht.

Die in Natriumazid gelagerte Matrix wurde im ersten Schritt mit 25 ml Waschpuffer A gewaschen. Der aufgetaute 500 g Gehirnhomogenat-Überstand von 2 Gehirnen wurde zu der Matrix gegeben und über Nacht bei 4°C und vertikaler Rotation inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gehirnhomogenat bei 500 g und 4°C für 20 min zentrifugiert und der Überstand von der Matrix abgenommen. Anschließend wurde die Matrix 3x mit Waschpuffer B und danach 3x mit Waschpuffer C gewaschen, wobei jeder Waschschrift 10 min inkubiert bei vertikaler Rotation und darauffolgend 10 min bei 500 g zentrifugiert wurde. Die Überstände der sechs Waschschrift wurden zur Analyse aufbewahrt und eingefroren. Eluiert wurden die Proteine mit 2 ml Elutionspuffer bei 4°C und vertikaler Rotation. Das Eluat wurde 10 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert und mit 500 µl Neutralisationspuffer neutralisiert und eingefroren oder es wurde eine TCA-Fällung (siehe 4.2.2.11) durchgeführt.

Die Matrix wurde mit 5 ml Regenerationspuffer A und anschließend mit 5 ml Regenerationspuffer B behandelt. Die Puffer inkubierten jeweils 5 min bei 4°C und vertikaler Rotation, wurden 5 min bei 500 g zentrifugiert und dieser Schritt wurde 3x wiederholt.

Zum Schluss wurde die Matrix noch einmal mit PBS gewaschen und in Regenerationspuffer C gelagert.

4.2.2.11 Proteinfällung mit TCA

Alle folgenden Schritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Die TCA-Fällung ist irreversibel, sehr effizient und schnell. Es wurde 1 ml des Eluats und der Waschschriffe der Affinitätschromatographie gefällt. Gekühlte 100%ige Trichlor-Essigsäure (TCA) wurde zugegeben, bis eine Endkonzentration von 20% erreicht war.

Die Protein-TCA-Lösung wurde gut gemischt, Proteine für 30 min auf Eis gefällt und die Probe anschließend bei 11.000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Die TCA-haltige obere Phase wurde vollständig abgenommen, ohne das proteinenthaltene Pellet zu stören und gesondert entsorgt. Das Pellet wurde vorsichtig mit 0,5 ml eiskaltem Aceton gewaschen, um TCA-Reste zu entfernen. Das Aceton wurde vom Pellet abgenommen und das Pellet innerhalb von 5 – 10 min an der Luft getrocknet. Zur Neutralisation wurden 20 µl 1 M eiskaltes Tris zu dem Pellet gegeben. 5 µl nativer SDS-Probenpuffer färbte die Lösung blau. Falls durch Zugabe des Probenpuffers eine gelbliche Färbung auftrat, war das Pellet zu sauer und es wurde in kleinen Mengen 1 M Tris hinzugegeben, bis die Lösung ins bläuliche überging.

Die gefällten Waschschriffe und das Eluat wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

4.2.2.12 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Für die Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele, wurde Roti-Blue Lösung (Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben hergestellt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese über Nacht auf einer Wippe mit Färbelösung inkubiert. Danach wurde das Gel 3x für 5 min mit Waschlösung gewaschen und anschließend getrocknet (Gel-Air-Dryer, Bio-Rad) oder wenn mit kolloidalem Coomassie (Roth, Karlsruhe) gefärbt wurde, Banden für die Massenspektroskopie unter möglichst proteinfreien Bedingungen ausgeschnitten.

4.3 Maushirnpräparation und Homogenisierung

4.3.1 Gehirnentnahme

Die Gehirne wurden von Nicole Karl und Gabriele Loers freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Wildtypmäuse des Stammes C57Bl6J waren zwischen 9 und 20 Wochen alt. Nach dem Tod der Mäuse wurde die Haut entfernt, die Schädeldecke eröffnet und das gesamte Gehirn entnommen. Das weiche Gehirn wurde mit einer schmalen Pinzette vom Hirnstamm abgetrennt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die entnommenen Gehirne wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

4.3.2 Gehirnhomogenisierung und Fraktionierung

Ein Gehirn wurde in 3 ml Homogenisierungspuffer in einem Glaspotter zerkleinert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Homogenisierung wurde durch mehrmaliges Auf- und Niederdrücken des Homogenisierungsstabes erreicht. Das unbehandelte Gehirnhomogenat wurde bei 500 g und 4°C für 20 min zentrifugiert, um nicht homogenisierte Gewebe und Zellkerne abzutrennen.

Getrennt voneinander wurde der Überstand und das Pellet schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Der Überstand wurde für die Affinitätschromatographie eingesetzt (siehe 4.2.2.10).

4.4 Bioinformatische Analysen

Mit den aus der Sequenzierabteilung des ZMNH erhaltenen DNA-Sequenzen wurde zum Abgleich eine BLAST-Analyse mit der NCBI-Datenbank durchgeführt (www.ncbi.nlm.nih.gov). Um Sequenzhomologien mit bekannten Proteinsequenzen zu vergleichen, wurde eine ClustalW2-Analyse (www.ebi.ac.uk/clustalw/) durchgeführt. Das Programm DNA-Translate (www.expasy.org/tools) wurde zum Übersetzen von DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen genutzt.

Von der Firma New England BioLabs wurden die Programme NEBcutter, für Restriktionsanalysen, und der Double Digest Finder, um den optimalen Puffer für den Doppelverdau zu finden, verwendet (www.neb.com).

Zur Berechnung der Annealing Temperatur, der Anlagerungstemperatur der Primer an DNA-Sequenzen während einer PCR, wurde der Tm calculator (www.finnzymes.us) in Anspruch genommen.

5. Ergebnisse

Die Grundlage der hier vorliegenden Arbeit bildete ein vorangegangenes Projekt in der eigenen Arbeitsgruppe, in dem anti-idiotypische Antikörperfragmente gegen den monoklonalen HNK-1 Antikörper isoliert werden konnten. In Anlehnung an dieses Projekt sollte der anti-idiotypische Antikörper aufgereinigt und charakterisiert werden, um nach neuen Rezeptoren suchen zu können.

5.1 Expressionstest des HNK-1 anti-idiotypischen Antikörpers

Zu Anfang wurde ein Expressionstest durchgeführt, in dem die Bindung vom HNK-1 Antikörper an den HNK-1 anti-idiotypischen Antikörper von Dr. Martine Albert und somit das übernommene Material auf Funktionalität und Detektierbarkeit überprüft werden sollte.

Der HNK-1 anti-idiotypische Antikörper im scFv-Format war in den pHEN-Vektor mit c-Myc-tag kloniert und wurde für den ersten Expressionstest in kompetente *E. coli* JM83 Zellen transformiert. Die Selektion auf Agarplatten erfolgte über eine Ampicillinresistenz des Expressionsvektors.

Die mit der Vorkultur angeimpfte Hauptkultur (250 ml LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin) inkubierte nach Induktion der Genexpression mit IPTG in einem Schüttelkolben für 3 h und in einem zweiten über Nacht (siehe 4.2.1.1).

Um festzustellen, ob das gewünschte Genprodukt als lösliches Protein im Periplasma lokalisiert war, musste die äußere Zellmembran ohne Schädigung der inneren Membran mittels Periplasma-Aufschlusspuffer geöffnet werden.

Die Periplasmafraktionen der zwei Kulturen wurde nativ und denaturiert auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert (siehe 4.2.2.3).

Beide Membranen, geblockt mit 5% Milchpulver in PBS, hatten dieselbe Probenauftragung. Die eine inkubierte mit dem primären HNK-1 Antikörper (1:1.000), während die zweite als Kontrolle diente und keine Erstantikörper-Inkubation erfuhr. Der Sekundäntikörper war bei beiden identisch, α -Maus-HRP Antikörper (1:5.000).

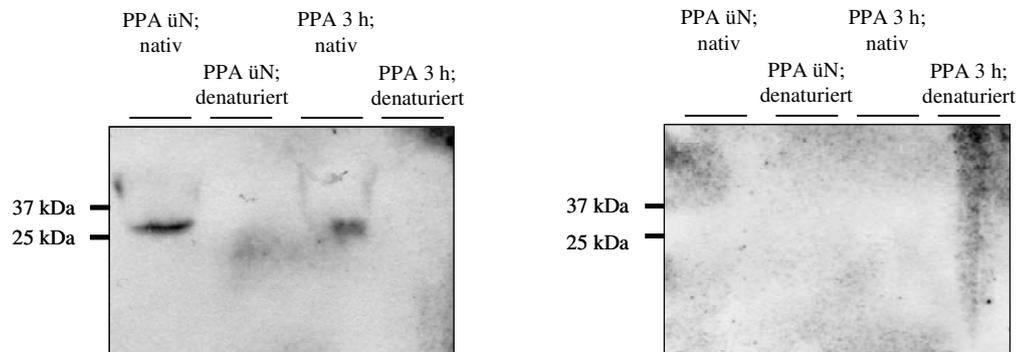


Abb. 5-1: Detektion des anti-idiotypischen Antikörpers im Periplasma

PPA = Periplasma-Aufschluss; üN = Übernachtskultur

Western Blot-Analyse zur Funktionalitätsprüfung des anti-idiotypischen Antikörpers für das Projekt. Der linke Blot wurde mit dem Primärantikörper HNK-1 inkubiert und zeigt Banden bei 26 kDa im Periplasma-Aufschluss (PPA) der 3 h und Übernachtskultur (üN) der nativ aufgetragenen Proben. Der rechte Blot diente der Kontrolle, wurde ohne Primärantikörper inkubiert und zeigte keine Banden auf dem Blot.

Die Western Blot-Analyse zeigte in dem Blot mit Primärantikörper-Inkubation Banden bei 26 kDa in den nativ aufgetragenen Periplasmafraktionen der 3 h Kultur sowie der Übernachtskultur (Abb. 5-1). Der Blot ohne Primärantikörper-Inkubation zeigte keinerlei Banden, unabhängig davon, ob die Proben denaturiert oder nativ aufgetragen wurden.

5.2 Klonierung in Vektor pASK 118 mit Strep-tag

Der HNK-1 anti-idiotypische Antikörper wurde bereits in klonierter Form in einem c-Myc-tag Vektor übernommen, womit lediglich eine Detektion möglich war. Zur präparativen Aufreinigung musste der Antikörper in einen Strep-tag Vektor umkloniert werden.

Der für die Klonierung verwendete Vektor (pASK 118) wurde der Vektorsammlung des Instituts entnommen. Die Klonierung begann mit der Transformation des Vektors in kompetente *E. coli* DH5a Zellen und dem Ausstreichen auf Agarplatten. Die Selektion auf Agarplatten erfolgte über Chloramphenicolresistenz des Expressionsvektors. 200 ml

LB-Medium mit Chloramphenicol wurden mit einer Kolonie angeimpft und für eine Maxi-Präparation über Nacht inkubiert (siehe 4.1.7.2). Es wurden zwei Maxi-Präparationen parallel durchgeführt. Die DNA Konzentration der Maxi-Präparation wurde photometrisch gemessen und zur Überprüfung der DNA ein Testverdau durchgeführt. Geschnitten wurde der 3.925 bp große Vektor in drei Ansätzen mit den Enzymen XbaI und HindIII, XhoI und SacI sowie mit PstI und BstEII.

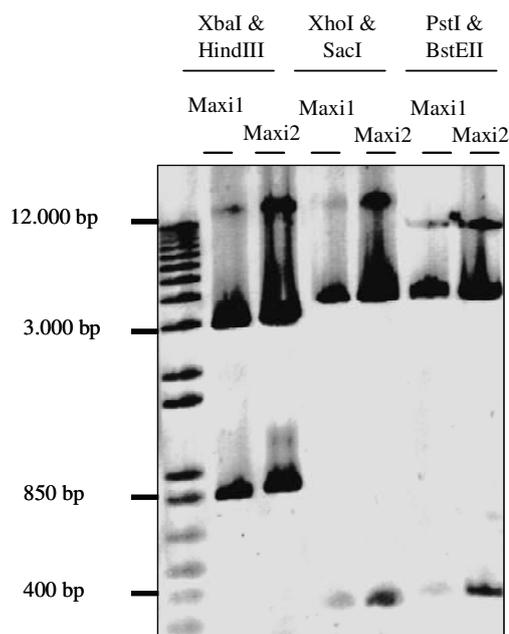


Abb. 5-2: Testverdau des Strep-tag Vektors

Maxi 1 und Maxi 2 sollten die identische Vektor-DNA enthalten.

Die Vektor-DNA wurde zur Kontrolle in drei Ansätzen mit jeweils zwei Enzymen geschnitten. 20 μ l des Verdau wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und die Fragmentgröße mit der errechneten Größe abgeglichen.

Im Vergleich wurden beide DNA Maxi-Präparationen in den drei Verdau-Ansätzen identisch geschnitten. Die nach dem Testverdau zu erwartenden Vektor-Fragmente wurden mit dem Programm NEBcutter errechnet (siehe 4.4). Der Verdauungsansatz mit XbaI und HindIII sollte Fragmente der Größe 3.093 bp und 832 bp zeigen, mit XhoI und SacI 3.611 bp und 314 bp, mit PstI und BstEII sollten Fragmente der Größe 3.600 bp und 325 bp entstehen. Das Agarose-Gel zeigte dieselben Fragmentgrößen wie die errechneten Größen. Die mittels Maxi-Präparation vervielfältigte Vektor-DNA wurde nach diesem Testverdau zur Klonierung eingesetzt.

5.2.1 Klonierung des mittels Phusion Hot Start Polymerase amplifizierten PCR-Produkts

Die Phusion Hot Start Polymerase wurde eingesetzt, um den HNK-1 anti-idiotypischen Antikörper im scFv-Format aus dem pHEN-Vektor mittels PCR (siehe 4.1.1.1) zu vervielfältigen. Die PCR-Fragmente wurden anschließend in den pASK 118 Vektor ligiert.

Dem 50 µl Reaktionsansatz wurde 1 µl zu amplifizierende DNA (anti-idiotypischer Antikörper 1:30 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt) zugesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass passende Enzymschnittstellen vor dem Beginn der variablen schweren Kette des scFv und vor dem Tag des Vektors, also nach der variablen leichten Kette des scFv, eingefügt werden konnten. Als Restriktionsschnittstellen wurden SbfI und XhoI verwendet und Primer mit diesen Sequenzen synthetisch hergestellt (siehe 3.9.1).

Tab. 5-1: Übersicht der verwendeten Primersequenzen

Unterstrichen sind die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen, die dem Insert hinzugefügt werden. Die lange Sequenz der Primer lagert sich an das Insert an; der forward Primer an den Beginn der variablen schweren Kette und der reverse Primer an das Ende der variablen leichten Kette.

Primername	Primersequenz
SbfI (forward)	5'- <u>ACC TGC AGG</u> AGT CTG GGG GAG GTG TGG TAC GG-3'
XhoI (reverse)	5'- <u>TCT CGA GCT</u> TGG TCC CTC CGC CGA ATA CCA CA-3'

Das PCR-Produkt wurde nach der Polymerase-Kettenreaktion in einem 1%igen Agarose-Gel überprüft (Abb. 5-3). Der Reaktionsansatz zeigte eine schwache Bande in Höhe von 4.000 bp, die dem restlichen Originalvektor und eine dicke Bande bei 694 bp, die dem amplifizierten PCR-Produkt, entsprach. Eine Aufreinigung des PCR-Produkts wurde mittels PCR Purification Kit durchgeführt.

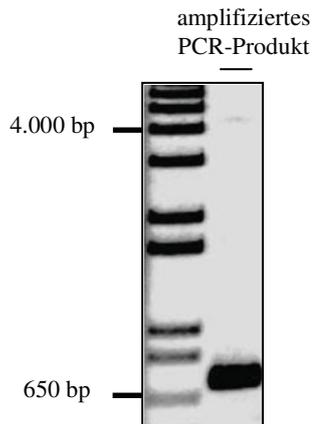


Abb. 5-3: Agarose-Gel zur Kontrolle des amplifizierten PCR-Produkts mit der Phusion Hot Start Polymerase

Die dicke Bande zwischen 650 bp und 850 bp zeigt das amplifizierte PCR-Produkt. Die schwache Bande, die mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, stammt vom restlichen, nicht amplifizierten pHEN Vektor.

Nachdem das Insert mittels PCR erfolgreich amplifiziert werden konnte, wurden der Vektor und das Insert zur Klonierung vorbereitet. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und XhoI, das Insert mit SbfI und XhoI geschnitten (siehe 4.1.8). PstI ist ein Isoenzym zu SbfI, beide Enzyme schneiden identische Überhänge. Der Restriktionsverdau inkubiert für 2 h und wurde anschließend komplett auf ein präparatives 0,5%iges Gel zur elektrophoretischen Auftrennung aufgetragen. Die Bande vom Insert und vom Vektor wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

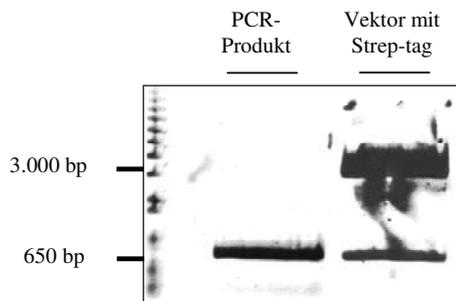


Abb. 5-4: Restriktionsverdau der zu ligierenden DNA-Fragmente

Der Vektor mit den Enzymen PstI und XhoI geschnitten. Das Insert, das scFv PCR-Produkt, wurde mit den Enzymen SbfI und XhoI geschnitten. Die Bande in Höhe von 3.200 bp des elektrophoretisch aufgetrennten Vektors und die Bande in Höhe von 694 bp vom PCR-Produkt wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und die Fragmente zur Ligation eingesetzt.

Die Insert-Bande zwischen 650 bp und 850 bp und die Vektor-Bande in Höhe von 3.200 bp waren die zu separierenden Banden.

Die Konzentration der aus dem Gel aufgereinigten Vektor- und Insert-DNA wurde bestimmt (siehe 4.1.9) und 50 ng Vektor-DNA zur Ligation mit der T4 DNA Ligase eingesetzt. Das Insert wurde in einem Verhältnis von 3:1 und 5:1 zum Vektor zum Ligationsansatz hinzugegeben. Die durch den Restriktionsverdau entstandenen überhängenden Enden, einsträngige Bereiche an jedem DNA-Ende, konnten an komplementäre einsträngige DNA-Abschnitte angelagert werden und mit Hilfe der Ligase wieder Doppelstränge bilden. In diesem Fall ist ein neues Konstrukt aus HNK-1 anti-idiotypischen Antikörper und pASK 118 Vektor mit integriertem Strep-tag entstanden.

Der Ligation der DNA-Fragmente folgte die Vermehrung des rekombinanten Plasmids durch Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen und anschließender Minipräparation. Die Selektion auf Agarplatten erfolgte über Chloramphenicolresistenz des Vektors.

Die durch Minipräparation isolierten rekombinanten Plasmide wurden auf das Vorhandensein des Inserts untersucht. Hierzu wurde ein Kontrollverdau mit dem Enzym BstEII durchgeführt. Dieses Enzym ist ein „Doppelcutter“, das zweifach in dem eingebauten scFv schneidet. Somit konnte überprüft werden, ob das Insert in den Vektor eingebaut wurde. Bei einer erfolgreichen Ligation wären DNA-Fragmente der Größe 3.592 bp und 337 bp zu sehen gewesen.

Das war nicht der Fall, die Gele zeigten lediglich den Vektor und Religationen des Vektors. Auch wiederholte Versuche mittels der Phusion Hot Start Polymerase amplifizierten PCR-Produkts klonieren zu wollen, waren nicht erfolgreich. Aufgrund dieser Tatsache wurde versucht, das rekombinante Plasmid mit Hilfe des pGEM-T Easy Vektor zu klonieren.

5.2.2 Subklonierung und Klonierung des mittels Taq Polymerase amplifizierten PCR-Produkts

Der über PCR amplifizierte HNK-1 anti-idiotypische Antikörper im scFv-Format im Originalvektor von Dr. Martine Albert wurde in den pGEM-T Easy Vektor über T/A-Klonierung subkloniert (siehe 4.1.5), mit Restriktionsenzymen herausgeschnitten, um in den Zielvektor mit Strep-tag kloniert zu werden.

Die Klonierung entsprach der des mittels Phusion Hot Start Polymerase amplifizierten PCR-Produkts (siehe 5.2.1), abgesehen von dem Zwischenschritt, der Subklonierung in den pGEM-T Easy Vektor.

Amplifiziert wurden die PCR-Fragmente mit Hilfe der Taq-Polymerase. Dem 50 μ l Reaktionsansatz wurden 3 μ l zu amplifizierende DNA (anti-idiotypischer Antikörper 1:30 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt) zugesetzt. Die Primer waren dieselben wie zuvor bei der PCR mit der Phusion Hot Start Polymerase (siehe Tab. 5.1). Sie fügten die Enzymschnittstellen SbfI und XhoI ein.

Das PCR-Produkt wurde nach der Polymerase-Kettenreaktion in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen und auf dessen korrekte Größe hin überprüft.

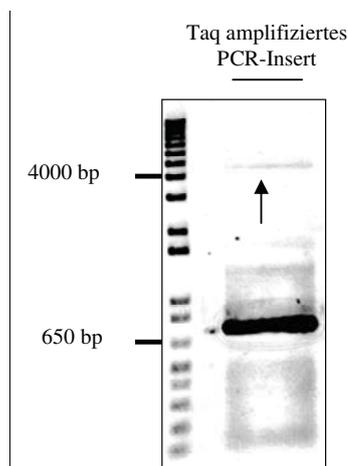


Abb. 5-5: Agarose-Gel zur Kontrolle des amplifizierten PCR-Produkts mit der Taq-Polymerase.

Die Bande in Höhe von 694 bp entspricht dem anti-idiotypischen Antikörper, dem amplifizierten PCR-Produkt. Die schwache Bande, die mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, zeigt die Vektor-DNA vom nicht amplifizierten pHEN-Vektor von Martine Albert.

Das Agarose-Gel zeigte eine schwache Bande in Höhe von 4.000 bp, die dem restlichen pHEN-Vektor und eine Bande in Höhe von 694 bp, die dem amplifizierten PCR-Produkt entsprach. Aufgrund von Sekundärbanden im Gel wurde das PCR-Fragment in Höhe von 694 bp aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Aus der PCR gewonnene DNA-Amplifikate konnten unter Verwendung der Taq-Polymerase, welche die DNA-Synthese mit einem Überhang eines Desoxyadenosins abschließt, direkt in einen T-Überhangsvektor kloniert werden. Für die Subklonierung wurde der vorgeschchnittene pGEM-T Easy Vektor verwendet (siehe 4.1.5). Die Schnittstelle sitzt inmitten des lacZ-Gens, die Multiple-Cloning-Site (multiple Klonierungsstelle) ist ebenfalls integriert, wodurch erfolgreich eingefügte Inserts auf entsprechendem Medium mit X-Gal und IPTG, nach Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli*-Zellen DH5 α , durch blau/weiß Selektion identifiziert werden konnten. Durch Ligation der PCR-Fragmente in den Vektor wurde die Gensequenz der β -Galactosidase unterbrochen und das Enzym wurde nicht mehr exprimiert. Somit konnte X-Gal nicht mehr gespalten werden und die Blaufärbung der Kolonien blieb aus. Kolonien, die das Fragment eingebaut hatten waren weiß, Kolonien ohne Fragment waren blau. Außerdem trägt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

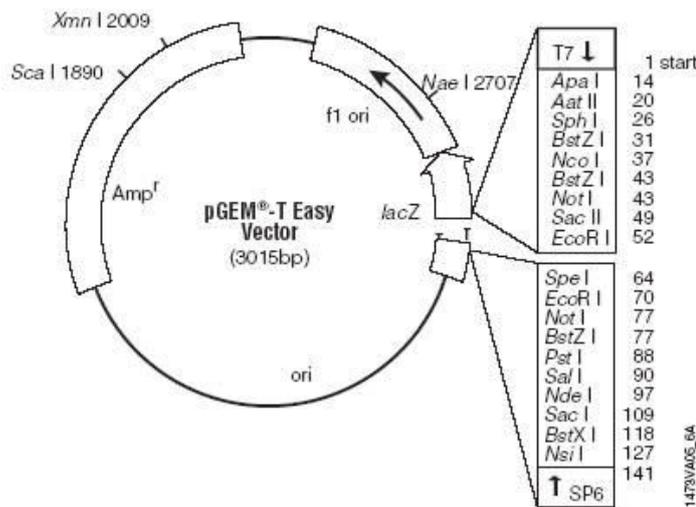


Abb. 5-6: Schema des pGEM-T Easy Vektors für die Subklonierung

Amp^r = Ampicillin-Resistenzgen; lacZ = α -Fragment des β -Galaktosidase Gens, beinhaltet multiple Klonierungsstelle mit SP6- und T7-Promotoren

Die in den pGEM-T Easy Vektor klonierten gereinigten PCR-Fragmente wurden nach Vermehrung und Plasmidisolierung anschließend sequenziert. Die Sequenzen (nicht dargestellt) zeigten eindeutig das eingebaute Insert in den pGEM-T Easy Vektor.

Im nächsten Schritt wurde der pGEM-T Easy Vektor mit den Restriktionsenzymen SbfI und XhoI verdaut, um den subklonierten anti-idiotypischen Antikörper herauszuschneiden. Parallel dazu, wurde auch der pASK 118 Vektor zur Ligation vorbereitet, indem dieser mit den Enzymen PstI und XhoI geschnitten wurde. Beide Verdauansätze wurden komplett zur Separation der DNA-Fragmente auf ein 0,5%iges Agarose-Gel aufgetragen.

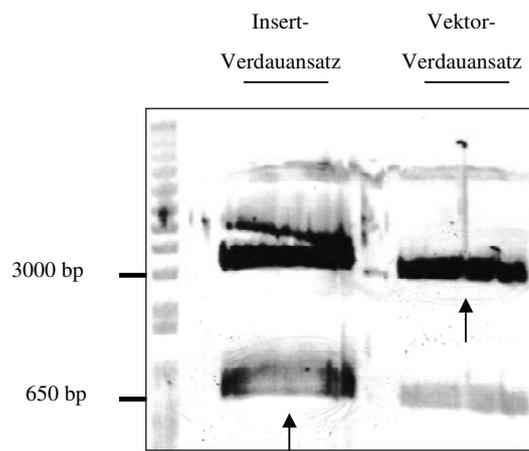


Abb. 5-7: Restriktionsverdau vom pGEM-T Easy und pASK 118

Der Insert-Verdauansatz besteht aus dem subklonierten anti-idiotypischen Antikörper in den pGEM-T Easy Vektor, geschnitten mit SbfI und XhoI. Der Vektor-Verdauansatz besteht aus dem Strep-tag Vektor pASK 118, geschnitten mit PstI und XhoI

Der anti-idiotypische Antikörper in Höhe von 694 bp aus dem Insert-Verdauansatz und die Vektor-DNA in Höhe von über 3.000 bp aus dem Vektor-Verdauansatz wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 4.1.4).

Die Konzentration der aus dem Gel aufgereinigten Vektor- und Insert-DNA wurde bestimmt (siehe 4.1.9) und 100 ng Vektor-DNA zur Ligation eingesetzt (siehe 4.1.10). Um ein optimales Verhältnis der beiden Fragmente zueinander sicherzustellen, wurde ein molares Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA von 1:3 und 1:5 sichergestellt.

Zur Vermehrung wurden die Ligationsansätze in kompetente *E. coli* DH5a Zellen transformiert und die Plasmide durch Minipräparation isoliert. Die durchgeführten 8 Minipräparationen wurden einem Kontrollverdau unterzogen, der die rekombinante

DNA zeigen sollte. Für den Kontrollverdau wurde das Enzym BstEII verwendet, das zweifach im klonierten anti-idiotypischen Antikörper schneidet. Bei erfolgreicher Klonierung würden DNA-Fragmente der Größe 3.592 bp und 337 bp auf einem 1%igem Agarose-Gel separiert werden.

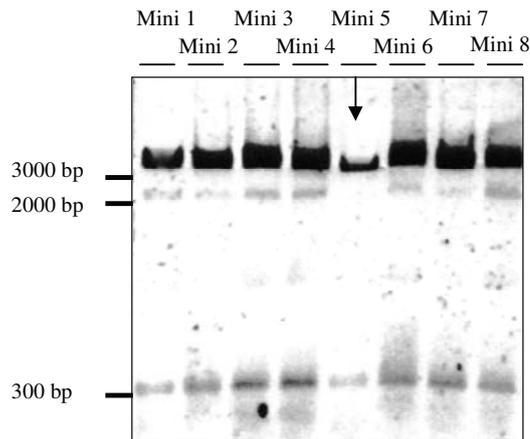


Abb. 5-8: Testverdau der Minipräparationen zur Identifizierung positiver Klone

Die 8 Minipräparationen wurden mit dem Enzym BstEII verdaut und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Der Klon Nr. 5 hebt sich von den anderen ab, die obere Bande ist schmaler und dieser Klon hat keine Bande in Höhe von 2.000 bp.

Der mit dem Pfeil markierte Klon Nr. 5, wurde sequenziert und als positiver Klon identifiziert (Sequenzierprimer, siehe 3.9.2). Die Sequenz konnte den Klon eindeutig als die gesuchte Sequenz identifizieren, sie zeigte die wichtigen Stellen des anti-idiotypischen Antikörpers, den Beginn der variablen schweren Kette (V_H), den Beginn der variablen leichten Kette (V_L) und den Peptidlinker, der beide Ketten des scFv miteinander verknüpft. Zusätzlich war der Strep-tag nachzuweisen, der in den Vektor kloniert war.

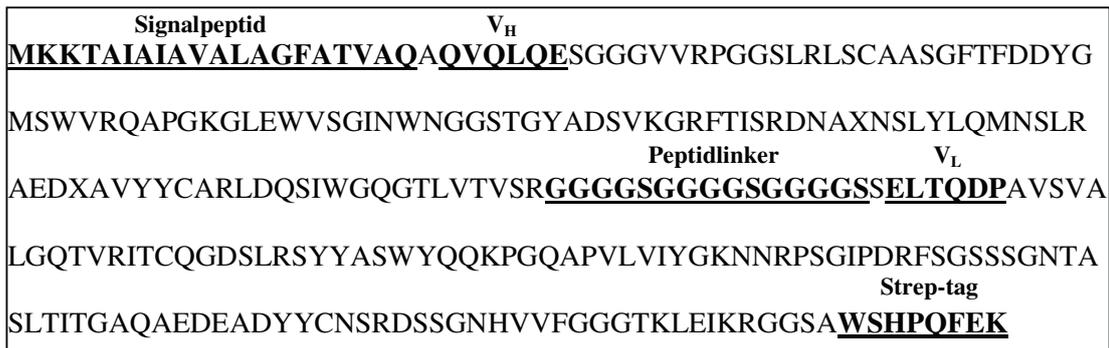


Abb. 5-9: Sequenz des HNK-1 anti-idiotypischen Antikörpers im scFv-Format

V_H = Beginn der schweren variablen Kette; V_L = Beginn der leichten variablen Kette

In der Sequenz sind die für ein scFv typischen Abschnitte (V_H , Peptidlinker, V_L), das Signalpeptid und der Strep-tag des pASK 118-Vektors zu erkennen und hervorgehoben.

5.3 Produktion des anti-idiotypischen Antikörpers in *E. coli*

Die Sekretion der Proteine in den periplasmatischen Raum von *E. coli* erfolgte mit Hilfe bakterieller Signalsequenzen, die mit den zu sekretierenden Proteinen ein Fusionsprotein bilden. Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran konnte nach Induktion (Induktor war Anhydrotetracyclin, 2 mg/ml in DMF) der Genexpression die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

Der so produzierte und isolierte HNK-1 anti-idiotypische Antikörper konnte im Anschluss aufgereinigt (siehe 4.2.2.1), charakterisiert und zur Identifizierung neuer Bindungspartner eingesetzt werden.

5.3.1 Überprüfung der Expression des Klons im Schüttelkolben

Zur Überprüfung des HNK-1 anti-idiotypischen Antikörpers wurde die rekombinante DNA in kompetente *E. coli* JM83 und HB2151 Bakterien transformiert und die Expression im Schüttelkolben gestartet.

In einem Vorversuch (hier nicht dargestellt) im kleineren Maßstab ließ die Immunoblot-Analyse ausschließlich bei den genannten *E. coli* Stämmen eine erfolgreiche Expression vermuten. Anhand dieses Vorversuches wurde mit den beiden *E. coli*-Stämmen JM83

und HB2151 im größeren Maßstab weitergearbeitet, um mehr zu analysierendes Material zu erhalten.

Die Transformation von Klon Nr. 5, der die Sequenz des HNK-1 anti-idiotypischen Antikörpers zeigte, erfolgte nach entsprechendem Protokoll (siehe 4.1.6) und die Selektion auf Agarplatten über Chloramphenicolresistenz des Expressionsvektors.

Nach Animpfen der Vorkultur mit transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte die Anzucht und Induktion der Proteinproduktion im Schüttelkolben mit dem Volumen von 200 ml Medium (siehe 4.2.1.1). Die Expression wurde mit 20 µl Anhydrotetracyclin-Lösung 2 mg/ml in DMF bei einer OD₆₀₀ von 0,6 induziert und die Kulturen für 3 h und über Nacht bei 30°C weiter inkubiert. Nach der Ernte (siehe 4.2.1.1) der 3 h und Übernachtkultur der *E. coli*-Stämme JM83 und HB2151 wurden das Medium und der Periplasma-Aufschluss mit der Immunoblot-Analyse analysiert. Der Periplasma-Aufschlusspuffer führt zur Destabilisierung der äußeren Bakterienzellmembran, wodurch es zum Austritt der löslichen periplasmatischen Proteine kommt.

Untersucht wurden das Periplasma und das Medium auf die Detektierbarkeit des Strep-tags und Identifizierung der Proteinbanden auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Um den Strep-tag nachweisen zu können, wurden 40 µl der Proben jeweils denaturiert und nativ auf ein SDS-Gel (15%iges Trenngel, 6%iges Sammelgel) (siehe 4.2.2.2) aufgetragen und mit Strep-Tactin HRP (1:100.000) detektiert (siehe 4.2.2.4).

Der Strep-tag-Nachweis der beiden untersuchten Kulturen zeigte lediglich Banden im Periplasma-Aufschluss von JM83 und HB 2151 und keine im Medium.

Auf dem Blot der 3 h Kultur waren die zu erkennenden Banden in Höhe von 26 kDa und 50 kDa zu sehen, während die Übernachtkultur von HB2151 nur noch schwache Banden bei 50 kDa und von JM83 eindeutige Banden bei 50 kDa und schwache bei 26 kDa zeigte. Im Vergleich waren die Banden der 3 h Kultur bei 26 kDa des *E. coli*-Stammes HB2151 dicker als die des Stammes JM83. Ein deutlicher Unterschied von denaturierten zu nativ aufgetragenen Proben war nicht festzustellen. Die 50 kDa Proteinbanden vom HB2151 Stamm der 3 h Kultur waren eindeutig schwächer als die 25 kDa Banden.

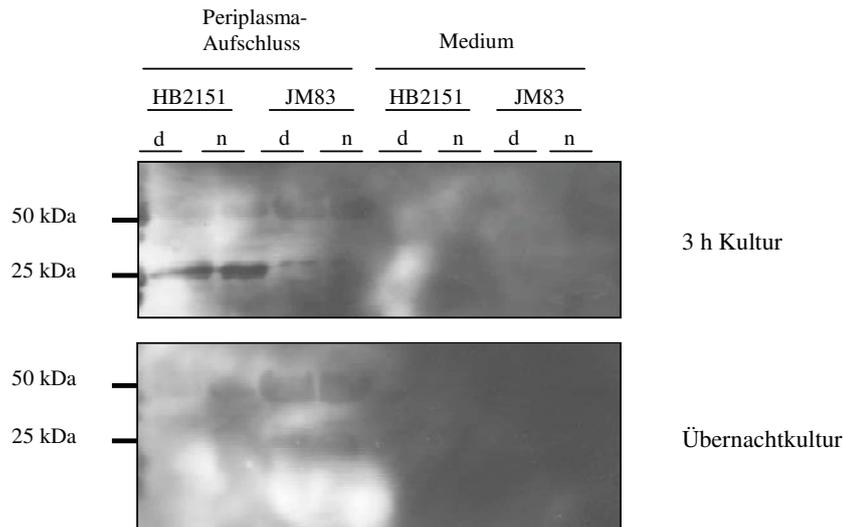


Abb. 5-10: Strep-tag-Nachweis im Periplasma-Auflschluss und Medium des Schüttelkolbenversuches (3 h und Übernachtskultur)

d = denaturiert; n = nativ

40 µl Probe wurden jeweils denaturiert und nativ aufgetragen. Verglichen wurde der Strep-tag-Nachweis der 3 h Kultur und der Übernachtskultur der *E. coli*-Stämme HB2151 und JM83. Außerdem sollte überprüft werden, ob der Strep-tag im Periplasma-Auflschluss und im Medium zu detektieren war oder nur in einem der beiden Stämme.

Der spezifische Antikörper-Nachweis wurde nach demselben Auftragschema wie das des Strep-tags-Nachweises durchgeführt. 40 µl der Proben wurden jeweils denaturiert und nativ aufgetragen (siehe 4.2.2.2) und der anti-idiotypische Antikörper mit HNK-1 Antikörper (Primärantikörper) und α -Maus HRP (Sekundärantikörper) nachgewiesen (siehe 4.2.2.3).

Die Übernachtskultur zeigte lediglich schwache Banden im JM83 Stamm der denaturiert und nativ aufgetragenen Proben in Höhe von 25 kDa des Periplasma-Auflchlusses. Bei beiden Kulturen waren keine Banden im Medium zu erkennen.

Die 3 h Kultur vom JM83 Stamm zeigte Banden in Höhe von 25 kDa, die allerdings deutlich schwächer waren als die vom HB2151 im Vergleich. Der HB2151 zeigte zusätzlich Banden in Höhe von 50 kDa und in Höhe von 15 kDa. Die nativ aufgetragene Probe des HB2151 Stammes wies eine stärker erkennbare Bande in Höhe von 15 kDa auf als die Bande der denaturiert aufgetragenen Probe.

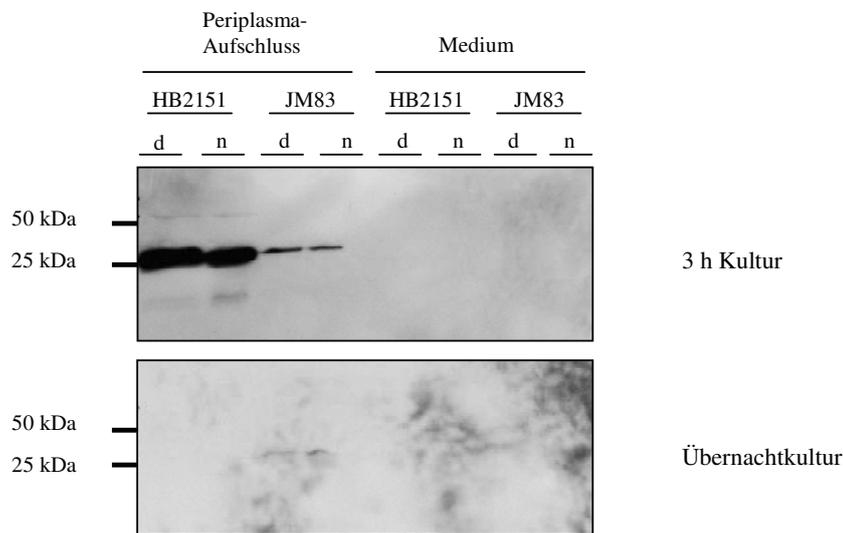


Abb. 5-11: Antikörper-Nachweis im Periplasma-Aufschluss und Medium des Schüttelkolbenversuches (3 h und Übernachtskultur)

d = denaturiert; n = nativ

40 µl Probe wurden jeweils denaturiert und nativ aufgetragen. Verglichen wurde der Antikörper-Nachweis der 3 h Kultur und der Übernachtskultur der *E. coli*-Stämme HB2151 und JM83. Außerdem sollte überprüft werden ob der anti-idiotypische Antikörper im Periplasma-Aufschluss und im Medium zu detektieren war oder nur in einem von beiden.

Um eine Interaktion zwischen dem in der Probe aufgetragenen anti-idiotypischen Antikörper und dem Sekundärantikörper auszuschließen, wurde parallel eine Kontrolle durchgeführt. Die Kontrolle (nicht dargestellt) hatte dieselbe Probenauftragung wie zuvor der Antikörper-Nachweis und wurde nach dem Blocken mit 5% Magermilchpulver der Membran mit dem Sekundärantikörper, ohne zuvor mit einem Primärantikörper, inkubiert. Die Kontrolle zeigte keinerlei Banden.

5.3.2 Produktion im Laborfermenter

Der HNK-1 anti-idiotypische Antikörper sollte in ausreichender Menge im Laborfermenter produziert werden, um Material zur Charakterisierung des anti-idiotypischen Antikörpers und zur Identifizierung neuer HNK-1 Rezeptoren zur Verfügung zu haben. Zur Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose 4B sollten mg-Mengen des Antikörpers vorliegen.

Der Fermenter hatte ein TB-Mediumsvolumen von 6 l und die DNA des anti-idiotypischen Antikörpers wurde in *E. coli* HB2151 transformiert (siehe 4.2.1.2). Während der Fermentation wurde die Temperatur, der pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck über Elektroden und Regeleinheiten überwacht. Die optische Dichte und das Zellfeuchtgewicht gemessen und notiert, die Werte in eine Excel-Tabelle eingetragen, um den Verlauf der Fermentation mittels grafischer Darstellung verfolgen zu können (siehe Abb. 5-12).

Die Rührerdrehzahl des Fermenters betrug nach dem Animpfzeitpunkt 350 rpm und die Temperatur 26°C. Nach 16 h wurde die Glycerol-Lösung (autoklaviertes Glycerol mit ddH₂O, 50:50) auf 7 ml/h eingestellt und nach weiteren 2 h auf 14 ml/h erhöht. Die Temperatur wurde auf 28°C, der Rührer auf 450 rpm erhöht und die Zufuhr der Glycerol-Lösung ausgeschaltet. Nach 18,5 h Inkubation sollte der pH-Wert 7,05 betragen und der Sauerstoff auf 0,5 – 1 bar eingestellt werden. Der Feed wurde mit 20 ml/h wieder eingeschaltet und der Sauerstoff auf 1,5 bar nach 20,5 h erhöht.

Mit 1:10.000 Anhydrotetracyclin (2 mg/ml in DMF) wurde die Proteinproduktion 21,5 h nach Animpfen des Mediums im Fermenter induziert. Zu diesem Zeitpunkt betrug die optische Dichte, gemessen bei 600 nm, 14,60, und die Zellfeuchtmasse hatte ein Gewicht von 32,1 g/l.

Kultiviert wurde für weitere 3 h nach dem Induktionszeitpunkt, anschließend wurden die Zellen bei einem Zellfeuchtgewicht von knapp 45 g/l und einer optischen Dichte von 22,5 geerntet. Mittels Periplasma-Aufschlusspuffer und Lysozym wurden die Zellen aufgeschlossen, um die Proteine freizusetzen (siehe 4.2.1.2).

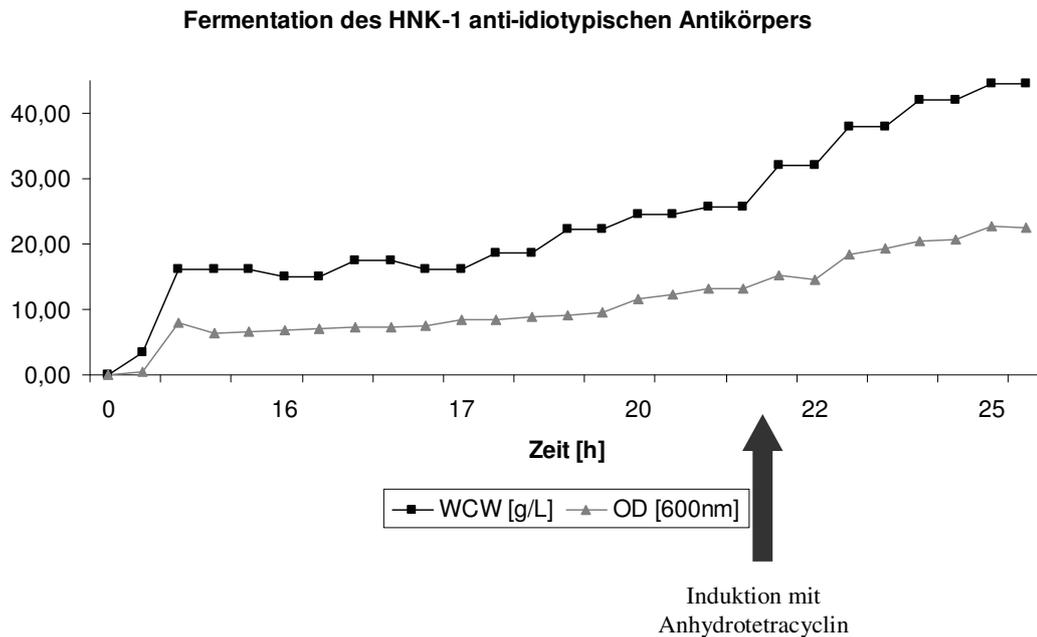


Abb. 5-12: Grafisch dargestellter Verlauf der Antikörper Produktion im Fermenter

WCW = Wet Cell Weight (Zellfeuchtmasse); OD = optische Dichte

In schwarz ist der zeitliche Verlauf der Zellfeuchtmasse in g/l und in grau der zeitliche Verlauf der optischen Dichte, gemessen bei 600 nm, dargestellt. Der Pfeil deutet auf den Induktionszeitpunkt der Proteinproduktion mit Anhydrotetracyclin 21,5 h nach Animpfen des Fermentermediums mit der 300 ml dicht angewachsenen Vorkultur. 24,5 h nach Animpfen wurde die Kultivierung beendet und die Zellen geerntet.

5.4 Aufreinigung des anti-idiotypischen Antikörpers

Die Antikörperaufreinigung wurde mit dem Strep-tag / Strep-Tactin-System durchgeführt (siehe 4.2.2.1). Dieses System ermöglichte die Aufreinigung anhand des Strep-tags, der eine hohe Strep-Tactin-Bindungsaffinität aufwies. An das Strep-Tactin gekoppelte Säulenmaterial konnte der Strep-tag binden.

Nach der Fermentation wurden 50 ml Aliquots der Proteinlösung (Periplasma-Aufschluss) bei -20°C eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt jeweils 50 ml zur Dialyse und anschließenden Aufreinigung einsetzen zu können. Die Dialyse ist eine wirkungsvolle Methode zum Entsalzen oder Umpuffern von Protein-Lösungen. Die

Poren des Dialyseschlauchs erlaubten Molekülen bis zur Ausschlussgröße den Durchtritt. Die Proteine blieben somit im Schlauch, Salze verteilten sich nach 2 – 5 h gleichmäßig auf das Innere und die Außenlösung.

Dialysiert wurde im Dialyseschlauch mit der Ausschlussgröße MWCO (molecular weight cut off) 4.000 – 6.000 und gegen 5 l Dialysepuffer, der 1 – 2mal gewechselt wurde (siehe 4.2.2.1).

Um die gepackten Säulen nicht zu überladen, wurde nicht mehr als 50 ml Proteinlösung eingesetzt, teilweise parallel mittels Gravity-Flow- (Schwerkraft-) und FPLC- (Fast Protein Liquid Chromatography) Verfahren aufgereinigt und anschließend die Proteinfractionen vereint, damit mehr aufgereinigter anti-idiotypischer Antikörper zum Koppeln an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B zur Verfügung stand.

5.4.1 Antikörperaufreinigung mittels Gravity-Flow (Schwerkraft)

Die Gravity-Flow-Säule war gepackt mit Strep-Tactin Sepharose und besaß ein Matrixvolumen von 6 ml. Nach der Äquilibration der Säule und Bindung über den Strep-tag des anti-idiotypischen Antikörpers an die Strep-Tactinmatrix wurde die Säule gewaschen, um anschließend den aufgereinigten anti-idiotypischen Antikörper eluieren zu können (siehe 4.2.2.1). Gewaschen wurde die Matrix mit 8x 10 ml Waschpuffer, jeder Waschschrift wurde gesondert aufgefangen und ein Aliquot zur späteren Analyse auf Eis aufbewahrt. Der über den Strep-tag an die Strep-Tactinmatrix gebundene anti-idiotypische Antikörper wurde mit 4x 4 ml und 1x 9 ml Elutionspuffer von der Matrix eluiert (siehe 4.2.2.1). Jeder der fünf Schritte wurde separat gesammelt und ein Aliquot zur Analyse auf Eis aufbewahrt.

Nach der Elution des Antikörpers wurde die Säule mit Regenerationspuffer zur Regeneration der Sepharose befüllt.

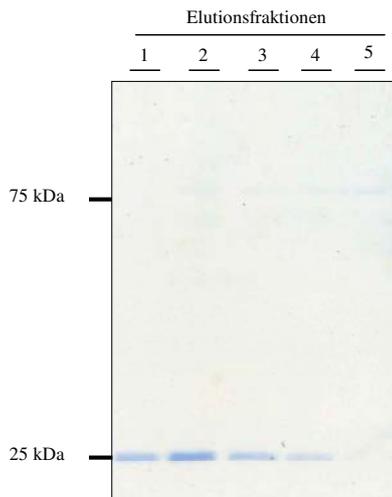


Abb. 5-13: Elutionsfraktionen der Antikörperaufreinigung mittels Gravity-Flow-Säule

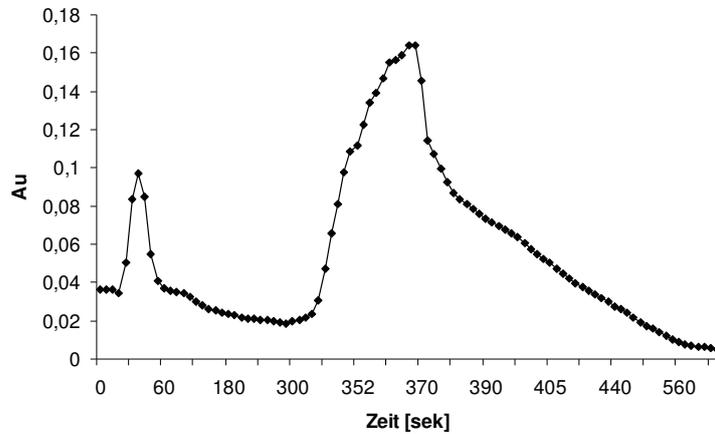
Fractionen 1 – 4 wurden mit 4 ml und Fraktion 5 mit 9 ml Elutionspuffer eluiert. 20 µl der Proben wurden auf ein SDS-Gel (15% Trenngel, 6% Sammelgel) aufgetragen und das Gel mit Coomassie gefärbt.

20 µl der fünf Elutionsfraktionen der Gravity-Flow Aufreinigung wurden auf ein SDS-Gel nativ aufgetragen und die Proteinbanden wurden mittels Coomassie-Färbung (siehe 4.2.2.12) sichtbar gemacht. Fraktion 1 – 4 zeigte Banden bei 26 kDa, in der 5. Fraktion war keine Färbung von Proteinen auf der Höhe mehr erkennbar.

5.4.2 Antikörperaufreinigung mittels FPLC

Auch die FPLC-Säule war mit Strep-Tactin Sepharose gepackt und hatte ein Matrixvolumen von 2,5 ml. Nach der Äquilibration der Säule und Bindung des anti-idiotypischen Antikörpers an die Matrix wurde die Säule gewaschen und anschließend der gebundene Antikörper in 2 ml Fraktionen mit Hilfe des Fraktionssammlers eluiert (siehe 4.2.2.1). Die Flussrate betrug 1 ml/min und der Druck auf die Säule durfte einen Wert von 250 psi nicht überschreiten. Die Elution wie auch die Waschschrte wurden beendet, nachdem ein größerer Peak zu sehen war, und sich die Linie der UV-Messung bei einem konstanten Wert eingependelt hat.

Aufreinigung mittels FPLC



Fraktionen: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

Abb. 5-14: Zeitlicher Verlauf der UV-Messung während der Aufreinigung mittels FPLC

Dargestellt ist die UV-Messung der FPLC in Abhängigkeit von der Zeit. Der große Peak stellt die Elution des anti-idiotypischen Antikörpers von der Strep-Tactinmatrix dar. Unter dem Diagramm ist der Umfang der 2 ml-Fraktionen dargestellt. In dem ersten Peak sollte noch kein Protein eluiert werden. Die 1. Fraktion wird zur Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Der zeitliche Verlauf der UV-Messung während der Aufreinigung und die Einteilung in die verschiedenen Fraktionen lässt eine Aussage darüber treffen, in welchen Fraktionen Eluat, der anti-idiotypische Antikörper, enthalten war. Die Fraktionen wurden im Gel untersucht.

Von den 2 ml Fraktionen wurden je 20 µl Eluat auf ein Gel aufgetragen (siehe 4.2.2.2) und Proteine mit Hilfe der Coomassie-Färbung angefärbt.

Im Anschluss an die Elution wurde die FPLC-Säule mit Regenerationpuffer regeneriert, bis sich die Matrix orange gefärbt hat.

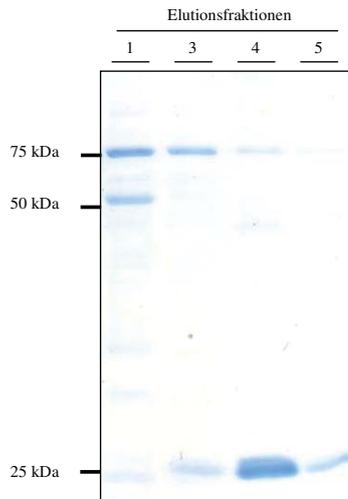


Abb. 5-15: Elutionsfraktionen der Antikörperaufreinigung mittels FPLC

Fraktion 3 – 5 wurden mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Fraktion 1 wurde ebenfalls analysiert. 20 μ l der Proben wurden auf ein SDS-Gel (15% Trenngel, 6% Sammelgel) aufgetragen und das Gel mit Coomassie gefärbt.

Von den Fraktionen wurden 20 μ l auf ein SDS-Gel nativ aufgetragen. Das Gel bzw. die Proteine wurden mittels Coomassie gefärbt (siehe 4.2.2.12). Anhand des zeitlichen Verlaufs der UV-Messung (siehe Abb. 5-14) konnte eine Elution des anti-idiotypischen Antikörpers in den Fraktionen 3 – 5 erwartet werden. Die erste Fraktion wurde mit aufgetragen, um den ersten Peak auf Proteine zu untersuchen. Das SDS-Gel zeigte Banden in Höhe von 26 kDa in den Fraktionen 3 – 5, aber keine Bande auf der Höhe der ersten Fraktion. Außerdem ist zu erkennen, dass das meiste Protein in der 4. Fraktion eluiert wurde. Zusätzlich waren Banden in Höhe von 75 kDa zu sehen, die bei fortgeschrittener Elution (Fraktion 5) nicht mehr nachzuweisen waren. Die erste Fraktion, die keinen anti-idiotypischen Antikörper enthielt, zeigte eine dritte Bande in Höhe von 50 kDa.

5.5 Charakterisierung des anti-idiotypischen Antikörpers

Die Charakterisierung des anti-idiotypischen Antikörpers fand mittels Western-Blot- und ELISA-Analyse statt. Damit sollten unspezifische Bindungen des scFv an andere anti-Glykan Antikörper überprüft und ausgeschlossen werden.

5.5.1 Charakterisierung mittels Western Blot

Die Charakterisierung mittels Western Blot sollte den anti-idiotypischen Antikörper im scFv-Format durch die spezifische Bindung des HNK-1 Antikörpers nachweisen. 40 µl aufgereinigter Periplasma-Aufschluss der Fermenter-Produktion wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 4.2.2.2) und anschließend mit einer Western-Blot-Analyse analysiert (siehe 4.2.2.3). Die Proben wurden mit reduzierendem (denaturiertem) und nicht-reduzierendem (nativen) Probenpuffer aufgetragen.

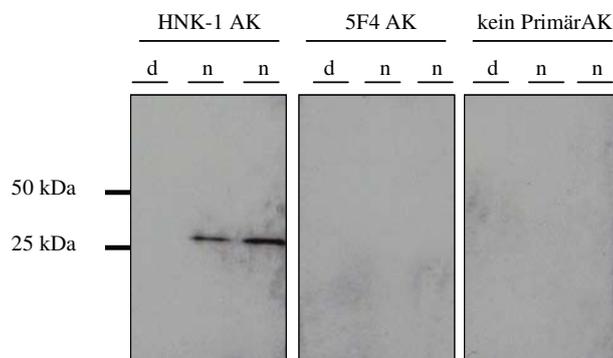


Abb. 5-16: Charakterisierung des anti-idiotypischen Antikörpers mittels Western Blot-Analyse

d = denaturiert; n = nativ; AK = Antikörper

40 µl Probe wurde denaturiert und nativ auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die drei Teile wurden zur Antikörper-Inkubation separiert, stammten aber von einem Gel. Primärantikörper waren HNK-1, 5F4 und bei dem dritten Teil der Membran fand keine Primärantikörper-Inkubation statt. Der Sekundärantikörper war bei den drei Abschnitten identisch, α -Maus HRP.

Die Membran mit transferierten Proteinen wurde in drei Teile geschnitten, um verschiedene Primärantikörper damit inkubieren zu können. Zur Kontrolle der Bindung des aufgetragenen anti-idiotypischen Antikörpers an den HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde einer der drei Teile ohne Primärantikörper inkubiert. Die

beiden anderen Teile der gedrittelten Membran wurden einmal mit HNK-1 und der andere Teil mit 5F4 Primärantikörper inkubiert. Beide Antikörper stammen von derselben Spezies, in diesem Fall Maus, und wurden mit einer Konzentration von 2 µg/ml auf die Membran aufgebracht. Der Sekundärantikörper α -Maus HRP 1:10.000 inkubierte für alle drei Teile identisch.

Die Western Blot-Analyse detektierten Banden in Höhe von 26 kDa der nativ aufgetragenen Proben der HNK-1 Primärantikörper-Inkubation entsprachen der Größe des anti-idiotypischen Antikörpers. Weitere Banden waren auf den Blots nicht sichtbar.

5.5.2 Charakterisierung mittels ELISA

Die Charakterisierung mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sollte die spezifische Bindung des anti-idiotypischen Antikörpers zum HNK-1 Antikörper in verschiedenen Konzentrationen zeigen (siehe 4.2.2.6).

Die Wells einer ELISA-Platte wurden mit 5 µg/ml Antikörper (HNK-1, 412, 5F4 und L5) und zur internen Kontrolle 3 Wells mit dem anti-idiotypischen Antikörper über Nacht beschichtet. Die verwendeten Antikörper waren HNK-1, 412, 5F4 und L5, wobei nur L5 ein IgM aus der Ratte war, die anderen waren aus der Maus. Geblockt wurde der ELISA mit 5% BSA und als Bindungspartner diente der aufgereinigte anti-idiotypische Antikörper im scFv-Format. Der Primärantikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt und auf die Antikörper-beschichteten Wells aufgetragen. Als Sekundärantikörper, wobei es kein Antikörper sondern ein HRP-Konjugat war, wurde Strep-Tactin HRP (1:100.000) eingesetzt.

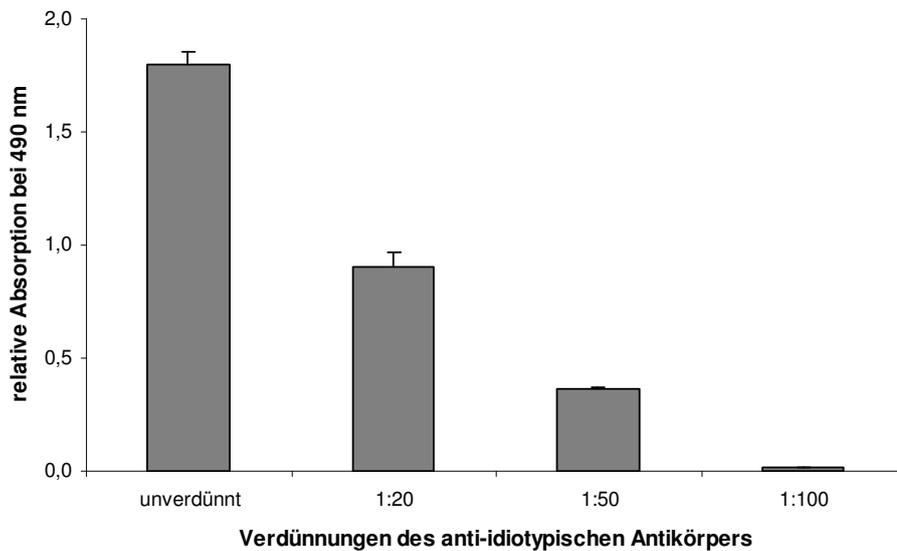


Abb. 5-17: Die Bindung vom anti-idiotypischen Antikörper zum HNK-1 Antikörper

Gemessen wurde die Bindung vom anti-idiotypischen Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen zum HNK-1 Antikörper bei einer relativen Absorption von 490 nm. Der ELISA wurde mit 5 µg/ml Antikörper beschichtet, geblockt mit 5% BSA und mit dem anti-idiotypischen Antikörper in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:20, 1:50 und 1:100) inkubiert. Als Sekundärantikörper diente Strep-Tactin HRP.

Zu einem positiven ELISA-Ergebnis führte ausschließlich die Reaktion des HNK-1 Antikörpers. Der ELISA wurde als Dreifach-Ansatz durchgeführt, für jede Verdünnung wurden 3 Wells mit Antikörper beschichtet und mit einer Verdünnungsstufe des anti-idiotypischen Antikörpers inkubiert. Der Mittelwert der 3 Messungen der jeweiligen Verdünnungsstufe wurde errechnet und abgebildet (Abb. 5-17).

Die Antikörper 412, 5F4 und L5 zeigten keinerlei Bindung an den anti-idiotypischen Antikörper und wurden daher hier nicht dargestellt. Die interne Kontrolle, anti-idiotypischen Antikörper beschichtet und detektiert mit Strep-Tactin HRP, war positiv (hier nicht dargestellt).

Zusätzlich wurde ein möglicher Unterschied zwischen der Detektion mit Strep-MAB HRP und Strep-Tactin HRP untersucht. Strep-MAB HRP ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der spezifisch und mit sehr hoher Affinität das Strep-tag II-Affinitätspeptid bindet. Er ist bereits HRP-konjugiert, wodurch eine Detektion mittels Sekundärantikörper nicht nötig war. Alle Proben wurden auf einer zweiten Platte ebenfalls aufgetragen und statt mit Strep-Tactin HRP (1:100.000) mit Strep-MAB HRP (1:4.000) inkubiert. Anhand der Messung wurde der Mittelwert der Dreifach-Ansätze der verschiedenen Verdünnungsstufen errechnet. Es zeigte sich kein nennenswerter Unterschied zwischen der Inkubation mit Strep-Tactin HRP und Strep-MAB HRP.

5.6 Identifizierung potentieller neuer HNK-1 Rezeptoren

Zur Identifizierung potentieller neuer HNK-1 Rezeptoren wurde der anti-idiotypische Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt. Dadurch war es möglich in Maushirnhomogenat nach neuen Interaktionspartnern zu suchen.

Die Ergebnisse der Western Blot- und ELISA-Analyse legten nahe, dass der anti-idiotypische Antikörper das HNK-1 Kohlenhydrat mimikriert.

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden die potentiellen neuen Bindepartner im Eluat mittels TCA-Fällung gefällt. Anschließend fand eine SDS-Analyse der Proteine mit anschließender Coomassie-Färbung statt, wodurch Banden sichtbar gemacht worden waren, die ausgeschnitten und mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert wurden.

5.6.1 Kopplung des anti-idiotypischen Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Für die Kopplung des gereinigten anti-idiotypischen Antikörpers in scFv-Format wurden die Elutionsfraktionen der Gravity-Flow- und FPLC-Aufreinigung (siehe 5.4.1 und 5.4.2) vereint, um mehr Antikörper an die Sepharose koppeln zu können. Von der Gravity-Flow-Aufreinigung war Protein in den Fraktionen 1 – 4 enthalten und von der FPLC-Aufreinigung in den Fraktionen 3 – 5. Nach der Aufreinigung wurden die

gepoolten Elutionsfraktionen in Kopplungspuffer umgepuffert und aufkonzentriert. Umgepuffert und konzentriert wurde der anti-idiotypische Antikörper mit Vivaspinsäulen, die eine Ausschlussgröße von 5 kDa besaßen (siehe 4.2.2.7). Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration in der aufkonzentrierten Probe mit dem BCA-Test bestimmt (siehe 4.2.2.8).

Für die Kopplung an die Sepharose standen, laut BCA-Test, 500 µg anti-idiotypischer Antikörper zur Verfügung (siehe 4.2.2.9). Das Kopplungsergebnis wurde mit einem BCA-Test nach Kopplung des Antikörpers an die Sepharose überprüft. In diesem Test wurde keine bestimmbare Proteinmenge gemessen. Dieses Ergebnis lies auf eine erfolgreiche Kopplung des anti-idiotypischen Antikörpers schließen.

5.6.2 Affinitätschromatographie zur Identifizierung neuer Rezeptoren

Die Affinitätschromatographie wurde im Batch-Verfahren durchgeführt. Als Säulenmaterial diente die CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit gekoppeltem HNK-1 anti-idiotypischen Antikörper (siehe 4.2.2.10). Der 500 g Gehirnhomogenat-Überstand stammte von 9 bis 20 Wochen alten Wildtypmäusen des Stammes C57Bl6J (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Mit Hilfe der Matrix wurde in dem Gehirnhomogenat von zwei Mäusen nach potentiellen neuen Rezeptoren für das HNK-1 Kohlenhydrat gesucht.

Nach Inkubation mit dem Maushirnhomogenat wurde die Matrix 3x mit 5 ml Waschpuffer B und 3x mit 5 ml Waschpuffer C gewaschen. Die Überstände der Waschschrte wurden zur Analyse aufbewahrt. Die Proteine konnten mit 2 ml Elutionspuffer über einen pH-Shift von der mit dem anti-idiotypischen Antikörper gekoppelten Matrix eluiert.

Das Eluat wurde mit 500 µl 1 M Tris/HCl pH 6,8 neutralisiert und anschließend die Proteine mit Hilfe einer TCA-Fällung gefällt (siehe 4.2.2.11).

Zur Regeneration wurde die Matrix alternierend mit Regenerationspuffer A und B gewaschen und in PBS mit 0,01% Natriumazid gelagert.

5.6.3 SDS-Gel-Analyse der TCA-gefällten Proteine

Die Proteine der Waschschrte und des Eluats wurden in Anwesenheit von TCA gefällt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das nach der TCA-Fällung getrocknete Pellet wurde in 20 μ l 1 M eiskaltem Tris und 5 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einem SDS-Gel (8% Trenngel) laufen gelassen und anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

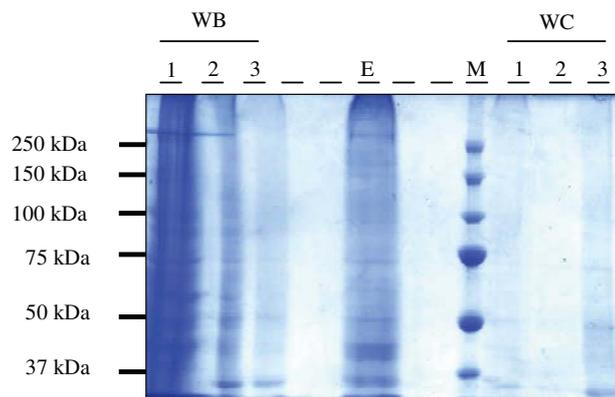


Abb. 5-18: SDS-Gel der TCA-gefällten Proteine

WB = Waschpuffer B; WC = Waschpuffer C; M = Marker; E = Eluat

Auf das 8%ige SDS-Gel wurden 20 μ l der TCA-gefällten Waschschrte 1 – 3 von Puffer B und C und 20 μ l des TCA-gefällten Eluats aufgetragen. Jeweils links und rechts zwei Taschen neben der Eluat-Auftragung wurde nichts aufgetragen.

Die zu untersuchenden Banden, mit potentiellen neue Rezeptoren, befanden sich im Eluat. Aus diesem Grund wurden die Banden mit Hilfe eines Skalpell vorsichtig aus dem Gel separiert, einzeln in Reaktionsgefäße überführt und zur Massenspektrometrie-Analyse gegeben. 8 Banden wurden unter möglichst reinen Bedingungen (Mundschutz, Haarnetz und neuen Gebrauchsmaterialien), damit keine fremden Proteine das Ergebnis der Massenspektrometrie verfälschten, ausgeschnitten.

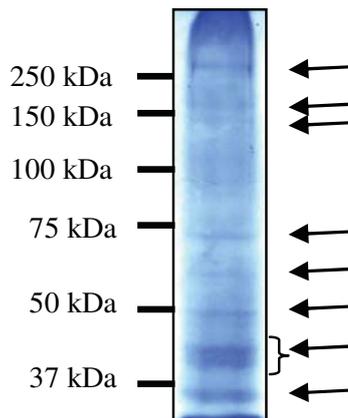


Abb. 5-19: Banden für die Massenspektrometrie

Die Bande war aus dem SDS-Gel der TCA-gefällten Proteine (Abb.?). Die Pfeile markieren die 8 ausgeschnittenen und zur Massenspektrometrie eingereichten Proben. Die Klammer deutet auf zwei Banden, die nicht voneinander getrennt werden konnten und zusammen analysiert werden mussten.

5.6.4 Massenspektrometrieergebnis

Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Dr. F. Buck (UKE Hamburg) durchgeführt.

Insgesamt zeigte die Massenspektrometrie Ergebnisse, die wie folgt dargestellt werden konnten:

Tab. 5-2: Massenspektrometrieergebnis

Alle durch die Massenspektrometrie gefundenen Proteine sind aufgelistet und nach ihrem Vorkommen sortiert.

Extrazelluläre Proteine:

CN37

RSSA

Mito- und cytoplasmatische Proteine:

GAPDH

PSMD3

HNRPK

ATP B

RAP 1

ATP A

IDH 3A

Cytoskelett:

Clathrin

Spectrin α

Tubulin

Actin

AP 180

DCT N2

AP 1B1 oder AP 2B1

SHLB2 (endophilin)

SH3G2 (endophilin A1)

SH3G3

TMOD2 (Tropomodulin 2)

CAZ A-2 (capping Protein)

CAZ A-1

CICA

Chaperone:

HSP 70

HSP 60

TCPE

PDIA6

6. Diskussion

Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten Studien zum HNK-1 Antikörper, der im eigenen Institut untersucht wurde [Schachner, 1989; Schachner & Martini, 1995]. In einem vorangegangenen Projekt in derselben Arbeitsgruppe konnten anti-idiotypische Antikörperfragmente gegen den zuvor gereinigten monoklonalen Antikörper HNK-1, welcher das HNK-1 Kohlenhydrat erkennt, isoliert werden (Dr. Martine Albert, 2001).

Für die nach der Phage-Display-Methode isolierten anti-idiotypischen Antikörper wurde eine Antikörper-Bibliothek [Nissim et al., 1994] im scFv-Format (single chain variable fragment) verwendet. Antikörperfragmente in einem scFv-Format besitzen variable Regionen der schweren und leichten Kette eines Antikörpers. Die beiden variablen Regionen sind über einen kurzen Peptidlinker von 10 – 25 Aminosäuren miteinander verknüpft. Die Antikörper-Bibliothek bestand aus mehr als 10 hoch 8 humane Antikörperfragmenten. Der monoklonale Antikörper HNK-1 [Abo & Balch, 1981] wurde für die Phage-Display-Methode als Antigen eingesetzt.

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die anti-idiotypischen Antikörperfragmente mit dem Originalantigen um die Antigen-Bindungsstelle des HNK-1 Antikörpers, der ein Epitop des sulfatierten HNK-1 Kohlenhydrats erkennt, konkurrieren [Kruse et al., 1984]. Die isolierten Antikörperfragmente zeigten eine hohe Affinität zum HNK-1 Antikörper und Immunreaktivität an Geweben mit potentiellen Bindungspartnern. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass das vom HNK-1 Antikörper erkannte Epitop von den anti-idiotypischen Antikörperfragmenten mimikriert wurde.

Aufgrund dieser Resultate sollte die Antigen-mimikrierende Eigenschaft der anti-HNK-1-Antikörperfragmente weiter spezialisiert werden und nach bekannten sowie neuen Rezeptoren für das HNK-1 Kohlenhydrat im Nervensystem der Maus gesucht werden. Für Cerebellumzellen aus der postnatalen Maus konnte eine Mitwirkung des HNK-1 Kohlenhydrats an Zell-Zell- und an Zell-Substrat-Interaktion gezeigt werden [Keilhauer et al., 1985; Künemund et al., 1988]. Die Zellen müssten somit über Rezeptoren für das HNK-1 Kohlenhydrat verfügen.

So wurde bereits z.B. an dem Extrazellulärmatrixmolekül Laminin eine spezifische Bindungsstelle für das HNK-1 Kohlenhydrat [Hall et al., 1995] identifiziert.

6.1 Klonierung der anti-idiotypischen Antikörperfragmente in pASK 118

Mit einem ersten Expressionstest konnte der anti-idiotypische Antikörper im scFv-Format anhand der Bindung des Primärantikörpers HNK-1 nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte durch einen Kontrollblot eine Interaktion zwischen dem scFv und dem Sekundärantikörper α -Maus HRP ausgeschlossen werden (siehe Abb. 5-1). Die denaturiert aufgetragenen Proteine haben vermutlich ihre Sekundärstruktur verloren und sind deshalb nicht mehr nachweisbar. Aufgrund dieses Nachweises wurde mit dem vorhandenen anti-idiotypischen Antikörper weitergearbeitet und mit der Klonierung in den pASK 118 Expressionsvektor begonnen.

Ziel dieses Projektes war unter anderem den anti-idiotypischen Antikörper aufzureinigen und an einer Matrix zu immobilisieren, um neue Interaktionspartner im Gehirn der Maus identifizieren zu können.

Der anti-idiotypische Antikörper wurde von Dr. Martine Albert in einem Vektor mit c-Myc-Affinitäts-Tag übernommen und sollte im Rahmen dieser Arbeit in einen Strep-tag Vektor umklontiert werden. Damit sollte der anti-idiotypische Antikörper nicht nur detektiert, sondern auch aufgereinigt werden können.

Die Amplifikation der variablen Domänen des scFv konnte sowohl mit Phusion als auch mit einer Taq Polymerase durchgeführt werden.

Durch das Auftragen der PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel mit anschließender Gelelektrophorese konnten die amplifizierten Fragmente anhand eines Größenstandards identifiziert (siehe Abb. 5-3 und Abb. 5-5) und in den Zielvektor ligiert werden.

Die Antikörperfragmente konnten rekombinant in *E. coli*-Zellen exprimiert werden. Der Expressionsvektor pASK 118 zeichnet sich durch ein Signalpeptid, einen StrepII-Affinitätstag (WSHPQFEK) und ein Chloramphenicol Acetyltransferase-Gen für eine Antibiotika-Resistenz gegen Chloramphenicol aus.

Eine direkte Klonierung des Inserts, amplifiziert mittels Phusion Hot Start Polamerase, in den Expressionsvektor nicht möglich, weswegen zunächst in den pGEM-T Easy Vektor subkloniert wurde. Die Subklonierung diente dazu, geeignete Schnittstellen für die spätere Ligation in den pASK 118 Vektor einfügen.

Nach der Ligation der PCR-Fragmente mit dem pGEM-T Easy Vektor wurde der Ansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert, auf Agarplatten über Ampicillinresistenz des Vektors selektiert und anschließend mit Hilfe des Mini-Kits aus den Bakterien wiedergewonnen. Der Erfolg der Klonierung wurde anhand eines Restriktionsverdaus und einer anschließenden DNA-Sequenzierung überprüft. Der Zielvektor pASK 118 und das Insert aus dem Hilfsvektor pGEM-T Easy wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten, im Agarose-Gel separiert und mit einem Gelextraktionskit aufgereinigt (siehe Abb. 5-7). Im Anschluss an die Ligation wurde der Ansatz in kompetente *E. coli*-Zellen DH5 α transformiert. Über die Chloramphenicolresistenz des Expressionsvektors wurde auf Agarplatten selektiert und die Plasmid-DNA der einzeln gewachsenen *E. coli*-Kolonien durch Plasmidisolierung gewonnen. Durch eine DNA-Sequenzanalyse wurde der Erfolg der Klonierung bestätigt.

6.2 Produktion des anti-idiotypischen Antikörpers in *E. coli*

Rekombinante Proteine, die in *E. coli* exprimiert werden, können entweder aus dem Zytoplasma (Zellinnere) oder aus dem Periplasma isoliert werden. Der Periplasmatische Raum liegt zwischen der Zytoplasmamembran und äußeren Membran Gram-negativer Bakterien.

Bei der Expression vom HNK-1 anti-idiotypische Antikörper ist eine bakterielle Signalsequenz vorhanden, die mit den zu sekretierenden Proteinen ein Fusionsprotein bildet und somit in den Periplasmatischen Raum gelangt. Zur Isolation der rekombinanten Proteine aus dem Periplasma wurde die äußere Membran permeabilisiert. Die Disulfidbrücken in *E. coli* sind nativ nur im Periplasma möglich, der Nachteil hierbei ist allerdings die geringere Ausbeute.

6.2.1 Überprüfung / Vergleich der Expression im Schüttelkolben

Die Expression wurde durch Transformation in kompetente *E. coli* JM83 und HB2151 Bakterien überprüft und verglichen. Die Proteinproduktion wurde durch Anhydrotetracyclin-Lösung bei einer OD₆₀₀ von 0,6 induziert. Beide Stämme wurden jeweils einmal für 3 h und einmal über Nacht nach Induktion weiter inkubiert.

Mittels Western Blot-Analyse konnte der Strep-tag und die Proteingröße, durch Bindung des HNK-1 Antikörpers, des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden. Beide Ergebnisse zeigten Banden in Höhe von 26 kDa, welche der Größe des anti-idiotypischen Antikörpers entsprach (siehe Abb. 5-10 und 5-11).

Die dickeren Banden des HB2151 Stammes deuteten auf mehr produziertes Protein hin. Bei der Isolation der Proteine wurde das Volumen an Periplasma-Aufschlusspuffer in Abhängigkeit der optischen Dichte der Stämme aneinander angeglichen.

Proteine und Strep-tag sind ausschließlich im Periplasma und nicht im Medium zu detektieren, was allerdings mit dem Hintergrund, dass Dr. Martine Albert mit den anti-idiotypischen Antikörperfragmenten aus dem Bakterienkulturüberstand gearbeitet hat, zunächst nicht auszuschließen war. Nach diesem Ergebnis wurde das Medium für weitere Untersuchungen und Analysen nicht mehr herangezogen.

Die Banden in Höhe von 26 kDa waren in den Übernachtskulturen kaum noch vorhanden. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die Bakterienstämme ein gutes Wachstumsverhalten besitzen, wodurch das Kulturvolumen für eine über Nacht Inkubation erhöht hätte werden müssen. Über Nacht könnte auch ein Abbau der Proteine stattgefunden haben oder eine Aggregation der Proteine.

Die optimale Wachstumstemperatur für *E. coli* beträgt 37°C, in diesem Versuch wurde bei 30°C inkubiert, um Aggregatbildung und Degradation durch Proteasen, wozu rekombinante Proteine anfällig sind, zu vermeiden. Mit der Senkung der Inkubationstemperatur über Nacht hätte womöglich die Expression der Proteine ohne Abbau erreicht werden können.

Weiterhin ist in den Western Blot-Analysen eine zweite Bande, in Höhe von 50 kDa, zu erkennen, die auf eine Dimerbildung des scFv hindeutet.

6.2.2 Fermenterlauf zur Produktion des anti-idiotypischen Antikörpers

Die Expression des anti-idiotypischen Antikörpers konnte im Schüttelkolben gezeigt werden. Anhand des Vergleiches der beiden *E. coli*-Stämme wurde für die Produktion des rekombinanten Proteins HB2151-Zellen gewählt. Dieser *E. coli*-Stamm wies die höhere gebildete und isolierte Proteinmenge auf. Weiterhin sprach für diesen Stamm, dass bereits Dr. Martine Albert mit HB2151-Zellen gearbeitet hat. Der wichtigste statische Prozessparameter ist das Nährmedium, welches zur Kultivierung eingesetzt worden war. Nur mit geeignetem Nährmedium können hohe Wachstumsraten und hohe Zelldichten erzielt werden. Aus diesem Grund wurde das Komplexmedium TB verwendet.

Um den Verlauf der Fermentation besser nachvollziehen zu können, wäre ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit den gezogenen Messproben interessant gewesen.

Die Ernte erfolgte 3 h nach Induktion der Proteinproduktion.

6.3 Aufreinigung und Charakterisierung des anti-idiotypischen Antikörpers

6.3.1 Aufreinigung

Zur Kopplung des anti-idiotypischen Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose 4B musste der Antikörper von den restlichen bakteriellen Proteinen gereinigt werden.

Mit dem der Fragmente eingefügten Strep-tag sollten die anti-idiotypischen Antikörperfragmente aus dem Periplasma-Aufschluss mit Strep-Tactin Sepharose isoliert werden, indem der Strep-tag an das gekoppelte Strep-Tactin der Matrix bindet und anschließend mit Desthiobiotin, einem Biotin-Derivat, eluiert. Das Desthiobiotin bindet im Gegensatz zu Biotin reversibel an Strep-Tactin.

Die Aufreinigung der Proteine fand unter nativen Bedingungen, also funktionell aktiver Form der Fragmente, statt. Die Coomassie-gefärbten SDS-Gele zeigten das rekombinante Proteine in seiner monomeren Form (siehe 5-13 und 5-15). Das Protein mit der Größe von 75 kDa, welches ebenfalls in den SDS-Gelen zu sehen war, wurde auch in den Waschschrritten zuvor sichtbar (hier nicht dargestellt), hierbei handelte es

sich vermutlich um ein bakterielles Protein, welches die Suche nach neuen Rezeptoren nicht behindern sollte.

Die grafische Darstellung der FPLC-Aufreinigung zeigte einen kleineren Peak in der ersten Fraktion (siehe 5-14). Die SDS-Gel-Analyse konnte allerdings eine Elution des anti-idiotypischen Antikörpers in dieser Fraktion ausschließen. Der Peak entstand vermutlich bei dem Wechsel von Waschpuffer auf Elutionspuffer, zu dem Zeitpunkt wurde der Fluss kurz gestoppt und könnte eine Veränderung der UV-Messung bewirkt haben.

Das Ergebnis der Aufreinigung mit dem Gravity-Flow- und FPLC-Verfahren mit Hilfe der Strep-Tactin Sepharose war erfolgreich, der anti-idiotypische Antikörper wurde aufgereinigt und vermeintliche Dimere waren in der SDS-Analyse nicht zu verzeichnen.

6.3.2 Charakterisierung

Charakterisiert wurde der anti-idiotypische Antikörper im Western Blot und im ELISA. Im Western Blot sollte die spezifische Bindung zum HNK-1 Antikörper gezeigt werden, indem die Bindung mit der zum 5F4 und Sekundärantikörper verglichen wurde. Lediglich eine Bindung zum HNK-1 Antikörper konnte gezeigt werden (siehe 5-16). Eine Bindung zum HNK-1 Antikörper fand ausschließlich bei den nativ aufgetragenen Proben statt. Diese wurden für ein eindeutiges Ergebnis doppelt aufgetragen.

Das Ergebnis der Charakterisierung im Western Blot zeigte eine spezifische Bindung des HNK-1 Antikörpers zum anti-idiotypischen Antikörper. Andere anti-Glykan Antikörper bindeten nicht.

Die Charakterisierung im ELISA bestätigte das Ergebnis und zeigte zusätzlich, dass die Bindung des HNK-1 Antikörpers zum anti-idiotypischen Antikörper konzentrationsabhängig war. Der ELISA wurde mit den zur Bindung testenden Antikörpern beschichtet und mit dem anti-idiotypischen Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Als Antikörper wurden Antikörper der gleichen Spezies gewählt und L5 aus der Ratte. 412 war ein monoklonaler Antikörper, der auch nicht

sulfatiertes HNK-1 Kohlenhydrat und somit ein anderes Epitop des Antigens erkennt [Chou et al., 1986] und 5F4 für den Bindungstest eingesetzt. Die Detektion der Bindung mit Strep-Tactin oder mit Strep-MAB machte keinen Unterschied.

Der ELISA zeigte ausnahmslos nur Bindungen des HNK-1 Antikörpers an den anti-idiotypischen Antikörper (siehe Abb. 5-17) und eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung.

Anhand der Charakterisierung im Western Blot und im ELISA wurde vermutet, dass der anti-idiotypische Antikörper das HNK-1 Kohlenhydrat mimikriert.

6.4 Identifizierung potentieller HNK-1 Rezeptoren

Zur Identifizierung neuer HNK-1 Rezeptoren musste der anti-idiotypische Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt werden. Trotz der gepoolten Fraktionen konnte nicht mehr als 500 µg anti-idiotypischer Antikörper an die Sepharose gekoppelt werden. Die schlechte Proteinkonzentration könnte mit der Klonierung des anti-idiotypischen Antikörpers in einen anderen Vektor verbessert werden.

500 µg wurden zur Kopplung verwendet. In Maushirnhomogenat wurde nach potentiellen Rezeptoren gesucht. Dafür wurde ein 500 g Überstand zweier homogenisierter Gehirne auf die Sepharose gegeben und inkubiert. Auf die Affinitätschromatographie folgend, wurde eine TCA-Fällung und anschließend eine SDS-Analyse mit den Waschschrinen und dem Eluat durchgeführt (siehe Abb. 5-18).

Die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden (siehe Abb. 5-19) wurden mit der Massenspektrometrie analysiert (siehe Tab. 5-2).

Identifiziert wurden unter anderem extrazelluläre Proteine CN37, welches GPI verankert und auf Gliazellen zu finden ist und RSSA, das ribosomale Protein SA, ein Laminin Rezeptor [Akama et al., 2008]. Weiterhin noch interessant war GAPDH. Zur weiteren Analyse sollten die Ergebnisse reproduziert werden.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der HNK-1 anti-idiotypische Antikörper im Laborfermenter produziert, um nach potentiellen Rezeptoren der Glykostruktur HNK-1 zu suchen.

Das HNK-1 Kohlenhydrat scheint an zahlreichen Zellinteraktionen im Nervensystem beteiligt zu sein, die unter anderem die Entwicklung, die Regeneration peripherer Nerven und die Aufrechterhaltung wichtiger Strukturen wie der Bluthirnschranke betreffen. Das Kohlenhydrat wird von zahlreichen neuronalen Erkennungsmolekülen in verschiedenen Spezies exprimiert.

Der HNK-1 Antikörper, der gegen ein Membranantigen einer kultivierten humanen T-Zelllinie gerichtet ist, bindet spezifisch an ein Antigen auf einer Untergruppe humaner natürlicher Killerzellen. Durch biochemische Analysen an Glykoproteinen, die das Epitop des HNK-1 Antikörpers tragen, konnte gezeigt werden, dass das Antigen ein Kohlenhydrat ist. Die für die Immunreaktivität des Kohlenhydrates verantwortliche Struktur ist das saure sulfatierte Trisaccharid 3-O-Sulfo-GlcA(β -1 \rightarrow 3)Gal(β -1 \rightarrow 4)GlcNAc am nicht reduzierenden Ende.

In einem vorherigen Projekt konnte das rekombinante anti-idiotypische Antikörperfragment gegen den Kohlenhydrat-erkennenden monoklonalen Antikörper HNK-1 isoliert werden. Für die Isolation wurde die Phage-Display-Methode eingesetzt.

In Anlehnung an dieses Projekt wurde der anti-idiotypische Antikörper aufgereinigt, charakterisiert und zur Identifizierung neuer HNK-1 Rezeptoren eingesetzt.

Hierzu wurde der anti-idiotypische Antikörper zunächst in einen Vektor mit einem Strep-tag kloniert. Dies gelang erst über Subklonierung in den pGEM-T Easy Vektor. Der anti-idiotypische Antikörper besaß ein Molekulargewicht von 26 kDa und ein scFv-Format. Nach der Produktion im Laborfermenter wurden die Fragmente aus dem Periplasma aufgereinigt. Weiter wurde der anti-idiotypische Antikörper charakterisiert und somit die spezifische Bindung zum HNK-1 Antikörper gezeigt. Die Bindung zu weiteren anti-Glykan Antikörpern konnte ausgeschlossen werden.

Durch Kopplung der Fragmente an CNBr-aktivierte Sepharose 4B konnten potentielle Bindungspartner in Gehirnen der Maus identifiziert werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte dem extrazellulären Matrix Protein RSSA geschenkt werden, der ein Laminin-Rezeptor ist.

8. Literaturverzeichnis

- T. Abo, C. M. Balch, *J. Immunol.* **1981**, *127*, 1024-1029.
- T. Agria, T. Kohriyama, L. Freddo, N. Latov, M. Saito, K. Kon, S. Ando, M. Suzuki, M. E. Hemling, K. L. Rinehart Jr., S. Kusunoki, R. K. Yu, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 848-853.
- K. Akama, R. Tatsuno, M. Otsu, T. Horikoshi, T. Nakayama, M. Nakamura, T. Toda, N. Inoue, *Biochim. Biophys Acta* **2008**, *1784*, 773-82
- U. Bartsch, F. Kirchhoff, M. Schachner, *J. Comp. Neurol.* **1989** *284*, 451-462.
- E. Bollensen, M. Schachner, *Neurosci. Lett.* **1987**, *82*, 77-82.
- P. E. Braun, D. E. Frail, N. Latov, *J. Neurochem.* **1982**, *39*, 1261-1265.
- P. A. Bunn Jr., I. Linnoila, J. D. Minna, D. Carney, A. F. Gazdar, *Blood* **1985**, *65*, 764-768.
- J.-M. Caillaud, S. Benjelloun, J. Bosq, K. Braham, M. Lipinski, *Cancer Res.* **1984**, *44*, 4432-4439.
- D. K. H. Chou, A. A. Ilyas, J. E. Evans, C. Costello, R. H. Quarles, F. B. Junalwala, *J. Biol. Chem.* **1986** *261*, 11717-11725.
- D. K. H. Chou, N. Prasadarao, O. Koul, F. B. Jungalwala, *J. Neurochem.* **1991**, *57*, 852-859.
- G. M. Edelman, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 135-169.
- G. M. Edelman, K. L. Crossin, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 155-190.
- B. F. Erlanger, *Imm. Tod.* **1989**.
- A. Faissner, *Neurosci. Lett.* **1987** *83*, 327-332.
- B. A. Fields, F. A. Goldbaum, X. Ysern, R. J. Poljak, R. A. Mariuzza, *Nature* **1995**, *374*, 739-742.
- A. Furuya, H. Yoshida, N. Hanai, *Antic. Res.* **1992**, *12*, 27-32.
- H. Hall, L. Liu, M. Schachner, B. Schmitz, *Eur. J. Neurosci* **1993**, *5*, 34-43.
- H. Hall, T. Vorherr, M. Schachner, *Glycobiol.* **1995**, *5*, 435-441.

- H. Hall, R. Deutzmann, R. Timpl, L. Vaughan. B. Schmitz, M. Schachner, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 233-242.
- K. Hirashima, K. Zenita, A. Takada, A. Kitahara, G. Ishihara, R. Harada, K. Ohmori, S. Hirohashi, S. Kyoizumi, M. Akiyama, R. Kannagi, *J. Imm.* **1990**, *145*, 224-232.
- A. Ilyas, D. K. Chou, F. B. Jungalwala, C. Costello, R. H. Quarles, *J. Neurochem.* **1990**, *55*, 594-601.
- N. K. Jerne, *Ann. Immunol.* **1974**, *125C*, 373-389.
- F. B. Jungalwala, *Neurochem. Res.* **1994**, *19*, 945-957.
- G. Keilhauer, A. Faissner, M. Schachner, *Nature* **1985**, *316*, 728-730.
- A. V. Kornilov, A. A. Sherman, L. O. Kononov, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 717-730.
- J. Kruse, R. Mailhammer, H. Wernecke, A. Faissner, I. Sommer, C. Goridis, M. Schachner, *Nature* **1984**, *311*, 153-155.
- V. Künemund, F. B. Jungalwala, G. Fischer, D. K. H. Chou, G. Keilhauer, M. Schachner, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 213-223.
- J.-G. Leu, B.-X. Chen, A. W. Diamanduros, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10690-10694.
- M. Lipinski, K. Braham, J. M. Caillaud, C. Carlu, T. Tursz, T. Feizi, *J. Exp. Med.* **1983**, *158*, 1775-1780.
- R. C. McGarry, S. L. Helfand, R. H. Quarles, J. C. Roder, *Nature* **1983**, *306*, 376-378.
- P. S. Mohan, D. K. H. Chou, F. B. Jungalwala, *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 2024-2031.
- T. Nakano, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1569-1572.
- A. Nissim, H.R Hoogenboom, I.M. Tomlinson, G. Flynn, C. Midgley, D. Lane, G. Winter, *J. EMBO* **1994**, *13*, 692-8
- A. Noronha, A. Ilyas, R. H. Quarles, H. Antonicek, M. Schachner, *Brain Res.* **1986**, *385*, 237-244.
- P. Pesheva, A. F. Horwitz, M. Schachner, *Neurosci. Lett.* **1987**, *83*, 303-306.
- M. Poltorak, R. Sadoul, G. Keilhauser, C. Landa, T. Fahrig, M. Schachner, *J. Cell. Biol.* **1987**, *105*, 1893-1899.
- G. Reifenberger, J. Szymas, W. Wechsler, *Acta Neuropathol. (Berl.)* **1987**, *74*, 105-123.

- M. Schachner, *Ciba Fdn. Symp.* **1989**, 145, 56-172.
- M. Schachner, R. Martini, *Trends Neurosci.* **1995**, 18, 183-191.
- B. Schmitz, M. Schachner, Y. Ito, T. Nakano, T. Ogawa, *Glycoconj. J.* **1994**, 11, 345-352.
- S. Schuller-Petrovic, W. Gebhart, H. Lassmann, H. Rumpold, D. Kraft, *Nature* **1983**, 306, 179-181.
- G. Sen, M. Chakraborty, K. A. Foon, R. A. Reisfeld, M. Bhattacharya-Chatterjee, *J. Imm.* **1998**, 21, 75-83.
- A. J. Steck, N. Murray, C. Meier, N. Page, G. Perruisseau, *Neurol.* **1983**, 33, 19-23.
- K. Stefansson, L. Marton, J. P. Antel, R. L. Wollmann, R. P. Roos, G. Chejfec, B. G. W. Arnason, *Act. Neurop.* **1983**, 59, 255-261.
- A. H. Tatum, *Ann. Neurol.* **1993**, 33, 502-506.
- Y. Tsutsumi, *Acta Histochem. Cytochem.* **1984**, 17, 15-21.
- M. Umeda, I. Diego, E. D. Ball, D. M. Marcus, *J. Imm.* **1986**, 137, 2562-2567.
- H. Voshol, W. E. M. van Zuylen, G. Orbrger, J. F. G. Vliegenthart, M. Schachner, *J. Biol. Chem.* **1996** 271, 22957-22960.
- K. Yago, K. Zenita, I. Ohwaki, R. Harada, S. Nozawa, K. Tsukazaki, M. Iwamori, N. Endo, N. Yasuda, M. Okuma, R. Kannagi, *Mol. Imm.* **1993**, 30, 1481-1489.

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Seum Albumine (Rinderserumalbumin)
CNBr	Cyanogen Bromide
d	denaturiert
DNA	Deoxy ribonucleic Acid (Desoxy ribunucleinsäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Eluat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
h	Stunden
HABA	Hydroxy-azophenyl-benzoic acid
HNK	Human Natural Killer Cell (humane natürliche Killerzellen)
HNK-1	anti-idiotypischer Antikörper
HRP	horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	lysogeny broth medium
M	Marker
mAk	monoklonaler Antikörper
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular weight cut off (Ausschlussgröße)
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPA	Periplasma-Aufschluss
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
scFv	single chain variable fragment

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	Übernachtskultur
v/v	Volumen pro Volumen
V _h	variable Region der schweren Kette
V _l	variable Region der leichten Kette
WB	Waschpuffer B
WC	Waschpuffer C
WCW	Wet Cell Weight (Zellfeuchtmasse)
w/v	Gewicht pro Volumen

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biosynthese neuronaler Strukturen, ZMNH, durchgeführt.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Prof. Dr. Melitta Schachner, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Diplomarbeit an ihrem gut ausgestatteten Institut in einem angenehmen Arbeitsumfeld anfertigen zu können.

Weiter gilt mein Dank Dr. Ralf Kleene, der nicht nur die Aufgabe des zweiten Gutachters übernommen hat, sondern mich im Laufe der Arbeit unterstützt und beraten hat.

Für die Betreuung während der Anfertigung meiner Diplomarbeit möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker bedanken, der jederzeit für offene Fragen zur Verfügung stand.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für die kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung im Laboralltag und für die hilfreichen Diskussionen, die zweifellos zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Gaby Loers für die freundschaftliche Betreuung bei der Vorbereitung meiner Diplomarbeit und Michael Knepper, der mir stets mit wissenschaftlichem Verständnis zur Seite stand.

Darüber hinaus danke ich sehr herzlich meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich auf meinem Weg vorbehaltlos unterstützt haben. Ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen.