

**Etablierung von neuen Methoden zur Herstellung
rekombinanter Antikörper und zur spezifischen Selektion
von Antikörpervarianten im hohen Durchsatz**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Stefan Lange

aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Mitberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2002

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2002

1 INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Inhaltsverzeichnis | 3 |
| 2 | Sprachkonventionen und Abkürzungen | 6 |
| 2.1 | Abkürzungen | 6 |
| 2.2 | Aminosäuren | 7 |
| 2.3 | Einheiten | 7 |
| 2.4 | Verzeichnis der verwendeten Anglizismen | 7 |
| 3 | Zusammenfassung | 10 |
| 4 | Abstract | 13 |
| 5 | Einleitung | 15 |
| 5.1 | Herbizide | 15 |
| 5.1.1 | Triazinherbizide, Atrazin | 16 |
| 5.1.2 | 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure und 2,4,5-Trichlorphenoxy-essigsäure | 19 |
| 5.2 | Antikörper und Antikörperfragmente | 20 |
| 5.2.1 | Vorkommen, Struktur und physiologische Funktion von Antikörpern | 20 |
| 5.2.2 | Produktion von Antikörpern und deren Fragmenten | 23 |
| 5.2.3 | Antikörper in Forschung, Analytik, Diagnostik und Therapie | 27 |
| 5.2.4 | Hochdurchsatz-Screening von Antikörperbibliotheken | 29 |
| 5.3 | Methodische Grundlagen | 31 |
| 5.3.1 | <i>Pichia pastoris</i> als eukaryontisches Protein-Expressionssystem | 31 |
| 5.3.2 | Immunoassays | 34 |
| 5.3.3 | Reinigung rekombinanter Proteine durch IMAC | 36 |
| 5.4 | Ausgangspunkt und Zielsetzung dieser Arbeit | 37 |
| 6 | Material und Methoden | 39 |
| 6.1 | Material | 39 |
| 6.1.1 | Chemikalien und Biochemikalien | 39 |
| 6.1.2 | Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide | 40 |
| 6.1.3 | Rekombinante Antikörperfragmente | 42 |
| 6.1.4 | Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software | 45 |
| 6.1.5 | Medien, Lösungen und Puffer | 48 |
| 6.1.6 | Allgemein verwendete Lösungen und Puffer | 48 |
| 6.2 | Mikrobiologische Methoden | 48 |
| 6.2.1 | Stammhaltung und Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen | 48 |
| 6.2.2 | Transformation von <i>E. coli</i> | 49 |
| 6.2.3 | Transformation von <i>P. pastoris</i> | 50 |
| 6.2.4 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 51 |
| 6.2.5 | Zellaufschluß von <i>P. pastoris</i> | 52 |
| 6.2.6 | Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> | 52 |
| 6.2.7 | Zellaufschluß von <i>E. coli</i> | 52 |
| 6.2.8 | Expression rekombinanter Proteine in <i>P. pastoris</i> | 53 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 6.2.9 | Expression rekombinanter Proteine in <i>S. cerevisiae</i> ----- | 55 |
| 6.2.10 | Immunfluoreszenzmarkierung von Hefezellen----- | 55 |
| 6.3 | Molekularbiologische Methoden----- | 56 |
| 6.3.1 | Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese----- | 56 |
| 6.3.2 | Methoden zur Isolation und Reinigung von DNA----- | 56 |
| 6.3.3 | Methoden die auf der Polymerase-Ketten-Reaktion beruhen----- | 59 |
| 6.3.4 | Automatische Sequenzierung von DNA----- | 61 |
| 6.3.5 | Enzymatische Methoden zur DNA-Modifikation bei Klonierungen----- | 64 |
| 6.4 | Biochemische Methoden----- | 64 |
| 6.4.1 | Reinigung rekombinanter Proteine----- | 64 |
| 6.4.2 | SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese----- | 65 |
| 6.4.3 | Western Blotting----- | 68 |
| 6.4.4 | Kompetitiver ELISA----- | 69 |
| 6.4.5 | Homogener, kompetitiver Fluoreszenzpolarisationsassay----- | 71 |
| 6.4.6 | Proteinbestimmungen----- | 72 |
| 6.4.7 | Durchflußcytometrie----- | 72 |
| 6.4.8 | Konfokale Laser Scanning Mikroskopie----- | 73 |
| 6.5 | Chemische Methoden----- | 73 |
| 6.5.1 | Darstellung von Atrazin-C ₆ -POD, Atrazin-C ₆ -EGFP und Atrazin-C ₆ -BSA - | 73 |
| 6.5.2 | Darstellung eines Atrazin-FITC-Konjugates----- | 74 |
| 7 | Ergebnisse----- | 75 |
| 7.1 | Vorbemerkungen----- | 75 |
| 7.2 | Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente in <i>P. pastoris</i>----- | 75 |
| 7.2.1 | Herstellung der Expressionsvektoren pGAPZ α -Fab und pPICZ α -Fab----- | 75 |
| 7.2.2 | Expression des Fabs K411B in <i>P. pastoris</i> ----- | 82 |
| 7.2.3 | Expression und Nachweis der Fab-Fragmente----- | 84 |
| 7.2.4 | Bestimmung der Bindungseigenschaften der Fab-Fragmente----- | 87 |
| 7.2.5 | Kultivierung im Bioreaktor und Bestimmung der Proteinmenge----- | 91 |
| 7.2.6 | Optimierung der Fab-Expressionskassette----- | 91 |
| 7.2.7 | Expression und Charakterisierung des 2,4-D spezifischen Fab-Fragmentes - | 93 |
| 7.2.8 | Expression des scFvs K411B----- | 96 |
| 7.3 | Hochdurchsatz-Systeme zur Durchmusterung von Antikörperbibliotheken | 101 |
| 7.3.1 | Entwicklung eines Fluoreszenzpolarisations-Assays----- | 102 |
| 7.3.2 | Hefeoberflächendisplay der scFvs' und des scFvs-EGFP----- | 104 |
| 8 | Diskussion----- | 118 |
| 8.1 | Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in <i>P. pastoris</i>----- | 118 |
| 8.1.1 | Ausgangspunkt----- | 118 |
| 8.1.2 | Herstellung der Antikörper-Expressionsvektoren----- | 119 |
| 8.1.3 | Expression des Fabs und des scFvs K411B----- | 119 |
| 8.1.4 | Charakterisierung der Antikörperfragmente----- | 124 |
| 8.2 | Hochdurchsatzscreening von Antikörperbibliotheken----- | 128 |
| 8.2.1 | Vorbemerkungen----- | 128 |
| 8.2.2 | Fluoreszenzpolarimetrie----- | 128 |
| 8.2.3 | Hefeoberflächendisplay----- | 129 |
| 9 | Literatur----- | 133 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 10 | <i>Eigene Publikationen</i> ----- | 148 |
| 10.1 | Original Publikationen: ----- | 148 |
| 10.2 | Patent ----- | 148 |
| 10.3 | Ausgewählte Konferenzbeiträge ----- | 148 |
| 11 | <i>Lebenslauf</i> ----- | 150 |
| 12 | <i>Erklärung</i> ----- | 151 |
| 13 | <i>Danksagung</i> ----- | 152 |

2 SPRACHKONVENTIONEN UND ABKÜRZUNGEN

Im wissenschaftlichen Sprachgebrauch übliche und allgemein verwendete englische (Fach)Begriffe wurden nicht ins Deutsche übersetzt, sondern im Text kursiv hervorgehoben und in einem separaten Verzeichnis aufgeführt.

2.1 Abkürzungen

| | | | |
|----------------|---|--------------------|--|
| 2,4-D | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure | <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| 2,4,5-T | 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure | EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| Ag | Antigen | GAPDH | Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase |
| Ak | Antikörper | H | Schwere Kette eines Antikörpermoleküls |
| ARS | Autonom replizierende Sequenz | IgG | Immunglobulin G |
| ATP | Adenosintriphosphat | IMAC | Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie |
| APS | Ammoniumpersulfat | kb | Kilobase(n) |
| bp | Basenpaar(e) | KR | Kreuzreaktivität, Kreuzreaktant |
| BPB | Bromphenolblau | K411B | Bezeichnung für das Atrazin-spezifische Antikörperfragment |
| BSA | Rinderserumalbumin | L | Leichte Kette eines Antikörpermoleküls |
| BTM | Biotrockenmasse | LB | Luria-Bertani |
| c | Konzentration | LSM | Laser Scanning Mikroskop |
| CAA | Casaminosäuren | mAk | monoklonaler Antikörper |
| CEN | Centromersequenz | M/V | Masse pro Volumen |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid | MCPA | 4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure |
| DMF | Dimethylformamid | NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | NTA | Nitrilotriessigsäure |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | NTP | Nukleosidtriphosphat |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH | OD | Optische Dichte |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| EIA | Enzym Immuno Assay | pAk | polyklonaler Antikörper |
| ELISA | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> | PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| EU | Europäische Union | PEG | Polyethylenglykol |
| FACS | Fluoreszenz-aktiverter Zellsorter | POD | Peroxidase |
| FIA | Fluoreszenz Immuno Assay | <i>P. pastoris</i> | <i>Pichia pastoris</i> |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat | | |
| dNTP | Desoynukleotid-5'-triphosphat | | |

| | | | |
|----------------------|--|-----------------|---|
| RG | Reaktionsgefäß | U _{pm} | Umdrehungen pro Minute |
| RIA | Radio Immunassay | V | Volumen |
| RT | Raumtemperatur | V/V | Volumen pro Volumen |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | V _H | variable Domäne der schweren |
| SDS | <i>Sodium</i> (=Natrium) Dodecyl Sulfat | V _L | variable Domäne der leichten |
| TEMED | N,N,N',N'' Tetramethylendiamin | | Kette eines Antikörpers |
| TMB | Tetramethylbenzidin | vgl. | vergleiche |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan | x g | Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²) |
| ÜN | über Nacht | Zeo | Zeocin |
| | | λ | Wellenlänge |

2.2 Aminosäuren

Zur Bezeichnung von Aminosäuren wurde der Einbuchstaben-Code gemäß den Vorschlägen der IUPAC-Kommission für biologische Nomenklatur verwendet (IUPAC, 1984).

2.3 Einheiten

| | | | |
|----|--------------|-----|---------|
| A | Ampère | M | Molar |
| °C | Grad Celsius | min | Minute |
| Da | Dalton | s | Sekunde |
| g | Gramm | V | Volt |
| h | Stunde | | |
| l | Liter | | |

2.4 Verzeichnis der verwendeten Anglizismen

| Englischer Fachbegriff | Erklärung |
|------------------------|---|
| ADI | Abkürzung für <i>acceptable daily intake</i> : Akzeptierbare tägliche Aufnahme von toxischen Stoffen. |
| Alignment | Bezeichnung für den Homologievergleich zwischen DNA-Sequenzen. |
| Annealing | Anlagerung der <i>Primer</i> an das <i>Template</i> bei der Polymerasekettenreaktion. |
| ARS | Abkürzung für <i>autonomous replicating sequence</i> : Replikationsursprung zur Replikation von episomalen Hefepiasmiden. |

| | |
|------------------------|--|
| Batch Kultivierung | Satzweise Kultivierung: Kultivierungsstrategie, bei der während der Kultivierung weder frisches Substrat zugefüttert noch Kulturlösung entnommen wird. |
| CDR | Abkürzung für <i>complementary determining region</i> : Die Komplementarität-bestimmende Region bezeichnet die hypervariablen Bereiche des Antikörpermoleküls, die die Antigenbindungsstelle bilden. |
| Coating (pre-coating) | Beschichten einer Mikrotiterplatte mit primären Antikörpern. |
| Crossover | Synonym für die homologe Rekombination von DNA Abschnitten. |
| Diabody | Dimere, die sich aus zwei scFv Fragmenten bilden. Dabei lagert sich jeweils die V _H -Domäne des einen mit der V _L -Domäne des anderen scFv zusammen. Bei Zusammenlagerung zweier verschiedener scFv bilden sich bispezifische Diabodies. Die Bildung von Diabodies wird durch kurze Linkerpeptide zwischen den beiden variablen Domänen eines scFv begünstigt. |
| dsFv | Abkürzung für <i>disulfide stabilised variable fragment</i> : Antikörperfragment bestehend aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette, das durch mindestens eine zusätzliche intermolekulare Disulfidbrücke stabilisiert wird. |
| EGFP | Abkürzung für <i>enhanced green fluorescent protein</i> : Doppelmutante (F64L, S65T) des Grün fluoreszierenden Proteins aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i> (Prasher <i>et al.</i> , 1992; Shimomura <i>et al.</i> , 1962). |
| EPA | Abkürzung für <i>Environmental Protection Agency</i> . Amerikanische Umweltschutzbehörde. |
| Extension | Synthese des neuen DNA Strangs bei der Polymerasekettenreaktion. |
| Fab | Abkürzung für <i>antigen binding fragment</i> : Antikörperfragment bestehend aus den variablen Domänen sowie der jeweils ersten konstanten Domäne beider Polypeptidketten. |
| Fc | kristallisierbares Fragment eines IgG-Antikörpermoleküls, das durch Papain- oder Pepsinbehandlung entsteht. |
| Fed-batch Kultivierung | Zufütterungskultivierung: Kultivierungsstrategie, bei der während der Kultivierung Substrat zugefüttert wird, ohne Kulturlösung zu entnehmen. |
| Fv | Abkürzung für <i>variable fragment</i> : Antikörperfragment bestehend aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette. |
| HER2 | Abkürzung für <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> : Rezeptor 2 für den <i>Humanen Epidermis Wachstumsfaktor</i> . |

| | |
|--------------------|--|
| in frame | Lage zweier Gensequenzen zueinander im gleichen Translations-Leseraster. |
| KLH | Abkürzung für <i>keyhole limpet hemocyanin</i> : Hämocyanin der Napfschnecke. |
| Mut ^{+/-} | Abkürzung für <i>methanol utilization</i> : Kurzform des Phänotyps von <i>Pichia pastoris</i> Methanol als C-Quelle mit Hilfe von Alkoholoxidasen verwerten zu können. + gute Verwertung von Methanol durch Oxidation mit den Alkoholoxidasen 1 und 2; s langsame (<i>slow</i>) Verwertung nur mit der Alkoholoxidasen 2; - keine Verwertung von Methanol. |
| NIH | Abkürzung für <i>National Institute of Health</i> : Amerikanische Gesundheitsbehörde. |
| omp A | Abkürzung für <i>outer membrane protein A</i> : Signalsequenz zur Sekretion von Proteinen ins Periplasma. |
| ori | Abkürzung für <i>origin of replication</i> : Replikationsursprung bakterieller Plasmide. |
| Panning | Methode zur Selektion von spezifischen Antikörpern durch Bindung an ein immobilisiertes Antigen. |
| PBS | Abkürzung für <i>phosphate buffered saline</i> . |
| Primer | Oligonukleotid, das bei der PCR den Start initiiert und die Anfangssequenz des neu synthetisierten DNA-Stranges darstellt. |
| scFv | Abkürzung für <i>single chain variable fragment</i> : Fv-Fragment dessen variable Domänen über einen Peptidlinker miteinander verknüpft sind. |
| Tag | Oligopeptid das C- oder N-terminal gentechnisch an rekombinante Proteine fusioniert ist und zur Aufreinigung oder Detektion des Proteins dient. |
| Template | DNA, die bei einer Polymerasekettenreaktion als Ausgangsmaterial zur spezifischen Amplifikation von bestimmter Sequenzabschnitte eingesetzt wird. |
| Tracer | Mit Fluoreszenzfarbstoff- oder Enzym markiertes Reportermolekül das z.B. zum Nachweis von Antigen-Antikörper Wechselwirkungen eingesetzt wird. (englisch <i>trace</i> = Spur). |
| TSS | Abkürzung für <i>transformation storage solution</i> . Lösung zur Herstellung und Lagerung kompetenter Zellen. |
| WHO | Abkürzung für <i>world health organisation</i> . Weltgesundheitsorganisation. |
| YNB | Abkürzung für <i>yeast nitrogen base</i> . |

3 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden im ersten Teil rekombinante herbizidspezifische Antikörperfragmente (scFvs und Fabs) in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* produziert. Dies gelang sowohl für die scFvs als auch für die Fabs durch genomische Integration der codierenden Gene. Im Fall des atrazinspezifischen Fab Fragments K411B wurden hierfür mehrere Vektoren hergestellt, die jeweils die Gene beider Ketten als Fusion mit der α -Faktor-Signalsequenz unter Kontrolle eines eigenen Promotors enthielten. Somit konnten nach Transformation eines einzigen Vektors in *Pichia* beide Antikörperketten exprimiert und ins Medium sekretiert werden. Hierbei zeigte sich, daß Klone mit beiden Genen unter Kontrolle des methanolinduzierbaren AOX1 Promotors größere Mengen Fab exprimierten, als solche mit den Antikörpergenen unter Kontrolle des konstitutiven GAPDH-Promotors. Durch *fed-batch* Kultivierung eines ausgewählten Klons im 5l Bioreaktor konnten schließlich 40 mg l⁻¹ Fab exprimiert werden. Wie sich durch vergleichende SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte, bildeten ca. 30 % der sekretierten schweren und leichten Ketten komplette Fab Fragmente.

Auch bei der Expression des scFvs K411B zeigten Klone, die das scFv-Gen als Fusion mit der α -Faktor-Signalsequenz unter Kontrolle des AOX1-Promotors genomisch integriert trugen die bessere Expression.

Die Bindungseigenschaften des scFvs und des Fabs K411B wurden mittels eines direkten, kompetitiven ELISAs bestimmt: Wie erwartet zeigte sich nach Normalisierung der sigmoidalen Atrazin-Bindungskurven Übereinstimmung bei den mit den beiden Antikörperfragmenten gemessenen Testmittelpunkten von ~3 $\mu\text{g l}^{-1}$. Dieser lag jedoch um ca. eine Größenordnung höher, als der mit dem parentalen monoklonalen Antikörper K4E7 gemessene Wert von ~0,2 $\mu\text{g l}^{-1}$. Die Kreuzreaktivitäten der verschiedenen rekombinanten Antikörper stimmten jedoch nahezu mit denen des mAk überein.

Schließlich ermöglichte die Entfernung mehrerer Restriktionsschnittstellen in dem für die Expression des Fabs K411B hergestellten Expressionsvektor dessen Verwendung zur Herstellung von Fab Fragmenten beliebiger Spezifität durch einfachen Austausch der nun durch singuläre Schnittstellen begrenzten variablen

Domänen. Dies wurde durch Austausch der V_H - und V_L -Domänen des Fabs K411B durch die eines 2,4-D-spezifischen Fabs und der nachfolgenden Expression des neuen anti-2,4-D-spezifischen Fabs validiert. Obwohl die exprimierte Menge deutlich geringer, als die des Fabs K411B war, konnte mittels ELISA eine sigmoidale Bindungskurve zur Bestimmung von 2,4-D erstellt werden, aus der sich ein Testmittelpunkt von $\sim 10 \mu\text{g l}^{-1}$ ergab.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neben dem bereits erwähnten ELISA weitere Methoden zur Messung von Bindungseigenschaften von Antikörpern etabliert und bezüglich ihrer Eignung zum Screening von Antikörperbibliotheken in hohem Durchsatz bewertet: Zunächst wurde ein auf Fluoreszenzpolarisation beruhender homogener, kompetitiver Test entwickelt. Mit einem Testmittelpunkt von $\sim 90 \mu\text{g l}^{-1}$ bei der Bestimmung von Atrazin wäre für Anwendungen in der Umweltanalytik jedoch eine Optimierung hinsichtlich einer verbesserten Sensitivität notwendig. Aufgrund seiner im Vergleich zum ELISA sehr schnellen Durchführbarkeit binnen weniger Minuten, wäre der Test vor allem als Schnelltest im mittleren Durchsatz geeignet und weniger für ein *Screening* im hohen Durchsatz, da die Ergebnisse im Vergleich zum ELISA weniger genau und reproduzierbar waren.

Zum Screening von Antikörperbibliotheken und zur Selektion von Varianten mit bestimmten Bindungseigenschaften im hohen Durchsatz, wie es für evolutive Methoden erforderlich ist, wurde ein Hefeoberflächenexpressionssystem etabliert. Diese mit dem Phagen-Display verwandte Methode ist im Gegensatz zum ELISA und zum Fluoreszenzpolarisationstest vom Mikrotiterplattenformat unabhängig, da die Bestimmung der Bindungseigenschaften sowie die Selektion von Varianten mit dem Durchflußcytometer erfolgt: Durch Fusion der Gene der herbizidspezifischen scFvs mit dem Gen einer Domäne des Agglutininrezeptors gelang nach Transformation des Fusionsgenes die Expression und Präsentation des daraus resultierenden funktionellen Fusionsproteins auf der Hefeoberfläche. Die damit erreichte Kopplung von Geno- und Phänotyp erlaubt durch Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antigenen oder fluoreszenzmarkierten Epitop-spezifischen Antikörpern und nachfolgender Analyse und Sortierung am Durchflußcytometer das Screening und die Selektion von Hefezellen, die Antikörper mit speziellen Bindungseigenschaften exprimieren. Die erfolgreiche funktionelle Expression der verschiedenen scFvs auf der Hefeoberfläche wurde durch Fluoreszenzmikroskopie, konfokale Laserscanning-Mikroskopie sowie FACS-Messungen überprüft und

bestätigt. Eine Vereinfachung der Screeningmethode wurde durch Expression des scFvs-EGFP auf der Oberfläche der Zellen erreicht: Damit kann auf die für die Bestimmung der Oberflächenexpressionsmenge notwendige Markierung der scFvs mit Epitop-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern verzichtet werden, da die Fluoreszenz des EGFP-Anteils direkt mit der Menge des exprimierten Fusionsproteins korreliert. Beim Screening von Bibliotheken nach bestimmten Bindungseigenschaften ist dies von Bedeutung, da die Markierung der Zellen mit fluoreszenz-markierten Antigenen neben der Affinität des Antikörpers auch von der Menge des für die Markierung zugänglichen scFv abhängt.

4 ABSTRACT

The first part of this study comprised the expression of recombinant, herbicide-specific antibody fragments (scFvs and Fabs) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. For the Fab and the scFv this has been achieved by the integration of the encoding genes into the genome of *Pichia*.

In case of the atrazine-specific Fab K411B two vectors each containing both genes encoding the heavy and light chain each fused to the α -factor signal sequence under control of separate promoters were constructed. By this way it was possible to express both genes upon transformation of a single vector into *Pichia*. Clones harboring the genes under control of the methanol-inducible AOX1 promoter showed a significant higher expression level than clones expressing the genes constitutively under control of the GAPDH promoter. By fed-batch cultivation of a selected clone in a 5l benchtop bioreactor 40 mg l⁻¹ Fab were expressed. As shown by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions approximately 30 % of the secreted heavy and light chains assembled and built the complete Fab.

Also in case of the scFv K411B strains harboring the scFv encoding gene under control of the AOX1 promoter showed a higher expression level.

The binding properties of both antibody fragments were analyzed by a direct, competitive ELISA: The IC₅₀ values for the determination of atrazine measured with both fragments were nearly identical (3 $\mu\text{g l}^{-1}$), but one order of magnitude higher than that of the parental monoclonal antibody (mAb) K4E7 (0,2 $\mu\text{g l}^{-1}$). The crossreactivity pattern towards several s-triazines of the recombinant fragments was nearly the same as the one determined with the parental mAb.

The removal of several restriction sites from the vector for the expression of the Fab K411B raised the possibility to use this modified vector for the production of Fab fragments with any desired specificities by exchange of the variable domains using single restriction sites. This was validated by exchange of the V_H- and V_L-genes encoding the variable domains of the Fab K411B by the respective genes of a 2,4-Diphenoxyacetic acid (2,4-D) specific Fab fragment and the subsequent expression of the new 2,4-D-specific Fab. Although the expression level of this Fab was lower than that of K411B, sigmoidal binding curves leading to an IC₅₀ value for the detection of 2,4-D of ~ 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ were obtained.

The second part of this study comprised the establishment of additional assays for the measurement of antibody binding properties and the evaluation concerning the applicability for screening of antibody libraries in a high throughput. First, a homogenous, competitive assay based on fluorescence polarization was developed. With the obtained IC_{50} of $\sim 90 \mu\text{g l}^{-1}$ for the detection of atrazine an improvement of this assay concerning sensitivity is needed for applications like environmental analysis. Although it can be performed within several minutes, it is more suitable to be used as a fast assay in a middle throughput than in a high throughput system due to its microtiter plate based format and the imprecise and sometimes hardly reproducible results obtained.

For the screening of antibody libraries and the selection of variants with desired properties in a high throughput as it is needed for the directed evolution of antibodies, a method similar to phage display was established: By fusion of the genes encoding the herbicide specific scFvs with the gene of one domain of the membrane bound agglutinin receptor the functional expression and presentation of the respective fusion protein on the yeast cell wall was achieved upon transformation of the fusion gene into *Saccharomyces cerevisiae*. The coupling of the geno- and phenotype in this system allows the screening and selection of the yeast cells by FACS analysis upon labeling the cells with fluorescence-coupled epitope-specific antibodies and/or fluorescence-labeled antigens. The functional expression and secretion of the two scFvs onto the surface of the cells was confirmed by fluorescence microscopy, laser-scanning microscopy and flow cytometry. A simplification of the screening system was achieved by surface expression of the scFv-EGFP fusion protein: No labeling of the cells with epitope specific antibodies was necessary by this way, as the fluorescence of the EGFP domain of the fusion protein directly correlates with the expression level of the fusion protein. The knowledge of the expression level is important for the screening of libraries as the yield of the labeling with antigen depends on the amount of the expressed antibody in addition to its affinity.

5 EINLEITUNG

5.1 Herbizide

Seit Mitte des letzten Jahrhunderts werden Herbizide (lat. herba: Pflanze, caedere: töten), also Pflanzenvernichtungsmittel zum Schutz von Kulturpflanzen vor unerwünschten Unkräutern eingesetzt. Damals wurden zunächst Schwefel und Schwefelkalkbrühe, später dann schwermetallhaltige Substanzen eingesetzt. Mit Beginn des 20sten Jahrhunderts wurden anorganische Substanzen wie Kupfer(II)-sulfat, Eisen(III)-sulfat oder Natriumchlorat zunehmend durch organische Verbindungen ersetzt, die mittlerweile mehr als 95% aller Pflanzenschutzmittel ausmachen. Eingeteilt werden Herbizide nach verschiedenen Kriterien: Hinsichtlich ihrer Wirksamkeit unterscheidet man 1) Totalherbizide, die wahllos sämtliche Vegetation vernichten, 2) Semitotalherbizide, gegen die nur verholzte Pflanzen eine teilweise Resistenz besitzen und 3) Selektivherbizide, die Schadpflanzen effektiv vernichten, Nutzpflanzen jedoch nicht schädigen. Je nach Wirkungsweise im Pflanzenstoffwechsel unterteilt man sie in Photosynthesehemmer (Triazinderivate), Atmungshemmer (Pentachlorphenol, substituierte Dinitrophenole), Mitosehemmer (Carbamate, Aniline) oder Wuchsstoffe (Phenoxy-carbonsäuren).

Insgesamt sind derzeit ca. 340 Pestizide zugelassen und auf dem Markt (Lehotay, 1997). In Europa werden jährlich ca. 80.000 t Pestizide eingesetzt (Barcelo und Hennion, 1997), wovon die Herbizide den größten Anteil darstellen. Neben ökologischen Effekten waren es vor allem die durch Pestizide verursachten bis heute nur schwer abzuschätzenden Gesundheitsrisiken für den Menschen - es werden mutagene, cancerogene und fruchtschädigende Wirkungen diskutiert - die 1980 zur Trinkwasserrichtlinie der Europäischen Union geführt hatten. Die darin festgelegten maximalen Grenzwerte von $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ für Einzelwirkstoffe mit allen Hauptmetaboliten sowie $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ für die Summe aller Wirkstoffe wurden im Herbst 1989 mit der Neufassung der Trinkwasserverordnung in Deutschland in nationales Recht umgesetzt (TrinkwV, 1989). Die Grenzwerte wurden hierbei weniger aus wissenschaftlichen, toxikologischen Gründen festgelegt, als vielmehr aus der politischen Motivation der EU, Europas Trinkwasser weitgehend pestizidfrei zu halten (Guyot, 1994). Trotz einer weiteren Neufassung der TrinkwV von 1998 gelten diese

Werte bis heute. In den USA dagegen werden die Trinkwasser-Grenzwerte durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) bzw. EPA (*Environmental Protection Agency*) anhand des sogenannten ADI-Wertes (*acceptable daily intake*) für jedes Pflanzenschutzmittel separat festgelegt. Sie liegen dann um einen Sicherheitsfaktor zwei höher als der sogenannte NOEL-Wert (*no effect level*) angibt, der im langfristigen Tierversuch keine Auswirkungen zeigte. Nominell liegen sie zwischen 2 und 700 µg l⁻¹ (Cohen, 1990) und damit deutlich über den in Europa zugelassenen Werten.

Zum Nachweis von Herbiziden z. B. in Grundwasser werden hauptsächlich konventionelle Methoden (DIN-Verfahren) der Analytik wie HPLC und GC/MS eingesetzt (Thier und Freshe, 1986). Um hiermit jedoch die notwendigen Nachweisgrenzen bis unter die genannten Grenzwerte zu erreichen, ist oft eine vorherige Aufkonzentrierung durch flüssig/flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion notwendig (Pihlström *et al.*, 1997).

Seit 1989 werden vermehrt kommerzielle immunologische Testverfahren eingesetzt (Meulenbergh *et al.*, 1995; Miller und Niessner, 1994; Wittmann und Hock, 1989), deren Sensitivität mittlerweile in vielen wenn auch nicht in allen Fällen ausreichend ist, um Konzentrationen bis unter die Grenzwerte nachzuweisen. Es werden *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* Testkits im Mikrotiterplatten- oder Teststreifenformat angeboten (Riedel-de-Haen und KG, 1999; Sension, 2000; Sensotest, 2000), die aufgrund ihrer einfachen Handhabung ohne größeren Geräteaufwand sogar eine Verwendung außerhalb des Labors erlauben. Mittlerweile wurden von der EPA Richtlinien für die Umweltanalytik mit immunologischen Testverfahren veröffentlicht (Gee *et al.*, 1994; ISO/CD15089, 1997).

5.1.1 Triazinherbizide, Atrazin

Atrazin oder auch 6-Chlor-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5-triazin-2,4-diamin (C₈H₁₄ClN₅) gehört zur Gruppe der s-Triazine (1,3,5-Triazine), die seit 1959 (Simazin, J.R. Geigy AG, Basel) als selektive Herbizide hergestellt werden (Gast *et al.*, 1955) und bis heute weltweit zu den am häufigsten verwendeten Pflanzenschutzmitteln zählen. Die Triazine werden nach einer ihrer Seitengruppen in 3 Gruppen eingeteilt: (1) Chlor-Triazine (Endung: azin), (2) Methylthio-Triazine (Endung: tryn) und (3) Methoxy-Triazine (Endung: meton). Abbildung 1 zeigt einige der Hauptvertreter. Nach Aufnahme über die Wurzeln gelangen die Triazinherbizide

in die Sprossspitzen und Blätter, wo sie als Photosyntheseinhibitoren wirken: Durch Bindung an das D1-Protein des Photoreaktionszentrums im Photosystem 2 unterbrechen sie den Elektronentransport zum Plastochinon Q_B und verhindern damit die Umwandlung von Lichtenergie in elektrochemische Energie. Dies resultiert in einer Produktion von Triplett-Chlorophyll und Sauerstoffradikalen, was schließlich die Peroxidierung von Membranlipiden induziert (Fuerst und Norman, 1991; Velthuys, 1981).

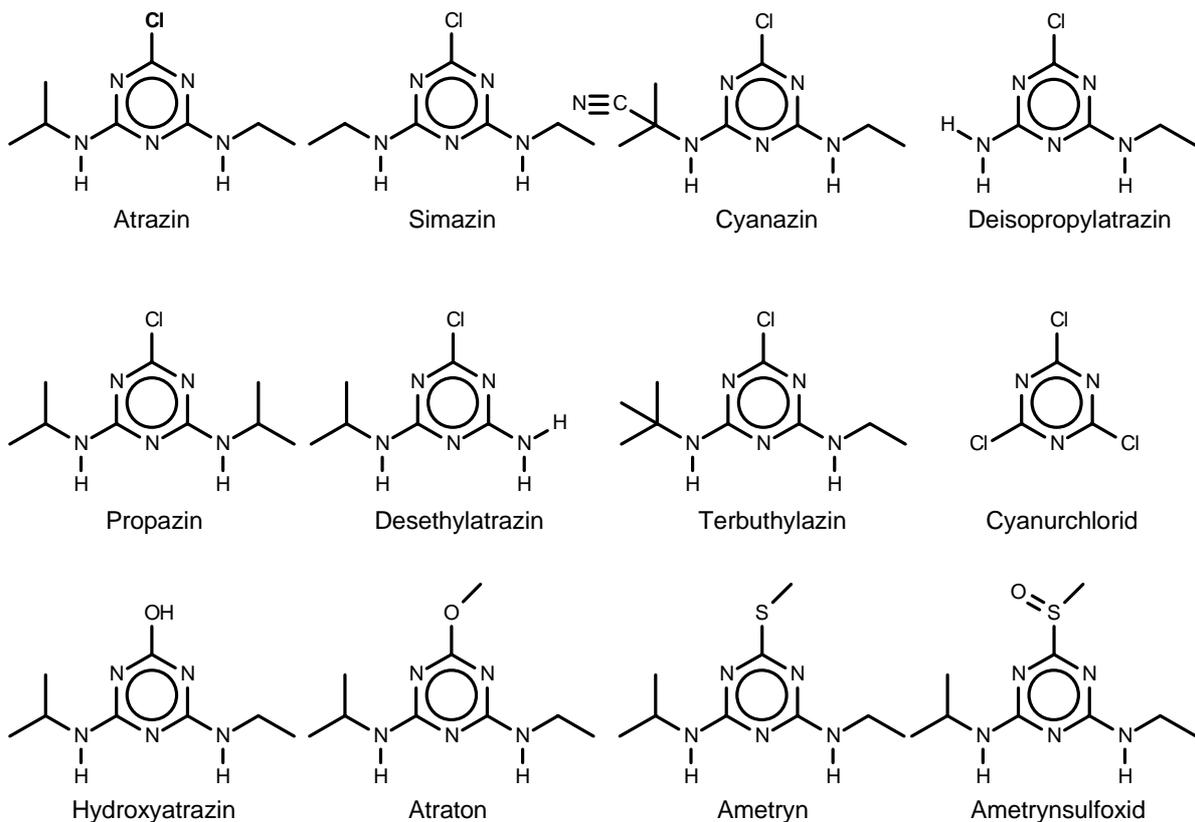


Abbildung 1: Wichtige Vertreter der s-Triazine

Da der Patentschutz des ursprünglich unter dem Handelsnamen *Gesaprim* eingeführten Atrazins seit langem ausgelaufen ist, findet es sich als Bestandteil einer Reihe von Pflanzenschutzmitteln (Aatrex, Aktikon, Alazine, Atred, Atranex, Atrataf, Atratol, Azinotox, Crisazina, Farmco, G-30027, Giffex 4L, Malermis, Primatol, Simazat und Zeapos) und wird weltweit zur Kontrolle von breitblättrigen Unkräutern vor allem in Mais und Hirsekulturen eingesetzt. Letztere nehmen das Atrazin zwar ebenfalls auf, können es jedoch durch Glutathion-Konjugation binden und so in die Vakuole schleusen, wo es abgebaut oder eingelagert wird. Neben der Anwendung in

der Landwirtschaft (bis zu 8 kg pro Hektar) wurde Atrazin auch in sogenannten Tankmischungen mit anderen Herbiziden zur Unkrautbekämpfung auf Gleisanlagen, Industrie- und Verkehrsflächen in Dosierungen von bis zu 20 kg pro Hektar eingesetzt. Die geschätzte Weltproduktion betrug 1987 nach Angaben der WHO 70.000 t. Bei der Anwendung gelangt Atrazin in den Boden, wo es größtenteils mikrobiell abgebaut wird (Abbauprodukt Desethylatrazin). Die Halbwertszeit beträgt hier ca. 45 Tage; bei schlechten Abbaubedingungen z. B. in Wasser kann sich diese auf über 100 Tage verlängern. Für Bienen, Vögel, Bodenorganismen und Nützlinge sind bislang keine toxischen Effekte beobachtet worden. Bei oraler Aufnahme durch Kaninchen, Ratten oder Mäuse liegt die LD_{50} zwischen 1000 und 3000 mg kg^{-1} (Meister *et al.*, 1984). Aquatische Organismen, insbesondere Algen reagieren am empfindlichsten auf Atrazin. Durch solche indirekten Effekte wie das Absterben des Phytoplanktons können aquatische Ökosysteme nachhaltig gestört werden. Trotz einer weitgehend unbedenklichen akuten humantoxikologischen Wirkung wurde Atrazin 1989 von der EPA als potenziell human-carcinogen eingestuft und der Toxizitätsklasse III zugerechnet, jedoch nicht verboten. Viele diesbezügliche Studien führten zu kontrovers diskutierten Ergebnissen. Die Anwendung von Atrazin ist in Deutschland seit 1991 verboten, des Weiteren in Dänemark, Österreich, Schweden und Finnland. Trotz der damit erreichten sinkenden Anwendung verursachen Atrazin und Desethylatrazin Rückstandsprobleme in Gewässern und im Grundwasser: Nach Angaben des österreichischen Umweltbundesamtes lagen im Zeitraum 1.7.1998 bis 30.6.1999 nach wie vor 8,2% der Messungen von Atrazin und 12,2% der Messungen von Desethylatrazin über dem Grundwasserswellenwert und dem Trinkwassergrenzwert von $0,1 \mu g l^{-1}$. In Deutschland lagen nach Angaben der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg vom 28.8.1998 bzgl. eines grenzübergreifenden Projekts zum Grundwasserschutz im deutsch-französisch-schweizerischen Oberrheingraben an 40 % der untersuchten Meßstellen positive Befunde vor, 4 % davon über dem europäischen Grenzwert. Im Elsaß, wo anstelle eines generellen Verbots nur eine Begrenzung der je Hektar maximal auszubringenden Menge existiert, wurden an 59% der untersuchten Meßstellen Rückstände gefunden, wovon 13% über dem Grenzwert lagen.

5.1.2 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure und 2,4,5-Trichlorphenoxy-essigsäure

Die Herbizidgruppe der chlorierten Phenoxy-carbonsäuren sind Analoge der Indolylessigsäure, synthetische Auxine, die in Pflanzen als Wuchsstoffhormone fungieren, in dem sie die Nukleinsäure- und Proteinsynthese, die Enzymaktivität, die Atmung und die Zellteilung beeinflussen (Heß, 1981). Einige Hauptvertreter sind in Abbildung 2 dargestellt. Insbesondere 2,4-D wirkt vorrangig bei zweikeimblättrigen Pflanzen, während monokotyledone Pflanzen über einen bis dato umstrittenen Resistenzmechanismus verfügen (Heß, 1981). Dies ermöglicht die Verwendung von 2,4-D als Selektivherbizid in verschiedenen Getreidekulturen wie Reis oder Mais aber auch Zuckerrohr.

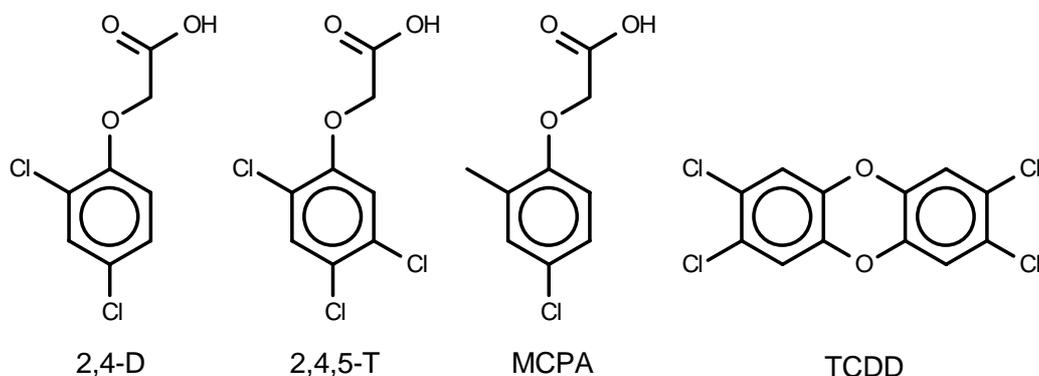


Abbildung 2: Hauptvertreter der Chlorphenoxy-carbonsäure-Herbizide sowie das bei der Herstellung anfallende Nebenprodukt Dioxin. 2,4-D: 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure; 2,4,5-T: 2,4,5-Trichlorphenoxy-essigsäure; MCPA: 4-Chlor-2-methylphenoxy-essigsäure; TCDD: 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin („Dioxin“ oder „Sevesogift“).

Ursprünglich zur Ernteerleichterung im Tomaten-, Soja- und Baumwollanbau entwickelt, sollte 2,4-D während des 2. Weltkriegs von den Amerikanern zur Vernichtung japanischer Reisfelder eingesetzt werden, was durch das Kriegsende verhindert wurde. Seit seiner Einführung in die Landwirtschaft gehört 2,4-D unter Produktnamen wie Hi-Dep®, Weedar® 64, Weed RHAP A-4D®, Weed RHAP A in den USA sowie weltweit zu den am häufigsten eingesetzten Herbiziden. Traurige Berühmtheit erlangte 2,4-D im Vietnamkrieg, in dem es in unterschiedlichen Kombinationen mit 2,4,5-T unter militärischen Farbcodes wie *Agent Orange* (60%), *Agent Purple*, *Agent Pink*, *Agent Green* und *Agent Blue* eingesetzt wurde, um durch Erntevernichtung und Entlaubung des Dschungels die vietnamesische Nahrungsversorgung zu zerstören und verborgene Guerillastellungen aufzuspüren.

Verantwortlich für die insbesondere bei Vietnam-Veteranen gefundenen toxikologischen Auswirkungen ist hauptsächlich die bei der Herstellung von 2,4,5-T als Begleitsubstanz auftretende Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD, gemeinhin als Dioxin oder „Seveso“-Gift bekannt) (Hagenmaier, 1986; Stevens, 1981). Trotz eindeutig nachgewiesener Cancerogenität der chlorierten Phenoxyessigsäuren (z. B. Zunahme des Auftretens von Non-Hodkin-Lymphomen bei exponierten Personenkreisen), wird die Toxizität kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse einer Reihe von toxikologischen Studien sowie umfangreiche weitere Informationen sind im Internet unter www.24D.org zu finden.

5.2 Antikörper und Antikörperfragmente

5.2.1 Vorkommen, Struktur und physiologische Funktion von Antikörpern

Antikörper, die spezifisch an Krankheitserreger binden, wurden erstmalig 1890 von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato im Blut geimpfter Personen entdeckt. Mit der Entwicklung der immer noch relativ jungen Wissenschaft Immunologie zeigte sich, daß Antikörper einen zentralen Bestandteil der humoralen Immunantwort darstellen (Humores = Körperflüssigkeiten). Sie werden ausschließlich von B-Zellen bzw. den sich daraus entwickelnden Plasmazellen zunächst als Oberflächenrezeptoren und später im Verlauf der Immunantwort als lösliche Proteine produziert. Sie kommen dann in den flüssigen Bestandteilen des Blutes (Plasma, Serum), den extrazellulären Flüssigkeiten des Körpers sowie an spezifische Rezeptoren gebunden, auf der Oberfläche verschiedener Effektorzellen des Immunsystems (Mastzellen, Phagocyten, natürliche Killerzellen = NK-Zellen) vor. Ihre physiologischen Aufgaben bestehen in der Bindung und Markierung von Antigenen (fremde, immunogene Moleküle) und der Vermittlung dieser Bindung an weitere Komponenten des Immunsystems, die dann die Zerstörung der Pathogene bewirken. Dadurch tragen sie auf verschiedene Weisen zum Schutz eines Organismus bei: Die Neutralisierung von Krankheitserregern erfolgt durch einfache Bindung. Durch Opsonisierung (Überziehen der Krankheitserreger) und Komplementaktivierung ermöglichen und verbessern sie die Aufnahme und Inaktivierung von Fremdstoffen durch Phagocyten.

Die Fähigkeit der B-Zellen eines Organismus spezifische Antikörper gegen nahezu jedes Antigen herzustellen, ergibt sich aus der einerseits variablen und

andererseits stark homologen Struktur der Antikörper (Abbildung 3): Die Grundstruktur aller Antikörper setzt sich aus 4 Polypeptidketten zusammen, wovon jeweils zwei identisch sind. Nach ihrer molekularen Masse unterscheidet man zwischen der schweren (55 oder 70 kDa) und der leichten Kette (25 kDa). Eine leichte Kette ist jeweils mit einer schweren Kette verbunden, und die beiden schweren Ketten sind zusätzlich durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Beide, die schwere und die leichte Kette bestehen aus mehreren, sich wiederholenden und unabhängig voneinander faltenden, globulären Motiven aus ca. 110 Aminosäuren bzw. 12 kDa, den sogenannten Immunglobulindomänen. Strukturell besteht jede dieser Domänen, deren korrekte Faltung durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert wird, aus zwei Lagen antiparalleler β -Faltblätter aus wiederum je drei oder vier Polypeptidsträngen.

Alle Proteine, die aus diesen charakteristischen Strukturen aufgebaut sind (neben Antikörpern z.B. auch T-Zell-Rezeptoren), werden deswegen allgemein als Immunglobuline bezeichnet. Innerhalb dieser gemeinsamen Grundstruktur unterscheidet man fünf Klassen desselben Isotyps (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE) sowie im Falle von IgG und IgA weitere Unterklassen (beim Menschen IgG1 bis IgG4 und IgA1, IgA2), die sich im konstanten Teil der schweren Kette voneinander unterscheiden. Bei den leichten Ketten wird zwischen zwei Varianten, der kappa- und der lambda-Kette unterschieden. Die Immunglobuline verschiedener Spezies unterscheiden sich vor allem in den Unterklassen. Die verschiedenen Antikörperklassen werden zu verschiedenen Zeitpunkten einer Immunantwort gebildet und vermitteln unterschiedliche Effektorfunktionen. Während IgG, IgD und IgE als Monomere vorkommen, bilden IgA und IgM Di- bzw. Pentamere. Unabhängig vom Isotyp bilden alle Antikörper schließlich eine Ypsilon-ähnliche Struktur: Die beiden für die Antigenbindung zuständigen N-terminalen Domänen setzen sich aus je einer variablen und einer konstanten Region zusammen und werden als Fab-Fragmente (Fragmente des antigenbindenden Teils) bezeichnet. Die Effektorfunktionen werden vom C-terminalen Stamm, dem sogenannten Fragment des konstanten Teils (Fc-Fragment), aus zwei (bei IgA, IgD, IgG) bzw. drei (bei IgE und IgM) konstanten Regionen vermittelt. Die beiden Fab-Fragmente sind über eine flexible Gelenkregion (*hinge*) mit dem Fc-Teil verbunden. Beide Antigenbindungsstellen setzen sich aus je drei hypervariablen Schleifen, den Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (CDR) der schweren und der leichten

Kette zusammen und liegen in den Gerüstregionen der variablen Domänen. Abbildung 4 zeigt die Struktur der Antigenbindungsstelle eines Fv am Beispiel von K411B mit dem Hapten Atrazin-C₆.

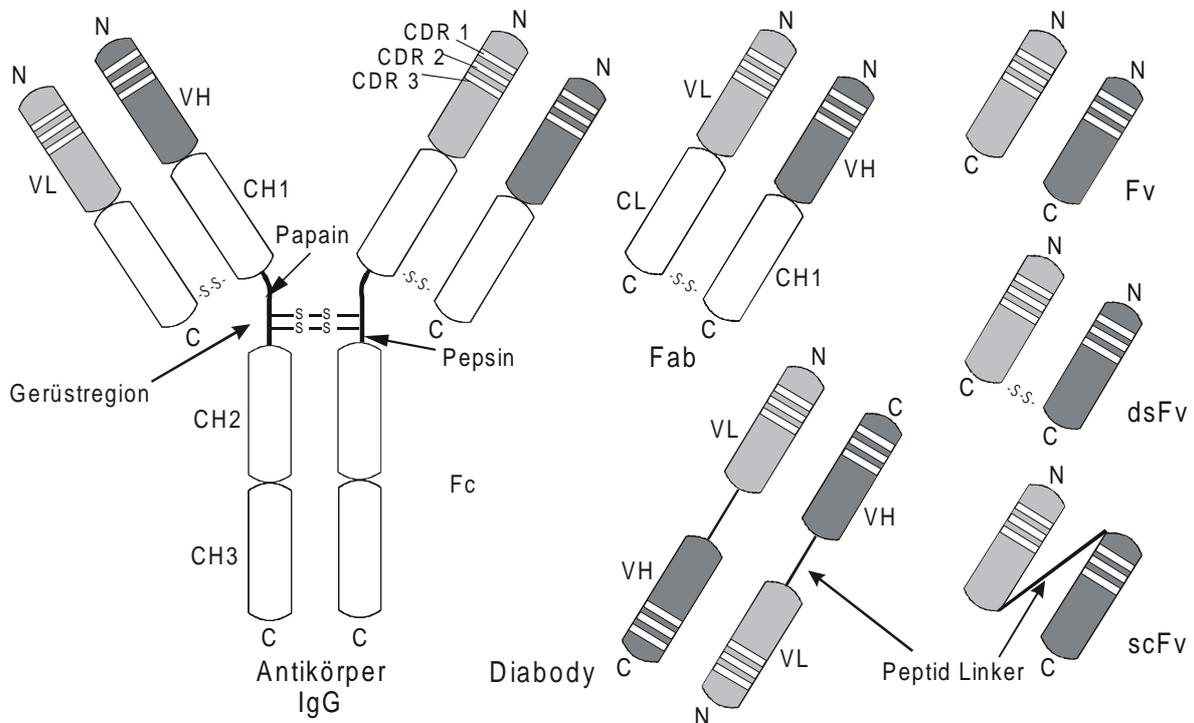


Abbildung 3: Struktur des Antikörpermoleküls und davon abgeleiteter Fragmente.

Die Vielfalt der geschätzt 10^{11} unterschiedlichen Antikörpermoleküle entsteht durch somatische Rekombination einer begrenzten Anzahl separater Gensegmente (V-, D-, J-Regionen) der variablen Regionen sowie durch weitere Zufallsmutationen, die im Verlauf einer Immunreaktion eintreten (junktionale Vielfalt, Affinitätsreifung). Weitere Details zur Struktur und immunologischen Funktion der Antikörpermoleküle sind in einer Reihe von Lehrbüchern nachzulesen, wovon hier (Abbas *et al.*, 1994) und (Janeway und Travers, 1995) exemplarisch genannt sind.

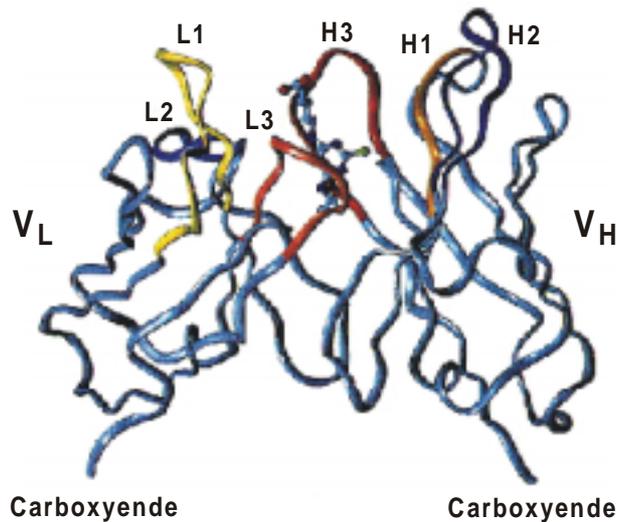


Abbildung 4: Strukturmodell des variablen Fragments K411B in Banddarstellung mit dem Hapten Atrazin-C₆ (Kugel-Stab-Darstellung) in der Bindungsstelle. Die CDRs sind angegeben und farbig hervorgehoben. (Abbildung modifiziert nach (Kusharyoto *et al.*, 2002))

5.2.2 Produktion von Antikörpern und deren Fragmenten

5.2.2.1 Poly- und Monoklonale Antikörper

Die klassische Herstellung von Antikörpern definierter *Spezifität* beruht auf der Immunisierung von Wirbeltieren (Mäuse, Ratten, Kaninchen, Ziegen, Schafe) mit einem Antigen. Dieses kann nahezu jedes beliebige Makromolekül sein oder aber ein kleines auch Hapten genanntes Molekül, das an ein Trägerprotein (z.B. BSA oder KLH) gekoppelt ist. Einige Wochen nach der Immunisierung findet man die gewünschten Antikörper angereichert im Blutserum des Tieres. Die so gewonnenen *Antiseren* enthalten einen für das einzelne Individuum spezifischen Satz Antikörper, in dem nun diejenigen angereichert vorkommen, die gegen unterschiedliche *Epitope* des zur Immunisierung verwendeten Antigenmoleküls gerichtet sind. Da jeder einzelne Antikörper definierter Spezifität von einem eigenen B-Zell-Klon gebildet wird, spricht man von *polyklonalen* Antikörpern (pAk). Voraussetzung zur Anwendung von Antikörpern in Medizin und Diagnostik ist jedoch die Isolierung oder Produktion von Antikörpern gleichbleibender, definierter Spezifität. Die Entwicklung der Hybridomatechnologie (Köhler und Milstein, 1975), mit deren Hilfe monoklonale Antikörper (mAk) gegen eine Vielzahl von Antigenen gewonnen werden konnten, war diesbezüglich ein Meilenstein in der Forschung. Dabei werden nach der Immunisierung eines Versuchstieres die in der Milz enthaltenen B-Lymphozyten (Antikörperproduzenten) entnommen und mit unsterblichen Plasmazytomzellen

fusioniert. Die resultierenden Hybridomzellen vereinigen die Unsterblichkeit der Krebszellen und die Fähigkeit der B-Zellen, Antikörper definierter Spezifität zu produzieren. Diese Hybridomazellen können nun im satzweisen (*batch*), im Zufütterungs- (*fed batch*), im kontinuierlichen oder im Perfusionsbetrieb kultiviert werden.

Die dabei produzierten, meist murinen Ak wirken bei *in vivo* Anwendungen in der Humanmedizin jedoch häufig immunogen und können durch anti-Maus-Antikörper neutralisiert werden (Milstein und Waldmann, 1999). Nachteilig sind auch die aufwendige Selektionsprozedur zur Auswahl des gewünschten Klons aus dem Fusionsansatz, die technisch aufwendige Produktion in großem Maßstab sowie die nur eingeschränkten Möglichkeiten gezielter genetischer Manipulation.

5.2.2.2 Rekombinante Antikörper

Aus oben genannten Gründen wurde bereits früh versucht, rekombinante Antikörper von Bakterien produzieren zu lassen. Im Mittelpunkt dieses dritten, auf den modernen gentechnischen Methoden beruhenden Weges standen jedoch im Gegensatz zu den beschriebenen pAk und mAk nur Antikörperfragmente, die jedoch die Antigenbindestelle enthielten: Bereits vor der Entwicklung der gentechnologischen Methoden wurden die monovalenten Fab-Fragmente und die divalenten (Fab)₂-Fragmente durch Proteasespaltung (Papain, Pepsin) von kompletten Antikörpermolekülen hergestellt (siehe auch Abbildung 3). Die kleinsten Fragmente enthalten jedoch nur die variablen Domänen der beiden Polypeptidketten und werden deshalb als Fragmente des variablen Bereichs (Fv) bezeichnet. Im Gegensatz zu den Fab Fragmenten können sie jedoch nur rekombinant hergestellt werden.

Da erst während der Entwicklung der B-Zellen, in jeder einzelnen B-Zelle die Gene für „ihren spezifischen“ Antikörper durch Rekombination der V-, J- und D-Sequenzen entstehen, greift man zur Klonierung der relevanten Sequenzen (variable Domänen und bei Fab-Fragmenten die erste konstante Domäne) auf die mRNA bzw. cDNA zurück: Im ersten Schritt wird nach Isolation der mRNA mittels der reversen Transkriptase eine cDNA hergestellt. Mit der mRNA-cDNA-Heteroduplex als *Template* sowie mit zwei *Primern*, die an die Enden der gewünschten Genbereiche hybridisieren, werden die Gen-Sequenzen der Antikörperfragmente durch PCR amplifiziert und können in heterologe Wirtsorganismen wie *E. coli* eingebracht

werden. Da auch die Gerüstregionen, die in den variablen Antikörperdomänen die hypervariablen CDRs einschließen, eine relativ hohe Homologie innerhalb einer Spezies und einer Klasse aufweisen, kann die PCR häufig mit „Standard“-Primern erfolgen (Clackson *et al.*, 1991; Orlandi *et al.*, 1989). Obwohl die Gene in *E. coli* exprimiert wurden, konnten in den ersten Versuchen anstelle funktioneller Proteine nur unlösliche Aggregate (Einschlußkörper) nachgewiesen werden (Boss *et al.*, 1984; Cabilly *et al.*, 1984). Erst 1988 konnten die ersten rekombinanten Antikörperfragmente funktionell in *E. coli* hergestellt werden (Better *et al.*, 1988; Skerra und Plückthun, 1988). Dies gelang durch Sekretion der Antikörperketten in den periplasmatischen Raum der Zelle mit Hilfe N-terminaler Signalsequenzen. Das oxidierende Milieu des Periplasmas ermöglicht die Ausbildung der zur korrekten Faltung notwendigen Disulfidbrücken.

Nachteilig bei Fv Fragmenten ist deren Instabilität, da die beiden Polypeptidketten nicht kovalent miteinander verknüpft sind. Dies konnte jedoch bei den scFvs (*single chain* Fv) durch Einführung von flexiblen Peptidlinkern zwischen den beiden variablen Domänen (häufig mit der AS-Sequenz (Gly₄Ser)₃) und noch besser bei den dsFvs (*disulfide stabilised* Fv) durch zusätzliche intermolekulare Disulfidbrücken (Glockshuber *et al.*, 1990; Glockshuber *et al.*, 1992; Reiter *et al.*, 1994) verbessert werden. Letztere haben sich jedoch trotz höherer Stabilität aufgrund geringerer Expressionsmengen bislang nicht durchgesetzt. Zwei scFvs in einer Zelle können sich zu bivalenten, im Fall von verschiedenen scFvs auch bispezifischen Diabodies falten, indem sich jeweils die V_H-Domäne des einen Fragments mit der V_L-Domäne des anderen zusammenlagert. Die Art der Faltung (scFv oder Diabody) wird durch die Länge des *Linker*peptids bestimmt: Vorhandene Strukturdaten zeigen, daß zur korrekten Faltung von scFv Fragmenten eine Distanz von 35 bis 40 Å vom *Linker* überbrückt werden muss. Ausgehend davon wurden *Linker*längen von 12 – 28 Aminosäuren zur Herstellung von scFv Fragmenten verwendet (Alfthan *et al.*, 1995; Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988; Pantoliano *et al.*, 1991; Takkinen *et al.*, 1991). Je kürzer die *Linker*peptide sind, desto höher wird der Anteil an Diabodies. Insbesondere unter therapeutischen Gesichtspunkten muß bei der Wahl der Fragmente auf deren Größe geachtet werden, denn sie beeinflusst die für die Wirksamkeit wichtigen Eigenschaften wie Spezifität, Affinität, Avidität (Valenz), Fähigkeit zur Gewebepenetration sowie Ausschleusung durch die Niere. Während sich für therapeutische Anwendungen aufgrund dieser Eigenschaften

Minibodies und Fab₂-Fragmente besonders eignen, sind scFvs aufgrund ihrer verringerten Halbwertszeit besonders für radiodiagnostische Zwecke (Adams *et al.*, 1993; Goldenberg und Nabi, 1999) geeignet.

5.2.2.3 Weitere Expressionssysteme

Bis heute ist *E. coli* aufgrund seiner allgemein bekannten und einfachen experimentellen Handhabbarkeit das am häufigsten zur Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente verwendete Expressionssystem (Bandtlow *et al.*, 1996; Bassi *et al.*, 2000; Better und Horwitz, 1989; Carter *et al.*, 1992; Chames und Baty, 2000; Harrison und Keshavarz-Moore, 1996; Plückthun, 1991a; Plückthun, 1991b; Plückthun und Skerra, 1989; Skerra, 1994). Trotz der Dominanz bei der Expression rekombinanter Proteine zeigt das System insbesondere bei der Expression eukaryontischer und/oder komplexer Proteine einige Schwächen, wie z. B. die Unfähigkeit von Bakterien, posttranslationale Modifikationen durchzuführen oder Probleme bei der korrekten Faltung von vielen heterolog exprimierten und komplexen Proteinen. Nachteilig stellte sich bei der Expression von Antikörperfragmenten auch heraus, daß selbst durch einzelne Punktmutationen, die bei der Herstellung von Mutantenbibliotheken teilweise beabsichtigt generiert werden, die Ausbeute erheblich beeinflusst werden kann (Duenas *et al.*, 1995; Knappik und Plückthun, 1995; Ulrich *et al.*, 1995), was jedoch unabhängig vom Expressionssystem ist.

Keiner der verschiedenen Lösungsansätze, wie die Reduktion auf die antigenspezifischen Domänen des Antikörpermoleküls (Fab, Fv, ...), die Expression der Ak in Form von Einschlußkörpern und deren nachfolgende Rückfaltung *in vitro* oder die ins oxidierende Milieu des Periplasmas erfolgte Expression, konnte diese Probleme jedoch zufriedenstellend lösen. Mittlerweile wurden zwar eine Reihe weiterer Expressionssysteme wie verschiedene Säugerzellen (Dorai *et al.*, 1994; Jost *et al.*, 1994), Insektenzellen (Putlitz *et al.*, 1990), Bäcker- und Spalthefen (Bowdish *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 1985), transgene Pflanzen (Firek *et al.*, 1993; Longstaff *et al.*, 1998; Whitelam *et al.*, 1994) und Tiere sowie *in vitro* Expressionssysteme (Nicholls *et al.*, 1993; Ryabova *et al.*, 1997) getestet. Es konnte sich jedoch außer den verschiedenen Säugerzelllinien keines entscheidend durchsetzen oder als Alternative zu *E. coli* etablieren. Gründe hierfür sind die zu niedrigen Expressionsmengen, eine aufwendige und damit verbundene teure

Kultivierung oder der Mangel an gut etablierten und verbreiteten Methoden der Kultivierung und genetischen Manipulation. Einen vergleichenden Überblick über die verschiedenen Systeme gibt (Verma *et al.*, 1998).

5.2.3 Antikörper in Forschung, Analytik, Diagnostik und Therapie

Seit Entdeckung und Optimierung der Produktionsverfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper durch Köhler und Milstein 1975 haben sich diese zu einem nahezu unverzichtbaren Werkzeug in Forschung, Analytik und Diagnostik sowie als Therapeutikum entwickelt. So war Okt3 von Orthoclone der erste zur Therapie zugelassene monoklonale Antikörper. Er bindet an eine der Ketten des humanen T-Lymphozyten CD3 Komplexes des T-Zellrezeptors, führt dadurch zur Blockierung der T-Zellaktivierung und zur Entfernung CD3 positiver T-Zellen aus der peripheren Zirkulation und wird als Immunsuppressivum gegen die Transplantatabstoßung eingesetzt. Aufgrund der für therapeutische Anwendungen störenden Immunogenität tierischer Antikörper wurden diese zunächst vorrangig für diagnostische und analytische Zwecke verwendet.

Die Entwicklung der kostengünstigen Herstellung funktioneller Antikörper in *E. coli* und anderen Wirtsorganismen in Verbindung mit den gentechnologischen Möglichkeiten eröffneten zum einen die Aussicht auf Antikörper in ausreichender Menge sowie auf ganz neue Felder der gezielten Veränderung einer Reihe von Antikörpereigenschaften (*antibody engineering*). Eines der ersten Ziele war hier die Humanisierung von Antikörpern, um die immunogene Wirkung bei Verwendung als Therapeutika zu vermeiden: Hierbei sind entweder nur die variablen Domänen oder gar nur die hypervariablen Regionen mit der Antigenbindestelle murinen Ursprungs und werden in ansonsten humane Antikörpergerüste eingebracht. Beide dieser Strategien zur Herstellung der nun als „Chimären“ oder „humanisierte“ Antikörper bezeichneten Antikörper führten bereits zu zugelassenen Therapeutika: Bei Präparaten wie Mabthera® (Rituximab, Roche, zugelassen 1998) zur Behandlung von CD 20 positiven B-Zell Non Hodgkin Lymphomen und Simulect® (Basiliximab, Novartis, zugelassen 1998) zur Prophylaxe bei allogenen Nierentransplantationen wurde die komplette variable Domäne murinen Ursprungs verwendet (Anderson *et al.*, 1997; Kahan *et al.*, 1999); bei den Präparaten Remicade® und Herceptin® zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten und Entzündungen bzw. metastatisierendem Brustkrebs sind nur die hypervariablen Regionen murinen

Ursprungs (Elliott *et al.*, 1994; McNeil, 1998). Tabelle 1 gibt einen Überblick der derzeit zugelassenen therapeutischen Antikörper. Weitere befinden sich in den klinischen Phasen des Zulassungsverfahrens.

Eine Verbindung humanisierter Antikörper mit der Hybridomtechnik war die Züchtung „humaner Mäuse“, bei der die murinen Antikörperkettengene durch humane ersetzt wurden (Green, 1999).

Tabelle 1: In Deutschland zugelassene therapeutische Antikörper. Quelle: Informationssekretariat Biotechnologie (ISB,). Abkürzungen: Chim.: chimärisiert; hum.: humanisiert.

| Produkt | Ziel-molekül | AK | Indikation | Unternehmen | Zulassung |
|----------------------------|--------------------------|-------------|---|---|-----------|
| Orthoclone OKT 3 | CD3 | mAk | Transplantat- Abstoßung | Orthio-Biotech, Janssen-Cilag | 1986 |
| ReoPro™ Abciximab | gpIIb-IIIa (Integrin) | Fab | Thrombose Gerinnungshemmung | Centocor, Eli Lilly, Fujisawa | 5/1995 |
| Humaspect™ Votumumab | | mAk | Detektion des Kolon- Karzinoms | Organon Teknika | 11/1996 |
| Zenapax™ Daclizumab | CD25 (IL-2) | mAk (hum.) | Transplantat- Abstoßung | Protein Design Labs, Hoffmann-La Roche | 2/1999 |
| Rituximab™ Mabthera | CD20 | mAk (chim.) | B-Zell Lymphome | Genentech, IDEC, Zenyaku Kogyo, Hoffmann-La Roche | 1998 |
| Remicade™ Infliximab | TNF α | mAk (chim.) | Entzündungen | Centocor, Schering- Plough, Tanabe Seiyaku | 08/1999 |
| Herceptin™ Trastuzumab | HER2- Rezeptor | mAk (chim.) | Brustkrebs | Genentech | 09/2000 |
| Simulect™ Basiliximab | CD25 (IL-2) | mAk (chim.) | Akute Nierentransplantat Abstoßung | Novartis | 10/1998 |
| Synagis™ Palivizumab | RSV | mAk (hum.) | RSV Infektionen | MedImmune, Abbott Lab., Boehringer Ingelheim | 05/1999 |
| MabCampath™ Alemtuzumab | CD52 | mAk (hum.) | chronisch lymphozytische Leukämie (Non- Hodgkin-Lymphom) | Millenium & Ilex UK Ltd. | 03/2001 |

Neben den therapeutischen Anwendungen führte die Verfügbarkeit von Antikörpern vieler Spezifitäten zur Entwicklung von neuen immunologischen Nachweismethoden von körpereigenen und pharmazeutischen Substanzen. Seit Ende der 80er Jahre wurden auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik eine Reihe von Immunoassays gegen relevante Substanzen wie Pflanzenschutzmittel oder Xenobiotika entwickelt, die für viele Analyte bereits kommerziell verfügbar sind (siehe Kapitel 5.1).

5.2.4 Hochdurchsatz-Screening von Antikörperbibliotheken

Die gentechnische Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente in *E. coli* eröffnete neue Möglichkeiten zur Herstellung verschiedenster Antikörperbibliotheken. Durch die Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.*, 1992) konnten die variablen Domänen der schweren und leichten Ketten unabhängig voneinander aus B-Zell-cDNA amplifiziert und miteinander kombiniert werden. Zur Selektion von Antikörpern einer bestimmten Affinität und Spezifität gegenüber der zu detektierenden Zielstruktur ist ein schnelles, zuverlässiges und hinreichend genaues Selektionsverfahren der Schlüssel zum Erfolg. Bei der klassischen Antikörpergewinnung wurde hierfür die häufig mit dem „Goldwaschen“ verglichene Prozedur des *pannings* eingesetzt. Hierbei werden nach Immunisierung eines Tieres dessen Antikörper-präsentierende B-Zellen auf immobilisiertes Antigen gegeben, daran nicht gebundene Zellen durch Waschen entfernt und diejenigen, die Ak der gewünschten Spezifität präsentieren, entsprechend angereichert.

Auch die mit rekombinanten Methoden hergestellten Antikörperbibliotheken wurden zunächst erfolgreich mit den klassischen Selektionsverfahren durchsucht, wobei jedoch die Antikörperfragmente selbst anstelle der sie produzierenden Zellen angereichert wurden (Huse *et al.*, 1989). Dies erfordert eine große Menge an immobilisiertem Antigen, weswegen große Bibliotheken mit 10^9 oder mehr unterschiedlichen Varianten damit nicht effektiv durchsucht werden können. Die Lösung dieses Problems war die fundamentale Entdeckung, daß heterologe Proteine auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen von *E. coli* exprimiert werden können. Dies erfolgt durch Fusion des Gens eines scFv an das eines Oberflächenproteins des Phagen. In den während des folgenden Infektionszyklus entstehenden Phagen ist das Genprodukt physisch mit dem Gen gekoppelt, so daß ähnlich wie im natürlichen B-Zellsystem eine klonale Selektion erfolgen kann. Es

können also direkt Phagen, die die Ak der gewünschten Spezifität exprimieren, angereichert und erneut in Kultur genommen werden. Das 1990 erstmalig angewendete „Phagen-display“ System (McCafferty *et al.*, 1990) mit dem Prinzip der Kopplung von Genotyp und Phänotyp wurde seither durch Entwicklung von verschiedenen Systemen aus Phagemidvektoren und Helferphagen optimiert (Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991). Dabei enthalten die Vektoren die Verpackungsgene des filamentösen Phagen inklusive des Fusionsproteins unter Kontrolle von regulierbaren Promotoren, während der Helferphage die übrigen Phagengene beisteuert. Damit kann die Vervielfältigung der Antikörperbibliothek erfolgen, ohne daß die für *E. coli* toxischen und somit negativ selektierenden Phagenpartikel entstehen. Diese werden erst gegen Ende durch Induktion des Phagemidvektors und gleichzeitige Zugabe des Helferphagen gebildet. Als weitere Alternativen wurde die Kopplung von Geno- und Phänotyp auf Nicht-Phagensysteme übertragen. Dabei exprimieren rekombinante Bakterien (Daugherty *et al.*, 1998) oder Hefezellen (Boder und Wittrup, 1997) die heterologen Proteine auf der Zellwandoberfläche als Fusion mit einem Zellwandprotein. Das Screening und die Selektion der im Vergleich zu den Phagenpartikeln viel größeren Zellen erfolgt anstelle des *pannings* an einer immobilisierten Matrix mit Hilfe eines Fluoreszenz Aktivierten Zellsorters (FACS). Da bei den beschriebenen Systemen häufig die Ligation und/oder die Transformation der Wirtszellen den limitierenden Faktor darstellt, wurde mit dem sogenannten *Ribosome-display* ein *in-vitro* Screeningsystem entwickelt, das auf zellfreier scFv Expression beruht (Hanes und Plückthun, 1997). Hierbei wird nach der Translation das entstandene Protein nicht freigesetzt, sondern verbleibt bereits korrekt gefaltet mit der RNA am Ribosom. Durch *panning* der Komplexe aus Ribosom, RNA und Antikörperfragment werden diejenigen der gewünschten Spezifität angereichert und die RNA isoliert. Durch eine anschließende RT-PCR können weitere Mutationen eingeführt werden und ein neuer Selektionszyklus gestartet werden.

5.3 Methodische Grundlagen

5.3.1 *Pichia pastoris* als eukaryontisches Protein-Expressionssystem

Die Möglichkeit Methanol, das ökonomisch aus Erdgas herzustellen war, als Kohlenstoffquelle für die Kultivierung methylotropher Hefen zu verwenden und deren Biomasse als billiges, proteinreiches Futtermittel einzusetzen, war der auslösende Faktor eines immer noch anhaltenden Forschungsinteresses an *Pichia pastoris*. Diesbezüglicher Höhepunkt war die Entwicklung von kontinuierlichen Hochzelldichte-Kultivierungstechniken der Hefe ($> 130 \text{ g l}^{-1} \text{ BTM}$) in den Siebziger Jahren durch die Philipps Petroleum Company (PPC), Bartlesville, Oklahoma, USA. Der mit der Ölkrise 1972 verbundene, dramatische Preisanstieg für Methanol und der parallele Preisverfall von Soja, der Hauptproteinquelle in der Nutztierfütterung, stoppte diese Entwicklung jedoch, da der Einzelzellprotein-Prozeß mit ca. \$5 je Pfund ökonomisch nicht mehr konkurrenzfähig war. Anfang der Achtziger Jahre wurde *Pichia pastoris* dann vom Salk Institute Biotechnology / Industrial Associates (La Jolla, Kalifornien, USA) zu einem stabilen heterologen Proteinexpressionssystem weiter entwickelt und kann seit 1993 von Research Corporation Technologies zur kommerziellen Proteinexpression und von Invitrogen zu Forschungszwecken lizenziert werden.

Pichia pastoris ist eine sprossende Hefe, die wie die Gattungen *Candida*, *Hansenula* und *Torulopsis* Methanol als einzige Kohlenhydratquelle metabolisieren kann. Dazu stehen ihr zwei Alkoholoxidasen, codiert durch zwei Gene (AOX1, AOX2) zur Verfügung (Cregg *et al.*, 1989), die jedoch nur eine geringe Affinität zu Sauerstoff aufweisen. Dies wird durch die Produktion großer Mengen an Alkoholoxidase ($>30\%$ des in der Zelle vorhandenen löslichen Proteins bei Wachstumslimitierung auf Methanol) kompensiert. Für den Großteil der in der Zelle vorhandenen Alkoholoxidase-Aktivität zeichnet sich AOX1 (EC 1.1.3.13) verantwortlich, die unter der Kontrolle des starken, stringent regulierten, Methanol-induzierbaren AOX1-Promotors steht. Die AOX2 dagegen ist zwar weitgehend homolog zur AOX1, steht jedoch unter Kontrolle eines schwachen Promotors. Die Regulation der AOX1 Expression erfolgt auf RNA-Ebene mittels zweier Mechanismen ähnlich denen des Gal-Operons zur Regulation des Galaktosestoffwechsels in *S. cerevisiae*: Zusätzlich zur Induktion durch Methanol,

ohne das der Promotor nahezu vollständig reprimiert ist, ist die Abwesenheit weiterer, reprimierender C-Quellen erforderlich (Katabolitrepression).

Der Abbau des Methanols beginnt mit dessen Oxidation zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid durch die Alkoholoxidase. Dieser erste Schritt erfolgt in den Peroxisomen, wo das toxische Wasserstoffperoxid direkt zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt wird. Das Formaldehyd wird in einem Kreislauf, der ebenfalls in den Peroxisomen stattfindet, durch die Dihydroxyacetonsynthase mit Xylulose-5-monophosphat zu Glyceraldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton kondensiert. Ein Teil des Formaldehyds wird direkt ausgeschleust und im Cytoplasma durch Dehydrogenasen zu Formiat und Kohlendioxid umgesetzt.

Die heterologe Expression von Proteinen erfolgte zunächst nur unter Kontrolle des beschriebenen, starken AOX1 Promotors; später kamen andere Promotoren, insbesondere der konstitutive Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Promotor hinzu. Als Expressionsstämme werden verschiedene Derivate des Stammes NRRL-Y-11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, USA) verwendet, von denen die meisten zur Selektion von Transformanden Mutationen im Histidinol Dehydrogenase Gen enthalten (Cregg *et al.*, 1985). Es sind verschiedene Stämme erhältlich, die sich durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit korrekter AOX Gene und damit in ihrer Fähigkeit, Methanol zu verwerten, unterscheiden: GS115 enthält beide AOX-Gene und kann damit gut mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, was dem Mut⁺-Phänotyp entspricht (Cregg *et al.*, 1985); KM71 dagegen verfügt nur über ein funktionelles AOX2 Gen und kann damit nur langsam mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, was dem Mut^s-Phänotyp entspricht (Cregg und Madden, 1987). Um den Abbau heterologer Proteine durch Proteasen zu vermeiden, wurden weitere Protease-defiziente Stämme entwickelt (SMD1168, SMD1165, SMD1163), bei denen das Gen der Proteinase B (*PRB1*) und/oder der Proteinase A mutiert ist, eine vakuoläre Aspartyl Protease (*PEP4*), die sowohl sich selbst als auch weitere Proteasen (Carboxypeptidase Y, Proteinase B) aktiviert.

Da in *Pichia* bislang keine replizierenden, endogenen Plasmide ähnlich dem 2 μ -Plasmid aus *S. cerevisiae* bekannt sind und Plasmide mit ARS-Elementen (ARS, *autonomous replicating sequence*) zwar existieren, jedoch nicht stabil sind, werden die heterologen Expressionskassetten nach Transformation in *Pichia* durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Als Integrationsort werden in der

Regel entweder der defekte HIS4 Locus oder Bereiche des Alkoholoxidase-Gens gewählt. Die eigentliche Integration kann durch ein Doppel-*crossover* erfolgen, wobei die zwischen den beiden homologen Sequenzen liegende genomische Sequenz durch die zwischen den beiden homologen Sequenzen liegende des Vektors ersetzt wird. Alternativ kann die Integration durch ein Einfach-*Crossover* als Insertion erfolgen, wobei keine ursprünglich vorhandenen Sequenzen verloren gehen. Handelt es sich bei dem Insertionsort um AOX1, entstehen - abhängig davon, ob die AOX1 erhalten bleibt oder nicht - die verschiedenen Phänotypen bezüglich der Metabolisierung von Methanol. Eine wichtige Rolle spielt der Mut-Phänotyp insbesondere bei der Wahl der geeigneten Fermentationsstrategie im Hinblick auf den Induktionszeitpunkt durch Methanol. Transformanden können im Gegensatz zu nicht-transformierten *Pichia* Zellen in Medium ohne Histidin oder in Medium mit Zeocin™ wachsen.

Die Expression kann intrazellulär oder mittels geeigneter Signalsequenzen sekretorisch ins Medium erfolgen. Hier kommen z. B. die natürlichen Signalsequenzen der heterologen Proteine in Frage oder die PHO1 Signalsequenz der sauren Phosphatase von *Pichia*. Am effektivsten hat sich jedoch häufig die Präpro-Signalsequenz des α -Faktors aus *S. cerevisiae* erwiesen. Insbesondere weil *Pichia* nahezu keine homologen Proteine sekretiert, vereinfacht dies die Reinigung der heterologen Proteine aus dem Medium enorm.

Als eukaryontischer Organismus zeigt die Hefe *Pichia pastoris* die typischen Vorteile eukaryontischer Expressionssysteme bei der Proteinprozessierung, -faltung, und posttranslationalen Modifikation rekombinanter, eukaryontischer Proteine. Dennoch ergeben sich insbesondere gegenüber nativen humanen Proteinen Unterschiede hinsichtlich der posttranslationalen Modifikationen (vor allem Glykosylierungen, aber auch Phosphorylierungen, Methylierungen, ...), was die Verwendung solcher heterolog in *Pichia* hergestellter humaner Proteine am Menschen *in vivo* zumindest einschränkt.

Im Vergleich zur Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeichnet sich *Pichia pastoris* durch 10 - 100-fach höhere Expressionsmengen aus. Viele für *Saccharomyces* entwickelte Methoden lassen sich problemlos auf *Pichia pastoris* übertragen, was den Organismus zu einem einfachen, schnellen und billigen Expressionssystem macht.

Obwohl bereits viele Proteine erfolgreich und zum Teil in sehr hohen Ausbeuten in *Pichia* überexprimiert werden konnten – eine Übersicht zeigt (Higgins und Cregg, 1998) - beschränkt sich dies bei Antikörpern bislang weitgehend auf scFvs (Boado *et al.*, 2000; Eldin *et al.*, 1997; Freyre *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997b; Luo *et al.*, 1996; Marty *et al.*, 2001) und *Diabodies* (Luo *et al.*, 1997a). Dies mag mit dem in *Pichia* notwendigen Aufwand der genomischen Integration heterologer Gene zusammenhängen: Bei Proteinen, die aus mehreren, verschiedenen Untereinheiten bestehen, wie es bei ganzen Antikörpern oder Fab-Fragmenten der Fall ist, erfordert dies die Integration der Gene aller Untereinheiten in das Genom einer Zelle. Tatsächlich wurden bislang lediglich vier heterodimere Proteine, HLA-DR2 $\alpha\beta$ (Kalandadze *et al.*, 1996), Bovines Follikel-stimulierendes Hormon (Fidler *et al.*, 1998), ein Fab-Fragment (Takahashi *et al.*, 2000) sowie ein kompletter, Dioxin-spezifischer monoklonaler Antikörper (Ogunjimi *et al.*, 1999) in *Pichia* exprimiert. Bei Letzterem bildete jedoch nur ein kleiner Prozentsatz der exprimierten schweren und leichten Ketten das funktionell aktive H₂L₂ Tetramer.

5.3.2 Immunoassays

Immunoassays (IA) dienen dem spezifischen Nachweis von Antigenen, den Analyten oder auch von Antikörpern. Sie zeigen sich vor allem bei hohen Probendurchsätzen zu verträglichen ökonomischen Belastungen den Methoden der klassischen Analytik wie HPLC, GC oder GC/MS überlegen. Im Gegensatz zu diesen erfordern Immuntests keine teuren Geräte, sind dementsprechend einfach durchführbar, lassen sich z. B. auf Teststreifenformate miniaturisieren und liefern schließlich vergleichsweise schnell ein Ergebnis. Nachteile der Immunoassays sind Ungenauigkeiten durch Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper oder Matrixeffekte, Instabilität der verwendeten Antikörper und/oder *Tracermoleküle* sowie letztendlich die Verfügbarkeit von Antikörpern der gewünschten Spezifität in ausreichender Menge, obwohl prinzipiell die Möglichkeit besteht, gegen nahezu jeden beliebigen Analyten Antikörper herzustellen. Trotz dieser Limitationen wurden eine Vielzahl von Testdesigns vor allem zur Einzelanalytbestimmung aber auch für Multianalysysteme zur simultanen Detektion und Quantifizierung verschiedener Analyten etabliert. So erhielten Yalow und Berson den Nobelpreis für die Entwicklung eines Immunoassays zur quantitativen Bestimmung von Humaninsulin (Yalow und Berson, 1996).

Einer der ersten und immer noch zur Quantifizierung von Antikörpern oder Antigenen verwendete IA ist die Immunpräzipitation: Sie beruht auf der Bildung von sichtbaren Ak/Ag-Komplexen wenn beide Komponenten, Antigen und Antikörper, bei der Diffusion durch ein halbfestes Gel in gleichen Konzentrationen aufeinandertreffen. Es werden dabei die aus der Bindung folgenden physikalischen Veränderungen von Antigen und/oder Antikörper gemessen. Eine besondere Variante stellt der *Ouchterlony*-Test dar, ein zwei-dimensionaler Doppeldiffusionstest bei dem ein Serum oder Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen in kreisförmig angeordnete Vertiefungen auf das Gel aufgetragen wird und das Antigen im Zentrum des Kreises. Durch Analyse der Präzipitatlinien lassen sich Quantifizierungen von Antigen bzw. Antikörper oder das Vorliegen von verwandtschaftlichen Proteinen nachweisen. Anstelle dieser passiven Diffusionstests können solche Immunpräzipitationen auch als Immunelektrophoresen erfolgen, die generell sensitiver und schneller sind. Neben diesen Immunpräzipitationen, deren Sensitivität aufgrund der visuellen Beobachtung der Präzipitate begrenzt ist (20 µg bis 2 mg pro Liter), existieren weitere Immuntests, die die primäre Bindung zwischen Antigen und Antikörper selbst messen. Abhängig von ihrem Funktionsprinzip werden sie nach verschiedenen Kriterien eingeteilt: Mit radioaktiven Isotopen, Enzymen, Fluoreszenz- und Chemolumineszenzfarbstoffen stehen verschiedene Markierungen zu Verfügung, die die Art der Detektion sowie die Bezeichnung des jeweiligen Testformats (RIA, EIA/ELISA, FIA, ...) bestimmen. Trotz hoher Sensitivitäten ohne Amplifikationseffekte wird der radioaktive Nachweis aufgrund der mit der Radioaktivität verbundenen Nachteile wenn möglich durch Enzym-katalysierte Farbreaktionen oder Fluoreszenznachweise ersetzt. Des weiteren unterscheidet man zwischen Tests, die vollständig in Lösung (homogen) oder in der Nähe einer Oberfläche, an die eine der Komponenten immobilisiert ist (heterogen), erfolgen. Letztere ermöglichen aufgrund der Immobilisierung eines der Reaktionspartner eine einfache Trennung von gebundenen und ungebundenen Molekülen und sind deswegen trotz des längeren Zeitbedarfs häufiger anzutreffen. Bei den heterogenen Immunoassays (Abbildung 5) wird zusätzlich zwischen direkten Immuntests, bei denen der Primärantikörper immobilisiert ist und indirekten Immunoassays, bei denen das Antigen immobilisiert ist, unterschieden.

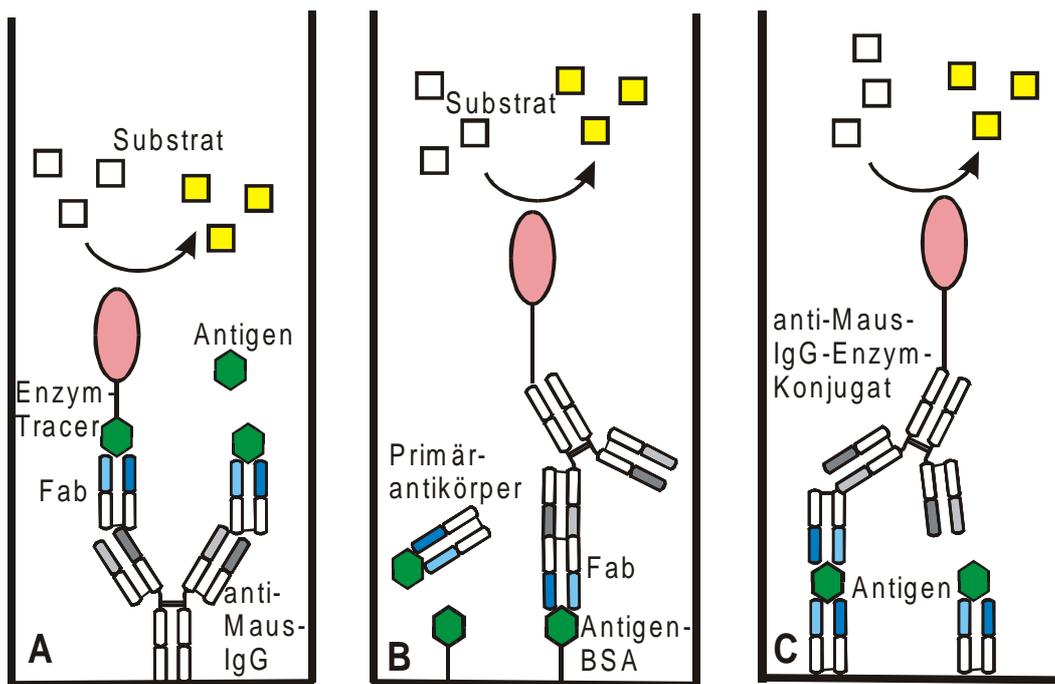


Abbildung 5: Prinzipien verschiedener heterogener Immunoassays. A: direkter, kompetitiver ELISA; B: indirekter, kompetitiver ELISA; C: Sandwich-ELISA

Die Detektion und Quantifizierung des Analytmoleküls kann durch kompetitive oder nicht-kompetitive Anordnungen erfolgen: Bei nicht-kompetitiven Formaten liegt der Antikörper im Überschuß vor, bei kompetitiven dagegen besteht eine Konkurrenz zwischen markierten und nicht markierten Antigenmolekülen um die limitierten Antikörperbindungsstellen. Das wohl bekannteste Beispiel für den nicht-kompetitiven Test ist der sogenannte „Sandwich“-ELISA. Hier dient ein an die feste Matrix gekoppelter Analyt-spezifischer Primärantikörper als Fänger-Antikörper für das Analytmolekül, das dann direkt von einem weiteren markierten Primärantikörper detektiert wird. Die Detektion des zweiten Primärantikörpers kann alternativ auch durch einen markierten Sekundärantikörper erfolgen.

5.3.3 Reinigung rekombinanter Proteine durch IMAC

Rekombinante Proteine können durch eine spezielle Methode der Affinitätschromatographie, die sogenannte immobilisierte Metall Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt werden (Porath *et al.*, 1975). Diese beruht auf der reversiblen, spezifischen Bindung verschiedener Aminosäureseitenketten, insbesondere von Histidin, Cystein und Tryptophan an zweiwertigen Metallionen (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}), die durch Komplexbildung an einen chelierenden Liganden der stationären Phase immobilisiert sind.

In der Praxis wird die DNA-Sequenz des (His)₆-Tags gentechnisch 3'- oder 5'-seitig an das Gen des aufzureinigenden Proteins fusioniert. Zur Aufreinigung des entstandenen Fusionsproteins wird zunächst die Kohlenhydratmatrix mit dem Metallion beladen und die so vorbereitete Matrix mit dem jeweiligen Puffer äquilibriert. Nach Beladung der Säule mit der Proteinmischung werden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit Äquilibrierungspuffer entfernt und schließlich durch pH-Änderung die Affinität zwischen dem (His)₆-Tag des rekombinanten Proteins und den Metallionen verringert oder durch Imidazol (100 – 300 mM) die Proteine verdrängt und damit eluiert. Da die koordinative Bindung der Metallionen an die Chelatbildner deutlich stärker ist als die Bindung der Proteine, können die Proteine ohne Verunreinigung mit Metallionen desorbiert werden. Die Entfernung der an das Protein fusionierten Histidinreste wird häufig durch eine spezifische, ebenfalls zusätzlich eingefügte Proteaseschnittstelle zwischen dem eigentlichen Protein und dem Histidin-Tag ermöglicht.

5.4 Ausgangspunkt und Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit entstand vor dem in den ersten beiden Kapiteln geschilderten Hintergrund im Rahmen eines EU-Projekts¹, an dem sich insgesamt 5 Partner², darunter 4 Forschungseinrichtungen sowie eine Firma beteiligten. Dessen Ziel war die Entwicklung eines optoelektronischen und mit rekombinanten Antikörpern bzw. artifiziellen Rezeptoren bestückten Multi-Sensorarrays zur schnellen vor-Ort Bestimmung von Herbiziden. Als Zielstruktur wurden die in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Triazinherbizide gewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, um die Verfügbarkeit von Antikörpern zu gewährleisten, ein Expressionssystem zur rekombinanten Herstellung von Antikörperfragmenten im Gramm-Maßstab etabliert werden. In früheren Arbeiten wurde am Institut für Technische Biochemie bereits *E. coli* in Verbindung mit dem Vektor pASK85 (Bandtlow *et al.*, 1996) zur Herstellung von Fab-Fragmenten eingesetzt. Da hiermit jedoch auch nach umfassender Optimierung in Form einer

¹ EnviroSense ENV4-CT96-0333

² Prof. Turner, Cranfield Biotechnology Centre, Cranfield, Bedford, MK43 0AL, England
Prof. B. Hock, Technische Universität München-Weihenstephan, 85350 Freising, Deutschland
Prof. Barcelo, Centro Superior d'Investigacion Cientifica, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spanien
Prof. R. D. Schmid, ITB, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Deutschland
Bookham Technology Ltd., Chilton, Oxfordshire, OX11 0QX, England

fed-batch Hochzelldichtefermentation zur Vermeidung des Crabtree-Effekts (Minimierung der Acetatbildung) nur ca. 3 – 5 mg Fab-Fragmente pro Liter gewonnen und durch immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnten (Ziegler *et al.*, 1997), sollte nun *Pichia pastoris* zur sekretorischen Expression der Fab Fragmente eingesetzt werden.

Des weiteren sollte ein System zum *Screening* und zur Selektion von Varianten, die z. B. mit evolutiven Methoden hergestellt werden, etabliert werden. Letzteres sollte aufgrund einer Übereinkunft am Institut, mit der Einschränkung erfolgen, zur Vermeidung von Kontaminationen mit Phagen auf deren Verwendung und damit auch auf die weit verbreitete *Phage-Display*-Technologie zu verzichten.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Sämtliche Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Sigma, Fluka, Merck, Roth und Riedel de Haen bezogen. Desweiteren wurden die folgenden Biochemikalien und molekularbiologischen Kits verwendet:

Tabelle 2: Biochemikalien

| Biochemikalie / Kit * | Hersteller |
|---|--|
| Anti-Maus IgG FITC Konjugat | Sigma-Aldrich Chemicals, # F6257 |
| BCA™ Protein Assay Kit | Pierce, #23225 |
| DNA-Längenstandard 1kb-Leiter | Gibco Invitrogen Co. #15615-024 |
| Kaninchen-anti-Maus IgG (pAk) | Sigma-Aldrich Chemicals, #M-7023 |
| Monoklonaler Anti-polyHistidin Ak (IgG2a) | Sigma-Aldrich Chemicals #H-1029 |
| PD-10 Sephadex™ G-25 M Säulen | Amersham Pharmacia Biotech, #17-0851-01 |
| Pfu DNA Polymerase | Stratagene, #600159 |
| Pfu Turbo® Polymerase | Stratagene, #600252 |
| PYD1 Yeast Display Vector Kit | Invitrogen, #V835-01 |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, #28706 |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, #27104 |
| QIAGEN Plasmid Midi Kit | Qiagen, #12145 |
| QuikChange site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene, #200518 |
| Schaf-anti-Maus-Ig-POD | Boehringer Mannheim Biochemica, #1317377 |
| TALON® Metal Affinity Resin | Clontech, #8901-2 |
| TALON® Superflow Resin | Clontech, #8908-1 |

* Nicht aufgeführte Biochemikalien und DNA-modifizierende Enzyme wurden von New England Biolabs, MBI Fermentas, Gibco Invitrogen Co. und Boehringer Mannheim (heute Roche) bezogen.

6.1.2 Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Mikroorganismen sowie die in Tabelle 4 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Plasmide als Ausgangsmaterial für Klonierungsarbeiten verwendet. Oligonukleotide, die als *Primer* für PCR Reaktionen oder Sequenzierungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Bakterien und Hefen

| Organismus | relevanter Genotyp / Phänotyp | Referenz |
|---|---|---------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5 α | F Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁻) <i>supE44 thi-1</i> λ ⁻ <i>gyrA96 relA1?</i> Δ (<i>lacZya-argF</i>)U169 | DSMZ #6897 =CCRC 51731 |
| <i>Epicurian coli</i> [®] XL1 Blue Supercompetent cells | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac [F' proAB lacI^f ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i> | Stratagene, #200236 |
| <i>P. pastoris</i> GS115 | <i>his 4 Mut</i> ⁺ | Invitrogen, #C181-00 |
| <i>P. pastoris</i> X33 | <i>Wildtyp</i> | Invitrogen, #C180-00 |
| <i>S. cerevisiae</i> EBY100 = BJ5465/pIU211 | MATa <i>ura 3-52 trp 1 leu2Δ1 <i>his3</i>Δ200 <i>pep4:HIS3</i> <i>prb1</i>Δ1.6R <i>can1 GAL</i></i> | Invitrogen, #C839-00 |

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Referenz / Herkunft |
|------------------|---------------------------------|
| pASK85 | (Bandtlow <i>et al.</i> , 1996) |
| pASK-Fab24D | (Kusharyoto, 2001). |
| pASK-Fab-K411B | (Ziegler <i>et al.</i> , 1997) |
| pEGFP-His | (Enzelberger, 1999) |
| pET-scFv-EGFP | (Oelschlaeger und Srikant-Iyer) |
| pGAPZ α A | Invitrogen, #V205-20 |
| pPICZ α A | Invitrogen, #V195-20 |
| pYD1 | Invitrogen, #V835-01 |

Tabelle 5: Als PCR- oder Sequenzierprimer verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Nukleotidsequenzen* | Bemerkungen |
|--------------------|---|----------------------------|
| Fab-1 | 5'-gaaaagagaggctgaagctgacatcgagctcaccagtc-3' | |
| Fab-2 | 5'-ccgccggaattctcactaacactcattcct-3' | <i>Eco</i> RI |
| Fab-3 | 5'-acaactaattattcgaacgatgagattcc-3' | <i>Sfu</i> I |
| Fab-4 | 5'-agcttcagcctctctttctcgagagataccc-3' | |
| Fab-5 | 5'-gaaaagagaggctgaagctgaagttaaactgcagcagtc-3' | |
| Fab-6 | 5'-ccgccggaattcttattaatggatgatgg-3' | <i>Eco</i> RI |
| Fab-7 = H2 | 5'-gtttcaagagatgattcc-3' | |
| Fab-8 = H4R | 5'-tttggctagaagccgg-3' | |
| Fab-9 = L2 | 5'-aggacagacttcaccctcac-3' | |
| Fab-10 = L4R | 5'-ggtatagctgttatgctg-3' | |
| Fab-11 = H3 | 5'-ttccctgagccagtgacag-3' | |
| Fab-12 = H5R | 5'-tgccttgccccagtaag-3' | |
| Fab-13 = L3 | 5'-gaagattgatggcagtgaaacg-3' | |
| Fab-14 = L5R | 5'-cggagctgatttactttgc-3' | |
| 5Alpha | 5'-tactattgccagcattgctgct-3' | |
| 3AOX | 5'ggcaaatggcattctgacatcct-3' | |
| Mut-L-ΔBam942 | 5'-ccaacctagaaactggcatccctgccaggttc-3' | Δ <i>Bam</i> HI |
| Mut-L-ΔBam942-i | 5'-gaacctggcagggatgccagttctaggttg-3' | Δ <i>Bam</i> HI |
| Mut-H-ΔBam807 | 5'-ggtgcaacctggaggtccatgaaactctc-3' | Δ <i>Bam</i> HI |
| Mut-H-ΔBam807-i | 5'-gagagttcatggaacctccaggtgcacc-3' | Δ <i>Bam</i> HI |
| Mut-H-ΔBam1252 | 5'-gacctggaactctggttccctgtccagcgg-3' | Δ <i>Bam</i> HI |
| Mut-H-ΔBam1252-i | 5'-caccgctggacagggaaaccagagttccaggtc-3' | Δ <i>Bam</i> HI |
| Mut-Pic-ΔPmeI | 5'-ccaaaactgacagtttagacgctgtcttgaacc-3' | Δ <i>Pme</i> I |
| Mut-Pic-ΔPmeI-i | 5'-ggtccaagacagcgtctaaactgtcagtttg-3' | Δ <i>Pme</i> I |
| Mut-Gap-ΔBspHI | 5'-cgggcccgcagcagctgttgagattattggaaacc-3' | Δ <i>Bsp</i> HI |
| Mut-Gap-ΔBspHI-i | 5'-ggtttccaataatctcaagacatgctccgccc-3' | Δ <i>Bsp</i> HI |
| Mut-Pic-ΔSac204-i | 5'-gaaggaattggaatgagcaggtccaatcaagccaataactgg-3' | Δ <i>Sac</i> I |
| Mut-Pic-ΔSac204 | 5'-ccagttattgggcttgattggaactcgtcattccaattcctc-3' | Δ <i>Sac</i> I |
| Mut-Pic-ΔXho1184 | 5'-ctaaagaagaaggggtatctcttgagaaaagagaggctgaagc-3' | Δ <i>Xho</i> I |
| Mut-Pic-Δxho1184-i | 5'-gcttcagcctctctttctcaagagataccccttctttag-3' | Δ <i>Xho</i> I |
| Mut-Pic-Δxho1909 | 5'-gccggcctcctcgatcgttaccttgagccgcccggccag-3' | Δ <i>Xho</i> I |
| Mut-Pic-Δxho1909-i | 5'-ctggcggcccgcggctcaaggtaccgatccgagacggcccgc-3' | Δ <i>Xho</i> I |
| ScFv-1f | 5'-gactgaattcaggtgaaactgcagcag-3' | <i>Eco</i> RI |
| ScFv-2r | 5'-gtatgcccgcctctagaccgttgattccagctt-3' | <i>Not</i> I, <i>Xba</i> I |
| scFv-Cys1-R | 5'-ggctctagatcaacaatggtgatgatggtgatgccgttgattccagcttgg-3' | <i>Xba</i> I, Cys |
| scFv-Cys2-R | 5'-ggctctagatcaatggtgatgatggtgatgaccgttgattccagcttgg-3' | <i>Xba</i> I, Cys |


```

      .                100 a b                .                110
      CDR H3
Y C T R H S Y R Y D G F A Y W G Q G T T V T V S
tattgtaccaggcacagctataggtacgacgggtttgcttactggggccaaggcaccacggtcaccgtctcc

S A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V
tcagcaaagaccactcctccgctctgtttaccctctggctcctggttctgcggtcagactaactctatgggtg

T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S G S L S
actctgggatgcctgggtcaagggctatctccctgagccagtgacagtgacctggaactctggatccctgtcc

S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V P
agcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcaatctgacctctacactctgagcagctcagtgactgtcccc

S S T W P S E T V T C N V A H P A S S T K V D K
tccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacggtgccaccggcttctagcaccaaagttgacaag

K I V P R D C H H H H H H
aaaatcgtaccgcgcgactgccatcaccaccatcaccat
    
```

Leichte Kette:

```

      .                10                .                20
      D I E L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R
      gacatcgagctcactcagttctccagcttctttggctgtgtctctagggcagagggccaccatctcctgcaga

      .      a b c d      30                .                40
      CDR L1
A S E S V D I Y G N S F M H W Y Q Q K P G Q P P
      gccagtgaaagtggtgatatttatggcaatagtttatgcactgggtaccagcagaaaaccaggacagccaccc

      .                50                .                60                .
      K L L I Y R A S N L E T G I P A R F S G S G S R
      aaactcctcatctatcgtgcatccaacctagaaaactgggatccctgccaggttcagtggcagtggtctagg

      70                .                80                .                90
      T D F T L T I N P V E A D D V A T Y F C Q Q S K
      acagacttcaccctcaccattaatcctgtggaggctgatgatggttgcaacctatttctgtcagcaaaagtaaa

      .                100                .
      CDR L3
S A P Y T F G G G T K L E I K R R A D A A P T V
      tcagctccgtacacggttcggagggggcaccaagctggaaatcaaacggcgcgctgatgctgcaccgactgta

S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F
tccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttc

Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L N S W
taccctaaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgctcctgaacagttgg

T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y E
actgatcaggacagcaaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacggttgaccaaggacgagtatgaa

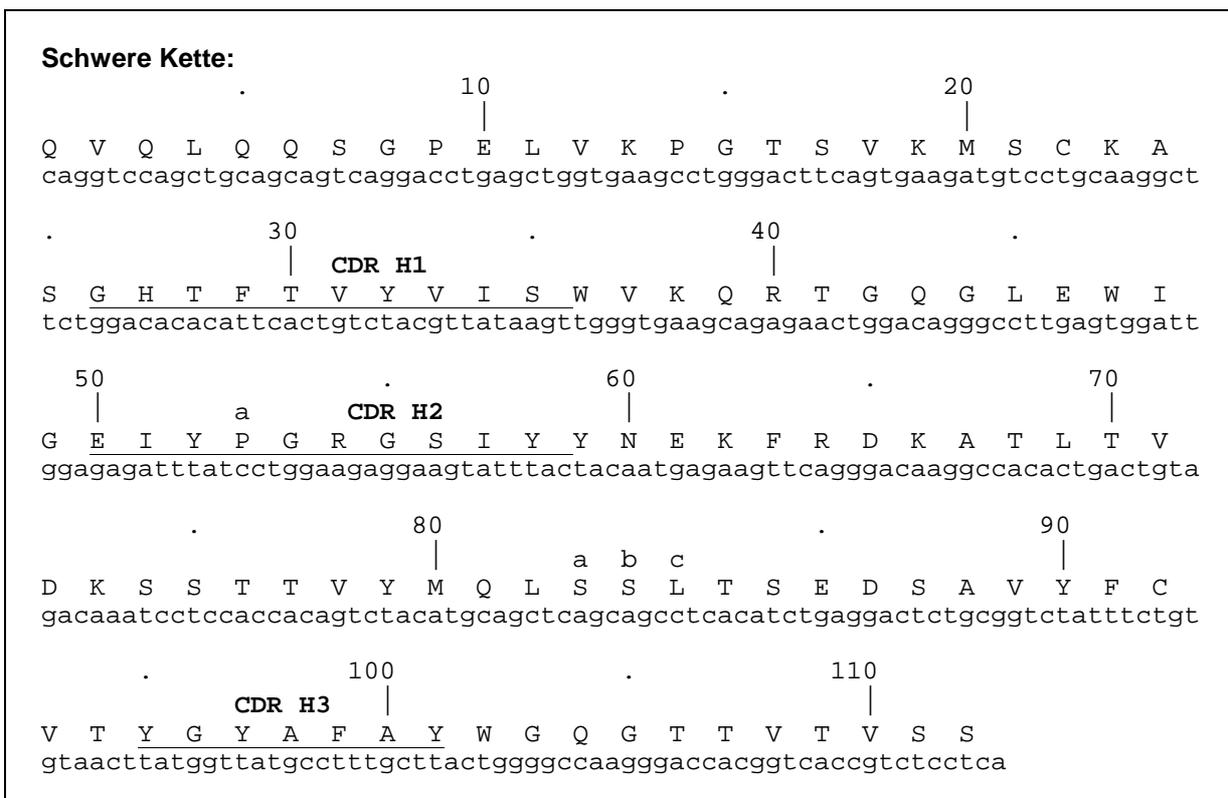
R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R
cgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccattgtcaagagcttcaacagg
    
```

N E C
aatgagtgt

Abbildung 6: Aminosäure- und DNA-Sequenzen des Fabs K411B. Die Numerierung der variablen Domänen (fett gedruckt) erfolgte gemäß (Kabat *et al.*, 1991). Die konstanten Domänen sind normal gedruckt. Die Sequenz des C-terminalen (His)₆-Tags der schweren Kette ist kursiv dargestellt, die CDRs sind unterstrichen.

6.1.3.2 Die 2,4-D- spezifischen Antikörperfragmente Fab24D und scFv24D

Das in dieser Arbeit ebenfalls verwendete 2,4-D spezifische Fab wurde ursprünglich aus dem mAk der Zelllinie E2/B5 abgeleitet. Diese Zelllinie wurde durch Immunisierung einer Maus mit dem über eine Peptidbindung an das Trägerprotein BSA gekoppelte Hapten 2,4-D erhalten. Der von dieser Zelllinie gebildete mAk entspricht der Isotyp-Subklasse IgG1/kappa (Franek *et al.*, 1994). Die Gensequenzen des Fab24D (Abbildung 7) setzen sich aus den variablen Domänen des monoklonalen Antikörpers und den konstanten Domänen aus pASK85 zusammen (Kusharyoto, 2001).



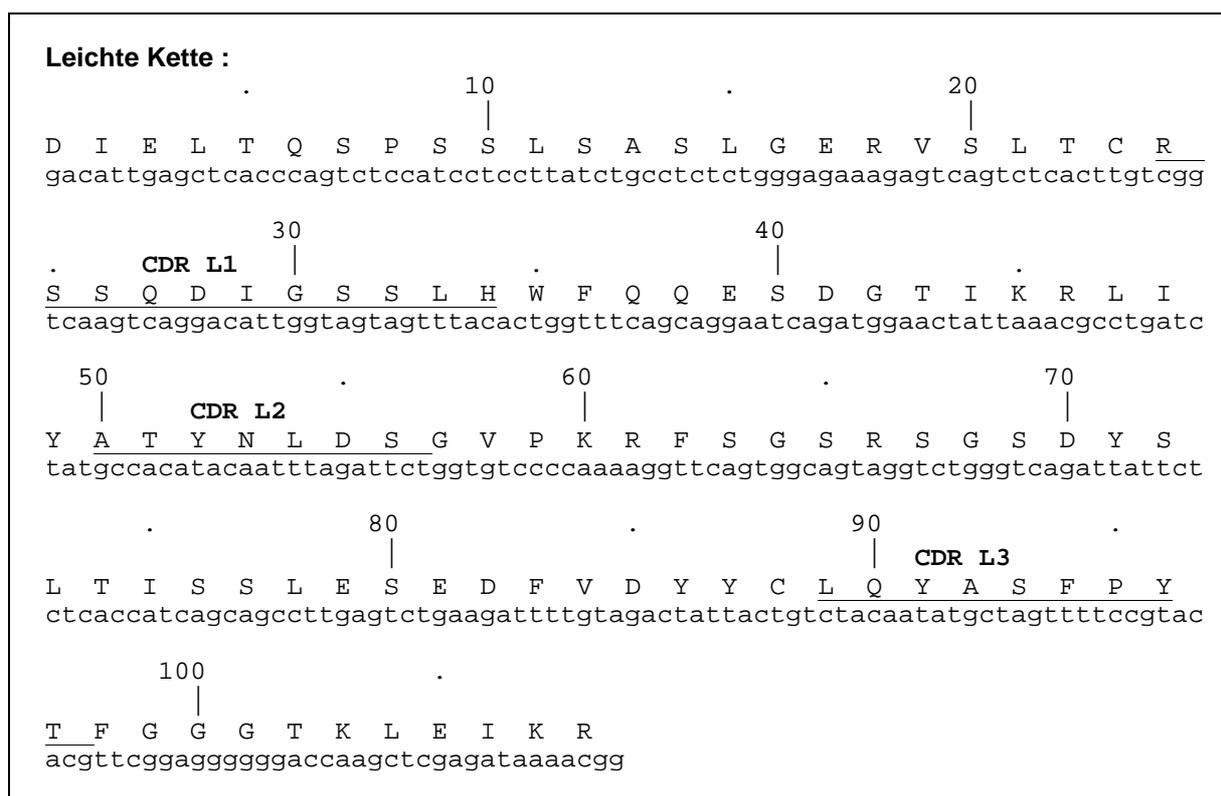


Abbildung 7: Aminosäure- und DNA-Sequenz der variablen Domänen des 2,4-D spezifischen Fab Fragmentes der Zelllinie E2/B5. Die Numerierung erfolgte gemäß (Kabat *et al.*, 1991). Die CDRs sind unterstrichen. Die Sequenzen der konstanten Domänen entsprechen denen des Fabs K411B (Abbildung 6).

6.1.4 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Tabelle 6: Geräte und Meßeinrichtungen

| Verwendete Geräte | Typbezeichnung | Hersteller-Firma |
|---------------------------------------|---|--|
| Agarose-Gelelektrophorese-Apparaturen | DNA Sub Cell™, Mini Sub™ DNA Cell, Mini Sub™ Cell GT Video Copy Processor P66E BWM 9X Monitor UV-Leuchttisch | BioRad Mitsubishi Javelin Electronics MWG-Biotech |
| Bioreaktoren | Labfors | Infors AG |
| DNA-Sequenzierer | 373A DNA Sequencer ABI Prism™ 377 DNA-Sequencer | Perkin Elmer Perkin Elmer |
| Durchflußcytometer | FACStar-Plus™ | Becton Dickinson |
| Fluorimeter | FluoStar | BMG LabTechnologies |
| Elektroporation | Gene Pulser®, Pulse Controller | BioRad |
| Heizrührer | RCT Basic | IKA Labortechnik |

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| Inkubatoren | Brutschränke HT-Schüttelinkubatoren UM 500 HS501 digital | WTC Binder Infors AG Memmert IKA Labortechnik |
| Kühler | K20 | Haake |
| Mikroskope | Axiolab E Axioskop LSM | Zeiss Zeiss Leica |
| Mikrotiterplatten-Waschautomat | Titertek Microplate Washer M96V Titertek Microplate Stacker | ICN |
| Mikrowellengerät | Micro-Chef FM A935 | Moulinex |
| Netzgeräte | Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply | BioRad |
| Objektive | Achroplan 10x/0,25, 40x/0,65, Wasser Immersion100x/1,0 | Zeiss |
| PAGE | Minigel-Twin G42 Model 583 Gel Dryer Phast System | Biometra® BioRad Pharmacia Biotech |
| PCR-Geräte | DNA Thermocycler Robocycle® Gradient 40 Mastercycler gradient | Perkin Elmer Stratagene® Eppendorf |
| pH-Meter | Digital pH Meter pH525 | WTW |
| Photometer | UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 3000) | Pharmacia Biotech |
| Protein Blotting Apparatur | Trans Blot SD | BioRad |
| Retsch-Mühle | MM 2000 | Retsch |
| Thermomixer | Thermomixer 5436 | Eppendorf |
| Ultraschallgeräte | Sonifier 250 Sonorex Super RK 514 H | Branson Bandelin |
| „Vortexer“ | Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Waagen | Basic, MC1 Research RC 210 D Precision Advanced | Sartorius OHAUS® |
| Wasserbad | B3 | Haake |

| | | |
|-------------|--|---|
| Zentrifugen | Eppendorf Centrifuge 5417 C Eppendorf Centrifuge 5415 R Eppendorf Centrifuge 5810 Universal 30 F KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155 mm) G412 Sorvall RC – 5B (Rotor: SA 600) | Eppendorf Eppendorf Eppendorf Hettich Jouan Jouan Du Pont Instruments |
|-------------|--|---|

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Typ | Hersteller / Bezugsquelle |
|--------------------------|--|--|
| Celluloseacetatfilter | Porengröße 0,2 µm | Sartorius, #11107-47 |
| Eppendorfreaktionsgefäße | Safe-lock tubes 0,5 ml Safe-lock tubes 1,5 ml Safe-lock tubes 2,0 ml | Eppendorf, #0030 121.023 Eppendorf, #0030 120.086 Eppendorf, #0030 120.094 |
| Einmal-Küvetten | 1,5 ml halbmicro | Neolab, #10006250 |
| Mikrotiterplatten | F96 zertifiziert, Maxisorp Multiscreen 96 well Platten | Nunc, #439454 Millipore, #MAHV N45 |
| Polypropylenröhrchen | 15 ml, steril 50 ml, steril | Greiner, #188.271 Greiner, #210.261 |

Tabelle 8: Software

| Software | Hersteller / Bezugsquelle |
|--------------------|--|
| Chem Window 5.1 | Bio-Rad Laboratories |
| Clone Manager 5.02 | Scientific & Educational Software |
| MS-Office 2000 | Microsoft |
| Scion-Image | Microsoft Windows kompatible Version der Bildauswertungssoftware NIH-Image (http://www.scion.com) |

6.1.5 Medien, Lösungen und Puffer

6.1.5.1 Vorbemerkungen

- Sämtliche Medien, Lösungen und Puffer wurden mit Wasser angesetzt, das zunächst in einer Deionisationsanlage der Haustechnik und anschließend in einer Deionisationsanlage (Modulab BioScience Research Grade UF / Polishing System) des Labors deionisiert wurde. Die Sterilisierung erfolgte durch 20 minütiges Autoklavieren bei 121°C oder durch Sterilfiltration (0,22 µm Sterilfilter, Millipore).
- Im Folgenden sind nur allgemein verwendete Lösungen aufgeführt. Alle weiteren Lösungen, Medien und Puffer sind ihrer Verwendung entsprechend bei den jeweiligen Methoden aufgeführt. Lösungen, die nur aus einer Komponente bestehen werden nicht extra aufgeführt.
- Die Herstellung fester Kultivierungsmedien (Agarplatten) erfolgte, soweit nicht anders angegeben, durch Zugabe von 15 g l⁻¹ (*E. coli*) bzw. 20 g l⁻¹ (Hefen) Agar.

6.1.6 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

6.1.6.1 1x TE-Puffer:

| | |
|------------------|-------|
| Tris-HCl; pH 7,5 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

6.1.6.2 10xPBS-Puffer (= 80 mM)

| | |
|---|-------------------------|
| NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O | 1,265 g l ⁻¹ |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 12,1 g l ⁻¹ |
| NaCl | 8,5 g l ⁻¹ |
| pH 7,2 mit 1M HCl | |

6.2 Mikrobiologische Methoden

6.2.1 Stammhaltung und Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen

Die verschiedenen Stämme von *E. coli*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* wurden zur kurzfristigen Lagerung auf Agarplatten ausgestrichen und bei 10°C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerolstocks von Übernachtskulturen angelegt (*E. coli*: 15% (V/V) Glycerin, 85% (V/V) ÜN-Kultur; Hefen: 50% (V/V) Glycerin und 50% (V/V) ÜN-Kultur) und bei -70°C gelagert.

Zur Anzucht von Übernacht-Kulturen werden je 4 - 10 ml Medium (*E. coli*: LB Medium; Hefe: YPD Medium) in sterilen Reagenzgläsern mittels steriler Zahnstocher von Einzelkolonien auf Agarplatten oder von Glycerolkulturen angeimpft und bei 200 Upm im Schüttelinkubator bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (Hefen) inkubiert.

6.2.1.1 LB Medium

| | |
|---------------|----------------------|
| Bacto-Trypton | 10 g l ⁻¹ |
| Hefe-Extrakt | 5 g l ⁻¹ |
| NaCl | 5 g l ⁻¹ |
| pH 7,0 | mit NaOH |

6.2.1.2 YPD Medium

| | |
|--------------|----------------------|
| Hefe-Extrakt | 10 g l ⁻¹ |
| Bacto Pepton | 20 g l ⁻¹ |
| D-Glucose | 20 g l ⁻¹ |

6.2.1.3 Verwendete Antibiotika

Die folgenden Antibiotika wurden eingesetzt zur Positivselektion von Mikroorganismen mit Resistenz vermittelnden Genen:

Tabelle 9: Verwendete Antibiotika

| Antibiotikum | Konzentration der Stammlösung | Arbeitskonzentration |
|---|--|---|
| Zeocin = Bleomycin-Derivat von Invitrogen # R250-05 | 100 mg ml ⁻¹ H ₂ O | 25 µg ml ⁻¹ (<i>E. coli</i>) 100 µg ml ⁻¹ (<i>P. pastoris</i>) |
| Ampicillin (Natrium-Salz) Roth #K029,2 | 100 mg ml ⁻¹ | 100 µg ml ⁻¹ |
| Nalidixinsäure (Natrium-Salz) Sigma #N4382 | 20 mg ml ⁻¹ in 0,1N NaOH | 50 µg ml ⁻¹ |

6.2.2 Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und deren Transformation werden 50 ml LB-Medium mit 0,5 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und 2 - 3 Stunden bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 - 0,7 inkubiert. Die Zellen werden dann durch Zentrifugation (3000 x g, 5 min, 4°C) geerntet, in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert.

Zur Transformation werden 200 µl dieser kompetenten TSS-Zellen mit 1 – 10 ng der zu transformierenden DNA gemischt und für 20 – 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 – 45 s bei 42°C im Wasserbad) und anschließender Zugabe von 800 µl LB-Medium werden die transformierten Zellen 1 h bei 37°C inkubiert und auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

6.2.2.1 TSS-Lösung (transformation storage solution)

| | |
|-------------------|------------|
| PEG 6000 | 10 % (V/V) |
| DMSO | 5 % (V/V) |
| MgSO ₄ | 50 mM |
| LB-Medium | ad 100 ml |

6.2.3 Transformation von *P. pastoris*

Zur Herstellung kompetenter *Pichia* Zellen werden 100 ml frisches YPD-Medium mit 0,1 - 0,5 ml einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3 - 1,5 inkubiert (30°C, 200 Upm). Nun werden die Zellen aus 85 ml der Kultur abzentrifugiert (10 min, 1500 x g, 4°C) und mehrfach wie folgt gewaschen: Das Zellpellet wird in 100 ml eiskaltem H₂O resuspendiert, erneut zentrifugiert (5 min, 4°C, 3500 Upm) und in 50 ml frischem H₂O (4°C) resuspendiert. Nach Resuspension der erneut pelletierten Zellen in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol und Zentrifugation (5 min, 4°C, 1500 x g) wird das Zellpellet schließlich in 250 µl Sorbitol (1 M) aufgenommen und bis zur Transformation am selben Tag auf Eis gestellt.

Zur Transformation durch Elektroporation werden nun 100 µl der resuspendierten Zellen mit 5 - 10 µg der zu transformierenden, durch Restriktionsverdauung linearisierten DNA (in 10 - 15 µl H₂O) gemischt und in eine mittels UV-Licht sterilisierte Elektroporationsküvette überführt, 5 min auf Eis inkubiert und dann bei 1500 V, 25 µF und 200 Ω elektroporiert. Anschließend wird die Küvette mit eiskalter, 1 M Sorbitollösung aufgefüllt, gemischt und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Tube überführt, das ohne zu Schütteln 60 min bei 30°C inkubiert wird. Danach werden jeweils 50 - 200 µl der Zellsuspension auf eine YPDS-Agarplatte mit Zeocin ausplattiert und 48 – 96 h bei 30°C inkubiert.

6.2.3.1 YPDS Transformationsmedium

Wie YPD (6.2.1.2), jedoch zusätzlich mit 1M Sorbitol.

6.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *S. cerevisiae* ausschließlich mit dem Expressionsvektor pYD1 (Tabelle 4) und Derivaten davon transformiert. Dies erfolgte mit dem im pYD1 *Yeast Display Vector Kit* an gegebenen Protokoll:

Es werden 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie *S. cerevisiae* angeimpft und ÜN bei 30°C und 200 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur in 50 ml YPD zu einer OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und weitere zwei bis vier Stunden bei 30°C und 200 Upm inkubiert. Nun werden die Zellen durch Zentrifugation (1500 x g, 5 min, 4°C) geerntet und das Pellet in 40 ml TE resuspendiert. Erneut werden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml 1xLiAc/0,5xTE resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Je Transformationsansatz werden nun 1 µg zu transformierende Plasmid-DNA und 100 µg denaturierte Heringssperma-DNA mit 100 µl der Zellsuspension gemischt. Nach Zugabe von 700 µl 1xLiAc/40% PEG-3350/1xTE und guter Durchmischung wird der Ansatz 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend werden 88 µl DMSO zugegeben, gemischt und 7 min bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Der Ansatz wird nun 10 s zentrifugiert, der entstehende Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 50 – 100 µl TE-Puffer resuspendiert und auf eine Selektivagarplatte ausplattiert.

6.2.4.1 1xLiAc/0,5xTE

| | |
|----------------------|--------|
| Lithiumacetat pH 7,5 | 100 mM |
| Tris-HCl pH 7,5 | 5 mM |
| EDTA | 0,5 mM |

6.2.4.2 1xLiAc/40%PEG-3350/1xTE

| | |
|----------------------|------------|
| Lithiumacetat pH 7,5 | 100 mM |
| PEG-3350 | 40 % (V/V) |
| Tris-HCl pH 7,5 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

6.2.4.3 Minimal-Dextrose-Agar

| | |
|----------------------------------|--------------|
| <i>Yeast nitrogen base</i> (YNB) | 0,67 % (M/V) |
| Glucose | 2 % (M/V) |
| Leucin (optional) | 0,01 % (M/V) |
| Tryptophan (optional) | 0,01 % (M/V) |
| Agar | 1,5 % (M/V) |

6.2.5 Zellaufschluß von *P. pastoris*

Der Aufschluß von *P. pastoris* erfolgte mechanisch unter Verwendung der Retschmühle (Schütte und Kula, 1988). Zunächst werden die Zellen aus 1 ml Kultur abzentrifugiert (2 min, 21500 x g, RT), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1,0 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Glasperlen (Durchmesser 0,75 - 1 mm) wird das Reaktionsgefäß (RG) in den Vibrationsarm der Retschmühle eingespannt und die Vibrationsbewegung mit einer Frequenz von 1800 min⁻¹ und einer Amplitude von 100 gestartet. Nach 30 min werden die Glasperlen und die Zellbruchstücke abzentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen sowie der DNA in ein frisches RG überführt.

6.2.6 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

E. coli wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung von rekombinantem EGFP-(His)₆ eingesetzt. Hierzu wird der Stamm DH5α mit dem Vektor pEGFP-His, der das EGFP-(His)₆-Fusionsgen unter Kontrolle des Lac-Promotors enthält, transformiert. Von einer Übernachtskultur der Transformanten werden 50 ml LB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben 1:100 angeimpft und bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Mit Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0,8 wird die Expression des EGFP-(His)₆ durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 3 bis 4 Stunden inkubiert und durch Zentrifugation (3000 x g, 10 min, 4°C) geerntet. Das im Fall der EGFP-Expression stark grün gefärbte Zellpellet wird bis zum Zellaufschluß bei -20°C gelagert.

6.2.7 Zellaufschluß von *E. coli*

Zum Zellaufschluß wird das Zellpellet aus 50 ml Kultur in 5 ml Aufschlußpuffer resuspendiert und 30 Minuten bei RT inkubiert (Aufschluß durch Lysozym im Puffer). Anschließend wird der Ansatz dreimal jeweils 2 – 3 Minuten durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen, wobei die Lösung stets auf Eis gelagert wird. Danach wird die Lösung in Reaktionsgefäße überführt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (21500 x g, 4°C) entfernt. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird bis zur Weiterverwendung bei 4°C oder -20°C gelagert.

6.2.7.1 Aufschlußpuffer

| | |
|----------------------------|-----------------------|
| Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0 | 50 mM |
| NaCl | 400 mM |
| Lysozym | 1 mg ml ⁻¹ |

6.2.8 Expression rekombinanter Proteine in *P. pastoris*

6.2.8.1 Expression in Schüttelkolbenkulturen

Vor der Expressionskultivierung wurde der Mut-Phänotyp der Expressionsstämme durch paralleles Ausplattieren auf YPD- und YPM Agarplatten bestimmt: Stämme, die beide Kohlenstoff-Quellen, Glucose und Methanol verwerten und somit auf beiden Medien gut anwachsen, gehören dem Mut⁺-Phänotyp an; Stämme, die nur auf YPD-Medium anwachsen dem Mut^s-Phänotyp.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsversuche erfolgten weitgehend mit Stämmen, bei denen das heterologe Gen unter Kontrolle des methanolinduzierbaren Promotors der Alkoholoxidase 1 (AOX1) steht. Da dieser durch Glucose reprimiert wird, werden die rekombinanten Stämme zunächst von einer Einzelkolonie bzw. vom Glycerolstock in 10 – 20 ml BMGY in Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30°C und 200 Upm kultiviert, bis sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befindet ($OD_{600} > 5$). Zur Induktion der Expression werden die Zellen von Stämmen, die nach Transformation noch die Alkoholoxidase 1 enthalten, also dem Phänotyp Mut⁺ angehören, abzentrifugiert und zu einer O_{600} von 0,5 – 1,0 in BMMY resuspendiert. Die Weiterkultivierung erfolgt dann bei einer für das zu exprimierende Protein optimalen Temperatur zwischen 20 und 30°C und 200 Upm für drei bis fünf Tage. Als C-Quelle sowie zur Aufrechterhaltung der Induktion werden täglich 0,5% (V/V) Methanol zugegeben. Stämme, die dem Phänotyp Mut^s angehören und somit nur schlecht auf Methanol als einziger C-Quelle wachsen, werden dagegen in BMGY kultiviert bis eine hohe Zelldichte von $OD_{600} > 40$ erreicht ist und erst dann zur Induktion in BMMY aufgenommen und weiterkultiviert wie für Mut⁺-Stämme beschrieben.

Stämme, die ein heterologes Gen unter dem konstitutiven GAPDH-Promotor exprimieren, werden im Gegensatz zu den bisher beschriebenen in YPD kultiviert. Aufgrund des konstitutiven Promotors ist keine Induktion durch Methanolzugabe und damit auch kein Medienwechsel erforderlich.

Bei allen Expressionsexperimenten werden täglich Proben genommen, um das Wachstumsverhalten durch Messung der optischen Dichte sowie der Biofeucht- und/oder Biotrockenmasse zu kontrollieren und den Zeitpunkt der optimalen Expression zu bestimmen.

6.2.8.1.1 YPM Medium (Agarplatten)

Wie YPD, jedoch ohne Glucose. Vor dem Ausplattieren werden 100 µl Methanol auf dem Agar ausgestrichen.

6.2.8.2 Expression durch Fermentation im Bioreaktor

Die Expression rekombinanter Proteine im größeren Maßstab erfolgte durch *fed-batch*-Fermentationen der rekombinanten *Pichia*-Stämme in einem Fünfliter-Bioreaktor (Labfors) der Firma Infors, wobei Rührerdrehzahl, Temperatur, pH und gelöster Sauerstoff online gemessen wurden und Fütterungsrate, Belüftungsrate sowie die Säure/Base-Titration Rechner-gesteuert erfolgten.

Es wird zunächst eine Vorkultur hergestellt, indem 100 ml BMGY mit 2 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 200 Upm und 30°C inkubiert werden. Mit den Zellen der Vorkultur, die durch Zentrifugation geerntet und in BMMY resuspendiert werden, werden dann 4,9 Liter Medium im Bioreaktor zu einer Zelldichte von $OD_{600} \sim 0,5-1,0$ angeimpft. Die eigentliche Fermentation beginnt mit einer *batch*-Phase, während der die anfangs zugegebenen 0,5% (V/V) Methanol verbraucht werden. Dies wird durch Bestimmung der gelösten Sauerstoffkonzentration *online* gemessen, welche während der Oxidation einer C-Quelle abnimmt und nach Verbrauch der C-Quelle wieder sprunghaft zunimmt. Nach Verbrauch des anfänglich zugegebenen Methanols wird die *fed-batch*-Phase durch quasi-kontinuierliche Zugabe von Fütterungsmedium (40 % (V/V) Methanol, 1% (M/V) Hefeextrakt und 2% (M/V) Pepton) gestartet. Hierbei wird die Konzentration des gelösten Sauerstoffs durch Rechner-gesteuerte Fütterung zwischen 20 und 30% der Sättigungskonzentration gehalten. Abhängig vom Sauerstoffverbrauch der wachsenden Kultur führt dies zu einer Zunahme der Fütterungsrate von anfänglich $\sim 2,7 \text{ ml h}^{-1}$ auf bis zu $22,5 \text{ ml h}^{-1}$. Nach 96 –120 h Induktion wird die Fermentation beendet und der Kulturüberstand durch Zentrifugation der Zellen (3000-5000 x g, 20 min, 4°C) gewonnen.

6.2.8.3 BMGY Kultivierungsmedium

| | |
|------------------------------|----------------------|
| Hefe-Extrakt | 10 g l ⁻¹ |
| Bacto Pepton | 20 g l ⁻¹ |
| Kalium-Phosphatpuffer pH 6,0 | 100 mM |
| Glycerol | 1 % (V/V) |

6.2.8.4 BMMY Kultivierungsmedium

Wie BMGY, jedoch statt Glycerol mit 0,5 % (V/V) Methanol.

6.2.9 Expression rekombinanter Proteine in *S. cerevisiae*

Heterologe Expressionsexperimente in *S. cerevisiae* erfolgten ausschließlich mit Materialien des „pYD1 Yeast Display Vector Kits“ von Invitrogen, also dem Stamm EBY100 und dem Oberflächenexpressionsvektor pYD1: Zunächst werden 10 ml YNB-CAA-Glucose Medium mit einer Einzelkolonie eines rekombinanten Stammes in einem 50 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30°C und 200 Upm ÜN inkubiert. Sobald die Kultur am nächsten Tag eine OD₆₀₀ von 2 – 5 erreicht hat, werden die Zellen 5 min bei 3000 – 5000 x g abzentrifugiert. Zur Induktion wird das Zellpellet nun in YNB-CAA-Galactose Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 1 resuspendiert und bei 20°C und 200 Upm inkubiert. Zur Kontrolle der Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion werden regelmäßig Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und als Pellet bei 4°C bis zur Analyse gelagert. Hierbei ist darauf zu achten, daß alle Proben jeweils dieselbe Anzahl an Zellen enthalten, was durch sogenannte 1OD-Äquivalente (= 1 ml Probe mit OD₆₀₀=1, 0,5 ml Probe mit OD₆₀₀=2 u.s.w.) erreicht wird. Als Negativkontrolle wird ein mit dem Vektor pYD1 transformierter Stamm und/oder der nicht transformierte Stamm kultiviert, wobei dann das Medium zusätzlich 100 µg ml⁻¹ Tryptophan enthält.

6.2.9.1 YNB-CAA-Medium

| | |
|---|--------------|
| YNB (ohne Aminosäuren) | 0,67 % (M/V) |
| Casaminosäuren | 0,5 % (M/V) |
| Glucose oder Galactose | 2 % (M/V) |
| Galactosemedium wird zur Induktion der heterologen Expression verwendet, vor Induktion dagegen Glucose. | |

6.2.10 Immunfluoreszenzmarkierung von Hefezellen

Die Fluoreszenzmarkierung von Hefezellen erfolgte mittels Antikörper, die gegen Epitope auf der Oberfläche der Zellen gerichtet sind. Hierzu wurde ebenfalls ein Protokoll aus der Anleitung des „pYD1 Yeast Display Vector Kits“ verwendet:

Zuerst werden die Zellen der entnommenen Proben abzentrifugiert (3000 – 5000 x g, 5 min, 4°C) und in 500 µl 1xPBS resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren werden die Zellen in 250 µl 1xPBS, 1 mg ml⁻¹ BSA und 1 µg Epitop-spezifischem Antikörper (Maus-Anti-polyHistidin IgG) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, wobei zwischendurch mehrfach gemischt wird. Anschließend werden die Zellen wie oben abzentrifugiert, in 1xPBS gewaschen, wieder abzentrifugiert, in 250 µl 1xPBS, 1 mg ml⁻¹ BSA und 1 µg Anti-Maus-IgG-FITC Konjugat resuspendiert und 30 min im

Dunkeln inkubiert. Zum Schluß werden die Zellen 2 mal in 0,5 ml 1xPBS gewaschen und schließlich für weitere Analysen (Fluoreszenzmikroskopie, Fluorimetrie, ...) in 40 µl 1xPBS resuspendiert.

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Durch mehrfaches Aufkochen im Mikrowellengerät wird 1% (M/V) Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst, nach Abkühlen auf ca. 55°C mit 0,5 µg l⁻¹ Ethidiumbromid versetzt und in ein Flachbett mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Das polymerisierte Gel wird mit dem Flachbett in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1x-TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben (1 Volumen DNA + 5 Volumen Auftragspuffer) beladen. Als Längenstandard wird 1kb-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese (Sharp *et al.*, 1973) erfolgt bei max. 120 V bis die Bromphenolblau-Bande das Gel zu ca. $\frac{3}{4}$ durchlaufen hat.

Zur Auswertung und Dokumentation wird das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid auf dem UV-Leuchttisch zur Fluoreszenz angeregt und das Bandenmuster photographiert.

6.3.1.1 50x-TAE-Puffer

| | |
|-------------------|------------------------|
| Tris | 242 g l ⁻¹ |
| Essigsäure | 57,1 g l ⁻¹ |
| EDTA/NaOH, pH 8,0 | 0,5 M |

6.3.1.2 6x-DNA-Auftragspuffer

| | |
|----------------------|-------------|
| Glycerin | 30 % (M/V) |
| Bromphenolblau (BPB) | 0,2 % (M/V) |
| EDTA, pH 7,5 | 25 mM |

6.3.2 Methoden zur Isolation und Reinigung von DNA

6.3.2.1 Ethanol-Fällung

Zu 1 Volumen DNA-Lösung werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) gegeben, die Lösung kurz gemischt und zur Fällung 30 min bei -20°C (alternativ: -70°C) inkubiert. Nach Zentrifugation (21500 x g, 30 min, 4°C) in einer Eppendorf-Zentrifuge wird der Niederschlag je nach Bedarf

ein- oder mehrfach mit 70% (V/V) Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und soweit nicht anders angegeben in 1x-TE-Puffer resuspendiert.

6.3.2.2 Isopropanol-Fällung

Zu 1 Volumen DNA-Lösung werden 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und kurz gemischt. Nach 15 minütiger Fällung bei RT wird die präzipitierte DNA in der Eppendorf-Zentrifuge 15 min bei 21500 x g und RT abzentrifugiert, das Isopropanol verworfen, der Niederschlag mit 70% (V/V) Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und soweit nicht anders angegeben in 1x-TE-Puffer resuspendiert.

6.3.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Bei der Aufreinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion werden gleiche Volumina DNA-Lösung und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, gesättigt in 1xTE) gevortext und 5 min zentrifugiert (21500 x g , 4°C). Die wässrige Phase wird abgenommen und erneut mit demselben Volumen Phenol-Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation wie oben wird die wässrige Phase abgenommen, die DNA gefällt (6.3.2.1) und in 1xTE-Puffer oder H₂O resuspendiert.

6.3.2.4 Plasmid DNA Isolation aus *E. coli* mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit oder dem Plasmid Midi Kit

Für Anwendungen, die besonders reine Plasmid-DNA erfordern (PCR-Reaktionen, Sequenz-Reaktionen, präparative Restriktionsansätze, ...) wird diese Plasmid-Präparationsmethode verwendet, die auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim und Doly, 1979) und der spezifischen Bindung von DNA an Ionenaustauschersäulen beruht. Es werden Zellen aus 2 ml einer ÜN-Kultur durch Zentrifugation (21500 x g, 1 min, 4°C) geerntet und die Plasmidisolierung exakt nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wird das Plasmid Midi Kit verwendet. Eine 50 ml ÜN-Kultur dient als Ausgangsmaterial und wird 10 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Plasmid-Isolation aus dem Zellpellet wird gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

6.3.2.5 Plasmid DNA Isolation aus *E. coli* für Schnelltests

Für Anwendungen, die weder besonders viel noch besonders reine Plasmid-DNA erfordern (z. B. Restriktionsanalysen zur Kontrolle von Plasmiden) wurde diese

Methode verwendet, die ebenfalls auf der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) beruht: Das Zellpellet aus 2 ml ÜN-Kultur wird in 200 µl Flexi-Lösung 1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Flexi-Lösung 2 und vorsichtiges Schütteln lysiert, wobei die Lösung klar werden sollte. Die Zugabe von 200 µl Flexi-Lösung 3 bewirkt unter vorsichtigem Schütteln das Ausflocken der Proteine und der genomischen DNA, die nun abzentrifugiert (5 min, 21500 x g, RT) werden. Die DNA im Überstand wird nach Isopropanol-Fällung (siehe 6.3.2.2) in 20 µl 1x-TE-Puffer resuspendiert.

6.3.2.5.1 Flexi-Lösung 1

| | |
|------------------|-------------------------|
| Tris/HCl; pH 7,5 | 100 mM |
| EDTA | 10 mM |
| RNase I | 400 µg ml ⁻¹ |

6.3.2.5.2 Flexi-Lösung 2

| | |
|------|-------------|
| NaOH | 1 M |
| SDS | 5,3 % (M/V) |

6.3.2.5.3 Flexi-Lösung 3

| | |
|------------------|---------|
| 5 M Kaliumacetat | 60 ml |
| Essigsäure | 11,5 ml |
| H ₂ O | 28,5 ml |

6.3.2.6 Isolation genomischer DNA aus *P. pastoris*

Zunächst werden die Zellen aus 10 ml Kultur durch Zentrifugation (3000 x g, 5 min, 4°C) geerntet und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Nach Zellaufschluß (siehe 6.2.5) wird der Überstand (1 ml) mit 150 µl SDS-TE vorsichtig gemischt und 5 min bei 65°C inkubiert. Nun werden 150 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben, kurz gevortext und nach 30 – 40 minütiger Inkubation auf Eis zentrifugiert (21500 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wird mit 200 µl 3M Natriumacetat, pH 5,2 und 1 ml Isopropanol gemischt, 10 min bei -80°C inkubiert und zentrifugiert. Das Pellet wird ca. 15 min luftgetrocknet, anschließend durch intensives Vortexen in 90 µl H₂O gelöst und nach Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 200 µl Isopropanol zentrifugiert (21500 x g, 15 min, 4°C). Der DNA-Niederschlag wird mit 1 ml 70% (V/V) Ethanol gewaschen, 5 min bei 21500 x g und 4°C zentrifugiert, getrocknet, in 100 µl TE-RNase resuspendiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

6.3.2.6.1 SDS-TE

| | |
|------|-----------|
| SDS | 2 % (M/V) |
| Tris | 100 mM |
| EDTA | 10 mM |

6.3.2.6.2 TE-RNase

| | |
|---------------------------------------|------|
| 1xTE-Puffer | 1 ml |
| RNase (aus QIAprep Spin Miniprep Kit) | 2 µl |

6.3.2.7 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Reinigung und Präparation von DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe aus einem Gemisch mehrerer, verschieden großer Fragmente, die z. B. durch Restriktionsverdauungen entstehen, wurden die Fragmente zunächst durch präparative Agarosegelelektrophorese getrennt. Nach dem Elektrophoreselauf wird auf dem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell das Agarosestück aus dem Gel geschnitten, welches das gewünschte DNA-Fragment enthält. Das ausgeschnittene Gelstück kann nun bei -20°C eingefroren oder sofort unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* gemäß den Anweisungen des Herstellers weiterverarbeitet werden.

6.3.3 Methoden die auf der Polymerase-Ketten-Reaktion beruhen**6.3.3.1 Standard PCR zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten**

Zur spezifischen Amplifikation eines bestimmten DNA Abschnittes aus einer Ausgangs-DNA (*Template*) gemäß (Mullis *et al.*, 1992) wurde der folgende 100 µl Reaktionsansatz auf Eis pipettiert. Die variabel angegebenen Komponenten müssen empirisch gewählt werden. Für analytische PCRs wurde die Taq-Polymerase verwendet, für präparative PCRs wegen ihrer 3'-5'-Korrekturlesefähigkeit die Pfu- oder Turbo-Pfu Polymerase (Stratagene). Um Kontaminationen auszuschließen bzw. zu erkennen, sollte regelmäßig eine Negativkontrolle bei der Wasser statt *Template*-DNA verwendet wird, erfolgen.

Der komplette Reaktionsansatz gemäß Tabelle 10 wird durch Vortexen gemischt, in der Eppendorffzentrifuge kurz zentrifugiert und bei Verwendung eines *Thermocyclers* ohne Deckelheizung mit 50 - 100 µl Mineralöl überschichtet. Die anschließende zyklische PCR erfolgt in einem *Thermocycler*, wobei die optimalen

Programmparameter, insbesondere die *Annealing*-Temperatur empirisch ermittelt werden müssen (Tabelle 11).

Tabelle 10: Allgemeines PCR-Pipettier-Schema

| Komponente | Volumen / Reaktion | Endkonzentration |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------|
| 10x-Polymerase-Puffer [*] | 10 µl | 1x |
| dNTP-Mix ^{**} | 8 µl | 0,2 mM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0 - 10 µl | 0 – 2,5 mM |
| BSA (10 mg/ml) | 0 – 5 µl | 0 - 50 µg / 100 µl |
| <i>Primer a</i> (10 pmol/µl) | 2 µl | 20 pmol |
| <i>Primer b</i> (10 pmol/µl) | 2 µl | 20 pmol |
| <i>Template</i> ^{***} | 0,5 - 1 µl | - |
| Pfu-Polymerase | 1 µl | 2,5 U / 100 µl ⁻¹ |
| H ₂ O | ad 100 µl | - |

^{*} enthält bei Benutzung des Pfu-Polymerase-Puffers 15 mM MgCl₂

^{**} ATP, CTP, GTP, TTP je 2,5 mM, insgesamt also 10 mM

^{***} (Plasmid-DNA aus Mini-Präparation, genomische DNA)

Tabelle 11: Programm-Parameter für die PCR

| Programmschritt | Denaturierung | <i>Annealing</i> ^{**} | <i>Extension</i> [*] | Zyklen |
|-----------------|---------------|--------------------------------|-------------------------------|--------|
| 1 | 95°C, 5 min | 45 - 65°C, 2 min | 68°C, 3 min | 1 |
| 2 | 95°C, 1 min | 45 - 65°C, 2 min | 68°C, 3 min | 25 |
| 3 | 95°C, 1 min | 45 - 65°C, 2 min | 68°C, 5 min | 1 |

^{*} bei Verwendung der Taq-Polymerase sowie der Turbo-Pfu Polymerase betrug die Extensions-Temperatur 72°C, bei Verwendung der Pfu-Polymerase 68°C.

^{**} Temperatur und Zeiten wurden variiert.

6.3.3.2 Ortsgerichtete Einführung von Punktmutationen

6.3.3.2.1 Punkt-Mutagenese von zirkulären Plasmiden mit dem Quikchange Mutagenese Kit (Stratagene)

Die gezielte Einführung von einzelnen Punktmutationen wurde mit dem Quikchange Mutagenese Kit weitgehend nach Herstellerangaben durchgeführt: Zunächst wird das komplette zirkuläre Plasmid mit Hilfe entgegengesetzt gerichteter, revers-komplementärer *Primer* (ca. 40 bp Länge), die die Mutation mittig enthalten, amplifiziert. Vor der Transformation des neu synthetisierten Plasmids mit Mutation in

E. coli erfolgt dessen positive Selektion durch *Dpn* I Verdauung des *in vivo* synthetisierten Ausgangsvektors, wobei die Eigenschaft von *Dpn* I ausgenutzt wird, ausschließlich methylierte DNA zu schneiden.

6.3.3.2 Punkt-Mutagenese von DNA-Fragmenten mit Hilfe der 4-Primer-Methode

Als Alternative zu dem beschriebenen Quikchange-Kit wurden Punktmutationen mit der sogenannten 4-Primer-Methode (Horton *et al.*, 1993) eingefügt. Dazu werden gemäß Abbildung 8 zunächst 2 PCR-Reaktionen mit den *Primern* 1 und 2 bzw. 3 und 4 durchgeführt, wobei in beide Produkte über die sich überlappenden Primer 2 und 3 die Mutation am 3'- bzw. 5'-Ende eingefügt wird. In einer weiteren PCR mit den beiden Produkten der ersten PCR als Ausgangsmaterial, die nun die Mutationen an dem überlappenden Ende tragen, sowie den außen liegenden *Primern* 1 und 4 wird schließlich das komplette Fragment amplifiziert. Nach Ligation des PCR-Produkts in einen geeigneten Vektor, wird das Vorhandensein der Mutation ohne weitere Sekundärmutationen durch Sequenzierung kontrolliert.

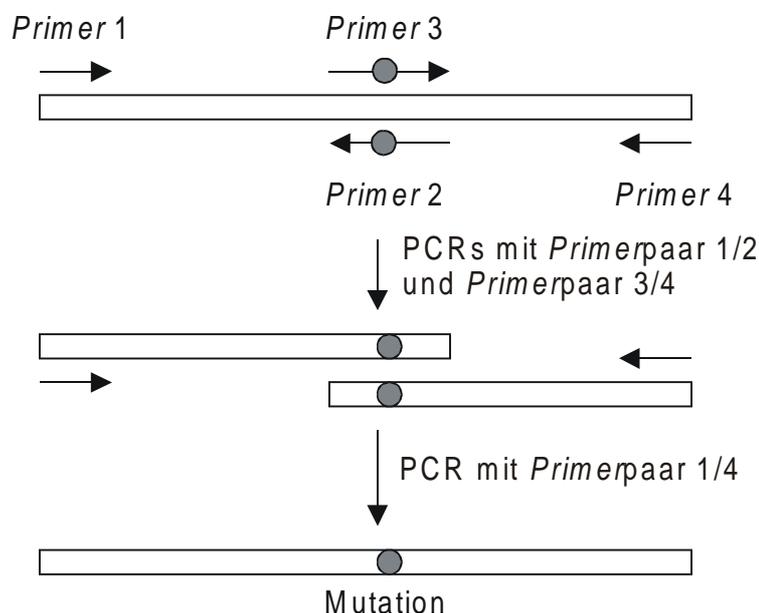


Abbildung 8: Schema zur Einführung von Mutanten durch die 4-Primer-Methode

6.3.4 Automatische Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Grundprinzip der von Fred Sanger 1977 entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (Sanger *et al.*,

1977) mit Hilfe des 373A-DNA-Sequencers sowie gegen Ende der Arbeit mit dem Prism™ 377A-DNA-Sequencer von Applied Biosystems. Es wurde eine zur PCR analoge und nur wenig doppelsträngige *Template* DNA erfordernde, zyklische Sequenzierung durchgeführt, bei der die vier ddNTPs mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, welche durch zwei Argonlaser bei 488 und 514 nm angeregt werden. Diese Vierfarbentechnik (Freeman *et al.*, 1990; Prober *et al.*, 1987) ermöglicht das Auftragen der bei der Sequenzreaktion entstandenen DNA-Fragmente in einer Spur des Polyacrylamidgels und erhöht so die Kapazität je Gel sowie die Geschwindigkeit der Datenerfassung, welche im Gegensatz zur klassischen radioaktiven Sequenzierung bereits während des Elektrophoreselaufs erfolgt.

Der Cycle-Sequencing-Reaktionsansatz wird gemäß folgendem Pipettierschema mit dem *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, das bereits die benötigten Mengen AmpliTaq®DNA Polymerase FS, dNTPs, Terminatoren, Salze und Puffer enthält, angesetzt.

Tabelle 12: Pipettierschema der zyklischen Sequenzierung

| Komponenten | Menge |
|---|--------------|
| <i>BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix</i> | 4 µl |
| Sequenzier-Primer | 3,2 pmol |
| DNA | 300 - 500 ng |
| H ₂ O | ad 20 µl |

Die zyklische Sequenzierreaktion erfolgt im Thermocycler unter den folgenden Bedingungen:

Tabelle 13: Programm-Parameter der zyklischen Sequenzierreaktion

| Programmschritt | Denaturierung | Annealing | Extension | Zyklenzahl |
|-----------------|---------------|--------------|-------------|------------|
| 1 | 96°C, 1 min | - | - | 1 |
| 2 | 95°C, 40 sec | 55°C, 40 sec | 60°C, 4 min | 25 |
| 3 | - | - | 60°C, 4 min | 1 |

Bei Sequenzierungen mit dem 373A DNA Sequencer werden die PCR-Produkte durch eine Ethanol-fällung (6.3.2.1) gereinigt, getrocknet und der Niederschlag in 4 µl Resuspensionslösung gelöst. Nach 5 minütiger Denaturierung bei 95°C wird der Ansatz rasch auf Eis abgekühlt und nach kurzem Zentrifugieren in die Taschen des nach Angaben von ABI hergestellten Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt ebenfalls nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (2500 V, 40 mA, 30 W) und wird aufgrund der Dauer von 12 h über Nacht durchgeführt. Die vom Rechner bereits während des Elektrophoreselaufs erfassten Rohdaten werden anschließend mit der zum Sequencer gehörigen Software prozessiert. Gegen Ende der vorliegenden Arbeit wurde die Reinigung der bei der Sequenzreaktion entstandenen DNA-Fragmente sowie die anschließende Elektrophorese und Datenprozessierung mit dem Prism™ 377A-DNA-Sequencer von Volker Nödinger (Institut für Technische Biochemie) durchgeführt. Die Reinigung der DNA-Fragmente erfolgte hierbei durch Gelfiltration mit einer Sephadex G50 Matrix, die mit einem Glasschaber in einer Multititerplatte MAHV N45 verteilt wurde und darin mit 300 µl H₂O je Kavität drei Stunden zum Quellen inkubiert wurde. Auf die gequollene Matrix wird die Probe pipettiert und durch Zentrifugation wieder eluiert. Nach zwei stündiger Trocknung wird das DNA-Pellet mit 3,5 µl einer 4:1 Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert. Hiervon wird 1 µl vor dem Elektrophoreselauf in die Geltasche aufgetragen.

Die Sequenzdaten werden schließlich von Hand oder am Rechner mit *Alignment*-Programmen, die zur Software-Ausstattung der Sequencer gehören, ausgewertet.

6.3.4.1 Sequenziergel-Lösung

| | |
|--|---------|
| Harnstoff | 30 g |
| Rotiphorese® NF-10x-TBE-Puffer | 6 ml |
| Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29:1) für automatische Sequenzierer | 9 ml |
| H ₂ O | 23,5 ml |

Die fertige Lösung wird durch einen Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 24 µl TEMED und 180 µl 10 % (M/V) APS gestartet.

6.3.4.2 Resuspensionslösung für Sequenzreaktionen

| | |
|--------------------|------------|
| Formamid | 80 % (V/V) |
| 25 mM EDTA, pH 8,0 | 20 % (V/V) |

6.3.5 Enzymatische Methoden zur DNA-Modifikation bei Klonierungen

DNA-modifizierende, enzymatische Methoden für Klonierungszwecke wie Restriktionsverdauungen im analytischen oder präparativen Maßstab, Ligationen, Dephosphorylierungen, u.s.w. wurden nach Angaben der Enzymhersteller bzw. wie bei (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben durchgeführt.

6.4 Biochemische Methoden

6.4.1 Reinigung rekombinanter Proteine

6.4.1.1 Präzipitation von Antikörperfragmenten aus *Pichia* Kulturüberständen

Die Aufkonzentrierung rekombinanter Antikörperfragmente aus den *Pichia* Kulturüberständen erfolgte durch eine Fällung mit Trichloressigsäure:

Hierfür werden gleiche Volumen Kulturüberstand und 48%ige Trichloressigsäure gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (21500 x g, 15 min, 4°C) wird der Niederschlag zwei mal mit 500 µl Aceton gewaschen, wobei nach beiden Schritten zentrifugiert und der Überstand verworfen wird (21500 x g, 15 min, 4°C). Der Niederschlag wird schließlich luftgetrocknet und je nach gewünschtem Konzentrationsgrad in der entsprechenden Menge 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 resuspendiert.

6.4.1.2 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Rekombinante Proteine wurden in dieser Arbeit stets als Fusionsproteine mit einem C-terminalen (His)₆-tag exprimiert. Dies erlaubte eine Affinitätsaufreinigung durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) sowohl von Proteinen die intrazellulär bzw. periplasmatisch in *E. coli* exprimiert wurden, wie auch von Proteinen, die von *P. pastoris* in den Kulturüberstand sekretiert wurden.

Zur Aufreinigung wurde die Sephadex-Gelfiltrationsmatrix einer PD-10 Säule entfernt und die leere und gereinigte Säule mit 8 ml TALON™-SuperFlow Matrix gepackt. Dies ist eine mit Cobalt beladene Superflow 6 Matrix auf Agarosebasis. Nach Äquilibration der Säule mit IMAC-Extraktions-/Waschpuffer können bis zu 2 mg Protein je ml Matrix (*E. coli* Zellaufschluß oder *Pichia* Kulturüberstand) auf der Säule gebunden werden. Nach Waschen der Säule mit mindestens 3 Säulenvolumen Waschpuffer werden die gebundenen Proteine durch Elutionspuffer eluiert, wobei jeweils 0,5 ml Fraktionen gesammelt werden. Nach vollständiger

Elution wird die Säule mit 25 ml Waschpuffer regeneriert und bis zur nächsten Verwendung verschlossen bei 4°C gelagert.

6.4.1.2.1 IMAC-Extraktions-/Waschpuffer

| | |
|---------------------|--------|
| Na-Phosphat, pH 7,0 | 50 mM |
| NaCl | 300 mM |

6.4.1.2.2 IMAC-Elutionspuffer

| | |
|---------------------|--------|
| Na-Phosphat, pH 7,0 | 50 mM |
| NaCl | 300 mM |
| Imidazol | 150 mM |

6.4.1.3 Aufreinigung nach Größe durch Gelfiltration

Die Entfernung kleiner Moleküle aus Proteinlösungen bzw. ein Pufferaustausch erfolgte durch Gelfiltration mit fertig gepackten „PD-10“-Säulen von Pharmacia, die eine Sephadex-Matrix enthalten. Hierzu wird die Säule zunächst mit dem gewünschten Arbeitspuffer äquilibriert und anschließend die Probe in maximal 2 ml Volumen aufgetragen. Eluiert wird mit dem gewünschten Arbeitspuffer (in dieser Arbeit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0), wobei jeweils 0,5 ml oder 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Nach vollständiger Elution wird die Säule durch Waschen mit weiteren 25 ml Puffer regeneriert.

6.4.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zum Nachweis und zur Molekulargewichtsbestimmung rekombinant hergestellter Proteine und deren Reinheitskontrolle wurde die SDS-PAGE gemäß (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dazu wird ein 12,5 %iges Trenngel hergestellt, das nach Auspolymerisieren mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet wird, auf das vor der Elektrophorese die mit Auftragspuffer 1:2 verdünnten und kurz aufgekochten Proteinproben aufgetragen werden. Der Auftragspuffer wird, je nachdem ob reduzierende oder nicht-reduzierende Bedingungen erwünscht sind, mit oder ohne DTT angesetzt. Der Elektrophoreselauf erfolgt zunächst 10 min bei 10 mA pro Gel, anschließend bei 24 - 26 mA pro Gel bis die BPB Bande des Auftragspuffers das Gel verlassen hat.

Die Detektion der Proteinbanden nach dem Lauf erfolgte durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue R250 und anschließender Entfärbung des

proteinfreien Bereiche in Entfärbelösung. Alternativ wurde die sensitivere Färbemethode mit SERVA Violett durchgeführt:

Das Gel wird nach der Elektrophorese zuerst 2 mal 20 min bei RT in Fixierlösung, anschließend 2 mal 2 – 3 min in Wasser (60°C) geschwenkt. Unmittelbar vor der eigentlichen Färbung wird die SERVA-Färbelösung angesetzt und das Gel darin 7 min geschwenkt. Nach mehrfachem Spülen des Gels mit Wasser wird mit 3%iger Phosphorsäure entfärbt, bis der Hintergrund fast klar ist. Das entfärbte Gel wird nochmals mit Wasser gespült und kann darin bei 4°C bis zu 3 Tage gelagert oder sofort getrocknet werden.

Quantitative Auswertungen des SDS-Gels wurden mit Hilfe der Bildauswertungs-Software „Scion-Image“, einer Windows-kompatiblen Version von „NIH-Image“ durchgeführt. Als Standard wurde der „*Low Molecular Weight Standard*“ von Amersham Pharmacia verwendet.

6.4.2.1 4x-Sammelgel-Puffer

| | |
|------------------|-------------|
| Tris/HCl, pH 6,8 | 0,5 M |
| SDS | 0,4 % (M/V) |

6.4.2.2 4x-Trenngel-Puffer

| | |
|------------------|-------------|
| Tris/HCl, pH 8,8 | 1,5 M |
| SDS | 0,4 % (V/V) |

6.4.2.3 Sammelgel (4%)

| | |
|-------------------------------|---------|
| Acrylamidlösung 30 % (M/V) | 0,52 ml |
| 4x-Sammelgel-Puffer (6.4.2.1) | 1 ml |
| H ₂ O | 2,47 ml |
| TEMED | 4 µl |
| APS 10 % (M/V) | 40 µl |

6.4.2.4 Trenngel (12,5 %)

| | |
|------------------------------|---------|
| Acrylamidlösung 30 % (M/V) | 3,33 ml |
| 4x-Trenngel-Puffer (6.4.2.2) | 2 ml |
| H ₂ O | 2,67 ml |
| TEMED | 4 µl |
| APS 10 % (M/V) | 40 µl |

6.4.2.5 2x-SDS-Proben-Puffer

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Tris | 100 mM |
| DTT (nur für reduzierende Gele) | 200 mM |
| SDS | 4 % (M/V) |

| | |
|---|------------------------|
| BPB | 0,2 % (M/V) |
| Glycerin | 20 % (V/V) |
| 6.4.2.6 Elektrophorese-Puffer | |
| Tris/HCl, pH 8,3 | 3 g l ⁻¹ |
| Glycin | 14,4 g l ⁻¹ |
| SDS | 2 g l ⁻¹ |
| 6.4.2.7 Coomassie-Färbelösung | |
| Coomassie-Brilliant Blue R-250 | 1 g l ⁻¹ |
| Methanol | 30 % (V/V) |
| Essigsäure | 10 % (V/V) |
| 6.4.2.8 Coomassie-Entfärbelösung | |
| Methanol | 30 % (V/V) |
| Essigsäure | 10 % (V/V) |
| 6.4.2.9 Serva-Violett-Stammlösung | |
| Serva-Violett 17 | 1 % (M/V) |
| 6.4.2.10 Fixierlösung | |
| Methanol | 40 % (V/V) |
| Essigsäure | |
| 6.4.2.11 Serva-Violett Färbelösung | |
| Serva-Violett Stammlösung | 9 Volumenteile |
| 10 % Phosphorsäure | 1 Volumenteil |

6.4.2.12 Proteinstandards für SDS-PAGE

Als Molekulargewichts- sowie Mengenstandard wurde der *Low Molecular Weight (LMW) Standard* von Amersham Pharmacia Biotech (#14 000-97 000) verwendet:

Tabelle 14: Zusammensetzung des LMW Standards von Amersham Pharmacia Biotech

| Protein | Molekulargewicht [kDa] | Menge [ng µl ⁻¹] |
|------------------|------------------------|------------------------------|
| Phosphorylase b | 97 | 335 |
| Albumin | 66 | 415 |
| Ovalbumin | 45 | 735 |
| Carboanhydrase | 30 | 415 |
| Trypsininhibitor | 20,1 | 400 |
| α-Lactalbumin | 14,4 | 580 |

6.4.3 Western Blotting

Zur eindeutigen Identifikation rekombinant hergestellter Antikörperfragmente wurden sämtliche Proteinbanden vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und durch eine Immunofärbung spezifisch markiert: Dazu werden zunächst sowohl das Gel wie auch die NC-Membran 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wird in der Blotting-Apparatur ein Stapel wie folgt aufgebaut: Auf drei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere wird zunächst die äquilibrierte NC-Membran, dann das Gel und schließlich drei weitere Filterpapiere luftblasenfrei aufgeschichtet. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die NC-Membran erfolgt nun durch *Elektroblotting* für ca. 20 min bei 15 V.

Die Membran wird anschließend entweder getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert oder direkt für eine Stunde bei RT in Blockierungspuffer geschwenkt. Nach der Absättigung unbesetzter Stellen wird die Membran in einer Lösung des Maus-anti-(His)₆-Antikörpers (1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer) ÜN bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag zwei mal 20 min bei RT in 0,3 % (V/V) Tween 20 in TS-Puffer und 3 mal 10 min bei RT in TS-Puffer gewaschen. Anschließend wird die Membran 1 h bei RT in einer Lösung des anti-Maus-IgG-POD Konjugats (1:1000 in Blockierungspuffer) inkubiert und erneut 3 mal 10 min bei RT in TS-Puffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift werden gebundene Antikörper durch Inkubation der Membran in Substratpuffer detektiert. Bei der Enzym-Substrat-Reaktion entsteht durch die Oxidation des 4-Chloro-1-Naphthols ein blau-violetter Farbkomplex.

6.4.3.1 Transferpuffer für Western Blotting

| | |
|--------------|------------|
| Tris, pH 8,3 | 25 mM |
| Glycin | 142 mM |
| Methanol | 20 % (V/V) |

6.4.3.2 TS-Puffer

| | |
|------------------|--------------|
| Tris/HCl, pH 7,5 | 10 mM |
| NaCl | 0,85 % (M/V) |

6.4.3.3 Blockierungs Puffer

| | |
|---------|------------------------|
| Albumin | 1 % (W/V) in TS-Puffer |
|---------|------------------------|

6.4.3.4 Substratlösung

| | |
|---------------------|---------------------------|
| 4-Chloro-1-Naphthol | 0,1 g in 33,4 ml Methanol |
|---------------------|---------------------------|

| | |
|--|----------|
| Phosphatpuffer (0,6 M, pH 6 mit 1 M Citronensäure) | 5 ml |
| H ₂ O | 16,2 ml |
| H ₂ O ₂ (30 %) | 0,334 ml |

6.4.4 Kompetitiver ELISA

Der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete kompetitive ELISA (Abbildung 5) wurde ursprünglich zur quantitativen Detektion von Herbiziden entwickelt (Giersch *et al.*, 1993), hier aber zum Nachweis und zur Charakterisierung rekombinanter Antikörperfragmente eingesetzt.

Über einen an die Mikrotiterplatte adsorbierten *Fänger*-Antikörper (polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-IgG) wird das rekombinante, herbizid-spezifische Antikörperfragment (Fab oder scFv) immobilisiert. Nach Entfernung nicht gebundener Antikörperfragmente durch einen Waschschrift erfolgt die Konkurrenz zwischen Enzym-markierten Analytmolekülen (*Tracer*) und nicht-markierten Analytmolekülen um die Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers. Hierbei wird durch Verwendung von definierten Konzentrationen des nicht-markierten Analyten eine Standardkurve erstellt, anhand der die Konzentration von unbekanntem, parallel gemessenen Analytproben bestimmt werden kann. Die Signalauswertung erfolgt durch eine Enzym-Substrat-Reaktion (Peroxidase-katalysierte Oxidation von Tetramethylbenzidin), infolge derer ein farbiges Produkt entsteht, das photometrisch gemessen werden kann. Die Auswertung erfolgt mittels sigmoidaler Kalibrierkurven, die durch Auftragung der Absorptionen über den zugehörigen logarithmierten Standardkonzentrationen erstellt werden. Da sie aufgrund der experimentellen Bedingungen (Temperatur, Zeitdauer der Enzym-Substrat-Reaktion, Konzentration des *Tracers*, etc) schwanken können, werden sie einer Normalisierung nach folgender Formel unterzogen:

$$\frac{B}{B_0} [\%] = 100 \frac{A - A_{\text{üb}}}{A_0 - A_{\text{üb}}}$$

mit A: Absorption

A_{üb}: Absorption bei Überschuss des Kompetitors (Standard)

A₀: Absorption ohne Kompetitor

Hierbei gibt B/B₀ das Verhältnis von gebundenem *Tracer* in Anwesenheit von Analyt zu gebundenem *Tracer* in Abwesenheit von Analyt in Prozent an. Der Wert liegt zwischen 0 und 100%, wobei der sogenannte Testmittelpunkt (IC₅₀) die

Analytkonzentration angibt, bei der die Antigenbindungsstellen je zur Hälfte mit Analyt- und *Tracermolekülen* besetzt sind, also $\%B/B_0 = 50\%$ ist. Mittels der Testmittelpunkte bei der Detektion verschiedener Analyten lässt sich schließlich die Kreuzreaktivität in Prozent berechnen:

$$KR[\%] = \frac{IC50_{Atrazin}}{IC50_{KR}}$$

Zunächst wird eine F96 Maxisorp™ Mikrotiterplatte mit 300 µl je Kavität anti-Maus-IgG (1:1000 in Carbonatpuffer) befüllt und ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem, automatischen Waschen mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Washers mit Waschpuffer wird die Platte je Kavität mit 300 µl Fab- oder scFv-haltigem Kulturüberstand rekombinanter *Pichia* gefüllt und 2 h bei RT inkubiert. Die so beschichtete Platte wird erneut 3 mal mit Waschpuffer gewaschen und kann direkt verwendet werden oder trocken bei -20°C gelagert werden. Für den Konkurrenzschritt werden je Kavität 200 µl Analyt-Standard (0 – 10000 µg l⁻¹ s-Triazin) und 50 µl einer 1:4000 – 1:10000 Verdünnung des POD-*Tracers* (6.5.1) in 80 mM PBS zugegeben, kurz gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschritten wird die Enzym-Substrat-Reaktion durch Zugabe von 200 µl TMB-Substratlösung je Kavität gestartet und nach 10 bis 45 Minuten (je nach Farbentwicklung) durch Zugabe von 100 µl 2 N Schwefelsäure gestoppt. Dadurch schlägt die Farbe von blau in das bei einer Wellenlänge von 450 nm absorbierende gelb um und kann somit photometrisch im ELISA-Reader detektiert werden.

6.4.4.1 10xPBS-Puffer (= 80 mM)

| | |
|---|-------------------------|
| NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O | 1,265 g l ⁻¹ |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 12,1 g l ⁻¹ |
| NaCl | 8,5 g l ⁻¹ |
| pH 7,2 mit 1M HCl | |

6.4.4.2 Waschpuffer

| | |
|---------------|------------------------|
| 10xPBS-Puffer | 100 ml l ⁻¹ |
| Tween 20 | 0,5 ml l ⁻¹ |

6.4.4.3 Carbonatpuffer

| | |
|---------------------------------|----------|
| Na ₂ CO ₃ | 0,0125 M |
| NaHCO ₃ | 0,0375 M |
| pH 9,6 mit 1M HCl oder 1M NaOH | |

6.4.4.4 POD-Substratpuffer

| | |
|--------------------------|-------|
| Na-Acetat | 0,1 M |
| pH 5,5 mit Citronensäure | |

6.4.4.5 TMB-Stammlösung

| | |
|---------------------|-------|
| Tetramethylbenzidin | 60 mg |
| DMSO | 10 ml |

6.4.4.6 TMB-Substratlösung

| | |
|--|--------|
| TMB-Stammlösung | 400 µl |
| POD-Substratpuffer | 25 ml |
| 1% (V/V) H ₂ O ₂ | 100 µl |

6.4.4.7 H₂SO₄ (2N)

| | |
|---|-------------------------|
| H ₂ SO ₄ (konzentriert, 95-98%) | 98,08 g l ⁻¹ |
|---|-------------------------|

6.4.5 Homogener, kompetitiver Fluoreszenzpolarisationsassay

Bei der Fluoreszenzpolarisation wird im Gegensatz zu anderen fluorimetrischen Methoden nicht die Fluoreszenzintensität gemessen, sondern die Änderung der Polarisationsrichtung der linear polarisierten Fluoreszenzemission. Diese Änderung ist durch die Rotationsbeweglichkeit des Fluorophors bedingt, die von der Größe des Fluorophors abhängt und sich somit durch Komplexbildung wie beispielsweise bei einer Antikörper-Antigen-Reaktion ändern kann. Eine detaillierte Beschreibung der Fluoreszenzpolarisation findet sich in (Sportsman *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit wurde zur Etablierung eines Tests nach diesem Prinzip ein Atrazin-FITC-Konjugat, dessen Synthese in Kapitel 6.5.2 beschrieben ist, als Fluorophor eingesetzt. Das Konjugat dient in dem in Lösung stattfindenden Test als markiertes *Tracer*-Molekül, das wie beim ELISA in einer Kompetitionsreaktion mit nicht-markiertem Atrazin um die Bindungsstellen des sich hier jedoch ebenfalls in Lösung befindlichen atrazinspezifischen Antikörpers konkurriert. Eine niedrige Polarisationsänderung zeigt also das Vorhandensein von nicht-markiertem Analyt in der Lösung an, während eine starke Polarisationsänderung in Abwesenheit des Analyten durch alleinige Bindung des *Tracers* hervorgerufen wird.

Zunächst werden in Vorversuchen die optimalen Verdünnungen des *Tracers* und der Antikörper bestimmt. Dazu werden in einer schwarzen Mikrotiterplatte 100 µl Boratpuffer, 100 µl Antikörperlösung (*Pichia*-Kulturüberstand) und 100 µl *Tracer*lösung gemischt und die Fluoreszenzintensität und -polarisation gemessen.

Ziel ist hierbei zum einen, die geringstmögliche Menge *Tracer* zu bestimmen, die für eine sich vom Hintergrundsignal deutlich abhebende Fluoreszenzintensität notwendig ist, zum andern die Verdünnung der Antikörperlösung, also des *Pichia*-Kulturüberstands zu bestimmen, die für ein möglichst hohes Fluoreszenzpolarisationssignal notwendig ist.

Zur Durchführung des kompetitiven Assays selbst werden in einer schwarzen Mikrotiterplatte 50 µl Boratpuffer, 100 µl des Atrazinstandards in verschiedenen Konzentrationen, 50 µl einer 1:10000 Verdünnung des Atrazin-FITC-*Tracers* in Boratpuffer und 100 µl der Antikörperlösung gemischt und ohne weitere Inkubation im Fluoreszenzpolarimeter gemessen. Die Fluoreszenzpolarisationswerte bei den verschiedenen Atrazinkonzentrationen ergeben bei halblogarithmischer Auftragung die für kompetitive Assays typische sigmoidale Bindungskurve, die wie für den ELISA beschrieben (6.4.4) normalisiert wird.

6.4.5.1 Boratpuffer

| | |
|--------------------|--------|
| Natrium-Borat | 100 mM |
| pH 8,5 mit 1M NaOH | |

6.4.6 Proteinbestimmungen

Proteinkonzentrationen wurden mit einem kommerziell erhältlichen BCA-Test, gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Konzentrationsbestimmungen von Proteinen in Kulturüberständen von *Pichia pastoris* waren aufgrund der in den Medien vorhandenen Peptide weder damit noch mit alternativen Protein-Tests (Biuret, Bradford,...) möglich und erfolgten deswegen densitometrisch durch Messung der Intensität der jeweiligen Proteinbanden in SDS-Gelen mit Hilfe einer Bildauswertungs-Software: Dazu wurden auf dem SDS-Gel der Standard in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen und anhand der Intensität der Bande der Carboanhydrase eine Standardkurve erstellt.

6.4.7 Durchflußcytometrie

FACS Analysen von Hefezellen wurden an einem FACStar-Plus™ der Firma Becton Dickinson am Biologischen Institut der Universität Stuttgart durchgeführt. Vor den Analysen wurden die mit FITC oder EGFP markierten Zellen mit 1xPBS gewaschen und zu einer Dichte von ca. 10^6 Zellen ml⁻¹ verdünnt. Das Anregungslicht wurde von einem 488 nm Laser geliefert. Mehrere Photomultiplier detektierten das von der Größe der Zellen abhängige vorwärts gestreute Licht (FSC, forward scatter),

das von der Granularität der Zellen abhängige im 90° Winkel zum Anregungsstrahl gestreute Licht (SSC, *side scatter*) sowie die von den Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm emittierte Fluoreszenz der Wellenlänge 530 ± 30 nm (Bandpaßfilter).

6.4.8 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Laser Scanning mikroskopische Untersuchungen wurden am Institut für Zellbiologie und Immunologie an einem LSM der Firma Leica unter Verwendung eines 63x Öl-Immersionsobjektivs durchgeführt.

6.5 Chemische Methoden

6.5.1 Darstellung von Atrazin-C₆-POD, Atrazin-C₆-EGFP und Atrazin-C₆-BSA

Der Enzym- und der EGFP-*Tracer* wurden mit der Carbodiimid/N-Hydroxysuccinimid-Methode gemäß (Giersch *et al.*, 1993) hergestellt, bei der ein Atrazin-Derivat mit einem C₆-*Spacer* an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (POD) bzw. an das rekombinant hergestellte, fluoreszierende Protein EGFP kovalent gekoppelt wird (Abbildung 9). Zunächst wird das Atrazin-C₆ in einen aktivierten Ester überführt, der dann an die Aminogruppen der POD bzw. des EGFP gekoppelt wird. Das Kopplungsprodukt wird nun von überschüssigem Atrazin und überschüssigen Aktivierungsreagenzien durch Gelfiltration getrennt.

Für die Bildung des aktivierten Esters werden 1 mg Atrazin-C₆ (= 3,2 µmol) zusammen mit 1,7 mg N-Hydroxysuccinimid (= 15 µmol NHS) und 6,2 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (= 30 µmol DCCI) in 130 µl Dioxan gemischt und unter langsamem Schütteln bei RT mindestens 18 h inkubiert. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert (21500 x g, 30 s) und der Überstand weiterverwendet. Anschließend werden 0,5 – 2 mg der POD bzw. des EGFP in 3 ml einer 0,13 M NaHCO₃-Lsg gelöst, der aktivierte Ester tropfenweise zugegeben und der Ansatz nach kurzem Mischen für weitere 3 h dunkel bei RT inkubiert. Zur Reinigung des *Tracers* wird der 3 ml-Ansatz auf eine mit 80 mM PBS (25 - 30 ml) äquilibrierte PD-10 Sephadexsäule gegeben, mit 16 x 0,5 ml 80 mM PBS eluiert und in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Der Verbleib der POD bzw. des EGFP kann visuell (die Peroxidase ist aufgrund einer Hämgruppe rötlich gefärbt, das EGFP fluoresziert grün) oder spektralphotometrisch verfolgt werden ($\lambda = 403$ nm: Detektion der POD, $\lambda = 260$ nm: Detektion des

Atrazins, $\lambda = 220 \text{ nm}$: Detektion des Atrazin- C_6 -POD *Tracers*, für die Detektion bei 260 nm und 220 nm müssen die Proben 1 : 20 verdünnt werden). Bei der Auswahl der Fraktionen mit Atrazin-POD-*Tracer* ist darauf zu achten, daß die Fraktionen kein freies Atrazin- C_6 enthalten, da dieses den ELISA verfälschen würde. Verunreinigungen durch die POD stören im ELISA dagegen nicht, da sie während der Waschschrte entfernt wird.

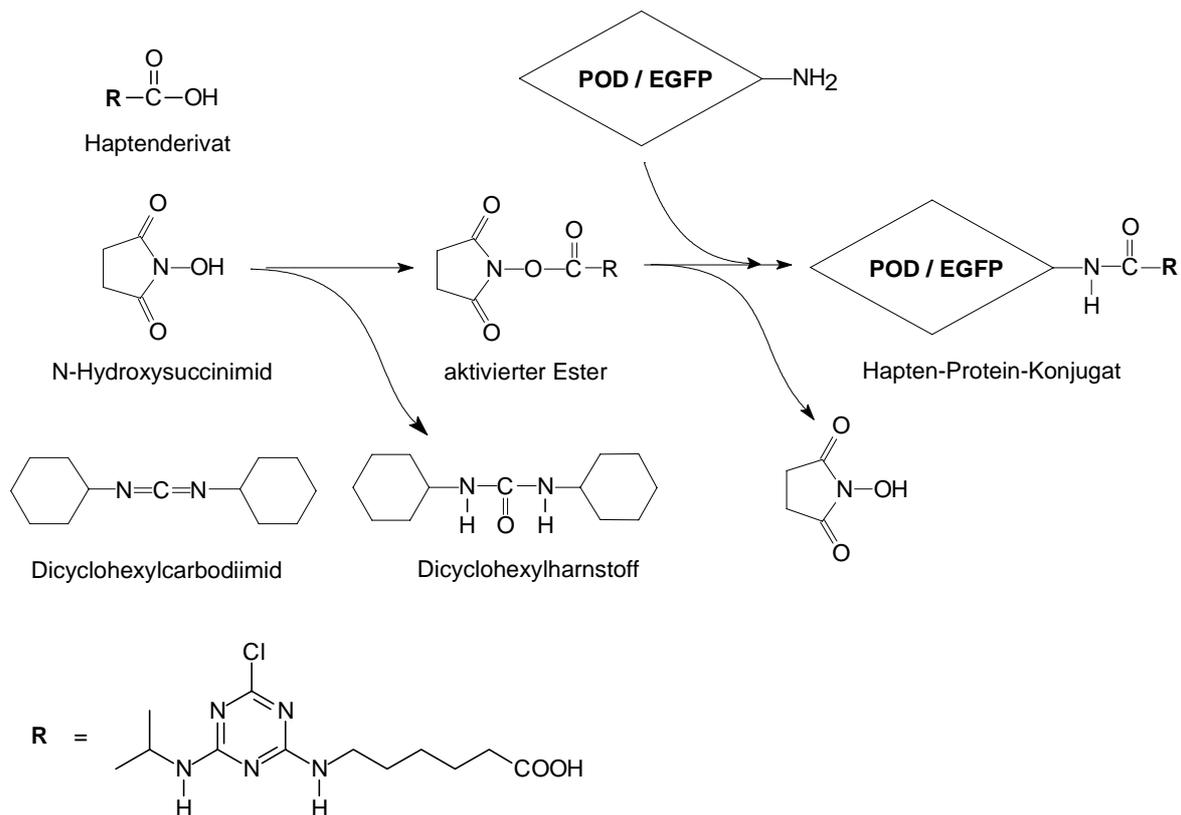


Abbildung 9: Synthese von Atrazin-Protein Konjugaten mit Hilfe der DCCI / NHS Methode

6.5.2 Darstellung eines Atrazin-FITC-Konjugates

Ein Atrazin-FITC-*Tracer* wurde freundlicherweise von Dr. Sergei Eremin von der Universität Moskau zur Verfügung gestellt. Zu dessen Herstellung wurden 4 mg 2,4-Dichlor-6-isopropyltriazin ($20 \mu\text{M}$) und 3,5 mg Fluoresceinamin ($10 \mu\text{M}$) zu 0,5 ml DMF und 50 μl Pyridin gegeben und zunächst für 1 h bei RT unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz ÜN bei 4°C unter Rühren inkubiert. Ein Teil der Reaktionsmischung wurde nun über eine Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und in Chloroform/Methanol (4:1 V/V) entwickelt. Die Hauptbande bei $R_f=0,9$ wurde von der Dünnschichtplatte gekratzt und mit 2 ml Methanol extrahiert.

7 ERGEBNISSE

7.1 Vorbemerkungen

Die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse gliedern sich in zwei Abschnitte: Im ersten Teil wurde ein Expressionssystem zur Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* etabliert. Anschließend wurden im zweiten Teil ein Hochdurchsatz-Screening System zur Durchmusterung großer Antikörperbibliotheken etabliert.

7.2 Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente in *P. pastoris*

7.2.1 Herstellung der Expressionsvektoren pGAPZ α -Fab und pPICZ α -Fab

Ausgangspunkt dieser Arbeit war das in 6.1.3.1 beschriebene *E. coli*-Expressionssystem basierend auf dem Vektor pASK-K411B. Zur Expression in *Pichia* mußten zunächst die beiden DNA-Sequenzen für die schwere und leichte Kette der Fabs' in *Pichia* transformiert werden. Da in *Pichia* bis dato keine stabil replizierenden, episomalen Vektoren bekannt sind, mußten die DNA-Sequenzen der schweren und leichten Kette – im folgenden als H- und L-Kette bezeichnet - in das Genom integriert werden. Hierzu wurde eine Strategie auf Basis der kommerziell erhältlichen Vektoren pGAPZ α A und pPICZ α A gewählt, die nach Transformation in den chromosomalen GAPDH- bzw. AOX1-Locus des *Pichia*-Genoms integrieren und eine konstitutive oder Methanol-induzierte Expression rekombinanter Proteine erlauben. Da sich beide Vektoren nur in den Promotorsequenzen unterscheiden, wurde zur Herstellung der Expressionsvektoren dieselbe Strategie verwendet.

Im ersten Schritt wurden mehrere Vektoren hergestellt, die jeweils nur die Expressionskassette der H-Kette oder die der L-Kette, unter Kontrolle des GAPDH-Promotors oder des AOX1-Promotors enthielten: pGAPZ α -H, pGAZ α -L, pPICZ α -H, pPICZ α -L. Um die Sekretion beider Antikörperketten ins Medium zu erreichen, wurden die Ak-Gensequenzen zunächst durch eine *splicing-by-overlap-extension*-PCR-Strategie gemäß Abbildung 10A *in frame* mit der Prä-pro-Sequenz des α -

Faktors aus *S. cerevisiae* fusioniert. Dazu wurden die beiden Ak-Sequenzen aus pASK-K411B amplifiziert, wobei mit den 5'-Primern (Fab-1, Fab-5) eine zum 3'-Ende des α -Faktors komplementäre Sequenz und mit den 3'-Primern (Fab-2, Fab-6) die Restriktionschnittstelle *Eco* RI eingefügt wurde. Im Fall der H-Kette ist zu beachten, daß das bereits in pASK-K411B vorhandene (His)₆-tag am 3'-Ende mit amplifiziert wurde, um eine spätere IMAC-Reinigung des Fabs zu ermöglichen. Parallel wurde mit den Primern Fab-3 und Fab-4 die Alpha-Faktor-Signalsequenz aus pPICZ α A amplifiziert und dabei am 5'-Ende die Schnittstelle *Sfu* I eingefügt. Das Agarosegel in Abbildung 10B zeigt die entsprechenden PCR-Produkte PCR- α (286 bp, Spur 2), PCR-H (699 bp, Spur 3) und PCR-L (662 bp, Spur 4): Mit diesen PCR-Produkten der beiden ersten PCR als *Template* (PCR- α + PCR-H bzw. PCR- α + PCR-L) und den außen liegenden Primern Fab-3 und Fab-2 bzw. Fab-3 und Fab-6 wurden in der letzten PCR die beiden Antikörperketten jeweils mit dem α -Faktor verknüpft.

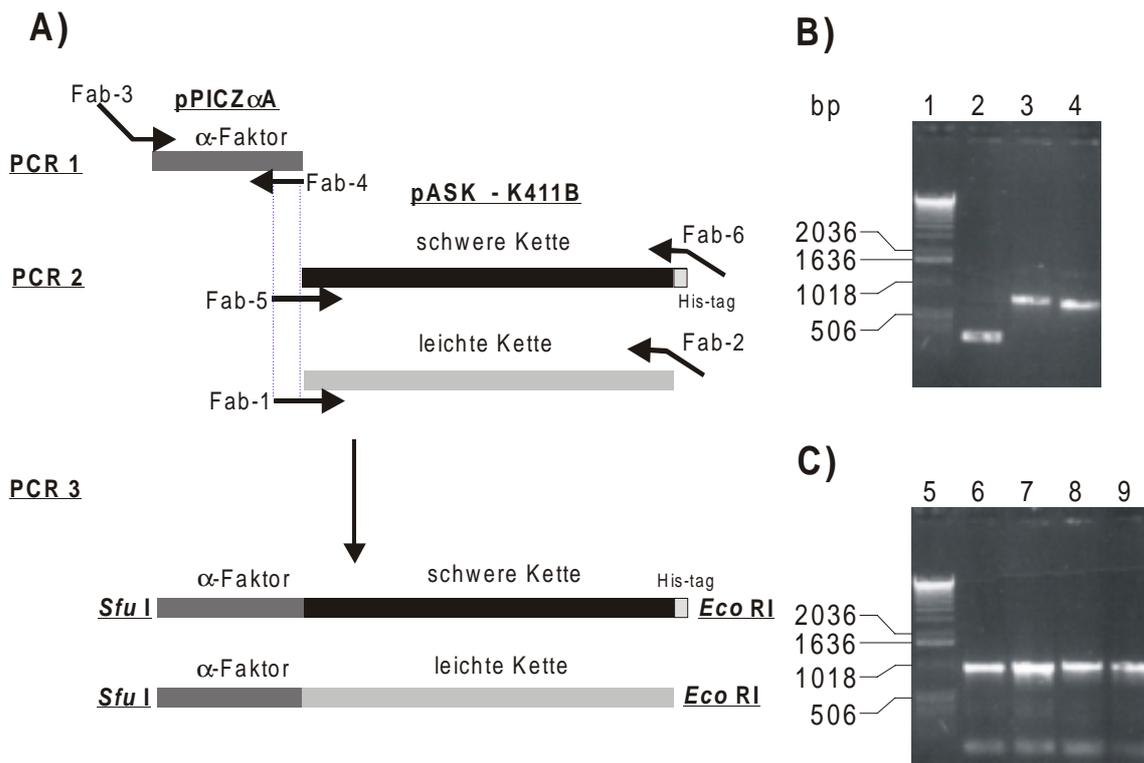


Abbildung 10: Fusion der beiden Antikörperketten mit der α -Faktor-Signalsequenz. Das Schema in A) zeigt die Fusion der beiden Ketten mit dem α -Faktor durch eine *splicing-by-overlap-extension*-PCR Strategie. Das Agarosegel in B) zeigt mit den Banden des α -Faktors (Spur 2), der H-Kette (Spur 3) und der L-Kette (Spur 4) die PCR-Produkte der ersten beiden PCR-Reaktionen (PCR- α , PCR-H, PCR-L). Das Gel in C) zeigt die Banden der mit dem α -Faktor fusionierten Gene der leichten (Spuren 6 & 7) und der schweren (Spuren 8 & 9) Ketten (PCR- α H und PCR- α L). Spuren 1 & 5: Längenstandard.

Das Agarosegel in Abbildung 10C zeigt die entsprechenden PCR-Produkte PCR- α H (986 bp, Spuren 8 & 9) und PCR- α L (948 bp, Spuren 6 & 7), die nun gemäß Abbildung 11 anstelle des dort ursprünglich vorhandenen α -Faktors in die *Sfu* I und *Eco* RI Schnittstellen von pPICZ α A bzw. pGAPZ α A kloniert wurden. Die fertigen Plasmide (pGAPZ α -H, pGAPZ α -L, pPICZ α -H, pPICZ α -L) wurden anschließend zur Kontrolle teilsequenziert, um Mutationen oder Leseraserverschiebungen (zwischen α -Faktor und H- oder L-Kette), die eventuell durch die PCR-Reaktionen auftreten könnten, auszuschließen.

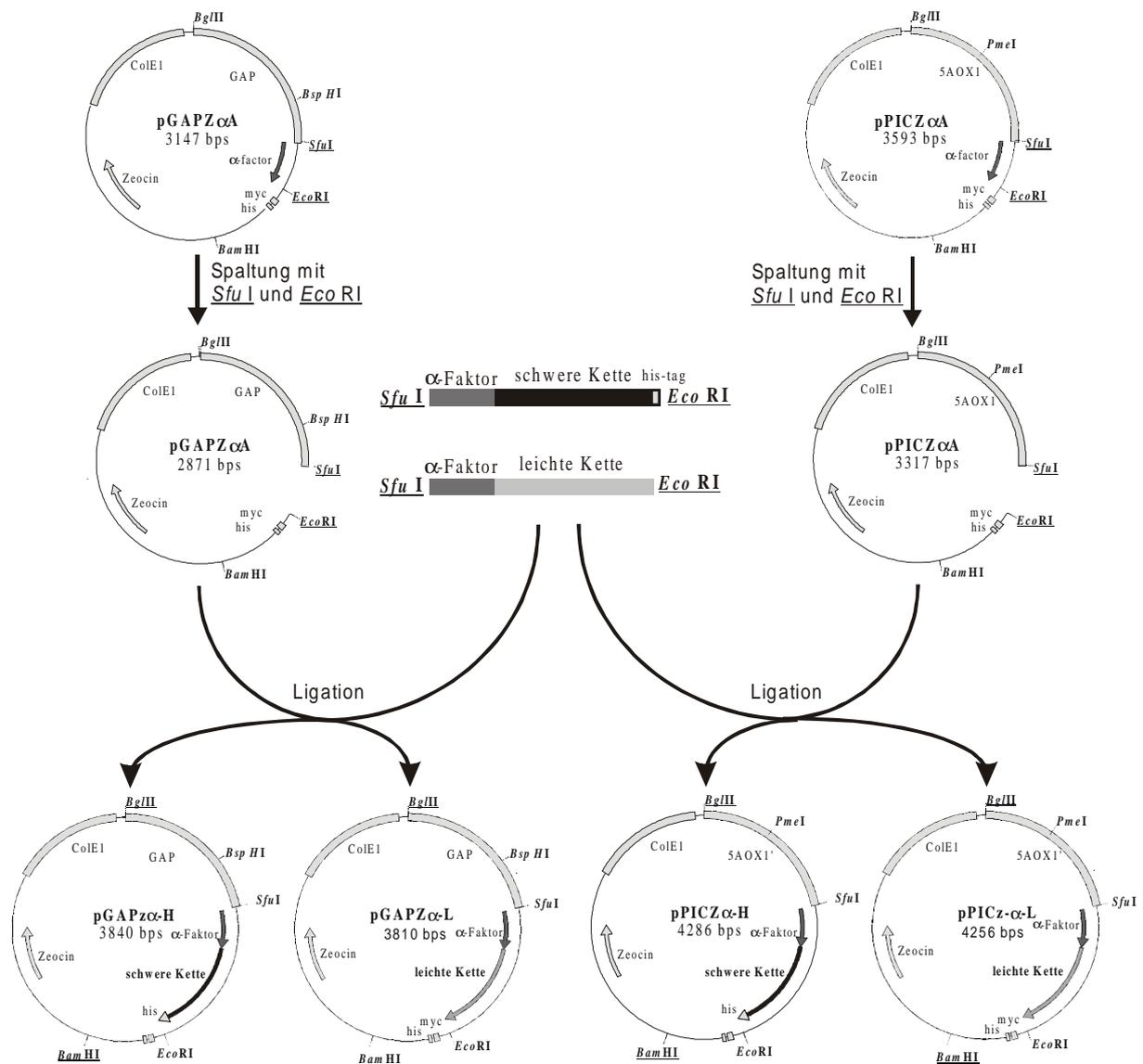


Abbildung 11: Strategie zur separaten Klonierung der beiden mit dem α -Faktor fusionierten AK-Gene in die Vektoren pGAPZ α A (links) bzw. pPICZ α A (rechts). Die Klonierung der beiden Fusionsgene in die Vektoren pGAPZ α A- Δ BspHI bzw. pPICZ α A- Δ PmeI erfolgte analog und ist hier nicht dargestellt.

Um nun rekombinante *Pichia*-Stämme zu erhalten, die die Gene beider Ketten unter Kontrolle desselben Promotors (GAPDH oder AOX1) chromosomal enthalten, wäre eine Kotransformation der beiden Vektoren pGAPZ α -L und pGAPZ α -H bzw. pPICZ α -L und pPICZ α -H möglich gewesen. Da mit der Zeocin-Resistenz der verwendeten Vektoren jedoch nur ein Selektionsmarker zur Verfügung stand, wäre nach erfolgter Integration einer Expressionskassette keine Positivselektion von Kotransformanden beider Expressionskassetten möglich gewesen. Aus diesem Grund wurden stattdessen in einem weiteren Klonierungsschritt die beiden Expressionskassetten der H- und L-Ketten in einem Vektor kombiniert: Dies erfolgte anhand der die Expressionskassetten einschließenden Restriktionsschnittstellen *Bam* HI und *Bgl* II, die zwar unterschiedliche Erkennungssequenzen (5-G'GATCC-3, 5-A'GATCT-3) besitzen, nach dem Schneiden jedoch aufgrund derselben entstehenden klebrigen Enden ligiert werden können. Zunächst wurden jedoch durch Quikchange-Mutagenese mit den *Primerpaaren* Mut-H-Bam807/Mut-H-Bam807-i, Mut-H-Bam1252/Mut-H-Bam1252-i und Mut-L-Bam942/Mut-L-Bam942-i zwei stille Mutationen in die H-Kette von pPICZ α -H und pGAPZ α -H (Positionen 807 und 1252) bzw. eine in die L-Kette von pPICZ α -L und pGAPZ α -L (Position 942) eingefügt, um dort zusätzlich vorhandene *Bam* HI Schnittstellen zu entfernen. Das Agarosegel in Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Kontrollverdauungen des Plasmids pGAPZ α -H mit der schweren Kette vor und nach den beiden Mutagenesen.

Da nach Kombination beider Expressionskassetten in einem Vektor auch die zur Transformation notwendige Linearisierungsschnittstelle *Bsp* HI (pGAPZ α A) bzw. *Pme* I (pPICZ α A) zweimal statt nur einmal vorhanden wäre, wurden durch weitere Quikchange-Mutagenese PCRs mit den *Primerpaaren* Mut-Gap- Δ BspHI / MutGap- Δ BspHI-i sowie Mut-Pic- Δ PmeI / Mut-Pic- Δ PmeI-i Varianten der Ausgangsvektoren ohne diese Schnittstellen hergestellt - pGAPZ α - Δ BspHI und pPICZ α - Δ PmeI - und die Expressionskassetten der H- und L-Kette auch in diese ligiert. Die Klonierung der beiden Expressionskassetten in diese Vektoren erfolgte analog zur Klonierung in pPICZ α A und pGAPZ α A (Abbildung 11) und wird deswegen nicht gesondert beschrieben.

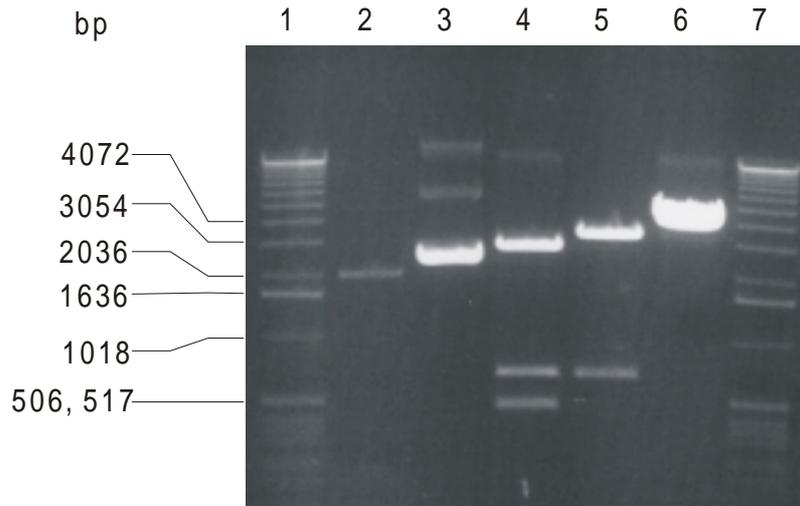


Abbildung 12: Kontrolle der Quikchange-Mutagenese nach Restriktionsverdauung des Plasmids pGAPZ α -H vor und nach den Mutagenesen. Die beiden Mutageneseschritte zur Entfernung der störenden *Bam* HI Schnittstellen wurden durch Kontrollverdauung mit *Bam* HI überprüft. Während der Ausgangsvektor pGAPZ α -H vor der Mutagenese aufgrund der beiden Schnittstellen innerhalb der H-Kette sowie der Schnittstelle am Ende des AOX-Terminationssignals 3 Banden aufwies (Spur 4), zeigten die Ein- und Zweifachmutanten (Spur 5 und 6) nur noch zwei bzw. eine Bande auf dem Agarosegel. Spuren 1 & 7: Längenstandard, Spur 2: pGAPZ α A zirkulär, Spur 3: pGAPZ α -H zirkulär, Spur 4: pGAPZ α -H/*Bam* HI, Spur 5: pGAPZ α -H-Mut1/*Bam* HI, Spur 6: pGAPZ α -H-Mut2/*Bam* HI.

Im letzten Klonierungsschritt wurde nun je eine Expressionskassette der H-Kette mit der einer L-Kette kombiniert. Hierzu wurden aus den Vektoren pPICZ α - Δ *Pmel*-L, pPICZ α - Δ *Pmel*-H, pGAPZ α - Δ *Bsp*HI-L und pGAPZ α - Δ *Bsp*HI-H die Expressionskassetten mit *Bgl* II und *Bam* HI ausgeschnitten und in einen mit *Bam* HI oder *Bgl* II linearisierten Vektor ligiert, wobei jeweils Kassetten mit und ohne Linearisierungsschnittstelle miteinander kombiniert wurden. Tabelle 15 zeigt die entsprechenden Ligationsansätze.

Tabelle 15: Ligationsansätze zur Herstellung der Heterodimere

| Ansatz | Vektor | Linearisierung | Insert aus | durch Verdau |
|--------|-------------------|----------------|---|------------------------------|
| 1 | pPICZ α -H | <i>Bam</i> HI | pPICZ α - Δ <i>Pmel</i> -L | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |
| 2 | pPICZ α -H | <i>Bgl</i> II | pPICZ α - Δ <i>Pmel</i> -L | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |
| 3 | pPICZ α -L | <i>Bam</i> HI | pPICZ α - Δ <i>Pmel</i> -H | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |
| 4 | pPICZ α -L | <i>Bgl</i> II | pPICZ α - Δ <i>Pmel</i> -H | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |
| 5 | pGAPZ α -H | <i>Bam</i> HI | pGAPZ α - Δ <i>Bsp</i> HI-L | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |
| 6 | pGAPZ α -H | <i>Bgl</i> II | pGAPZ α - Δ <i>Bsp</i> HI-L | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |
| 7 | pGAPZ α -L | <i>Bam</i> HI | pGAPZ α - Δ <i>Bsp</i> HI-H | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |
| 8 | pGAPZ α -L | <i>Bgl</i> II | pGAPZ α - Δ <i>Bsp</i> HI-H | <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II |

Aufgrund der mit *Bam* HI und *Bgl* II erzeugten kompatiblen, klebrigen Enden von Vektor und Insert, konnten die Inserts in zwei Orientierungen in den Vektor ligiert werden. Zusätzliche Variabilität entstand durch die Lage der Linearisierungsschnittstelle *Bsp* HI bzw. *Pme* I bzgl. der beiden Expressionskassetten. Somit ergab dies je nach Insertionsort und –orientierung der beiden Expressionskassetten zueinander und bzgl. der Linearisierungsschnittstellen für beide Vektorsysteme jeweils acht verschiedene Expressionsvektoren: pPICZ α -Fab1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -4a, -4b (Abbildung 13) und pGAPZ α -Fab1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -4a, -4b (nicht dargestellt). Nach Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* wurden aus mehreren Klonen je Transformationsansatz die Plasmide isoliert und die Orientierung und Lage der in den jeweiligen Expressionskassetten durch Restriktionsanalyse untersucht.

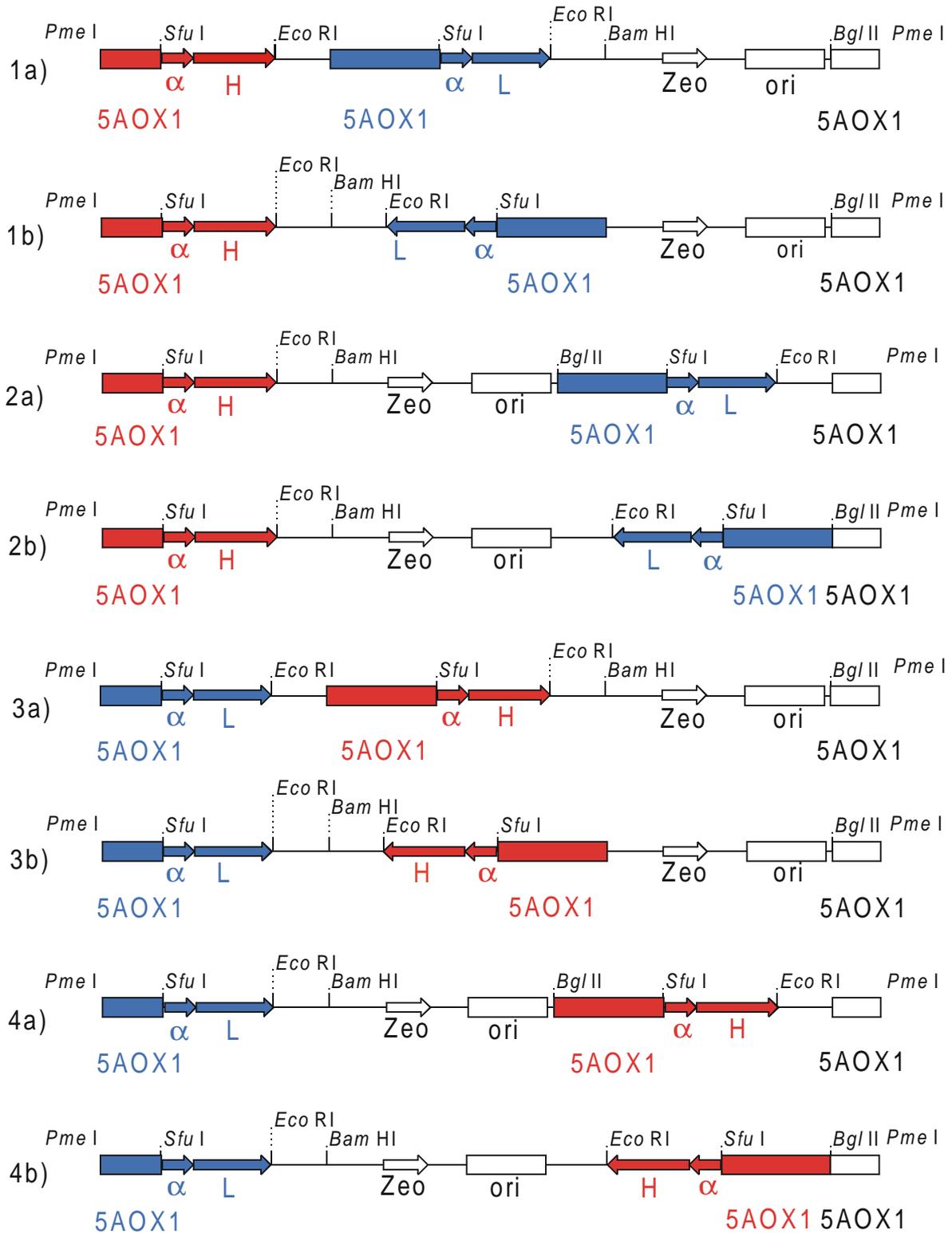


Abbildung 13: Theoretisch mögliche Anordnungen der beiden Expressionskassetten am Beispiel der Vektoren pPICZ α -Fab1a-4b nach Linearisierung in Pme I. Jeweils zwei Anordnungen (a und b) entstanden so aus den Ligationsansätzen 1 – 4 (Tabelle 15). Da bei den Vektoren pGAPZ α -Fab1a-4b lediglich ein anderer Promotor sowie eine andere Linearisierungsschnittstelle vorliegt, ergibt sich ein ähnliches Bild, das hier nicht dargestellt wird.

7.2.2 Expression des Fabs K411B in *P. pastoris*

7.2.2.1 Transformation der Expressionskassetten in *P. pastoris* GS115

Bei der Verwendung mehrerer Expressionskassetten zur Steigerung der Expressionsausbeute von monomeren Proteinen wird von Invitrogen empfohlen, sämtliche Expressionskassetten in derselben Orientierung ins Genom von *Pichia* zu integrieren. Aufgründessen wurden durch Restriktionsanalyse der bei den Ligationsansätzen (Tabelle 15) entstandenen Plasmide, diejenigen zur Transformation in *Pichia pastoris* GS115 selektiert, die beide Expressionskassetten in derselben Orientierung enthielten. In Abbildung 13 sind dies die Vektoren pPICZ α -Fab-1a, -2a, -3a und -4a; mit den Vektoren pGAPZ α -Fab1a-4b wurde entsprechend verfahren. Vor der Transformation wurden die Vektoren wie in Abbildung 13 dargestellt, mit *Pme* I linearisiert und anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gefolgt von einer Ethanol-fällung gereinigt. Die Transformation der so vorbereiteten Vektoren in *P. pastoris* GS115 lieferte nun jeweils ca. 50 - 100 Transformanden, die wie folgt benannt wurden: Die aus den verschiedenen Transformationsansätzen hervorgegangenen, rekombinanten *Pichia*-Klone sind im folgenden mit 1 – 8 bezeichnet, wobei die Klone 1 – 4 mit pPICZ α -Fab-1 bis -4 und die Klone 5 – 8 mit pGAPZ α -Fab-5 bis -8 transformiert wurden; verschiedene Klone aus demselben Transformationsansatz sind zusätzlich mit fortlaufenden Großbuchstaben gekennzeichnet. Die Namen pGAPZ α -Fab* bzw. pPICZ α -Fab* bezeichnen im folgenden die Klone allgemein ohne nähere Spezifikation der bei der Transformation verwendeten Expressionskassetten.

7.2.2.2 Kontrolle der genomischen Integration der Expressionskassetten

sowie des Integrationsphänotyps bezüglich der Methanolverwertung

Zunächst wurden mit je drei Kolonien der acht Transformationen, jeweils 25 ml YPD_{Zeo}-Medium inokuliert. Da jedoch nur die Klone 1C, 2B, 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C, 5A, 6A, und 7A angewachsen sind, wurden vor dem Hintergrund der klonalen Variation der Expressionsmenge in *Pichia* später weitere Klone von den Transformationsplatten gepickt und bzgl. der Expression der Fab-Fragmente untersucht.

Zur Kontrolle der genomischen Integration der Expressionskassetten wurde die chromosomale DNA der mit pPICZ α -Fab* transformierten Klone (1C, 2B, 3A, 3C, 4A,

4B und 4C) isoliert und diese durch PCR mit *Primern* spezifisch für die Gene der L-Kette (Fab-9, Fab-10) bzw. H-Kette (Fab-7, Fab-8) der Fab-Fragmente auf das Vorhandensein beider Gene untersucht. Durch Agarosegelelektrophorese konnten die beiden erwarteten PCR-Produkte für alle getesteten Klone eindeutig nachgewiesen werden, was in Abbildung 14 dargestellt ist. Da keine Klone gefunden wurden, die nur eine oder keine der beiden Expressionskassetten genomisch integriert hatten und die genomische Integration beider Kassetten somit anscheinend unabhängig von deren Anordnung funktioniert hat, wurde bei weiteren Klonen darauf verzichtet und stattdessen sofort die funktionelle Expression der Fab Fragmente im ELISA getestet.

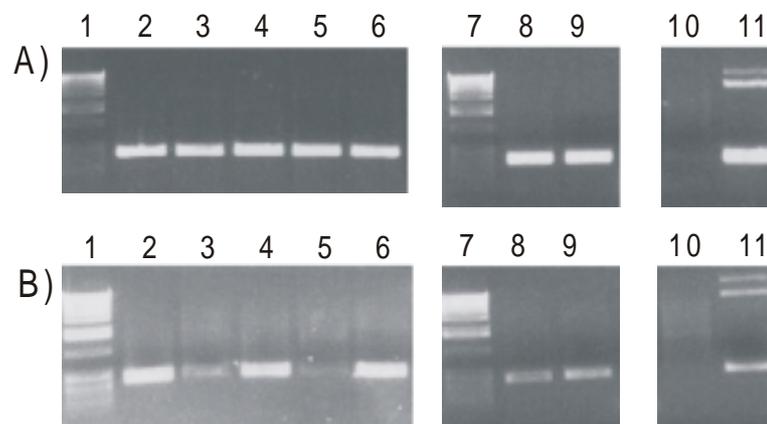


Abbildung 14: Die erfolgreiche genomische Integration der beiden Expressionskassetten wurde durch PCR mit spezifischen *Primern* und chromosomaler DNA als *template* nachgewiesen. Abbildung A) zeigt die PCR-Produkte, die mit *Primern* spezifisch für die leichte Kette erzielt wurden (379 bp), B) die, die mit *Primern* spezifisch für die H-Kette erhalten wurden (425 bp). Außer der Positiv- (pPICZ α -Fab, Spur 11) und Negativkontrolle (pPICZ α A, Spur 10) zeigt das Gel die folgenden Klone: Spur 2: 3A, Spur 3: 3B, Spur 4: 4A, Spur 5: 4B, Spur 6: 4C, Spur 8: 1C, Spur 9: 2B. Spuren 1 und 7: Längenstandard.

Um für die Expressionsversuche mit den Transformanten die die Expressionskassetten mit dem AOX1-Promotor enthalten geeignete Kultivierungsbedingungen zu finden, wurde die Art der Integration und damit die Fähigkeit Methanol als einzige C-Quelle zu verwerten (Mut-Phänotyp), untersucht. Hierzu wurden die Klone parallel auf Agarplatten mit Glycerol (BMGY) oder Methanol (BMMY) als C-Quelle ausplattiert und das Wachstumsverhalten analysiert. Alle Klone wuchsen auch auf dem Methanol-haltigen Medium gut und wiesen damit den bei GS115 bevorzugten Mut⁺-Phänotyp auf.

7.2.3 Expression und Nachweis der Fab-Fragmente

Nach diesen Vortests wurden zunächst mit allen GS115 Klonen Expressionsversuche im 50 ml Maßstab durchgeführt: Klone, die die Fab-Gene unter Kontrolle des konstitutiven GAPDH-Promotors enthalten (5A, 6A, und 7A), wurden dabei in YPD-Medium als *batch*-Kultur 4 Tage bei 30°C und 200 Upm inkubiert. Klone, die die Fab-Gene unter Kontrolle des methanolinduzierbaren AOX1-Promotors enthielten (1C, 2B, 3A, 3C, 4A, 4B und 4C), wurden zunächst 24 h in BMGY und dann zur Induktion der Expression weitere 96 h in BMMY kultiviert (30°C, 200 Upm).

Zur Identifikation der Klone, die die höchste Antikörperausbeute im Überstand liefern, wurden je 150 µl der Kulturüberstände vor sowie 48 und 72 Stunden nach Induktion (Klone 1C, 2B, 3A, 3C, 4A, 4B und 4C) bzw. Kultivierungsbeginn (Klone 5A, 6A, und 7A) mit 150 µl PBS gemischt und in einem ELISA (6.4.4) getestet, wobei jedoch auf die eigentliche Kompetitionsreaktion verzichtet wurde und stattdessen vor der Enzym-Substrat-Reaktion nur Atrazin-C₆-POD auf die mit anti-Maus-IgG beschichteten Mikrotiterplatten gegeben wurde. Wie in Abbildung 15 links zu sehen, zeigten fünf der getesteten Überstände ein eindeutiges Signal nach 48 und 72 Stunden Induktion (1C, 3A, 3C, 4A, 4C). Bei weiteren Expressionsversuchen konnten auch im Überstand von Klon 3B (hier nicht gezeigt) sowie in denen von vier zusätzlich gepickten Klonen (2D, 3D, 3E, 4D) eindeutig funktionell aktive Fab Fragmente nachgewiesen werden. Die Absorptionssignale, die mit den Überständen dieser Klone erzielt wurden, liegen deutlich höher als die, die mit den zuerst gepickten Klonen erreicht wurden. Da dies jedoch auch an anderen Parametern des ELISA liegt (Bsp. *Tracer*konzentration, Dauer der Substratreaktion, ...), kann von der Höhe dieser Signale nicht auf das Expressionslevel geschlossen werden.

Bei mehreren Wiederholungen dieser Expressionsversuche und ELISAs zeigten die Klone 1C, 2D, 3D, 3E, 4A und 4D die höchsten Fab-Expressionsmengen. Da hier kein Klon dabei ist, der die Fab-Fragmente unter Kontrolle des GAPDH-Promotors exprimiert, wurden diese aufgrund der offensichtlich geringeren Expressionslevel für weitere Versuche nicht mehr herangezogen.

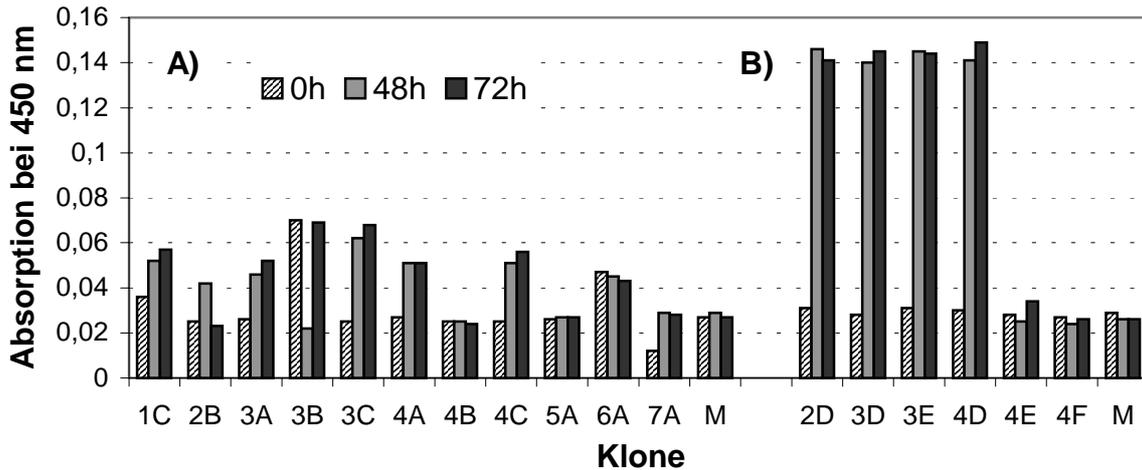


Abbildung 15: Screening der *Pichia*-Klone nach Fab-Expression durch ELISA. Die zur Erstellung des Diagramms verwendeten Daten stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Expressionsversuche mit den Klonen A) und B) sowie die ELISAs mit den jeweiligen Überständen erfolgten zu verschiedenen Zeiten und können deswegen nicht direkt miteinander verglichen werden. Abkürzungen: 1A – 4F: Klone mit den Fab-Genen unter Kontrolle des AOX1-Promotors; 5A, 6A, 7A: Klone mit den Fab-Genen unter Kontrolle des konstitutiven GAPDH-Promotors; M: Medium als Negativkontrolle.

Je 10 µl Überstand der Klone, die im ELISA ein Signal zeigten, wurden nun durch SDS-PAGE auf das Vorhandensein von Proteinbanden untersucht. Durch Coomassie-Färbung konnten jedoch zunächst keine Proteinbanden der zu erwartenden Größen der L- und H-Kette eindeutig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Das berechnete Molekulargewicht beträgt für die H-Kette mit (His)₆-tag 25,0 kDa und für die L-Kette 24,1 kDa. Deshalb wurden in weiteren Experimenten zum einen die in den Kulturüberständen vorhandenen Proteine durch TCA-Fällung vor dem Auftragen 10-fach konzentriert (Abbildung 16A) und zum andern durch Verwendung von Serva Violett statt Coomassie Brilliant Blue die Sensitivität der Färbung erhöht (Abbildung 16B). Beide Strategien führten wie auf den beiden SDS-Gelen zu sehen, nur in den Spuren mit Überständen induzierter Kulturen zu Proteinbanden von knapp 30 kDa. Der eindeutige Nachweis, daß die Proteinbanden auf den SDS-Gelen tatsächlich den sekretierten Fab-Fragmenten entsprechen, konnte anschließend durch einen Western Blot mit einem Antikörper gegen das C-terminale (His)₆-tag der schweren Kette erbracht werden, was in Abbildung 17 exemplarisch für Klon 2D dargestellt ist. Erwartungsgemäß ist auf dem Blot unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) nur in den Spuren mit Überständen nach Induktion (4) eine Bande derselben Größe (~30 kDa) wie auf dem SDS-Gel nachweisbar. Die Spuren mit Überständen vor Induktion (0) zeigten dagegen keine

Signale. Auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte nur nach Induktion eine Expression nachgewiesen werden. Unter diesen Bedingungen tauchten allerdings zwei Banden auf, von denen die untere bei ca. 25 kDa der freien, nicht durch eine Disulfidbrücke mit der leichten Kette verknüpften, schweren Kette entspricht; die obere bei ca. 45 kDa dagegen dem kompletten Fab-Fragment.

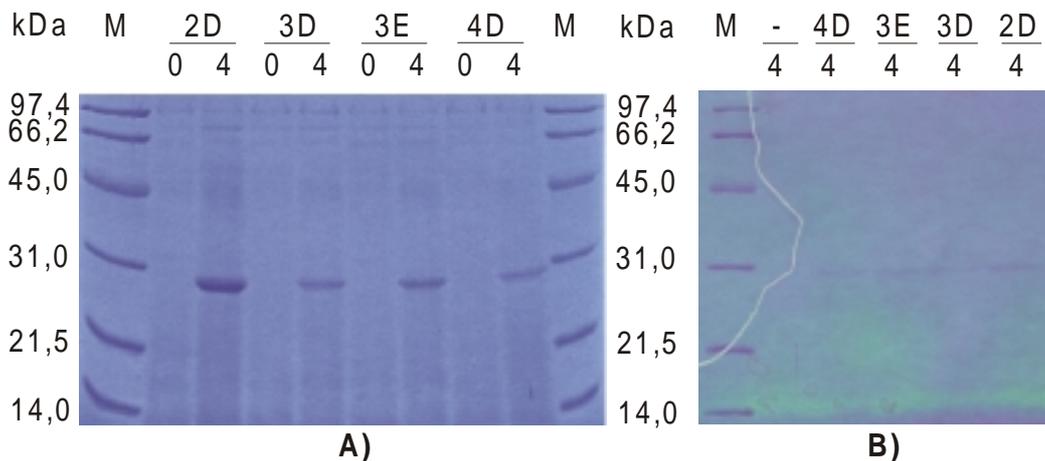


Abbildung 16: Nachweis der Fab-Fragmente durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. In Gel A) wurden neben dem Molekulargewichtsstandard (M) 10-fach konzentrierte Kulturüberstände einiger mit pPICZ α -Fab* transformierter Klone jeweils vor (0) und nach (4) 4-tägiger Induktion aufgetragen; die Färbung des Gels erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue. In Gel B) wurden nicht-konzentrierte Kulturüberstände derselben rekombinanten Klone wie in A) sowie einer Negativkontrolle (*P. pastoris* GS115/pPICZ α A) nach 4 Tagen Induktion aufgetragen; die Färbung erfolgte mit SERVA Violett.

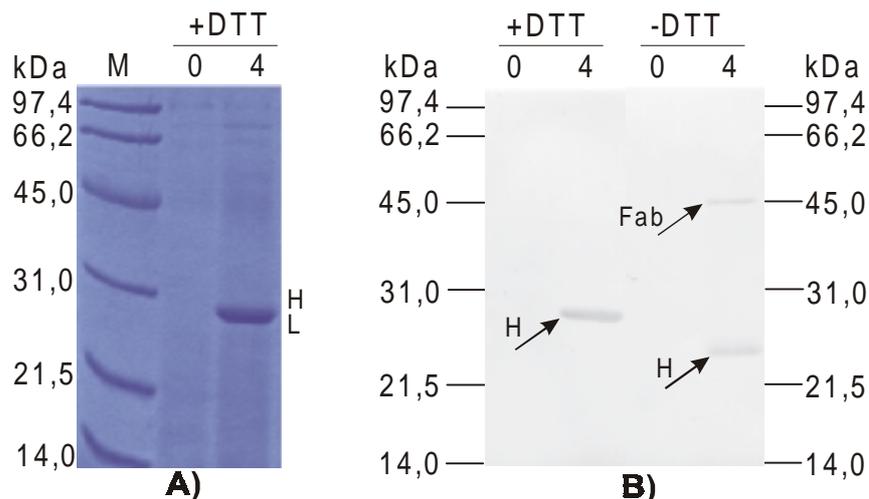


Abbildung 17: SDS-Gel (A) und Western Blot (B) der von Pichia sekretierten Fab-Fragmente. Zur Bestimmung des Anteils kompletter Fab-Fragmente wurde die SDS-PAGE unter reduzierenden (+DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) durchgeführt. Dargestellt sind die Spuren mit Kulturüberständen von *P. pastoris* GS115/pPICZ α -Fab, Klon 2D, vor (0) und 4 Tage nach Induktion (4).

7.2.4 Bestimmung der Bindungseigenschaften der Fab-Fragmente

Verschiedene Bindungscharakteristika wie Testmittelpunkte, Nachweisgrenzen und Kreuzreaktivitäten für den Nachweis von Atrazin und anderen s-Triazinen erfolgten mit dem in Kapitel 6.4.4 beschriebenen kompetitiven ELISA. Dieser beruht auf der Competition um die Fab-Bindungsstellen zwischen dem Analyten und einem Peroxidase-markierten Analyten, dem *Tracer-Molekül*, das im letzten Schritt des ELISA eine Farbreaktion katalysiert.

7.2.4.1 Herstellung des Atrazin-POD-Tracer

Der Atrazin-POD-Tracer wurde wie in 6.5.1 beschrieben synthetisiert und anschließend durch eine Gelfiltration von überschüssigem, nicht gebundenem Atrazin-C₆ gereinigt. Um bei der Aufreinigung eine Überladung der Gelfiltrationssäule zu vermeiden wurden mehrere Synthese-Reaktionen mit verschiedenen Mengen POD durchgeführt. Eine Trennung des *Tracers* von nicht oder nur unvollständig mit Atrazin-C₆ gekoppelter Peroxidase ist so nicht möglich, da der Molekulargewichtsunterschied für eine Auftrennung durch Gelfiltration zu gering ist. Dies stört jedoch im ELISA nicht, da die POD ohne Atrazinreste nicht an die immobilisierten Antikörperfragmente bindet und durch die Waschschriffe aus der Lösung entfernt wird. Wichtig ist hier vor allem, daß nicht-gebundenes Atrazin-C₆ aus der Lösung entfernt wird, da dieses an die Ak binden könnte und so das Ergebnis beeinflussen würde. Die Bestimmung der gewünschten Elutionsfraktionen, die den *Tracer* (Absorptionsmaximum bei 220 nm) ohne freies Atrazin (Absorptionsmaximum bei 260 nm) enthalten, wurde durch photometrische Messung der verschiedenen Fraktionen sichergestellt. Wie in Abbildung 18 zu sehen, sind dies die Fraktionen, die die Säule zuerst verlassen. Für die darauffolgenden ELISAs wurden ohne vorherige Bestimmung der Kopplungsausbeute die Fraktionen 3-5 des Ansatzes mit 2 mg POD, die Fraktionen 4-7 des Ansatzes mit 1 mg POD und die Fraktionen 6 und 7 des Ansatzes mit 0,5 mg POD verwendet. Damit wurden die Fraktionen mit hohem *Tracer*-Anteil gewählt, und gleichzeitig sichergestellt, daß kein ungekoppeltes Atrazin-C₆ vorhanden war.

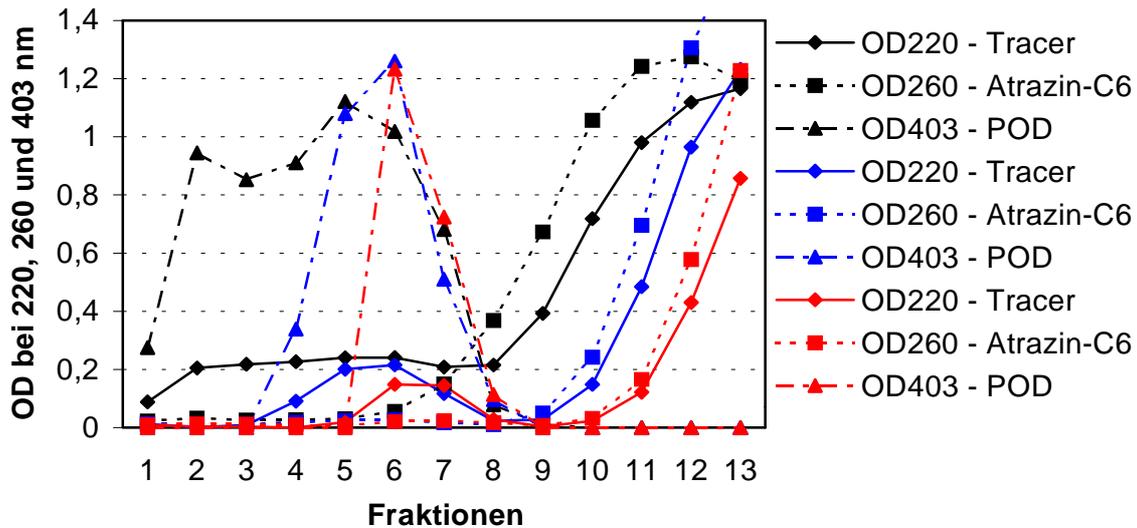


Abbildung 18: Aufreinigung der Atrazin-POD-Tracer aus drei Synthese-Reaktionen, die mit unterschiedlichen Mengen POD erfolgten, durch Gelfiltration. Für die 3 Reaktionen wurden 0,5 mg (rot), 1 mg (blau) und 2 mg POD (schwarz) eingesetzt. Nach photometrischer Messung der Elutionsfraktionen der 3 Reaktionsprodukte zeigte sich, daß bei Verwendung von 2 mg POD die Säule bereits überladen ist. Dies ist daran zu erkennen, daß zum einen die POD (\blacktriangle , OD_{403}) bzw. der POD-Tracer (\blacklozenge , OD_{220}) bereits in der ersten Elutionsfraktion enthalten ist, zum anderen die OD_{220} vor Elution des ungebundenen Atrazins (\blacksquare , OD_{260}) nicht mehr auf Null zurück geht.

7.2.4.2 Messung der Bindungseigenschaften im kompetitiven ELISA

Zur Bestimmung der Bindungseigenschaften wurden zunächst die Kulturüberstände der *Pichia*-Klone 1C, 2D, 3A, 3B, 3C, 3D 4A, 4C, und 4D mit den verschiedenen Orientierungen der Expressionskassetten (Abbildung 13) direkt ohne vorherige Konzentrierung oder Reinigungsschritte in einem kompetitiven ELISA getestet, dessen Ergebnis in Abbildung 19 dargestellt ist. Wie in Teilabbildung A zu sehen, zeigten alle bis auf einen (Klon 3D) der getesteten Überstände die erwartete, für kompetitive Bindungsassays charakteristische, sigmoidale Bindungskurve. Die maximalen Absorptionswerte (in Abwesenheit von Atrazin) variierten jedoch stark, was durch unterschiedliche Antikörperkonzentrationen in den Überständen und damit Expressionsmengen bedingt ist. Die Normalisierung dieser sigmoidalen Bindungskurven (Abbildung 19B) erlaubte dann die Bestimmung der Testmittelpunkte (IC_{50}) für den Nachweis von Atrazin. Die sich nahezu deckenden Bindungskurven ergaben einheitlich einen Testmittelpunkt von ca. $2,8 \mu\text{g l}^{-1}$ Atrazin für die Fab-Fragmente aus allen Überständen.

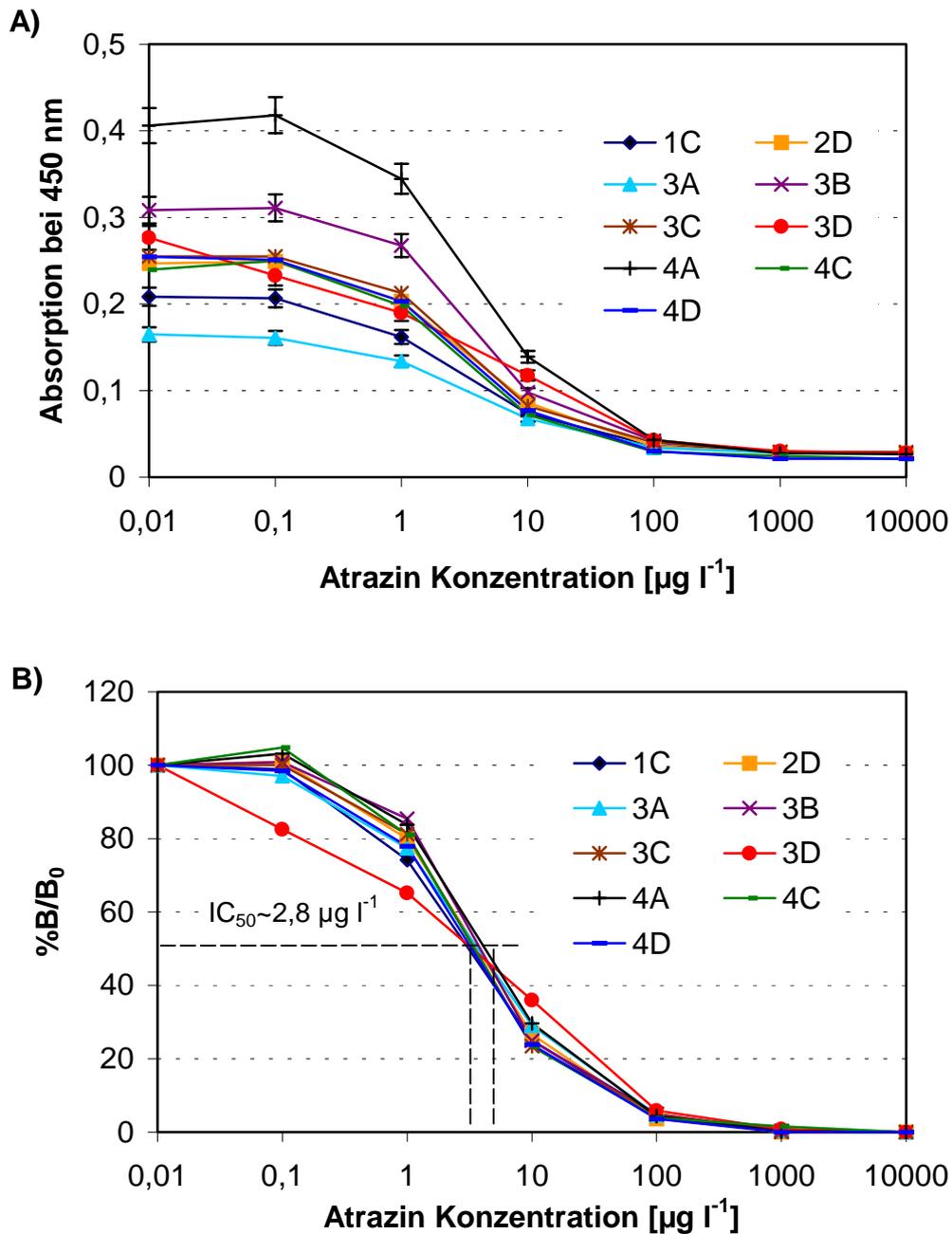


Abbildung 19: Bestimmung der sigmoidalen Bindungskurven mit Fab-Fragmenten aus den Überständen verschiedener *Pichia*-Klone. Die Standardkurven in (A) wurden der Vergleichbarkeit wegen normalisiert (B).

Die weitere Charakterisierung der Fab-Fragmente von *Pichia* erfolgte aufgrund der hohen Expressionsausbeute mit den Überständen von Klon 4A. Nach Messung der Bindungskurven und deren Normalisierung für weitere s-Triazine (Abbildung 20A), konnten die Kreuzreaktivitäten diesen gegenüber (Abbildung 20B) berechnet werden. Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten des in *Pichia* hergestellten Axs wurden nur die s-Triazine einbezogen, gegenüber denen auch der parentale,

monoklonale Antikörper der Zelllinie K4E7 sowie die entsprechenden rekombinant in *E. coli* hergestellten scFvs, eine signifikante Kreuzreaktivität (>1%) besitzen (Giersch, 1993). Dies sind im einzelnen Cyanazin, Terbutylazin, Propazin, Desethylatrazin und Simazin.

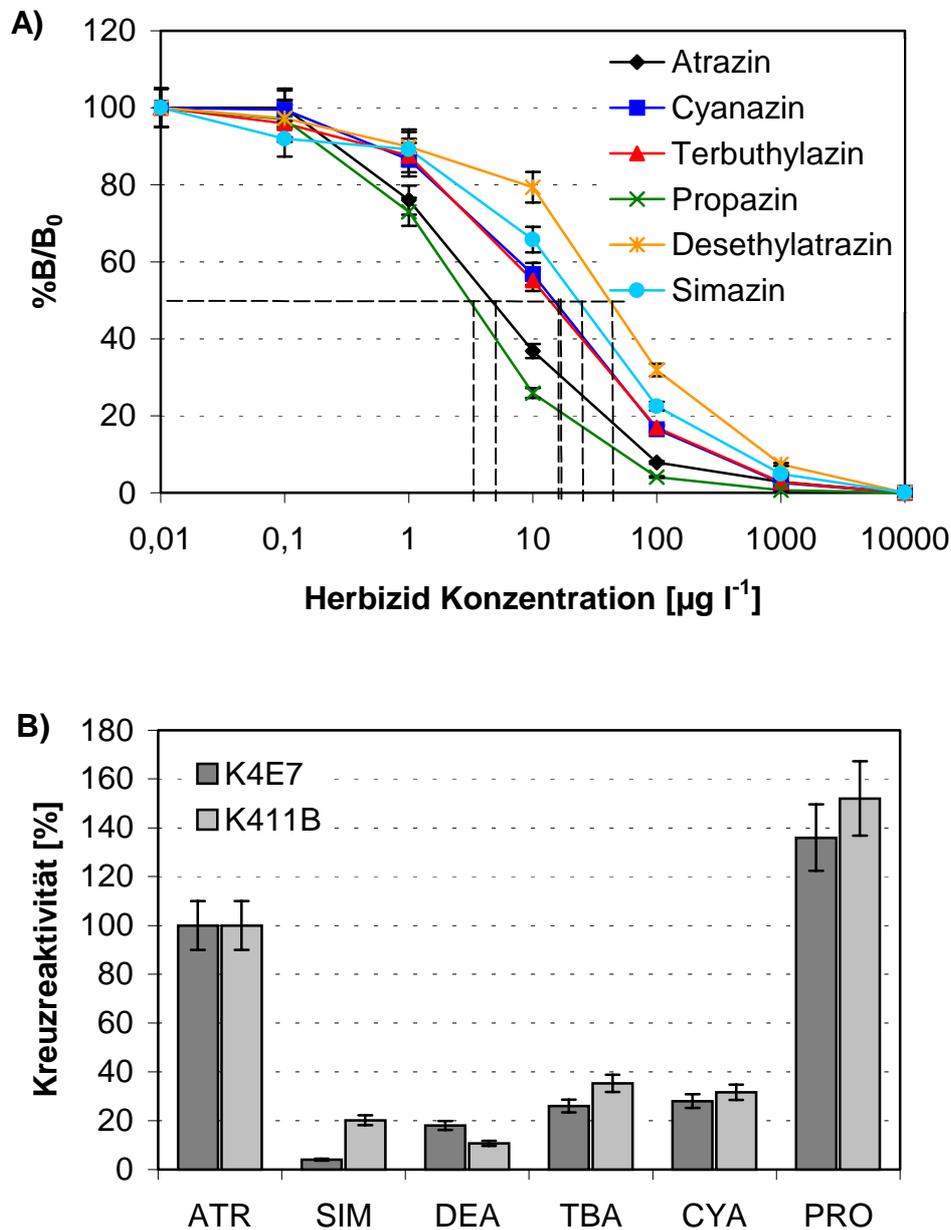


Abbildung 20: Bestimmung der Kreuzreaktivitäten des Fab-Fragmentes K411B des Klons 4A im Vergleich zu denen des parentalen, monoklonalen Antikörpers der Zelllinie K4E7 (Giersch, 1993). In A) sind die normalisierten Bindungskurven dargestellt, aus denen sich die in B) gezeigten Kreuzreaktivitäten ergeben. ATR: Atrazin, SIM: Simazin, DEA: Desethylatrazin, TBA: Terbutylazin, CYA: Cyanazin, PRO: Propazin.

Die Messung der Testmittelpunkte ergab für Atrazin 4,6 µg l⁻¹, für Propazin 3,0 µg l⁻¹, für Terbutylazin 13,1 µg l⁻¹, für Cyanazin 14,6 µg l⁻¹, für Simazin 22,8 µg l⁻¹

und für Deethylatrazin $43,0 \mu\text{g l}^{-1}$. Die sich daraus ergebenden Kreuzreaktivitäten von 152% für Propazin, 35,3% für Terbutylazin, 31,58% für Cyanazin, 20,19% für Simazin und 10,7% für Desethylatrazin sind wie in Abbildung 20B zu sehen, mit denen des entsprechenden parentalen, monoklonalen Antikörpers der Zelllinie K4E7 vergleichbar.

7.2.5 Kultivierung im Bioreaktor und Bestimmung der Proteinmenge

Eine relativ einfache Möglichkeit zur Erzielung höherer Ausbeuten an rekombinanten Proteinen ist die Kultivierung im Bioreaktor. Die wesentlichen Unterschiede zur Schüttelkolbenkultivierung sind bei der Kultivierung im Fermenter zum einen die genau definierbaren Kultivierungsbedingungen wie Belüftung, pH, Temperatur, u.s.w., zum andern das deutlich größere Kulturvolumen. Um dies auszunutzen wurden mit dem Klon 4A wie im Methodenteil beschrieben *fed-batch*-Fermentationen in einem 5l-Bioreaktor durchgeführt. Diese erfolgten unter denselben Bedingungen wie die Schüttelkolbenkultivierungen, wobei der pH jedoch nicht durch Pufferung des Mediums sondern durch Titration mit Schwefelsäure bzw. Ammoniumhydroxid (jeweils 5%(V/V)) konstant gehalten wurde. Während der 4 – 5-tägigen Kultivierung wurden täglich Proben gezogen, die durch SDS-PAGE und ELISA analysiert wurden.

Nach Beendigung der Fermentation wurde die Ausbeute der in den Überstand sekretierten Fab-Fragmente densitometrisch anhand eines SDS-Gels bestimmt: Als Referenz diente die Carboanhydrase des Molekulargewichtsmarkers, der in verschiedenen Konzentrationen auf dasselbe Gel aufgetragen wurde. Nach Erstellung einer Eichgerade anhand der densitometrischen Vermessung der Banden der Carboanhydrase konnte die Konzentration der Fabs' im Überstand zu $40 \mu\text{g l}^{-1}$ bestimmt werden.

Desweiteren wurde densitometrisch der Anteil der H- und L-Ketten bestimmt, die als komplette Fab-Fragmente sekretiert wurden. Hier ergab sich ein Wert von ca. 30 %.

7.2.6 Optimierung der Fab-Expressionskassette

Um den in Kap. 7.2.1 beschriebenen Vektor pPICZ α -Fab* zur sekretorischen Expression von Fab-Fragmenten mit beliebigen Spezifitäten nutzen zu können, wurde er wie folgt modifiziert: Der Vektor enthält die Antikörper-Gensequenzen aus dem Vektor pASK-K411B jeweils als Fusion mit dem α -Faktor und somit auch die

Restriktions-Schnittstellen *Pst* I, *Bst* EII, *Sac* I und *Xho* I, mit denen die variablen Domänen gezielt ausgeschnitten und durch andere ersetzt werden können (Abbildung 21). Um dies auch in dem *Pichia*-Vektor pPICZ α -Fab* zu ermöglichen, mußten hier jedoch die zusätzlich im Promotorbereich, in der α -Faktor-Sequenz sowie in der Terminationsregion vorkommenden Schnittstellen *Sac* I und *Xho* I entfernt werden.

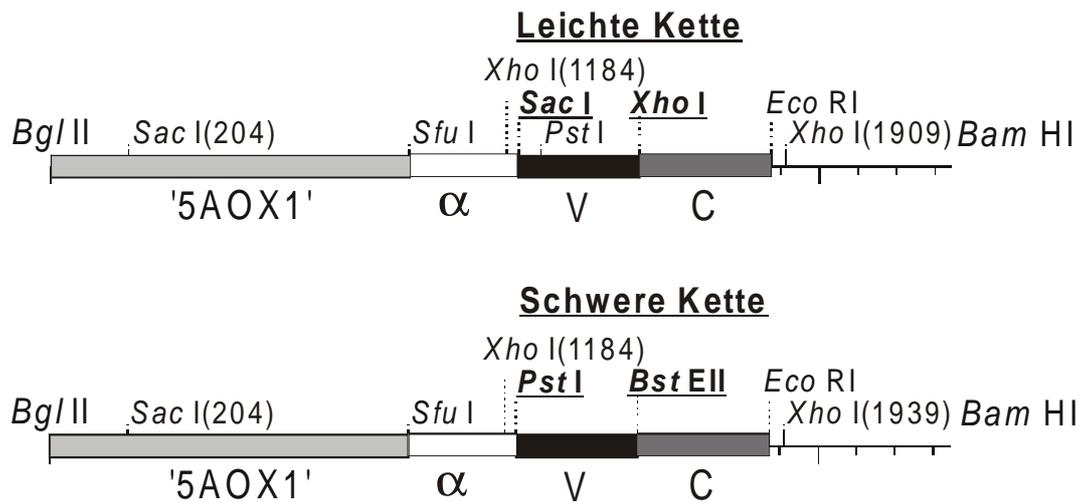


Abbildung 21: Expressionskassetten der schweren und leichten Kette von Fab K411B (nicht maßstabsgetreu). Um die beiden Expressionskassetten universell zur Expression von Fab-Fragmenten mit anderen variablen Domänen und damit Spezifitäten nutzen zu können mußten die Schnittstellen *Sac* I (204) der schweren Kette und *Xho* I (1184, 1909) der leichten Kette entfernt werden. Die Positionsnummern beziehen sich hier auf die Monomervektoren, in die die Mutationen eingeführt wurden. V: variable Domäne; C: Konstante Domäne; α : α -Faktor-Signalsequenz. Die zur Expressionskassette gehörenden Schnittstellen sind fett und unterstrichen dargestellt, die zu entfernenden Schnittstellen sind fett dargestellt sowie mit der Positionsnummer versehen.

Dies erfolgte durch ortsspezifische Mutagenese der Monomervektoren pPICZ α - Δ Pme-H, pPICZ α - Δ Pme-L, pPICZ α -H und pPICZ α -L mittels *Quikchange*-PCR (Kapitel 6.3.3.2.1) mit den *Primer*kombinationen Mut-Pic- Δ Sac204 / Mut-Pic- Δ Sac204-i, Mut-Pic- Δ Xho1184 / Mut-Pic- Δ Xho1184-i und Mut-Pic- Δ Xho1909 / Mut-Pic- Δ Xho1909-i.

Da die Deletion der *Xho* I Schnittstelle an Position 1909 durch *Quikchange*-PCR nicht funktionierte, wurde nach Deletion der beiden Schnittstellen *Sac* I (204) und *Xho* I (1184) zur Deletion dieser verbliebenen Schnittstelle eine andere Strategie gewählt: Durch eine Partialverdauung mit *Xho* I wurden die Plasmide, die noch zwei *Xho* I Schnittstellen enthielten, statistisch an einer der beiden Positionen geschnitten und damit linearisiert und anschließend einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen. Die Religation der Plasmide führte schließlich zur Zerstörung der

Linearisierungsschnittstelle durch Insertion von 4 zusätzlichen Nukleotiden was in Abbildung 22 dargestellt ist.

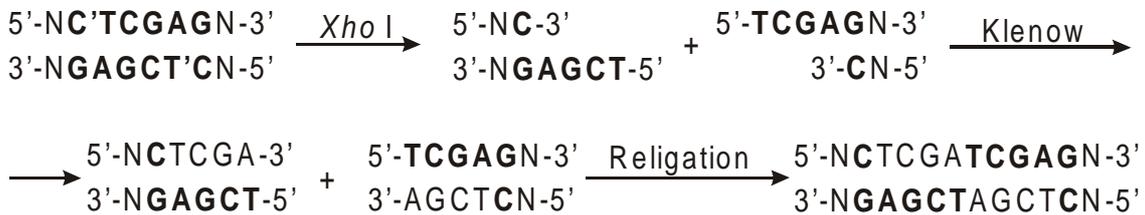


Abbildung 22: Die Strategie zur Deletion einer von zwei Xho I Schnittstellen beruht auf der Xho I Partialverdauung gefolgt von Klenow-Behandlung und Religation des linearisierten Plasmids. Die zu deletierende Schnittstelle Xho I bzw. die sie ursprünglich bildenden Nukleotide sind fett dargestellt.

Nach der Mutagenese wurden die so entstandenen Plasmide pPICZ α -H- Δ Sac204- Δ Xho1184- Δ Xho1909 und pPICZ α - Δ Pme-L- Δ Sac204- Δ Xho1184- Δ Xho1909 durch Restriktionsanalysen sowie Sequenzierungen mit den *Primern* 5ALPHA und 3AOX kontrolliert. Sie können nun wieder wie in Kapitel 7.2.1 beschrieben in einem Vektor kombiniert werden; im Rahmen dieser Arbeit wurden sie jedoch durch Austausch der variablen Domänen des Fabs K411B durch die eines 2,4-D spezifischen Fabs zur Expression dieses anti-2,4-D-Fab Fragmentes verwendet, was im folgenden Kapitel beschrieben wird.

7.2.7 Expression und Charakterisierung des 2,4-D spezifischen Fab-Fragmentes

Die Validierung der modifizierten Vektoren sollte durch Expression eines 2,4-D-spezifischen Fab-Fragments erfolgen. Dazu wurden aus pPICZ α -H- Δ Sac204- Δ Xho1184- Δ Xho1909 und pPICZ α - Δ Pme-L- Δ Sac204- Δ Xho1184- Δ Xho1909 die variablen Domänen mit den Restriktionsenzymen *Pst* I und *Bst* EII (H-Kette) bzw. *Sac* I und *Xho* I (L-Kette) ausgeschnitten und durch die eines 2,4-D-spezifischen Antikörperfragments ersetzt. Letztere stammen aus dem Vektor pASK-Fab24D und wurden mit denselben Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in die beiden *Pichia*-Vektoren ligiert. Nach Kontrolle der entstandenen Vektoren pPICZ α -L-24D und pPICZ α -H-24D durch analytische Restriktionsverdauungen wurden die beiden Expressionskassetten wie für das Atrazin-spezifische Fab-Fragment K411B beschrieben (Kapitel 7.2.1) mit Hilfe der Schnittstellen *Bgl* II und *Bam* HI in einem Plasmid (pPICZ α -Fab24D) kombiniert. Zur Transformation in *Pichia* wurde wiederum

nur der Vektor gewählt, der beide Expressionskassetten in derselben Orientierung enthält. Schließlich wurden mit 16 rekombinanten *Pichia*-Transformanten Expressionsversuche durchgeführt und die Überstände durch den in Kapitel 6.4.4 beschriebenen kompetitiven ELISA auf Expression der Fab-Fragmente untersucht (Abbildung 23).

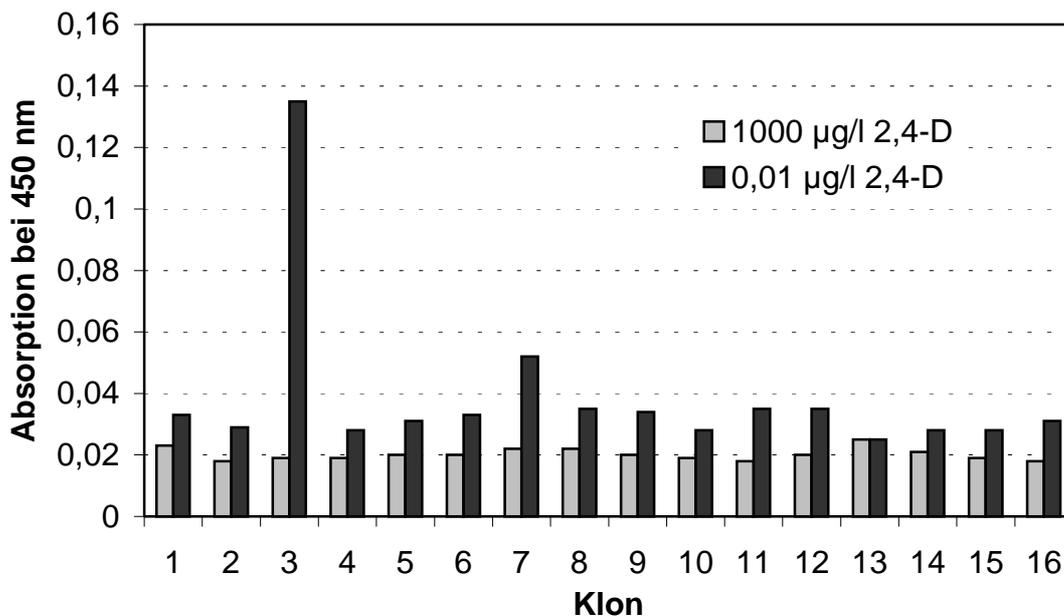


Abbildung 23: Screening nach rekombinanten *Pichia*-Klonen, die 2,4-D spezifische Fab-Fragmente sekretieren. Dargestellt sind für jeden Klon die Absorptionswerte des kompetitiven ELISA bei 2,4-D Konzentrationen von 0,01 µg l⁻¹ und 1000 µg l⁻¹. Obwohl nur jeweils ein Messwert aufgetragen ist, kann ein Fehler ausgeschlossen werden, da im Vergleich zur vollständigen Konkurrenz durch 10000 µg l⁻¹ 2,4-D auch mit 2,4-D Konzentrationen von 0, 0,01, 0,1, 1 und 10 µg l⁻¹ erhöhte Absorptionswerte gemessen wurden. Am beispiel der sigmoidalen Bindungskurven der Klone 3 und 7 ist dies in Abbildung 24 gezeigt.

Hierbei wurden für jeden Klon die Absorptionswerte bei 2,4-D-Konzentrationen von 0,01 µg l⁻¹ und 1000 µg l⁻¹ aufgetragen. Wie in Abbildung 23 zu sehen konnten ohne ausreichende Konkurrentkonzentration in den Überständen fast aller Klone erhöhte Absorptionswerte und damit das Vorhandensein von Fab-Fragmenten nachgewiesen werden. Aufgrund der insgesamt dennoch sehr niedrigen absoluten Absorptionswerte, entweder infolge geringer Expressionslevel oder geringer Stabilität der exprimierten Fab Fragmente, konnte nur mit den Überständen der Klone 3 und 7 die für den kompetitiven ELISA typischen sigmoidalen Bindungskurven erstellt werden (Abbildung 24). Aus den normalisierten Standardkurven (Abbildung 24B) ergibt sich ein Testmittelpunkt von ca. 10 µg l⁻¹ 2,4-D. Die nahezu

übereinstimmenden Ergebnisse der beiden Klone ist insbesondere unter Berücksichtigung des niedrigen Signals von Klon 7 bemerkenswert.

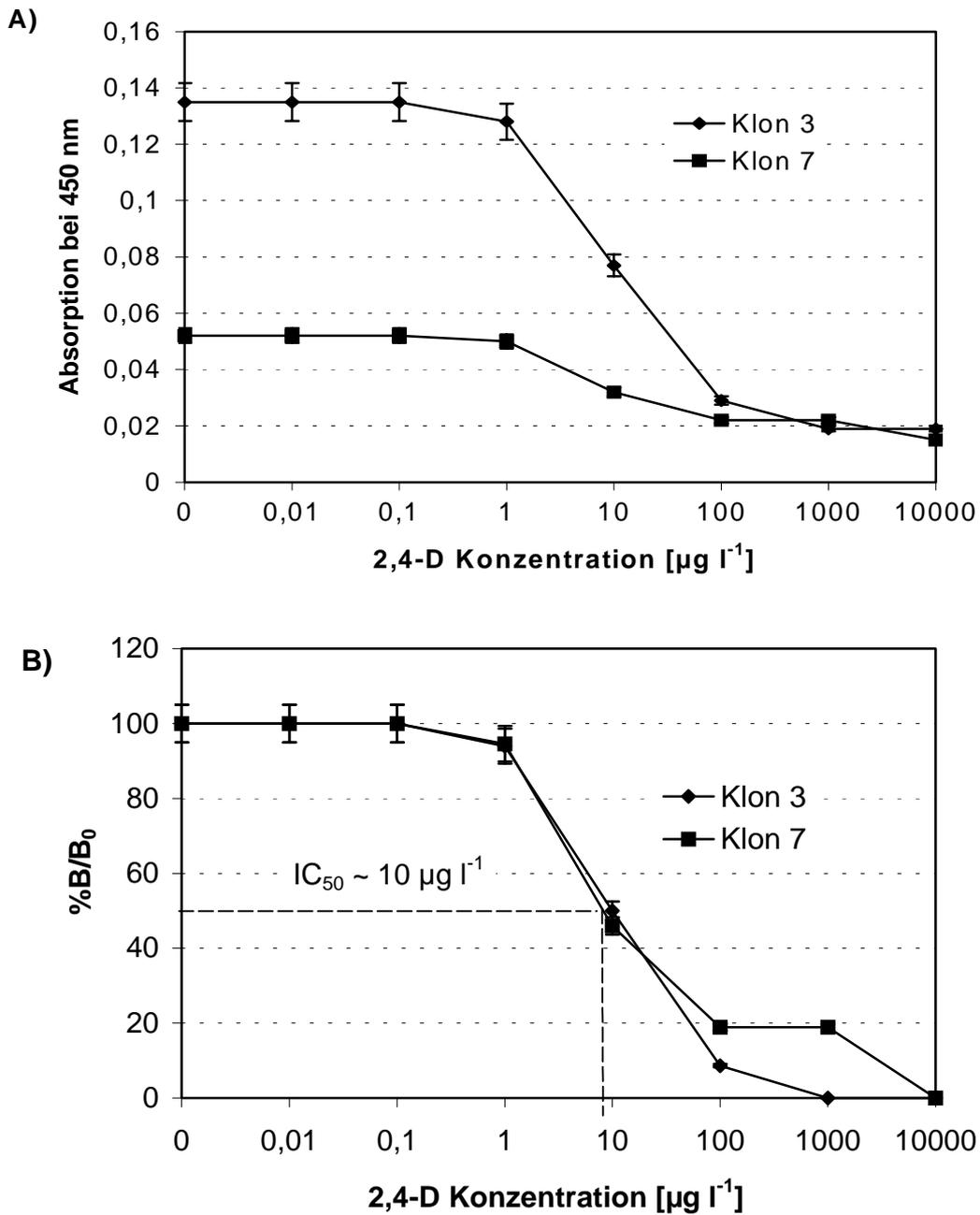


Abbildung 24: Kalibrationskurven der 2,4-D spezifischen Fab-Fragmente zur Detektion von 2,4-D im kompetitiven ELISA vor (A) und nach (B) Normalisierung.

7.2.8 Expression des scFvs K411B

Nach der erfolgreichen sekretorischen Expression der Fab-Fragmente in *P. pastoris* sollte auch das entsprechende scFv K411B sekretorisch in *Pichia* exprimiert werden. Das Genkonstrukt des scFvs, das aus den durch einen $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ -Linker miteinander verknüpften, variablen Domänen des Fab-Fragmentes in der Orientierung $V_H\text{-Linker-}V_L$ besteht, wurde von Dr. Karl Kramer (TU München) in dem Phagemidvektor pCANTAB5E kloniert zur Verfügung gestellt. Zur Expression in *Pichia* war es also lediglich notwendig, das Gen durch PCR aus diesem Ausgangsvektor zu amplifizieren und *in frame* hinter den α -Faktor der *Pichia*-Expressionsvektoren zu klonieren. Dies erfolgte durch eine PCR mit den Primern scFv-1f und scFv-2r, die so gewählt wurden, daß zum einen das Stop-Codon nicht mit amplifiziert wurde, so daß in den fertigen Konstrukten (Abbildung 25) ein Fusionsgen mit den in pGAPZ α und pPICZ α vorhandenen C-terminalen Myc- und His)₆-tags entstand, zum andern die Klonierungsschnittstellen *Eco* RI und *Not* I 5'- bzw. 3'-seitig eingefügt wurden. Nach Linearisierung an der *Pme* I bzw. *Bsp* HI Schnittstelle in der Promotorregion wurden beide Plasmide (pGAPZ α -scFv-K411B und pPICZ α -scFv-K411B) in *P. pastoris* X33 transformiert.

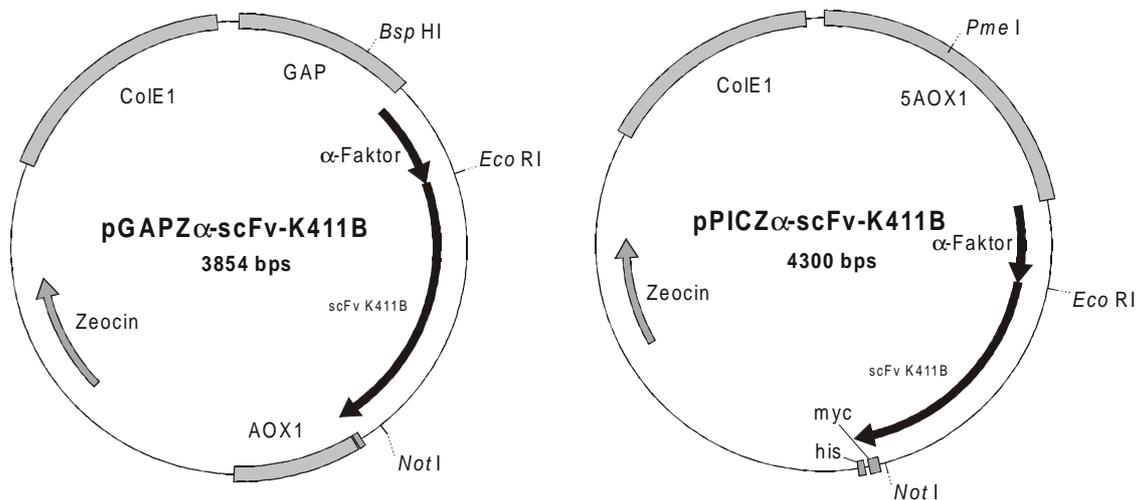


Abbildung 25: Expressionsvektoren zur Expression des scFvs K411B in *Pichia pastoris*. ColE1: *E. coli* Replikationsursprung, Zeocin: Zeocin-Resistenz, AOX1: Terminationsregion, GAP: GAPDH-Promotor, his: (His)₆-tag, myc: myc-tag. Die Terminationsregion AOX1 sowie die beiden C-terminalen Tags sind in beiden Vektoren enthalten.

7.2.8.1 Expression, Nachweis und Charakterisierung des „wt“-scFvs

Von beiden Konstrukten wurden jeweils fünf Transformanten für Expressionsexperimente gemäß 6.2.8.1 gewählt und die Überstände der Kulturen durch SDS-PAGE, Western Blot und ELISA analysiert. Während selbst in den konzentrierten Überständen der Klone mit pPICZ α -scFv-K411B nach SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue nur extrem schwache Banden detektiert werden konnten (hier nicht gezeigt), waren in den konzentrierten Überständen von vier Klonen mit pGAPZ α -scFv-K411B viele Banden erkennbar, am deutlichsten die bei ca. 31, 35, 46 und 70 kDa (Abbildung 26), wovon die oberen beiden aufgrund ihrer Größe nicht als scFv (berechnetes Molekulargewicht 30314 Da) in Frage kamen. Anhand des SDS-Gels konnte die Expression des scFvs somit nicht nachgewiesen werden. Der parallel durchgeführte Western Blot mit Antikörpern spezifisch gegen das C-terminal fusionierte (His)₆-tag zeigte jedoch in vier Überständen eine Bande bei ca. 31 kDa, die vermutlich dem scFv entspricht.

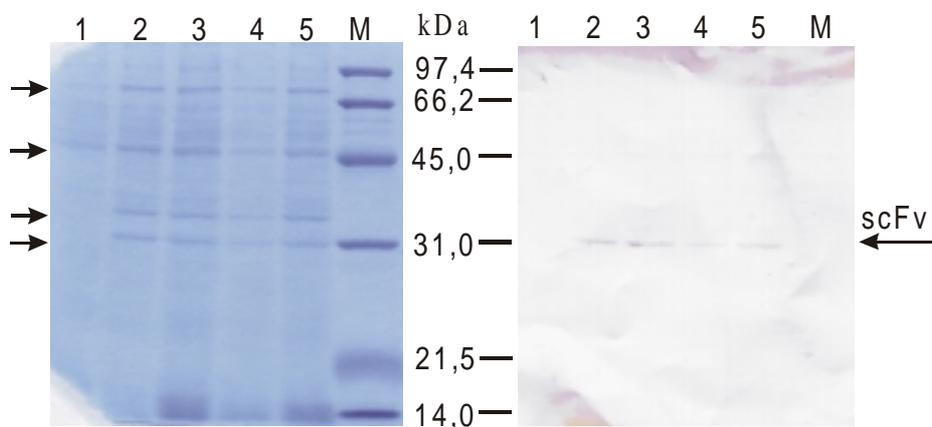


Abbildung 26: Nachweis des scFvs im Überstand rekombinanter Pichia Klone durch SDS-PAGE und Western Blotting. Aufgetragen wurden die Überstände der 5 mit pGAPZ α -scFv-K411B transformierten Klone nach 4 tägiger Kultivierung; die Elektrophorese erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. M: Molekulargewichtsmarker, 1 – 5: Überstände der verschiedenen Klone.

Die Validierung der Ergebnisse des Western Blot erfolgte wie bei den Fab-Fragmenten beschrieben durch einen kompetitiven ELISA, dessen Ergebnis in Abbildung 27 dargestellt ist. Wie nach dem Western Blot zu erwarten, zeigte auch im ELISA nur Klon 1 kein eindeutiges Signal, das durch Standardisierung zur Bestimmung des Testmittelpunktes herangezogen werden konnte. Dieser liegt für

die scFvs der anderen vier Klone zwischen zwei und vier $\mu\text{g l}^{-1}$ Atrazin, was nahezu dem Wert der entsprechenden Fab-Fragmente entspricht.

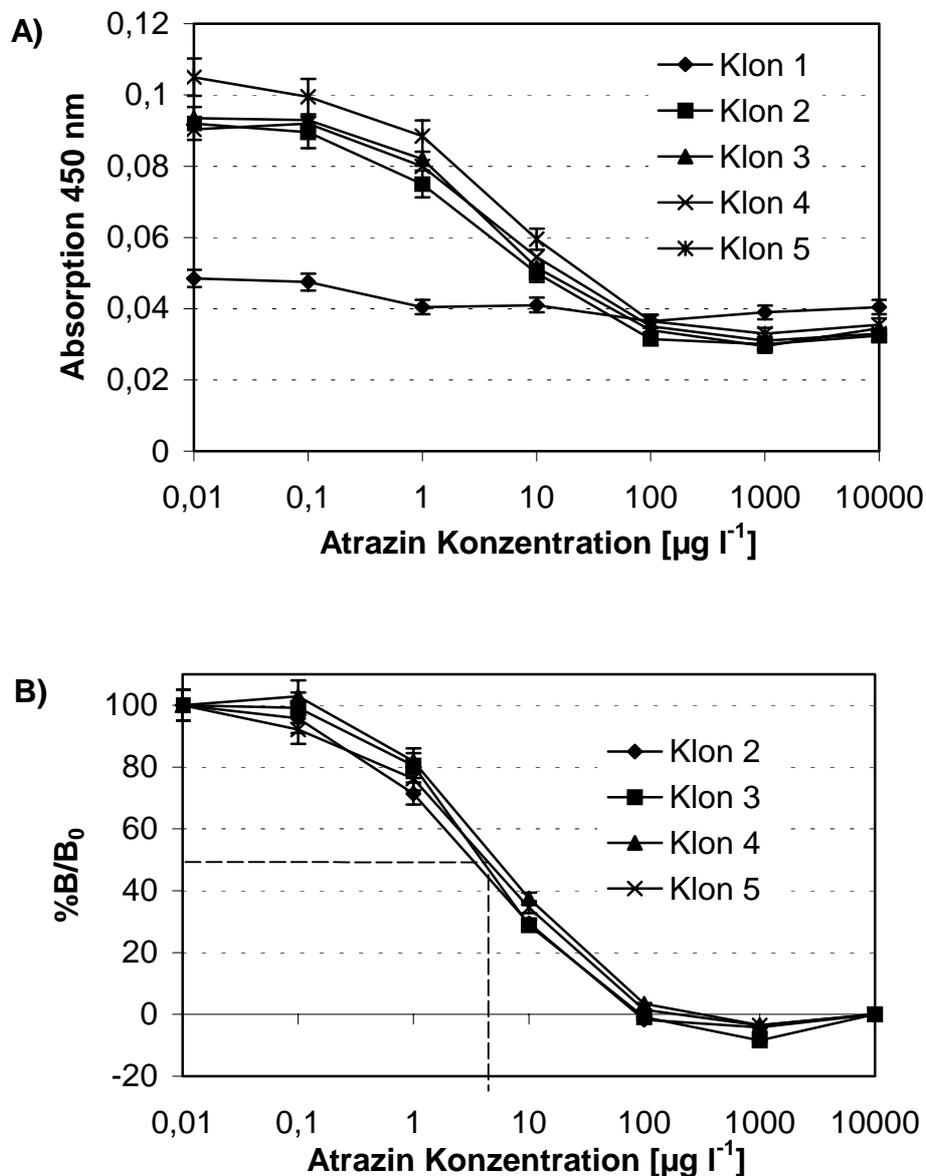


Abbildung 27: Nachweis funktioneller scFvs im Überstand rekombinanter *Pichia*-Klone nach 4 Tagen Expression durch ELISA. A) nicht-normalisiert, B) normalisiert.

7.2.8.2 Expression von scFv-Varianten mit einem zusätzlichen Cystein

scFvs sind allgemein relativ instabile Proteine, was sich auch in der Ausbeute an funktionellem Protein insbesondere bei lang dauernden Kultivierungen bemerkbar macht. Zur Steigerung der Stabilität sollten die scFvs durch Disulfidbrückenbildung infolge eines zusätzlichen Cysteins im Bereich des C-Terminus als Dimere hergestellt werden (Abbildung 28).

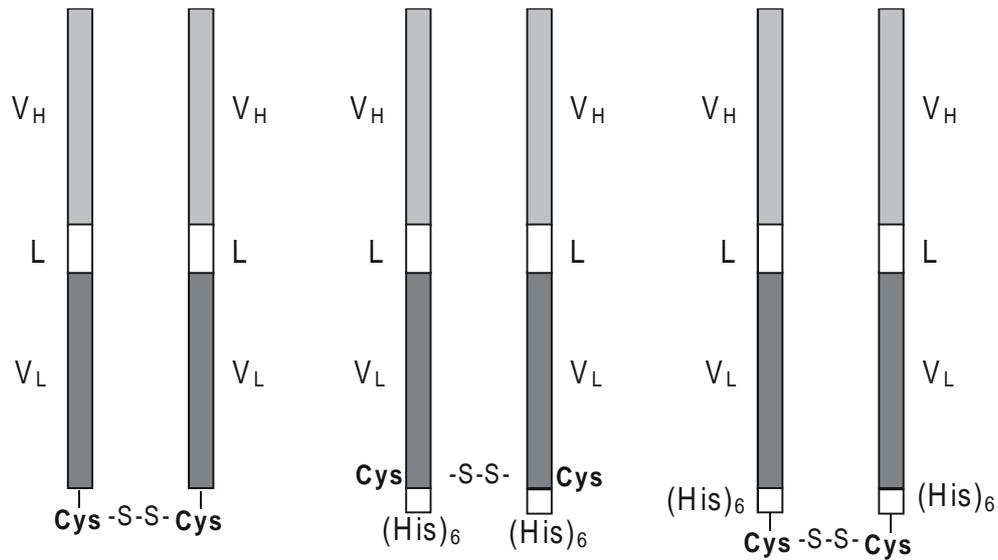


Abbildung 28: Prinzip der Dimerisierung von scFv-Fragmenten durch Disulfidbrückenbildung. Die Abbildung gibt lediglich die Lage der Disulfidbrücken wieder, nicht jedoch die Faltung der scFvs'. V_H: variable Domäne der schweren Kette, V_L: variable Domäne der leichten Kette, L: (GSSSS)₃-Linkerpeptid.

Hierzu wurden durch PCR-Amplifikation der scFv-Sequenzen aus pPICZ α -scFv-K411B mit den *Primer*paaren scFv-1F/scFv-Cys1-R, scFv-1F/scFv-Cys2-R und scFv-1F/scFv-Cys3-R verschiedene Konstrukte hergestellt, die das zusätzliche Cystein anstelle des (His)₆-tags (Abbildung 28, links) bzw. vor (Abbildung 28, Mitte) oder nach dem (His)₆-tag (Abbildung 28, rechts) am C-Terminus enthalten.

Nach Restriktionsverdauung dieser PCR-Produkte von 767 bp (ohne His₆-tag) bzw. 785 bp (mit His₆-tag) mit *Eco* RI und *Xba* I und anschließender Ligation in die entsprechenden Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle von pGAPZ α A und pPICZ α -A wurden die hierbei entstandenen Expressionsvektoren pGAPZ α -scFv-Cys, pGAPZ α -Cys-His, pGAPZ α -His-Cys, pPICZ α -Cys, pPICZ α -Cys-His und pPICZ α -His-Cys mit *Bsp* HI bzw. *Pme* I linearisiert und in *P. pastoris* X33 transformiert. Von jedem der Konstrukte sowie des Wildtyps wurden vier Klone für Expressionsversuche weiterkultiviert und die Überstände durch ELISA (Abbildung 29) und SDS-PAGE (Abbildung 30) auf funktionelle scFv untersucht. Sowohl im ELISA als auch nach SDS-PAGE zeigte sich, daß das scFv im Gegensatz zu den ersten Expressionsversuchen (7.2.8) nun unter Kontrolle des AOX-Promotors deutlich besser exprimiert wurde, als unter dem GAPDH-Promotor: So waren in den Überständen der Klone, die das scFv konstitutiv exprimieren sollten, kaum Banden auf dem SDS-Gel zu identifizieren, und auch die ELISA-Signale ließen sich nicht

vom Hintergrundsignal unterscheiden. Bei den Klonen dagegen, die das scFv Methanol-induziert exprimieren, waren sowohl Banden auf dem SDS-Gel als auch signifikante Signale im ELISA nachweisbar. Die genaue Analyse des ELISAs zeigt, daß alle Konstrukte bis auf jene, die das Cystein C-terminal nach dem $(\text{His})_6\text{-tag}$ enthalten (pPICZ α -scFv-His-Cys), eine Expression zeigten. Des weiteren fällt auf, daß die Überstände der WT-Klone signifikant höhere Signale zeigen, als die der Konstrukte mit zusätzlichem Cystein.

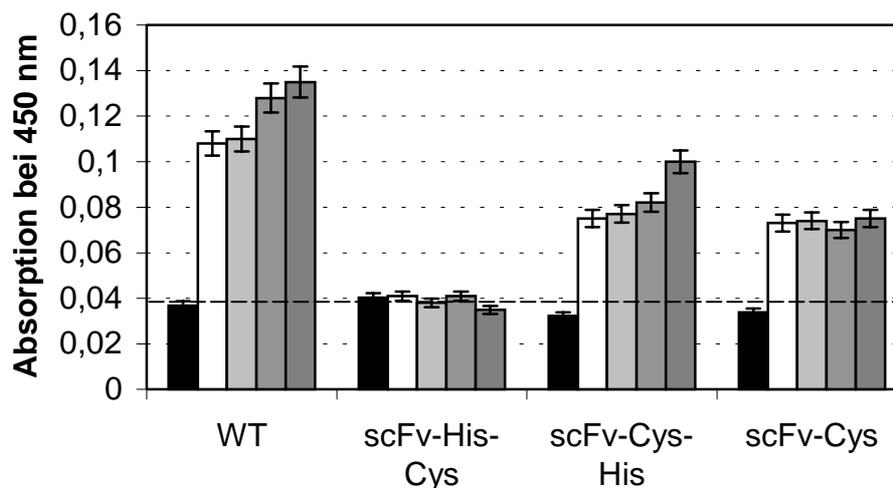


Abbildung 29: ELISA zum Nachweis funktioneller scFvs im Überstand rekombinanter *Pichia* Klone, die mit pPICZ α -scFv (WT mit $(\text{His})_6\text{-tag}$), pPICZ α -scFv-His-Cys, pPICZ α -scFv-Cys-His oder pPICZ α -Cys transformiert wurden. Gezeigt sind für jedes Konstrukt die ELISA-Signale von 4 Klonen (weiße bzw. graue Balken) bei einer Konkurrenz von $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ Atrazin. Die Negativkontrolle (schwarze Balken) stellt das Signal bei einer Konkurrenz von $10000 \mu\text{g l}^{-1}$ Atrazin dar.

Das Ziel, durch das zusätzliche Cystein eine Dimerisierung der scFv zu erreichen wurde jedoch nicht oder nur in extrem geringer Ausbeute erreicht, was auf dem SDS-Gel in Abbildung 30 exemplarisch dargestellt ist. Lediglich in einem Überstand eines mit pPICZ α -scFv-Cys transformierten Klons konnte unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine schwache Bande auf Höhe des für ein $(\text{scFv})_2$ erwarteten Molekulargewichts von ca. 61 kDa nachgewiesen werden. Im kompetitiven ELISA konnten bezüglich des IC_{50} der sigmoidalen Bindungskurven keine Unterschiede zwischen scFvs mit und ohne Cystein nachgewiesen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Aviditäten von divalenten $(\text{scFv})_2$ Fragmenten und monovalenten scFvs wäre dies zu erwarten gewesen, obwohl es sich im Fall des relativ kleinen Antigens Atrazin weniger stark auswirkt, als bei großen Antigenen mit mehreren Epitopen.

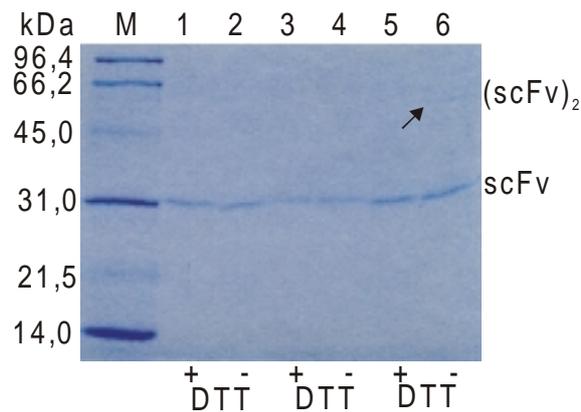


Abbildung 30: SDS-PAGE der Überstände dreier scFv-exprimierender *Pichia*-Klone nach 4 Tagen Induktion. Die Klone wurden mit pPICZ α -scFv (Spuren 1 und 2), pPICZ α -scFv-Cys-His (Spuren 3 und 4) oder mit pPICZ α -scFv-Cys (Spuren 5 und 6) transformiert. Zur Identifizierung etwaiger Disulfidbrücken wurden sämtliche Überstände unter reduzierenden (+DTT) und nicht-reduzierenden (-DTT) Bedingungen aufgetrennt.

7.3 Hochdurchsatz-Systeme zur Durchmusterung von Antikörperbibliotheken

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Systems zur Selektion rekombinant hergestellter Antikörperbibliotheken und von Varianten mit gewünschten Bindungseigenschaften im hohen Durchsatz. Hierbei war zu beachten, daß das für diese Zwecke bereits allgemein etablierte und häufig genutzte Phagen-Display (Kapitel 5.2.4) nicht zur Verwendung kommen sollte.

Zunächst wurde in Erwägung gezogen, den zur Charakterisierung der Fab-Fragmente und scFvs bereits verwendeten kompetitiven ELISA (6.4.4) durch den Einsatz eines Pipettierroboters zu automatisieren. Allerdings bleibt hier zum einen die Limitierung auf Mikrotiterplatten mit 96 bzw. 384 Kavitäten bestehen. Zum andern müssen die Mikrotiterplatten in diesem heterogenen Assay in mehreren zeitaufwendigen Schritten *gecoatet* werden, wobei die mit der Verwendung eines Pipettierroboters gewonnene Zeitersparnis nur wenig ins Gewicht fällt, da der Zeitbedarf hauptsächlich durch die relativ langen Inkubationszeiten bedingt ist. Da ein in hohem Durchsatz durchgeführter ELISA zusätzlich zu den methodischen Nachteilen aufgrund der benötigten Verbrauchsmittel auch einen erheblichen finanziellen Aufwand erfordert hätte, wurde er nicht weiter in Betracht gezogen. Stattdessen wurde ein homogener, kompetitiver Assay auf Basis von

Fluoreszenzpolarisation, der wie der ELISA zwar ebenfalls im Mikrotiterplattenformat durchgeführt wird, aber ohne die zeitaufwendige Immobilisierung von teuren Primär-Antikörpern auskommt (6.4.5) sowie ein Hefeoberflächendisplaysystem etabliert.

7.3.1 Entwicklung eines Fluoreszenzpolarisations-Assays

Zunächst wurden in mehreren Vorversuchen mit dem scFv K411B aus X33/pPICZ α -scFv (WT mit (His)₆-tag) sowie den mit einem zusätzlichen Cystein versehenen scFvs aus *Pichia*-Überständen der Klone X33/pPICZ α -scFv-His-Cys, X33/pPICZ α -scFv-Cys-His und X33/pPICZ α -scFv-Cys die geeigneten Verdünnungen des *Tracers* und der Kulturüberstände bestimmt. Ein ausreichendes Fluoreszenzintensitätssignal ergab sich bei einer *Tracer*-Verdünnung von 1:10000; die höchste Fluoreszenzpolarisation ergab sich wie in Abbildung 31 zu sehen, bei 16-facher Verdünnung der *Pichia*-Kulturüberstände. Der Überstand des Klons X33/pPICZ α -scFv-His-Cys wurde nicht weiter verwendet, da wie im ELISA und nach dem SDS-PAGE (7.2.8.2) auch in diesem Fluoreszenzpolarisations-Vorversuch keine Expression der scFvs' nachzuweisen war.

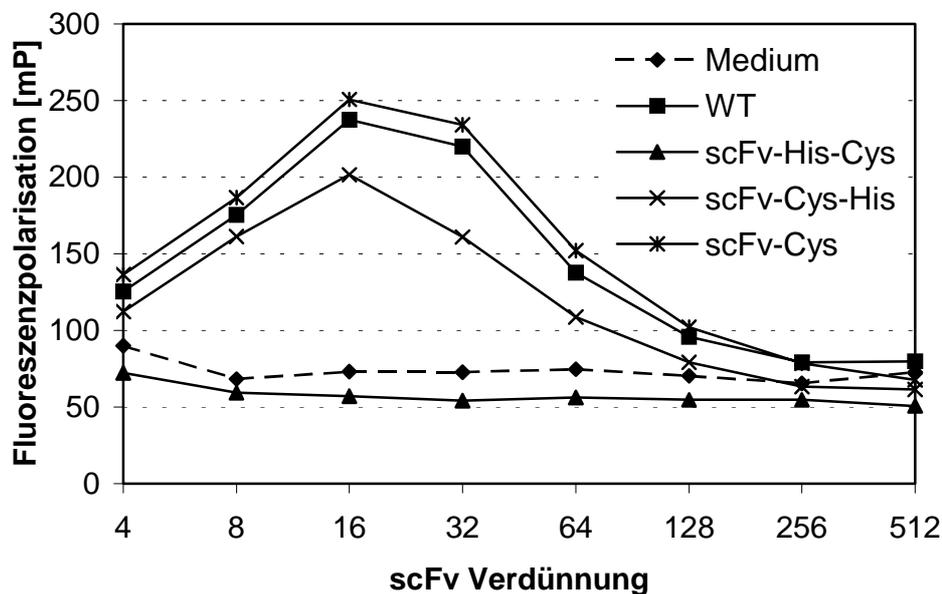


Abbildung 31: Bestimmung der für den Fluoreszenzpolarisationsassay optimalen Antikörperkonzentration, also der geeignete Verdünnungsfaktor des *Pichia*-Kulturüberstands.

Im anschließenden eigentlichen Assay konnten die in Abbildung 32 dargestellten Standardkurven erstellt werden. Diese zeigen die für kompetitive Assays typische, sigmoidale Form (Abbildung 32A). Nach Normalisierung wurde der Testmittelpunkt

(IC₅₀) für den Nachweis von Atrazin zu ca. 90 µg l⁻¹ bestimmt (Abbildung 32B), was ca. 30 mal höher als der im ELISA ermittelte Wert ist.

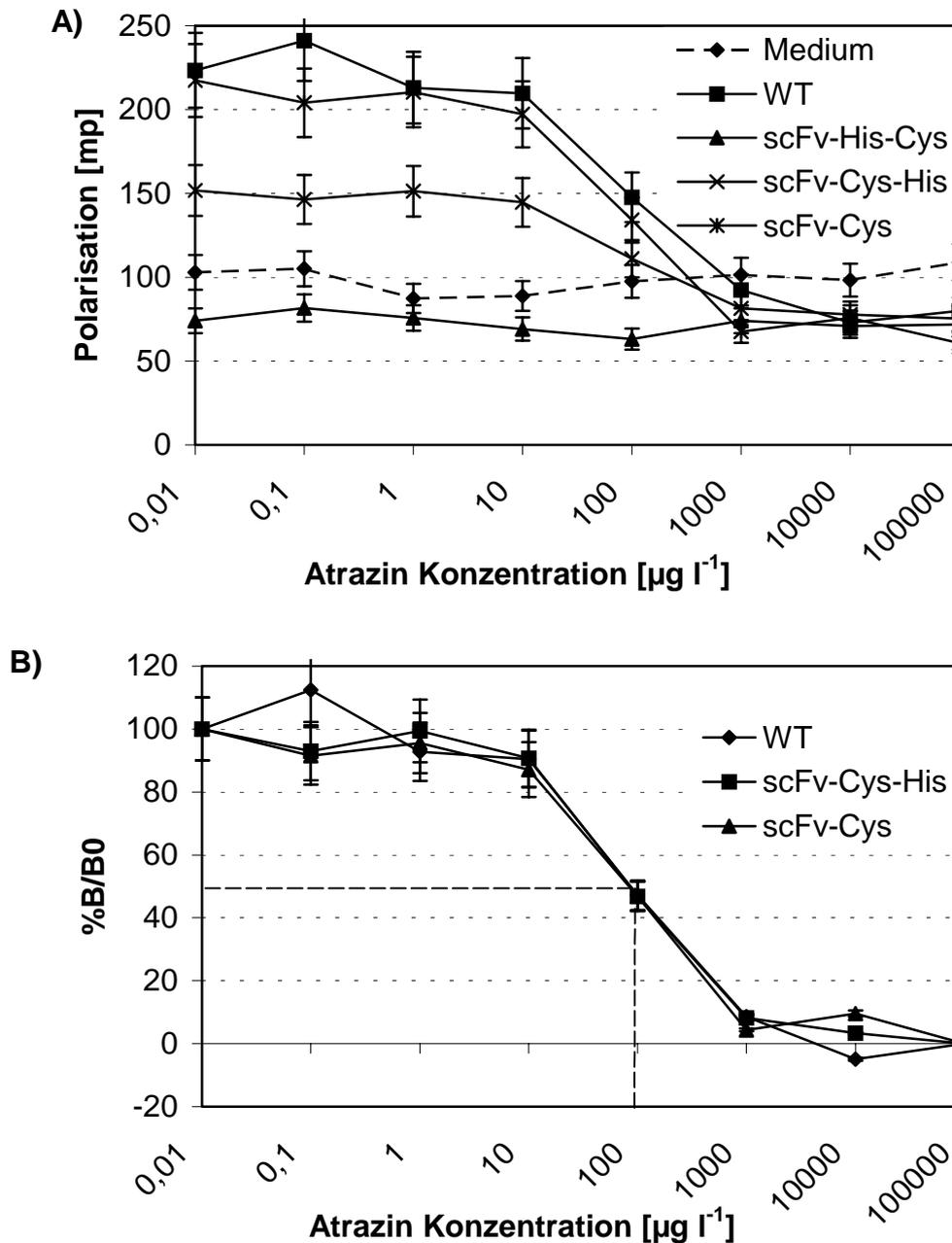


Abbildung 32: Nicht-normalisierte (A) und normalisierte (B) Standardkurven des Fluoreszenzpolarisations-Assays. Medium diente als Negativkontrolle, wurde jedoch bei der Normalisierung wie die Werte von scFv-His-Cys nicht mit einbezogen. Der Testmittelpunkt ergab sich aus den normalisierten Kurven nahezu identisch zu ca. 90 µg l⁻¹.

Nach Bestimmung der geeigneten Verdünnungen von *Tracer* und Kulturüberstand konnten entsprechende Bindungskurven (hier nicht gezeigt) auch mit dem Fab K411B aus Klon GS115/pPICZα-Fab 1C erstellt werden. Die damit

bestimmten Testmittelpunkte lagen ebenfalls im Bereich zwischen 40 und 110 $\mu\text{g l}^{-1}$ Atrazin.

7.3.2 Hefeoberflächendisplay der scFvs' und des scFvs-EGFP

Da sich die bisher beschriebenen Assays, der ELISA aufgrund seines zeitlichen und finanziellen Aufwands, der Fluoreszenzpolarisationstest aufgrund der Ungenauigkeit bzw. schlechten Reproduzierbarkeit, letztlich nicht als HTS-System eignen, sollte ein von Mikrotiterplatten unabhängiges *Screening*- und Selektionssystem etabliert werden. Eine Alternative stellt das Hefeoberflächendisplay dar: Ähnlich wie beim Phagen-Display (5.2.4) bilden der Genotyp und Phänotyp hier eine physikalische Einheit. Die scFvs werden dabei auf der Zellwandoberfläche von *S. cerevisiae* exprimiert und nach außen präsentiert. Dies erfolgt durch Fusion an den membranassoziierten α -Adhäsionsrezeptor der Hefe, der natürlicherweise bei der Stabilisierung von Zell-Zell-Interaktionen und bei der Fusion von a und α haploiden Zellen eine Rolle spielt. Er besteht aus zwei Proteinen, dem Agglutinin 1 (Aga 1) und dem Agglutinin 2 (Aga 2). Aga 1 wird nach Sekretion kovalent an das β -Glucan der extrazellulären Matrix verankert; Aga 2 bindet im Golgi-Apparat über zwei Disulfidbrücken an Aga 1 und bleibt auch nach dessen Sekretion mit diesem verbunden. Wie in Abbildung 33 dargestellt, wird das scFv-Gen C-terminal an das Gen des Agglutinin 2 (Aga2) fusioniert, welches durch Disulfidbrücken mit dem in der Zellwand verankerten Agglutinin 1 (Aga1) verknüpft wird. Zum Nachweis des scFvs auf der Zelloberfläche sind zusätzlich N- und C-terminale Epitope enthalten, die mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Hiermit kann das Fusionsprotein zwar nachgewiesen und quantifiziert werden; den funktionellen Nachweis der scFv-Domäne des Fusionsproteins erlaubt jedoch nur ein markiertes Antigen. Als Markierung werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

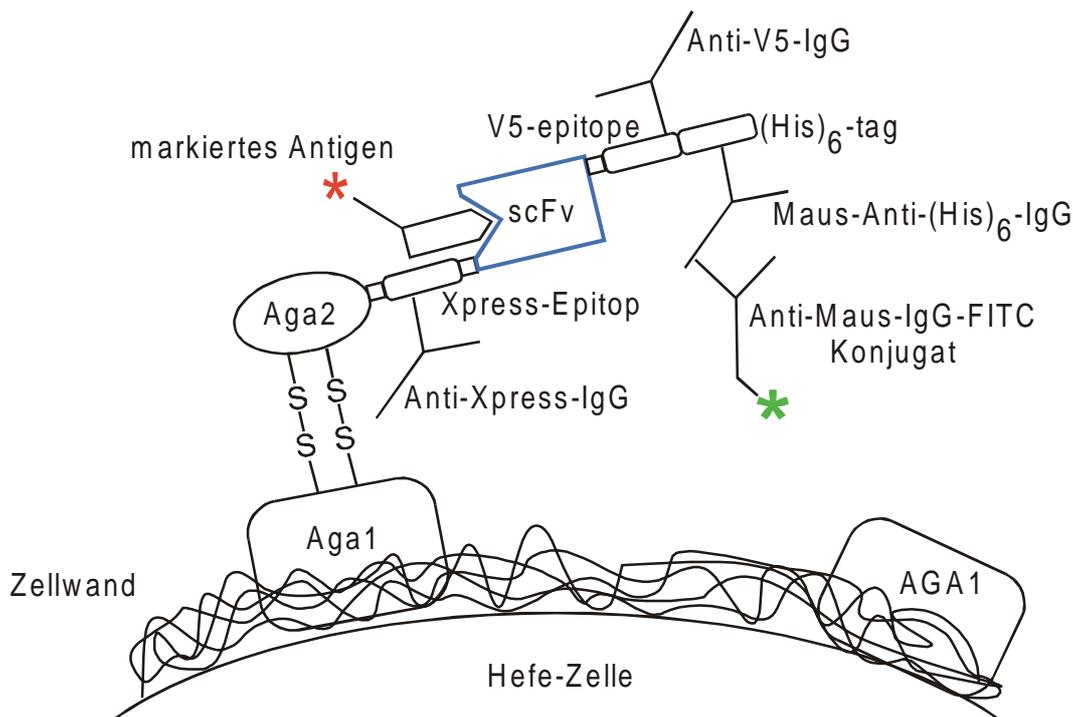


Abbildung 33: Prinzip des Hefeoberflächendisplays. Das Antikörperfragment wird als Fusionsprotein mit mehreren Epitop-Sequenzen (N-terminal *Xpress* und C-terminal *V5* und *(His)₆*) C-terminal nach der Sequenz des *AGA2*-Proteins exprimiert. Dieses wird durch Disulfidbrücken mit dem *AGA1*-Protein auf der Hefeoberfläche verankert. Abbildung verändert nach (Boder und Wittrup, 2000).

7.3.2.1 Herstellung und Transformation der Hefeoberflächen-Expressionsvektoren

Ausgangspunkt der Arbeiten zur Etablierung des Hefeoberflächendisplays war ein kommerzielles Kit, das während dieser Arbeit auf den Markt kam. Es beruht weitgehend auf Arbeiten von Karl Dane Wittrup (Boder und Wittrup, 1997) an der Universität von Illinois (mittlerweile Massachusetts Institute of Technology, Boston), und beinhaltet neben dem Tryptophan-defizienten Hefestamm *S. cerevisiae* EBY 100 vor allem den in Abbildung 34 dargestellten Oberflächenexpressionsvektor pYD1, der sämtliche Merkmale, die für das Oberflächendisplay (Abbildung 33) notwendig sind, enthält: *Aga2*-Gen gefolgt von den Epitop-Sequenzen unter Kontrolle des Galactose-Promotors, eine MCS und das Tryptophangen (*TRP1*) zur Selektion in Hefe.

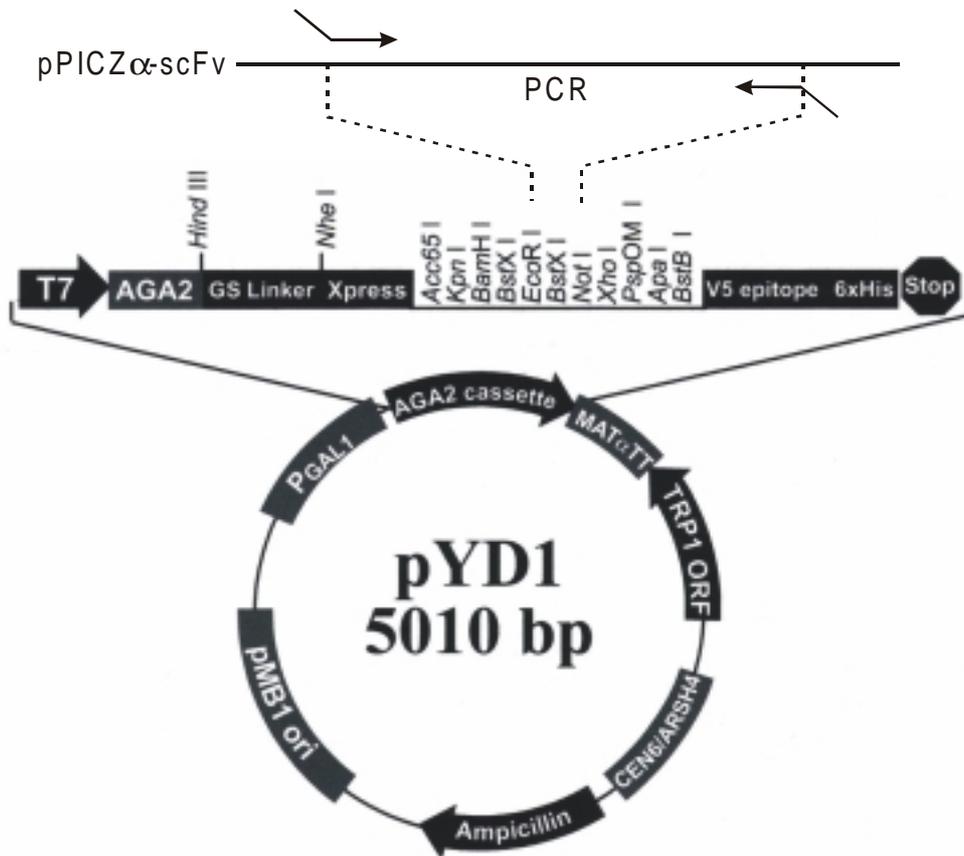


Abbildung 34: Aufbau des Shuttle-Vektors pYD1 zur Hefeoberflächenexpression. AGA2: Agglutinin 2 Gen, GS-Linker: Glycin-Serin-Linkersequenz, Xpress-Epitop: codiert die AS „DLYDDDDK“, V5-Epitop codiert die AS „GKPIPPLLGLDST“, Trp1: Tryptophan-Gen zur Selektion in Hefe, CEN6/ARSH4: Hefe-Replikationssequenz, Ampicillin: β -Lactamase-Gen zur Selektion in *E. coli*, pMB1 ori: Replikationsursprung für *E. coli*, P_{Gal1} : Galactose-Promotor. Die Klonierung des scFvs-Gens erfolgte wie dargestellt durch PCR, wobei über die Primer die notwendigen Schnittstellen eingefügt wurden. (Abbildung modifiziert nach (Invitrogen))

Zunächst wurden das Gen des Atrazin-spezifischen scFv K411B durch PCR aus dem Vektor pPICZ α -scFvK411B mit den Primern pYD-K411B-F/pYD-K411B-R amplifiziert und mittels dabei eingefügter Schnittstellen (*Eco* RI; *Not* I) in die entsprechenden Positionen von pYD1 kloniert. Die Kontrolle des so entstandenen Vektors pYD-scFv-K411B erfolgte neben analytischen Restriktionsverdauungen durch Sequenzierung mit den Primern pYD1-F und pYD1-R. Hierbei kam es vor allem darauf an, daß sämtliche Bestandteile des Fusionsgens im gleichen Leseraster lagen.

Parallel wurde aus dem 2,4-D-spezifischen Fab-Fragment durch eine *splicing-by-overlap-extension-PCR* gemäß Abbildung 35 das entsprechende scFv hergestellt: Die beiden variablen Domänen aus pASK-Fab24D (7.2.7) wurden mittels zweier PCR mit den Primerpaaren H24D-F/Li-24D-R bzw. Li-L24D-F/L24D-R amplifiziert.

Dabei wurden bereits die Sequenzen für den Glycin-Serin-Linker (GGGGS)₃ des scFvs angehängt. Die Lage und Länge der hierfür verwendeten *Primer* zeigt Abbildung 35. In einer weiteren PCR mit den *Primern* H24D-F/L24D-R und den beiden ersten PCR-Produkten als Ausgangsmaterial wurden schließlich beide variablen Domänen über die bereits in den ersten beiden PCRs eingefügten Sequenzen für den Glycin-Serin-Linker (GGGGS)₃ des scFvs miteinander fusioniert. Terminal wurden eine *Bam* HI (5') und *Eco* RI (3') Schnittstelle eingefügt, mittels derer das scFV-Gen schließlich in die entsprechenden Schnittstellen von pYD1 (Abbildung 34) kloniert wurde. Die Produkte der verschiedenen PCRs sind auf dem Agarosegel in Abbildung 36 dargestellt.

Die Transformation der Vektoren pYD-scFv-K411B, pYD-scFv-24D sowie des Ausgangsvektors pYD1 in *S. cerevisiae* EBY 100 gemäß der in Kapitel 6.2.4 beschriebenen Methode lieferte ohne weitere Optimierung für alle 3 Plasmide mehrere hundert bis tausend Transformanden.

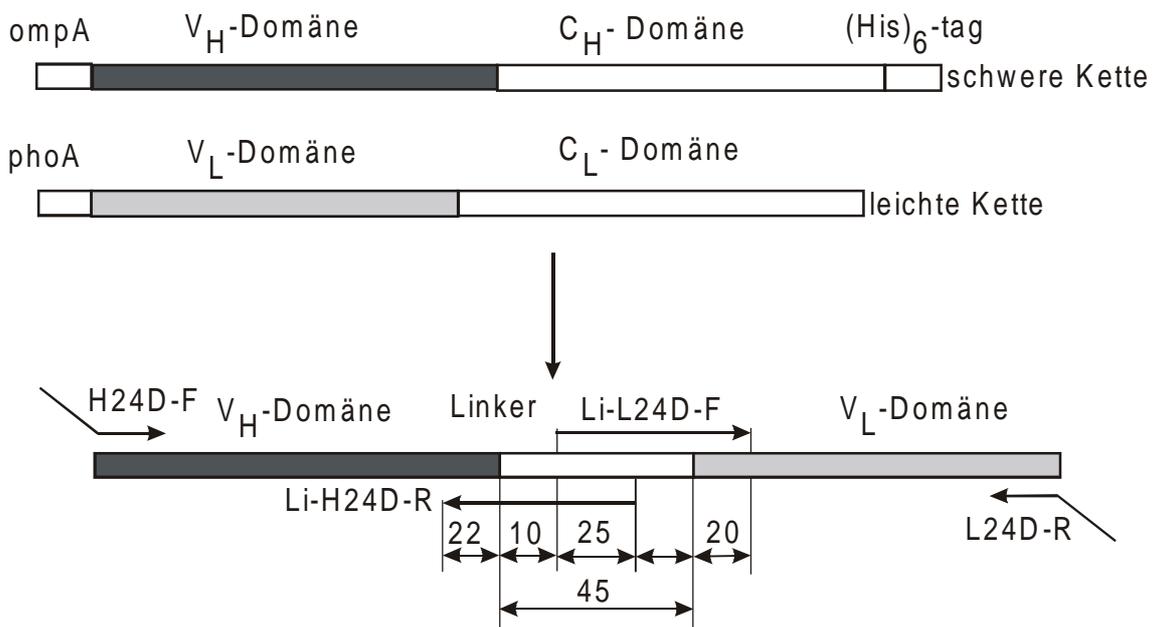


Abbildung 35: Klonierungsstrategie zur Herstellung der 2,4-D spezifischen scFVs aus den entsprechenden Fab-Fragmenten. Ausgangsmaterial für die Amplifikation der beiden variablen Domänen war pASK-Fab24D mit der bicistronischen Expressionskassette (oben). Nach separater Amplifikation der beiden variablen Domänen wurden diese mit der anschließenden *splicing-by-overlap-extension PCR* zum kompletten scFv fusioniert (unten). Die Zahlenwerte geben die Lage bzw. die Länge der für die Einführung des (GGGGS)₃-Linkerpeptids verantwortlichen *Primer* in Basen an.

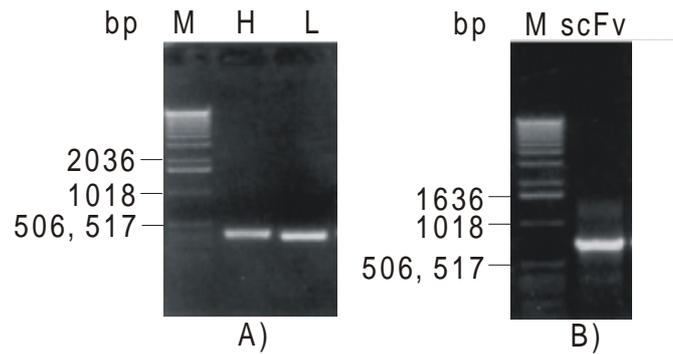


Abbildung 36: PCR-Produkte der separaten variablen Domänen des Fab24D (H: 401 bp; L: 357 bp, A) sowie nach deren Fusion durch die *splicing-by-overlap-extension* PCR als scFv (B; 735 bp).

7.3.2.2 Expression und Nachweis der AK-Fragmente auf der Zelloberfläche

Zunächst wurden eine Kolonie des nicht transformierten Hefestammes EBY100 (Klon 1), 2 Transformanden, die den Vektor pYD1 enthielten (EBY100/pYD1; Klone 2 und 3), 5 Transformanden, die mit pYD-scFv24-D transformiert wurden (EBY100/pYD-scFv24D; Klone 4 – 8) und 8 Transformanden, die mit pYD-scFv-K411B transformiert wurden (EBY100/pYD-scFv-K411B; Klone 9 – 16), für Expressionsexperimente gepickt. Dies erfolgte für sämtliche Klone wie in Kapitel 6.2.9 beschrieben; lediglich der WT-EBY100 (nicht transformiert) wuchs auf dem YNB-CAA-Medium trotz Zugabe von 0,01 % (M/V) Tryptophan nicht an und wurde deswegen auf YPD kultiviert. Von allen Kulturen wurden jeweils vor sowie 24 und 48 Stunden nach Induktion Proben für die Immunfluoreszenzmarkierung (Kapitel 6.2.10) der heterolog auf der Oberfläche als Fusionsprotein exprimierten scFv gezogen. Die Markierung erfolgte mit einem poly-His-Antikörper, der an das C-terminale (His)₆-tag des Fusionsproteins (Abbildung 33) bindet und nach Waschen der Zellen zur Entfernung nicht gebundener Ak mittels eines Maus-spezifischen IgG-FITC Konjugats am Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann. Als Negativkontrolle wurden nicht-transformierte EBY100 Zellen (Klon 1) analog behandelt; als Positivkontrolle diente EBY100/pYD1 (Klone 2 und 3). Letzteres war möglich, da in dem Vektor pYD1 das Aga2 sowie die Epitope zur Markierung *in frame* liegen und somit auch ohne Fusion mit einem heterologen Protein auf der Oberfläche exprimiert werden. Die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop zeigte, daß sich alle Klone nach Induktion mit dem anti-(His)₆-Ak markieren ließen (Tabelle 16). Damit kann indirekt von einer Expression des Fusionsproteins aus dem Aga 2, einem der beiden scFvs und den Epitopen ausgegangen werden.

| Konstrukt | Anzahl der untersuchten Klone | Spezifität des scFvs | Fluoreszenzsignal | | |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------|------|-------|
| | | | 0h | 24 h | 48 h |
| EBY100 | 1 | - | - | - | - |
| EBY100 / pYD1 | 2 | - | - | +(+) | ++(+) |
| EBY100 / pYD-scFv-24D | 5 | 2,4-D | - | ++ | ++(+) |
| EBY100 / pYD-scFv-K411B | 7 | Atrazin | - | +(+) | ++(+) |

Tabelle 16: Immunfluoreszenzmarkierung der Hefekonstrukte mit den verschiedenen exprimierten Fusionsproteinen mit anti-(His)₆-spezifischen Antikörpern gefolgt von einem anti-Maus-IgG-FITC Konjugat. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte durch Beobachtung am Fluoreszenzmikroskop. Die angegebenen Werte (-, +, ++, +++) geben nur den subjektiven, qualitativen Eindruck der Fluoreszenzintensität und des Anteils fluoreszierender Zellen wieder und können nicht quantitativ ausgewertet werden: - keine Fluoreszenz beobachtbar, + schwaches Fluoreszenzsignal, das nur wenig vom Hintergrund unterscheidbar war, ++ eindeutige Fluoreszenz bei vielen Zellen, +++ starke Fluoreszenz bei nahezu allen Zellen. Die Werte in Klammern stellen die klonale Variation dar, die jedoch verhältnismäßig gering war.

Der Nachweis der Funktionalität der scFvs' sollte nun durch Bindung von FITC-markierten Antigenen erfolgen. Hierfür wurde mit einigen Klonen ein weiterer Expressionsversuch durchgeführt und die Proben vor und nach Induktion mit FITC-Atrazin bzw. FITC-2,4-D markiert. Die Untersuchung der Proben am Fluoreszenzmikroskop zeigte ein so nicht erwartetes Ergebnis: Im Gegensatz zur Markierung mit dem anti-His-IgG ließen sich die Zellen aus Proben vor und nach Induktion mit den markierten Antigenen anfärben, noch dazu unabhängig von der Antigen-spezifität der exprimierten scFvs und von den verwendeten Antigen-FITC-Konjugaten (Atrazin oder 2,4-D; Tabelle 17). Da sich diese unspezifische Markierung auch mit Antigen-FITC-Konjugaten in PBS mit 1 mg ml⁻¹ BSA als Blockierungsreagenz nicht unterdrücken ließ, lag die Vermutung nahe, daß es sich nicht um eine unspezifische Bindung, sondern um ein Eindringen der Markierungsreagenzien in die Zellen handelt. Dies könnte erfolgen, da es sich bei beiden Konjugaten um relativ kleine Moleküle handelt, die passiv oder gar aktiv (über Transportvorgänge) in die Zelle gelangen und dort auch durch Waschen nicht entfernt werden, sondern ein erhöhtes Hintergrundsignal bewirken.

Sollte tatsächlich die zu geringe Größe des Antigen-FITC Konjugats eine Rolle bei der unspezifischen Markierung der Zellen spielen, wäre dies durch Verwendung eines größeren Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden. Da die Antigene Atrazin und 2,4-D aufgrund der Spezifität der scFv nicht zu verändern waren, blieb die

Möglichkeit einen größeren Fluoreszenzfarbstoff als Fluorescein zu verwenden, was im folgenden Kapitel beschrieben ist. Die meisten kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffe stellen jedoch wie FITC relativ kleine Moleküle dar. Alternativ bot sich das Protein EGFP an, das mit seinem Molekulargewicht von ca. 28 kDa nicht in die Zelle eindringen kann.

| Klon | Konstrukt | Spezifität des scFvs | Markierung | Fluoreszenz | |
|-------|-----------------------|-------------------------|--------------------|-------------|------|
| | | | | 0 h | 48 h |
| 5 | EBY100/pYD-scFv-24D | 2,4-D | Atrazin-FITC | + | + |
| 5 | EBY100/pYD-scFv-24D | 2,4-D | Atrazin-FITC / BSA | ++ | ++ |
| 5 | EBY100/pYD-scFv-24D | 2,4-D | 2,4-D-FITC | ++ | ++ |
| ----- | | | | | |
| 6 | EBY100/pYD-scFv-24D | 2,4-D | Atrazin-FITC | + | + |
| 6 | EBY100/pYD-scFv-24D | 2,4-D | 2,4-D-FITC | + | + |
| 10 | EBY100/pYD-scFV-K411B | Atrazin | Atrazin-FITC / BSA | ++ | ++ |
| 12 | EBY100/pYD-scFV-K411B | Atrazin | Atrazin-FITC | + | ++ |
| 12 | EBY100/pYD-scFV-K411B | Atrazin | 2,4-D-FITC | + | + |
| 14 | EBY100/pYD-scFV-K411B | Atrazin | Atrazin-FITC / BSA | + | +++ |

Tabelle 17: Antigen-Fluoreszenzmarkierung der verschiedenen EBY100 Konstrukte. Die Markierung erfolgte mit Atrazin-FITC bzw. 2,4-D-FITC in PBS oder in PBS/BSA. BSA sollte nicht besetzte Bindungsstellen blockieren. Der Nachweis der Fluoreszenzsignale erfolgte durch Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Die angegebenen Werte (-, +, ++, +++) geben nur den subjektiven, qualitativen Eindruck der Fluoreszenzintensität und des Anteils fluoreszierender Zellen wieder und können nicht quantitativ ausgewertet werden: - keine Fluoreszenz beobachtbar, + schwaches Fluoreszenzsignal, das nur wenig vom Hintergrund (Zellen, die mit Atrazin-BSA anstelle mit fluoreszenzmarkiertem Analyt markiert wurden) unterscheidbar war, ++ eindeutige Fluoreszenz bei vielen Zellen, +++ starke Fluoreszenz bei nahezu allen Zellen.

7.3.2.3 Herstellung von Atrazin-C6-EGFP

Die Herstellung eines entsprechenden Atrazin-EGFP-*Tracers* bestand schließlich aus 3 Abschnitten: Zuerst wurde rekombinantes EGFP-(His)₆ in *E. coli* DH5 α überexprimiert und im nächsten Schritt das im löslichen Überstand des Zellaufschlusses (6.2.7) enthaltene EGFP über dessen C-terminales (His)₆-tag durch IMAC gereinigt. Der letzte Schritt war dann die Kopplung an das mit einem C₆-COOH versehene Atrazin.

7.3.2.3.1 Expression und Reinigung von EGFP

Die Expression des EGFP erfolgte wie in 6.2.6 beschrieben und konnte aufgrund der grünen Färbung des EGFP selbst ohne UV-Anregung visuell verfolgt werden: Im Gegensatz zur Negativkontrolle (*E. coli* DH5 α /pUC19) war die Kultur nach Induktion sowie das abzentrifugierte Zellpellet bei Tageslicht grün gefärbt, und vor allem letzteres fluoreszierte bei UV-Anregung intensiv. Es war somit keine weitere Kontrolle der Expression notwendig.

Nach dem Zellaufschluß (Kapitel 6.2.7) wurde das EGFP aus der löslichen Fraktion wie in Kapitel 6.4.1 beschrieben über eine TALON[®]-Säule gereinigt. Dabei konnte, wie in Abbildung 37 zu sehen, der Verbleib des EGFP zu jedem Zeitpunkt aufgrund der Grünfärbung bzw. Fluoreszenz visuell verfolgt werden und somit auch die entsprechende(n) Elutionsfraktion(en) mit dem EGFP bestimmt werden.

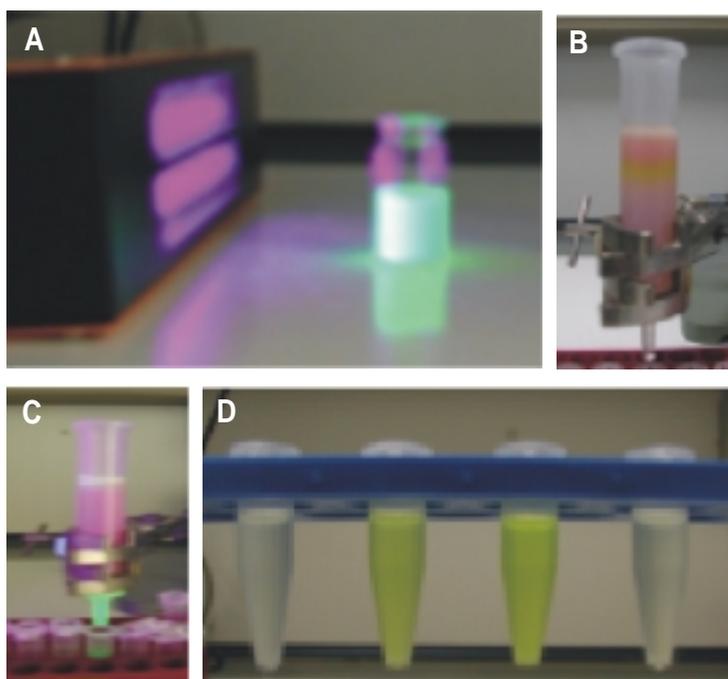


Abbildung 37: Visuelle Kontrolle der IMAC-Aufreinigung des rekombinant in *E. coli* exprimierten EGFP mit (A und C) und ohne (B und D) UV-Anregung. A) Zell-Lysat vor der Aufreinigung, B) EGFP auf der TALON[™]-Matrix zu Beginn der Elution, C) EGFP beim Verlassen der Säule, D) EGFP-haltige Elutionsfraktionen.

Die Entfernung des Imidazols aus den EGFP-haltigen Fraktionen erfolgte anschließend durch eine Gelfiltration gemäß 6.4.1.3. Zur Quantifizierung des EGFP wurde die Fluoreszenz in den verschiedenen Fraktionen beider Reinigungsschritte zusätzlich im Fluorimeter gemessen. Deutlich ist zu erkennen, daß der Großteil des

EGFP in beiden Schritten jeweils nur auf 2 - 4 Fraktionen verteilt wird (Abbildung 38). Die Proteinbestimmung in Fraktion 3 der Gelfiltration durch den BCA-Test ergab eine Konzentration von ca. $0,9 \text{ mg ml}^{-1}$. Unter Einbeziehung der beiden anderen Fraktionen 2 und 4 konnten aus 50 ml Kultur schließlich ca. 2 mg EGFP gewonnen werden.

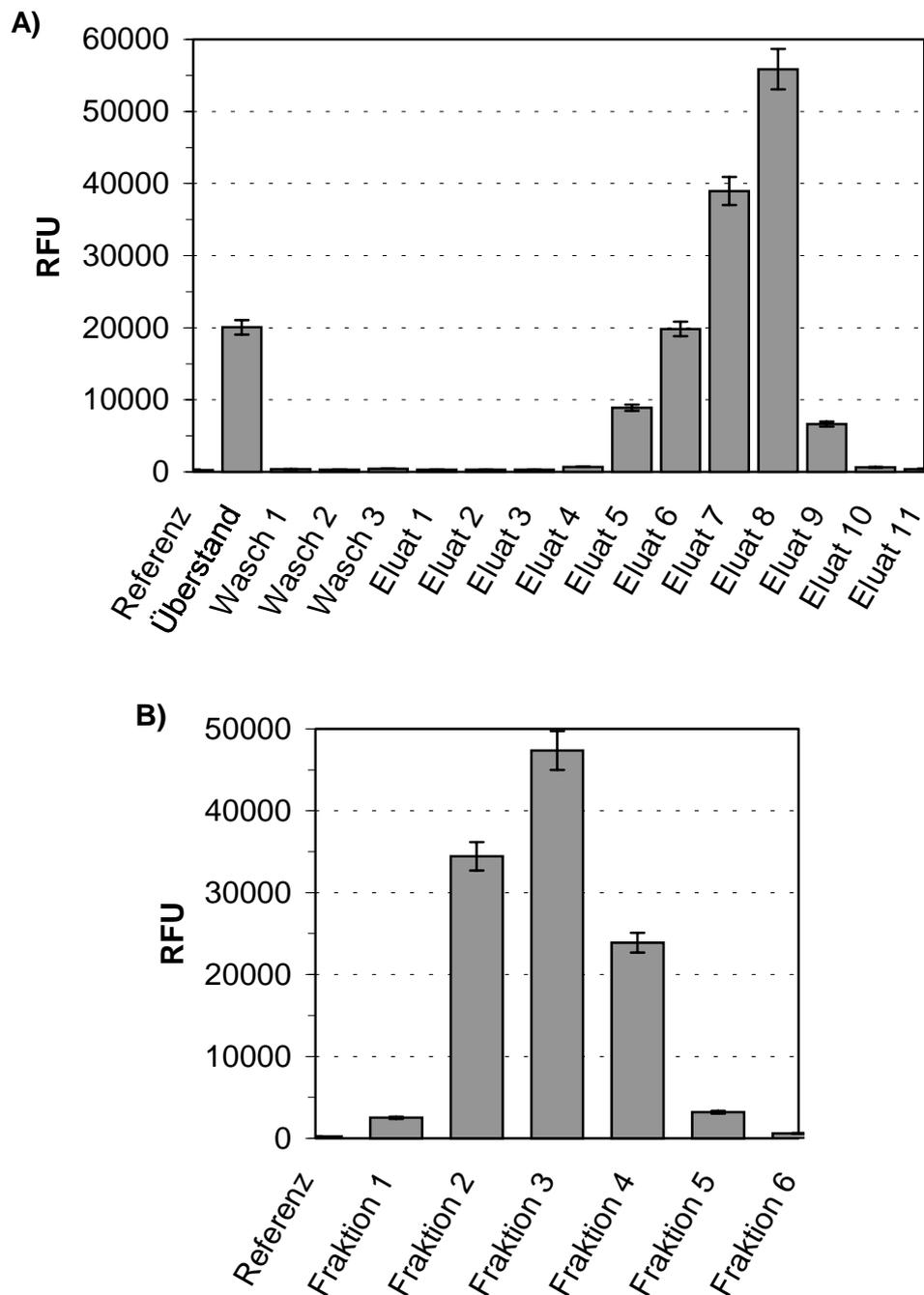


Abbildung 38: Fluoreszenzmessung der verschiedenen Fraktionen beider Reinigungsschritte. A: Fraktionen der IMAC-Reinigung; B: Fraktionen der Gelfiltration. Die Fraktionen 7 und 8 der IMAC wurden vereint und durch die Gelfiltration vom Imidazol befreit.

Die Kontrolle der Reinigung erfolgte schließlich durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit Proben der verschiedenen Reinigungsschritte. Deutlich ist auf dem SDS-Gel in Abbildung 39 die für höhere EGFP-Konzentrationen typische Dimerbildung zu erkennen (Palm *et al.*, 1997).

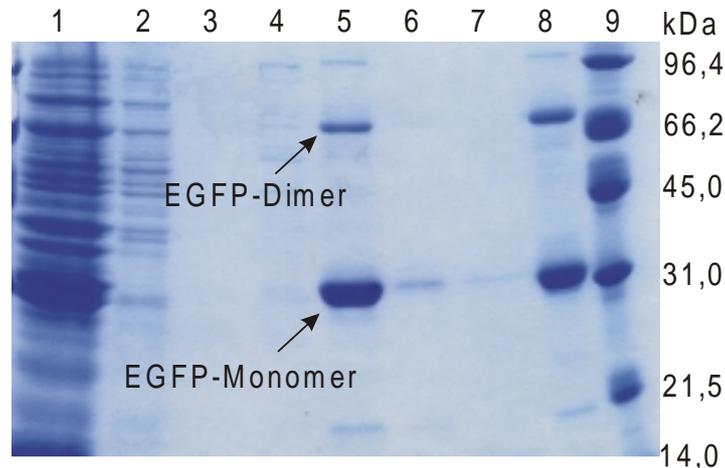


Abbildung 39: SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Reinigung des EGFP. Spur 1: *E. coli* Zellextrakt; Spur 2: Waschfraktion der IMAC; Spur 3: IMAC-Eluat 2; Spur 4: IMAC-Eluat 6, Spur 5: IMAC-Eluat 8; Spur 6: IMAC-Eluat 9; Spur 7: IMAC-Eluat 10; Spur 8: Eluat 3 der Gelfiltration; Spur 9: Molekulargewichtsstandard (LMW).

7.3.2.3.2 Darstellung des Atrazin-C₆-EGFP-Tracermoleküls

Die Kopplung des gereinigten EGFP an das Atrazin erfolgte analog zur Kopplung der POD an das mit einem C₆-Spacer versehene Atrazin (6.5.1). Das Atrazin-C₆ bindet bei der gewählten Synthesestrategie mit seiner Carboxylgruppe vorrangig an die Aminogruppen der Lysinreste des EGFP. Aus der Anzahl der an der Proteinoberfläche liegenden und für das Atrazin-C₆ zugänglichen Lysinreste (=18) ergab sich deswegen das Verhältnis der einzusetzenden, molaren Mengen der beiden Edukte (18 Mol Atrazin-C₆ je Mol EGFP): Nach Aktivierung von 1 mg Atrazin-C₆ wurden 0,1 mg des aktivierten Esters (331 nmol) mit 0,25 mg EGFP (9 nmol) für die Synthesereaktion eingesetzt. Hierbei lag ein zweifacher Überschuss an Atrazin-C₆ vor, um sämtliche Lysine mit Atrazin-C₆ zu koppeln. Die Reinigung des Konjugats erfolgte schließlich ebenfalls analog zur Reinigung des Atrazin-C₆-POD-Konjugats durch Gelfiltration und konnte wie schon bei der Reinigung des EGFP aus dem Zellextrakt dargestellt (Abbildung 37), anhand der Fluoreszenz verfolgt werden.

7.3.2.4 Funktioneller Nachweis der scFV auf der Hefeoberfläche

Mit Hilfe dieses Atrazin-C₆-EGFP Konjugats wurden nun die rekombinanten Zellen der Klone EBY100/pYD-scFv-K411B und EBY100/pYD-scFv-24D jeweils vor und nach Induktion inkubiert. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop ergab tatsächlich, daß sich Zellen vor Induktion überhaupt nicht anfärben ließen und nach Induktion nur solche Zellen, die das Atrazin-spezifische scFv K411B auf der Oberfläche präsentieren (Tabelle 18). Damit konnte die funktionelle Expression des scFvs auf der Oberfläche nachgewiesen und gleichzeitig eine signifikante Kreuzreaktivität des anti-2,4-D-scFvs gegenüber Atrazin ausgeschlossen werden.

| Klon | Konstrukt | Spezifität der scFv | Fluoreszenzsignal | | |
|------|-------------------------|---------------------|-------------------|------|------|
| | | | 0 h | 24 h | 48 h |
| 6 | EBY100 / pYD-scFv-24D | 2,4-D | - | - | - |
| 8 | EBY100 / pYD-scFv-24D | 2,4-D | - | - | - |
| 12 | EBY100 / pYD-scFv-K411B | Atrazin | - | + | ++ |
| 15 | EBY100 / pYD-scFv-K411B | Atrazin | - | + | ++ |

Tabelle 18: Nachweis der scFv auf der Oberfläche rekombinanter Hefen durch Färbung mit Atrazin-C₆-EGFP und Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Die angegebenen Werte (-, +, ++, +++) geben den subjektiven, qualitativen Eindruck der Fluoreszenzintensität und des Anteils fluoreszierender Zellen wieder und können nicht quantitativ ausgewertet werden: - keine Fluoreszenz beobachtbar, + schwaches Fluoreszenzsignal, das nur wenig vom Hintergrund unterscheidbar war, ++ eindeutige Fluoreszenz bei vielen Zellen, +++ starke Fluoreszenz bei nahezu allen Zellen.

7.3.2.5 Expression eines scFV-EGFP-Fusionsproteins auf der Hefeoberfläche

Nachdem sich in den vorangegangenen Versuchen die Funktion des Oberflächenexpressionssystems nachweisen ließ, sollte nun ein Fusionsprotein bestehend aus dem scFv und dem EGFP auf der Oberfläche der Hefe präsentiert werden. Dies erlaubt eine Quantifizierung des Fusionsproteins direkt über die Fluoreszenz des EGFP-Anteils ohne zusätzliche Markierungsschritte und würde die *Screening*-Experimente dementsprechend vereinfachen.

Das scFvK411B-EGFP-Fusionsgen wurde am Institut bereits in einer anderen Arbeit durch eine *splicing-by-overlap-extension* PCR hergestellt (Oelschlaeger und Srikant-lyer) und lag in pET20b(+) kloniert vor (pET20-scFvK411B-EGFP). Es konnte somit durch PCR mit den *Primern* scFv-EGFP-F und scFv-EGFP-R und dem Vektor

pET20-scFvK411B-EGFP als *Template* amplifiziert werden, wobei das 5'-Ende mit einer *Xho* I und einer *Not* I Schnittstelle und das 3'-Ende mit einer *Apa* I Schnittstelle versehen wurde. Das PCR-Produkt (1500 bp) wurde einmal mit *Xho* I / *Apa* I (a) und einmal mit *Not* I / *Apa* I (b) geschnitten und jeweils in die entsprechenden Schnittstellen von pYD1 ligiert. Schließlich wurde EBY100 mit den dabei entstandenen Vektoren pYD-K411B-EGFP-a und pYD-K411B-EGFP-b transformiert und mit einigen der Transformanten aus beiden Transformationsansätzen Expressionsversuche durchgeführt. Die Zellen der während der Kultivierung entnommenen Proben wurden lediglich in PBS gewaschen und ansonsten ohne weitere Behandlung direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert: Sämtliche untersuchten Klone zeigten vor Induktion nur ein schwaches Hintergrundsignal. Bereits nach 12 Stunden Induktion, aber insbesondere nach 48 Stunden Induktion fluoreszierten die Zellen sehr intensiv, was exemplarisch in Abbildung 40A dargestellt ist. Zwischen Klonen, die das Fusionsgen in *Xho* I / *Apa* I oder in *Not* I / *Apa* I von pYD1 enthielten, wurden keine Unterschiede bezüglich der Fluoreszenz gefunden. Im Vergleich zu Zellen, die nur das scFv exprimierten und anschließend mit FITC markiert wurden, war das Fluoreszenzsignal der Zellen mit dem scFv-EGFP-Fusionsprotein deutlich intensiver. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (LSM) konnte im Fall der Fusionsproteine auch eindeutig deren Lokalisation auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, während im Zellinneren nahezu keine Fluoreszenz vorliegt (Abbildung 40B).

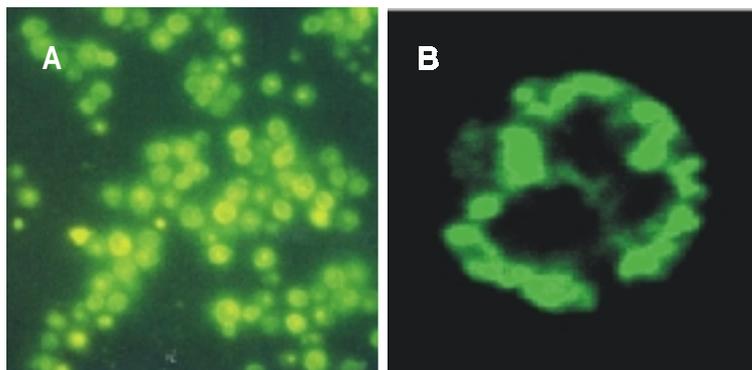


Abbildung 40: Analyse von EBY100/pYD-scFv-EGFP-b am Fluoreszenzmikroskop (A) und am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) jeweils mit UV-Anregung. Beide Aufnahmen erfolgten mit Zellen nach 48-stündiger Induktion der Expression. Die Aufnahme in (A) zeigt Zellen unter Verwendung eines 10x Okulars in Verbindung mit einem 40x Objektiv. (B) zeigt einen Schnitt durch eine Zelle, der am LSM durch ein 63x-Objektiv aufgenommen und mittels einer Bildverarbeitung weiter vergrößert wurde.

Das eigentliche Ziel des Systems, die Selektion von Zellen, die Antikörpervarianten mit besonderen Bindungseigenschaften exprimieren, erfordert jedoch neben der Expression der scFvs' bzw. des scFv-EGFP-Fusionsproteins auf der Oberfläche ein geeignetes Verfahren. Hierfür wurde die Durchflußcytometrie gewählt, mittels derer die Zellen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften analysiert und bei Bedarf im hohen Durchsatz durch Zellsortierung vereinzelt werden können. Da vor Ort kein FACS zur Verfügung stand, wurde im Rahmen dieser Arbeit nur eine grobe Validierung der Methode durchgeführt. Dazu wurden Hefezellen, die das scFv K411B exprimieren (EBY100/pYD-scFv-K411B) nach Atrazin-FITC-Markierung, sowie Zellen, die das scFv-EGFP-Fusionsprotein exprimieren (EBY100/pYD-scFv-EGFP) durchflußcytometrisch analysiert. Im Gegensatz zu den Negativkontrollen EBY100 und EBY100/pYD1, konnten sowohl bei den mit Atrazin-FITC markierten Zellen (EBY100/pYD-scFv-K411B; nicht dargestellt) als auch bei den scFv-EGFP exprimierenden Zellen (EBY100/pYD-scFv-EGFP) eindeutige Fluoreszenzsignale in den Proben nach Induktion nachgewiesen werden (Abbildung 41).

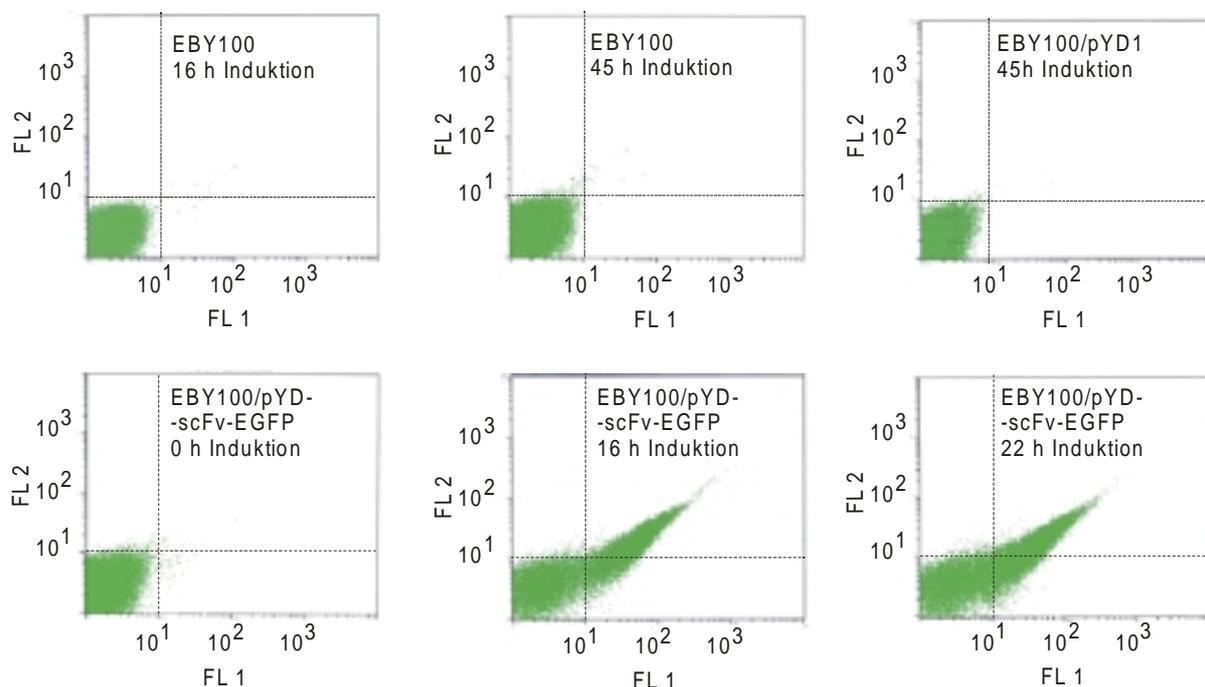


Abbildung 41: FACS-Analysen von EBY100/pYD-scFv-EGFP vor und nach Induktion (untere Reihe) im Vergleich zu den Negativkontrollen EBY100 und EBY100/pYD1 (obere Reihe). Dargestellt sind Dotplots der Fluoreszenzsignale FL1 gegen FL2, also grün (509 nm) gegen gelb (550nm).

Der Anteil fluoreszierender Zellen nach ca. 2 Tagen Induktion lag bei über 50 % der EBY100/pYD-scFv-EGFP Zellen. Deutlich ist zu erkennen, daß die durch das

EGFP emittierte Fluoreszenz auch in den FL2 Kanal einstreut, was bei einer Zweifarbenanalyse jedoch mittels Software-Einstellungen kompensiert werden könnte.

8 DISKUSSION

8.1 Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in *P. pastoris*

8.1.1 Ausgangspunkt

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein bereits bestehendes Expressionssystem zur Herstellung rekombinanter Antikörper in *E. coli*, mit dem Antikörperausbeuten von ca. 3 – 5 mg l⁻¹ erzielt werden konnten (Ziegler *et al.*, 1997). Hierfür waren bereits eine Reihe von Optimierungen notwendig, wie die Etablierung eines Hochzellichtefermentationsverfahrens mit der Zufütterung von Glucose zur Limitierung der Acetatkonzentration. Da die Expressionsmenge damit jedoch nicht zufriedenstellend gesteigert werden konnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Eignung von *Pichia pastoris* als Wirtsorganismus zur Expression rekombinanter Antikörperfragmente untersucht werden. Im Fall von scFvs konnte die Eignung zwar bereits mehrfach gezeigt werden (Eldin *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997b; Luo *et al.*, 1996), für Fab-Fragmente oder komplette Antikörper sind bis dato jedoch nur zwei Studien publiziert worden: (Takahashi *et al.*, 2000) stellten ein IgE-Rezeptor-spezifisches anti-FcεRI-Fab in Konzentrationen zwischen 10 und 40 mg l⁻¹ her, das die Bindung von IgE an FcεRI von Mastzellen inhibierte. (Ogunjimi *et al.*, 1999) exprimierten ein komplettes Dioxin-spezifisches IgG (36 mg l⁻¹), wobei jedoch nur ein kleiner Teil der sekretierten schweren und leichten Ketten das komplette Antikörpermolekül bildeten.

Als Modellantikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit der Atrazin-spezifische Antikörper K411B gewählt, dessen codierende DNA-Sequenzen als Fusion mit N-terminalen Signalsequenzen sowie den C-terminalen, konstanten Domänen eines anderen Antikörpers in einer bicistronischen Expressionskassette des Vektors pASK-K411B vorlagen und die periplasmatische Produktion von Fab-Fragmenten in *E. coli* ermöglichten.

8.1.2 Herstellung der Antikörper-Expressionsvektoren

Zur Herstellung von Fab-Fragmenten in *Pichia pastoris* war es zunächst notwendig, die beiden Gene für die schwere und leichte Kette des Fab-Fragmentes unter geeigneten Promotoren ins Genom von *Pichia* zu integrieren. Hierfür wurde eine Strategie gewählt, mittels derer die Gene beider Ketten bereits *in vitro* in einem Expressionsvektor kombiniert wurden. Dabei wurden - um eine sekretorische Expression zu erreichen - beide Gene an das 3'-Ende der α -Faktor-Signalsequenz fusioniert und standen jeweils unter Kontrolle eines eigenen Promotors (GAPDH-Promotor oder AOX1-Promotor), so daß schließlich für beide Ketten des Fabs komplette eigene Expressionskassetten in dem Vektor vorlagen. Dies sollte nach Transformation des linearisierten Vektors die Integration beider Expressionskassetten ins Genom von *Pichia* sicherstellen. Tatsächlich enthielten alle getesteten Transformanden die Gene beider Antikörper-Ketten genomisch integriert, was durch PCR mit spezifischen *Primern* gezeigt werden konnte (vgl. 7.2.2.2). Im Gegensatz dazu wählten andere Arbeitsgruppen eine Strategie der Kotransformation zweier separater Plasmide, die jeweils die Expressionskassette von nur einer Untereinheit der heterodimeren Proteine enthalten (Fidler *et al.*, 1998; Kalandadze *et al.*, 1996). Dies bringt jedoch den Nachteil mit sich, daß mehr Klone analysiert werden müssen, um Kotransformanden zu finden, die beide Expressionskassetten genomisch integriert enthalten. So enthielten im Fall des HLA-DR2 nur 14,1 % der untersuchten Transformanden die Gene beider Untereinheiten genomisch integriert (Kalandadze *et al.*, 1996). Die Ursache ist hierfür, daß für *Pichia* neben verschiedenen Auxotrophiemarkern nur Zeocin als stringenter Selektionsmarker zur Verfügung steht, der keine Positivselektion von Kotransformanden erlaubt (Kalandadze *et al.*, 1996).

Parallel zur Herstellung der Expressionsvektoren zur Expression des Fab-Fragments wurde ein Vektor zur Expression des entsprechenden scFv K411B hergestellt (7.2.8).

8.1.3 Expression des Fabs und des scFvs K411B

Die gewählte Klonierungsstrategie lieferte schließlich eine Reihe von Vektoren (pGAPZ α -Fab* und pPICZ α -Fab*), die sich außer in den verwendeten Promotoren in der Anordnung der Expressionskassetten der schweren und leichten Kette des Fabs zueinander sowie zur Linearisierungsschnittstelle des zu transformierenden Vektors

unterschieden. Nach Transformation von *Pichia pastoris* GS115 mit den Expressionsvektoren, deren Expressionskassetten in derselben Orientierung vorlagen, wurden durch ELISA und SDS-PAGE einige Transformanten hinsichtlich der Menge an exprimiertem Fab analysiert.

Zunächst zeigte sich bei der Analyse von SDS-Gelen, daß Klone mit den beiden heterologen Genen der schweren und leichten Kette unter Kontrolle des AOX1-Promotors deutlich höhere Expressionsmengen erzielten, als jene, bei denen die heterologe Expression konstitutiv unter Kontrolle des GAPDH-Promotors erfolgte.

Des weiteren zeigte sich, daß trotz einer vorhandenen klonalen Variation der Expressionsmenge, die Anordnung der Expressionskassetten diesbezüglich keine Rolle spielte. Aufgrund der konstant hohen Expressionsmengen bei wiederholten Kultivierungen wurde schließlich Klon 4A für Kultivierungen im 5l-Bioreaktor unter definierten Bedingungen als im Schüttelkolben ausgewählt. Die densitometrische Auswertung der dem Fab entsprechenden Bande eines SDS-Gels mit Kulturüberstand einer *fed-batch* Kultivierung des Klons 4A ergab bereits ohne weitere Fermentationsoptimierungen (Medium, pH, Temperatur, Rührerdrehzahl, u.s.w.) eine Fab Konzentration von ca. 40 mg l⁻¹. Dies ist im Vergleich zu anderen Proteinen, die in *Pichia* heterolog in Ausbeuten von bis zu mehreren Gramm pro Liter exprimiert werden konnten (Sreekrishna und Kropp, 1996) eher mäßig, entspricht aber exakt dem Wert den (Takahashi *et al.*, 2000) bei der sekretorischen Expression eines Fab in *Pichia* erzielten. Verglichen mit anderen heterodimeren Proteinen, die in *Pichia* zum Teil nur in weitaus geringeren Ausbeuten sekretiert werden konnten, z. B. HLA-DR2 (300 – 400 µg l⁻¹, (Kalandadze *et al.*, 1996) und oFSH (17,5 – 61 µg l⁻¹, (Fidler *et al.*, 1998)) ist dies jedoch ein beachtlicher Wert, obwohl nur ca. 30% der sekretierten H-Ketten mit den L-Ketten komplette Fab-Fragmente bildeten (= 12 mg l⁻¹), was durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen gezeigt wurde (Abbildung 17). Dies ist zwar nicht optimal aber dennoch bei der Expression von dimeren Proteinen nicht ungewöhnlich: Bei der Expression von scFvs mit einem C-terminalen Cystein, das durch intermolekulare Disulfidbrücken die Bildung von Dimeren ermöglicht, wurde ein maximales Monomer zu Dimer Verhältnis von ca. 1:3 gefunden (Luo *et al.*, 1997a). Bei der Expression des Follikel stimulierenden Hormons bildeten 10% bzw. 33% der beiden Untereinheiten oFSH α und oFSH β stabile Dimere (Fidler *et al.*, 1998). Auch

im Rahmen dieser Arbeit konnten mit scFVs, die ein zusätzliches Cystein im C-Terminus enthielten nahezu keine Dimere hergestellt werden (vgl. 7.2.8.2).

Die mit *Pichia* erzielte Expressionsmenge rekombinanter Fab Fragmente ist des weiteren vergleichbar mit der des parentalen mAbs in der Hybridoma Zelllinie K4E7 (50 –100 mg l⁻¹, (Giersch, 1993)). Bei der Expression desselben Fabs K411B unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotors in *E. coli* W3110 wurde in früheren Arbeiten wie eingangs erwähnt, trotz Etablierung einer Hochzellichtefermentation nur eine Ausbeute von ca. 3 – 5 mg l⁻¹ erreicht (Ziegler *et al.*, 1997).

Die nun in *Pichia* exprimierte Menge von ca. 40 mg l⁻¹ bzw. 12 mg l⁻¹ liegt auch im Bereich der Werte (zwischen 10 und 36 mg l⁻¹), die bei der sekretorischen Expression eines vollständigen Antikörpers mit *Pichia* erzielt wurden. Im Fall dieses Dioxin-spezifischen IgG zeigen die veröffentlichten Western Blot Analysen jedoch deutlich, daß nur ein sehr geringer Anteil der H- und L-Ketten die kompletten H₂L₂ Tetramere bildete, während der Großteil in Form von Monomeren oder Dimeren (HL) vorlag (Ogunjimi *et al.*, 1999).

Die genauere Analyse des Western Blots in Abbildung 17 weist darauf hin, daß mangelnde Disulfidbrückenbildung nicht der Grund für die nicht dimerisierten L- und H-Ketten ist: Die richtige Faltung der variablen und der konstanten Domänen eines Fab Fragments erfolgt auch durch Bildung von je einer intramolekularen Disulfidbrücke in jeder Domäne, also insgesamt vier in einem Fab Fragment. Zusätzlich werden beide Ketten eines Fab-Fragments durch eine intermolekulare Disulfidbrücke zusammen gehalten (vgl. Abbildung 3, 5.2.1). Im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen finden sich die Banden der schweren und der leichten Kette aufgrund des geringen Massenunterschieds (25,0 kDa bzw. 24,2 kDa) übereinandergelagert bei ca. 29 kDa, während unter nicht-reduzierenden Bedingungen beim Western Blot neben einer Bande von ca. 50 kDa, eine weitere Bande bei ca. 25 kDa erscheint. Während die 50 kDa Bande vermutlich das komplette Fab repräsentiert, entspricht die 25 kDa Bande aufgrund des verwendeten anti-(His)₆-Antikörpers nur der schweren Kette. Dieser scheinbare Größenunterschied der schweren Kette unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen von ca. 4 kDa kann wie folgt erklärt werden:

Die 29 kDa Bande entspricht der schweren Kette, deren intra- und intermolekularen Disulfidbrücken reduziert, also gespalten vorliegen. Bei der 25 kDa-Bande hingegen handelt es sich ebenfalls um die separate schwere Kette, deren

intramolekulare Disulfidbrücken jedoch gebildet wurden und unter den oxidierenden Bedingungen des SDS-Gels auch erhalten blieben und somit zu der kompakteren, sich schneller im Gel bewegendem Form der schweren Kette führten.

Da die intramolekularen Disulfidbrücken offensichtlich gebildet wurden, ist zu vermuten, daß nicht mangelnde Disulfidbrückenbildung in *Pichia*, sondern die in monomerer Form verbliebenen Ketten, die keinen Dimerisierungspartner gefunden haben, den limitierenden Faktor darstellen.

Das scFv K411B wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls sekretorisch in *Pichia* exprimiert. Wie bei der Expression des Fabs Fragmentes erfolgte die Expression sowohl unter dem konstitutiven GAPDH- als auch unter dem Methanol-induzierbaren AOX1-Promotor. Hier schien zunächst der GAPDH-Promotor die bessere Alternative hinsichtlich der Expressionsmenge zu sein. Bei der erneuten Expression des WT-scFv mit weiteren Transformanten sowie mehreren Mutanten mit einem zusätzlichen Cystein lieferten jedoch eindeutig Klone mit dem scFv-Gen unter Kontrolle des AOX1-Promotors die höheren Expressionsmengen, erkennbar an der Bandenintensität auf den SDS-Gelen (vgl. Abbildung 26 und Abbildung 30). Die exprimierte Menge war gemessen an den Bandenintensitäten auf den SDS-Gelen vergleichbar mit jener der Fab-Fragmente (vgl. 7.2.8.1 und 7.2.8.2). Die Ergebnisse anderer Arbeiten bei der Expression von scFvs in *Pichia* waren sehr unterschiedlich: Sie reichten vom Milligramm-Maßstab (Marty *et al.*, 2001; Ridder *et al.*, 1995) bis über 1 g l^{-1} (Freyre *et al.*, 2000). Eine interessante Beobachtung wurde von (Luo *et al.*, 1995) gemacht: Bei der Expression von scFvs, die die variablen Domänen in unterschiedlicher Reihenfolge enthielten, konnte nur das Konstrukt 5'-V_L-Linker-V_H-3' erfolgreich in *Pichia* exprimiert werden. Untersuchungen der Expressionsmengen sowie der Faltung von scFvs mit unterschiedlichen Anordnungen der schweren und leichten Kette, die in *E. coli* exprimiert wurden, zeigten jedoch unterschiedliche Ergebnisse (Anand *et al.*, 1991; Ayala *et al.*, 1995; Tsumoto *et al.*, 1994). Demnach ist anzunehmen, daß die zu bevorzugende Orientierung für jedes zu exprimierende scFv gesondert bestimmt werden muß. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit das scFv K411B nur in der vorhandenen Orientierung (5'-V_H-Linker-V_L-3') exprimiert wurde, kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden.

Sowohl bei den Fab Fragmenten wie auch bei den scFvs ist zu beachten, daß die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Expressionsmengen weitgehend ohne Optimierungen der Kultivierungsbedingungen erzielt wurden. Insbesondere die scFvs

wurden lediglich in Schüttelkolbenkulturen exprimiert. Die Kultivierung der rekombinanten Stämme unter kontrollierten Bedingungen wie sie in einem Bioreaktor vorliegen, bietet ein großes Potential zur Steigerung der erreichten Expressionsmengen (Hellwig *et al.*, 2001). Im Rahmen einer parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Master-Thesis konnten mittels einer statistischen Methode der Parameteroptimierung nach dem Modell von (Khuri und Conlon, 1981) in Kombination mit einigen Testfermentationen die zur Expression des Fabs K411B optimalen Werte für den pH (5,7) und die Temperatur (29°C) bestimmt und experimentell bestätigt werden (Tulapurkar, 2000). Eine weitere Steigerung der Expressionsmenge wurde hier durch Verwendung des *Pichia*-Stammes X33 erzielt.

Bemerkenswert war bei allen der sekretorisch exprimierten Antikörperfragmente deren Reinheit im Kulturüberstand. So waren nach vollständiger Entfernung der Zellen auf den SDS-Gelen der entsprechenden Kulturüberstände induzierter Kulturen ausschließlich die Banden der rekombinanten Proteine sichtbar. Die einzige Verunreinigung bestand demnach aus den Medienbestandteilen. Gründe für diese hohe Reinheit sind die stabile Zellwand der Hefe, durch die kaum Hefeproteine - weder durch aktive Transportvorgänge noch durch passive Diffusion - nach außen ins Medium gelangen (Longstaff *et al.*, 1998).

Nachdem sich die Eignung und das Potential von *P. pastoris* bei der Expression rekombinanter Antikörperfragmente, insbesondere Fabs gezeigt haben, wurden die zur Herstellung des Fabs K411B verwendeten Vektoren durch mehrere stille Mutationen so modifiziert, daß sie zukünftig für die Expression von Fab Fragmenten mit beliebigen variablen Domänen zugänglich sind. Dies erfolgte durch Entfernung mehrerer Schnittstellen, so daß die variablen Domänen des Fabs nun durch singuläre Restriktionsschnittstellen gegen andere variable Domänen ausgetauscht werden können. Die Validierung dieses Vektorsatzes erfolgte schließlich durch Expression eines 2,4-D spezifischen Fab, dessen variable Domänen aus der Zelllinie E2/B5 stammen. Im Vergleich zum Fab K411B waren die Expressionsmengen dieses Fab jedoch deutlich geringer. Dies ist aus mehreren Gründen bemerkenswert: Beide Fab-Fragmente besitzen dieselben konstanten Domänen, die somit nicht der limitierende Faktor sein können. Die Gene der schweren und leichten Ketten werden in beiden Antikörpern jeweils als Fusion mit der α -Faktorsignalsequenz exprimiert, so daß eine unterschiedliche Transkriptionsinitiation infolge der 5'-Sequenz ausgeschlossen werden kann. Auch die Translationsinitiation sollte in beiden Fällen

gleich sein, da keine Variationen in der Sequenz der Ribosomenbindestelle oder deren Abstand zum Startcodon vorliegen. Somit muß der Grund in der Sequenz der variablen Domäne liegen. Tatsächlich wurden bei der Expression rekombinanter Antikörper in *E. coli* mehrfach Punktmutationen in den variablen Domänen gefunden, die die Faltung, die Stabilität oder allgemein das Expressionslevel stark beeinflussten (Chowdhury *et al.*, 1998; Kipriyanov *et al.*, 1997; Nieba *et al.*, 1997). Allerdings waren die betroffenen Positionen der variablen Regionen immer spezifisch für das jeweilige Antikörperfragment, so daß keine generellen Vorhersagen getroffen werden können. Somit könnte zur Verbesserung des Expressionslevels auf rationalem Wege nur in der Sequenz des 2,4-D spezifischen Fab speziell nach Positionen mit im Vergleich zu gut exprimierten Antikörpern ungewöhnlichen Aminosäuren gesucht werden und diese gegebenenfalls durch die an dieser Stelle möglicherweise häufiger vorkommenden Aminosäuren ersetzt werden. Alternativ bestünde die Möglichkeit durch Zufallsmutagenese Varianten zu generieren, die sich besser exprimieren lassen. Insbesondere letzteres beinhaltet jedoch auch die Gefahr, daß Varianten mit besserer Expression, aber zerstörter Antigenbindungsfähigkeit entstehen.

8.1.4 Charakterisierung der Antikörperfragmente

Die Bindungseigenschaften der mit den rekombinanten *Pichia* Stämmen hergestellten Antikörperfragmente wurden mit einem kompetitiven ELISA gemessen. Während dieser Assay in der Umweltanalytik eingesetzt wird, um Herbizide nachzuweisen, diente er im Rahmen dieser Arbeit der Charakterisierung der Antikörperfragmente und wurde in einer modifizierten Version ohne Kompetitor auch eingesetzt um die rekombinanten Antikörper im Kulturüberstand nachzuweisen. Hierbei können die maximalen Absorptionswerte auch zum Vergleich der Antikörpermenge herangezogen werden (vgl. Abbildung 19A). Eingeschränkt wird dies jedoch dadurch, daß jeweils nur Antikörperfragmente derselben globulären Struktur (Fab, scFv, mAk) verglichen werden können, da diese im *Coating*-Schritt an einen polyklonalen anti-Maus-Antikörper immobilisiert werden. Dieser jedoch besteht aus einer Mischung von Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Mausantikörpers und bindet dementsprechend die verschiedenen Fragmente unterschiedlich gut. Dadurch erklärt sich auch das geringe Signal bei Verwendung von scFvs im Vergleich zu Fabs oder mAk: Je „vollständiger“ ein Antikörpermolekül ist, desto mehr Epitope stehen zur Bindung an den pAk zur Verfügung und desto

höher ist der zu erreichende Absorptionwert, wobei das Maximum erreicht wird, wenn alle Bindungsstellen der pAk besetzt sind. Ein zusätzlicher Grund für die mit den rekombinanten Antikörperfragmenten im ELISA erhaltenen geringen Absorptionssignale (0,2 – 0,4) im Vergleich zu denen mit dem mAk K4E7 (>1,0) können unterschiedliche posttranslationale Modifikationen sein: Der verwendete primäre anti-Maus-IgG wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit Maus-Antikörpern gewonnen. Die im polyklonalen Serum des Kaninchens vorhandenen Ak binden wahrscheinlich in den meisten Fällen an Aminosäuresequenz-Epitope des Maus-IgG, möglicherweise jedoch auch an Epitope, die infolge posttranslationaler Modifikationen wie Glykosilierungen entstehen. Letzere sind jedoch bei den in *Pichia* exprimierten Fabs vermutlich in veränderter Form vorhanden, so daß sie von den betroffenen IgGs des Serums nicht gebunden werden.

Bei der Messung der Testmittelpunkte zeigte sich die erwartete Übereinstimmung zwischen den beiden Fragmenten: Bei der Competition des Atrazin-C₆-POD-Tracers durch Atrazin wurden mit beiden Antikörperfragmenten Testmittelpunkte (50 % Inhibition) von ca. 3 µg l⁻¹ Atrazin erreicht. Diese liegen somit ca. eine Größenordnung höher, als der mit dem parentalen monoklonalen Antikörper der Zelllinie K4E7 erreichte Wert von ca. 0,2 µg l⁻¹. Allerdings besteht dieser Unterschied auch zwischen dem mAk und dem in *E. coli* produzierten scFv K411B (Kramer und Hock, 1996) und wird demnach nicht durch Strukturveränderungen infolge posttranslationaler Modifikationen z. B. während der Sekretion, verursacht. Die Kreuzreaktivitätsmuster der beiden Triazin-spezifischen Antikörperfragmente, die aus den IC₅₀-Werten der Kalibrierungskurven gegen einige repräsentative Triazine ermittelt wurden, waren nicht nur identisch mit denen des entsprechenden in *E. coli* hergestellten scFv K411B sondern im Gegensatz zum Testmittelpunkt auch mit denen des parentalen Antikörpers K4E7 (Giersch, 1993; Kramer und Hock, 1996; Kusharyoto *et al.*, 2002).

Hierbei ist zu beachten, daß die Kreuzreaktivitäten auf Basis der in µg l⁻¹ angegebenen Testmittelpunkte bestimmt wurden. Dies ist rein wissenschaftlich betrachtet nicht korrekt, da der Einfluß der Molekulargewichte der verschiedenen Analyten hierbei nicht berücksichtigt wird. Es wurde dennoch so verfahren, da es der gängigen Praxis in der Umweltanalytik entspricht. Im übrigen stellen die Kreuzreaktivitäten jeweils das relative Bindungsverhalten gegenüber den einzelnen Triazinen dar, so daß bei konstanter Verwendung der Massenkonzentration in allen

Experimenten ein Vergleich verschiedener Kreuzreaktivitäten dennoch möglich ist. Die absolute Bindung der Triazine durch den mAk erfolgt hingegen auf einem um den Faktor 10 – 15 höheren Affinitätslevel, als durch die rekombinanten Antikörperfragmente. Diese Änderung der Affinität bei der Transformation vom mAk zum rekombinanten Ak-Fragment kann verschiedene Ursachen haben:

Der Einfluß der Valenz, also die Zahl der Bindungsstellen der Antikörperfragmente auf die gemessene Affinität sollte durch Expression von scFvs, die über ein zusätzliches C-terminales Cystein dimerisieren, untersucht werden. Die Dimerisierung über Disulfidbrücken erfolgte jedoch bei keinem der Konstrukte (vgl. 7.2.8.2); möglicherweise sind sterische Gründe hierfür verantwortlich. Der auch als Avidität bezeichnete Effekt wirkt sich jedoch hauptsächlich bei höhermolekularen Antigenen aus, die multiple Bindungen eines Antikörpers an mehrere Epitope eines Antigens ermöglichen. Bei den Triazinen handelt es sich jedoch um niedermolekulare Haptene, die nahezu vollständig von einer Antigenbindestelle umgeben sind, so daß eine Mehrfachbindung durch zwei Antigenbindungsstellen eines mAk weitgehend ausgeschlossen werden kann. Außerdem wurde keine Änderung der gemessenen Affinität bei konventionell durch Papain-Verdau hergestellten Fab-Fragmenten gegenüber dem ursprünglichen mAk beobachtet (Kramer, 2001). Die Natur macht sich diesen Effekt zu Beginn einer Immunreaktion, die noch ohne somatisch hypermutierte (und damit in ihrer Affinität gesteigerte) Antikörper auskommen muß, zunutze: Zur Steigerung der Affinität um bis zu mehrere Größenordnungen (Ciric *et al.*, 1995) werden die pentameren IgM-Moleküle hergestellt, die 10 identische Antigenbindungsstellen besitzen.

Die Sequenz der rekombinanten Fragmente kann als Grund für die Affinitätsänderung jedoch nicht ausgeschlossen werden: Hierbei ist zunächst zu beachten, daß nur die Sequenz der rekombinanten Fragmente vorliegt, so daß kein direkter Vergleich mit der Sequenz des parentalen mAk möglich ist. Es hat sich jedoch gezeigt, daß sämtliche der aus der Hybridom-Zelllinie K4E7 hervorgegangenen *E. coli* Klone, die Bindungsaffinität zeigten, dieselbe Aminosäuresequenz aufwiesen (Kramer und Hock, 1996). Somit können etwaige Fehler bei der ursprünglichen PCR-Amplifikation der V-Gene ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der V-Gene der zur Herstellung von K4E7 verwendeten Myelomzelllinie PAI-B₃ Ag8I zeigte jedoch, daß die V_L-Kette der rekombinanten Klone identisch ist mit der V_L-Kette der Myelomlinie, die selbst keine Antikörper exprimiert

(Kramer, 2001). Somit bestehen die rekombinanten Fragmente aus der Kombination einer Triazin-spezifischen V_H -Domäne mit einer unspezifischen V_L -Domäne der Myelomzelllinie, was der wesentliche Grund für die geringere Affinität der rekombinanten Fragmente im Vergleich zum mAk sein dürfte. Das vergleichbare Kreuzreaktivitätsmuster hingegen läßt sich durch das Vorhandensein der spezifischen V_H -Kette (vor allem der CDR H3) begründen, die häufig den wesentlichen Beitrag für die Antigenbindung leistet (Rini *et al.*, 1992).

Das von *Pichia* nur in geringen Mengen sekretierte 2,4-D spezifische Fab Fragment diente im Rahmen dieser Arbeit lediglich als Validierung für die Expressionsvektoren und wurde nicht weiter charakterisiert. Lediglich der Testmittelpunkt aus der Kalibrierkurve bei der Detektion von 2,4-D wurde zu ca. 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ bestimmt.

Bei Betrachtung der erreichten Testmittelpunkte hinsichtlich ihrer Relevanz in der Umweltanalytik ist festzustellen, daß Herbizidkonzentrationen im Bereich der europäischen Grenzwerte mit dem gewählten kompetitiven ELISA und den verschiedenen Antikörperfragmenten nachgewiesen werden können. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Nachweisgrenzen um ca. eine Größenordnung tiefer liegen (bei 10% Inhibition), als die Testmittelpunkte. Desweiteren kann die Sensitivität des ELISAs durch Verwendung geringerer Konzentrationen des Antikörpers sowie des *Tracers* erhöht werden. Im Fall des *Tracers* trägt auch eine geringere Kopplungsrate, das heißt weniger Atrazin je POD-Molekül zur Sensitivität bei. In beiden Fällen begründet sich dies dadurch, daß weniger Atrazin in der Probe benötigt würde, um den *Tracer* von der Antikörperbindungsstelle zu verdrängen bzw. an der Bindung zu hindern. Eine weitere Alternative zur Steigerung der Sensitivität, wäre die Verwendung eines *Tracers*, bei dem die POD an ein schwächer bindendes Hapten als Atrazin gekoppelt wird. Bei allen Vorgehensweisen ist jedoch darauf zu achten, daß die gemessenen Absorptionswerte das Hintergrundsignal deutlich übersteigen.

Ohne eine explizite Untersuchung ist bei verschiedenen ELISAs, die mit demselben *Pichia*-Kulturüberstand über einen längeren Zeitraum wiederholt durchgeführt wurden, eine relativ hohe Stabilität des Fabs K411B aufgefallen. Die beim ELISA nach Lagerung der Überstände bei ca. 8°C nach ca. einem halben Jahr gemessenen Absorptionswerte lagen nahezu im selben Bereich wie bei der Messung mit den frischen Überständen. Einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung der Fabs' im Überstand leisten hier die Medienbestandteile des Komplexmediums,

insbesondere wohl die Peptide. Dies zeigte sich nach Dialyse eines Kulturüberstands gegen Phosphatpuffer bei nachfolgenden reflektometrischen interferenzspektroskopischen Messungen zur Bestimmung der kinetischen Daten des Fabs am Institut für Physikalische Chemie in Tübingen. In den dialysierten Überständen verloren die so gereinigten Fabs binnen weniger Tage nahezu ihre ganze Aktivität (Haenel, 2000). Dies mag auch eine Erklärung für die geringen Expressionsmengen sein, die bei Kultivierung der rekombinanten *Pichia* Klone mit Minimalmedium im Bioreaktor erzielt wurden (Tulapurkar, 2000).

8.2 Hochdurchsatzscreening von Antikörperbibliotheken

8.2.1 Vorbemerkungen

Antikörperbibliotheken bilden häufig das Ausgangsmaterial bei der Suche nach geeigneten Antikörpern für Anwendungen in der Therapie, Diagnostik oder Analytik. Unabhängig davon, ob es sich um *in vivo* synthetisierte oder um artifizielle Antikörperbibliotheken wie die sogenannte HUCAL-Bibliothek (Knappik *et al.*, 2000) handelt, ist ein geeigneter Test die wesentliche Voraussetzung für den Erfolg bei der Suche nach dem Antikörper einer bestimmten Eigenschaft. Bei der Beschreibung evolutiver Methoden zur Verbesserung von Proteineigenschaften wird dies allgemein häufig durch den Satz „*You get what you screen for – Man findet (nur) wonach man sucht*“ ausgedrückt. Voraussetzung für die Eignung eines solchen Tests ist neben der Genauigkeit bei der Messung des jeweiligen Parameters die Möglichkeit ihn schnell und im hohen Durchsatz bei vertretbarem Aufwand durchführen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Assays etabliert werden, mit denen aus Bibliotheken von Zufallsmutanten der herbizidspezifischen Antikörperfragmente, Varianten mit veränderten Bindungseigenschaften selektiert werden können.

8.2.2 Fluoreszenzpolarimetrie

Zunächst wurde ein homogener, kompetitiver Test auf Basis von Fluoreszenzpolarisation im Mikrotiterplattenformat etabliert. Mit im Vergleich zum ELISA viel geringerem Arbeits- und Zeitaufwand (wenige Minuten anstelle von Stunden) konnten damit ähnliche sigmoidale Bindungskurven wie im ELISA aufgenommen werden (Abbildung 32). Allerdings lag der damit erreichte Testmittelpunkt bei der Bestimmung von Atrazin mit ca. $90 \mu\text{g l}^{-1}$ um ein Vielfaches

höher, als der des kompetitiven ELISA. Da die damit erreichten Nachweisgrenzen nicht zur Detektion von Herbizidkonzentrationen im Bereich der Grenzwerte ausreichen, ist der Assay für umweltanalytische Anwendungen so nicht geeignet, sondern müßte hinsichtlich der Nachweisgrenzen optimiert werden. Da beim Vergleich von verschiedenen Antikörpervarianten wie bereits beschrieben jedoch das relative Bindungsverhalten gegenüber den verschiedenen Triazinen relevant ist, kann die Bestimmung der Kalibrierungskurven ohne Nachteile auch bei geringeren Affinitäten, also mit höheren als Kompetitor einzusetzenden Herbizidkonzentrationen erfolgen. Schwierigkeiten zeigten sich bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Dies betraf weniger das generelle Funktionieren des Tests, dafür jedoch die bei verschiedenen in zeitlichem Abstand durchgeführten Experimenten sich deutlich voneinander unterscheidenden Testmittelpunkte.

Ein großer Vorteil des Assays ist im Gegensatz zu heterogenen Immunoassays die schnelle und einfache Durchführbarkeit, die in wenigen Minuten erfolgen kann. Nachteilig bleibt dennoch das verwendete Mikrotiterplattenformat: Selbst bei Verwendung von 384er Platten und automatischen Pipettierrobotern führt dies zu einem hohen finanziellen (Verbrauchsmaterial) und logistischen Aufwand, wenn der Test im hohen Durchsatz erfolgen soll, also wenn Tausende von Varianten analysiert werden sollen. Die verschiedenen Aspekte berücksichtigend, ist die Methode weniger für genaue Messungen in hohem Durchsatz, als vielmehr für schnelle Analysen geeignet, die es ermöglichen eine grobe Aussage zu treffen, ob Triazine vorhanden sind oder nicht, bzw. ob ein Antikörper vorhanden ist und den jeweiligen Analyten bindet oder nicht. Als konkretes Einsatzgebiet käme hier auch die Kontrolle der Produktbildung bei der Herstellung rekombinanter Antikörper durch Kultivierung der Mikroorganismen im Fermenter in Frage, wo häufig eine schnelle *online*-Messung gewünscht wird.

8.2.3 Hefeoberflächendisplay

Da sämtliche bisher verwendete Assays den Limitationen der Mikrotiterplatte unterworfen waren, wurde mit dem Hefeoberflächendisplay in Verbindung mit der Durchflußcytometrie eine Methode etabliert, die ohne die Verwendung von Mikrotiterplatten einen weitaus höheren Durchsatz erlaubt. So können mit modernen Zellsortierern bis zu 40.000 Zellen (Mutanten) pro Sekunde analysiert werden. Im Vergleich zu anderen *Screenings*- und Selektionssystemen wie Phagendisplay oder

die Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von Bakterien zeichnet sich das Hefeoberflächendisplay durch die Verwendung des eukaryontischen Wirts *Saccharomyces cerevisiae* aus, der gegenüber den prokaryontischen Systemen Vorteile bei der Expression eukaryontischer Proteine besitzt. Ursprünglich von der Arbeitsgruppe von Karl D. Wittrup entwickelt (Boder und Wittrup, 1997), kennzeichnet das dem Phagendisplay verwandte System eine physische Kopplung von Genotyp und Phänotyp des zu analysierenden Proteins. Obwohl mittlerweile kommerziell von Invitrogen erhältlich, sind bislang nur Arbeiten aus dem Umfeld der Arbeitsgruppe von Wittrup publiziert worden: Diese widmeten sich der Synthese und dem *Screening* nach Antikörpern mit extrem hoher Affinität (Boder *et al.*, 2000), der Isolierung von Antikörpern, die als Pseudoantigene des T-Zellrezeptors die Aktivierung von T-Zellen bewirken (Cho *et al.*, 1998) sowie der Erhöhung der Temperaturstabilität und Sekretionseffizienz von Antikörpern, die als WT nicht exprimiert wurden, durch gerichtete Evolution (Shusta *et al.*, 1999).

Während die von Wittrup und seiner Arbeitsgruppe im Hefeoberflächendisplay exprimierten Rezeptoren (Antikörperfragmente und T-Zellrezeptor) spezifisch vermeintlich große Antigene (Proteine) binden, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit den herbizidspezifischen scFvs erstmalig Antikörper gegen kleine Haptene auf der Oberfläche exprimiert. Sowohl die Präsentation des atrazinspezifischen scFvs K411B wie auch des 2,4-D-spezifischen scFvs gelang als Fusion mit dem Aga2-Protein sowie verschiedenen Tags zur Markierung. Die Beobachtung der fluoreszierenden Zellen am Fluoreszenzmikroskop spiegelte jedoch auch hier das für die beiden Antikörper bereits bei der löslichen Expression in *Pichia* beobachtete unterschiedliche Expressionslevel wieder: So war der Anteil von fluoreszierenden Zellen die das 2,4-D-spezifische scFv präsentierten deutlich geringer als der Anteil der Zellen, die das atrazinspezifische scFv exprimierten. Gleiches gilt für die durchschnittliche Fluoreszenzintensität einzelner Zellen.

Schwierigkeiten traten zunächst beim funktionellen Nachweis der scFvs durch Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antigenen auf: Das Problem der unspezifischen Markierung der Zellen mit Atrazin-FITC- bzw. 2,4-D-FITC-Konjugaten konnte jedoch durch Verwendung der größeren Atrazin-EGFP-Konjugate gelöst werden. Ein weiterer Schritt zur Optimierung des *Screening*-Systems sollte die Präsentation eines scFv-EGFP-Fusionsproteins auf der Oberfläche darstellen: Das Fluoreszenzsignal infolge der Bindung fluoreszierender Antigenkonjugate hängt

neben der Affinität des scFvs zum Antigen auch von der Menge des präsentierten Fusionsproteins ab. (Boder und Wittrup, 1997) haben deswegen vorgeschlagen, die Menge des auf der Oberfläche präsentierten Fusionsproteins über eine zweite, von der Antigen-spezifität unabhängigen Markierung der präsentierten Fusionsproteine mit Epitop-spezifischen Antikörpern zu messen und so in die Auswertung mit einzubeziehen. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Expression des scFvK411B-EGFP-Fusionsproteins anstelle des scFvs allein, ermöglicht nun eine direkte Bestimmung des Oberflächenexpressionslevels anhand der Fluoreszenz des EGFP-Anteils. Der funktionelle Nachweis des scFvs Anteils dieses Fusionsproteins konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geführt werden. Im Ergebnisteil nicht dargestellt, sollte dies durch Bindung eines DsRed-Atrazin-Konjugats an die scFv-Bindungsstelle erfolgen, scheiterte jedoch letztlich an der Verfügbarkeit des reinen rot-fluoreszierenden DsRed Proteins für die Kopplung mit Atrazin. Das WT-Protein ließ sich zwar rekombinant in *E. coli* herstellen; nach Einführung eines C- oder N-terminalen (His)₆-Tags zur Reinigung durch IMAC erfolgte jedoch keine Expression mehr. In einer anderen Arbeit am ITB konnte jedoch bei der löslichen Expression des Fusionsproteins bereits die Funktionalität des scFv-Anteils nachgewiesen werden (Oelschlaeger und Srikant-Iyer). Sofern der nun zusätzliche Aga-Anteil des Fusionsproteins keinen störenden Einfluß hat, in dem er z. B. die Antigenbindungsstelle blockiert, sollte somit mittels eines zweiten nicht im Emissionswellenlängenbereich von EGFP fluoreszierenden Atrazin-Tracers die Funktionalität des scFv-Anteils des Fusionsproteins gezeigt werden können.

Alternativ wurden zur Bestimmung der Fluoreszenzsignale aufgrund der Atrazin-FITC- bzw. Atrazin-EGFP-Markierung neben der relativ subjektiven Auswertung am Fluoreszenzmikroskop im Rahmen zweier parallel zu dieser Arbeit am ITB durchgeführten Studienarbeiten Fluoreszenzmessungen am Fluorimeter durchgeführt (Mohr, 2000; Pollak, 2000). Da hierbei jedoch keine einzelnen Zellen analysiert werden, sondern Messungen in einer Zellsuspension erfolgen, war darauf zu achten, daß die zu vergleichenden Proben exakt dieselbe Anzahl Zellen enthielten, was durch die Entnahme von sogenannten OD-Äquivalenten erreicht wurde (Bsp. 1 ml Kultur mit OD₆₀₀=1 oder 0,5 ml Kultur mit OD₆₀₀=2). Bei der Messung von Zellen, die nur das scFv K411B auf der Oberfläche exprimierten und mit Epitop-spezifischen Antikörpern markiert wurden, war die Fehlerquote infolge von unterschiedlichen Zellverlusten bei den verschiedenen Proben während der

Waschschritte jedoch sehr hoch. Von Zellen, die das scFv-EGFP-Fusionsprotein präsentierten, konnte dagegen direkt die Fluoreszenz gemessen werden. Bei der Messung unterschiedlicher Zellmengen ergab sich eine nahezu lineare Korrelation zwischen eingesetzter Zellmenge und gemessenem Fluoreszenzsignal, so daß hier von einem geringen Fehler ausgegangen werden kann.

Der Nachweis der Oberflächenexpression der scFvs' bzw. des scFv-EGFP Fusionsproteins erfolgte schließlich auch durchflußcytometrisch. Gemessen am Anteil fluoreszierender Zellen sowie an der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen waren die FACS-Messungen deutlich sensitiver, als die Beobachtungen am Fluoreszenzmikroskop. Dies ist insofern von Bedeutung, als daß die eigentliche Selektion der Mutanten nach einer Mutagenese ebenfalls am FACS erfolgen würde.

9 LITERATUR

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. (1994). "Cellular molecular Immunology." 2nd ed. W.B. Saunders Company.
- ADAMS, G. P., MCCARTNEY, J. E., TAI, M. S., OPPERMAN, H., HUSTON, J. S., STAFFORD, W. F., 3RD, BOOKMAN, M. A., FAND, I., HOUSTON, L. L., WEINER, L. M. (1993). Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Research* **53**(17), 4026-34.
- ALFTHAN, K., TAKKINEN, K., SIZMANN, D., SÖDERLUND, H., TEERI, T. T. (1995). Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides. *Protein Engineering* **8**(7), 725-731.
- ANAND, N. N., MANDAL, S., MACKENZIE, C. R., SADOWSKA, J., SIGURSKJOLD, B., YOUNG, N. M., BUNDLE, D. R., NARANG, S. A. (1991). Bacterial expression and secretion of various single-chain Fv genes encoding proteins specific for a Salmonella serotype B O-antigen. *Journal of Biological Chemistry* **266**(32), 21874-9.
- ANDERSON, D. R., GRILLO-LOPEZ, A., VARNIS, C., CHAMBERS, K. S., HANNA, N. (1997). Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans* **25**(2), 705-8.
- AYALA, M., BALINT, R. F., FERNANDEZ-DE-COSSIO, L., CANAAN-HADEN, J. W., LARRICK, J. W., GAVILONDO, J. V. (1995). Variable region sequence modulates periplasmic export of a single-chain Fv antibody fragment in Escherichia coli. *Biotechniques* **18**(5), 832, 835-8, 840-2.
- BANDTLOW, C., SCHIWECK, W., TAI, H.-H., SCHWAB, M. E., SKERRA, A. (1996). The Escherichia coli-derived Fab fragment of the IgM/κ antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Eur. Journal of Biochemistry* **241**, 468-475.

- BARBAS, C. F., 3RD, KANG, A. S., LERNER, R. A., BENKOVIC, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* **88**(18), 7978-82.
- BARCELO, D., HENNION, M. C. (1997). "Trace determination of pesticides and their degradation products in water." Elsevier, Amsterdam.
- BASSI, A. S., DING, D. N., GLOOR, G. B., MARGARITIS, A. (2000). Expression of single chain antibodies (ScFvs) for c-myc oncoprotein in recombinant *Escherichia coli* membranes by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae* [In Process Citation]. *Biotechnology Progress* **16**(4), 557-63.
- BETTER, M., CHANG, C. P., ROBINSON, R. R., HORWITZ, A. H. (1988). *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**(4855), 1041-3.
- BETTER, M., HORWITZ, A. H. (1989). Expression of engineered antibodies and antibody fragments in microorganisms. *Methods in Enzymology* **178**, 476-496.
- BIRD, R. E., HARDMAN, K. D., JACOBSON, J. W., JOHNSON, S., KAUFMANN, B. M., LEE, S.-M., LEE, T., POPE, S. H., RIORDAN, G. S., WHITLOW, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426.
- BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**(6), 1513-23.
- BOADO, R. J., JI, A., PARDRIDGE, W. M. (2000). Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a genetically engineered single chain antibody against the rat transferrin receptor. *Journal of Drug Target* **8**(6), 403-12.
- BODER, E. T., MIDELFORT, K. S., WITTRUP, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity [In Process Citation]. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **97**(20), 10701-5.
- BODER, E. T., WITTRUP, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology* **15**(6), 553-7.

- BODER, E. T., WITTRUP, K. D. (2000). Yeast surface display for directed evolution of protein affinity, stability and expression. *Methods for Enzymology* **328**(430-444).
- BOSS, M. A., KENTEN, J. H., WOOD, C. R., EMTAGE, J. S. (1984). Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. *Nucleic Acids Research* **12**(9), 3791-806.
- BOWDISH, K., TANG, Y., HICKS, J. B., HILVER, D. (1991). Yeast expression of a catalytic antibody with chorismate mutase activity. *Journal of Biological Chemistry* **266**(18), 11901-11908.
- BREITLING, F., DÜBEL, S., SEEHAUS, T., KLEWINGHAUS, I., LITTLE, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**, 147-153.
- CABILLY, S., RIGGS, A. D., PANDE, H., SHIVELY, J. E., HOLMES, W. E., REY, M., PERRY, L. J., WETZEL, R., HEYNEKER, H. L. (1984). Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **81**(11), 3273-7.
- CARTER, P., KELLEY, R. F., RODRIGUEZ, M. L., SNEDECOR, B., COVARRUBIAS, M., VELLIGAN, M. D., WONG, W. L. T., ROWLAND, A. M., KOTTS, C. E., CARVER, M. E., YANG, M., BOURELL, J. H., SHEPARD, H. M., HENNER, D. (1992). High-level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *BIO/TECHNOLOGY* **10**, 163-167.
- CHAMES, P., BATY, D. (2000). Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. *FEMS Microbiology Letters* **189**(1), 1-8.
- CHO, B. K., KIEKE, M. C., BODER, E. T., WITTRUP, K. D., KRANZ, D. M. (1998). A yeast surface display system for the discovery of ligands that trigger cell activation. *Journal of Immunological Methods* **220**(1-2), 179-88.
- CHOWDHURY, P. S., VASMATZIS, G., BEERS, R., LEE, B., PASTAN, I. (1998). Improved stability and yield of a Fv-toxin fusion protein by computer design and protein engineering of the Fv. *Journal of Molecular Biology* **281**(5), 917-28.

- CIRIC, B., RADULOVIC, M., DIMITRIJEVIC, L. J., JANKOV, R. M. (1995). Effect of valency on binding properties of antihuman IgM monoclonal antibody. *Hybridoma* **14**, 537-544.
- CLACKSON, T., HOOGENBOOM, H. R., GRIFFITHS, A. D., WINTER, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**(6336), 624-8.
- COHEN, S. Z. (1990). "Pesticides in ground water: an overview. Environmental fate of pesticides." (D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds.) John Wiley & Sons Ltd., Chichester New York.
- CREGG, J. M., BARRINGER, K. J., HESSLER, A. Y., MADDEN, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular Cell Biology* **5**(12), 3376-85.
- CREGG, J. M., MADDEN, K. R. (1987). Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris*. In "Biological Research on yeasts" (G. G. Steward, I. Russell, R. D. Klein, und R. R. Hielsch, Eds.), Vol. 2, pp. 1-18. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- CREGG, J. M., MADDEN, K. R., BARRINGER, K. J., THILL, G. P., STILLMAN, C. A. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular Cell Biology* **9**(3), 1316-23.
- DAUGHERTY, P. S., CHEN, G., OLSEN, M. J., IVERSON, B. L., GEORGIU, G. (1998). Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Engineering* **11**(9), 825-32.
- DAVIS, G. T., BEDZYK, W. D., VOSS, E. W., JACOBS, T. W. (1991). Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells. *Biotechnology (N Y)* **9**(2), 165-169.
- DORAI, H., MCCARTNEY, J. E., HUDZIAK, R. M., TAI, M. S., LAMINET, A. A., HOUSTON, L. L., HUSTON, J. S., OPPERMAN, H. (1994). Mammalian cell expression of single-chain Fv (sFv) antibody proteins and their C-terminal fusions with interleukin-2 and other effector domains. *Biotechnology (N Y)* **12**(9), 890-897.
- DUENAS, M., AYALA, M., VAZQUEZ, J., OHLIN, M., SODERLIND, E., BORREBAECK, C. A., GAVILONDO, J. V. (1995). A point mutation in a murine immunoglobulin V-

- region strongly influences the antibody yield in *Escherichia coli*. *Gene* **158**(1), 61-66.
- ELDIN, P., PAUZA, M. E., HIEDA, Y., LIN, G., MURTAUGH, M. P., PENTEL, P. R., PENNELL, C. A. (1997). High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods* **201**, 67-75.
- ELLIOTT, M. J., MAINI, R. N., FELDMANN, M., KALDEN, J. R., ANTONI, C., SMOLEN, J. S., LEEB, B., BREEDVELD, F. C., MACFARLANE, J. D., BIJL, H., ET AL. (1994). Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**(8930), 1105-10.
- ENZELBERGER, M. (1999). Universität Stuttgart, Stuttgart, Dissertation.
- FIDLER, A. E., LUN, S., YOUNG, W., MCNATTY, K. P. (1998). Expression and secretion of a biologically active glycoprotein hormone, ovine follicle stimulating hormone, by *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Endocrinology* **21**(3), 327-336.
- FIREK, S., DRAPER, J., OWEN, M. R., GANDECHA, A., COCKBURN, B., WHITELAM, G. C. (1993). Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures [published erratum appears in *Plant Molecular Biology* 1994 Mar;24(5):833]. *Plant Molecular Biology* **23**(4), 861-870.
- FRANEK, M., KOLAR, V., GRANATOVA, M., NEVORANKOVA, Z. (1994). Monoclonal ELISA for 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: Characterization of antibodies and assay optimization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1369-1374.
- FREEMAN, M., BAEHLER, C., SPOTTS, S. (1990). Automated laser-fluorescence sequencing. *Biotechnology (N Y)* **8**(2), 147-8.
- FREYRE, F. M., VAZQUEZ, J. E., AYALA, M., CANAAN-HADEN, L., BELL, H., RODRIGUEZ, I., GONZALEZ, A., CINTADO, A., GAVILONDO, J. V. (2000). Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* **76**(2-3), 157-63.

- FUERST, E. P., NORMAN, M. A. (1991). Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science* **39**, 458-464.
- GAST, A., KNUESLI, E., GYSIN, H. (1955). Über Pflanzenwachstumsregulatoren. *Experientia* **XI**, 107-108.
- GEE, S. J., HAMMOCK, B. D., EMON, J. M. (1994). A user's guide to environmental immunochemical analysis. In "EPA/540/R-94/509".
- GIERSCH, T. (1993). A new monoclonal antibody for the sensitive detection of atrazine with immunoassay in microtiter plate and dipstick format. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **41**, 1006-1011.
- GIERSCH, T., KRAMER, K., HOCK, B. (1993). Optimization of a monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of terbuthylazine. *Science of Total Environment* **132**, 435-448.
- GLOCKSHUBER, R., MALIA, M., PFITZINGER, I., PLÜCKTHUN, A. (1990). A comparison of Strategies to stabilize immunoglobulin Fv-Fragments. *Biochemistry* **29**, 1362-1367.
- GLOCKSHUBER, R., SCHMIDT, T., PLÜCKTHUN, A. (1992). The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in Escherichia coli. *Biochemistry* **31**(5), 1270-9.
- GOLDENBERG, D. M., NABI, H. A. (1999). Breast cancer imaging with radiolabeled antibodies. *Seminars of Nuclear Medicine* **29**(1), 41-8.
- GREEN, L. L. (1999). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* **231**(1-2), 11-23.
- GUYOT, C. (1994). "Strategies to minimize the pollution of water by pesticides. Pesticides in Ground and surface drinking water." (H. Börner, Ed.) Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg.
- HAENEL, C. (2000). Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen, Persönliche Mitteilung

- HAGENMAIER, H. (1986). Determination of 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin in commercial chlorophenols and related products. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **325**, 603-606.
- HANES, J., PLÜCKTHUN, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **94**(10), 4937-42.
- HARRISON, J. S., KESHAVERZ-MOORE, E. (1996). Production of antibody fragments in *Escherichia coli*. *Annals of the New York Academy of Science* **782**, 143-158.
- HELLWIG, S., EMDE, F., RAVEN, N. P., HENKE, M., VAN DER LOGT, P., FISCHER, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology & Bioengineering* **74**(4), 344-52.
- HEß, D. (1981). "Pflanzenphysiologie." 7 ed. UTB Ulmer, Stuttgart.
- HIGGINS, D. R., CREGG, J. M. (1998). "Pichia Protocols." Methods in Molecular Biology (J. M. Walker, Ed.), 103 Humana Press, Totowa.
- HOOGENBOOM, H. R., GRIFFITHS, A. D., JOHNSON, K. S., CHISWELL, D. J., HUDSON, P., WINTER, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* **19**(15), 4133-7.
- HORTON, R. M., HO, S. N., PULLEN, J. K., HUNT, H. D., CAI, Z., PEASE, L. R. (1993). Gene splicing by overlap extension. *Methods in Enzymology* **217**, 270-9.
- HUSE, W. D., SASTRY, L., IVERSON, S. A., KANG, A. S., MEES, M. A., BURTON, D. R., BENKOVIC, S. J., LERNER, R. A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* **246**, 1275-1281.
- HUSTON, J. S., LEVINSON, D., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M.-S., NOVOTNY, J., MARGOLIES, M. N., RIDGE, R. J., BRUCCOLERI, R. E., HABER, E., CREA, R., OPPERMAN, H. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue

produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science* **85**, 5879-5883.

INVITROGEN. Manual for the Multi-Copy Pichia Expression Kit, version F.

INVITROGEN. Manual for the pYD1 Yeast Display Vector kit, version C.

ISB. Informationssekretariat Biotechnologie, <http://www.i-s-b.org>

ISO/CD15089. (1997). Water Quality: Guideline for selective immunoassay for the determination of plant treatment and pesticide agents. *ISSO/TC/47/Sc.* **2**(352), 13.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *European Journal of Biochemistry* **138**(1), 9-37.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P. (1995). "Immunologie." Trans. I. Haußer-Siller, M. Mauch, I. Neufeldt-Brasche, R. Pollwein, L. Seidler Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - Oxford.

JOST, C. R., KURUCZ, I., JACOBUS, C. M., TITUS, J. A., GEORGE, A. J., SEGAL, D. M. (1994). Mammalian expression and secretion of functional single-chain Fv molecules. *Journal of Biological Chemistry* **269**(42), 26267-26273.

KABAT, E. A., WU, T. T., PERRY, H. M., GOTTESMANN, K. S., FOELLER, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. *NIH Publication* **91-32242**.

KAHAN, B. D., RAJAGOPALAN, P. R., HALL, M. (1999). Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* **67**(2), 276-84.

KALANDADZE, A., GALLEN, M., FONCERRADA, L., STROMINGER, J. L., WUCHERPFENNIG, K. W. (1996). Expression of recombinant HLA-DR2 molecules. Replacement of the hydrophobic transmembrane region by a leucine zipper dimerization motif allows the assembly and secretion of soluble DR alpha beta heterodimers. *Journal of Biological Chemistry* **271**(33), 20156-20162.

- KHURI, A. I., CONLON, M. (1981). Simultaneous optimization of multiple response represented by polynomial regression functions. *Technometrics* **23**, 363-375.
- KIPRIYANOV, S. M., MOLDENHAUER, G., MARTIN, A. C., KUPRIYANOVA, O. A., LITTLE, M. (1997). Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Engineering* **10**(4), 445-53.
- KNAPPIK, A., GE, L., HONEGGER, A., PACK, P., FISCHER, M., WELLNHOFER, G., HOESS, A., WOLLE, J., PLÜCKTHUN, A., VIRNEKAS, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of Molecular Biology* **296**(1), 57-86.
- KNAPPIK, A., PLÜCKTHUN, A. (1995). Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Engineering* **8**(1), 81-89.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**(5517), 495-7.
- KRAMER, K. (2001). Habilitationsschrift. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.
- KRAMER, K., HOCK, B. (1996). Recombinant single-chain antibodies against s-triazines. *Food and Agricultural Immunology*. **8**, 97-109.
- KUSHARYOTO, W. (2001). Doktorarbeit. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- KUSHARYOTO, W., PLEISS, J., BACHMANN, T. T., SCHMID, R. D. (2002). Mapping of a hapten-binding site: molecular modeling and site-directed mutagenesis study of an anti-atrazine antibody. *Protein Engineering* **15**(3), 233-41.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- LEHOTAY, S. J. (1997). Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of Chromatography A* **785**, 289-312.
- LONGSTAFF, M., NEWELL, C. A., BOONSTRA, B., STRACHAN, G., LEARMONTH, D., HARRIS, W. J., PORTER, A. J., HAMILTON, W. D. (1998). Expression and

- characterisation of single-chain antibody fragments produced in transgenic plants against the organic herbicides atrazine and paraquat. *Biochimica et Biophysica Acta* **1381**(2), 147-160.
- LUO, D., GENG, M., NOUJAIM, A. A., MADIYALAKAN, R. (1997a). An engineered bivalent single-chain antibody fragment that increases antigen binding activity. *Journal of Biochemistry. (Tokyo)* **121**(5), 831-834.
- LUO, D., GENG, M., SCHULTES, B., MA, J., XU, D. Z., HAMZA, N., QI, W., NOUJAIM, A. A., MADIYALAKAN, R. (1998). Expression of a fusion protein of scFv-biotin mimetic peptide for immunoassay. *Journal of Biotechnology* **65**(2-3), 225-228.
- LUO, D., MAH, N., KRANTZ, M., WILDE, K., WISHART, D., ZHANG, Y., JACOBS, F., MARTIN, L. (1995). VI-Linker-Vh orientation-dependent expression of single-chain Fv containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions. *Journal of Biochemistry* **118**, 825-831.
- LUO, D., MAH, N., KRANTZ, M., WISHART, D., JACOBS, F., MARTIN, L. (1997b). High level secretion of single-chain antibody in *Pichia* expression system. *Biotechnology Techniques* **11**(10), 759-761.
- LUO, D., MAH, N., WISHART, D., ZHANG, Y., JACOBS, F., MARTIN, L. (1996). Construction and expression of bi-functional proteins of single-chain Fv with effector domains. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **120**(2), 229-32.
- MARTY, C., SCHEIDEGGER, P., BALLMER-HOFER, K., KLEMENZ, R., SCHWENDENER, R. A. (2001). Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression & Purification* **21**(1), 156-64.
- MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A. D., WINTER, G., CHISWELL, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **34**, 552-554.
- MCNEIL, C. (1998). Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer. *J National Cancer Institute* **90**(12), 882-3.
- MEISTER, R. T., BERG, G. L., SINE, C., MEISTER, S., POPLYK, J. (1984). "Farm Chemicals Handbook." 70 ed. Meister Publishing Co., Willoughby, OH, USA.

- MEULENBERG, E. P., MULDER, W. H., STORKS, P. G. (1995). Immunoassays for pesticides. *Environmental Science & Technology* **29**(3), 553-561.
- MILLER, J., NIESSNER, R. (1994). "Enzyme and Immunoassays." 5th edition B5 ed. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Wiley-VCH.
- MILSTEIN, C., WALDMANN, H. (1999). Optimism after much pessimism: what next? *Current Opinion in Immunology* **11**(5), 589-91.
- MOHR, M. (2000). Studienarbeit. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**, 17-27.
- NICHOLLS, P. J., JOHNSON, V. G., ANDREW, S. M., HOOGENBOOM, H. R., RAUS, J. C., YOULE, R. J. (1993). Characterization of single-chain antibody (sFv)-toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate. *Journal of Biological Chemistry* **268**(7), 5302-5308.
- NIEBA, L., HONEGGER, A., KREBBER, C., PLÜCKTHUN, A. (1997). Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved *in vivo* folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Engineering* **10**(4), 435-444.
- OELSCHLAEGER, P., SRIVIDHYA SRIKANT-IYER, S. L., JUTTA SCHMITT, ROLF D. SCHMID. Fluorophor-linked immunosorbent assay (FLISA): a time- and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment (scFv) and enhanced green fluorescent protein (EGFP). *Anal in Biochemistry* **submitted**.
- OGUNJIMI, A. A., CHANDLER, J. M., GOODING, C. M., RECINOS, A., CHOUDARY, P. V. (1999). High-level secretory expression of immunologically active intact antibody from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* **21**, 561-567.
- ORLANDI, R., GÜSSOW, D. H., JONES, P. T., WINTER, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for the expression by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **86**(3833-3837).

- PALM, G. J., ZDANOV, A., GAITANARIS, G. A., STAUBER, R., PAVLAKIS, G. N., WLODAWER, A. (1997). The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nature Structure Biology* **4**, 361f.
- PANTOLIANO, M. W., BIRD, R. E., JOHNSON, S., ASEL, E. D., DODD, S. W., WOOD, J. F., HARDMAN, K. D. (1991). Conformational stability folding and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**, 10117-10125.
- PIHLSTRÖM, T., HELLSTRÖM, A., AXELSSON, V. (1997). Gas chromatographic analysis of pesticides in water with off-line solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta* **356**, 155-163.
- PLÜCKTHUN, A. (1991a). Antibody engineering: Advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Bio/Technology* **9**, 545-551.
- PLÜCKTHUN, A. (1991b). Strategies for the expression of antibody fragments in *Escherichia coli*. *Methods: A companion to methods in enzymology* **2**, 88-96.
- PLÜCKTHUN, A., SKERRA, A. (1989). Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **178**, 497-515.
- POLLAK, N. (2000). Studienarbeit. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**(5536), 598-9.
- PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W., PRENDERGAST, F. G., CORMIER, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**(2), 229-33.
- PROBER, J. M., TRAINOR, G. L., DAM, R. J., HOBBS, F. W., ROBERTSON, C. W., ZAGURSKY, R. J., COCUZZA, A. J., JENSEN, M. A., BAUMEISTER, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**(4825), 336-41.
- PUTLITZ, J. Z., KUBASEK, W. L., DUCHENE, M., MARGET, M., SPECHT, B.-U. v., DOMDEY, H. (1990). Antibody production in baculovirus-infected insect cells. *Bio/Technology* **8**, 651-654.

- REITER, Y., BRINKMANN, U., KREITMAN, R. J., JUNG, S.-H., LEE, B., PASTAN, I. (1994). Stabilization of the Fv Fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry* **33**, 5451-5459.
- RIDDER, R., SCHMITZ, R., LEGAY, F., GRAM, H. (1995). Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **13**, 255-260.
- (1999). ELISA-Systeme für die Nahrungs- Futtermittel- und Wasseranalytik: Mikrotiterplatten-Test zum Nachweis von Triazinen. Art.-Nr. 45150. RIEDEL-DE-HAEN KG
- RINI, J. M., SCHULZE-GAHMEN, U., WILSON, I. A. (1992). Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* **255**, 959-965.
- RYABOVA, L. A., DESPLANCQ, D., SPIRIN, A. S., PLÜCKTHUN, A. (1997). Functional antibody production using cell-free translation: Effects of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nature Biotechnology* **15**, 79-84.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **74**(12), 5463-7.
- SCHÜTTE, H., KULA, M.-R. (1988). Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme & Microbiology Technology* **10**, 552-558.
- SENSION. (2000). Triazine Test-Kit Senso-Check TR500. *Sension GmbH, Am Mittleren Moos 48, 86167 Augsburg.*
- SENSOTEST. (2000). Biologische Testsysteme GbRmbH. *Dornstädter Weg 15, 89081 Ulm.*
- SHARP, P. A., SUGDEN, B., SAMBROOK, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**(16), 3055-63.

- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., SAIGA, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular Compartment Physiology* **59**(223-239).
- SHUSTA, E. V., KIEKE, M. C., PARKE, E., KRANZ, D. M., WITTRUP, K. D. (1999). Yeast Polypeptide Fusion Surface Display Levels Predict Thermal Stability and Soluble Secretion Efficiency. *Journal of Molecular Biology* **292**(5), 949-956.
- SKERRA, A. (1994). A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* **141**, 79-84.
- SKERRA, A., PLÜCKTHUN, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1040.
- SPORTSMAN, J. R., LEE, S. K., DILLEY, H., BUKAR, R. (1997). Fluorescence Polarization. In "High throughput Screening" (J. P. Devlin, Ed.), pp. 389-399. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
- SREEKRISHNA, K., KROPP, K. (1996). *Pichia pastoris*. In "Non-Conventional Yeasts in Biotechnology" (K. Wolf, Ed.), pp. 203-252. Springer, Berlin.
- STEVENS, P. (1981). Agent orange toxicity: A quantitative perspective. *Human Toxicology* **1**, 31-39.
- TAKAHASHI, K., YUUKI, T., TAKAI, T., RA, C., OKUMURA, K., YOKOTA, T., OKUMURA, Y. (2000). Production of humanized Fab fragment against human high affinity IgE receptor in *Pichia pastoris*. *Biosciences Biotechnology Biochemistry* **64**(10), 2138-44.
- TAKKINEN, K., LAUKKANEN, M.-L., SIZMANN, D., ALFTHAN, K., IMMONEN, T., VANNE, L., KAARTINEN, M., KNOWLES, J. K. C., TEERI, T. T. (1991). An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Engineering* **4**(7), 837-841.
- THIER, H. P., FRESHE, H. (1986). "Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln." (H. Freshe, Ed.) Thieme Verlag, Stuttgart.
- TRINKWV. (1989). Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung). *BGBl I*(22), 760-773.

- TSUMOTO, K., NAKAOKI, Y., UEDA, Y., OGASAHARA, K., YUTANI, K., WATANABE, K., KUMAGAI, I. (1994). Effect of the order of antibody variable regions on the expression of the single-chain HyHEL10 Fv fragment in *E. coli* the thermodynamic analysis of its antigen-binding properties. *Biochemistry & Biophysics Research Communications* **201**(2), 546-51.
- TULAPURKAR, M. E. (2000). Master Thesis. Indian Institute of Technology, Madras.
- ULRICH, H. D., PATTEN, P. A., YANG, P. L., ROMESBERG, F. E., SCHULTZ, P. G. (1995). Expression studies of catalytic antibodies. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **92**(25), 11907-11911.
- VELTHUYS, B. R. (1981). *FEBS Letters* **126**, 277-281.
- VERMA, R., BOLETI, E., GEORGE, A. J. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods* **216**(1-2), 165-181.
- WHITELAM, G. C., COCKBURN, W., OWEN, M. R. (1994). Antibody production in transgenic plants. *Biochemical Society of Transgenics* **22**(4), 940-4.
- WITTMANN, C., HOCK, B. (1989). Improved enzyme immunoassay for the analysis of s-triazines in water samples. *Food and Agricultural Immunology* **1**, 211-224.
- WOOD, C. R., BOSS, M. A., KENTEN, J. H., CALVERT, J. E., ROBERTS, N. A. EMTAGE, J. S. (1985). The synthesis and *in vivo* assembly of functional antibodies in yeast. *Nature* **314**, 446-449.
- YALOW, R. S., BERSON, S. A. (1966). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. 1960. *Obesity Research* **4**(6), 583-600.
- ZIEGLER, T., HOLTMANN, D., SPRAUER, A., SCHMID, R. D. (1997). *5th European Workshop on Biosensors for Environmental Monitoring and Stability of Biosensors, Freising, Deutschland.*

10 EIGENE PUBLIKATIONEN

10.1 Original Publikationen:

LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID, R. D. (2001). High-yield expression of the recombinant atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods* **255**, 103-114.

LANGE, S., MUSIDLOWSKA, A., SCHMIDT-DANNERT, C., SCHMITT, J. (2001). BORNSCHEUER, U. T. Cloning, functional expression, and characterization of recombinant pig liver esterase. *ChemBioChem* **2**, 576-582.

MUSIDLOWSKA, A., LANGE, S., BORNSCHEUER, U. T. (2001). Durch Überexpression in der Hefe *Pichia pastoris* zu erhöhter Enantioselektivität: neue Aspekte bei der Anwendung von Schweineleberesterase. *Angewandte Chemie* **113** (15), 2934-2936, 2001. By overexpression in the yeast *Pichia pastoris* to enhanced enantioselectivity: New aspects in the application of pig liver esterase. *Angewandte Chemie International Edition* **40** (15), 2851-2853.

OELSCHLAEGER, P., SRIKANT-IYER, S., LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID, R. D. (2002). Fluorophor-linked immunosorbent assay (FLISA): a time and cost saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single chain antibody fragment (scFv) and enhanced green fluorescent protein (EGFP). *Analytical Biochemistry*, accepted

10.2 Patent

BORNSCHEUER, U. T., MUSIDLOWSKA, A., SCHMIDT-DANNERT C., LANGE, S. Rekombinante Schweineleberesterase, deren Verwendung sowie ein Verfahren zu deren Herstellung. Offenlegungsschrift DE 100 61 864 A1

10.3 Ausgewählte Konferenzbeiträge

LANGE, S. UND JESKE, H. (1996). Ausbreitungsrisiken von Geminiviren durch Agroinfektion im Boden. Vortrag bei der Jahrestagung des Arbeitskreises Virologie der Deutschen Phytopathologischen Gesellschaft.

- LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMIDT-DANNERT, C., SCHMID R. D. (1999). Production of herbicide-specific Fab fragments in the yeast *Pichia pastoris*. Posterpräsentation bei der 5. *Internationalen Konferenz „Agri-food Antibodies“* in Norwich, UK,
- LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID R. D. (2000). Production of herbicide-specific antibody fragments in the yeast *P. pastoris*. Posterpräsentation beim *Weltkongreß für Biotechnologie*, Berlin, Deutschland.
- ÖLSCHLAEGER, P., SRIKANT-IYER, S., LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID R. D. (2000). Expression, Refolding, Purification and Application of the Atrazine-Specific Single-Chain Variable-Fragment (scFv) Antibody K411B. Posterpräsentation bei „*Gab 2000, International Symposium on downstream processing of genetically engineered antibodies*“ in Barcelona, Spanien.
- LANGE, S., MUSIDLOWSKA, A., BORNSCHEUER, U. T. (2001). Cloning and expression of recombinant pig liver carboxylesterase – Evidence for the production of the γ -subunit. Posterpräsentation beim 5. *Internationalen Symposium für Biokatalyse und Biotransformation “BioTrans”* in Darmstadt, Deutschland sowie bei der *Dechema Jahrestagung der Biotechnologen* in Leipzig, Deutschland.
- SOLIMAN, N. A., ABDEL FATTAH, Y. R., SCHMID, R. D., LANGE, S. (2001). Cloning and heterologous expression of a lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolated from Egyptian soil. Posterpräsentation beim 5. *Internationalen Symposium für Biokatalyse und Biotransformation “BioTrans”* in Darmstadt, Deutschland

11 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Stefan Lange
Geburtsdatum / -ort: 24. 01. 1967 in Stuttgart
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Spechtweg 10, 70499 Stuttgart

SCHULAUSSBILDUNG

1973 – 1977: Grundschule in Stuttgart Weilimdorf
1977 – 1986: Gymnasium Stuttgart Weilimdorf, Abitur Juni 1986

WEHRDIENST

10/1986 – 12/1986: Grundausbildung zum Sanitätssoldat im 5. Sanitätsbataillon 210 in Kempten
01/1987 – 12/1987: Sanitätssoldat im 1. Panzerbataillon 224, Landsberg/Lech

STUDIUM

10/1988 – 09/1991: Maschinenwesen- und Verfahrenstechnik, Uni Stuttgart
10/1991 – 09/1997: Technische Biologie, Uni Stuttgart
Hauptfach: Immunologie
Nebenfächer: Mikrobiologie, Bioverfahrenstechnik
Pflichtfach: Biochemie
Studienarbeit: „*Direkte Sequenzierung PCR-amplifizierter Fragmente aus DNA A und B des Abutilon Mosaik Virus*“
Biologisches Institut, Abt. Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Prof. Dr. H. Jeske.
10/1996 – 09/1997: Diplomarbeit: „*Charakterisierung, Klonierung und Sequenzierung der Carboxylesterase aus Schweineleber*“
Institut für Technische Biochemie, Prof. Dr. Rolf D. Schmid.
09/1997: Abschluß: Diplom Biologe (technisch orientiert)
Gesamturteil: „sehr gut“

BERUFSPRAXIS:

10/1997 – 07/2002: Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart
Anfertigung der vorliegenden Arbeit.
seit 10/2000: Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie am Institut für Technische Biochemie.

Stuttgart, 27.06.2002

12 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich zur Erstellung der vorliegenden Arbeit keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den 17.05.2002

13 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei

Prof. Dr. Rolf D. Schmid ganz besonders für die Überlassung und Gestaltung des Themas und der mir gegebenen Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Technische Biochemie anzufertigen. Seine motivierenden Ratschläge in Verbindung mit den hervorragenden Bedingungen haben viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Durch die mir dabei überlassenen Freiheiten und übertragenen Verantwortlichkeiten habe ich über die rein wissenschaftliche Seite der Arbeit hinaus viel (von ihm) gelernt.

Dr. Jutta Schmitt für ihre Geduld beim Korrekturlesen (nicht nur) der vorliegenden Arbeit sowie für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die vielen engagierten, fachlichen Ratschläge und Diskussionen im Verlauf dieser Arbeit. Ganz besonders jedoch bedanke ich mich für ihre freundschaftliche und aufrichtige Zusammenarbeit.

Volker Nödinger für seine ständige Hilfsbereitschaft und seinen immer fröhlichen und unermüdlichen Einsatz - nicht nur am DNA- und Proteinsequencer, sondern in fast allen Bereichen des Laborbetriebs und darüber hinaus.

Prof. Dr. Claudia Schmidt-Dannert für ihre fachliche Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit und die Motivation *Pichia pastoris* als neues Expressionssystem zu testen.

Markus Fischer für seine geduldige Hilfe bei der „Suche“ und Wiederbelebung von so manchem Rechner und Drucker im Dschungel des Institutscomputernetzwerks.

Michaela Mohr, Nadine Pollak, Hendrik Schewe und Mattias Dietrich für ihre Hilfe und Mitarbeit an dem Projekt im Rahmen ihrer Studienarbeiten.

Srividya Srikant-Iyer und Mohan Tulapurkar für die Mitarbeit an dem Projekt im Rahmen ihrer Master Thesis sowie für die mir nebenbei gegebenen Eindrücke in ihre indische Kultur.

Einer ganzen Reihe von gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern die für ein freundschaftliches und tolles Arbeitsklima - zuweilen auch nach Feierabend oder am Wochenende - gesorgt haben, was für das Gelingen einer solchen Arbeit unabdingbar ist.

Prof. Dr. Peter Scheurich vom Institut für Zellbiologie und Immunologie für sein Interesse an der Arbeit und der damit verbundenen Bereitschaft zur Begutachtung

derselben. Desweiteren für seine immer zugängliche und freundliche Hilfsbereitschaft.

PD Dr. Karl Kramer und Prof. Dr. Bertold Hock von der Technischen Universität München für die Überlassung der Gene der schweren und leichten Kette des Fabs K411B; des weiteren bedanke ich mich für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die wir bei verschiedenen EU-Projekttreffen führten.

Eva Behrle und Elke Gerlach vom Institut für Zellbiologie und Immunologie für die Anfertigung einer Aufnahme am konfokalen Laser Scanning Mikroskop.

Dr. T. Borchers vom ICB, Münster für die Überlassung der Gene der V_H- und V_L-Domänen des 2,4-D spezifischen Antikörpers E2/B5.

Dr. Sergei Eremin von der Lomonossov Universität Moskau für die Einweisung in die Fluoreszenzpolarimetrie sowie die Überlassung der gestellten Tracer.

Dr. Uwe Irmer vom Biologischen Institut, (mittlerweile Eufets AG) für die Einweisung in die Durchflußcytometrie und die vielen damit verbundenen hilfreichen Tips.

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer und Anna Musidlowska von der Uni Greifswald für die gute Zusammenarbeit durch ihre engagierte und erfolgreiche Fortsetzung meines Diplomarbeitprojekts, das so zu späten Ehren kam.

Der EU und den europäischen Steuerzahlern für die Finanzierung der Arbeit.

Allen Kollegen und Nicht-Kollegen, die mir auch privat zur Seite standen. Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern.