

DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG
INSEKTENGIFTALLERGEN-SPEZIFISCHER
ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE
VERSCHIEDENER FORMATE UND ISOTYPEN

Dissertation

Zur Erlangung des
Doktorgrades der
Naturwissenschaften
der Fakultät für
Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dana Rühl

aus Schlüchtern

Hamburg 2010

Perpetuam in memoriam Margit.

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von August 2006 bis Juni 2010 am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg im Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst durchgeführt.

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Hahn

Tag der Disputation: 23.07.2010

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(2-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
Bromphenolblau	3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfonphthalein
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
c	konstante Region (<i>constant</i>)
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementarity determining region</i>)
cfu	Koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
CHO	Eierstock des chinesischen Hamsters (<i>Chinese hamster ovary</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
Fab	antigenbindendes Fragment
Fc	kristallisierbares Fragment
FKS	Fötales Kälberserum
FR	<i>framework</i>
Glu	Glukose
HCl	Salzsäure
HEK	humane embryonale Niere (<i>human embryonic kidney</i>)
His	Histidin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
hu	human
Ig	Immunglobulin

IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
MPBS	Milchpulver-PBS
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pNAG	Poly-N-acetylglucosamine
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
PP	Polypropylen
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
scFv	einzelkettiges Antikörperfragment (<i>single chain fragment variable</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDR	spezifizitätsbestimmende Region (<i>specificity determining region</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPBS	Tween 20-PBS
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
V _H	schwere variable Region (<i>heavy</i>)
V _L	leichte variable Region (<i>light</i>)
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
xg	Mehrfaches der Gravitation

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1. ALLERGIE	1
1.1.1. HYPERSENSIBILITÄTSREAKTION VOM TYP I – SOFORTTYP	3
1.1.2. HYMENOPTERENGIFTALLERGIE	8
1.1.3. ALLERGIE-DIAGNOSE	9
1.1.4. THERAPIE	11
1.2. ANTIKÖRPER-BIBLIOTHEKEN UND <i>PHAGE DISPLAY</i>	13
1.2.1. AVIANE ANTIKÖRPER-BIBLIOTHEKEN	16
1.3. ZIELSETZUNG	18
<u>2. MATERIAL</u>	<u>19</u>
2.1. STANDARDS UND ENZYME	19
2.2. CHEMIKALIEN UND BIOREAGENZIEN	19
2.3. ANTIKÖRPER	20
2.4. VEKTOREN	20
2.5. OLIGONUKLEOTIDE	20
2.6. PUFFER UND LÖSUNGEN	21
2.7. <i>E. COLI</i> BAKTERIENSTÄMME UND DEREN GENOTYP	26
2.8. ZELLINIEN UND ZELLKULTUR	27
2.9. <i>PHAGE DISPLAY</i> BIBLIOTHEK UND HELFERPHAGEN	27
2.10. AFFINITÄTSMATRICES	28
2.11. MEDIEN	28
2.12. KÄUFLICH ERWORBENE KITS	29
2.13. GERÄTE	29
<u>3. METHODEN</u>	<u>31</u>
3.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.1.1. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	31
3.1.2. SEQUENZIERUNG: DIDESOXYMETHODE NACH SANGER	35
3.1.3. AGAROSEGELELEKTROPHORESE	36
3.1.4. EXTRAKTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN	37
3.1.5. RESTRIKTIONSANALYSE	38
3.1.6. DEPHOSPHORYLIERUNG VON GESCHNITTENEN VEKTOREN	38
3.1.7. LIGATION	39
3.1.8. ISOLIERUNG VON DNA AUS LÖSUNGEN	39
3.1.9. ALKOHOLPRÄZIPITATION	40
3.1.10. HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>E. COLI</i>	40
3.1.11. TRANSFORMATION	41
3.1.12. LAGERUNG VON <i>E. COLI</i> ZELLEN	42
3.1.13. PLASMID-DNA-EXTRAKTION	42
3.1.14. ISOLIERUNG VON mRNA AUS DER MILZ	44
3.1.15. cDNA-SYNTHESE	44
3.1.16. BIBLIOTHEKSKLONIERUNG	45
3.2. PROTEINCHEMISCHE METHODEN	50
3.2.1. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG	50
3.2.2. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	50

3.2.3.	FÄRBUNG MIT COOMASSIE-BRILLIANT-BLAU	52
3.2.4.	WESTERN-BLOT	52
3.3.	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	52
3.3.1.	IMMUNPRINTING VON PROTEINEN	52
3.3.2.	ELISA	53
3.4.	PHAGE DISPLAY TECHNOLOGIE	55
3.4.1.	DARSTELLUNG DER M13K07- UND DER PKM13-HELPERPHAGEN	55
3.4.2.	TITERBESTIMMUNG DER M13K07- UND DER PKM13-HELPERPHAGEN	56
3.4.3.	WACHSTUM UND REPLIKATION VON BIBLIOTHEKEN	56
3.4.4.	SELEKTION	57
3.4.5.	REINFEKTION	58
3.4.6.	TITERBESTIMMUNG DER SELEKTION	58
3.4.7.	AMPLIFIKATION SELEKTIERTER PHAGEN	58
3.4.8.	TITERBESTIMMUNG SELEKTIERTER PHAGEN	59
3.4.9.	POLYKLONALE ELISA ANALYSE	59
3.4.10.	MONOKLONALE ELISA ANALYSE	60
3.5.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	61
3.5.1.	EXPRESSION IN MAMMALIA-ZELLEN	61
3.5.2.	VEKTORSYSTEM	61
3.5.3.	TRANSFEKTION UND TRANSIENTE EXPRESSION	62
3.5.4.	GENERIERUNG KONTINUIERLICH EXPRIMIERENDER ZELLINIEN	62
3.5.5.	KULTUR UND PASSAGE VON ADHÄRENTEN ZELLEN	63
3.5.6.	KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN VON MAMMALIA-ZELLEN	64
3.5.7.	β -HEXOSAMINIDASE <i>ASSAY</i>	64
4.	ERGEBNISSE	66

4.1.	ALLERGEN-SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	66
4.1.1.	GENERIERUNG HOMODIMERER, BIVALENTER ANTIKÖRPER- KONSTRUKTE	66
4.1.2.	DARSTELLUNG DER HUIGEC _{H2-4} HIS UND HUIGG ₄ C _{H2-3} HIS ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	67
4.1.3.	EXPRESSION HOMODIMERER, BIVALENTER ALLERGEN-SPEZIFISCHER SCFV ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	69
4.1.4.	ANALYSE DER ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE IN DIAGNOSTISCHEN <i>ASSAY</i> -SYSTEMEN	75
4.1.5.	DARSTELLUNG HETEROTETRAMERER VOLLANTI-KÖRPER-KONSTRUKTE	77
4.1.6.	EXPRESSION HETEROTETRAMERER ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	79
4.2.	KLONIERUNG CHIMÄRER IGGE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	82
4.2.1.	GENERIERUNG CHIMÄRER IGGE1 UND IGGE2 ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	83
4.2.2.	EXPRESSION DES ANTI – VES v 5-IGGE1His #1 UND DES ANTI - VES v 5-IGGE2His #1 ANTIKÖRPER-KONSTRUKTES	85
4.3.	DARSTELLUNG EINER AVIANEN IMMUNEN ANTIKÖRPER-BIBLIOTHEK UNTER BERÜCKSICHTUNG UNTERSCHIEDLICHER KLONIERUNGSSTRATEGIEN	88
4.3.1.	ANALYSE DER IMMUNISIERUNGEN	88
4.3.2.	DARSTELLUNG DER VARIABLEN KETTEN	90
4.3.3.	KLONIERUNG DER VARIABLEN REGIONEN MITTELS DER <i>STARGate® COMBINATORIAL CLONING</i> TECHNOLOGIE	92
4.3.4.	DARSTELLUNG EINER AVIANEN ANTIKÖRPER-BIBLIOTHEK MIT HILFE DER <i>GATEWAY™</i> TECHNOLOGIE	97
4.3.5.	SELEKTION	102
4.3.6.	PASG-P005SCFV BIBLIOTHEK GEGEN VES v 5	102
4.3.7.	PHEN-DEST-P005SCFV BIBLIOTHEK GEGEN VES v 5	103

5. DISKUSSION	106
5.1. ALLERGEN-SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	107
5.1.1. DARSTELLUNG HOMODIMERER, BIVALENTER UND HETEROTETRAMERER ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	107
5.1.2. CHARAKTERISIERUNG HOMODIMERER, BIVALENTER UND HETEROTETRAMERER ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	109
5.2. DARSTELLUNG CHIMÄRER IGGE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE	111
5.3. AVIANE IMMUNE ANTIKÖRPER-BIBLIOTHEKEN	114
5.3.1. IMMUNISIERUNG EINES HUHNS MIT WESPENGIFT UND ANALYSE DER ISOLIERTEN POLYKLONALEN IGY	116
5.3.2. STARGATE® BIBLIOTHEK	118
5.3.3. GATEWAY™ BIBLIOTHEK	119
5.3.4. STARGATE® VS. GATEWAY®	121
5.4. AUSBLICK	123
6. ZUSAMMENFASSUNG	125
7. ABSTRACT	126
8. LITERATUR	127
9. ANHANG	138
9.1. OLIGONUKLEOTIDE	138
9.2. SEQUENZDATEN	141
9.2.1. VERWENDETE SEQUENZEN	141
9.2.2. SEQUENZEN DER CHIMÄREN SCHWEREN KETTEN IGGE1 UND IGGE2	144
9.2.3. BIBLIOTHEKSSEQUENZEN	146
9.2.4. SELEKTIERTER SCFV ANTI-VES V 5 #2 (AUS DER GATEWAY® BIBLIOTHEK)	151
9.3. VEKTORKARTEN	152
9.4. ENTSORGUNG	154
9.5. GEFÄHRSTOFFE UND SICHERHEITSDATEN	154
9.6. GEFÄHRENSYMBOL	156
9.7. GEFÄHRENHINWEISE UND SICHERHEITSRATSCHLÄGE	156

1. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten wesen- und bienengift-spezifische Antikörperfragmente, die durch die Selektion einer naiven semi-synthetischen humanen Phagenbibliothek erhalten wurden, in unterschiedliche homodimere und heterotetramere Antikörper-Konstrukte überführt werden. Dabei sollten chimäre Konstrukte des humanen Immunglobulin (Ig) Isotyps E im Vordergrund stehen, welche die Fähigkeit zur Fc-Rezeptorbindung eines nativen IgE Antikörpers besitzen und die nachfolgend in verschiedenen diagnostischen Testsystemen analysiert werden sollten. Ebenfalls sollte eine aviane wespengift-spezifische Antikörper-Bibliothek auf Basis des Immunrepertoires eines mit Wespengift immunisierten Huhns dargestellt werden. Neben der eigentlichen Erstellung einer solchen Bibliothek die Evaluierung der verschiedenen Möglichkeiten zur Klonierung der Bibliothek im Fokus dieser Arbeit. Die entstandenen Antikörper-Bibliotheken sollten zur Überprüfung der Funktionalität gegen ein Majorallergen, das Ves v5, aus dem Wespengift selektiert werden. Die so erhaltenen allergen-spezifischen Antikörperfragmente erlauben nachfolgend die Generierung vollständiger Antikörper. Zudem können die Bibliotheken gegen weitere Allergene selektiert und zur Generierung monoklonaler Antikörper eingesetzt werden.

1.1. Allergie

Bereits 1906 definierte der Wiener Kinderarzt Clemens Freiherr von Pirquet den Begriff Allergie als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“¹. Heutzutage wird sie als eine Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird, definiert. Die Zahl von Patienten mit allergischer Rhinitis (Heuschnupfen), allergischem (atopischem) Asthma, atopischer Dermatitis (Neurodermitis) und Lebensmittelallergien steigt besonders in den Industrieländern stark an^{2,3,4}, wobei ungefähr 25% der westlichen Bevölkerung betroffen sind⁵. Robert R. A. Coombs und Philip G. H. Gell⁶ teilten im Jahr 1963 die unterschiedlichen hypersensiblen Reaktionen nach ihren pathophysiologischen Reaktionen in vier Typen (Typ I–IV) ein (Tab. 1). Die Immunreaktionen der

Allergietypen I – III werden durch Antikörper vermittelt, wobei die Typ I-Reaktion durch IgE und die Typen II und III durch IgG und IgM induziert werden. Bei der TypIV-Reaktion handelt es sich um eine Antikörper-unabhängige Reaktion, hierbei werden T-Zellen aktiviert.

Tab. 1: Einteilung der unterschiedlichen hypersensiblen Reaktionen und ihren Mechanismen sowie ein beispielhaftes Krankheitsbild nach Robert R. A. Coombs und Philip G. H. Gell⁶.

Typ	Pathophysiologische Mechanismen	Krankheitsbild (Beispiel)
I	IgE-vermittelt, gegen lösliche Antigene	Insektengiftallergie
II	Antikörper-vermittelter (IgG und IgM) und zytotoxischer Typ, Zellgebundene Antigene	
Ila	IgG und IgM Antikörper gegen zellgebundene Antigene	Hämolytische Anämie
Ilb	Stimulatorische Immunreaktion mit Hormonrezeptoren	Morbus Basedow
III	Antikörper-abhängiger Immunkomplex (lösliche Antigene)	Serumkrankheit
IV	Zell-vermittelter Typ/Antikörper-unabhängiger Typ (Aktivierung von T-Zellen)	
IVa1	Aktivierung von T _H 1-Zellen	Nickel-Kontaktdermatitis
IVa2	Aktivierung von T _H 2-Zellen	atopisches Asthma
IVb	Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten	Kontaktdermatitis

Bei der allergischen (atopischen) Reaktion vom Typ I, auch als Reaktion vom Soforttyp bezeichnet, handelt es sich um eine Interaktion von löslichen Antigenen und IgE Antikörpern. Hierbei liegen die Antikörper an ihre Rezeptoren gebunden vor und lösen nach ihrer Quervernetzung durch spezifische, lösliche Antigene eine Signalkaskade aus, die in der Ausschüttung unterschiedlicher Chemokine resultiert. Die Typ II-Reaktion wird auch als zytotoxischer Typ bezeichnet, neben den IgG spielen auch IgM Antikörper

eine Rolle, die gegen zell-gebundene Antigene gerichtet sind. Nach Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes kann diese Interaktion entweder zur Zelllyse oder zur Aktivierung endokriner Zellen führen. Eine Opsonisierung des Komplexes und eine anschließende Zelllyse findet bei der Typ IIa-Reaktion statt, während bei der Typ IIb-Reaktion durch die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren unterschiedliche spezifische Zellfunktionen aktiviert werden. Bei allergischen Reaktionen vom Typ III werden vor allem Antikörper gegen lösliche Antigene gebildet. Eine der bekanntesten Erkrankungen, die aus dieser Reaktion resultieren kann, ist die Serumkrankheit⁷, welche 1905 erstmals von Pirquet und Schick beschrieben wurde. Bei dieser Krankheit formen Antikörper mit ihren Antigenen Immunkomplexe, die sich u. a. in Kapillaren ablagern und somit zu Entzündungsreaktionen führen können⁸. Als Typ IV-Reaktion bezeichnet man eine T-Zell-vermittelte Immunantwort, die so genannte Spättyp-Reaktion, welche in drei Subtypen unterteilt wird. Typ IVa1 stellt eine T_H1 -Zell-vermittelte Reaktion dar, welche sich gegen lösliche Antigene richtet. Letztendlich werden dabei Makrophagen zum Abbau des gebildeten Immunkomplexes aktiviert. Beim Typ IVa2 werden nach Bindung der löslichen Antigene T_H2 -Zellen aktiviert, was zur Aktivierung eosinophiler Granulozyten führt. Die Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten, die durch Bindung von zellgebundenen Antigenen ausgelöst wird, führt ebenfalls zur Lyse der Zellen und beschreibt den letzten Typ IVb der hypersensiblen Reaktionen⁸.

1.1.1. Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I – Soforttyp

Da im Rahmen dieser Arbeit Antikörper gegen Allergene untersucht wurden, die im Zusammenhang mit der allergischen Reaktion vom Soforttyp stehen wird diese in diesem Kapitel gesondert erläutert. Als Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I wird nur die allergische Reaktion bezeichnet, bei der die IgE- und T_H2 -Zell-vermittelte Immunantwort eine Rolle spielt³. Bei diesem Mechanismus handelt es sich genau betrachtet um die gleiche Immunantwort, die stattfindet wenn z.B. Helminthen (parasitäre Würmer) in einen Organismus eindringen⁹. Dies führte zu der Vermutung, dass durch eine Art „Fehlfunktion“ des Immunsystems, Allergene als Fremdmoleküle erkannt und bekämpft werden⁹.

Die Typ I Reaktion kann in eine Sensibilisierungsphase (Abb. 1) und eine Effektorphase (Abb. 2) eingeteilt werden. Bei der Sensibilisierungsphase bindet ein Antigen, z.B. ein Allergen, an eine Dendritische Zelle, wird von dieser aufgenommen, prozessiert und anschließend in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Präsentation erfolgt über den MHC der Klasse II (*major histocompatibility complex*), dieser bindet an den T-Zell Rezeptor und bildet so einen Komplex aus Dendritischen Zellen und naiven T-Zellen. Dies führt zu einer Aktivierung und Differenzierung der naiven T-Zellen zu CD4⁺ Helfer-T-Zellen (T_H). Neben T_H1-Zellen, die durch den Transkriptionsfaktor T-bet (*T-box-expressed in T-cells*) reguliert werden^{10,11} und beim Schutz vor intrazellulären bakteriellen und viralen Pathogenen eine Rolle spielen werden IL-17-produzierenden T_H-Zellen (T_H-17-Zellen) diese sind involviert in der Abwehr extrazellulärer bakterieller Pathogene und Fungizide und durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t (*RAR-related orphan receptor γ t*) reguliert werden, gebildet (Abb. 3). Ebenfalls differenzieren die naiven T-Zellen zu T_H2-Zellen, die an der Immunreaktion gegen multizelluläre Parasiten beteiligt sind¹² (Abb. 3). T_H2-Zellen werden durch den Transkriptionsfaktor GATA3 reguliert¹³, binden an antigen-bindende B-Zellen und in Gegenwart von Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) führen die antikörper-produzierenden B-Zellen einen Isotypenwechsel von IgM zu IgE durch^{3,14,15,16,17}. Ob dieser Wechsel direkt verläuft oder über andere Antikörper-Isotypen ist bisher noch nicht detailliert aufgeklärt¹⁸. Der Isotypenwechsel wird in einem gesunden Organismus durch die Gegenwart von Interferon- γ -(IFN- γ)-produzierenden-T_H1-Zellen inhibiert³. Zeitgleich werden Gedächtnis-B-Zellen gebildet, welche bei einem erneuten Allergenkontakt aktiviert werden, wodurch höhere Mengen an IgE Antikörpern gebildet werden können (Abb. 1). Nach erneuter Exposition mit dem Allergen wird die Effektorphase aktiviert.

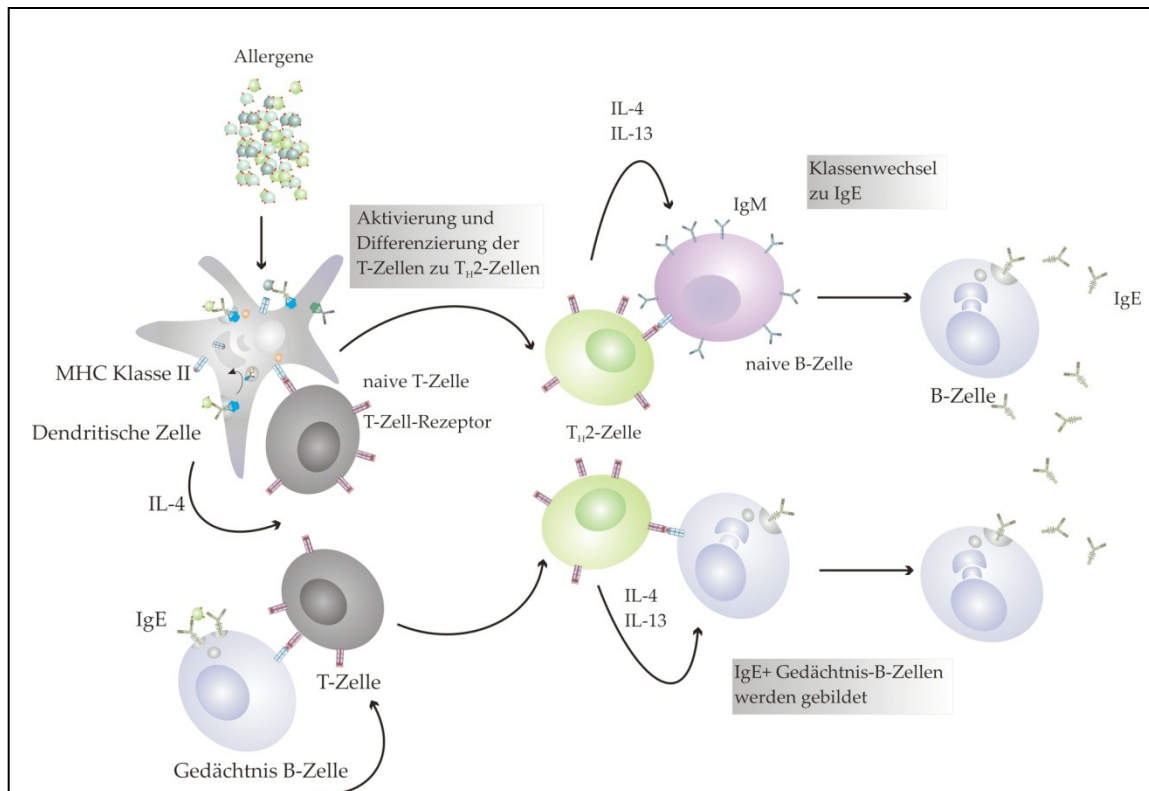


Abb. 1: Sensibilisierungsphase der allergischen Reaktion vom Typ I. Durch erstmaligen Kontakt mit einem Allergen werden Dendritische Zellen aktiviert. Hierbei wird das Allergen aufgenommen, prozessiert und als Peptid durch den MHC Klasse II (major histocompatibility complex) präsentiert. Dieser Schritt aktiviert eine Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H2-Zellen und ein Isotypenwechsel der gebildeten allergen-spezifischen Antikörper-Konstrukte zum IgE Isotyp findet in Gegenwart von Interleukinen (IL) statt.

Hierbei bindet das Allergen an spezifische IgE Antikörper, die über ihren Fc-Teil an den hoch-affinen IgE-Rezeptor FcεRI gebunden vorliegen, welcher auf der Oberfläche von Effektorzellen wie z.B. Mastzellen oder Basophilen präsentiert wird. Durch diese Quervernetzung der Rezeptoren wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Degranulation der Zelle und somit zur Freisetzung von u.a. Histamin, Cytokinen und Chemokinen führt (Abb. 2). Die Signalkaskade wird durch den Fcε Rezeptor aktiviert, welcher aus vier Untereinheiten, einer α-, einer β- und zwei γ-Untereinheiten besteht. Die α-Kette ist verantwortlich für die Antikörperbindung, die β-Untereinheit dient als Signalverstärker mit einem *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) und die beiden γ-Untereinheiten bilden ein Disulfid-verbrücktes Homodimer. Jede Kette der beiden γ-Untereinheiten besitzt ein ITAM und spielt dadurch eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion¹⁹. Während die tetramere Form des Rezeptors auf Effektorzellen, wie z.B. Basophilen, exprimiert wird, existiert außerdem eine trimere Form, bei der die β-

Kette fehlt, auf Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs), wie Monozyten oder Dendritischen Zellen¹⁹, ebenfalls Effektorzellen.

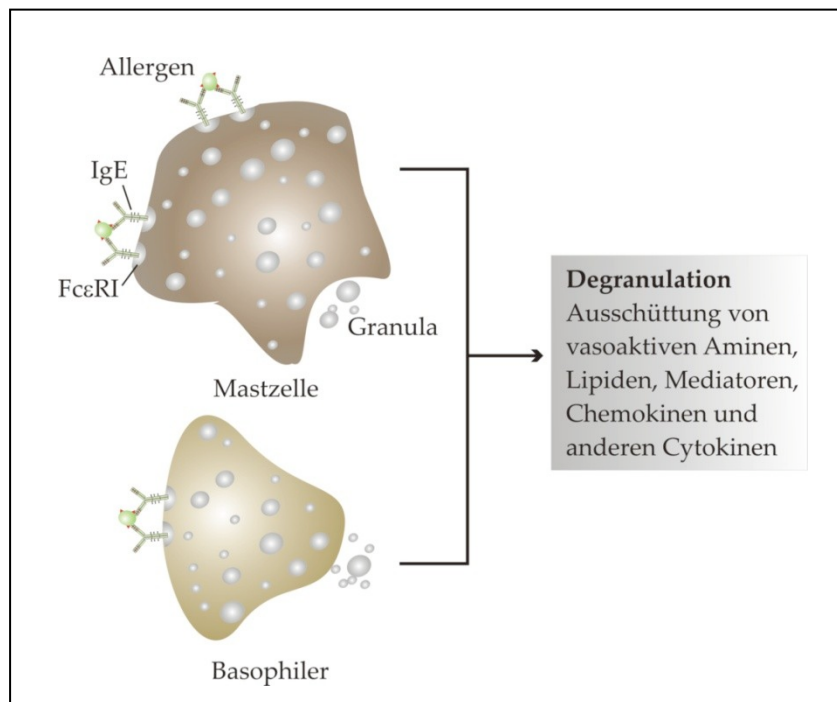


Abb. 2: Die Effektorphase der allergischen Reaktion vom Typ I. Durch Bindung eines Antigens an mehrere IgE Antikörper, die auf der Zelloberfläche über den Fcε Rezeptor (FcεRI) gebunden sind, wird eine Signalkaskade ausgelöst. Diese führt zur Degranulation von Effektorzellen und so zur Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren wie Chemokine.

Die Freisetzung von Mediatoren führt zu den bekannten Reaktionen wie allergischer Konjunktivitis, allergischer Rhinitis, allergischem Asthma und Urticaria. Es können aber auch schwerwiegendere und oftmals lebensbedrohliche, systemische Reaktionen auftreten wie ein angioneurotisches Ödem oder ein anaphylaktischer Schock, der innerhalb weniger Sekunden bis Minuten nach dem Kontakt mit dem Allergen stattfindet²⁰ und zum Tode führen kann.

Ein gesunder Organismus verfügt über immunologische Mechanismen um Entzündungen und Gewebeschäden eingrenzen zu können und so chronischen Infektionen vorzubeugen^{9,20}. Hierfür werden regulatorische T-Zellen (T_{reg}) gebildet, welche IL-10 und Interferon- γ (IFN- γ) sekretieren, was u.a. in immunsuppressiven und anti-entzündlichen Effekten resultiert^{9,21,22} (Abb. 3). Da beobachtet werden konnte, dass ein wiederkehrender Kontakt mit einem Allergen, zu einer chronischen Entzündung führen kann, vermutet man, dass dieser Mechanismus entweder nicht voll

ausgebildet oder vollständig verloren ist, bzw. dass die Entzündungsfaktoren überwiegen^{9,21,22}. Diese Beobachtungen werden ebenfalls durch die Hygiene-Hypothese^{2,9,21,22} bestätigt, welche besagt, dass die Bevölkerung der Industrienationen durch einen deutlich verbesserten und hygienischeren Lebensstandard weniger parasitären Infektionen, pathogenen und nicht-pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt ist^{2,9,21,22}, wodurch die Entwicklung der Immunantwort, unter anderem auch die Bildung von T_{reg} -Zellen ausbleibt, und in einem Ungleichgewicht zwischen T_{reg} -Zellen und T_H2 -Zellen resultiert. Des Weiteren spielt vermutlich die genetische Veranlagung, d.h. eine mögliche Neigung zur Ausbildung einer T_H2 -Zell-vermittelten Immunantwort^{2,9,21,22} eine Rolle, was bedeutet, dass einige Menschen durch den Kontakt mit einem harmlosen Antigen eine Allergie ausbilden, während andere, die in dem gleichen Umfeld aufgewachsen sind, keine Allergien aufweisen^{9,21,22,23}. Die molekularen Mechanismen, die dieser Theorie zu Grunde liegen, müssen jedoch noch im Detail geklärt werden.

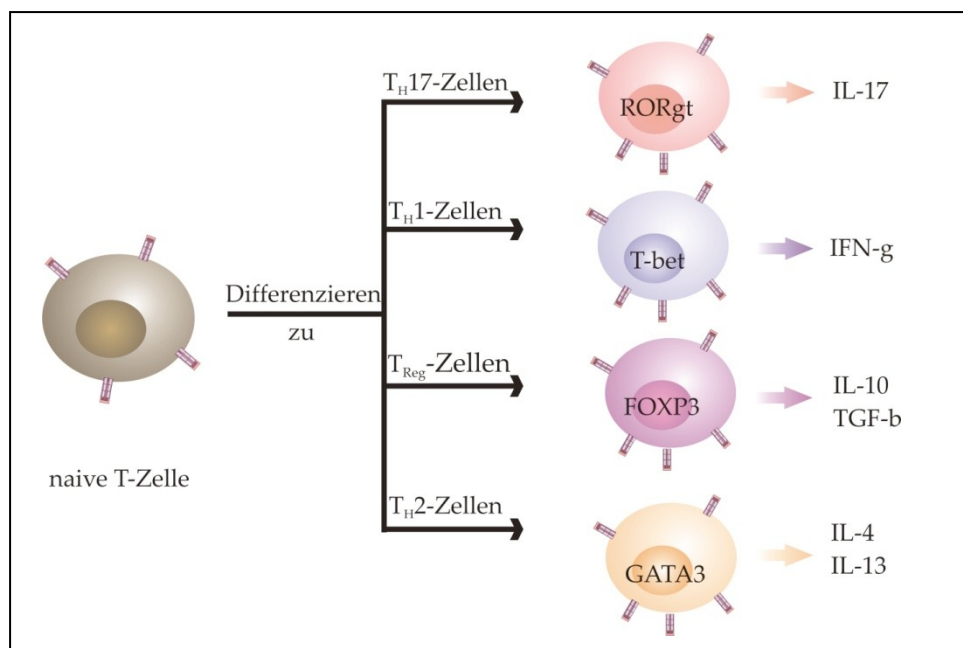


Abb. 3: Schematische Darstellung der Differenzierung naiver T-Zellen.

1.1.2. Hymenopterengiftallergie

Etwa 3% der Bevölkerung in Deutschland leidet unter allergischen Reaktionen nach Insektenstichen. Diese reichen von leichten Symptomen wie lokalen Schwellungen und Juckreiz, über Atemnot bis hin zum anaphylaktischen Schock²⁴, der zum Tod führen kann.

Dabei reagieren die meisten Betroffenen auf das Gift von Hymenopteren, eine Insektenordnung zu der unter anderem auch die in Deutschland weit verbreiteten Familien der Bienen (*Apidae*), Wespen (*Vespidae*) und Ameisen (*Formicidae*) gehören. Zur Familie der *Apidae* gehören u.a. die westliche Honigbiene (*Apis mellifera*) und die Hummel (*Bombus sp.*). Die Familie *Vespidae* ist in zwei Gruppen unterteilt, *Vespinae* und *Polistinae*. Zu den *Vespinae* zählen u.a. die Gemeine Wespe (*Vespula vulgaris*) und die Hornisse (*Vespa crabro*). Die *Polistinae* sind vor allem im mediterranen Raum verbreitet. Da die Gattung *Vespula* weitaus aggressiver ist als die Gattungen *Polistinae* und *Vespa*, stellt diese eine stärkere Bedrohung für Insektengift-Allergiker dar.

Bei einem Stich der westlichen Honigbiene werden zwischen 50 - 147 µg Gift abgegeben^{25,26}, ein Gemisch aus biologisch aktiven Substanzen wie diverse Proteine u.a. Enzyme und biogene Amine. Die Hauptkomponenten des Bienengifts sind Melittin (Api m 4), Phospholipase A₂ (Api m 1 oder PLA₂) und die Hyaluronidase (Api m 2). Melittin ist ein anti-inflammatorisches Peptid, das eine starke hämolytische Aktivität aufzeigt, da es sich in Zellmembranen einlagert und Poren bildet²⁷. An der durch das Gift verursachten Entzündungsreaktion sind u.a. die Phospholipase A₂, die Hyaluronidase, Histamin und das MCD-Peptid (*mast cell* degranulierendes Peptid), das zur Degranulation von Mastzellen führt, beteiligt²⁸.

Bei einem Stich der Gemeinen Wespe werden zwischen 1.7 - 3.1 µg Gift in das Gewebe des Opfers injiziert²⁹. Die Hauptkomponenten des Gifts sind unter anderem eine Hyaluronidase (Ves v 2) und eine Phospholipase A₁ (Ves v 1 oder PLA₁), von der Hyaluronidase wurde erst kürzlich eine zweite inaktive Form entdeckt³⁰. Die Phospholipase des Wespengiftes weist keinerlei Homologie zu der des Bienengifts auf. Ebenfalls ein Bestandteil des Wespengifts ist das Antigen 5 (Ves v 5), dessen Funktion bisher noch unbekannt ist. Die Dipeptidylpeptidasen IV der Biene (Api m 5) und der Wespe (Ves v 3) wurden in unserer Arbeitsgruppe identifiziert, exprimiert und

charakterisiert. Diese Peptidasen besitzen untereinander eine Sequenzhomologie von 53% auf Proteinebene und von 32%³¹ zur humanen Dipeptidylpeptidase IV.

Die bisher beschriebenen allergenen Bestandteile der Gifte der Honigbiene bzw. Gemeinen Wespe und deren biologische Funktionen sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Auflistung der bisher bekannten Gift-Allergene der westlichen Honigbiene bzw. der Gemeinen Wespe.

Organismus	Allergen	Name	MW
<i>Apis mellifera</i>	Api m 1	Phospholipase A ₂	16 kDa
	Api m 2	Hyaluronidase	39 kDa
	Api m 3	Saure Phosphatase	43 kDa
	Api m 4	Melittin	3 kDa
	Api m 5	Dipeptidylpeptidase IV	100 kDa
	Api m 6	Protease Inhibitor (putativ)	8 kDa
	Api m 7	CUB-Serin Protease	39 kDa
	Api m 8	Carboxylesterase	70 kDa
	Api m 9	Carboxylpeptidase	60 kDa
	Api m 10	Carbohydrat-reiches Protein	55 kDa
<i>Vespula vulgaris</i>	Ves v 1	Phospholipase A ₁	34 kDa
	Ves v 2 a	Hyaluronidase	45 kDa
	Ves v 2 b	Hyaluronidase (inaktiv)	47 kDa
	Ves v 3	Dipeptidylpeptidase IV	100 kDa
	Ves v 4	CUB-Serin Protease	35 kDa
	Ves v 5	Antigen 5	23 kDa

1.1.3. Allergie-Diagnose

Da allergische Reaktionen die Lebensqualität stark beeinflussen, spielt eine exakte Diagnose eine wichtige Rolle. Hierfür existieren eine Reihe unterschiedlicher Testverfahren, wie z.B. Hauttests, Provokationstests oder *in vitro*-Tests. Einer der gängigsten Hauttests ist der so genannte Prick-Test, bei dem Allergenextrakt auf die Haut getropft und diese anschließend eingeritzt wird. Nach einer Inkubationszeit von

ca. 30 min werden die entstandenen Quaddeln analysiert, indem man die jeweilige Größe der Quaddel bestimmt. Diese Art der Diagnose kann jedoch lediglich die Aussage zulassen, ob eine allergische Reaktion vorliegt oder nicht (Abb. 4A), jedoch kann man dadurch die Schwere der Allergie nicht bestimmen. Eine weitere Methode ist der Intrakutan-Test, bei dem eine spezifische Menge Allergen in die Haut injiziert wird. Auch hier wird anschließend die jeweilige Größe der Quaddel bestimmt. Bei den unterschiedlichen *in vitro*-Testverfahren werden allergen-spezifische Antikörper im Blut bestimmt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass sowohl der für ein Allergen spezifische IgE-Spiegel als auch der totale IgE-Spiegel bestimmt werden kann (Abb. 4B und Abb. 4C).

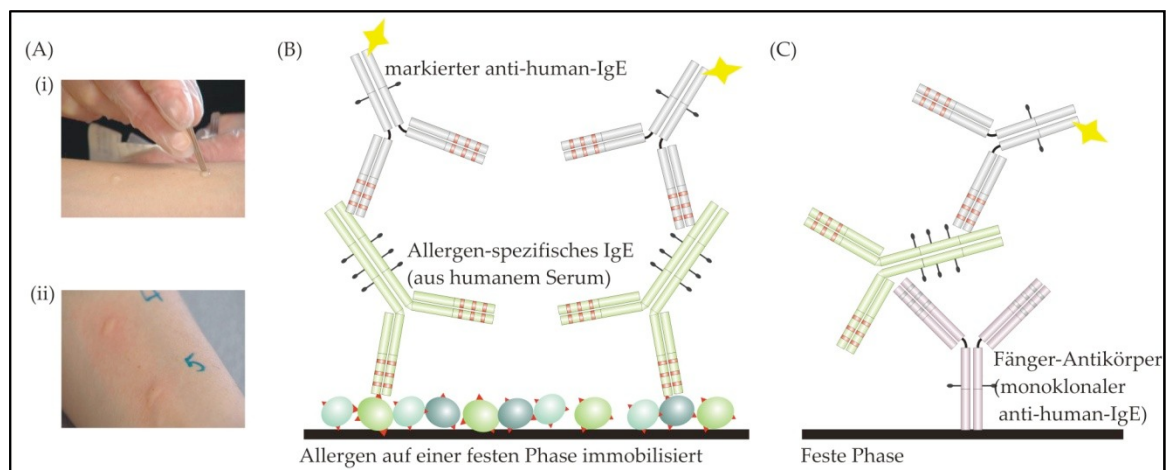


Abb. 4: Diagnosemethoden. (A) Darstellung eines Prick-Tests. (i) Auftrag der Allergene. (ii) Analyse der Quaddel. (B) Schematische Darstellung eines *in vitro*-Tests zur Bestimmung des allergen-spezifischen IgE-Spiegels. (C) Schematische Darstellung eines *in vitro*-Tests zur Bestimmung des gesamten IgE-Spiegels.

Der Basophilen-Aktivierungstest (BAT) ist eine Methode, bei der die Rezeptor-gebundenen allergen-spezifischen IgE Antikörper des Patienten analysiert werden können. Dieser Test ist eine der zuverlässigsten *in vitro*-Methoden. Hierbei wird die Degranulation der Basophilen bestimmt, welche durch spezifische Allergene ausgelöst werden. Das bedeutet, dass nur die IgE Antikörper eine Rolle spielen, die auf einer Effektorzelle gebunden vorliegen, und durch ihre Quervernetzung auf der Zelloberfläche die Signalkaskade auslösen. Die Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie u.a. Histamin, oder Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche, wie z.B. CD63, können anschließend analysiert werden. Außerdem werden für einige Allergene

Provokationstests durchgeführt, bei denen z.B. ein Pollenallergen auf die Nasenschleimhaut aufgebracht und die Sofortreaktion analysiert wird.

Eines der ersten *in vitro*-Testsysteme war der so genannte RAST (*radio allergen sorbent assay test*), bei dem der detektierende Anti-IgE Antikörper radioaktiv markiert war. Hierbei wurden die unterschiedlichen spezifischen IgE-Spiegel in so genannte RAST-Klassen eingeteilt um somit den Grad der Allergie besser vergleichen zu können. Diese Einteilung reicht von RAST-Klasse 0, d.h. negativ bis hin zu RAST-Klasse 4, d.h. stark positiv. Die heutigen unterschiedlichen *in vitro*-Methoden haben eine ähnliche Einteilung übernommen. Diese unterscheiden sich aber untereinander so stark, dass die diagnostischen Testsysteme nur unter Vorbehalt miteinander verglichen werden können.

Demnach ist die Diagnose bei Insektengift-Allergien zum Teil schwierig und da zusätzlich die Konzentrationen der Giftkomponenten in unterschiedlichen Giftextrakten variieren kann, können dadurch falsch-negative Ergebnisse entstehen²⁶. Außerdem treten häufig Kreuzreaktivitäten zwischen Wespen- und Bienengiftallergenen auf, die zum einen durch hohe Homologien auf Protein-Ebene zwischen den Giftkomponenten, wie z.B. Ves v 3 und Api m 5 erklärt werden können. Das bedeutet, das Patienten IgE-Raktivitäten gegen zwei Allergene besitzen und allergische Symptome zeigen, wobei sie jedoch nur gegen eines der beiden Allergene sensibilisiert sind. Zum anderen reagieren etwa 30 - 50% der Patienten auf Wespen- und Honigbienengiftextrakt. Der Grund hierfür kann neben einer tatsächlichen doppelten Sensibilisierung auch die kreuzreaktiven Carbohydrat Determinanten (*cross-reactive carbohydrate determinants*, CCD) sein³². Da die anschließende Therapie sich durch diese möglichen „Fehl-Diagnosen“ als schwierig erweist, wäre als Alternative zur Verwendung von Giftextrakten die Komponenten-aufgelöste Diagnostik mit rekombinant erzeugten Allergenen von Vorteil.

1.1.4. Therapie

Zur Behandlung leichter allergischer Reaktionen werden, neben der vom Arzt empfohlenen Karenz, der Meidung des Allergens, oftmals Antihistaminika und Kortison

eingesetzt. Ein Notfallset bestehend aus Antihistaminika, Kortikosteroiden und einem Adrenalin Auto-injektor (EpiPen®) wird den Allergikern verschrieben, bei denen ein erhöhtes Risiko vorliegt einen anaphylaktischen Schock zu bekommen. Diese Medikamente behandeln zwar die Symptome, jedoch werden die Allergien durch die Einnahme nicht geheilt. Zur Behandlung von schwerem Asthma bronchiale existiert der monoklonale Anti-human-IgE Antikörper Omalizumab (Xolair®) als Therapeutikum³³. Leukotrienrezeptor-Antagonisten, wie Singulair® (Montelukast) werden bei Asthma eingesetzt und verhindern kompetitiv die Bindung von Leukotrienen an ihren Rezeptor. Ebenfalls werden Immunmodulatoren, wie *Toll-like*-Rezeptor Liganden und Vitamin D eingesetzt, die eine Verschiebung der T-Zell-Antwort von T_H2- zu T_H1-Zellen induzieren. Die spezifische Immuntherapie (SIT) jedoch bietet bisher die einzige Möglichkeit eine starke allergische Reaktion kausal zu behandeln. Hierbei werden dem Patienten langsam ansteigende Mengen Allergen, in Form von Extrakten, subkutan über mehrere Monate bis Jahre appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die stetige Provokation mit dem auslösenden Allergen eine verstärkte Bildung allergen-spezifischer IgG₁ und IgG₄ Antikörper hervorgerufen wird, welche möglicherweise als blockierende Antikörper fungieren^{34,35,36}. Der genaue Mechanismus, der einer erfolgreichen SIT zugrunde liegt ist bisher noch nicht endgültig geklärt. In klinischen Studien wurden Hinweise gefunden, dass Antigen-präsentierende Zellen eine Rolle in der Bildung von IL-10-sekretierenden regulatorischen T-Zellen (T_{reg}-1) und nicht-proliferierende T_{reg}1-like Zellen spielen^{37,38}. Diese regulieren im Verlauf der Therapie allergen-spezifische T_H1- und T_H2-Antworten herunter³⁷ indem IL-10 und TGF-β ausgeschüttet werden. Der Therapeutische Effekt dieses regulatorischen Mechanismus ist die funktionelle Inaktivierung des krankheitsauslösenden T_H2-Subtyps. Zusammen mit der Neuinduktion und selektiven Proliferation von T_H1-Zellen kann so eine Modulation der T_H-Antwort zugunsten des T_H1-Subtyps erfolgen. Die SIT wird durch *in vitro*-Tests überwacht, die den IgE-, IgG₁- und IgG₄-Spiegel im Blut bestimmen. Bei der Behandlung mit Giftextrakt spricht man auch von einer „Venom Immuntherapie“ (VIT). Bei ca. 80% der Hymenopterengift-Allergiker werden mit Hilfe einer VIT die Symptome deutlich vermindert, jedoch besteht durch die unterschiedlichen Giftextrakte hier die Gefahr einer Neusensibilisierung gegen weitere Komponenten des Gifts und damit eine Verstärkung der allergischen Reaktion.

Die Verwendung rekombinanter Allergene in einer SIT anstelle des Giftextrakts könnte die Gefahr einer Neusensibilisierung vermindern und dadurch ebenfalls Nebenwirkungen reduzieren.

1.2. Antikörper-Bibliotheken und *Phage Display*

Das menschliche Immunsystem kann durch gezielte Selektionsprozesse hoch-spezifische Antikörper bilden. Um diesen Prozess *in vitro* zu imitieren wurden verschiedene Möglichkeiten der Antikörpergewinnung entwickelt. Eine der ersten Technologien war die Generierung von Hybridomzellen, welche durch die Fusion von murinen B-Zellen mit Myelomzellen entstehen. Durch diese von Köhler und Milstein³⁹ im Jahr 1975 entwickelte Methode lassen sich zwar hoch-affine Antikörper erzeugen, jedoch entsteht meist nur eine geringe Anzahl an spezifisch bindenden Antikörpern. Zudem ist der Transfer in andere Antikörper-Isotypen meist komplex und zeitintensiv. Die entstandenen monoklonalen Antikörper sind außerdem murinen Ursprungs, wodurch bei ihrem Einsatz als Therapeutikum im Menschen Komplikationen, wie die humane-Anti-Maus-Antikörper (HAMA)–Antwort, entstehen können.

Etwa 15 Jahre später wurden die ersten murinen Antikörperfragmente aus Lymphozyten immunisierter Tiere gewonnen und in *E. coli* exprimiert⁴⁰, wobei entweder die variablen Regionen der leichten (v_L) und der schweren (v_H) Kette oder aber antigen-bindende Fragmente (Fab) verwendet wurden. Die Darstellung antigen-bindender Domänen auf der Oberfläche filamentöser Phagen wurde 1990 von MacAfferty⁴¹ vorgestellt. Die daraus resultierende *Phage Display*-Technologie hat im Gegensatz zu der Hybridom-Technologie den Vorteil der schnellen, einfachen und kostengünstigen Produktion von Antikörperfragmenten. Es gibt weitere *Display* Methoden wie z.B. das Ribosomen- und mRNA-*Display* oder *yeast-Display*^{41,42,43,44,45}. Viele dieser *Display*-Methoden beinhalten vier essentielle Schritte. Erstens Generierung bzw. Klonierung einer genotypischen Diversität, zweitens Kopplung von Genotyp und Phänotyp, drittens Selektionsdruck (z.B. Antigenmenge) und letztendlich Amplifikation selektierter Phagen⁴⁴. Doch um die weiteren Schritte der Selektion durchführen zu können müssen Antikörper-Bibliotheken, die aus Antikörperfragmenten bestehen, generiert werden. Diese kann man in zwei

Hauptgruppen einteilen, in immune und nicht-immune Bibliotheken. Immune Bibliotheken werden aus dem B-Zell-Repertoire immunisierter Tiere oder Spender generiert und sind dadurch mit spezifischen Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen bzw. Allergen angereichert^{46,47}. Um eine Bibliothek mit einer möglichst hohen Diversität an variablen Regionen der leichten und der schweren Kette zu erhalten, werden Tiere mit spezifischen Antigenen bzw. Allergenen immunisiert. Durch die Entnahme von Blut während der einzelnen Immunisierungsschritte kann man den Erfolg überwachen, wobei der spezifische Antikörper-Spiegel im Serum analysiert wird. Nach einer erfolgreichen Immunisierung wird anschließend die Milz entnommen und daraus die mRNA isoliert. Bei einer immunen Bibliothek aus Spendermaterial wird dem Patienten Blut entnommen und mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD19 spezifisch B-Lymphozyten angereichert, aus denen nachfolgend die mRNA gewonnen werden kann. Ebenfalls besteht die Möglichkeit der Nasenbiopsie, bei der Patienten nasale Schleimhaut entnommen wird, die ebenfalls mit B-Zellen angereichert ist⁴⁸. Es konnten bereits aus Mensch^{49,50}, Maus^{47,51,52}, Huhn^{53,54,55,56,57,58}, Kaninchen⁵⁹ und Kamel⁶⁰ immune Bibliotheken erhalten werden. Diese werden nur aus den kleinsten antigen-bindenden Bereichen generiert wie z.B. monovalente variable-Fragmente (Fv)⁶¹ (Abb. 5A), *single-chain* Fv (scFv) (Abb. 5B), die durch Verknüpfung der variablen Regionen über einem Polypeptidlinker^{62,63} entstehen oder auch antigen-bindende-Fragmente (Fab)⁶⁴ (Abb. 5C).

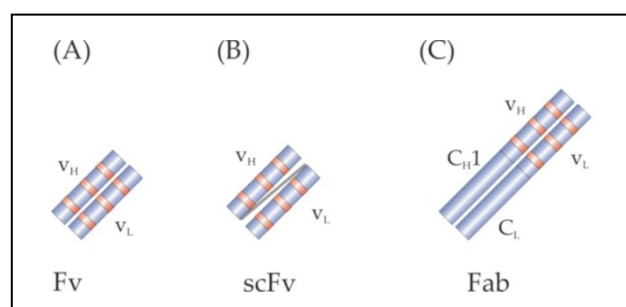


Abb. 5: Schematische Darstellung der Antikörper-Fragmente, die zur Generierung einer Antikörper-Bibliothek verwendet wurden. (A) variables Fragment (Fv). (B) *single-chain* Fv (scFv). (C) antigen-bindendes Fragment (Fab). Die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) in den variablen Regionen sind rot markiert⁶⁵.

Antikörper-Bibliotheken finden Anwendung in vielen medizinischen Forschungsbereichen, wie bei der Bekämpfung viraler Infektionen oder neoplastischer Krankheiten^{65,66} und Autoimmunkrankheiten^{67,68}. Ebenso sind immune Antikörper-

Bibliotheken im Rahmen der Analyse von speziellen Immunantworten von z.B. IgA in der Mucosa⁶⁹ interessant. Man kann nicht-immune Antikörper-Bibliotheken in synthetische und naive Bibliotheken unterteilen (Abb. 6). Naive Bibliotheken werden aus der mRNA von B-Zellen nicht immunisierter Spender gewonnen. Diese werden aus peripheren Lymphozyten⁷⁰, Milz⁷¹, Knochenmark und Tonsillen⁷² isoliert. Synthetische Antikörper-Bibliotheken hingegen werden aus V_H -Keimbahn-segmenten^{41,73} und aus V-Genen⁷⁴ gewonnen. Hier werden entweder alle drei CDR (*complementarity determining region*, komplementaritätsbestimmende Region) oder nur die CDR3 degeneriert^{75,76}, wobei die Längendiversität der CDR3, die sich in einem Bereich von 4-12 Aminosäuren bewegt und für die Antigen-Bindung von Bedeutung ist⁷⁷. Die Darstellung von Bibliotheken mit höchstmöglicher Vielfalt der variablen Regionen ist hierbei ein wichtiger Aspekt⁷⁸. Daher verfügen synthetische Antikörper-Bibliotheken üblicherweise über eine Größe im Bereich von 10^{10} - 10^{11} , so dass möglichst affine Antikörper selektiert werden können^{79,80,81}. Dass die Bibliotheksgröße jedoch nicht immer Einfluss auf die Affinität hat, zeigt, dass aus einer immunen Bibliothek mit einer geringeren Größe ebenfalls spezifische Antikörper mit einer hohen Affinität isoliert wurden.

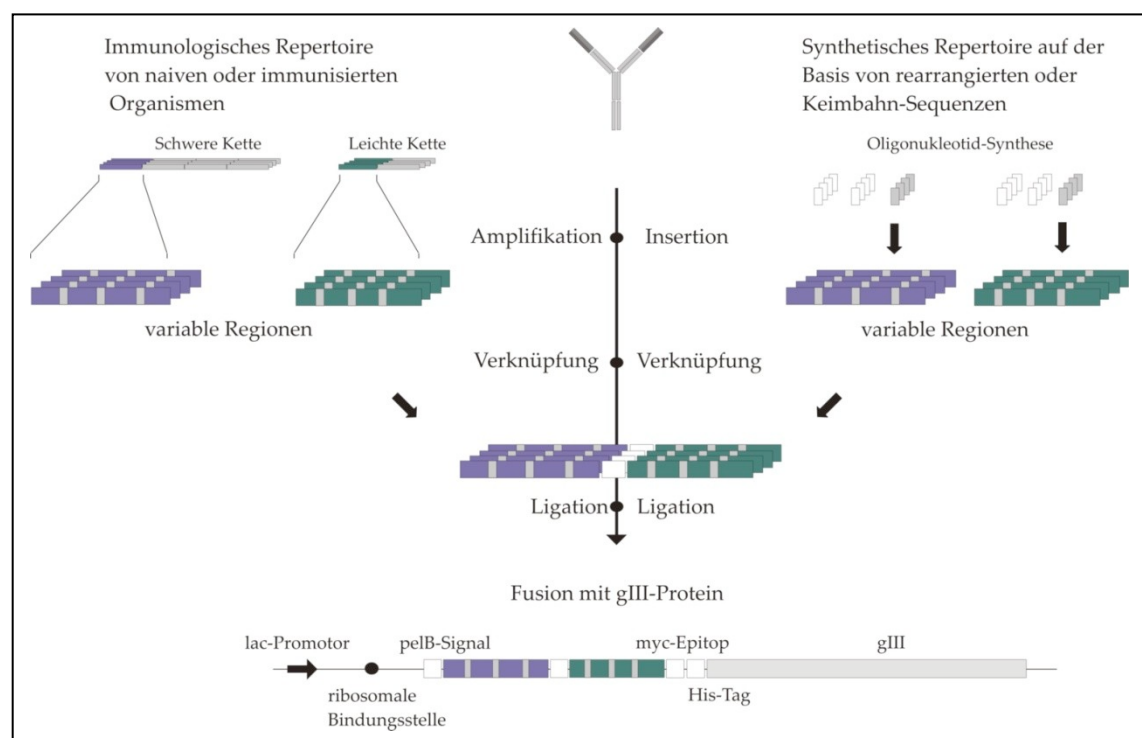


Abb. 6: Schematische Darstellung der Generierung von Antikörper-Bibliotheken im scFv-Format.

1.2.1. Aviane Antikörper-Bibliotheken

Die Diversität der Antikörperpopulation im menschlichen Organismus entsteht durch Rekombination von Gensegmenten und ergibt rechnerisch eine Diversität von 10^8 V-Antikörpergenen. Das humane Keimbahn-Repertoire stellt verschiedene Sequenzen für die leichten und schweren variablen Regionen bereit. Die v_H -Keimbahn hat neben 51 funktionellen Genen auch so genannte Pseudogene, die in gleicher Anzahl vorliegen⁸². Für die v_L -Ketten sind ebenfalls unterschiedliche Gene, 52 λ -Gene⁸³ und 40 κ -Gene vorhanden⁸⁴. Durch somatische Rekombination werden diese Fragmente miteinander verbunden, wobei bei diesen Prozessen zusätzliche Gene eine Rolle spielen. Zur Generierung der leichten und der schweren Kette werden so genannte J-Gene (*joining*) und D-Gene (*diversity*) benötigt. Um alle spezifischen Antikörper aus dem Serum eines Spenders erhalten zu können, müssen somit zur Amplifikation, da die variablen Regionen neben unterschiedlicher CDR ebenfalls diverse *framework*-Regionen besitzen, verschiedene 5'-Oligonukleotid-Paare verwendet werden, was eine langwierige Klonierung nach sich zieht.

Die Darstellung immuner Antikörper-Bibliotheken aus Hühnern stellt eine Möglichkeit zur Generierung hoch-affiner Antikörper dar. Die Antikörperdiversität im Huhn wird ebenfalls durch B-Zellen sichergestellt^{85,86}. In allen antikörper-produzierenden B-Zellen ist ein V- und ein J-Segment zur Generierung der leichten⁸⁷ und schweren Kette^{88,89}, sowie 16 D-Segmente im v_H -Lokus⁹⁰ vorhanden. Um jedoch eine hohe Diversität der Antikörper zu erhalten, spielen im avianen Immunsystem die V(D)-Pseudogene eine Rolle^{91,92}. Der Mechanismus der somatischen Genkonversion ist für die Diversität im avianen Organismus verantwortlich. Dies vereinfacht den Erhalt einzelner variabler Regionen, da zur Amplifikation der leichten und schweren Ketten der variablen Regionen jeweils nur ein 5'-Oligonukleotid-Paar benötigt wird. Es konnten bereits schon mehrere aviane Antikörper-Bibliotheken aus dem Huhn gewonnen werden^{54,55,57,93}.

Da eine Immunisierung sehr zeit- und kostenintensiv ist, wird diese begleitend durch Analyse der erhaltenen IgY überprüft. Diese Antikörper sind im avianen Immunsystem die Haupt-Antikörper⁹⁴ und können einfach aus dem Eigelb (*yolk*) isoliert werden⁹⁵. IgY besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zu IgE Antikörpern (Abb. 7), da diesem Antikörper ebenfalls eine flexible Gelenkregion (*hinge*-Region) fehlt und er über 4 C_H -

Regionen verfügt, in denen die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken ähnlich sind⁹⁶. IgY Antikörper gelten als Vorläufer der Antikörperklassen der Mammalia IgG und IgE Antikörper⁹⁷, da diese ebenfalls eine anaphylaktische Reaktion im Huhn auslösen können⁹⁸ und besitzen somit funktionelle Eigenschaften beider Mammalia Antikörper. Der im menschlichen Serum am häufigsten vorkommende Antikörper IgG wird in vier Subklassen unterteilt IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄, wobei IgG₁ am häufigsten vorkommt. Die IgG Antikörper erkennen viele Pathogene, wie z.B. Bakterien, Viren und Pilze. Diese Pathogene werden anschließend über die Aktivierung des Komplementsystems abgebaut. Der IgG₄ Antikörper spielt neben dem IgG₁-Antikörper eine Rolle bei der SIT, da dieser Antikörper wahrscheinlich blockierend wirkt. Die IgG Antikörper besitzen statt einer weiteren Domäne die *hinge*-Region, die das Fab mit dem Fc-Teil verbindet. Durch diese Region sind die Antikörper wesentlich flexibler (Abb. 7).

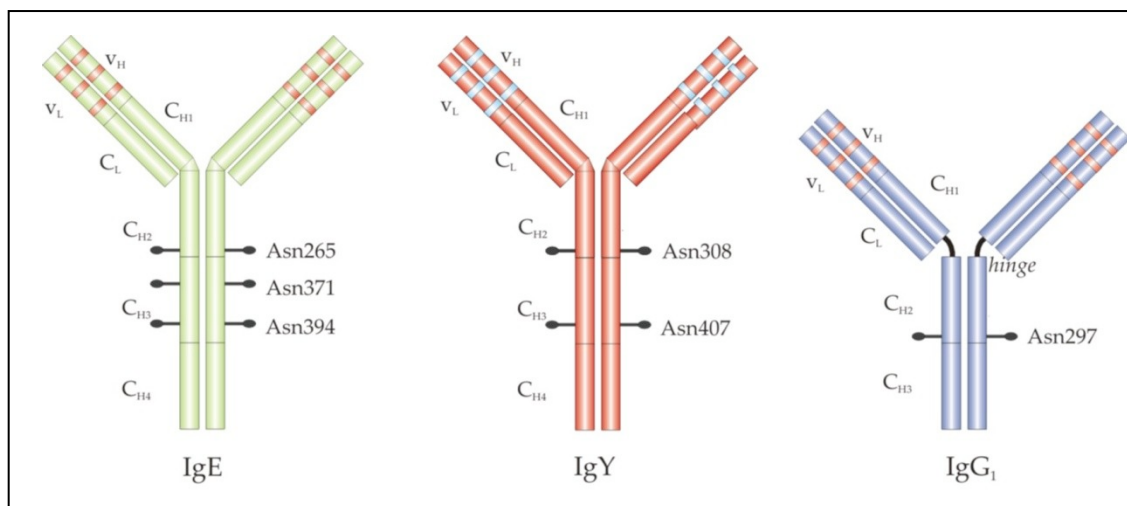


Abb. 7: Schematische Darstellung der Immunglobuline IgE, IgY und IgG₁. Dargestellt sind die humanen Antikörper-Isotypen IgE und IgG₁ und der aviane Antikörper IgY. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen IgE und IgY ist deutlich zu erkennen. Die komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) in den variablen Regionen sind rot (für IgE und IgG₁) bzw. blau (für IgY) markiert. In den einzelnen Antikörper-Konstrukten wurden ebenfalls die N-Glykosylierungsstellen markiert.

1.3. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Darstellung und Charakterisierung insektengift-spezifischer Antikörper-Konstrukte, die Antikörperfragmente wurden durch die Selektion einer naiven semi-synthetischen humane Phagenbibliothek erhalten. Hierbei sollten für die anschließende Nutzung in diagnostischen Testsystemen homodimere und heterotetramere Antikörper-Konstrukte des Isotyps IgE im Vordergrund stehen. Die generierten Antikörper-Konstrukte müssen ebenfalls die Fähigkeit zur Fc-Rezeptorbindung eines nativen IgE Antikörpers besitzen um diese ebenfalls in weiteren Studien analysieren zu können. Dort sollten sie auf eine mögliche Anwendung als „Standard-Antikörper“ in diagnostischen Testsystemen analysiert werden. Ebenfalls sollte eine aviane wespengift-spezifische Antikörper-Bibliothek generiert werden, diese durchläuft durch eine Immunisierung einer Affinitätsreifung und könnte somit zu hoch-affinen Antikörper-Konstrukten führen, die Epitop relevant sind. Die Darstellung dieser Antikörper-Bibliothek sollte über unterschiedliche Klonierungstechniken erfolgen. Für die Evaluation dieser Techniken sollte das aviane Immunsystem verwendet werden, da die Amplifikation der variablen Regionen deutlich einfacher ist als beim humanen System. Die Evaluation sollte hinsichtlich der Generierung, der erhaltenen Diversität der variablen Regionen, der Bibliotheksgröße und den Erhalt von spezifischen Antikörpern erfolgen.

2. Material

2.1. Standards und Enzyme

Standards:

Als Standards für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteinstandards *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* und *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) verwendet.

Die Standards für die Agarose-Gelelektrophorese λ -DNA/*Eco130I* (421-19329 bp), λ -DNA/*Eco47I* (308-8126 bp) und pUC19 DNA/*MspI* (67-501 bp) wurden von der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

Enzyme:

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

Enzyme, die Bestandteile von käuflich erworbenen Kits sind, werden hierbei nicht erwähnt.

2.2. Chemikalien und Bioreagenzien

Alle Chemikalien, Salze und Bioreagenzien wurden, soweit nicht anders erwähnt, in analytischer bzw. molekularbiologischer Qualität verwendet. Bezogen wurden sie von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Biomol GmbH (Hamburg), AppliChem GmbH (Darmstadt), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Acros Organics (Geel, Belgien), Thermo Electron GmbH Bioscience Technologies (Dreieich), Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Sigma, Aldrich, Fluka, (alle: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), Novagen (Merck Biosciences GmbH, Schwalbach), Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande) und Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn).

2.3. Antikörper

Die verwendeten Antikörper-Konjugate, wurden in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Verwendete Antikörper-Konjugate.

Antikörper	Firma
anti-M13-HRP	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
anti- <i>mouse</i> -IgG-AP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
anti-human-IgG-AP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
anti- <i>goat</i> -IgG-AP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
anti-human-IgG	Jackson Immunresearch, Baltimore USA
anti-human-IgE-AP	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-human-IgE	Biosource, Camarillo CA USA
anti-IgY-AP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-V5	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.4. Vektoren

Die verwendeten Vektoren pcDNA3.1+ und pBudCE4.1 zur eukaryotischen Expression in Mammalia wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Der Phagemidvektor pHen2 wurde von G. Winter, Center of Protein Engineering, MRC (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Der Vektor puc19T lag bereits im Arbeitskreis vor. Die Vektorkarten der verwendeten Vektoren sind im Anhang aufgeführt.

2.5. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide stammen von metabion Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Planegg-Martinsried). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.6. Puffer und Lösungen

Pufferlösungen, die Bestandteile eines käuflich erworbenen Kits sind, wurden in diesem Kapitel nicht berücksichtigt. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

Agarose-Gel-Auftragspuffer (6x):	0.09 % (w/v)	Bromphenolblau
	0.09 % (w/v)	Xylen Cyanol FF
	60 % (w/v)	Glycerol
	60 mM	EDTA
Ampicillin-Stocklösung:	20 mg/ml	Ampicillin
	in 70 %	Ehtanol lösen, steril filtrieren
		Lagerung bei -20 °C
AP-Detektiionspuffer:	100 mM	Tris-HCl, pH 9.5
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl
AP-Detektiionslösung: (für AP im ELISA)	13 mM	pNPP
	15 ml	AP-Detektiionspuffer, pH 9.5
AP-spezifische Detektiionspuffer: (für AP im Western Blot)	12.5 ml	AP-Detektiionspuffer, pH 9.5
	125 µl	BCIP-Stocklösung
	125 µl	NBT-Stocklösung
APS-Stocklösung:	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
		in ddH ₂ O lösen
		Lagerung bei +4 °C

MATERIAL

BCIP-Stocklösung:	0.5 % (w/v)	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in DMF lösen Lagerung bei -20 °C
Carbonatpuffer:	0.53 g 0.42 g	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃ in 50 ml ddH ₂ O lösen
Chloramphenicol:	15 mg/ml in 70 %	Chloramphenicol Ehtanol lösen, steril filtrieren Lagerung bei -20 °C
Citratpuffer für pNAG:	100 mM	Zitronensäure, pH 4.5 in ddH ₂ O lösen autoklavieren
Citratpuffer:	50 mM	Zitronensäure, pH 4.0 in ddH ₂ O lösen autoklavieren
Coomassie-Färbelösung:	0.1 % (w/v) 1 % (v/v) 40 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250 Eisessig Methanol
Coomassie-Entfärbelösung:	20 % (v/v)	Eisessig
HRP-spezifische Detektionslösung: (für HRP im ELISA)	3.3 mg 15 ml 26 µl	ABTS Citratpuffer, pH 4.0 H ₂ O ₂

FKS:		30 min bei 56 °C hitzeinaktivieren in 50 ml Aliquots Lagerung bei -20 °C
Glucose-Stocklösung:	50 % (w/v)	α -D-Glucose (wasserfrei) in ddH ₂ O lösen, steril filtrieren Lagerung in 50 ml Aliquots
IPTG:	1M	IPTG in ddH ₂ O lösen Lagerung bei -20 °C
Kanamycin-Stocklösung:	20 mg/ml	Kanamycin in ddH ₂ O steril filtrieren Lagerung bei -20 °C
Lösung I:	25 mM 50 mM 10 mM	Tris-HCl, pH 7.9 Glucose EDTA
Lösung II:	200 mM 1% (w/v)	NaOH SDS
Lösung III:	3 M	Kaliumacetat, pH 5.2 autoklavieren
NaAc-Lösung:	3 M	Natriumacetat, pH 5.2

MATERIAL

NBT-Stocklösung:	0.1% (w/v)	NBT
	100 mM	Tris-HCl, pH 9.5
		Lagerung bei -20 °C
PAGE-Probenpuffer (5x):	250 mM	Tris-HCl, pH 6.8
	40% (w/v)	Glycerol
	8% (w/v)	SDS
	0.004% (w/v)	Bromphenolblau
reduzierend:	100 mM	DTT zusätzlich
PAGE-Sammelgel-Puffer (4x):	500 mM	Tris-HCl, pH 6.8
	0.4% (w/v)	SDS
		Lagerung bei +4 °C
PAGE-Laufpuffer (5x):	125 mM	Tris-HCl, pH 8.3
	96 mM	Glycin
	0.5% (w/v)	SDS
PAGE-Trenngel-Puffer (4x):	1.5 M	Tris-HCl, pH 8.8
	0.4% (w/v)	SDS
		Lagerung bei +4 °C
PBS:	100 mM	NaCl
	33 mM	Na ₂ HPO ₄
	17 mM	NaH ₂ PO ₄
		pH 7.4/8 einstellen, autoklavieren
Phenol/Chloroform:	50% (v/v)	Phenol (Tris-gesättigt)
	50% (v/v)	Chloroform

pNAG-Lösung:	2.74 mg/ml	pNAG in Citratpuffer lösen aliquotieren in 1 ml Lagerung bei -20 °C
TB-Puffer:	10 mM	Hepes
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl pH 6.7 einstellen mit KOH autoklavieren
	55 mM	MnCl ₂ steril filtrieren, bei 4 °C lagern
Tetracyclin:	20 mg/ml	Tetracyclin in DMF lösen Lagerung bei -20 °C
TPBS:	0.1% (v/v)	Tween 20 in PBS
Transferpuffer:	25 mM	Tris
	19.2 mM	Glycin auffüllen auf 700 ml mit ddH ₂ O pH 8.3 einstellen
	200 ml	Methanol auffüllen auf 1000 ml mit ddH ₂ O
Triton-X-Lösung:	0.1 g	Triton-X
	900 µl	Tyrodes-Puffer

MATERIAL

Tyrodes-Puffer (incomplete):	7.6 g	NaCl
	0.4 g	KCl
	0.2 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	0.2 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	2.4 g	HEPES
		Auffüllen auf 1000 ml, pH 7.4
(complete):	1 g	Glucose
	1 g	BSA
X-Gal:	20 mg/ml	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-
		β-D-galactopyranosid
		in DMF lösen
		Lagerung bei -20 °C

2.7. *E. coli* Bakterienstämme und deren Genotyp

DH5α

F⁻,endA1,gyrA96,thi-1, hsdR17(r_k⁻,m_k⁺) supE44, relA1. Φ80lacZΔM15,Δ(lacZYA-argF),U169

HB2151

Nal^r thi-1 ara ((lac-proAB(F-proAB+laci_q lacZ(M15)))

TB1

araΔ(lac-proAB), rspL (Φ80, lacZΔ M 15), hsdR

TG1

supE thi-1Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK-mK-) [F' traD36proABlacI_qZΔM15]

TOP10

F- mcrA D(mrrhsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 D(lacX74) deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galUgalK rpsL endA1 nupG

XL1blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

XL10Gold

TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]

2.8. Zelllinien und Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) sind Epithelzellen und dienen bei der rekombinanten Expression in Mammalia als Expressionszelllinie. Die HEK293-Zellen wurden durch Transformation mit einem Fragment des Adenovirus 5 immortalisiert⁹⁹. Die Ratten Basophilen Leukämie Zellen (RBL-2H3) wurden mit der DNA des humanen hoch-affinen IgE-Rezeptors (FcεRI) transfiziert und werden im folgenden als RBL-2H3-SX38 Zellen geführt¹⁰⁰.

Invitrogen GmbH (Karlsruhe) lieferte das Gewebekulturmedium MEM, DMEM, Penicillin G, Streptomycin, Trypsin-EDTA und Zeocin. Das fötale Kälberserum (FKS) wurde von BIOCHROM AG (Berlin) und die Gewebekulturflaschen von Sarstedt AG & Co (Nümbrecht) bezogen.

2.9. *Phage Display* Bibliothek und Helferphagen

Die humane semisynthetische scFv-Bibliothek Griffin-1 wurde von G. Winter, Center of Protein Engineering, MRC (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt, ebenso wie der Helferphage pKM13 (Riechmann & Winter, 2000). Der Helferphage M13KO7 wurde kommerziell von Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) erworben.

2.10. Affinitätsmatrices

Ni-NTA-Agarose wurde von QIAGEN (Hilden) bezogen.

2.11. Medien

LB-Medium:	10 g/l	Trypton
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
		autoklavieren
TYE-Medium:	10 g/l	Trypton
	8 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	15 g/l	Agar
		autoklavieren
		Zugabe von Antibiotika
		nach Abkühlung auf 50 °C
2YT-Medium:	16 g/l	Trypton
	5 g/l	NaCl
	10 g/l	Hefeextrakt
		autoklavieren
SOB-Medium:	0.5% (w/v)	Hefe
	2% (w/v)	Trypton
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
		auoklavieren

SOC-Medium:	0.5% (w/v)	Hefe
	2% (w/v)	Trypton
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
		autoklavieren
	20 mM	Glucose
		steril filtrieren

2.12. Käuflich erworbene Kits

GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Big Dye-Terminator Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
StarGate® combinatorial cloning system	IBA BioTAGnology GmbH, Göttingen
Gateway®System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trifast®	PeqLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Human IgE ELISA Quantitation Kit	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery USA

2.13. Geräte

BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
Centrifuge Perfect Spin 24	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Centrifuge CT15RE	VWR International GmbH (Darmstadt)
CO ₂ -Begasungsinubator	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold)
Gel-Dokumentations-System	Intas GmbH (Göttingen)
GENIOS Multi-Detektions Reader	TECAN Deutschland GmbH (Crailsheim)

Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech GmbH (Osterode/Harz)
HERAsafe HS 18 Sicherheitswerkbank	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold)
Horizontal-Gelelektrophoresesystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
innova™ 4300 incubator shaker	New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen)
innova™ 4330, refrigerated incubator shaker	New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen)
Lichtmikroskop	Leitz GmbH & Co. KG (Oberkochen)
Mastercycler gradient	Eppendorf AG (Hamburg)
Milli-Q Academic, Laborwasser-System	Millipore GmbH (Schwalbach)
Minigel-Apparatur-SDS-PAGE	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, CA; USA)
SANYO CO ₂ -Inkubator MCO-17AI	SANYO Electric Co., Ltd. (Japan)
Thermocycler primus 25	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Trans-Blot Semi-Dry Transferl	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Waagen	Sartorius AG (Göttingen)

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden werden alle nach Sambrook¹⁰¹ in einem Sicherheitsstufe-1-Labor durchgeführt. Dies bedeutet, dass keine Gefährdung von Mensch und Umwelt vorliegt. Das eingesetzte Wasser ist entweder deionisiert oder hochreines Wasser aus den Filteranlagen PURELAB Plus PL5121 02 (USF, Ransbach, Baumbach) und Milli-Q Academic (Millipore GmbH, Schwalbach). Bei Bedarf werden Lösungen mittels Einwegspritzen durch Spritzenfilter (0.22 µm Porengröße) steril filtriert. Die Puffer und Medien werden, wenn nötig, autoklaviert (20 min bei 5 bar, 120 °C). Um Kontaminationen zu vermeiden, wird neben einer Bunsenbrennerflamme gearbeitet.

Der biochemische Abfall wird autoklaviert und der chemische Abfall gesondert entsorgt. Eine Auflistung der chemischen Substanzen und deren Entsorgungsweg sind im Anhang aufgeführt

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird eine DNA-Sequenz mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden kopiert und vervielfältigt^{102,103}. Die verwendeten Oligonukleotide besitzen eine bekannte Sequenz und flankieren den zu amplifizierenden Bereich der DNA, der als Matrize dient.

PCR-Zyklus:

Durch kurzzeitiges Erhitzen der Matrize auf 94 °C wird die DNA denaturiert, d.h. die Doppelstränge werden getrennt. Anschließend wird der Reaktionsansatz schnell auf die für die Oligonukleotide spezifische Temperatur abgekühlt. Bei dieser Temperatur hybridisieren (*Annealing*) die beiden Oligonukleotide jeweils an einen Strang. Die Länge der Oligonukleotide variiert meist zwischen 20 und 30 Nukleotiden. Bei dem dritten Schritt wird die DNA durch Anwesenheit der freien Desoxyribonukleotidtriphosphate

(dNTPs) synthetisiert (Elongation). Hierbei muss die Lösung auf die optimale Temperatur der DNA-Polymerase gebracht werden. Soweit nicht anders beschrieben, wird die Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) verwendet, deren optimale Reaktionstemperatur 72 °C beträgt. Die Taq-Polymerase besitzt keine 3'-5' Exonukleaseaktivität, weist jedoch eine 5'-3' Polymeraseaktivität auf. Durch Fehlen der Exonuklease findet keine Korrektur falsch eingebauter Nukleotide statt.

PCR mit Plasmid DNA:

Als Matrize wird Plasmid DNA verwendet und mit Hilfe bestimmter Oligonukleotide werden spezifische Amplifikate gebildet.

Matrize	1.0 µl
<i>Sense</i> Oligonukleotid	x µl (~10 pmol)
<i>Antisense</i> Oligonukleotid	x µl (~10 pmol)
dNTP (12.5 mM)	2.0 µl
10x Polymerase Puffer	5.0 µl
Polymerase	1.0 µl
ddH ₂ O	ad 50.0 µl

PCR screening:

Um Klone vor einer Sequenzierung auf das richtige Fragment zu überprüfen wird ein Screening durchgeführt. Als Matrize dient hier eine Zellsuspension in 2YT-Medium.

Matrize	1.0 µl
<i>Sense</i> Oligonukleotid	x µl (~10 pmol)
<i>Antisense</i> Oligonukleotid	x µl (~10 pmol)
dNTP (12.5 mM)	1.0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1.0 µl
10x Polymerase Puffer	2.5 µl
Polymerase	0.5 µl
ddH ₂ O	ad 25.0 µl

Für das *screening* und für die PCR mit Plasmid DNA wird das Standard-Programm (Tab. 2) verwendet.

Hybridisierung-PCR:

Als Matrizen dienen DNA-Stränge mit überlappenden Bereichen, die verknüpft werden sollen. Dazu wird ein spezielles Programm gewählt. Die Daten hierfür sind in Tab. 3 aufgelistet.

Matrize 1	1.0 µl
Matrize 2	1.0 µl
dNTP (12.5 mM)	2.0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2.0 µl
10x Polymerase Puffer	5.0 µl
Polymerase	1.0 µl
ddH ₂ O	ad 48.0 µl

Nach 7 Zyklen wird je 1 µl (~10 pmol) *Sense* Oligonukleotid und 1 µl (~10 pmol) *Antisense* Oligonukleotid hinzugegeben und das Programm fortgesetzt.

AccuPrime™ PCR:

Das AccuPrime™ Kit dient zur Amplifikation der variablen Regionen aus der cDNA, ebenso wie bei der Synthese möglichst komplexer Fragmente.

Matrize	0.1 pg – 20 ng
<i>Sense</i> Oligonukleotid	x µl (~10 pmol)
<i>Antisense</i> Oligonukleotid	x µl (~10 pmol)
AccuPrime™PCR Puffer I (10x)	5.0 µl
Polymerase	1.0 µl
ddH ₂ O	ad 50.0 µl

Für die AccuPrime™ PCR wird das AccuPrime™-Programm (Tab. 4) verwendet.

PCR-Programme:

Die PCR-Reaktionen werden in einem PCR-Sprint Thermoblock Thermocycler (Thermo Electron Cooperation, Dreieich) oder in einem Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt.

Standard:

Tab. 2: PCR-Programm unter Standard-Bedingungen (*abhängig von den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide).

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Primär Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	30 sec	30
Hybridisierung	48-58*	1 min	
Elongation	72	1 min	
terminale Elongation	72	10 min	1

Hybridisierung:

Tab. 3: PCR-Programm unter Hybridisierungs-Bedingungen (*abhängig von den Schmelz-temperaturen der verwendeten Oligonukleotide).

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Primär Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	30 sec	5 - 7
Hybridisierung	50-58*	1 min	
Elongation	72	1 min	
Zugabe der Oligonukleotide			
Denaturierung	94	30 sec	30
Hybridisierung	50-58*	1 min	
Elongation	72	1 min	
terminale Elongation	72	10 min	1

AccuPrime™:**Tab. 4: PCR-Programm unter AccuPrime™-Bedingungen (abhängig von den Schmelz-temperaturen der verwendeten Oligonukleotide).**

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Primär Denaturierung	94	15 sec - 2 min	1
Denaturierung	94	15 - 30 sec	
Hybridisierung	52-64*	1 min	25 - 35
Elongation	68	1 min	
terminale Elongation	68	5 min	1

3.1.2. Sequenzierung: Didesoxymethode nach Sanger

Nach Sanger¹⁰⁴ werden die vier radioaktiv markierten Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und ein 2',3'-Didesoxyanalogon (ddNTP) eines der Nukleosidtriphosphate (NTPs) zu dem Ansatz gegeben. Dieses Analogon blockiert das Wachstum der Kette, da ein 3'-Hydroxylende fehlt und somit keine Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. Jedes Fragment hat nun ein Didesoxyanalogon als endständige Gruppe. Vier verschiedene Sequenzierungsansätze werden elektrophoretisch getrennt und die Basensequenz mittels Autoradiogramm abgelesen.

Eine gute Alternative zur radioaktiven Sequenzbestimmung ist die Fluoreszenz-Detektion. In einem Reaktionsansatz werden vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs verwendet. Der Ansatz wird nach der PCR-Reaktion elektrophoretisch getrennt. Die Banden werden an ihrer Fluoreszenz erkannt und aus der Farbabfolge ergibt sich die Sequenz der Basen.

In diesem Fall wird die Sequenzbestimmung mittels Fluoreszenz durchgeführt und die Lösung nach der PCR in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, 60 µl Ethanol (96%) hinzugegeben und für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 30 µl Ethanol (70%) gewaschen. Der Überstand wird abgenommen, verworfen und das Pellet für 1 h getrocknet.

Das Aufnehmen des DNA-Pellets in eine geeignete Menge Puffer, sowie die Prozessierung der Daten werden im Arbeitskreis Richter am Universitätskrankenhaus Eppendorf (UKE, Hamburg) unter Verwendung des *3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA) und *Sequencing Analysis 5.1.1-Software* (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten werden für Homologievergleiche mit den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* und der Datenbank Ensembl des Sanger Institute und des European Bioinformatics Institute bearbeitet.

Sequenzierungsansatz und Programm:

Big Dye	1.5 µl
Oligonukleotid	x µl (~10 pmol)
Puffer	2.5 µl
DNA	x µl (~ 150-250 µg/ml)
ddH ₂ O	ad 10.0 µl

Tab. 5: PCR-Programm unter Sequenzierungs-Bedingungen (*abhängig von den Schmelz-temperaturen des verwendeten Oligonukleotids).

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96	30 sec	30
Hybridisierung	48 – 65*	15 sec	
Elongation	60	4 min	

3.1.3. Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente trennen und identifizieren zu können wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Mit dieser können Fragmente von bis zu 20.000 bp untersucht werden.

Zur Herstellung des Agarose-Gels werden 500 mg Agarose mit 50 ml 0.5 x TAE-Puffer vermischt und aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C werden 3 µl Ethidiumbromid (c = 100 µg/ml) hinzugegeben und in die Gießkammer, in die vorher ein Beladungskamm eingesetzt wird, gefüllt. Nach ca. 30 min wird das ausgehärtete Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 0.5 x TAE-Puffer überschichtet. Eine Tasche des Gels wird mit einem entsprechenden DNA-Standard und die anderen mit

den jeweiligen Proben, die mit 1/5 Volumen 6x Gelbeladungs-Puffer versetzt werden, befüllt. Es wird anschließend eine Spannung zwischen 130 und 140 V für 30 bis 40 min angelegt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern hierbei durch die Poren des Gels und eine Trennung erfolgt nach der Größe des jeweiligen Moleküls. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und ermöglicht somit Detektion der Fragmente mit Hilfe von UV-Licht.

3.1.4. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA-Fragmente erfolgt mit dem *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas GmbH, St. Leon Rot). Die gewünschte DNA-Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß abgewogen um die Menge an *Binding Buffer* zu bestimmen es werden pro 0.1 g Gelstück 0.1 ml *Binding Buffer* verwendet. Das Reaktionsgefäß wird in ein 50 - 60 °C warmes Wasserbad gestellt um die Agarose aufzulösen. Nach ungefähr 10 min, in dem das Reaktionsgefäß regelmäßig invertiert wird, wird die Lösung auf eine *GeneJET™ purification column* gegeben, dieses wird mit einem 2 ml *Collection Tube* versehen, und zentrifugiert (12000 xg, 1 min, Raumtemperatur), der Durchlauf wird verworfen und die Säule 100 µl *Binding Buffer* gewaschen, anschließend wird noch zweimal mit 700 µl komplettierten *Wash Buffer* (12000 xg, 1 min, Raumtemperatur), hierbei wird der Puffer je 2 – 3 min auf der Säule inkubiert, gewaschen (12000 xg, 1 min, Raumtemperatur), die Durchläufe werden verworfen. Die *GeneJET™ purification column* wird durch ein einminütiges zentrifugieren (12000 xg, 1 min, Raumtemperatur) getrocknet. Es werden 30 µl *Elution Buffer* auf die Säule gegeben, dieses wird mit einem neuen 1.5 ml Reaktionsgefäß versehen, und ca. 2 – 3 min inkubiert und anschließend wird die Säule zentrifugiert (12000 xg, 1 min, Raumtemperatur). Der Elutionsschritt wird mit weiteren 30 µl *Elution Buffer* wiederholt.

3.1.5. Restriktionsanalyse

Beim Schneiden (Verdau) von Plasmid DNA erkennen Restriktionsendonukleasen bestimmte Basensequenzen an den beiden Strängen der Doppelhelix und schneiden sie an diesen spezifischen Stellen.

Wenn das Plasmid an mehr als einer Stelle geschnitten werden soll und die Restriktionsenzyme unterschiedliche Reaktionsbedingungen haben, wird der Reaktionsansatz zwischen den Restriktionsanalysen mittels Alkoholpräzipitation gereinigt. Soweit nicht anders erwähnt, wird der jeweilige Verdau tagsüber durchgeführt.

Verdau:

	Plasmid DNA	PCR Produkt
DNA	x µl (bis 1 µg)	17 µl
10x Puffer	2.0 µl	2.0 µl
Restriktionsenzym	1 µl	1 µl
ddH ₂ O	ad 20.0 µl	ad 20.0 µl

3.1.6. Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren

Da Vektoren religieren können, müssen diese vor der Ligation noch dephosphoryliert werden. Mit Hilfe der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) werden die terminalen Phosphatgruppen des Vektors abgespalten. Hierfür wird der Vektor mit 1 µl FAP und ca. 3 µl 10x Pufferlösung versetzt und bei 37 °C 30 min inkubiert. Das Enzym wird durch Hitze (20 min, 65 °C) inaktiviert.

3.1.7. Ligation

In einem geschnittenen Vektor wird ein DNA-Fragment durch Basenpaarung angelagert und durch eine DNA-Ligase die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen Fragment und Vektor katalysiert. Dazu wird je eine freie Phosphatgruppe am 5'-Ende und eine freie OH-Gruppe am 3'-Ende benötigt. Üblicherweise wird ca. die dreifache Menge an DNA-Fragment für einen einfachen Teil Vektor-DNA verwendet.

Die Ligation findet soweit nicht anders erwähnt bei 16 °C über Nacht statt.

Ligationsansatz:

DNA-Vektor	x µl
DNA-Fragment	X µl
10x T4-DNA-Ligasepuffer	2.0 µl
T4-DNA-Ligase	1.0 µl
ddH ₂ O	ad 20.0 µl

3.1.8. Isolierung von DNA aus Lösungen

DNA kann durch Reinigung aus wässrigen Lösungen isoliert werden. Als Erstes wird eine Tris-gesättigte Phenol-Lösung 1:1 mit Chloroform vermischt und gevortext. Diese Suspension wird 2 min bei 20800 xg zentrifugiert. Die Phasen werden getrennt und die DNA-Lösung mit der gleichen Menge der organischen Phase vermennt und gut gevortext. Dieses Gemisch wird ebenfalls 2 min bei 20.800 xg zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wird von der Phenol-Chloroform-Phase getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.1.9. Alkoholpräzipitation

Die DNA kann mittels Alkoholpräzipitation ebenfalls aus Lösungen gewonnen werden. Zu der Lösung werden 3M Natriumacetatlösung (10% der Probenmenge) und die 3fache Menge an Ethanol (96%) gegeben, 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μl ddH₂O aufgenommen.

3.1.10. Herstellung kompetenter *E. coli*

3.1.10.1. für Elektroporationen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für Elektroporationen wird eine 3 ml 2YT-Kultur mit *E. coli* Zellen inokuliert und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 220 rpm über Nacht geschüttelt. Diese werden genutzt um 50 ml 2YT-Medium bei einer OD₆₀₀ 0.1 anzuimpfen und bei Raumtemperatur und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.4 kultiviert.

Danach werden die Zellen 20 min auf Eis gestellt und in ein vorgekühltes 50 ml PP-Röhrchen überführt. Diese wird 15 min bei $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3000 xg zentrifugiert, die Überstände verworfen und mit 50 ml eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendiert. Die Zellen inkubieren 30 min auf Eis um anschließend 15 min bei $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3000 xg zu zentrifugieren. Die Zellen werden dann noch zweimal mit 50 ml ddH₂O und unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen zweimal gewaschen. Die Zellsedimente werden in 250 μl eiskaltem ddH₂O bzw. um es bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern in 250 μl eiskalter 10%iger Glycerol-Lösung aufgenommen. Die Zellen, die eingefroren werden, werden aliquotiert, schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, die anderen werden zur sofortigen Verwendung auf Eis aufbewahrt.

3.1.10.2. für Hitzeschocktransformationen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Hitzeschocktransformation werden 3 ml 2YT-Medium mit dem entsprechenden Zellstamm geimpft und bis zu einer leichten Trübung kultiviert.

200 ml 2YT-Medium werden mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.8 geschüttelt. Anschließend werden sie 10 min auf Eis gestellt und in 50 ml PP-Röhrchen überführt. Diese werden 10 min bei 1 °C und einer Geschwindigkeit von 2500 xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2.500 xg 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut verworfen wird, werden die Zellen in 20 ml TB-Puffer, der mit DMSO zu einer finalen Konzentration von 7% versetzt wird, aufgenommen. Die Zellen werden nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis in 100 µl Aliquots aufgeteilt, entweder zur sofortigen Verwendung auf Eis gelagert oder schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.11. Transformation

3.1.11.1. Transformation mittels Elektroporation

Für die Transformation mit größeren Plasmiden ist die Elektroporation besser geeignet als die Hitzeschockmethode, da sie eine höhere Transformationseffizienz aufweist¹⁰⁵.

Es werden 1 µl Ligationsansatz mit 50 µl elektro-kompetenten *E. coli* Zellen versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand (VWR, Darmstadt) gegeben und durch einen kurzen elektrischen Impuls aktiviert (Easyject+, Equibio). Bei einer Impulszeit von 5 ms beträgt die Spannung 2500 V und der Widerstand 201 Ω. Anschließend werden 900 µl auf 37 °C vorgewärmtes 2YT-Medium hinzugegeben und in ein Rundbodenröhrchen überführt. Die Zellen werden 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wird die Probe 5 min bei 720 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl 2YT-Medium resuspendiert.

Der Ansatz wird auf einer TYE-Platte, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen wurde, ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank (37 °C) inkubiert.

3.1.11.2. Transformation mittels Hitzeschockmethode

Bei der chemischen Transformation nach Chung¹⁰⁶, werden Bakterien mit λ -Bakteriophagen und eiskalter CaCl_2 -Lösung versetzt und anschließend kurzzeitig erhitzt¹⁰⁷.

Die chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen werden auf Eis aufgetaut und 50 μl in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit 10 μl Ligationsansatz vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wird das Reaktionsgefäß 60 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gestellt und anschließend sofort auf Eis gelagert. Dort werden 450 μl 2YT-Medium hinzugeben und bei 220 rpm 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Probe 5 min bei 720 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 μl 2YT-Medium resuspendiert.

Der Ansatz wird auf einer TYE-Platte, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen wurde, ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank (37 °C) inkubiert.

3.1.12. Lagerung von *E. coli* Zellen

Um die *E. coli* Zellen länger lagern zu können wird 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 μl Glycerol (87%) versetzt. Dieses wird anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.13. Plasmid-DNA-Extraktion

3.1.13.1. Extraktion durch alkalische Lyse

Die Isolierung von Plasmid DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt¹⁰⁸.

3 ml 2YT-Medium, versetzt mit der entsprechenden Menge Antibiotikum, werden mit einer plasmidtragenden *E. coli*-Kolonie inokuliert. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die gewachsene Kultur wird in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5000 xg, 5 min, 25 °C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 μl Lösung I sorgfältig resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μl frisch angesetzter Lösung II zur Lyse der Bakterien wird das Reaktionsgefäß mehrmals

invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgt zur Proteinpräzipitation die Zugabe von 150 µl Lösung III sowie mehrmalige Inversion und Inkubation auf Eis für 5 min. Nach einer Zentrifugation (20800 xg, 10 min, 25 °C) wird der Überstand abgenommen und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wird eine äquivalente Menge an 2-Propanol zupipettiert. Einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis folgt ein Zentrifugationsschritt (20800 xg, 15 min, 4 °C). Der Überstand wird verworfen, das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und in der gewünschten Menge ddH₂O aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid DNA erfolgte bei -20 °C.

3.1.13.2. Extraktion aus kommerziellen Kits

Die Reinigung der DNA wird nach dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* Isolierungsprotokoll der Firma Fermentas GmbH (St. Leon Rot) durchgeführt.

Eine 10 ml 2YT-Kultur wird mit den Klonen inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wird die Lösung in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen.

Das Pellet wird mit 250 µl *Resuspension Solution*/RNase A resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 250 µl *Lysis Solution* hinzu pipettiert, vermischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dieser Lösung werden 350 µl *Neutralization Solution* gegeben und für 7 min bei 12000 xg zentrifugiert. Nun wird das Lysat mit Hilfe einer *GeneJET™ Spin Columns* gefiltert (12000 xg, 1 min, 25 °C), wobei die DNA an die Säulenmatrix bindet. Die Lösung wird verworfen und die Säule wird zweimal mit 500 µl *Wash Solution* (12000 xg, 1 min, 25 °C) gewaschen und anschließend durch einminütiges zentrifugieren bei Maximalgeschwindigkeit getrocknet. Die DNA wird abschließend zweimal mit 30 µl *Elution Buffer* von der Matrix eluiert.

3.1.14. Isolierung von mRNA aus der Milz

Die Isolation der mRNA aus der Milz wird mittels *peqGOLD TriFast™ Kit* (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Hierfür werden 50 – 100 mg des Gewebes mit 1 ml *Trifast™* versetzt und anschließend homogenisiert. Nach einer 5 min Inkubation bei RT, die die Dissoziation von Nuklein-Protein-Komplexen unterstützt, werden 0.2 ml Chloroform hinzu gegeben, 15 s lang invertiert und anschließend 3 - 10 min bei RT inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei RT von 5 min bei 12.000 xg, hierbei trennen sich die organische Phase, die Inter-Phase und die wässrige Phase. Die Phenol-Chloroform Phase und die Inter-Phase beinhaltet die genomische DNA. Die gesamte mRNA befindet sich in der wässrigen Phase. Diese Phase wird in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, 0.5 ml Isopropanol hinzu gegeben und 5 - 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (12000 xg, 10 min, 4 °C). Das Pellet wird anschließend zweimal mit 75 %igen Ethanol gewaschen (7500 xg, 8 min, 4 °C) und getrocknet. Das Pellet wird in 50 µl ddH₂O aufgenommen und mit 1 µl RNase Inhibitor versetzt.

3.1.15. cDNA-Synthese

Reverse Transkriptase, ein Enzym aus Retroviren und RNA-Tumoviren, wird verwendet, um komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) bei Vorgabe von Ansatzpunkten mit mRNA als Matrize zu synthetisieren. Bei der *SuperScript III* Reversen Transkriptase handelt es sich um eine Version der Reversen Transkriptase des Moloney-murinen-Leukämie-Virus (M-MuLV RT) mit erhöhter Thermostabilität. Es entsteht ein RNA-DNA-Hybrid, das für weitere Anwendungen wie einer Polymerase-Kettenreaktion zugänglich ist. 5 µg Gesamt-RNA wurden mit 50 µM Oligo-(dT)-Oligonukleotid oder genspezifisch mit 1 – 5 pmol Oligonukleotid und 1 µl dNTP (12.5 mM) versetzt und mit DEPC-behandeltem ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 65 °C und sofort danach eine Lagerung auf Eis für 1 min. 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 4 µl MgCl₂-Lösung (25 mM), 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl *SuperScript III* wurden hinzugefügt und für 60 min bei 50 – 55 °C inkubiert.

Durch Erhitzen für 5 min auf 85 °C wurde die Reaktion gestoppt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.1.16. Bibliotheksklonierung

Die Darstellung der avianen insektengift-spezifischen Bibliotheken erfolgt hinsichtlich der Isolierung der peripheren Lymphozyten, der mRNA, cDNA-Synthese etc. nach etablierten Methoden. Ausgehend von der genspezifisch umgeschriebenen cDNA erfolgt die PCR unter Verwendung der *AccuPrime Taq*-Polymerase. Die so entstandenen v_H - und v_L -Fragmente dienten als Primäramplifikat der unterschiedlichen Klonierungen.

3.1.16.1. Klonierung mittels StarGate® combinatorial cloning system

Die *StarGate*® Technologie der Firma IBA (IBA GmbH, Göttingen) ermöglicht ein einfaches und schnelles Klonieren von mehreren Gen-Sequenzen, so genannten GOI (*gene of interest*), in Donor-Vektoren und anschließend fusionieren in einen so genannten Donor-Fusionsvektor. Dieser dient als Ausgangsvektor zur Klonierung in verschiedene Akzeptorvektoren was das schnelle Klonieren in unterschiedliche Expressionsvektoren z.B. für Insektenzellen, Mammalia oder aber auch zur Expression von unterschiedlichen *E. coli*-Konstrukten erleichtert.

Die *StarGate*® Technologie nutzt für die einfache Klonierung unterschiedliche Restriktionsenzyme des Types 2S, diese schneiden die DNA eine bestimmte Nukleotidanzahl nach den Erkennungssequenzen. Da diese Nukleotide nicht vorgegeben sind können dadurch spezifische Überhänge entstehen, die eine gerichtete Ligation in die einzelnen Vektoren ermöglichen. Ebenso wird durch ein Wechsel der Antibiotikum-Resistenzen gewährleistet, dass nur die *E. coli* Kolonien überleben, die den richtigen Vektor tragen. Die Vektorkarten der verwendeten Vektoren sind im Anhang aufgeführt.

Amplifikation und Anfügen der Restriktionserkennungssequenzen:

Zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten Kette und der schweren Kette müssen zunächst die Zyklenzahl der PCR und die einzusetzende DNA Menge analysiert werden, da durch geringere Zyklen die Diversität der variablen Regionen erhalten bleibt. Es werden ebenfalls je 5 µl der Primäramplifikate der variablen Regionen der leichten und der schweren Kette eingesetzt und durch eine PCR mit 10 Zyklen die Restriktionsenzymerkennungssequenzen angefügt. Die so entstandenen Amplifikate werden über ein 1%iges Agarosegel gelelektrophoretisch getrennt, die Bande in der richtigen Größe ausgeschnitten und mittels des *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) gereinigt.

Donor Reaktion:

Zur Klonierung der variablen Region der schweren Kette, die sich abschließend in der 5' Region des Akzeptorvektors befinden soll wird der *upstream* Vektor pNFUSE-IBA-LINK2 verwendet, die leichte Kette befindet sich im endgültigen Konstrukt *downstream*, hierfür wird der Vektor pCFUSE-IBA1 verwendet.

Donorvektor pNFUSE/pCFUSE	10 µl
v _H oder v _L Fragment (2 ng/µl)	12 µl
StarSolution F1	1.0 µl
StarSolution F2	1.0 µl
StarSolution F3	1.0 µl

Zu dem Fusionsvektor pNFUSE-IBA-LINK2 wird das gereinigte PCR Produkt der v_H bzw. zu dem Fusionsvektor pCFUSE-IBA1 wird das gereinigte PCR Produkt der v_L gegeben und die Reaktionen werden mit den StarSolution F1, F2 und F3 versehen, diese beinhalten neben einem geeigneten Puffer ebenfalls die Ligase und das entsprechende Restriktionsenzym. Die Reaktion wird 1 h bei 30 °C inkubiert anschließend wird das Produkt bei 4 °C über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag werden die kompetenten *E. coli* Zellen z.B. TB1 oder XL1blue, die ein blau-weiss-*screening* ermöglichen, mit den Ligationen transformiert und auf TYE-Amp-IPTG-X-Gal-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Fusionsreaktion:

Nachdem erfolgreich die schwere und die leichte Kette in die jeweiligen Vektoren inseriert wurden, werden die beiden variablen Regionen zu einem scFv fusioniert. Dies geschieht mit Hilfe des Vektors pENTRY-IBA20.

Fusionvektor	10 µl
pNFUSE/pCFUSE (2 ng/µl)	12 µl
StarSolution F4	1.0 µl
StarSolution F5	1.0 µl
StarSolution F6	1.0 µl

Zu dem Fusionsvektor pENTRY-IBA20 werden die gereinigten Vektoren pNFUSE-IBA-_{VH}-LINK2 und pCFUSE-IBA1-_{VL} gegeben und die Reaktion wird mit den StarSolution F4, F5 und F6 versehen, diese beinhalten neben einem geeigneten Puffer ebenfalls die Ligase und das entsprechende Restriktionsenzym. Die Reaktion wird 1 h bei 30 °C inkubiert anschließend wird das Produkt bei 4 °C über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag werden die kompetenten *E. coli* Zellen z.B. TB1 oder XL1blue, die ein blau-weiss-*screening* ermöglichen, mit den Ligationen transformiert und auf TYE-Kan-IPTG-X-Gal-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Transferreaktion:

Nachdem erfolgreich die schwere und die leichte Kette zu einem scFv fusioniert wurden, mussten diese in den Akzeptorvektor pASG-IBA102-p3 transferiert werden. Dieser Vektor ermöglicht durch das GenIII die Darstellung einer Phagenbibliothek.

Akzeptorvektor	10 µl
pENTRY-IBA20-scFv (2 ng/µl)	12 µl
StarSolution A1	1.0 µl
StarSolution A2	1.0 µl
StarSolution A3	1.0 µl

Zu dem Akzeptorvektor pASG-IBA102-p3 wird der gereinigte Vektor pENTRY-IBA20-scFv gegeben und die Reaktion wird mit den StarSolution A1, A2 und A3 versehen, diese beinhalten neben einem geeigneten Puffer ebenfalls die Ligase und das entsprechende Restriktionsenzym. Die Reaktion wird 1 h bei 30 °C inkubiert anschließend wird das Produkt bei 4 °C über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag werden die kompetenten *E. coli* Zellen z.B. *XL1blue*, die ein blau-weiss-*screening* ermöglichen, mit den Ligationen transformiert und auf TYE-Amp-IPTG-X-Gal-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.16.2. Klonierung mittels Gateway™ Technologie

Ausgehend vom Ligationsprodukt der Fusionsreaktion der StarGate® Technologie erfolgt die Amplifikation und das Anfügen der *attB sites* mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide. Hierzu wird die DNA mit ihren terminalen Oligonukleotiden amplifiziert. Die so erhaltene DNA wird nach der Auftrennung über ein Agarose-Gel mittels des *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) gereinigt, und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Alkoholpräzipitation konzentriert.

Ortsspezifische Rekombination mittels Gateway™ Technologie

Die *Gateway™* Technologie nutzt das Lambda Rekombinationssystem, welches die Integration des Phagengenoms in das *E. coli*-Chromosom und den Wechsel zwischen lytischem und lysogenem Weg erlaubt, um den Transfer heterologer DNA, welche von

attachment sites flankiert ist, zwischen unterschiedlichen Vektorsystemen zu erlauben¹⁰⁹,¹¹⁰. Für die BP-Reaktion wird zunächst das Ziel-Gen mit Oligonukleotiden amplifiziert, die *attB1* bzw. *attB2 sites* einführen. Das Amplifikat mittels des *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) gereinigt.

BP Reaktion:

PCR-Produkt mit <i>attB1/attB2 sites</i>	x µl (100 fmol)
pDONR	x µl (100 fmol entspricht 150 ng)
10x Puffer	4 µl
BP Clonase Enzym Mix	4 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Der BP-Rekombinationsansatz wird für 1 h bei 25° C (für maximale Effizienz über Nacht) inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation für 10 min bei 37° C werden die Enzyme des BP Clonase Enzym Mixes verdaut und 2 µl des Reaktionsansatzes werden für die Transformation eines *E. coli* F-Zellstamms wie TB1, TOP10 oder DH5α eingesetzt.

LR Reaktion:

pENTR	x µl (100 fmol)
pHenDEST	x µl (100 fmol entspricht 300 ng)
10x Puffer	4 µl
BP Clonase Enzym Mix	4 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Der LR-Rekombinationsansatz wird für 1 h bei 25° C (für maximale Effizienz über Nacht) inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation für 10 min bei 37° C werden die Enzyme des LR Clonase Enzym Mixes verdaut und 2 µl des Reaktionsansatzes für eine Transformation eines *E. coli* F-Zellstamms eingesetzt. Für eine Phagenselektion der gewonnenen Expressions-Klone muss die Plasmid DNA isoliert und anschließend *E. coli* TG1 transformiert werden.

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1. Affinitätschromatographische Reinigung

3.2.1.1. IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography)

Immobilized metal ion affinity chromatography ist eine Methode zur Reinigung von rekombinanten Proteinen, die mit einem Polyhistidin-*tag* versehen sind.

Die Ni-NTA-Matrix wird mit den Überständen der Zellkultur beladen und über Nacht auf einem Rollbrett inkubiert. Die Matrix wird einmal mit 30 ml PBS und hinterher mit 10 ml PBS, welches mit 20 mM Imidazol versetzt wird, gewaschen. Mit einem Gradienten zwischen 100 – 300 mM Imidazol wird der Antikörper in 10 Fraktionen je 1 ml von der Säule eluiert. Die Fraktionen werden mittels SDS-PAGE und Blot überprüft. Durch Waschen mit 2 ml 1 M NaOH, 20 ml H₂O und 20 ml PBS wird die Säule regeneriert und bei 4 °C in 20 % Ethanol gelagert.

3.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Trennung von Proteinen gehört zu den effektivsten Trennmethoden. Bei der SDS-PAGE bewirkt die Vorbehandlung der Proteine, dass nur die Masse bei der Wanderung durch das elektrische Feld von Bedeutung ist. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), einem starken Detergens, das fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört, wird negative Ladung auf das Protein übertragen und maskiert dessen eigene Ladung. Demzufolge weisen SDS-beladene Proteine beinahe identische Ladung-Masse-Verhältnisse bei völliger Entfaltung der Sekundär- und Tertiärstrukturen auf. Dies bedeutet, dass die Proteine aufgrund der Siebeffekte in der Reihenfolge ihrer molaren Massen getrennt werden. Kleinere Proteine wandern schneller, während große nahe der Auftragsstelle zu finden sind. Die Mobilität der Proteine folgt einer logarithmischen Funktion ihrer Molekulargewichte. Die Schärfe der Banden ist bei der Gelelektrophorese durch das Probenvolumen begrenzt.

Eine Optimierung des Systems wird durch die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli¹¹¹ erreicht. Sie erzeugt schärfere Banden, benötigt aber

zwei Gelsysteme und verschiedene Pufferlösungen. Die pH-Differenz zwischen Trenngel bzw. Tankpuffer und Sammelgel um zwei Einheiten hat beim Eintritt der Proteine in das Trenngel eine Fokussierung der Proteine auf eine scharfe Bande zur Folge. Die Zusammensetzung der Gele Tris-Glycin ist in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: Zusammensetzung der Tris-Glycin Trenngele (je 5 Gele, links) und der 3%igen Sammelgele (je 5 Gele, rechts).

Edukte	7.5%iges Gel	Edukte	Sammelgel
Acrylamid (30 %ig)	7.5 ml	Acrylamid (30 %ig)	1.5 ml
Trenngelpuffer (4x)	7.5 ml	Sammelgelpuffer (4x)	3.75 ml
dH ₂ O	15 ml	dH ₂ O	9.6 ml
10 % APS	150 µl	10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

Zuerst wird das Trenngel in einer Größe von 9 x 6 cm in einem Multi-Cast-Gießstand Modell SE1200 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg), gegossen. Es wird, um eine ebene Gelkante zu erhalten, mit 150 µl 2-Propanol überschichtet und eine Stunde zur Polymerisierung bei Raumtemperatur inkubiert. Der Alkohol wird anschließend abgegossen und das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet. In diese wird zur Erzeugung der Probenaschen ein Teflonkamm gesteckt. Nach dem Auspolymerisieren wird der Kamm entfernt und das Gel mit deionisiertem Wasser gewaschen, um nicht-polymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Die zu analysierenden Proteinproben werden mit einem Äquivalent an Probenpuffer (4x) versetzt und vor dem Auftragen ca. 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken kann dem Probenpuffer Dithiothreitol zugesetzt werden. Die Elektrophorese erfolgt bei 130-160 V unter Wasserkühlung in einer mit Tankpuffer gefüllten Mini-Gel-Elektrophoresekammer Modell SE250 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Zur Molekulargewichtbestimmung der aufgetragenen Proteine wird ein Größenstandard aufgetragen.

3.2.3. Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Um die Banden sichtbar zu machen, kann das Trenngel der SDS-Page in eine Coomassie-Färbelösung gelegt und für 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert werden. Anschließend wird das Gel bis zum Auftreten einer deutlichen Färbung der Banden in die Entfärb-Lösung gegeben und in H₂O aufbewahrt.

3.2.4. Western-Blot

Die Proteine werden aus dem SDS-Gel durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran transferiert. Diese Membran hat eine hohe Peptidbindungskapazität. Der Transfer wird mittels Semidry Blot Methode durchgeführt. Anschließend wird der Transfer mittels *Immunprinting* nachgewiesen.

Semidry Blot:

Es wird ein luftblasenfreies Sandwich aus drei bis vier Lagen Filterpapier, das zuvor in Transferpuffer getränkt wird, der Membran, dem SDS-Gel und wieder drei bis vier Lagen Filterpapier gebildet. Dieses Sandwich wird auf die untere Elektrode der Blot-Einheit gelegt, mit der zweiten Elektrode und dem Deckel wird die Apparatur geschlossen. Anschließend wird eine konstante Stromstärke angelegt, wobei die Dauer (zwischen 45 und 90 min) der Elektrophorese von der Größe der zu transferierenden Proteine abhängig ist.

3.3. Immunologische Methoden

3.3.1. Immunprinting von Proteinen

Nachdem die Proteine vom SDS-Gel mittels Semidry- oder Nass-Blot Methode auf die Nitrocellulose-Membran übertragen wurden, wird die Membran für mindestens 30 min in 4% MPBS bei Raumtemperatur blockiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht in 2 % MPBS mit Antikörper überschichtet und bei 4 °C geschüttelt.

Am nächsten Tag wird die Membran ebenfalls je dreimal 5 min mit TPBS und PBS inkubiert und anschließend für 60 min mit einem Antikörper, der mit AP konjugiert ist, inkubiert. Die Membran wird je dreimal 5 min mit TPBS und PBS gewaschen und anschließend kurz mit TBS, pH 9.5 äquilibriert. Detektiert wird mit einer Lösung bestehend aus 1.25 ml NBT, 125 µl BCIP und 11.25 ml AP-Detektionspuffer. Die Entwicklung des Blots findet unter Lichtausschluss bis zu einer deutlichen Färbung statt. Abschließend wird die Membran mit Wasser gewaschen und getrocknet.

3.3.2. ELISA

Die ELISA Analyse dient zur Messung der Affinitäten von Antikörpern. Alle ELISA-Platten wurden bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (GENIOS Multi-Detektions Reader, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim) vermessen.

3.3.2.1. ELISA Analyse

Es wird eine Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit 50 µl (~50 µg/ml) Target pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden diese für mindestens 1 h mit 3% BSA-PBS, DMEM oder 4% MPBS blockiert. Die Mikrotiterplatte wird mit PBS gewaschen und mit dem ersten Antikörper 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ELISA-Platte wird je dreimal mit kaltem TPBS und kaltem PBS gewaschen, anschließend wird das Antikörper-Konjugat auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach maximal 1 h Inkubationszeit wird die Mikrotiterplatte erneut dreimal mit TPBS und PBS gewaschen. Abhängig vom gelabelten Antikörper wird entweder die AP-Detektionslösung oder die HRP-Detektionslösung verwendet und im Photometer vermessen.

3.3.2.2. AviQuant ELISA Analyse

Es wird eine Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit 50 µl (~50 µg/ml) AviQuant (Patent: EP 05022582.0, "*Chimera of human IgE receptor alpha chain and constant immunoglobulin domains for the determination of serum IgE*") oder dem

Antikörper-Konstrukt pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden diese für mindestens 1 h mit 10% FKS haltigem DMEM oder 4% MPBS blockiert. Die Mikrotiterplatte wird mit PBS gewaschen und mit AviQuant oder dem Antikörper-Konstrukt 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ELISA-Platte wird je dreimal mit kaltem TPBS und kaltem PBS gewaschen, anschließend wird das sekundäre Antikörper-Konjugat auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach maximal 1 h Inkubationszeit wird die Mikrotiterplatte erneut dreimal mit TPBS und PBS gewaschen. Die Detektion erfolgt mit einer AP-Detektionslösung oder die HRP-Detektionslösung verwendet und im Photometer vermessen.

3.3.2.3. ELISA Analyse zur Quantifizierung der Antikörper-Konzentration

Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe des *human IgE ELISA quantitation kit* der Firma Bethyl laboratories Inc. (Montgomery, USA). Es wird eine Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit 50 µl (~50 µg/ml) Fänger-Antikörper (A80-108A) pro Vertiefung für 1 h bei Raumtemperatur belegt. Die Mikrotiterplatte wird anschließend dreimal mit der Waschlösung gewaschen und mit 3% BSA-Blockierlösung blockiert. Nach einer 30 min wird dreimal mit der Waschlösung gewaschen und mit 100 µl der Standard-Lösungen bzw. den zu analysierenden Antikörper-Konstrukten in geeigneten Verdünnungen für 1 h inkubiert. Anschließend wird fünfmal mit der Waschlösung gewaschen und mit 100 µl des sekundären Anti-human-IgE-HRP-Konjugats (A80-108P) (~1 ng/ml) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ELISA-Platte wird je fünfmal mit der Waschlösung gewaschen und die Detektion erfolgt mit der HRP-spezifischen Detektionslösung und wird über mehrere Zyklen im Photometer vermessen.

3.4. Phage Display Technologie

Die *Phage Display* Technik ist eine in vitro Methode zur Selektion von Antikörper-Fragmenten. Die Fragmente werden auf der Oberfläche filamentöser Phagen präsentiert⁴³⁴⁴.

3.4.1. Darstellung der M13K07- und der pKM13-Helferphagen

Es werden zwei Arten von Helferphagen verwendet: Zum einen die M13K07-Helferphagen, diese können sowohl basisch mit Hilfe eines pH-*shift* als auch kompetitiv eluiert werden, zum anderen kommen die Helferphagen pKM13 zum Einsatz, die eine Trypsinspaltstelle besitzen und somit tryptisch eluiert werden können. Logarithmisch wachsende TG1-Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert und 500 µl hiervon zu einer auf 42 °C temperierten Soft-Agar-Lösung gegeben, durchmischt und auf eine vortemperierte 1YT-Platte, die schon mit 50 µl der jeweiligen Helferphagen behandelt worden ist, ausgestrichen. Um sicherzustellen, dass die Zellen sich gleichmäßig auf der Platte verteilen, wird diese unmittelbar nach der Zugabe geschwenkt. Nachdem die Soft-Agar-Lösung ausgehärtet ist wird die Platte für 16 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden 200 ml 2YT-Kan-Medium mit Bereichen gut ausgebildeter Plaques inokuliert und für maximal 14 h bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Nach Zentrifugation (2800 xg, 30 min, 4 °C) wird der Überstand in ein neues 50 ml PP-Röhrchen überführt und die Phagen mit 1/6 Volumenanteil PEG/NaCl in einem Zeitraum von 2 h gefällt und zentrifugiert (2.800 xg, 30 min, 4 °C). Das Pellet wird in 2 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (10000 xg, 20 min, 4 °C). Dadurch wird der phagenhaltige Überstand von zellulären Restbestandteilen befreit, anschließend mit Glycerol versetzt (Endkonzentration der phagenhaltigen Lösung betrug 15-30 %), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Abschließend wird der Titer der Stocklösungen bestimmt.

3.4.2. Titerbestimmung der M13K07- und der pKM13-Helferphagen

Um die genaue MOI (*multiplicity of infection*) der Helferphagen M13K07 und pKM13 bestimmen zu können, muss der Titer der Stocklösung der Helferphagen bekannt sein. Dafür wird eine Kultur des Supressorstammes TG1 angesetzt und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ 0.5 kultiviert. Hiervon werden 200 µl mit je 200 µl einer geeigneten Verdünnung der Helferphagen in 2YT-Medium für 30 min bei 37 °C inkubiert. Davon werden 100 µl auf TYE-Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die geeigneten Verdünnungen liegen üblicherweise zwischen 10⁻⁶ und 10⁻¹². Am nächsten Tag werden die Klone ausgezählt und der Titer ermittelt. Der Titer liegt normalerweise zwischen 10¹² und 10¹³ cfu/ml (*colony forming units*).

3.4.3. Wachstum und Replikation von Bibliotheken

Zur Darstellung von Bibliotheken aus der entsprechenden Stock-Kultur wird ein Aliquot langsam auf Eis aufgetaut und komplett zur Inokulation von 500 ml 2YT-Amp-Glu-Medium eingesetzt. Die Zellen werden bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert. Es werden 50 ml abgenommen und mit einer MOI=20 mit M13K07-Helferphagen zur Darstellung von rekombinanten Phagen versetzt und zur Infektion bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Zellen sedimentiert (2500 xg, 10 min, 4°C) und in 500 ml 2YT-Amp-Kan-Medium resuspendiert. Die Sekretion der Phagen erfolgt über Nacht für einen Zeitraum von maximal 16 Stunden bei 30°C und 220 rpm. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (2500 xg, 10 min, 4°C) wird der Überstand in ein steriles Gefäß überführt, mit 100 ml PEG/NaCl-Lösung versetzt und für mindestens 3 Stunden auf Eis gefällt. Nach Ablauf dieser Fällung wird der Ansatz erneut zentrifugiert (2.500 xg, 30 min, 4°C), der Überstand verworfen, das Phagensediment in 40 ml PBS resuspendiert und erneut für 90 Minuten mit 1/6 Volumenteil PEG/NaCl-Lösung auf Eis präzipitiert. Es wird ein weiteres Mal zentrifugiert (2500 xg, 30 min, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und zelluläre Restbestandteile sedimentiert (10000 xg, 10 min, 4°C). Der phagenhaltige Überstand wird in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und der Titer der Phagensuspension bestimmt.

Für die Replikation der Bibliotheken wird die 500 ml 2YT-Amp-Glu-Kultur nach Entnahme der 50 ml zur Darstellung von rekombinanten Phagen über einen weiteren Zeitraum von 3 Stunden bei 37°C und 220 rpm kultiviert und anschließend zentrifugiert (2500 xg, 30 min, 4°C). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 2YT-Medium aufgenommen, bis zu einer finalen Konzentration von 15-30% mit Glycerol (87%) supplementiert, zu je 1 ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.4.4. Selektion

Panning wird die Anreicherung antigen-spezifischer Phagen genannt. Dieses ist wichtig für die Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus einer bestimmten Bibliothek.

Die Selektion wird auf der Polystyroloberfläche eines Immunoröhrchens durchgeführt. Das Röhrchen wird mit rekombinanten Allergen bzw. Wespengift, gelöst in 2 ml PBS, über Nacht bei 4 °C auf einem Rollbrett beschichtet. Dieses wird dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 3%BSA-Lösung 2 h bei Raumtemperatur blockiert und hinterher einmal mit PBS gewaschen. Die Phagen-Lösung (10^{12} bis 10^{13} cfu/ml), die anschließend in das Immunoröhrchen überführt wird, wird zuvor für 30 min mit 4 ml 3%iger BSA-Lösung vorinkubiert, um die BSA-bindenden Phagen zu inhibieren. Nach 30 min auf einem Rollbrett wird das Röhrchen 1 ½ h inkubiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Röhrchen wird in der ersten Runde je 20 mal und in den weiteren Runden je 40 mal mit TPBS und PBS gewaschen, um alle unspezifisch bindenden Phagen zu entfernen. Die Elution erfolgt in der ersten Runde mit 1 ml 100 mM Triethylamin, das nach 8 min auf dem Rollbrett mit 500 µl 1 M Tris-HCl, pH 7.5, vorgelegt in einem 2 ml Reaktionsgefäß, neutralisiert wird. Das Immunoröhrchen wird mit 250 µl 1 M Tris-HCl, pH 7.5 nachgespült. In den folgenden Runden die pKM13 Helferphagen verwendet, diese werden tryptisch eluiert.

3.4.5. Reinfektion

Um die selektierten Phagen erneut in den zellulären Wirtsorganismus einzubringen, werden 10 ml TG1-Zellen (OD_{600} 0.5) mit dem Phagen-Eluat infiziert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Von der Zell-Lösung werden 100 µl für eine Titerbestimmung abgenommen und der Rest zentrifugiert (1900 xg, 10 min, 4 °C). Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 1 ml 2YT-Medium resuspendiert und auf zwei großen TYE-Amp-Glu-Platten ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht in einem 30 °C Brutschrank inkubiert.

3.4.6. Titerbestimmung der Selektion

Eine 3 ml TG1-Kultur wird bis zu einer OD_{600} 0.5 kultiviert. 200 µl Zellen werden mit 200 µl der entsprechenden Phagenverdünnung vermischt und eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. 100 µl werden davon auf TYE-Amp-Glu-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag werden die Klone ausgezählt.

3.4.7. Amplifikation selektierter Phagen

Die großen TYE-Amp-Glu-Platten repräsentieren die resultierende Subbibliothek der jeweiligen Runde, die eine deutliche Anreicherung spezifischer Klone aufweisen soll. Auf eine der Platten werden 4 ml 2YT-Medium gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst. Diese Suspension wird auf die zweite Platte gegeben und dort die gleiche Prozedur vollzogen. Die Zellen inkubieren anschließend 10 - 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollbrett. Dies soll das Lösen von Zellverbänden und eine repräsentative Verteilung der Klone gewährleisten.

Es werden 100 ml 2YT-Amp-Glu-Medium mit den Zellen inokuliert (OD_{600} 0.1) und bis zu einer OD_{600} 0.5 bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Das Einstellen auf eine OD_{600} von 0.1 erlaubt den TG1-Zellen den F-Pilus auszubilden. Von diesen 100 ml werden 10 ml abgenommen und mit den jeweiligen Helferphagen infiziert und für 30 min im 37 °C Wasserbad inkubiert. Die Kultur wird bei 1.900 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der

Überstand wird verworfen, in 1 ml 2YT-Medium resuspendiert und in 50 ml 2YT-Amp-Kan-Medium überführt. Die Zellen werden über Nacht bei 30 °C und 220 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wird die Über-Nacht-Kultur in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und zentrifugiert (2500 xg, 30 min, 4 °C). 40 ml des Überstandes werden in ein neues steriles 50 ml PP-Röhrchen überführt und mit 8 ml PEG/NaCl-Lösung versetzt, auf Eis für 2 h gefällt und bei 3.300 rpm für 30 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml PBS, pH 7.5 resuspendiert und erneut zentrifugiert (10000 xg, 10 min, 4 °C). Abschließend wird in einer Titerbestimmung die Anzahl der selektierten Phagen festgestellt.

Mehrere Aliquots der geschabten Zellen werden mit einer entsprechenden Menge 87% Glycerol versetzt und in Stickstoff schockgefroren. Diese werden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.4.8. Titerbestimmung selektierter Phagen

Es werden 200 µl TG1-Zellen (OD₆₀₀ 0.5) mit 200 µl der jeweiligen Verdünnungen versetzt, gut durchmischt und bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min werden je 100 µl auf TYE-Amp-Glu-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die resultierenden Klone ausgezählt und der Titer errechnet.

3.4.9. Polyklonale ELISA Analyse

Für die polyklonale ELISA-Analyse wird eine Mikrotiterplatte mit den entsprechenden rekombinanten Allergenen in den finalen Konzentrationen (50-100 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Mikrotiterplatte für mindestens 1 h mit 3% BSA-PBS oder 4% MPBS blockiert. Die Mikrotiterplatte wird mit PBS gewaschen und mit den Phagen der verschiedenen Selektionsrunden in den entsprechenden Verdünnungen in 1.5% BSA-PBS oder 2% MPBS 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ELISA-Platte wird je dreimal mit kaltem TPBS und kaltem PBS gewaschen, und anschließend mit dem phagenspezifischen Antikörper anti-M13-HRP inkubiert. Nach maximal 1 h

Inkubationszeit wird die Mikrotiterplatte dreimal mit TPBS und PBS gewaschen. Die Detektion erfolgt mit HRP-Detektlösung.

3.4.10. Monoklonale ELISA Analyse

Für die monoklonale ELISA-Analyse werden einzelne Klone der verschiedenen Selektionsrunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 in 4 ml 2YT-Amp-Glu-Medium kultiviert. Anschließend werden die Kulturen mit den Helferphagen (MOI = 5) infiziert, bei 37 °C inkubiert und nach 30 min zentrifugiert (1.900 xg, 10 min, 4 °C). Der Überstand wird verworfen und die Pellets in 100 µl 2YT-Medium resuspendiert. Die Klone werden über Nacht bei 30 °C in 2YT-Amp-Kan-Medium bei 220 rpm geschüttelt. Die Kulturen werden erneut zentrifugiert (4.000 rpm, 30 min 4 °C) und die Phagen aus dem Überstand mit 1/5 PEG/NaCl 2 h auf Eis gefällt und zentrifugiert (3.300 rpm, 30 min, 4 °C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Die Mikrotiterplatte wird mit den entsprechenden rekombinanten Allergenen in den finalen Konzentrationen (50-100 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wird die ELISA-Platte für mindestens 1 h mit 3% BSA-PBS oder 4% MPBS blockiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit PBS gewaschen und mit der Phagenlösung in den entsprechenden Verdünnungen in 1.5% BSA-PBS oder 2% MPBS 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ELISA-Platte wird je dreimal mit kaltem TPBS und kaltem PBS gewaschen, und anschließend mit dem phagenspezifischen Antikörper anti-M13-HRP inkubiert. Nach maximal 1 h Inkubationszeit wird die Mikrotiterplatte erneut dreimal mit TPBS und PBS gewaschen. Die Detektion erfolgt mit HRP-Detektlösung.

3.5. Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank (Sicherheitswerkbank Typ BSB 6A, Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italien) durchgeführt.

3.5.1. Expression in Mammalia-Zellen

Bei der Expression rekombinanter eukaryotischer Proteine werden Säugerzellen gewählt, da Probleme bei den posttranslationalen Modifikationen und Prozessierung minimiert sind. Bei der Expression in Mammalia werden normalerweise COS- oder CHO-Zellen verwendet, aber auch humane Zelllinien wie HEK293-Zellen, humane embryonale Nierenzellen, können eingesetzt werden. Diese Zellen können sowohl für die transiente als auch für die stabile Expression verwendet werden. Auch konnte für diese Zelllinie bewiesen werden, daß unter Erhalt der Bindungseigenschaften die Konversion von Antikörper-Fragmenten in vollständige Immunglobuline unterschiedlichen Isotyps möglich ist^{112,113,114,115}.

3.5.2. Vektorsystem

Für eine rekombinante Expression der leichten und schweren Kette von Antikörpern sollte die Möglichkeit zur Selektion stabiler Transfektanden unter verschiedenen Resistenzen bestehen, aus diesem Grund wird ein monocistronischer Expressionsvektor als System gewählt.

In dieser Arbeit wurden zwei Vektorsysteme zur stabilen Expression in Säugerzellen verwendet, der Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wird durch den CMV-Promotor reguliert und nutzt ein auf BGH zurückgehendes Polyadenylierungssignal.

Das andere Vektorsystem ist der pBudCE4.1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), der ebenfalls vom CMV-Promotor reguliert wird, hierbei werden zwei auf BGH zurückgehende Polyadenylierungssignale genutzt. Durch das Insert werden die Kozak-Sequenz^{116,117} und das Stopcodon eingebaut.

3.5.3. Transfektion und transiente Expression

Um fremde DNA in Zellen einbringen zu können, wird die Technik der Transfektion verwendet. Mit dieser Methode können Proteine in Säugerzellen exprimiert werden. Der Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wird mit dem entsprechenden Gen durch das Transfektionsreagenz jetPEI (Qbiogene, Heidelberg) in die Säugerzellen eingebracht.

Es werden 2 µg der DNA in 50 µl PBS, pH 7.4 aufgenommen und mit einer Lösung bestehend aus 10 µl PEI und 40 µl PBS, pH 7.4 vermischt. Wichtig ist hierbei, dass die PEI-Lösung zu der DNA gegeben wird. Um eine gleichmäßige Vermischung und Micellenbildung zu gewährleisten, wird 30 Sekunden gevortext, und die Lösung anschließend 30 Minuten inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 Stunden zuvor in einer Gewebekulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 bis 90% kultiviert.

Das Medium wird vorsichtig abgenommen und durch 2 ml frisches serumhaltiges DMEM ersetzt. Das Gemisch aus PEI und DNA wird langsam zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden 3 Tage bei 37°C kultiviert, anschließend trypsiniert und in eine 50 ml (25 cm²)-Gewebekulturflasche überführt.

3.5.4. Generierung kontinuierlich exprimierender Zelllinien

Eine Steigerung der Ausbeute der Expression ist durch die Generierung stabil exprimierender Zellen möglich. Die Zellen der transienten Expression werden unter Selektionsdruck kultiviert.

Die verwendeten Vektoren pcDNA3.1 und pBudCE4.1 beinhalten eine Zeocin-Resistenz, dieses wird in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzu gegeben.

Die Präsenz der Zielmoleküle im Überstand wird nach wenigen Wochen verifiziert. Damit kann eine bloße Resistenz ohne die korrelierende Expression ausgeschlossen werden.

3.5.5. Kultur und Passage von adhärenenten Zellen

3.5.5.1. HEK293-Zellen

In dem Kulturmedium DMEM mit Glucose, 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin wird die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert. Das Wachstum wird mit einem Lichtmikroskop (Leitz GmbH & Co. KG, Oberkochen) überprüft. Kultiviert werden die Zellen in 250 ml (75 cm²) und 650 ml (182 cm²) Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht). Mit Hilfe von Trypsin-EDTA Lösung werden die adhärenenten HEK293 Zellen, die zuvor vom Medium befreit worden sind, vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. Das Trypsin spaltet die Adhäsionsproteine und die Verbindung zum Boden der Kulturflasche wird durch den Komplexbildner EDTA abgeschwächt, indem dieser bivalente Ionen wie Calcium und Magnesium bindet. Die Zugabe von FKS-haltigem Medium zu der Zellsuspension verhindert die zytotoxische Wirkung von EDTA und die Schädigung der Zellwand durch Trypsin. Durch leichtes Klopfen wird das Ablösen der Zellen unterstützt und die Zellen werden in ein PP-Röhrchen überführt. Diese werden zentrifugiert (1.000 xg, 5 min, 25 °C), der Überstand verworfen und das Sediment in frischem 10% FKS-haltigen DMEM resuspendiert. Hiervon werden geringe Mengen (0.5-1.0 ml) in eine neue mit DMEM gefüllte Gewebekulturflasche überführt.

3.5.5.2. RBL-2H3-SX38 Zellen

In dem Kulturmedium MEM mit 15% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum, 1% Natriumpyrophosphat, 1% Natriumglutamat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin wird die Ratten Basophile Leukämie-Zelllinie RBL-SX38 in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert. Das Wachstum wird mit einem Lichtmikroskop (Leitz GmbH & Co. KG, Oberkochen) überprüft. Kultiviert werden die Zellen in 250 ml (75 cm²) und 650 ml (182 cm²) Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht). Mit Hilfe von Trypsin-EDTA Lösung werden die adhärenenten RBL-SX38 Zellen, die zuvor vom Medium befreit und

zweimal mit PBS, pH 7.4 gewaschen worden sind, vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. Das Trypsin spaltet die Adhäsionsproteine und die Verbindung zum Boden der Kulturflasche wird durch den Komplexbildner EDTA abgeschwächt, indem dieser bivalente Ionen wie Calcium und Magnesium bindet. Die Zugabe von FKS-haltigem Medium zu der Zellsuspension verhindert die zytotoxische Wirkung von EDTA und die Schädigung der Zellwand durch Trypsin. Durch leichtes Klopfen wird das Ablösen der Zellen unterstützt und die Zellen werden in ein PP-Röhrchen überführt. Diese werden zentrifugiert (1000 xg, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Sediment in frischem 15% FKS-haltigen MEM resuspendiert. Hiervon werden geringe Mengen (0.5-1.0 ml) in eine neue mit MEM gefüllte, das mit dem Antibiotikum G418 versetzt wurde, Gewebekulturflasche überführt.

3.5.6. Kryokonservierung und Auftauen von Mammalia-Zellen

Die stabilisierten Zellen werden in eine 650 ml (175 cm²) Gewebekulturflasche umgesetzt und bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Die Zellen werden mit 4 ml Trypsin-EDTA Lösung von der Schalenwand abgelöst, in 10 ml DMEM aufgenommen und 10 min bei 4 °C bei 700 xg zentrifugiert. Das Sediment wird in 5 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese werden sofort bei -20 °C eingefroren und am nächsten Tag bei -80 °C gelagert. Für die längere Aufbewahrung werden sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

In einem 37 °C Wasserbad kann ein eingefrorenes Kryo-Röhrchen wiederaufgetaut werden. Die Zellen werden in 10 ml DMEM aufgenommen, zentrifugiert (700 xg, 5 min, 25 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 12 ml Antibiotikum-haltigem Zellmedium resuspendiert und in eine 250 ml (75 cm²) Gewebekulturflasche überführt.

3.5.7. β -Hexosaminidase Assay

Das Medium der RBL-SX38 Zellen wird entfernt und die Zellen werden anschließend zweimal mit PBS, pH 7.4 gewaschen. Danach werden sie mit 2 ml Trypsin-EDTA Lösung von der Schalenwand abgelöst, in 10 ml MEM aufgenommen und 5 min bei 4 °C bei 700 xg zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen in 5 ml MEM

aufgenommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und etwa 3 Mio. Zellen pro 250 µl (75 cm²) Gewebekulturflasche ausgesät. Diese werden am nächsten Tag erneut von der Schalenwand abgelöst, zentrifugiert und 1 mL MEM aufgenommen. Die Zellzahl wird durch die Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 5×10^5 eingestellt. 200 µl der Zellsuspension pro Vertiefung einer sterilen 96er Mikrotiterplatte werden anschließend ausgesät und drei bis vier Stunden mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert. Der Überstand wird entfernt, die Verdünnungen der Antikörper-Konstrukte in MEM auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37 °C mit 5% CO₂ kultiviert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen viermal mit Tyrode's Puffer gewaschen. Anschließend wird zur Quervernetzung 100 µl Anti-human-IgE Antikörper in Tyrode's Puffer (c = 1 µg/ml) auf die Zellen gegeben. Es werden nach einer Stunde mit 5% CO₂ bei 37 °C 30 µl des Überstandes in eine *low-bind* Mikrotiterplatte überführt mit 10 µl pNAG-Lösung versehen, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend wird die Reaktion mit 50 µl Carbonatpuffer gestoppt.

Die Zellen werden erneut viermal mit Tyrode's Puffer gewaschen und mit 100 µl 0.1 % Triton-X zur kompletten Lyse der Zellen versehen. Es werden nach einer Stunde mit 5% CO₂ bei 37 °C 30 µl des Überstandes in eine *low-bind* Mikrotiterplatte überführt mit 10 µl pNAG-Lösung versehen, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend wird die Reaktion mit 50 µl Carbonatpuffer gestoppt.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten wespengift-spezifische scFv-Fragmente, die aus der semi-synthetischen Phagenbibliothek Griffin-1 selektiert wurden, in homodimere und heterotetramere Antikörper-Konstrukte überführt werden. Des Weiteren sollte eine immune aviane wespengift-spezifische Antikörper-Bibliothek unter Berücksichtigung unterschiedlicher Klonierungsstrategien hergestellt und gegen das Majorallergen Ves v 5 selektiert werden. Dabei stand die Evaluation verschiedener Klonierungstechniken im Vordergrund.

4.1. Allergen-spezifische Antikörper-Konstrukte

Ausgehend von scFv-Fragmenten, die durch Selektion der humanen semi-synthetischen Phagenbibliothek Griffin-1 gegen unterschiedliche Insektengiftallergene gewonnen wurden und bereits im Arbeitskreis vorlagen, sollten im Rahmen dieser Arbeit bivalente Antikörper-Konstrukte unterschiedlicher Isotypen dargestellt werden.

4.1.1. Generierung homodimerer, bivalenter Antikörper- Konstrukte

Die insektengift-spezifischen scFv wurden mit Oligonukleotiden, welche spezifische Restriktionsschnittstellen trugen, amplifiziert und in Vektoren, die zur Expression zur homodimerer, bivalenter Antikörper-Konstrukte verwendet werden, überführt. Dabei stellen die so erstellten Konstrukte, im Gegensatz zum scFv, Antikörper dar, die zum einen die bivalente Antigenbindung ermöglichen und zudem über den Fc-Bereich Effektorfunktionen ausüben können (Abb. 8).

Die allergen-spezifischen scFv wurden dafür mit einem huIgEC_{H2-4} bzw. huIgG₄CH₂₋₃ Antikörper-Konstrukt fusioniert, in dem die C_{H1}-Region deletiert ist, wodurch ein geringeres Molekulargewicht und ein höheres Expressionsniveau erreicht werden. Die erhaltenen scFv Antikörper-Konstrukte wurden anschließend in verschiedenen *Assay*-Systemen auf Bindung der entsprechenden Antigene in Allergenextrakten oder der rekombinant erzeugten Allergene untersucht und auf ihre Spezifität hin analysiert.

Des Weiteren sollten heterotetramere Vollantikörper-Konstrukte generiert und mittels unterschiedlicher *Assay*-Systeme analysiert werden.

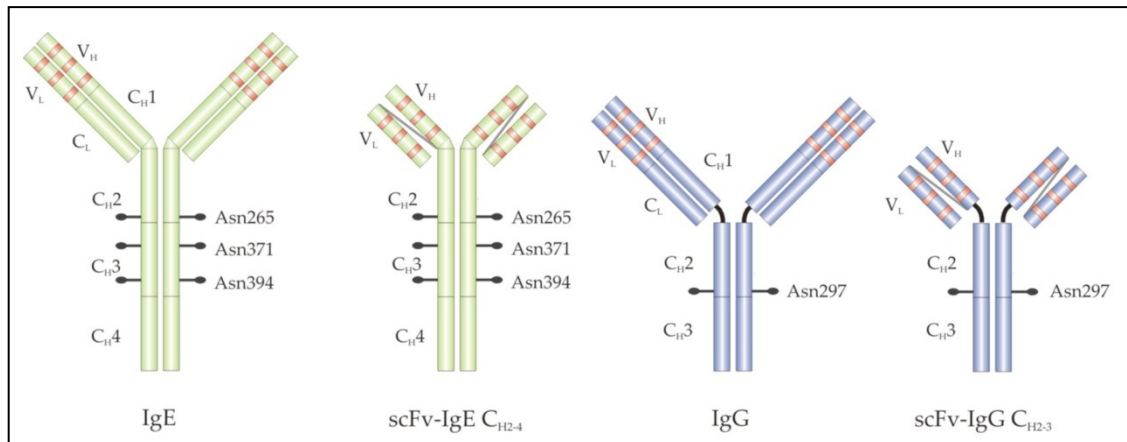


Abb. 8: Schematische Darstellung der Antikörper-Konstrukte der Isotypen IgE und IgG mit den um die C_{H1} jeweils verkürzten Konstrukten. Die CDR sind rot markiert. Die unterschiedlichen N-Glykosylierungsstellen der Antikörper Isotypen sind ebenfalls eingezeichnet.

4.1.2. Darstellung der huIgEC_{H2-4}His und huIgG₄C_{H2-3}His

Antikörper-Konstrukte

Die monovalenten scFv sollten zuerst in die Vektoren, die für die Expression homodimerer, bivalenter Antikörper-Konstrukte verwendet werden, überführt werden. Die Expressionskassette für die Klonierung der scFv als huIgEC_{H2-4}His und huIgG₄C_{H2-3}His in den Vektor pcDNA3.1+ ist in Abb. 9 aufgezeigt, ein His-tag am C-terminus sollte einer späteren Affinitätschromatographischen Reinigung dienen.

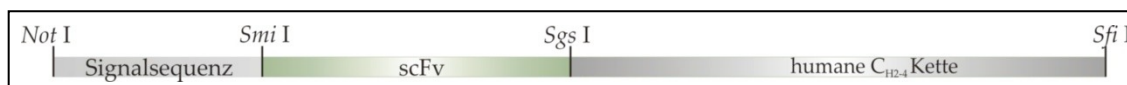


Abb. 9: Schematische Darstellung der Expressionskassette zur Klonierung in den Vektor pcDNA3.1+.

Für die Generierung der Antikörper-Konstrukte wird hier exemplarisch die Klonierung der Anti – Ves v 5 #1 und Anti – Ves v 5 #4 Antikörper-Konstrukte dargestellt.

Hierfür wurden die scFv Anti – Ves v 5 #1 und #4 mit den Oligonukleotiden *vH smi QVQLVQ* und *scFv KLTVLG sgs back*, welche die benötigten Sequenzen für die

Schnittstellen der Enzyme *Smi I* und *Sgs I* trugen, amplifiziert. Anschließend wurden sowohl die Fragmente als auch die Vektoren pcDNA3.1+/huIgEC_{H2-4}His-scFv bzw. pcDNA3.1+/huIgG₄CH₂₋₃His-scFv mit den Restriktionsenzymen *Sgs I* und *Smi I* inkubiert und gereinigt. Nach der Ligation der einzelnen scFv mit den jeweiligen Vektoren wurden XL1blue-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert, auf TYE-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien mittels PCR mit den spezifischen Oligonukleotiden überprüft und die Kolonien über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert.

Die Plasmid DNA der pcDNA3.1+/huIgEC_{H2-4}His-anti – Ves v 5 #1, pcDNA3.1+/huIgEC_{H2-4}His-anti – Ves v 5 #4, pcDNA3.1+/huIgGC_{H2-3}His-anti – Ves v 5 #1 und pcDNA3.1+/huIgGC_{H2-3}His-anti – Ves v 5 #4 Konstrukte wurden gereinigt und einer Sequenzanalyse unterworfen.

In Tab. 7 sind alle klonierten scFv aufgelistet, die Sequenzen der scFv und die der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation befinden sich im Anhang.

Tab. 7: Auflistung der insektengift-spezifischen scFv und der dazugehörigen homodimeren, bivalenten Antikörper-Konstrukte. Die mit + gekennzeichneten Konstrukte wurden kloniert. Die mit - gekennzeichneten Konstrukte wurden nicht kloniert.

scFv	pcDNA3.1+/huIgEC _{H2-4} His	pcDNA3.1+/huIgG ₄ CH ₂₋₃ His
Anti – Api m 2	+	-
Anti – Api m 3	+	+
Anti – Api m 5	+	-
Anti – Ves v 3	+	-
Anti – Ves v 5 #1	+	+
Anti – Ves v 5 #4	+	+

Nachdem alle Antikörper-Konstrukte durch Sequenzanalysen auf die richtige Insertion hin überprüft wurden, standen diese für die Expression in Mammalia zur Verfügung.

4.1.3. Expression homodimerer, bivalenter allergen-spezifischer scFv

Antikörper-Konstrukte

Die Antikörper-Konstrukte sollten anschließend in HEK293-Zellen exprimiert werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit der erhaltenen DNA unter Verwendung von PEI transfiziert¹¹⁸. Nach drei Tagen wurde der Kulturüberstand abgenommen und einer ELISA Analyse unterzogen. Die Zellen wurden drei Wochen bis zur stabilen Expression der Zelllinien kultiviert. Nach einer erneuten ELISA Analyse mit Überständen der stabil transfizierten exprimierenden Zelllinien zur Expression der Antikörper-Konstrukte wurden die Zellen, deren Antikörper eine deutliche Reaktivität gegenüber dem spezifischen Allergen aufwiesen, weiter kultiviert. In Abb. 10 sind exemplarisch die transienten Expressionen der Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1 und #4 gezeigt.

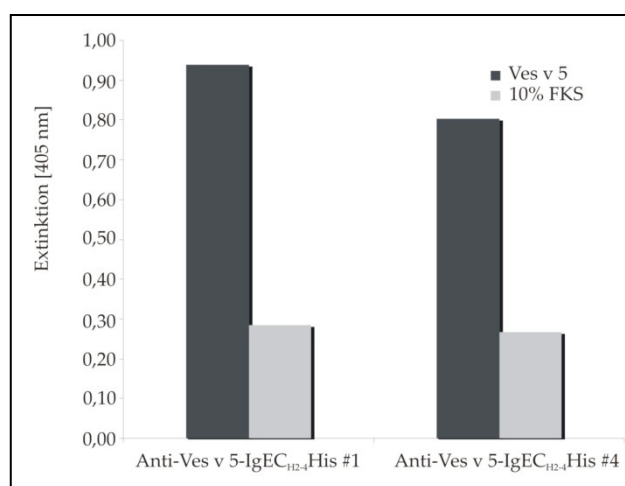


Abb. 10: ELISA Analyse zur Überprüfung der transienten Expression der Anti – Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1 und Anti – Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4 Antikörper-Konstrukte. Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 µl (c = 50 µg/ml) Allergen Ves v 5 pro Vertiefung über Nacht belegt, mit 10% FKS haltigem DMEM blockiert und mit 50 µl der Überstände der stabilen Expression der Anti – Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1 und Anti – Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4 Antikörper-Konstrukte inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das monoklonale Anti-IgE-AP Konjugat (1 : 1000 in 10% FKS haltigem DMEM). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 10% FKS haltiges DMEM verwendet.

In Abb. 11 und Abb. 12 sind die Überprüfungen der stabilen Expressionen der insektengift-spezifischen IgEC_{H2-4}His und IgG₄C_{H2-3}His Antikörper-Konstrukte in einer ELISA Analyse gezeigt.

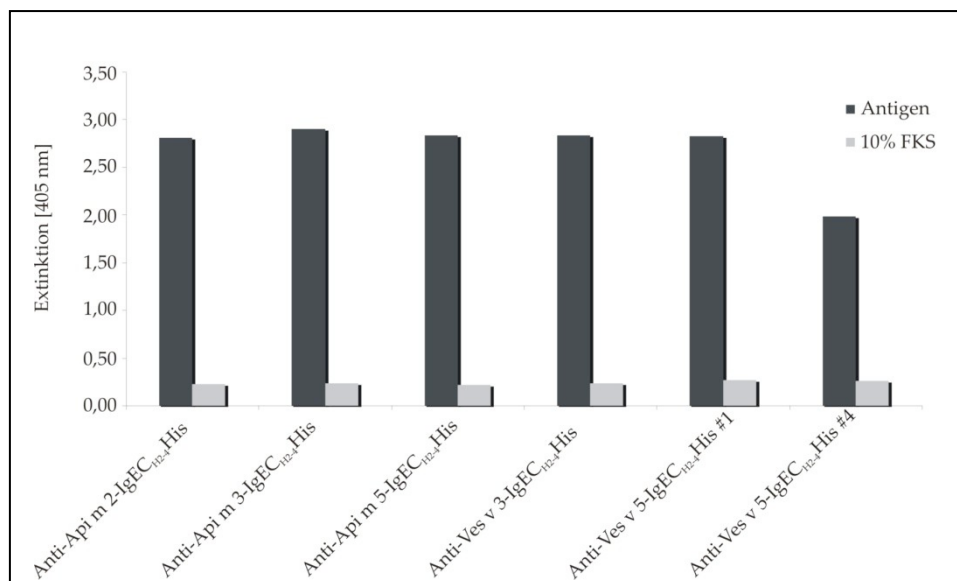


Abb. 11: ELISA Analyse zur Überprüfung der stabilen Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte im IgEC_{H2-4}His Format. Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 µl (c = 50 µg/ml) Antigen Api m 2, Api m 3, Api m 5, Ves v 3 und Ves v 5 pro Vertiefung über Nacht belegt, mit 10% FKS haltigem DMEM blockiert und mit 50 µl der Überstände der stabilen Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte im IgEC_{H2-4}His Format inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das monoklonale Anti-human-IgE-AP Konjugat (1 : 1000 in 10% FKS haltigem DMEM). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 10% FKS haltiges DMEM verwendet.

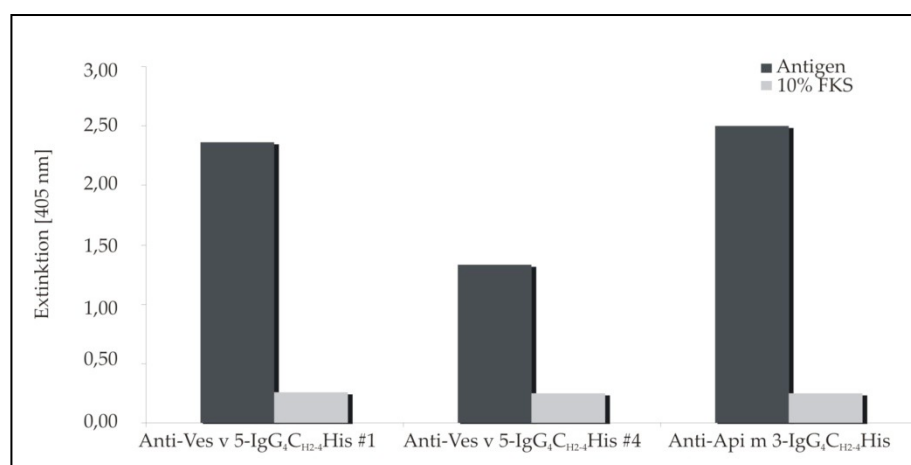


Abb. 12: ELISA Analyse zur Überprüfung der stabilen Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte im IgG₄C_{H2-4}His Format. Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 µl (c = 50 µg/ml) Antigen Api m 3 und Ves v 5 pro Vertiefung über Nacht belegt, mit 10% FKS haltigem DMEM blockiert und mit 50 µl der Überstände der stabilen Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte im IgG₄C_{H2-4}His Format inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das polyklonale Anti-human-IgG-AP Konjugat (1 : 20000 in 10% FKS haltigem DMEM). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 10% FKS haltiges DMEM verwendet.

Da alle Antikörper-Konstrukte eine Reaktivität auf ihr Antigen zeigten, wurden die Überstände der exprimierenden Antikörper-Konstrukte gesammelt und die Konstrukte über eine NiNTA-Matrix mittels IMAC gereinigt. Die erhaltenen gereinigten Fraktionen

wurden auf 7.5%ige SDS-Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung und die Antikörper-Konstrukte durch *Immunprinting* analysiert. Dazu wurden sie mit Hilfe der Semidry Blot Methode auf eine Nitrocellulose Membran übertragen und anschließend mit einem Detektions-Antikörper analysiert.

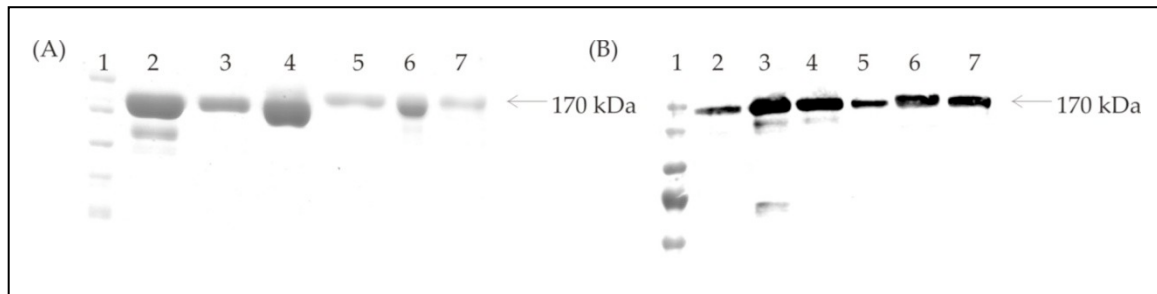


Abb. 13: SDS-PAGE Analyse und Immunoblot der in HEK293-Zellen exprimierten und mittels IMAC gereinigten insektengift-spezifischen IgEC_{H2-4}His Antikörper-Konstrukte. (A) Das SDS-PAGE-Gel wurde in Coomassie Brilliant Blau inkubiert und bis zur Sichtbarkeit der Banden entfärbt. Bahn 1: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*, Bahn 2: Anti-Api m 2-IgEC_{H2-4}His, Bahn 3: Anti-Api m 3-IgEC_{H2-4}His, Bahn 4: Anti-Api m 5-IgEC_{H2-4}His, Bahn 5: Anti-Ves v 3-IgEC_{H2-4}His, Bahn 6: Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1, Bahn 7: Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4. (B) Die Membran wurde mit 4% MPBS blockiert und anschließend mit dem polyklonalen Anti-human-IgE Antikörper (1 : 20000 in 2% MPBS) über Nacht inkubiert. Die Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-goat-IgG-AP Konjugat (1 : 20000 in 2% MPBS) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels AP-spezifischem Detektionspuffer und NBT/BCIP bis zur Sichtbarkeit der Banden. Bahn 1: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, 2: Anti-Api m 3-IgEC_{H2-4}His, Bahn 3: Anti-Api m 2-IgEC_{H2-4}His, Bahn 4: Anti-Api m 5-IgEC_{H2-4}His, Bahn 5: Anti-Ves v 3-IgEC_{H2-4}His, Bahn 6: Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1, Bahn 7: Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4.

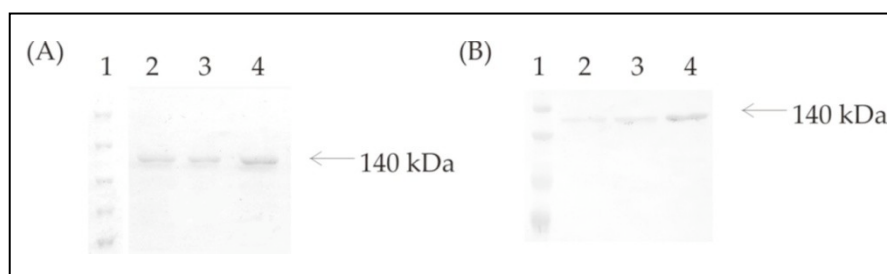


Abb. 14: SDS-PAGE Analyse und Immunoblot der in HEK293-Zellen exprimierten und mittels IMAC gereinigten insektengift-spezifischen IgG₄CH₂₋₃His Antikörper-Konstrukte. (A) Das SDS-PAGE-Gel wurde in Coomassie Brilliant Blau inkubiert und anschließend bis zur Sichtbarkeit der Banden entfärbt. Bahn 1: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*, Bahn 2: Anti-Api m 3-IgG₄CH₂₋₃His, Bahn 3: Anti-Ves v 5-IgG₄CH₂₋₃His #1, Bahn 4: Anti-Ves v 5-IgG₄CH₂₋₃His #4. (B) Die Membran wurde mit 4% MPBS blockiert und anschließend mit dem polyklonalen Anti-human-IgG-AP Konjugat (1 : 20000 in 2% MPBS) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels AP-spezifischem Detektionspuffer und NBT/BCIP bis zur Sichtbarkeit der Banden. Bahn 1: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Bahn 2: Anti-Api m 3-IgG₄CH₂₋₃His, Bahn 3: Anti-Ves v 5-IgG₄CH₂₋₃His #1, Bahn 4: Anti-Ves v 5-IgG₄CH₂₋₃His #4.

Die Abb. 13 und Abb. 14 zeigen die gereinigten insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte, welche sowohl mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung als auch durch Immunprinting analysiert wurden. Für alle gereinigten IgEC_{H2-4} Antikörper-Konstrukte konnten Banden in Höhe von 170 kDa und für die gereinigten IgG₄C_{H2-4} Antikörper-Konstrukte eine Bande in Höhe von 140 kDa detektiert werden. Diese entsprechen den glykosylierten Antikörper-Konstrukten, die errechneten Molekulargewichte bei 130 kDa für IgEC_{H2-4}-Konstrukte und bei 110 kDa für IgGC_{H2-3} Konstrukte liegen.

Das Expressionsniveau der stabil exprimierenden Zelllinien zur Expression der Antikörper-Konstrukte wurde mittels eines Quantifizierungs-ELISA auf ihre Expression hin analysiert. Hierbei wurden spezifisch mit einem Fänger-Antikörper (Anti-IgE) die scFv-IgEC_{H2-4} Antikörper-Konstrukte aus dem Überstand gebunden und anschließend mit einem zweiten Anti-IgE Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Standardreihe, die einem logarithmischen Kurvenfit unterzogen wurde und der Berechnung der Konzentrationen der Antikörper-Konstrukte diente. Die erhaltenen Konzentrationen sind in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8: Quantitative Bestimmung des Expressionsniveaus der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte.

scFv	huIgEC _{H2-4} His (µg/ml)
Anti – Api m 2	29.0
Anti – Api m 3	0.7
Anti – Api m 5	13.0
Anti – Ves v 3	0.2
Anti – Ves v 5 #1	36.0
Anti – Ves v 5 #4	21.0

Alle Antikörper-Konstrukte wurden im AlaBLOT System auf die Bindung der Einzelallergene im Bienen- bzw. Wespengiftextrakt hin analysiert (Abb. 15).

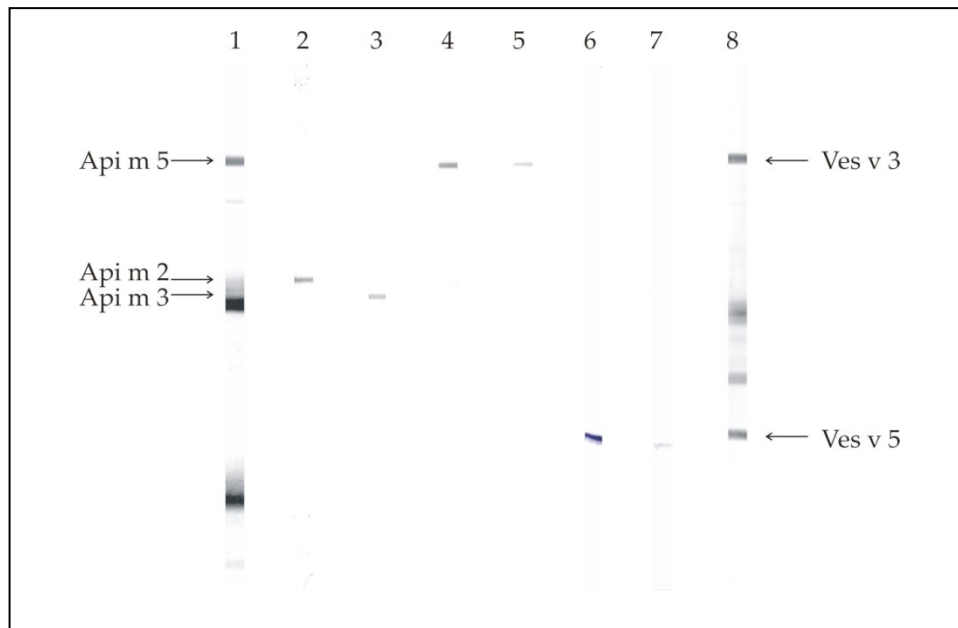


Abb. 15: AlaBLOT Analyse der in HEK293-Zellen exprimierten insektengift-spezifischen IgEC_{H2-4}His Antikörper-Konstrukte. Die AlaBLOT Streifen wurden mit den Überständen der in HEK293-Zellen exprimierten insektengift-spezifischen IgEC_{H2-4}His Antikörper-Konstrukte bzw. einem Pool aus Spenderseren inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das monoklonale Anti-IgE-AP Konjugat (1 :1000 in 10% FKS haltigem DMEM). Die Detektion erfolgte mittels AP-spezifischem Detektionspuffer und NBT/BCIP bis zur Sichtbarkeit der Banden. 1: Pool aus Spenderseren von Bienengiftallergikern (1 :5), 2: Anti-Api m 2-IgEC_{H2-4}His, 3: Anti-Api m 3-IgEC_{H2-4}His, 4: Anti-Api m 5-IgEC_{H2-4}His, 5: Anti-Ves v 3-IgEC_{H2-4}His, 6: Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1, 7: Anti- Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4, 8: Pool aus Spenderseren von Wespengiftallergikern (1 :5).

Hierbei kann man deutlich erkennen, dass alle IgE Antikörper-Konstrukte spezifisch ihr jeweiliges Antigen im Wespen- bzw. Bienengiftextrakt detektieren.

Ebenfalls wurden die beiden Antikörper-Konstrukte Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1 und #4 auf ihre Rezeptorbindung hin untersucht. Hierfür wurden RBL-2H3-SX38 Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie Ratten Basophiler Leukämiezellen, die mit der DNA des humanen Rezeptor FcεRI transfiziert wurde und diesen auf der Oberfläche trägt. Dieser Rezeptor kann mit humanen IgE Antikörpern belegt werden. Durch Quervernetzung der IgE Antikörper über ihr spezifisches Antigen oder Anti-IgE kommt es zur Degranulation der Zelle und somit zur Ausschüttung der β-Hexosaminidase. Diese kann durch umsetzen mit einem Substrat anschließend kolorimetrisch vermessen werden.

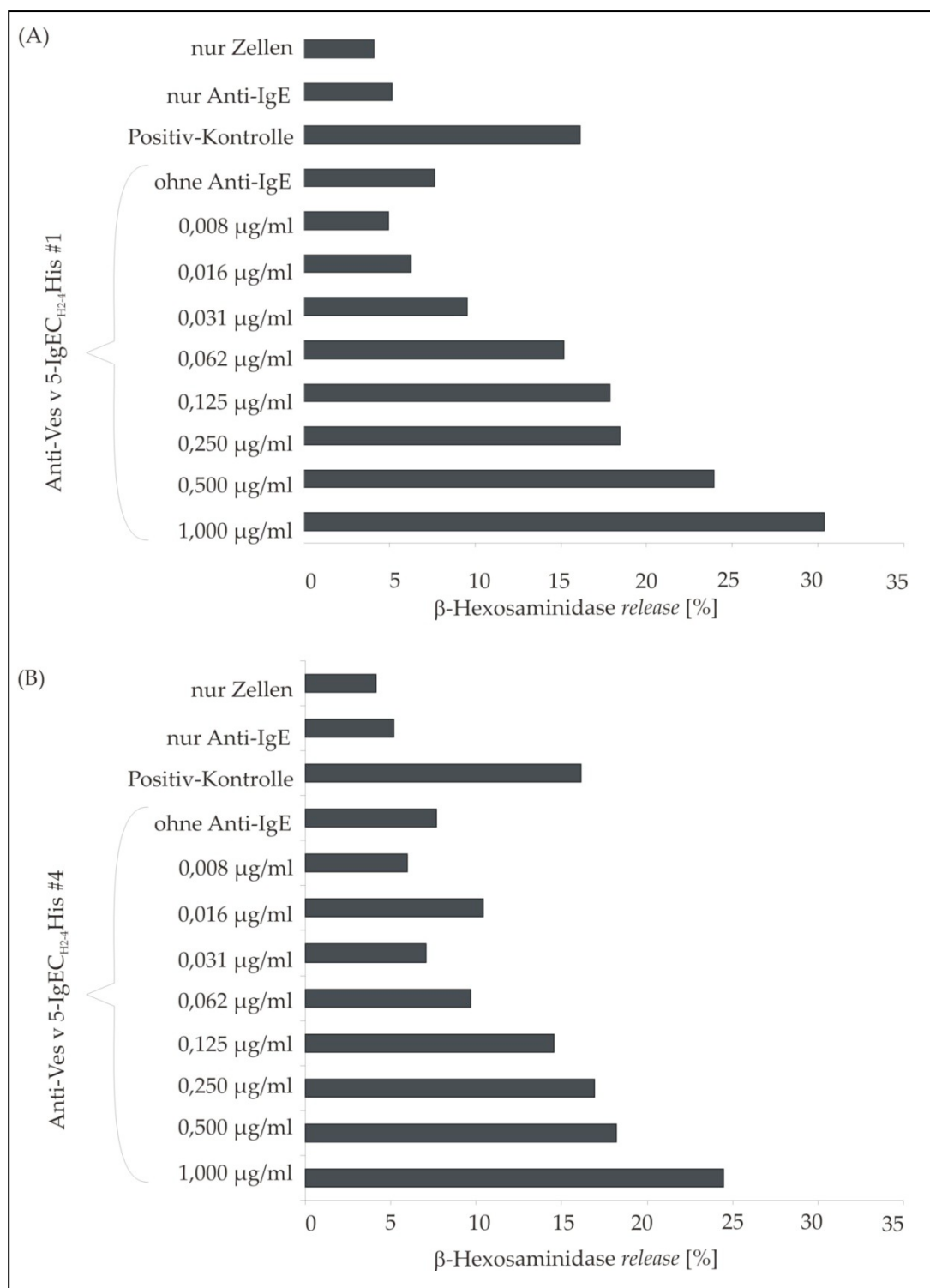


Abb. 16: β-Hexosaminidase Assay mit den beiden gereinigten Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His Antikörper-Konstrukte. Es wurden RBL-2H3-SX38 Zellen mit den Antikörper-Konstrukten über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ belegt. Am nächsten Tag wurden diese mit humanem Anti-IgE Antikörper (1 : 10000 in Tyrode's Puffer) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die ausgeschüttete β-Hexosaminidase wurde mit pNAG umgesetzt und nach 1 h bei 37 °C wurde die Reaktion mit Carbonatpuffer gestoppt. Als Positiv-Kontrolle wurde der BSP-spezifische Antikörper Anti-BSP2.1.1.-IgEC_{H2-4}His (c = 0.2 µg/ml) verwendet. In weiteren Kontrollen wurden zum einem die unbehandelten Zellen (nur Zellen) sowie nur der Quervernetzer Anti-human-IgE (Anti-IgE) vermessen. (A) Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1, (B) Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4.

In Abb. 16 kann man deutlich erkennen, dass beide Konstrukte an die humanen Fcε-Rezeptoren auf der Oberfläche binden und durch einen humanen polyklonalen IgE Antikörper quervernetzt werden können, was zu einer Signalweiterleitung und anschließenden Freisetzung von β-Hexosaminidase führt. Die Prozentuale Ausschüttung an β-Hexosaminidase zeigt für beide Antikörper-Konstrukte einen konzentrationsabhängigen Verlauf.

4.1.4. Analyse der Antikörper-Konstrukte in diagnostischen Assay-Systemen

Die erhaltenen Antikörper-Konstrukte wurden weiterhin mittels kommerzieller Assay-Systeme quantifiziert. Hierfür wurden die Überstände der in HEK293-Zellen exprimierten Antikörper-Konstrukte in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Markus Ollert an der Technischen Universität München in zwei diagnostischen Systemen, Immulite 2000 und UniCAP 250, analysiert. Da es sich bei den vorliegenden Antikörpern um IgE-Isotypen handelt, können diese in Analogie zu IgE Antikörpern aus Patientenseren quantifiziert werden. In solchen Systemen können neben der Bestimmung des Gesamt-IgE-Spiegels auch die Konzentration des spezifischen-IgE-Spiegels analysiert werden. Um solche Systeme zu Standardisieren wurden bisher Poolseren verwendet, die nicht immer reproduzierbare Ergebnisse liefern, da durch neue Chargen möglicherweise Antikörper gegen bestimmte Antigene geringer im Serum vorhanden sind. Die Antikörper-Konstrukte sollten hier für eine mögliche Anwendbarkeit als so genannter spezifischer Standard analysiert werden.

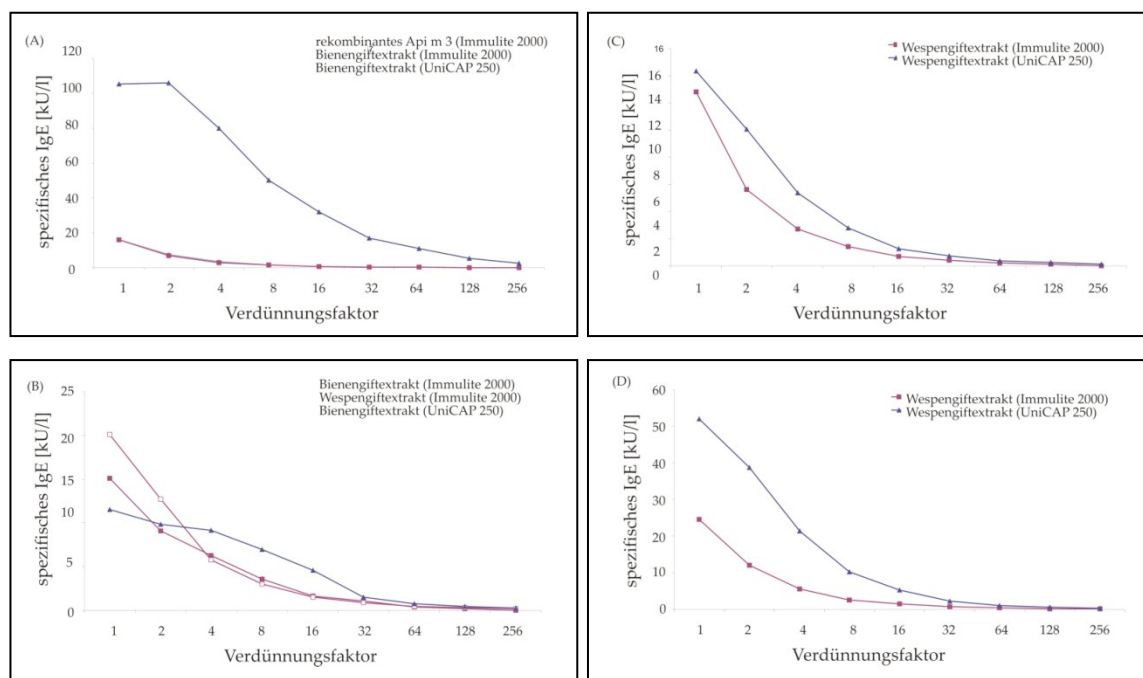


Abb. 17: Assay Analyse der in HEK293-Zellen exprimierten insektengift-spezifischen IgEC_{H2-4}His Antikörper-Konstrukte. Die Überstände der stabil exprimierenden Zelllinien zur Expression der Antikörper-Konstrukte wurden in den Systemen Immulate 2000 und UniCAP 250 in Verdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 256 (Verdünnungsfaktor) vermessen. (A) Anti-Api m 3-IgEC_{H2-4}His, (B) Anti-Api m 5-IgEC_{H2-4}His, (C) Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1, (D) Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4.

Hierbei kann man deutlich erkennen, dass alle Antikörper-Konstrukte eher eine geringe Reaktivität gegenüber den Wespengift- bzw. Bienengiftextrakten aufweisen. Mit dem verfügbaren rekombinant erzeugten Allergen Api m 3 und dem Anti-Api m 3-Antikörper konnte eine weitere Analyse durchgeführt werden. Abb. 17 A zeigt deutlich, dass das Antikörper-Konstrukt eine starke Reaktivität gegenüber dem Bienengiftextrakt welches im UniCAP 250 System verwendet aufweist. Jedoch wird der Antikörper im Immulate 2000 System nur ein geringer spezifischer IgE-Spiegel gegenüber dem rekombinant erzeugten Allergen und dem Bienengiftextrakt gemessen. Das Antikörper-Konstrukt Anti-Api m 5-IgEC_{H2-4}His (Abb. 17B) wurde ebenfalls auf Wespengiftextrakt vermessen, da bereits in ELISA Analysen gezeigt werden konnte, dass der Antikörper sowohl rekombinantes Api m 5 als auch rekombinantes Ves v 3 erkennt. Das Wespengift wird in der Analyse besser erkannt, was auf eine unterschiedliche Konzentration an Antigen in den jeweiligen Giftextrakten schließen lässt.

4.1.5. Darstellung heterotetramerer Vollantikörper-Konstrukte

Die insektengift-spezifischen scFv Anti – Api m 3, Anti – Ves v 3 und Anti – Ves v 5 #1 sollten des Weiteren als humane Vollantikörper kloniert werden, um diese als Standardisierungsreagenzien in verschiedenen *Assay*-Systemen nutzen zu können. Bei den Immulite 2000 und UniCAP 250 Systemen werden Seren allergischer Patienten untersucht, wofür die Expression der Vollantikörper-Konstrukte des Isotyps IgE Vorteile hat, da die Erstellung artifizieller scFv Antikörper-Konstrukte nicht direkt vergleichbar mit den IgE Antikörpern aus den Spenderseren ist.

Um sicherzustellen, dass die aus der Selektion erhaltenen scFv als Vollantikörper-Konstrukte exprimieren, sollten sie zunächst als IgG₁ Antikörper-Konstrukte kloniert werden, ein His-*tag* am C-terminus sollte einer späteren Affinitätschromatographischen Reinigung dienen. Die variablen Regionen der scFv Antikörperfragmente sollten in den Expressionsvektor pBudCE4.1/IgG₁His eingebracht werden. Nach erfolgreicher Expression sollte die konstante schwere Kette des Isotyps IgG₁ gegen die des Isotyps IgE ausgetauscht werden. In dem Vektor pBudCE4.1 können die variablen Ketten unabhängig voneinander über verschiedene Expressionskassetten kloniert werden, die von zwei unterschiedlichen Promotoren reguliert werden. Die schematische Darstellung der Expressionskassetten ist in Abb. 18 gezeigt.

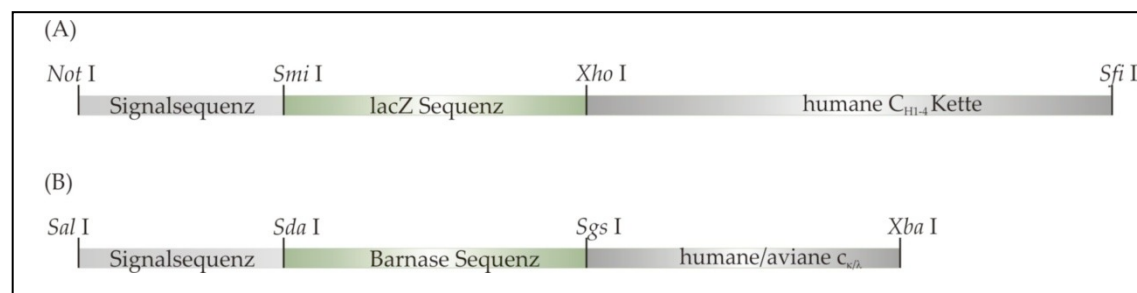


Abb. 18: Schematische Darstellung der Expressionskassetten zur Klonierung in den Vektor pBud4.1CE/IgG₁-opti. (A) Expressionskassette der schweren Kette. (B) Expressionskassette der leichten Kette.

Gezeigt ist hier eine Version des Vektors, welcher anstelle der variablen Regionen der leichten und der schweren Kette die Negativ-Selektionsmarkergene Barnase und lacZ enthält. Dies vereinfacht die Analyse der Transformanten, da diese sich eindeutig vom Ausgangsvektor unterscheiden. Durch das Verwenden der Reagenzien IPTG und X-Gal

können die Kolonien, die im Vektor anstelle der v_H das lacZ Gen (Abb. 18A) tragen, blau gefärbt werden. Der zweite Selektionsmarker ist die Barnase, die anstelle einer v_L in den Vektor kloniert wurde (Abb. 18B). Die Barnase ist eine extrazelluläre RNase aus dem *Bacillus amyloliquefaciens*. Diese nur 110 AS große RNase wirkt lethal auf *E. coli* Bakterien sobald sie exprimiert wird¹¹⁹. Durch das Einführen von so genannten Amber Stop Codons in die Expressionskassette kann die Expression durch die Verwendung von sogenannten *E. coli* Supressorstämmen wie z.B. TB1 oder HB2151 verhindert werden.

4.1.5.1. Amplifikation und Klonierung der variablen Region der schweren Kette

Zur Amplifikation der variablen Regionen der schweren Kette der scFv Fragmente Anti - Api m 3, Anti - Ves v 3 und Anti - Ves v 5 #1 wurden die Oligonukleotide *vH smi QVQLVQ* bzw. *vH smi EVQLV* und *PLA9 vh xho back*, welche die benötigten Sequenzen für die Schnittstellen der Enzyme *Smi I* und *Xho I* trugen, verwendet. Die v_H wurden amplifiziert. Anschließend wurden der Vektor pBudCE4.1/huIgG₁-opti sowie die Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *Smi I* und *Xho I* inkubiert und gereinigt. Die jeweiligen v_H Fragmente wurden mit dem Vektor ligiert, TB1-Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert, auf TYE-Zeo-IPTG-X-Gal-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Verwendung von IPTG und X-Gal gewährleistet die blau Färbung der Klone, die noch das lacZ Gen beinhalten. Am nächsten Tag wurden fünf weiße Kolonien mittels PCR mit den spezifischen Oligonukleotiden überprüft und die Kolonien über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert.

Die Plasmid DNA der pBudCE4.1/huIgG₁-anti - Api m 3 v_H , pBudCE4.1/huIgG₁-anti - Ves v 3 v_H und pBudCE4.1/huIgG₁-anti - Ves v 5 #1 v_H Konstrukte wurde einer Sequenzanalyse unterworfen.

Nachdem alle Antikörper-Konstrukte durch Sequenzanalysen auf die richtige Insertion der v_H hin überprüft worden waren, standen diese für die Klonierung der variablen Region der leichten Kette zur Verfügung.

4.1.5.2. Amplifikation und Klonierung der variablen Region der leichten Kette

Die variablen Regionen der leichten Kette der scFv Fragmente Anti – Api m 3, Anti - Ves v 3 und Anti – Ves v 5 #1 wurden mit Hilfe der Oligonukleotide *vL Sda QTVVTQ* bzw. *VL2/7-sbf for* und *vL KLTVLG sgs Kappa back*, welche die benötigten Sequenzen für die Schnittstellen der Enzyme *Sda I* und *Sgs I* trugen, amplifiziert. Anschließend wurden die Vektoren pBudCE4.1/huIgG₁-anti – Api m 3 *v_H*, anti-Ves v 3 *v_H*, anti – Ves v 5 #1 *v_H* und die Fragmente mit den Restriktionsenzymen *Sda I* und *Sgs I* inkubiert und gereinigt. Die jeweiligen *v_L* Fragmente wurden mit dem jeweiligen Vektor ligiert, XL1blue-Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert, auf TYE-Zeo-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je fünf Kolonien mittels PCR mit den spezifischen Oligonukleotiden überprüft und die Kolonien über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert.

Die Plasmid DNA der pBudCE4.1/huIgG₁His-Anti – Api m 3, pBudCE4.1/huIgG₁His-Anti – Ves v 3 und pBudCE4.1/huIgG₁His-Anti – Ves v 5 #1 Antikörper-Konstrukte wurden einer Sequenzanalyse unterworfen.

Nachdem alle Antikörper-Konstrukte durch Sequenzanalysen auf die richtige Insertion der variablen Region der leichten Kette hin überprüft worden waren, standen diese für die Expression in HEK293-Zellen zur Verfügung.

4.1.6. Expression heterotetramerer Antikörper-Konstrukte

Die Antikörper-Konstrukte sollten anschließend in HEK293-Zellen exprimiert werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit der erhaltenen DNA unter Verwendung von PEI transfiziert¹¹⁸. Nach drei Tagen wurde der Kulturüberstand abgenommen und eine ELISA Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden drei Wochen bis zur stabilen Expression der Zelllinien kultiviert. Nach einer erneuten ELISA Analyse (Abb. 19) mit Überständen der stabil transfizierten exprimierenden Zelllinien zur Expression der Antikörper-Konstrukte wurden die Zellen, deren Antikörper eine deutliche Reaktivität gegenüber dem spezifischen Allergen aufwiesen, weiter kultiviert.

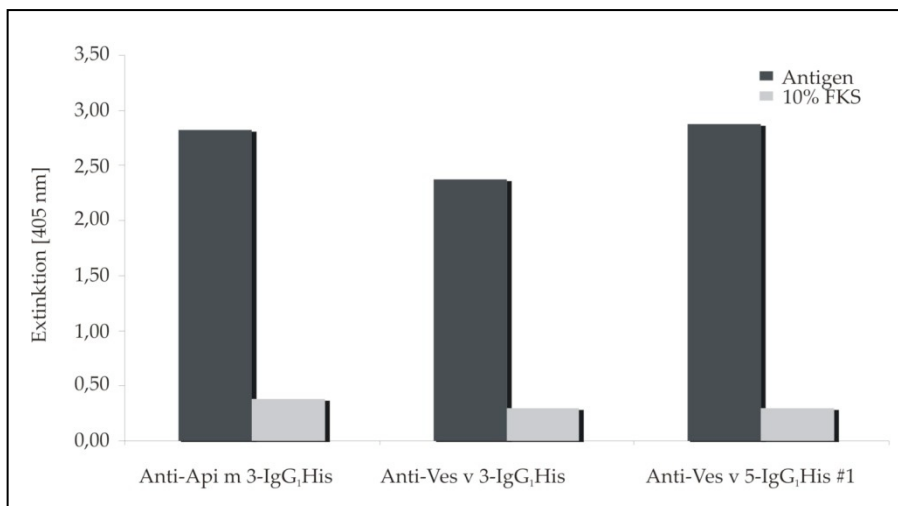


Abb. 19: ELISA Analyse zur Überprüfung der stabilen Expression der Anti – Api m 3-IgG₁His, Anti - Ves v 3-IgG₁His und Anti – Ves v 5-IgG₁His #1 Antikörper-Konstrukte. Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 µl (c = 50 µg/ml) Allergen Api m 3, Ves v 3 und Ves v 5 pro Vertiefung über Nacht belegt, mit 10% FKS haltigem DMEM blockiert und mit 50 µl der Überstände der stabilen Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte im IgG₁His Format inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das humane polyklonale Anti-human-IgG-AP Konjugat (1 : 20000 in 10% FKS haltigem DMEM). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 10% FKS haltiges DMEM verwendet.

Anschließend wurden die Überstände der exprimierenden Antikörper-Konstrukte gesammelt und die Konstrukte über eine NiNTA-Matrix mittels IMAC gereinigt. Die erhaltenen gereinigten Fraktionen wurden auf 7,5%ige SDS-Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die gereinigten Antikörper-Konstrukte wurden sowohl mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung als auch durch *Immunprinting* analysiert. Die Antikörper-Konstrukte wurden mit Hilfe der Semidry Blot Methode auf eine Nitrocellulose Membran übertragen und anschließend mit einem Detektions-Antikörper gefärbt.

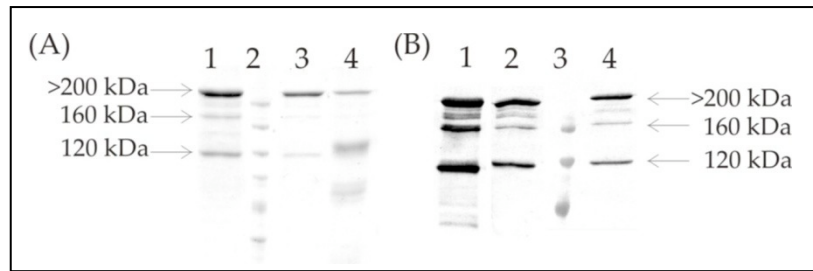


Abb. 20: SDS-PAGE Analyse und Immunoblot der in HEK293-Zellen exprimierten und mittels IMAC gereinigten Anti – Api m 3-IgG₁His, Anti – Ves v 3-IgG₁His und Anti - Ves v 5-IgG₁His #1 Antikörper-Konstrukte. (A) Das SDS-PAGE-Gel wurde in Coomassie Brilliant Blue inkubiert und anschließend bis zur Sichtbarkeit der Banden entfärbt. Bahn 1: Anti-Ves v 5-IgG₁His #1, Bahn 2: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*, Bahn 3: Anti-Ves v 3-IgG₁His, Bahn 4: Anti-Api m 3-IgG₁His #4. (B) Die Membran wurde mit 4% MPBS blockiert und anschließend mit dem polyklonalen Anti-human-IgG-AP Konjugat (1:20000 in 2% MPBS) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels AP-spezifischem Detektionspuffer und NBT/BCIP bis zur Sichtbarkeit der Banden. Bahn 1: Anti-Ves v 5-IgG₁His #1, Bahn 2: Anti-Ves v 3-IgG₁His, Bahn 3: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Bahn 4: Anti-Api m 3-IgG₁His #4.

Zusammenfassend sind in Abb. 20 die gereinigten Fraktionen der Expressionen der Anti - Api m 3-IgG₁His, Anti – Ves v 3-IgG₁His und Anti – Ves v 5 #1-IgG₁His Antikörper-Konstrukte gezeigt. Die Antikörper-Konstrukte konnten mittels *Immunprinting* jeweils als Banden in Höhe von >200 kDa, 160 kDa und 120 kDa bestätigt werden, das apparente Laufverhalten zum einen lässt auf unterschiedliche Glykosilierungsgrade der Antikörper-Konstrukte schließen zum anderen scheinen die gereinigten Antikörper-Konstrukte zu degradieren, da das errechnete Molekulargewicht eines IgG Antikörper-Konstrukt bei 144 kDa liegt.

Anschließend wurde die IgG schwere Kette der entstanden Vollantikörper-Konstrukte zu einer IgE schweren Kette ausgetauscht und exprimiert, jedoch wurde für keine der erfolgreich klonierten Antikörper-Konstrukte eine Expression gezeigt.

4.2. Klonierung chimärer IgGE Antikörper-Konstrukte

Die erfolgreiche Darstellung und Expression verschiedener scFv Konstrukte als verkürzte Antikörper-Konstrukte konnte zwar gezeigt werden, jedoch ist die Darstellung als Vollantikörper-Konstrukt dadurch nicht immer gewährleistet. Ein Nachteil der homodimeren, bivalenten scFv Antikörper-Konstrukte ist, dass die Antikörper-Konstrukte zu Aggregation neigen und dadurch möglicherweise die Ergebnisse verfälscht werden. Ebenfalls wäre die Nutzung von Vollantikörpern in den diagnostischen *Assay*-Systemen von Vorteil, da sie strukturell den natürlichen IgE entsprechen. Da die durch die Selektion mit der scFv Phagenbibliothek Griffin-1 erhaltenen insektengift-spezifischen scFv nicht als IgE Vollantikörper-Konstrukte exprimiert werden konnten, sollte ein chimäres Antikörper-Konstrukt erzeugt werden.

Die mögliche Anwendung der generierten Antikörper-Konstrukte in diagnostischen *Assay*-Systemen ist hierbei entscheidend, da die Verwendung als „Standard“ den gleichen Detektionsantikörper (Anti-IgE) benötigt. Ebenfalls sollten die Grundsätzlichen Eigenschaften des IgE Antikörpers, wie z.B. die Rezeptorbindung erhalten bleiben.

Zur Darstellung eines chimären Antikörper-Konstruktes standen verschiedene Isotypen der Immunglobuline zur Verfügung. Möglich wären die Darstellung von humanen IgAE, IgME und IgGE Antikörper-Konstrukten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der chimären Konstrukte IgGE angestrebt, da für die dargestellten IgG Antikörper-Konstrukte eine Expression gezeigt werden konnte. Dies beweist, dass die Paarung der ersten Domäne der schweren Kette der konstanten Region mit der leichten Kette der konstanten Region generell funktionell ist und exprimiert. Die Expression der Domänen zwei bis vier des Isotyps IgE konnte durch die verkürzten Konstrukte gezeigt werden¹²⁰ und die Expression der Domänen CH3-4 wurde erfolgreich beschrieben¹²¹. Ebenfalls wurde die Erfolgreiche Expression der konstanten Domänen CH1 und CH1-2 des Isotyp G von Feige et. al.¹²² beschrieben. Die Zusammenstellung von CH Domänen der beiden Isotypen IgE und IgG der beiden Antikörper-Konstrukte ist in Abb. 21 gezeigt. Bei dem Konstrukt IgGE1 sollte die IgECH1 Region gegen die IgG1CH1-hinge Region ausgetauscht werden. In Konstrukt IgGE2 wurden die ersten beiden Domänen des IgE

Antikörpers gegen die des IgG₁ ausgetauscht und sind als Expressionkassetten der schweren Ketten in Abb. 22 gezeigt.

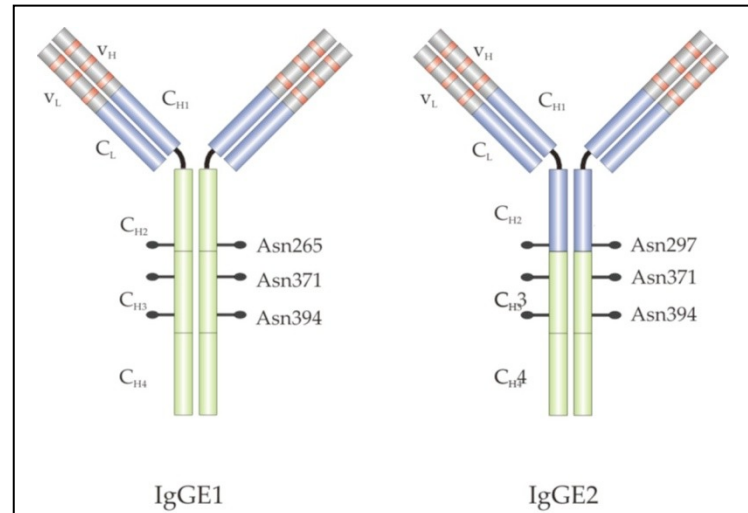


Abb. 21: Schematische Darstellung chimärer Vollantikörper-Konstrukte IgGE1 und IgGE2. Die konstanten Regionen der schweren Ketten des Isotyps G sind blau, die des Isotyps E grün dargestellt. Die variablen Bereiche und die leichte Kette sind in grau, die CDR sind in rot dargestellt. Die unterschiedlichen N-Glykosylierungsstellen der Antikörper Isotypen sind ebenfalls eingezeichnet.

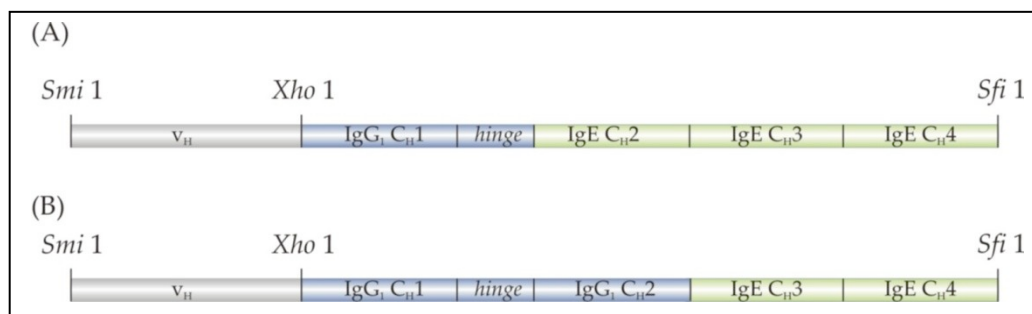


Abb. 22: Schematische Darstellung der Expressionkassetten der schweren Ketten der IgGE1 und IgGE2-Konstrukte. (A) IgGE1-Konstrukt: Hybridisierung der C_{H1} und hinge Region des IgG₁ mit den C_{H2-4} Domänen des IgE. (B) IgGE2-Konstrukt: Hybridisierung der C_{H1-2} Domäne des IgG₁ mit den C_{H3-4} Domänen des IgE.

4.2.1. Generierung chimärer IgGE1 und IgGE2 Antikörper-Konstrukte

Die schwere Kette IgGC_{H1hinge} wurde mit den Oligonukleotiden *IgG Xho for* und *IgG CH1 hinge back*, die schwere Kette IgG₁C_{H1-2} mit den Oligonukleotiden *IgG Xho for* und *IgG1 CH2back* amplifiziert. Die Banden wiesen eine erwartete Größe von ca. 350 bp (IgG₁C_{H1-hinge}) und ca. 700 bp (IgG₁C_{H1-2}) auf.

Die schwere Kette IgEC_{H2-4} wurde mit den Oligonukleotiden *IgE CH2 for* und *IgE sfi 5x his rev*, die schwere Kette IgEC_{H3-4} mit den Oligonukleotiden *IgE CH3 for* und *IgE sfi 5x his rev* amplifiziert. Die Banden wiesen eine erwartete Größe von ca. 950 bp (IgEC_{H2-4}) und ca. 700 bp (IgEC_{H3-4}) auf. In Abb. 23A sind die Amplifikate der einzelnen Ketten auf einem analytischen 1.5% Agarosegel gezeigt.

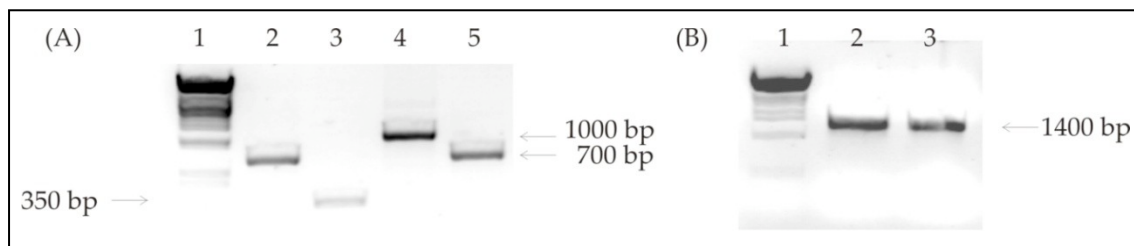


Abb. 23: Gelelektrophoretische Analyse der PCR zur Amplifikation der schweren Ketten der Isotypen G und E und der generierten IgGE1 und IgGE2 schweren Ketten. Die Analyse erfolgte auf einem analytischen 1.5%igen Agarosegel mittels Ethidiumbromidfärbung. (A) Bahn 1: Marker 16 λ -DNA/*Eco*130I, Bahn 2: IgG₁CH₁₋₂, Bahn 3: IgG₁CH_{1-hinge}, Bahn 4: IgEC_{H2-4}, Bahn 5: IgEC_{H3-4}, (B) Bahn 1: Marker 16 λ -DNA/*Eco*130I, Bahn 2: IgGE1, Bahn 3: IgGE2..

Nun sollten die schweren Ketten der IgE und IgG₁ Regionen hybridisiert werden. Bei einer Hybridisierungsreaktion müssen die Amplifikate in einem Verhältnis von 1 : 1 eingesetzt werden. Hierfür wurden die gereinigten Amplifikate auf ein 1.5%iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt (Abb. 23).

Für die Hybridisierungsreaktion des IgGE1 Antikörper-Konstruktes wurden als Edukte IgG₁CH_{1-hinge} und IgEC_{H2-4} äquivalent eingesetzt und nach fünf Zyklen wurden die Oligonukleotide *IgG Xho for* und *IgE sfi 5x his rev* hinzugegeben, eine PCR unter Standardbedingungen durchgeführt.

Für die Hybridisierungsreaktion des IgGE2 Antikörper-Konstruktes wurden als Edukte IgG₁CH₁₋₂ und IgEC_{H3-4} ebenfalls äquivalent eingesetzt und nach fünf Zyklen wurden die Oligonukleotide *IgG Xho for* und *IgE sfi 5x his rev* hinzugegeben und eine PCR unter Standardbedingungen durchgeführt. In Abb. 23B sind die Amplifikate der Hybridisierungsprodukte IgGE1 und IgGE2 gezeigt.

Anschließend sollten die schweren Ketten IgGE1 und IgGE2 in den Expressionsvektor pBudCE4.1 eingebracht werden. Hierfür wurde der Vektor pBudCE4.1/IgG₁-Anti - Ves v 5 #1 verwendet. Da HEK293-Zellen schon mit diesem

Vektor transfiziert wurden und die stabil exprimierenden Zelllinien, erfolgreich den Antikörper exprimierten.

Der Vektor pBudCE4.1/IgG₁His-Anti – Ves v 5 #1 und die Fragmente IgGE1His und IgGE2His wurden mit den Restriktionsenzymen *Sfi I* und *Xho I* inkubiert. Die jeweiligen Fragmente wurden mit dem Vektor ligiert, XL1blue-Zellen wurden mit den Ligationsansätzen transformiert, auf TYE-Zeo-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils fünf Kolonien von den Platten mittels PCR und den Oligonukleotiden *IgE 688 for* und *IgE 1169 b* überprüft und die Kolonien über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die Plasmid DNA der pBudCE4.1/IgGE1His-Anti – Ves v 5 #1 und pBudCE4.1/IgGE2His-Anti – Ves v 5 #1 Antikörper-Konstrukte wurden einer Sequenzanalyse unterworfen. Nachdem die Antikörper-Konstrukte durch Sequenzanalysen auf die richtige Insertion der schweren Ketten IgGE1 und IgGE2 hin überprüft wurden, standen diese für die Expression in Mammalia zur Verfügung.

4.2.2. Expression des Anti – Ves v 5-IgGE1His #1 und des Anti - Ves v 5-IgGE2His #1 Antikörper-Konstruktes

Die Antikörper-Konstrukte sollten anschließend in HEK293-Zellen exprimiert werden. Hierfür wurden HEK293 -Zellen mit der erhaltenen DNA unter Verwendung von PEI transfiziert¹¹⁸. Nach drei Tagen wurde der Kulturüberstand abgenommen und eine ELISA Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden drei Wochen bis zur stabilen Expression der Zelllinien kultiviert. Nach einer erneuten ELISA Analyse (Abb. 24) mit Überständen der stabil transfizierten exprimierenden Zelllinien zur Expression der Antikörper-Konstrukte wurden die Zellen, deren Antikörper eine deutliche Reaktivität gegenüber dem spezifischen Allergen aufwiesen, weiter kultiviert.

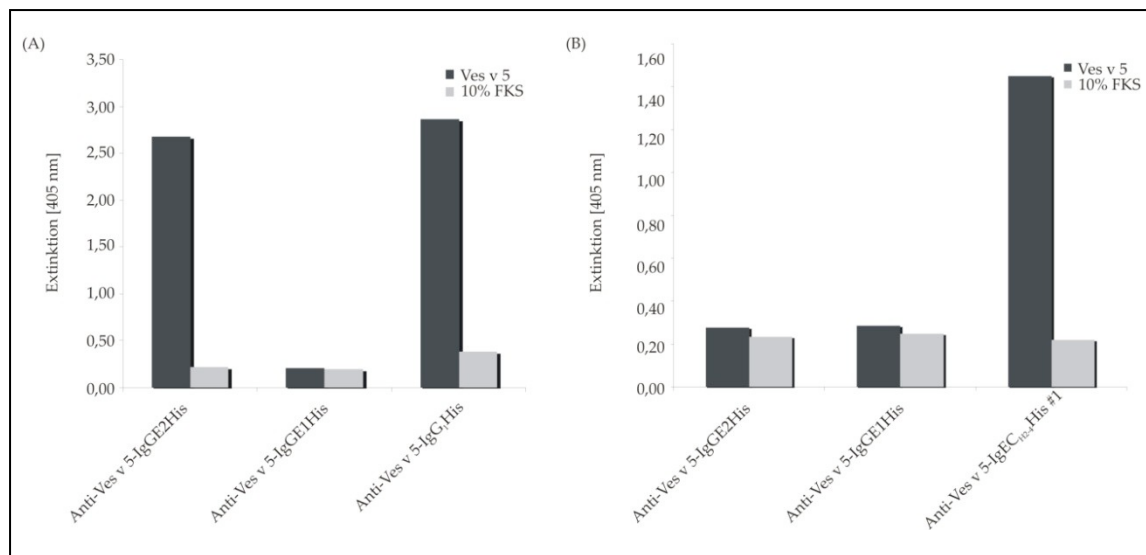


Abb. 24: ELISA Analyse zur Überprüfung der stabilen Expression der Anti – Ves v 5-IgGE1His #1 und Anti – Ves v 5-IgGE2His #1 Antikörper-Konstrukte. Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 μ l ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) Allergen Ves v 5 über Nacht belegt, mit 10% FKS haltigem DMEM blockiert und mit 50 μ l der Überstände der stabilen Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte der Isotypen IgGE1 und IgGE2 inkubiert. (A) Als sekundärer Antikörper diente das polyclonale Anti-human-IgG-AP Konjugat (1 : 20000 in 10% FKS haltigem DMEM). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. (B) Als sekundärer Antikörper diente der polyclonale Anti-human-IgE Antikörper (1 : 20000 in 10% FKS haltigem DMEM) und dieser wurde anschließend mit dem polyklonalen Anti-goat-IgG-AP Konjugat (1 : 20000 in 10% FKS haltigem DMEM) inkubiert. Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde in beiden Fällen 10% FKS haltiges DMEM verwendet.

Für das IgGE2-Antikörper-Konstrukt konnte mit dem humanen polyklonalen Anti-IgG-AP Antikörper-Konjugat eine erfolgreiche Expression nachgewiesen werden. Das IgGE1 Antikörper-Konstrukt konnte leider weder mit einem polyklonalen Anti-human-IgG noch mit einem Anti-human-IgE detektiert werden. Anschließend wurde das Anti-Ves v 5-IgGE2His Antikörper-Konstrukt auf Rezeptorbindung hin untersucht. Hierfür stand die Fc ϵ RI α Domäne des IgE Rezeptors (AviQuant), der mit dem IgY-Fc-Teil fusioniert wurde und im Arbeitskreis bereits vorlag, zur Verfügung. Das Anti-Ves v 5-IgGE2His Antikörper-Konstrukt wurde für diese Analyse angereichert und durch Dialyse die störenden Bestandteile des Überstandes entfernt.

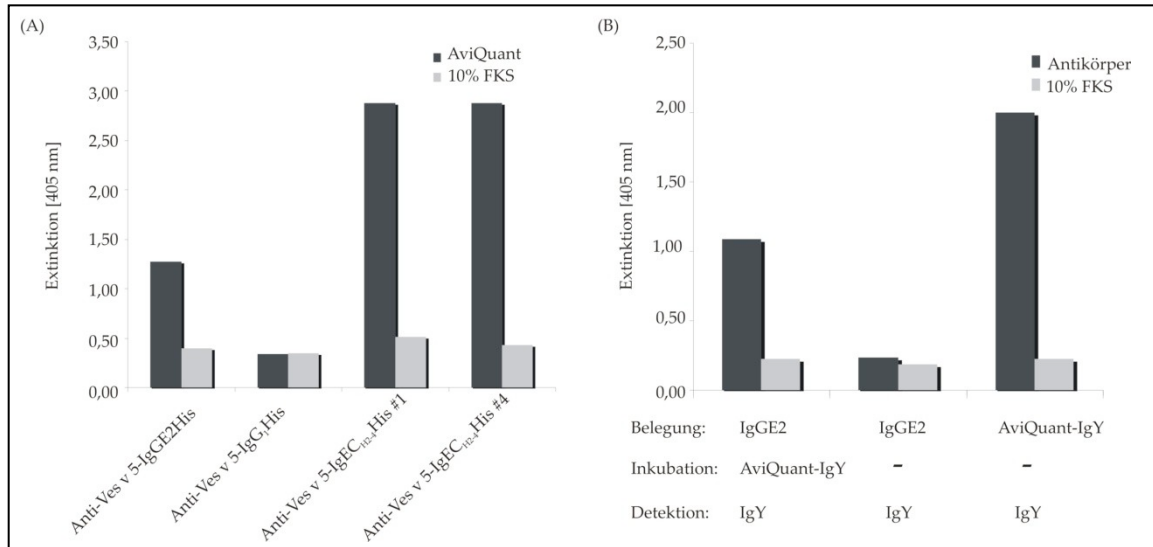


Abb. 25: ELISA Analyse zur Überprüfung der IgE Rezeptorbindung des in HEK293-Zellen exprimierten Anti – Ves v 5-IgGE2His Antikörper-Konstruktes. (A) Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 μ l ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) AviQuant-IgY pro Vertiefung über Nacht belegt, mit 10% FKS haltigem DMEM blockiert und mit 50 μ l der Überstände der stabilen Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das polyklonale Anti-human-IgG-AP Konjugat (1 : 20000 in 10% FKS haltigem DMEM). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 10% FKS haltiges DMEM verwendet. (B) Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 μ l ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) Anti – Ves v 5-IgGE2His (GE2) bzw. AviQuant-IgY pro Vertiefung über Nacht belegt und mit 5% MPBS blockiert. Anschließend wurden 50 μ l AviQuant-IgY bzw. 5% MPBS (-) inkubiert. Als Detektionsantikörper diente das polyklonale Anti-IgY-AP Konjugat (IgY) (1 : 5000 in 2% MPBS). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 10% FKS haltiges DMEM verwendet.

In Abb. 25 kann eine deutliche Reaktivität des Anti-Ves v 5-IgGE2His Antikörper-Konstruktes gezeigt werden, wodurch die Expression des IgEC_{H3-4} Domänen der schweren Kette nachgewiesen werden konnte. Die Expression des intakten IgGE2 Antikörper-Konstruktes und die Bindung der Fc Domänen des IgE Isotyps an den Rezeptor konnte hiermit gezeigt werden. Dies bedeutet, dass neben der Expression der IgE Domänen ebenfalls eine korrekte Faltung und somit eine funktionelle Bindung bestätigt werden konnte.

4.3. Darstellung einer avianen immunen Antikörper-Bibliothek unter Berücksichtigung unterschiedlicher Klonierungsstrategien

Zur Erstellung einer immunen wespengift-spezifischen Antikörper-Bibliothek wurde das aviane Immunsystem genutzt. Dieses hat den Vorteil, dass man durch ein Oligonukleotid-Paar alle variablen Regionen der schweren Kette und durch ein weiteres das vollständige Repertoire an variablen Regionen der leichten Kette amplifizieren kann. Ebenfalls ist die Überprüfung der Immunisierung vereinfacht, da hierbei kein Serum vom Tier entnommen werden muss, sondern die im Huhn entstehenden Antikörper aus den Eiern leicht zu isolieren sind.

4.3.1. Analyse der Immunisierungen

Zur Erstellung einer avianen Antikörper-Bibliothek wurde ein Huhn von der Firma Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien) mit Venomil® Wespengift (Bencard Allergie GmbH, München) immunisiert. Die Immunisierung erfolgte in drei Schritten, wobei nach jedem Immunisierungsschritt die Eier gesammelt wurden. Nach der finalen Immunisierung wurde das Huhn P005 getötet und die Milz entnommen. Die polyklonalen IgY Antikörper wurden aus den Eigelben mittels $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung erhalten und anschließend auf ihre Reaktivität gegenüber Wespengiftallergenen hin analysiert. (AlaBLOT, DPC Biermann, Bad Nauheim) (Abb. 26).

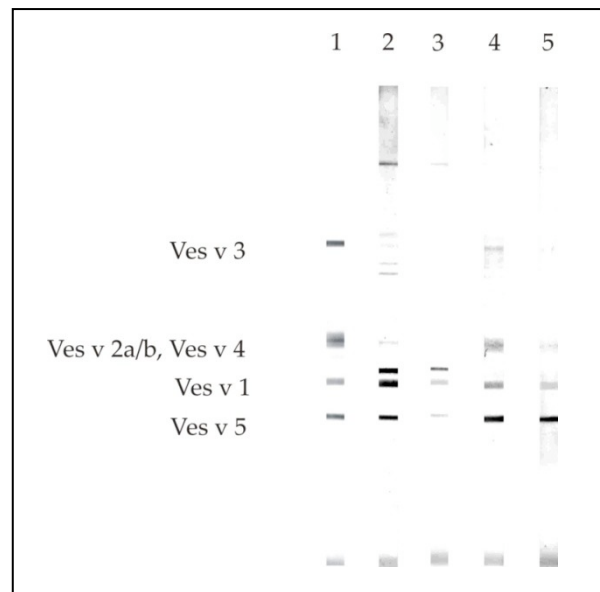


Abb. 26: AlaBLOT Analyse zur Überprüfung der Immunisierung des Huhnes P005 mit Wespengift. Die AlaBLOT Streifen wurde mit den polyklonalen IgY-P005 in 2% MPBS bzw. einem Pool aus Spenderseren 2% MPBS inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das polyklonale Anti-IgY-AP Antikörper-Konjugat (1 : 2000 in 2% MPBS) zur Detektion der polyklonalen IgY und für den AlaBLOT mit den Spenderseren wurde ein monoklonales Anti-human-IgE-AP Konjugat (1 : 1000 in 2% MPBS) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels AP-spezifischem Detektionspuffer und NBT/BCIP. 1: Pool aus Spenderseren von Wespengiftallergikern (1 : 5), 2: IgY-P005 nach dem zweiten Immunisierungsschritt (1 : 100), 3: IgY-P005 nach dem zweiten Immunisierungsschritt (1 : 1000), 4: IgY-P005 nach dem dritten Immunisierungsschritt (1 : 1000), 5: IgY-P005 nach dem dritten Immunisierungsschritt (1 : 5000).

Bei dem Vergleich des AlaBLOT Streifens, der mit Spenderseren von Wespengiftallergikern inkubiert wurde und den Streifen den polyklonalen IgY Antikörper aus den unterschiedlichen Immunisierungsschritten kann man deutlich erkennen, dass jeweils eine Bande in Höhe der Allergene Ves v 1, Ves v 2a, Ves v 2b, Ves v 3, Ves v 4 und Ves v 5 detektiert wird. Um die erhaltenen polyklonalen IgY auch auf Bindung nativ gefalteter Allergen zu überprüfen, wurden diese in einer ELISA Analyse untersucht. Hierfür wurden die in unserer Arbeitsgruppe vorliegenden, rekombinant erzeugten Wespengiftallergene verwendet (Abb. 27). Als Kontrolle dienten polyklonale IgY, die aus einem Ei des Huhns P005 vor der Immunisierung stammten.

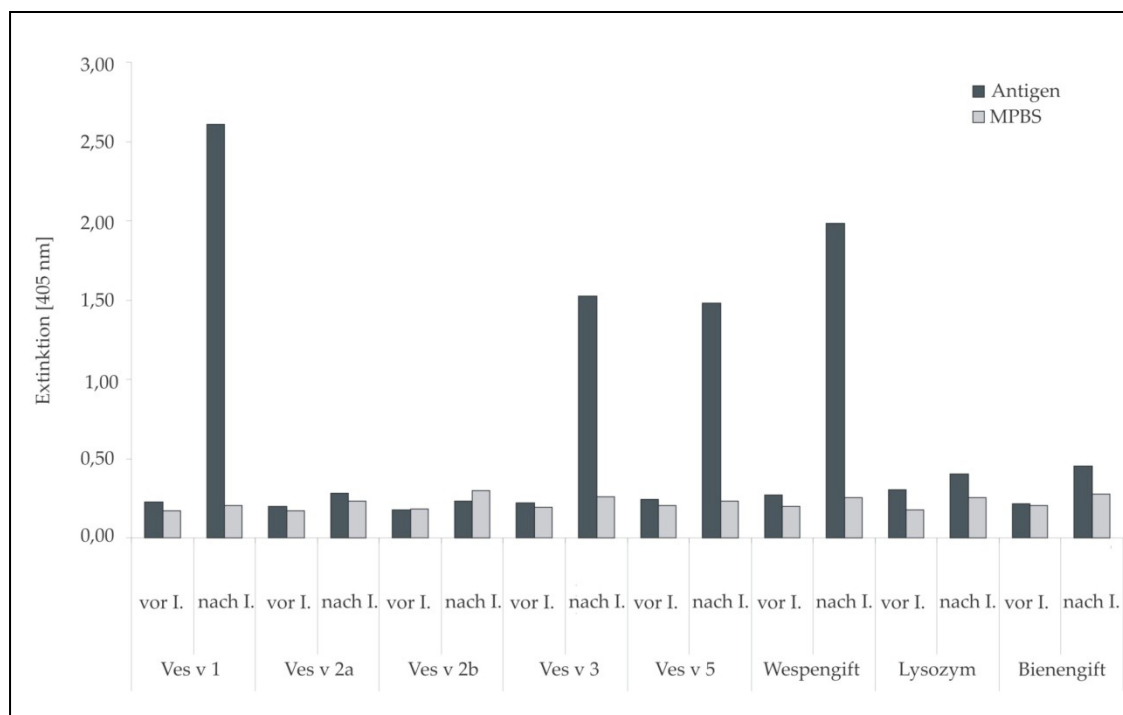


Abb. 27: ELISA Analyse zur Überprüfung der Immunisierung (I.) des Huhnes P005 mit Wespengift. Die Mikrotiterplatte wurde mit je 20 µl ($c = 30 \mu\text{g/ml}$) Allergen Ves v 1, Ves v 2a, Ves v 2b, Ves v 3, Ves v 5, Wespengift, Lysozym und Bienengift über Nacht belegt, mit 4% MPBS blockiert und mit 20 µl der polyklonalen IgY-P005 (nach I.) ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) in 2% MPBS bzw. der polyklonalen IgY-P005 (vor I.), aus dem nicht immunisierten Ei ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) in 2% MPBS inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das polyklonale Anti-IgY-AP Konjugat (1 : 2000 in 2% MPBS). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels AP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 4% MPBS verwendet.

In der ELISA Analyse ist deutlich zu erkennen, dass nach der Immunisierung mit dem Wespengift eine deutliche Anreicherung spezifischer Antikörper gegen die einzelnen Allergene Ves v 1, Ves v 3 und Ves v 5 aus dem Wespengift erfolgte. Als Kontroll-Antigene wurden sowohl Lysozym als auch Bienengift von Latoxan (Valence, Frankreich) verwendet, welche nicht von den polyklonalen IgY-P005 erkannt wurden. Es konnte somit eine spezifische Antikörper-Antwort des Huhns auf Wespengift und einzelne Allergene nachgewiesen werden, wodurch eine erfolgreiche Immunisierung bestätigt werden konnte.

4.3.2. Darstellung der variablen Ketten

Zur Gewinnung der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten und anschließender Klonierung in den Phagemidvektor die Milz des Huhns P005

entnommen und die RNA isoliert und genspezifisch, mit den Oligonukleotiden *Genspez vH* für v_H und *IgYlc back* für v_L , und *oligo(dT)* Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben. Die variablen Regionen der schweren Kette wurden anschließend mit den Oligonukleotiden *chicken vh for* und *chicken vh back*, die variablen Regionen der leichten Kette mit den Oligonukleotiden *chicken vl for* und *chicken vl back* amplifiziert (Abb. 28) und gereinigt. Durch die Amplifikation der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase), einem Enzym der Glycolyse, welches ubiquitär vorkommt, wurde die Generierung der cDNA (*oligo (dT)* umgeschrieben) überprüft. Das Gen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden, *Chgapdhfor* und *Chgapdhback*, amplifiziert. Hierbei konnte eine erfolgreiche cDNA-Synthese bestätigt werden.

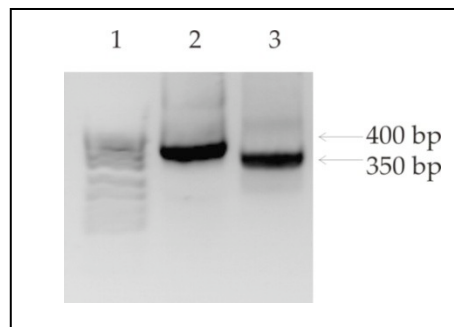


Abb. 28: Gelelektrophoretische Analyse der Amplifikation der leichten und schweren variablen Regionen. Die Analyse erfolgte auf einem analytischen 1.5%igen Agarosegel mittels Ethidiumbromidfärbung. Bahn 1: Marker 23 pUC19 DNA/*MspI*, Bahn 2: P005 v_H , Bahn 3: P005 v_L .

Nach Erhalt der variablen Regionen wurden unterschiedliche Möglichkeiten zur Darstellung einer scFv-Bibliothek verfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Optionen der Klonierung mittels der *StarGate® combinatorial cloning* Technologie und des *Gateway™* Systems untersucht (Abb. 29). Diese Techniken sind durch ihre Klonierungsstrategien (homologe Rekombination und Restriktion/Ligation) und anhand der entstehenden Überhänge ziemlich unterschiedlich. Dadurch kann gut evaluiert werden welche Strategie schnell zu einer hohen Diversität bzw. großen Bibliothek führt. Bei der *StarGate®* Technologie erfolgt die Klonierung über Restriktion und Ligation in einem Schritt. Die *Gateway™* Technologie ist eine Klonierungstechnik, in der scFv mittels Rekombination in den Destinationsvektor eingeführt werden. Da diese Technik einen scFv für die Klonierung in den Phagenmidvektor benötigt wurde die Möglichkeit 2 erst nach der Fusionsreaktion der *StarGate®* Technologie verfolgt.

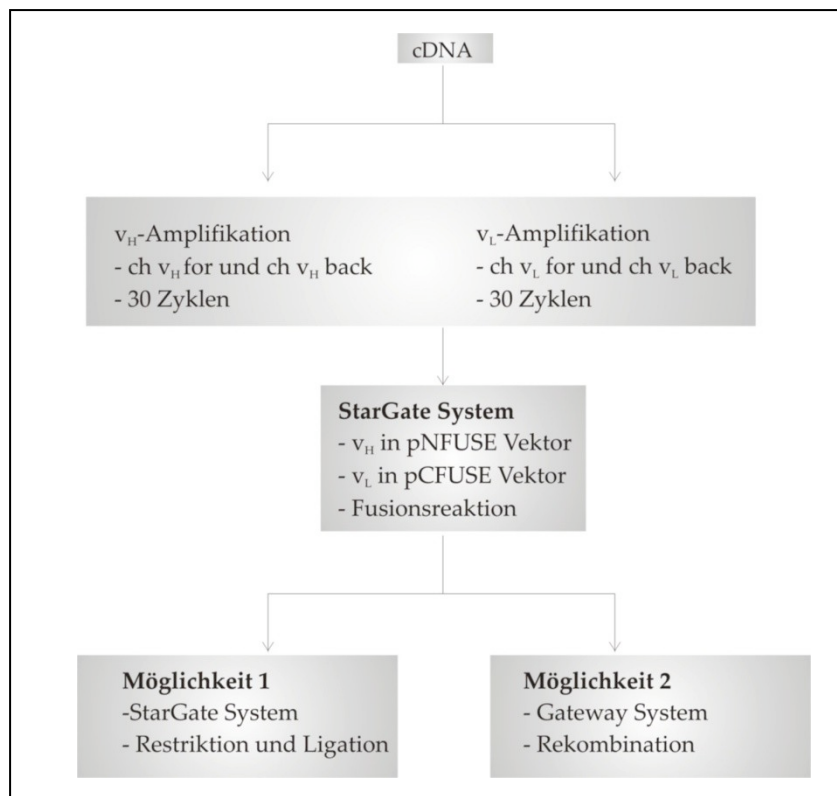


Abb. 29: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Klonierungsmöglichkeiten der avianen wespengift-spezifischen Antikörper-Bibliothek. Die Gateway™ Technologie konnte erst nach Fusion der variablen Regionen mittels der StarGate® Technologie angewendet werden.

4.3.3. Klonierung der variablen Regionen mittels der StarGate®

combinatorial cloning Technologie

Die Klonierungen der einzelnen variablen Regionen sollten mittels StarGate® *combinatorial cloning* Technologie in einen Phagemidvektor durchgeführt werden. Hierfür sollten die einzelnen variablen Regionen der leichten und der schweren Kette erst amplifiziert und anschließend mit den nötigen Erkennungssequenzen für das Typ 2S Restriktionsenzym versehen werden. Diese Art von Enzymen schneidet DNA Stränge eine gewisse Nukleotidanzahl nach bzw. vor den Erkennungssequenzen. Dies ermöglicht das Einfügen spezifischer Überhänge, welche anschließend die gerichtete Ligation in die jeweiligen Vektoren erlauben. Die Überhänge unterstützen weiterhin die gerichtete Fusion der variablen Regionen in den Vektor pENTRY-IBA20. Abschließend wird der fusionierte scFv in den Phagemidvektor, der neben einem Streptavidin-tag ebenfalls einen His-tag trägt, transferiert (Abb. 30). Durch das Vorliegen

unterschiedlicher Resistenzgene in den verschiedenen Vektoren erfolgt nach der Transformation die Selektion der gewünschten, mit den variablen Regionen versehenen, Zielvektoren.

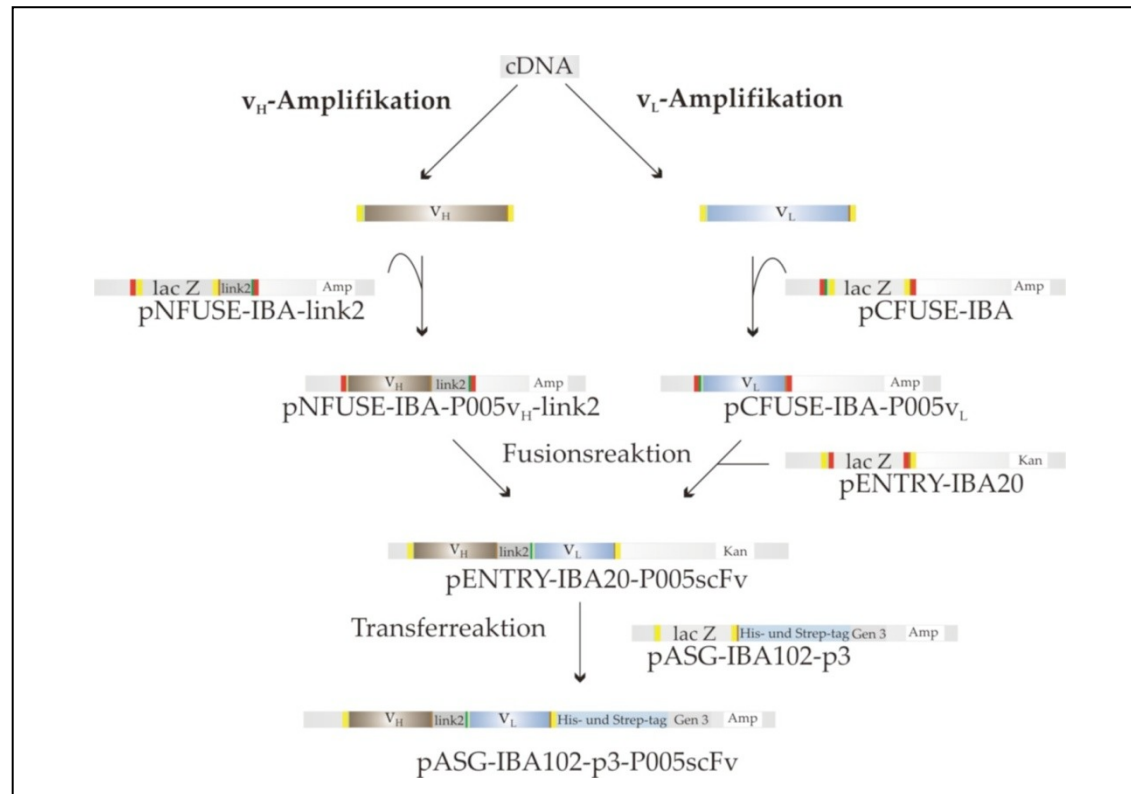


Abb. 30: Schematische Darstellung der StarGate®-Klonierung der avianen wespengift-spezifischen Antikörper-Bibliothek. Nach der Amplifikation der variablen Regionen der leichten (v_L) bzw. der schweren (v_H) Kette werden die gereinigten PCR Produkte in die jeweiligen Vektoren pCFUSE-IBA bzw. pNFUSE-IBA-link2 kloniert. Anschließend werden v_L und v_H in einer Fusionsreaktion miteinander zu einem scFv fusioniert und in den Vektor pENTRY-IBA20 überführt. Abschließend wird der gesamte scFv in den Destinationsvektor pASG-IBA102-p3 transferiert. Die unterschiedlichen Erkennungssequenzen der Typ 2S Restriktionsenzyme sind in verschiedenen Farben dargestellt und flankieren die Bereiche des lacZ-Gens bzw. der v_H und v_L Fragmente.

4.3.3.1. Generierung des Vektors pNFUSE-IBA-P005v_H-link2

Zur Amplifikation der variablen Regionen der schweren Kette des mit Wespengift immunisierten Huhns P005 wurden die Oligonukleotide *SG-CHIVH_{for}* und *SG-CHIVH_{back}*, welche die benötigten Sequenzen für die Schnittstellen des Typ 2S Enzyms trugen, verwendet. Die Fragmente wurden amplifiziert und gereinigt. Die Konzentration der gereinigten v_H Fragmente wurde anschließend densitometrisch auf einem 1%igen Agarosegel mittels *Quantity one®* (Bio-Rad laboratories GmbH, München)

auf 55.7 ng/μl bestimmt. Die gereinigten Fragmente wurden in einer finalen Konzentration von 1 ng/μl für die Reaktion eingesetzt und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag mittels Alkoholpräzipitation gefällt. TOP10-Zellen wurden mit dem Ansatz transformiert, auf TYE-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt, wobei die Größe der Subbibliothek 4.24×10^6 Transformanden betrug. Anschließend wurden zehn Kolonien mit den Oligonukleotiden *chicken vh for* und *chicken vh back* mittels PCR überprüft. Da alle analysierten Klone eine Bande in der erwarteten Größe aufwiesen, wurden die Kolonien von den Platten geschabt und eine 100 ml 2YT-Amp-Kultur mit der Zellsuspension der Subbibliothek bis zu einer OD_{600nm} von 0.1 inokuliert. Aus 10 ml der 100 ml Kultur wurde die Plasmid DNA gereinigt und anschließend eine Konzentration von 12 ng/μl bestimmt. Somit stand der Vektor pNFUSE-IBA-P005_{VH}-link2 für die Fusionsreaktion zur Verfügung.

4.3.3.2. Generierung des Vektors pCFUSE-IBA1-P005_{VL}

Zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten Kette des mit Wespengift immunisierten Huhnes P005 wurden die Oligonukleotide *SG-CHIVL for* und *SG-CHIVL back*, welche die benötigten Sequenzen für die Schnittstellen des Typ 2S Enzyms trugen, verwendet. Die Fragmente amplifiziert und gereinigt. Die Konzentration der gereinigten _{VL} Fragmente wurde anschließend densitometrisch auf einem 1%igen Agarosegel mittels *Quantity one*® (Bio-Rad laboratories GmbH, München) auf 23.3 ng/μl bestimmt. Die gereinigten Fragmente wurden in einer finalen Konzentration von 1 ng/μl für die Reaktion eingesetzt und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag mittels Alkoholpräzipitation gefällt. TOP10-Zellen wurden mit dem Ansatz transformiert, auf TYE-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt, wobei die Größe der Subbibliothek 1.8×10^6 Transformanden betrug. Zehn Kolonien wurden mittels PCR und den Oligonukleotiden *chicken vl for* und *chicken vl back* überprüft. Alle analysierten Klone trugen eine aviane _{VL}. Die Kolonien wurden von den Platten geschabt und eine 100 ml

2YT-Amp-Kultur mit der Zellsuspension der Subbibliothek bis zu einer OD_{600nm} von 0.1 inokuliert. Von 10 ml der 100 ml Kultur wurde die Plasmid DNA gereinigt und anschließend eine Konzentration von 24 ng/ μ l bestimmt. Der Vektor pCFUSE-IBA1-P005_{VL} stand somit für die Fusionsreaktion zur Verfügung.

4.3.3.3. Fusionreaktion unter Verwendung des Vektors pENTRY-IBA20

Nachdem die Vektoren pNFUSE-IBA-P005_{VH}-link2 und pCFUSE-IBA1-P005_{VL} amplifiziert, gereinigt und die Konzentrationen von 12 ng/ μ l für den Vektor pNFUSE-IBA-P005_{VH}-link2 und von 24 ng/ μ l für den Vektor pCFUSE-IBA1-P005_{VL} bestimmt wurden, konnten die beiden variablen Regionen fusioniert werden. Hierfür wurden beide Vektoren in der nächsten Reaktion in einer finalen Konzentration von 1 ng/ μ l eingesetzt und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C gelagert, am nächsten Tag wurden XL10Gold-Zellen mit dem Ansatz transformiert, auf TYE-Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Klone wurden ausgezählt, die Größe der Subbibliothek betrug bei 2×10^5 Transformanden. Zehn Kolonien wurden mit den Oligonukleotiden *chicken vh for* und *chicken vl back* mittels PCR überprüft. Alle analysierten Kolonien zeigten in eine Bande in der erwarteten Höhe. Drei positive Kolonien kultiviert, die Plasmid DNA wurde gereinigt und einer Sequenzanalyse unterworfen. Alle sequenzierten Kolonien trugen unterschiedliche aviane scFv.

Die Kolonien wurden von den Platten geschabt und eine 100 ml 2YT-Kan-Kultur mit der Zellsuspension der Subbibliothek bis zu einer OD_{600nm} von 0.1 inokuliert. Aus 10 ml der 100 ml Kultur wurde die Plasmid DNA gereinigt und anschließend die Konzentration bestimmt. Der Fusionsvektor pENTRY-IBA20-P005scFv stand somit für die Transferreaktion in den Destinationsvektor zur Verfügung.

4.3.3.4. Transferreaktion in den Vektor pASG-IBA102-p3

Nachdem der Vektor pENTRY-IBA-20-P005scFv amplifiziert, gereinigt und eine Konzentration von 303 ng/ μ l bestimmt wurde, wurden die erhaltenen scFv in den finalen Vektor pASG-IBA102-p3 transferiert. Dieser Vektor beinhaltet zusätzlich das

GenIII und kann somit für eine anschließende Expression des scFv auf der Oberfläche eines M13 Bakteriophagen verwendet werden. Hierfür wurde der Vektor pENTRY-IBA20-P005scFv in einer finalen Konzentration von 1 ng/μl in der Transferreaktion eingesetzt, die Reaktion für 1 h bei 30 °C inkubiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden F-pilus tragende XL10Gold-Zellen mit dem Ansatz transformiert, auf TYE-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Kolonien wurden ausgezählt, die Größe der Subbibliothek betrug dabei 1×10^5 Transformanten. Es wurden zehn Kolonien mittels PCR und den Oligonukleotiden *chicken vh for* und *chicken vl back* überprüft. Neun von zehn analysierten Kolonien zeigten eine Bande in der erwarteten Höhe. Fünf positive Kolonien wurden kultiviert, die Plasmid DNA gereinigt und einer Sequenzanalyse unterworfen (Abb. 31).



Abb. 31: Sequenz-Analyse der variablen Regionen der pASG-IBA102-P005scFv-p3 Klone. (A) der schweren Kette, (B) der leichten Kette. Die erhaltenen Sequenzen der Klone 1 - 5 wurden einem *Alignment* unterzogen und die CDR sind umrahmt.

Nachdem festgestellt wurde, dass alle sequenzierten Kolonien unterschiedliche aviane scFv trugen, wurden die Kolonien von den Platten geschabt und konnten so als Ausgangsbibliothek für eine Selektion eingesetzt werden.

4.3.4. Darstellung einer avianen Antikörper-Bibliothek mit Hilfe der *Gateway*TM Technologie

Eine aviane Antikörper-Bibliothek kann entweder durch Restriktion und anschließender Ligation, oder aber auch durch eine homologe Rekombination mit Hilfe der *Gateway*TM Technologie dargestellt werden^{109, 110}. Neben der klassischen Klonierung über

Restriktion und Ligation sollte in einem weiteren System die Möglichkeit der Klonierung einer scFv Bibliothek durch homologe Rekombination evaluiert werden. Hierfür wurde die *Gateway*TM Technologie, die auf dem Rekombinationssystem des lambda Bakteriophagen aus *E. coli* basiert, verwendet. Für den Lebenszyklus eines lambda Bakteriophagen gibt es zwei Möglichkeiten, einmal den lytischen Zyklus, der zur Zerstörung der Wirtszelle führt und den lysogenen Zyklus, bei dem die orts-spezifische Integration des Phagen-Genoms in das Genom der Wirtszelle stattfindet. Durch die Replikation der Wirtszelle wird beim lysogenen Zyklus ebenfalls die DNA des Phagen vermehrt, zur Freisetzung entfernt der Phage anschließend seine genetischen Informationen aus dem Genom der Wirtszelle was zur Lyse der Zelle führt. Dieser Mechanismus der orts-spezifischen Integration von genetischem Material kann auch für die Klonierung genutzt werden, wobei spezifische Sequenzen (*attachment sites*) von 25 bp an das zu klonierende Gen angefügt werden. Diese flankierenden Bereiche entsprechen den *sites* im Bakteriophagen und werden bei den folgenden Reaktionen spezifisch gebunden, geschnitten und wieder kovalent verknüpft. Um die beiden Zyklen des Bakteriophagen nutzen zu können werden spezifische Enzyme verwendet. Durch Einsatz der λ -Integrase (*Int*) aus dem *E. coli integration host factor* (IHF) wird der lysogene Zyklus nachgeahmt. Dies ist Bestandteil des BP Clonase Enzym Mixes. Der entstandene *Entry*-Vektor wird in einer weiteren Reaktion mit einem so genannten LR Clonase Enzym Mix, der eine λ -*Int*, IHF und λ -*Excisionase* (*Xis*) beinhaltet, versetzt. Die Vektoren, die für die beiden Reaktionen verwendet werden, beinhalten das *ccdB*-Gen. Dieses Gen gilt als „Selbstmord-Gen“, da es mit der *E. coli* Gyrase interagiert, diese inhibiert¹²³ und somit zur Lyse der Zelle führt. Ein grundlegender Mechanismus der *Gateway*TM Technologie basiert auf dem toxischen *ccdB*-Gen und seinem Antidot, dem *ccdA*-Gen. Der Destinationsvektor pHEN2-Dest-*ccdB*-CAT3.1 beinhaltet neben dem bereits erwähnten *ccdB*-Gen ebenfalls eine Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) Kassette um die Insertion der scFv-Fragmente zu ermöglichen (Abb. 32). Dieser Vektor lag im Arbeitskreis bereits vor¹²⁴.

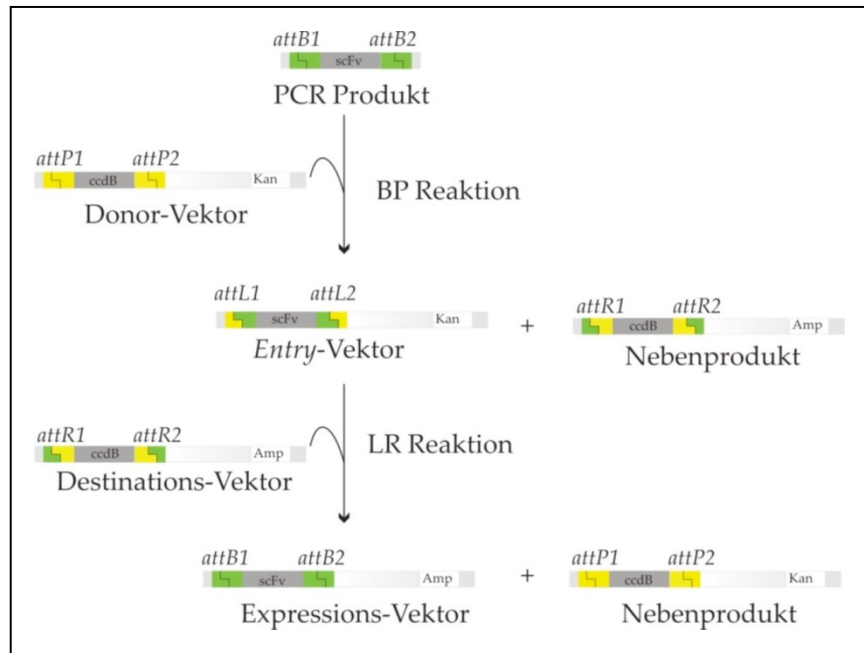


Abb. 32: Schematische Darstellung der homologen Rekombination der avianen wespengift-spezifischen Antikörper-Bibliothek mit Hilfe der Gateway™ Technologie. Nachdem die flanierenden Bereiche (*attachment sites*, *att*) mittels einer PCR angefügt wurden, wurde das Produkt mittels BP Reaktion in den Entry-Vektor überführt. Anschließend wird der scFv mittels LR Reaktion in den Expressionsvektor kloniert. Die unterschiedlichen *attachment sites* der einzelnen Reaktionen sind in verschiedenen Farben dargestellt und flankieren die Bereiche des *ccdB*-Gens bzw. der scFv-Fragmente. Die Abkürzungen B, P, L und R basieren auf dem Rekombinationssystem des Lambda Bakteriophagens aus *E. coli*.

4.3.4.1. Amplifikation und Anfügen der *attB sites* des P005scFv

Zur Amplifikation und Anfügen der *attB Sites* der P005scFv wurden von der Fusionsreaktion pENTRY-IBA20-P005scFv 0.2 µl entnommen, da diese den vollständigen scFv beinhaltet, und mit den Oligonukleotiden *Ch vH attB1 for* und *Ch vL attB2 back*, welche die benötigten Sequenzen für *attB sites* trugen amplifiziert und gereinigt. Die Konzentration des Amplifikates wurde sowohl mittels eines NanoDrop ND-1000 Gerätes als auch densitometrisch auf einem 1%igen Agarosegel mittels *Quantity one®* (Bio-Rad laboratories GmbH, München) bestimmt. Die avianen scFv standen somit für die BP Reaktion zur Verfügung.

4.3.4.2. BP Reaktion zur Generierung des Entry-Vektors

Nun sollte das scFv Fragment in den Donorvektor pDONR™201 mittels homologer Rekombination eingebracht werden. Hierfür wurde die Konzentration des Amplifikates bestimmt, welche bei 11 ng/µl lag. Anschließend wurde, wie im Methodenteil

beschrieben, die BP Reaktion durchgeführt. Es wurden TOP10 Zellen mit der Reaktion transformiert, auf TYE-Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Klone gezählt, die Größe der Subbibliothek betrug 2.7×10^6 Transformanten. Zehn Kolonien wurden mittels PCR und den Oligonukleotiden *chicken vh for* und *chicken vl back* überprüft. Sieben von zehn analysierten Kolonien zeigten eine Bande in der erwarteten Höhe. Zwei positive Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert, die Plasmid DNA gereinigt und einer Sequenzanalyse unterworfen. Die sequenzierten Kolonien trugen unterschiedliche aviane scFv.

Die Kolonien wurden von den Platten geschabt und eine 100 ml 2YT-Kan-Kultur mit der Zellsuspension der Subbibliothek bis zu einer OD_{600nm} von 0.1 inokuliert. Aus 10 ml der 100 ml Kultur wurde die Plasmid DNA gereinigt und anschließend die Konzentration bestimmt. Der *Entry*-Vektor pDonor-P005scFv stand somit für die LR Reaktion zur Verfügung.

4.3.4.3. LR Reaktion zur Generierung des Expressions-Vektors

Nachdem die Sequenzanalyse auf eine erfolgreiche Insertion der avianen scFv in den Donorvektor pDONRTM201 hinwies, sollten die scFv Fragmente durch die LR Reaktion in den Destinationsvektor überführt werden.

Die LR Reaktion wurde, wie im Methodenteil beschrieben, mit der LR Clonase I durchgeführt. Es wurden TOP10 Zellen mit der LR Reaktion transformiert, die Zellen auf TYE-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt, die Größe der Bibliothek betrug 2×10^6 Transformanten. Es wurden zehn Kolonien mittels PCR und den Oligonukleotiden *chicken vh for* und *chicken vl back* überprüft. Alle analysierten Kolonien zeigten eine Bande in der erwarteten Höhe. Die Kolonien wurden von den Platten geschabt und eine 100 ml 2YT-Amp-Kultur mit der Zellsuspension der Subbibliothek bis zu einer OD_{600nm} von 0.1 inokuliert. Aus 10 ml der 100 ml Kultur wurde die Plasmid DNA gereinigt und anschließend die Konzentration bestimmt. Der Destinationsvektor pHEN-Dest-P005scFv stand somit für die Transformation in F-pilus tragende Zellstämme zur Verfügung.

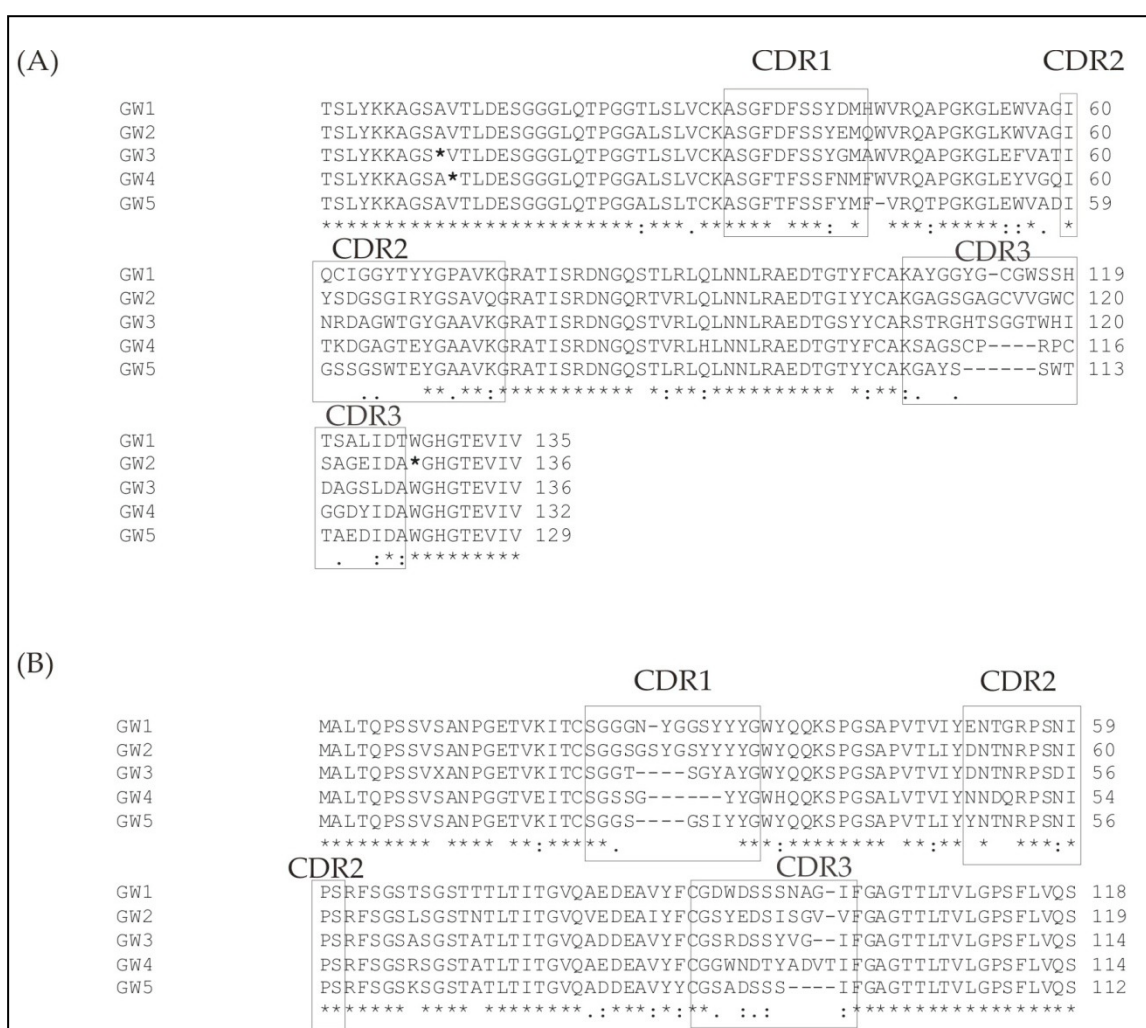


Abb. 33: Sequenz-Analyse variablen Regionen der pHEN-Dest-P005scFv Klone. (A) der schweren Kette, (B) der leichten Kette. Die erhaltenen Sequenzen der Klone (GW) 1 - 5 wurden einem *Alignment* unterzogen um die unterschiedlichen CDR besser vergleichen zu können. Die *frameshifts* wurden mit einem * in der Aminosäuresequenz und sind dadurch in einem Leserahmen dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den sequenzierten Kolonien um unterschiedliche aviane scFv handelt. Drei scFv wiesen jedoch einen *frameshift* auf. Die eigentliche Bibliotheksgröße entspricht eher der Top10-Transformation, also 2×10^6 da nur ca. 60% der aktuellen Bibliothek einen avianen scFv tragen. Die Kolonien wurden anschließend von den Platten geschabt und konnten so als Bibliothek für eine Selektion eingesetzt werden.

4.3.5. Selektion

Die erhaltenen Bibliotheken „StarGate®“-P005scFv und „Gateway™“-P005scFv sollten nun als Kontrolle gegen das im Wespengift in hoher Konzentration vorkommende Majorallergen Ves v 5 selektiert werden.

Die Selektion erfolgte in mehreren Runden. Die Superinfektion wurde mit unterschiedlichen Helferphagen durchgeführt, die unterschiedliche Elutionswege ermöglichen. In der ersten Selektionsrunde wurden M13KO7-Phagen eingesetzt, die mittels *pH-shift* entweder basisch oder sauer eluiert werden können. Somit wird gewährleistet, dass in der 1. Runde auch Phagen, die nur eine schwache Bindung zu der Zielstruktur aufweisen, für weitere Selektionsrunden erhalten werden. Um die Spezifität zu erhöhen können wurde in den weiteren Selektionsrunden pKM13-Phagen verwendet, die eine Trypsin-Spaltstelle aufweisen und tryptisch eluiert werden können.

4.3.6. pASG-P005scFv Bibliothek gegen Ves v 5

Für die Selektion der „StarGate®“-Bibliothek gegen Ves v 5 wurde in allen drei Selektionsrunden rekombinant exprimiertes Ves v 5 eingesetzt.

Es wurde über Nacht in ein Immunoröhrchen 1 ml rekombinantes Ves v 5 ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) gegeben und bei 4°C auf einem Rollbrett inkubiert. In der ersten Runde wurde mit den Helferphagen M13KO7 superinfiziert. Die rekombinanten Phagen wurden mittels *pH-shift* basisch eluiert. In der zweiten und dritten Selektionsrunde wurden die erhaltenen Amplifikationen mit den Helferphagen pKM13 infiziert und spezifisch tryptisch eluiert. Hierfür wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung in das Immunoröhrchen gegeben, und das Trypsin nach 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml

FKS haltigem DMEM inhibiert wurde. Nach den drei Selektionsrunden wurden die erhaltenen Phagen jeder Runde mittels polyklonaler ELISA Analyse untersucht. Es konnte jedoch keine Anreicherung spezifisch-bindender Phagen erreicht werden.

4.3.7. pHEN-Dest-P005scFv Bibliothek gegen Ves v 5

Für die Selektion der „Gateway™“-Bibliothek gegen Ves v 5 ebenfalls rekombinant exprimiertes Ves v 5 eingesetzt.

Es wurden über Nacht in ein Immunröhrchen 1 ml rekombinantes Ves v 5 ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) gegeben und bei 4°C auf einem Rollbrett inkubiert. In der ersten Runde wurde mit den Helferphagen M13KO7 superinfiziert. Die rekombinanten Phagen wurden unspezifisch mittels pH-shift basisch eluiert. In der zweiten und dritten Selektionsrunde wurden die erhaltenen Zellen mit den Helferphagen pKM13 superinfiziert und spezifisch tryptisch eluiert. Hierfür wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung in das Immunröhrchen gegeben, und das Trypsin nach 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml FKS haltigem DMEM inhibiert wurde. Nach den drei Selektionsrunden wurden die erhaltenen Phagen jeder Runde mittels polyklonaler ELISA Analyse untersucht (Abb. 34).

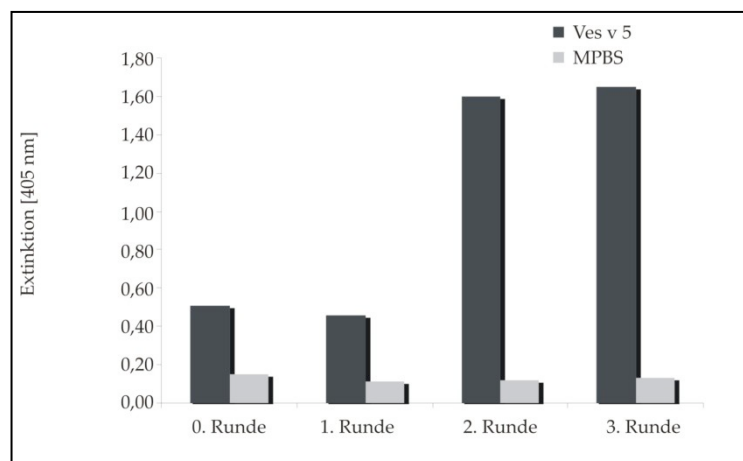


Abb. 34: ELISA Analyse der polyklonalen Phagen der Selektion gegen Ves v 5. Die Mikrotiterplatte wurde mit je $50 \mu\text{l}$ ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) Allergen Ves v 5 pro Vertiefung über Nacht belegt, mit 4% MPBS blockiert und mit $50 \mu\text{l}$ der polyklonalen Phagen der unterschiedlichen Selektionsrunden in einer 1 : 2 Verdünnung in 2% MPBS inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das polyklonale Anti-M13-HRP Konjugat (1 : 2000 in 2% MPBS). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels HRP-Detektionslösung. Als Kontrolle wurde 4% MPBS verwendet.

Das polyklonale Phagengemisch aus der zweiten und dritten Selektionsrunde zeigte eine starke Anreicherung von Phagen mit spezifischer Reaktivität gegenüber Ves v 5. Da die Analyse der zweiten Selektionsrunde auf monoklonaler Phagenebene kein Ergebnis zeigte wurde aus diesem Grund anschließend die dritte Selektionsrunde auf Ebene der monoklonalen Phagen in einer ELISA Analyse untersucht. Die Reaktivitäten der monoklonalen Phagen der dritten Selektionsrunde sind in Abb. 35 gezeigt.

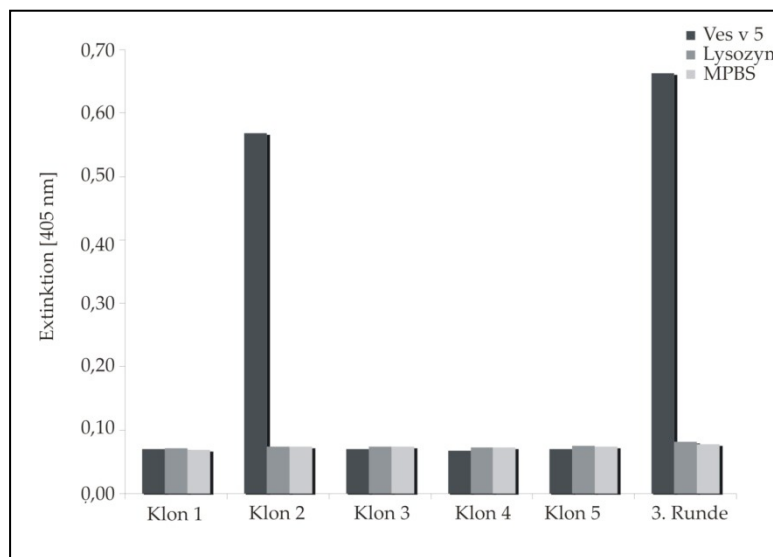


Abb. 35: ELISA Analyse der monoklonalen Phagen der dritten Selektionsrunde. Die Mikrotiterplatte wurde mit je 50 µl (c = 50 µg/ml) Allergen Ves v 5 und Lysozym pro Vertiefung über Nacht belegt, mit 4% MPBS blockiert und mit 50 µl der monoklonalen Phagenklone in einer 1 : 2 Verdünnung in 2% MPBS inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente das polyklonale Anti-M13-HRP Konjugat (1 : 2000 in 2% MPBS). Die Detektion erfolgte bei 405 nm mittels HRP-Detektlösung. Als Kontrolle wurde 4% MPBS verwendet, als Positiv-Kontrolle wurden die Phagen der 3. Selektionsrunde verwendet.

Der Phagenklon #2 der dritten Selektionsrunde zeigte eine deutliche Reaktivität gegenüber Ves v 5. Die *E. coli* Zellen des Klons #2 wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert, die Plasmid DNA gereinigt und einer Sequenzanalyse unterworfen. Die Sequenz des Klons #2 ist in Abb. 36 gezeigt.

(A)

T	S	L	Y	K	K	A	G	S	A	V	T	L	D	E	S	G	G	G	L
Q	T	P	K	G	G	L	S	L	V	C	E	A	S	G	F	T	F	N	S
Y	D	M	M	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	F	V	A	G	I
S	N	D	G	S	D	T	G	Y	G	A	A	V	K	G	R	A	T	I	S
R	D	N	G	Q	S	T	V	R	L	Q	L	N	D	L	R	A	E	D	A
G	T	Y	Y	C	A	R	D	H	G	T	C	G	Y	Y	W	D	S	G	C
I	D	A	W	G	H	G	T	E	V	I	V								

(B)

M	A	L	T	Q	P	S	S	V	S	A	N	P	G	E	T	V	E	I	T
C	S	G	G	S	R	Y	Y	S	W	H	Q	Q	K	S	P	G	S	A	P
V	T	V	I	Y	A	N	T	N	R	P	S	N	I	P	S	R	F	S	G
S	A	S	G	S	T	G	T	L	T	I	T	G	V	R	G	E	D	E	A
V	Y	Y	C	G	S	A	D	S	S	T	N	A	T	F	G	A	G	T	T
L	T	V	L	G	P	S	F	L	V	Q	S	G							

Abb. 36: Sequenzanalyse des Klons pHEN-Dest-Ves v 5#2. Die CDR sind farbig markiert. Die CDR1 sind rot, die CDR2 sind grün und die CDR3 sind grau umrahmt. (A) aviane variable Region der schweren Kette (v_H), (B) aviane variable Region der leichten Kette (v_L).

Die Sequenzierung dieses spezifischen Anti-Ves v 5 Antikörperfragmentes zeigte, dass es sich um einen neuen scFv handelt und mit keinem bis dahin sequenzierten Bibliotheksklon übereinstimmt. Dies ist ein weiteres Indiz, dass die klonierte Bibliothek über eine gewisse Diversität verfügt. Der erhaltene Phagenklon steht nun zur Überführung in unterschiedliche Antikörper-Konstrukte zur Verfügung.

Durch die erfolgreiche Selektion konnte gezeigt werden, dass die entstandene „Gateway™“-Bibliothek funktionell ist und nun für weitere Selektionen gegen andere Antigene wie z.B. Ves v 1 aus dem Wespengift zur Verfügung steht.

5. Diskussion

Die Verwendung synthetischer Antikörper-Konstrukte in der Diagnostik bietet enorme Vorteile, da Giftextrakte unterschiedlicher Präparationen unterschiedliche Antigenkonzentrationen aufweisen. Durch die Verwendung synthetischer Antikörper-Konstrukte als Standards könnte somit, in jedem Test analysiert werden ob das jeweilige Antigen in ausreichender Menge vorhanden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insektengift-spezifische scFv, die aus Selektionen mit der semi-synthetische scFv Phagenbibliothek Griffin-1 stammten, in homodimere, bivalente und heterotetramere Antikörper-Konstrukte der Isotypen G und E überführt. Diese allergen-spezifischen Antikörper-Konstrukte wurden anschließend in den diagnostischen *Assay*-Systemen Immulite 2000 und UniCAP 250 analysiert. Hierfür sollten Vollantikörper-Konstrukte generiert werden, die dem nativen IgE Antikörper aus Spenderseren entsprechen. Auf Grund der fehlenden Expression der selektierten scFv als IgE Vollantikörper wurde ein neues chimäres Antikörper-Konstrukt dargestellt. Da eine erfolgreiche Expression der generierten IgG Vollantikörper bereits bestätigt worden war, wurden die chimären Konstrukte aus einer Kombination schwerer Ketten der Isotypen G und E generiert. Die Antikörper-Konstrukte wurden in verschiedenen *Assay*-Methoden analysiert.

Um weitere spezifische Antikörper-Konstrukte zu erhalten, sollte eine aviane immune Antikörper-Bibliothek generiert werden. Die Darstellung einer wespengift-spezifischen Antikörper-Bibliothek bietet den Vorteil, dass durch Immunisierung bereits relevante Antikörper im Huhn produziert wurden, die möglicherweise für eine Epitop Charakterisierung Allergie relevanter Allergene interessant wären. Es wurden zwei Antikörper-Bibliotheken aus dem Immunrepertoire eines mit Wespengift immunisierten Huhns durch unterschiedliche Klonierungstechniken generiert. Diese wurden abschließend zur Überprüfung ihrer Funktionalität zur Selektion gegen das Majorallergen Ves v 5 eingesetzt.

5.1. Allergen-spezifische Antikörper-Konstrukte

Die Giftextrakte der Honigbiene und der Gemeinen Wespe beinhalten neben den bereits bekannten Allergenen viele weitere Komponenten, wie z.B. Melittin (in der Biene) und Mastoparan (in der Wespe), die durch ihre hohe Konzentrationen im Extrakt die Diagnostik erschweren. Einige Allergene sind auch unterrepräsentiert im Giftextrakt, wie zum Beispiel das Bienengiftallergen Api m 10, welches von mehr als 50% der Bienengiftallergiker erkannt wird, jedoch in den Giftextrakten nicht vorhanden ist. Eine unterschiedliche Präparation der Giftextrakte, die in unterschiedlichen Konzentrationen der Antigene resultiert, ist eine der Hauptursachen für die Schwierigkeiten in der Diagnostik von Spenderseren. Hier würden antigen-spezifische Antikörper-Konstrukte den Vorteil bieten, dass in jedem *Assay* die Extrakt-Präparation analysiert werden könnte.

Da in unserer Arbeitsgruppe die Einzelallergene rekombinant exprimiert vorlagen wurde eine Selektion mit der semi-synthetischen Phagenbibliothek Griffin-1 gegen die Allergene durchgeführt. Die durch die *Phage Display* Technologie gewonnen insektengift-spezifischen Antikörper-Fragmente Api m 2, Api m 3, Api m 5, Ves v 3 und Ves v 5 zeigen durch ihre Monovalenz eine geringere funktionelle Affinität und eine Detektion nicht möglich ist. Durch die Fusion dieser scFv mit dem Fc-Teil eines Immunglobulins und anschließender Expression können diese in verschiedenen ELISA Systemen analysiert werden.

5.1.1. Darstellung homodimerer, bivalenter und heterotetramerer Antikörper-Konstrukte

Die selektierten insektengift-spezifischen scFv Fragmente sollten mittels unterschiedlicher *Assay*-Systeme evaluiert werden. Da die Analyse monovalenter scFv Fragmente äußerst schwierig und eine Detektion nicht möglich ist, wurden die Fragmente mit den Fc-Fragment der Antikörper¹²⁵, der mit einem Histidin-*tag* versehen wurde, fusioniert. Dadurch wurde eine Detektion mit einem Fc-spezifischen Antikörper ermöglicht. Durch die Deletion der C_{H1}-Region der Konstrukte konnte bereits ein erhöhtes Expressionsniveau erzielt werden. Grund hierfür ist das geringere

Molekulargewicht, welches zu einer erhöhten Expressions- und Sekretionseffizienz führt.

Die Reinigungen der Konstrukte sind im Rahmen dieser Arbeit über den His-*tag* erfolgt, da diese mittels Nickel-NTA Matrix weitaus schonender verlaufen als Reinigungen über Matrices, die spezifisch für die leichten Ketten (Kappa-Matrix oder Protein L) oder den Fc-Teil des Antikörper-Konstruktes sind, wie z.B. Protein A oder Protein G. In allen anderen Reinigungen werden die Antikörper mittels pH-*shift* von der Matrix eluiert und dies kann Antikörper-Konstrukte in ihrer Faltung beeinflussen bzw. in ihrer Reaktivität beeinträchtigen.

Für die Nutzung der selektierten scFv in den diagnostischen Systemen Immulite 2000 und UniCAP 250 wurde ein homodimeres, bivalentes Molekül als scFv Antikörper-Konstrukt im IgEC_{H2-4} Format dargestellt^{120,126}. Die Expression der insektengift-spezifischen Antikörper-Konstrukte wurden in der leicht zu kultivierenden embryonalen Zelllinie HEK293 durchgeführt. Hierfür wurde die Zelllinie mit der DNA transfiziert und die Etablierung von stabil exprimierenden Zelllinien angestrebt.

Ebenfalls wurden die insektengift-spezifischen Antikörper-Fragmente Api m 3, Ves v 5 #1 und Ves v 5 #4 als IgG₄C_{H2-3} Antikörper-Konstrukte generiert¹²⁷. Die erfolgreich exprimierten IgG₄C_{H2-3}His Antikörper-Konstrukte können nun in den *Assay*-Systemen als blockierende Antikörper Verwendung finden.

Die artifiziellen scFv Antikörper-Konstrukte stellen mit ihrer deletierten C_{H1} Region Konstrukte dar, die zwar mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden können, jedoch im Vergleich zu Vollantikörpern eine deutliche geringere Flexibilität in ihrer Antigenbindung aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Expression vollständiger Immunglobuline in den Formaten IgG₁ und IgE angestrebt. Da die Expression von Antikörpern des Isotyps G deutlich effektiver ist, wurde zuerst die Generierung von IgG Antikörper-Konstrukten für ausgewählte insektengift-spezifische scFv durchgeführt. Hierbei wurden die scFv Api m 3, Ves v 3 und Ves v 5 #1 als heterotetramere Antikörper-Konstrukte Anti-Api m 3-IgG₁His, Anti-Ves v 3-IgG₁His und Anti-Ves v 5-IgG₁His dargestellt. Die Expression als IgG Antikörper-Konstrukt konnte erfolgreich nachgewiesen werden, jedoch nach dem Austausch der schweren Kette zum Isotyp E konnte bei keinem der Konstrukte eine Expression gezeigt werden.

5.1.2. Charakterisierung homodimerer, bivalenter und heterotetramerer Antikörper-Konstrukte

Die Funktionalität und Reaktivität der sekretierten Antikörper-Konstrukte wurde in einer ELISA Analyse mittels rekombinant erzeugter Allergene überprüft. Um sicherzustellen, dass die generierten und exprimierten Antikörper-Konstrukte ebenfalls die nativen Allergene in den Giftextrakten erkennen, wurden die Konstrukte im AlaBLOT System untersucht. Hierbei konnte für alle generierten Antikörper-Konstrukte gezeigt werden, dass eine Detektion des spezifischen Allergens aus Extrakt möglich ist. Jedoch ist eine Detektion im AlaBLOT System nur ein Hinweis darauf, ob die allergen-spezifischen Antikörper-Konstrukte die nativ gefalteten Allergene erkennen, da die Allergenextrakte auf den Membranstreifen denaturiert vorliegen. Um festzustellen, ob die synthetischen Antikörper-Konstrukte die nativen Allergene genauso gut binden wie die rekombinant erzeugten Allergene wurden die Konstrukte Anti-Api m 3-IgEC_{H2-4}His, Anti-Api m 5-IgEC_{H2-4}His, Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1 und Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4 in den *Assay*-Systemen Immulite 2000 und UniCap 250 vermessen. Hierbei zeigten die Antikörper-Konstrukte mit den Bienen- bzw. Wespengiftextrakten unterschiedliche Reaktivitäten, was in unterschiedlichen IgE-Spiegeln resultiert.

Der Einsatz der analysierten Antikörper-Konstrukte zeigte, dass die unterschiedlichen *Assay*-Systeme nicht miteinander vergleichbar sind^{128,129}, obwohl definierte Lösungen an Antikörper-Konstrukten analoge spezifische IgE-Spiegel in beiden *Assay*-Systemen aufweisen. Grund für die teilweise sehr unterschiedlichen spezifischen IgE-Spiegel können die verschiedenen Präparationen der Allergenextrakte sein, in denen manche Allergene aufgrund unzureichender Extraktionsmethoden unterrepräsentiert sind. Am Beispiel des Anti-Api m 5-IgEC_{H2-4}His Antikörper-Konstrukts, das ebenfalls das homologe Allergen Ves v 3 erkennt, kann dies sehr deutlich gezeigt werden. Dieses Konstrukt wurde neben der Analyse mit Bienengiftextrakt ebenfalls mit Wespengiftextrakt im Immulite 2000 System vermessen. Der Wert des spezifischen IgE-Spiegels ist bei der Messung mit dem Wespengift höher als bei der mit dem Bienengift, woraus geschlossen werden könnte, dass beide Allergene in unterschiedlichen Konzentrationen in den jeweiligen Giftextrakten vorliegen. Hierbei muss davon

ausgegangen werden, dass die Affinitäten des Anti-Api m 5 Antikörper-Konstruktes zu den Proteinen Api m 5 und Ves v 3 vergleichbar sind.

Ein weiteres interessantes Beispiel für unterschiedliche IgE-Spiegel ist die Analyse des Anti-Api m 3-IgEC_{H2-4}His Antikörper-Konstrukts. Bei diesem Konstrukt ist vor allem der Vergleich beider *Assay*-Systeme untereinander interessant. Bei Analyse mit Bienengift ist der spezifische IgE-Spiegel von 16 kU/L im Immulite 2000 System, dies entspricht Klasse III. Die Werte des spezifischen IgE liegen jedoch, nach einem UniCAP 250 *Assay*, bei 105 kU/L, was einer Klasse VI entsprechen würde. Die Untersuchung des Antikörper-Konstrukts mit rekombinant erzeugtem Einzelallergen im UniCAP 250 System zeigt einen identischen spezifischen IgE-Spiegel.

Eine weitere Ursache für geringe IgE-Spiegel kann die Immobilisierung des Allergens auf den jeweiligen Oberflächen sein. Eine Möglichkeit zur Immobilisierung ist das Biotinylieren des Allergens und anschließender Inkubation auf Streptavidinoberflächen. Jedoch können dadurch bestimmte Epitope auf der Allergenoberfläche verdeckt bzw. zerstört werden.

Die bisher generierten Antikörper-Konstrukte im IgEC_{H2-4}His Format, die unter Verwendung von Säugerzellüberstand vermessen wurden, sollten des Weiteren alle in gereinigter Form in den diagnostischen *Assay*-Systemen Immulite 2000 und UniCAP 250 mit ihren Einzelallergenen auf ihre Reaktivität hin überprüft werden.

Um zu Analysieren, ob die beiden Antikörper-Konstrukte Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #1 und Anti-Ves v 5-IgEC_{H2-4}His #4 ebenfalls für einen Einsatz in einem Basophilen Aktivierungstest geeignet sind, wurden diese ebenfalls im β -Hexosaminidase *Assay* vermessen. Bei diesem *Assay* werden humanisierte Ratten Basophilen Leukämie Zelllinie RBL-2H3-SX38 verwendet. Die Quervernetzung der einzelnen Antikörper-Konstrukte mit einem polyklonalen Anti-IgE Antikörper konnte erfolgreich gezeigt werden. Jedoch konnte bisher keine erfolgreiche Quervernetzung beider Antikörper-Konstrukte mit rekombinant erzeugtem Allergen Ves v 5 bzw. Wespengift gezeigt werden. Hierfür gibt es mehrere mögliche Ursachen die Antikörper-Konstrukte können ähnliche Epitope erkennen oder aber die Epitope liegen sterisch so ungünstig, dass die verkürzten Konstrukte nicht durch das Antigen quervernetzen. Die Affinität der Antikörper-Konstrukte spielt für den β -Hexosaminidase *Assay* ebenfalls eine Rolle, da mindestens

einer der Antikörper-Konstrukte hoch-affin sein muss. Hierfür sollten weitere Anti-Ves v 5 scFv als Antikörper-Konstrukte generiert und exprimiert werden.

Um zu Analysieren, ob die Antikörper-Konstrukte wirklich unterschiedliche Epitope erkennen, wurde ein *Sandwich*-ELISA durchgeführt, jedoch konnte hierbei kein Ergebnis erzielt werden, da der *Assay* durch unspezifische Bindung des Detektions-Antikörpers gestört wurde.

Die artifiziellen Konstrukte können ebenfalls der Grund sein, da die gereinigten Antikörper-Konstrukte möglicherweise einen *Cluster* bilden und dadurch nicht mit dem Detektions-Antikörper überprüft werden können. Um dies zu umgehen sollten diese nicht zu stark konzentriert werden. Ebenfalls neigen die generierten, exprimierten, gereinigten Antikörper-Konstrukte durch Einfrieren zu Aggregationsbildung und fallen beim Auftauen aus. Dies könnte umgangen werden indem man die Konstrukte mit Proteaseinhibitoren bei 4 °C lagert, jedoch könnten so die Konstrukte im Kühlschrank auch nur begrenzt gelagert, da diese trotz Inhibitoren degradiert werden. Die Lagerung von Antikörper-Konstrukten könnten verbessert werden, indem man zu den bereits gereinigten Konstrukten BSA gibt um die Aggregationsbildung zu inhibieren.

Für alle generierten Antikörper-Konstrukten wäre eine Bindungsstudie von Vorteil um die Affinitäten zu analysieren. Hierbei könnten die hoch-affinen bindenden Antikörper-Konstrukte herausgefiltert werden, welche als Standard in *Assay*-Systemen Verwendung finden könnten.

5.2. Darstellung chimärer IgGE Antikörper-Konstrukte

Die erfolgreiche Darstellung und Expression der insektengift-spezifischen scFv als verkürzte Antikörper-Konstrukte konnte zwar gezeigt werden, jedoch ist die Expressionsfähigkeit in Form von Vollantikörper-Konstrukten dadurch nicht immer gewährleistet.

In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits unterschiedliche variable Regionen aus Hybridomazellen gewonnen, als Vollantikörper als Isotyp E generiert und zur Expression gebracht werden. Jedoch konnte bisher keiner der generierten humanen IgE

Vollantikörper aus Antikörper-Fragmenten, die durch Selektion aus der Phagenbibliothek Griffin-1 erhalten wurden, nicht exprimiert werden.

Ein Grund hierfür könnte sein, dass diese Fragmente bestimmte Aminosäuren in den variablen Regionen besitzen, die dazu führen, dass die generierten Antikörper nicht korrekt gefaltet werden. Durch die unvollständige Faltung wird das Konstrukt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und somit nicht zur Expression gebracht werden. Da die meisten Griffin Antikörper-Fragmente als verkürzte IgE-Konstrukte sehr gut exprimieren, ist möglicherweise die erste Domäne der schweren Kette oder die leichte Kette für die nicht korrekt gefalteten Konstrukte verantwortlich.

Um dies besser evaluieren zu können, standen verschiedene Isotyp-Kombinationen der Immunglobuline zur Verfügung. Die mögliche Anwendung der generierten Antikörper-Konstrukte in diagnostischen *Assay*-Systemen ist hierbei entscheidend, da die Verwendung als Standardreagenz den gleichen Detektionsantikörper (Anti-IgE) benötigt. Ebenfalls sollten die grundsätzlichen Eigenschaften des IgE Antikörpers, wie z.B. die Rezeptorbindung erhalten bleiben. Möglich wären die Darstellungen von humanen chimären Konstrukten aus Kombinationen der Antikörperisotypen IgE bzw. IgA, IgM bzw. IgG. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der chimären Konstrukte IgGE angestrebt, da für die dargestellten IgG Antikörper-Konstrukte eine Expression gezeigt werden konnte. Dies zeigt, dass die Paarung der ersten Domäne der schweren Kette der konstanten Region mit der leichten Kette der konstanten Region des Isotyps G generell funktionell ist.

Die generierten IgGE Antikörper-Konstrukte sollten, durch die konstanten Regionen des Isotyps G, ein erhöhtes Expressionsniveau aufweisen und durch die konstanten Regionen des Isotyps E sollten sie mit einem Anti-IgE Antikörper detektiert werden und zudem die Fähigkeit besitzen an den Fcε-Rezeptor zu binden.

In den Konstrukten wurde darauf geachtet, dass die Aminosäure Prolin in der Position 32 konserviert ist, da es eine große Rolle bei der korrekten Faltung der IgG_{CH1-hinge} Region spielt. Diese Domäne ist in den unterschiedlichen IgG Antikörper Isotypen und in verschiedenen Spezies konserviert¹²². Falls jedoch die C_{H1} Domäne nicht korrekt gefaltet ist, wird das komplette Antikörper-Konstrukt im Endoplasmatischen Retikulum (ER)

durch das Chaperon BiP zurückgehalten, da BiP mit hoher Spezifität an die ungefaltete C_{H1} Domäne¹²² bindet, was bereits *in vivo*¹³⁰ und *in vitro*¹²² gezeigt werden konnte.

Für das erste Konstrukt IgGE1 wurde eine Kombination aus der ersten Domäne und *hinge* Region des IgG und aus den Domänen C_{H2-4} des IgE gewählt. Die *hinge*-Region wurde eingefügt um die Flexibilität zu erhöhen. Allerdings konnte bisher für dieses Antikörper-Konstrukt keine Expression gezeigt werden. Da nur die Domäne IgG C_{H1} -*hinge*, die für die Detektion mit dem polyklonalen Anti-human-IgG-AP ausreichen muss, könnte diese nicht für einen Nachweis der Expression ausreichen. Die Detektion der IgE schweren Ketten C_{H2-4} -Region ist ebenfalls äußerst schwierig, da der polyklonale humane Anti-IgE Antikörper mit einem Anti-goat-IgG-AP Antikörper detektiert wird und dieser unspezifisch bindet. Unter Verwendung des monoklonalen Anti-human-IgE-AP Antikörpers konnte ebenfalls keine Expression gezeigt werden, obwohl dieses Antikörper-Konjugat die verkürzten IgE Antikörper-Konstrukte durchaus erkennt. Dies deutet darauf hin, dass keine Expression stattfindet.

Ein Grund hierfür könnte die zusätzliche *hinge*-Region sein, denn die zusätzlichen Aminosäuren, könnten zu Problemen bei der korrekten Faltung des Antikörper-Konstrukts führen.

Die Regionen der letzten beiden Domänen des IgE Antikörpers wurden bereits erfolgreich von Wurzburg *et.al.*¹⁴ exprimiert, nach diesen Angaben und durch Analyse der Aminosäuresequenz wurde das IgGE2 Antikörper-Konstrukt generiert. Es wurde ein Übergang von IgG zu IgE gewählt, der nach Ende der IgG C_{H2} bzw. vor Beginn der IgE C_{H3} Domäne in der Nähe eines Prolin-Restes lag. Prolin ist fast nie in Helices oder Faltblättern vorzufinden und somit ist die Wahrscheinlichkeit nicht sehr hoch das eine Sekundärstruktur zerstört wird^{121,131,132}.

Das IgGE2 Antikörper-Konstrukt konnte zwar in ELISA Analysen mittels polyklonalem Anti-human-IgG-AP Antikörper nachgewiesen werden, jedoch konnte es nicht mit einem polyklonalen Anti-IgE Antikörper detektiert werden, da hierbei ebenfalls die unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers die Analyse störte. Allerdings konnte für das IgGE2 Antikörper-Konstrukt eine erfolgreiche Rezeptorbindung mittels AviQuant-Analyse nachgewiesen werden. Einmal konnte das Konstrukt mit Anti-human-IgG-AP detektiert werden ebenfalls konnte nach einer Dialyse und Inkubation

auf einer Mikrotiterplatte und durch AviQuant und Anti-IgY-AP detektiert werden. Beide Resultate lassen auf eine Bindung der IgEC_{H3-4} Domäne an den verkürzten Rezeptor schließen. In Studien wurde bereits gezeigt, dass die Domäne IgEC_{H3} ausreicht, um an den FcεRI in micromolarer Affinität^{133,134} zu binden^{121,135,136,137,138} und die Domäne C_{H4} nicht direkt an der Bindung des IgE-Fc Teils an den Rezeptor beteiligt ist, jedoch zur Orientierung der C_{H3} Domäne zur korrekten Bindung an den Rezeptor beiträgt¹³². Ein Aspekt ist jedoch, dass durch das Fehlen der Domäne C_{H2} die Stabilität des Antikörper-Rezeptor Komplexes geringer ist, als in einem verkürzten Konstrukt^{131,132,139,140,141}. Dies ist für die Anwendung der Antikörper-Konstrukte als „Standard“ in diagnostischen *Assays*, wie UniCAP 250 und Immulite 2000 nicht von belang, da hierbei nur die Detektion eine Rolle spielt. Jedoch wäre dies bei Basophilen Aktivierungstests zu berücksichtigen.

Das Generieren von neuen IgGE Antikörper-Konstrukten wäre hier interessant, z.B. ein Konstrukt welches aus den Domänen IgG₁C_{H1-hinge} und den Domänen IgEC_{H3-4} besteht. Da diese beiden Domänen des Isotypos E eine strukturelle Ähnlichkeit zu den IgG₁C_{H2-3} Regionen aufweisen¹²¹ ebenfalls sollte ein IgGE1 Konstrukt ohne *hinge* Region angedacht werden. Um jedoch die Probleme der IgE Antikörper-Expression zu analysieren, sollten mehr Konstrukte generiert werden, die Rückschlüsse auf die Faltung liefern. Neben unterschiedlichen Kombinationen der schweren Ketten könnten ebenfalls Punktmutationen in die erste Domäne der schweren Kette des IgE Antikörpers eingebracht werden.

Die Generierung des IgGE2 Antikörper-Konstrukts ist ein möglicher Lösungsweg für eine erfolgreiche Nutzung der synthetischen Antikörper-Konstrukte in diagnostischen *Assay*-Systemen.

5.3. Aviane immune Antikörper-Bibliotheken

Neben den bereits bekannten Allergenen beinhaltet Wespengiftextrakt viele weitere Komponenten, wodurch die Diagnostik und Therapie erschwert wird. Eine Ursache sind die unterschiedlichen Präparationen der Giftextrakte, welche neben in unterschiedlichen Allergenkonzentrationen resultieren können¹⁴², so sind z.B. einige Allergene gar nicht in den aufgearbeiteten Präparaten repräsentiert. Um dies zu umgehen könnten Tiere mit

den rekombinanten Allergenen immunisiert werden und polyklonalen Antikörper könnten zur Analyse verwendet werden. Jedoch würden diese Antikörper nicht als IgE Antikörper detektiert werden können und somit zu möglichen Fehlerquellen bei der Durchführung der *Assay*-Systeme führen. Durch die Verwendung monoklonaler allergen-spezifischer Antikörper-Konstrukte könnte dieses Problem umgangen werden. Dadurch kann gewährleistet werden, dass die einzelnen Allergene in den *Assay*-Systemen in ausreichender Konzentration präsentiert sind.

Monoklonale Antikörper können auf unterschiedlichste Wege generiert werden, wobei die effektivste Methode die *Phage Display* Technologie^{21,22} ist. Diese bietet gegenüber der Hybridomtechnologie viele Vorteile, unter anderem ist dieses System weniger zeit- und kostenintensiv. Es wurden bereits Antikörper-Fragmente aus der humanen semi-synthetischen Phagenbibliothek Griffin-1 gewonnen. Jedoch haben die, aus synthetischen Bibliotheken limitierter Diversität, erhaltenen Antikörper-Fragmente oftmals eine geringere Affinität, als Fragmente die aus einer immunen Bibliothek gewonnen wurden^{47,63}. Ein weiterer Aspekt zur Generierung einer immunen Bibliothek ist, dass bisher aus der Bibliothek Griffin-1 noch keine Fragmente gegen das Majorallergen Ves v 1 erhalten wurden.

Immune Antikörper-Bibliotheken konnten bereits aus unterschiedlichen Organismen generiert werden, z.B. aus Mensch^{49,50}, Maus^{47,51,52}, Huhn^{53,54,55,56,57,58}, Kaninchen⁵⁹ und Kamel⁶⁰. In dieser Arbeit wurde auf das aviane Immunrepertoire zurückgegriffen, da die Amplifikation der variablen Regionen der leichten und der schweren Kette mit jeweils nur einem Oligonukleotid-Paar vereinfacht ist. In B-Zellen^{85,86} werden die Antikörper produziert, in deren v_H -Lokus⁹⁰ sind ein V- und ein J-Segment zur Generierung der leichten⁸⁷ und schweren Kette^{88,89}, sowie 16 D-Segmente vorhanden. Sichergestellt wird die hohe Diversität jedoch ebenfalls von so genannten V(D)-Pseudogene^{91,92}. Dies beruht auf dem Mechanismus der somatischen Genkonversion. Als Ausgangsmaterial für die Amplifikationen der variablen Regionen dienten die B-Zellen aus der Milz, da diese dort in hoher Konzentration vorliegen. Das im Milzgewebe vorliegende B-Zell-Repertoire hat bereits eine Affinitätsreifung durchlaufen und beinhaltet somit die Informationen für viele antigen-spezifische Antikörper^{47,77}.

Da bereits viele Bibliotheken durch Klonierung zuvor hybridisierter scFv^{56,57,93,143,144} dargestellt und auch die Klonierung der variablen Regionen in zwei Schritten^{56,57} in den Phagemidvektor gezeigt werden konnte, sollten in dieser Arbeit vor allem neue Klonierungstechniken zum Erhalt einer immunen Bibliothek evaluiert werden, um möglichst schnell eine Bibliothek geeigneter Größe zu erhalten. Eine immune Bibliothek kann durch kombinatorische Systeme, wie das *StarGate*® System, welche auf den Standardtechniken der Restriktion und Ligation basiert, dargestellt werden. Hierbei werden die aus der RNA gewonnenen Ausgangsamplifikate der variablen Regionen über mehrere Reaktionen in den Destinationsvektor kloniert. Die zweite Technik die verwendet wurde ist die *Gateway*™ Technologie, welche auf dem Mechanismus der homologen Rekombination beruht und bereits vollständige scFv benötigt, die anschließend in den Destinationsvektor kloniert werden. Das, im Rahmen dieser Arbeit, angewandte *Gateway*™ System^{47,48} ist nicht die einzige Technologie, die auf dem Prinzip der homologen Rekombination basiert. Ein weiteres System ist z.B. das Cre/loxP System, welches vor allem in Pflanzen- und Säugertierzellsystemen Verwendung findet¹⁴⁵.

5.3.1. Immunisierung eines Huhns mit Wespengift und Analyse der isolierten polyklonalen IgY

Die Immunisierung mit Wespengiftextrakt stellt eine Herausforderung an das Immunsystem des Huhns dar, da der Extrakt neben den Allergenen Ves v 1, Ves v 2a/b, Ves v 3, Ves v 4 und Ves v 5 weitere Proteine wie vasoaktive Amine und Mastoparan beinhaltet. Die Verwendung von Giftextrakt, aus der Biene oder Wespe, anstelle von gereinigten Proteinen fordert den avianen Organismus, da der Extrakt neben immunstimulatorischen Molekülen ebenfalls toxische Proteine enthält. Dadurch wird im Fall des Toxins einerseits die Immunantwort gestört, jedoch wird andererseits die Antwort durch die immunstimulatorischen Proteine enorm verstärkt. Dies könnte dazu führen, dass eine spezifische Immunantwort gegenüber den im Wespengift enthaltenen immunogenen Molekülen entsteht und dadurch spezifische und Allergie relevantere Antikörper gebildet werden.

Allerdings kann der *Pool* aus unterschiedlichen „Antigenen“ in den Giftextrakten dazu führen, dass nicht jedes dieser Antigene eine Immunreaktion auslöst^{54,93}. Dies wurde bereits von Chiliza et. al. 2008 beschrieben¹⁴⁴, die zwei Hühner mit den gleichen Antigenen, einer Mixtur aus parasitären und viralen Pathogenen immunisierten. Die polyklonalen IgY der beiden Hühner wurden anschließend in einer ELISA Analyse untersucht und verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass die Hühner unterschiedliche Immunantworten gegeben hatten. Ein Grund hierfür kann die Antigen-Präsentation im Huhn selbst sein, da der aviane MHC Komplex wesentlich kleiner und kompakter als der humane ist. Dieser Komplex weist daher auch eine wesentlich geringere Variabilität auf¹⁴⁶.

Nachdem das Huhn P005 mit Wespengift nach herkömmlichem Protokoll immunisiert wurde, wurden die IgY isoliert und auf unterschiedlichen Wespengiftextrakt und rekombinant erzeugten Wespengiftallergenen mittels ELISA Analyse untersucht. Hierbei wurden als Kontrolle das Hühner-Lysozym und Bienengiftextrakt verwendet. Die Spezifität der isolierten IgY-Antikörper konnte deutlich für Ves v 1, Ves v 3 und Ves v 5 gezeigt werden, das Antigen Ves v 2a und seine inaktive Variante Ves v 2b wurden jedoch nicht erkannt. Ein möglicher Grund könnte sein, dass dieses Allergen nicht immunogen auf den avianen Organismus wirkt¹⁴⁴, sondern nur ein humaner Organismus eine Immunantwort gibt. Die polyklonalen IgY wurden ebenfalls im AlaBLOT System auf Wespengiftextrakt untersucht. Hierbei konnten Banden in Höhe der Antigene Ves v 1, Ves v 2a, Ves v 2b, Ves v 3, Ves v 4 und Ves v 5 detektiert werden, weitere Banden, die detektiert wurden, sind ebenfalls in dem AlaBlot Streifen, welcher mit Poolseren von Wespengiftallergikern inkubiert wurde, sichtbar, dies deutet auf mögliche weitere Antigene bzw. gebildete Antikörper hin. Das Banden in Höhe von Ves v 2a und Ves v 2b im ALABlot System detektiert wurden deutet darauf hin, dass die isolierten IgY möglicherweise weitere Allergene erkennen, die auf einer ähnlichen Höhe liegen.

Zur Analyse des Giftextraktes könnten schon die polyklonalen IgY Antikörper verwendet werden und, unter Verwendung eines IgE Antikörper-Konstrukts, das anstelle eines scFv einen Teil des avianen Rezeptors CHIR (*chicken immunoglobuline-like receptors*) trägt, in Assay-Systemen eingesetzt werden. Hierbei würden sich allerdings die

Schritte, die zu einer Detektion führen, unterscheiden zu der Detektion der IgE aus Spenderseren, dadurch können weitere Fehlerquellen entstehen.

Dies ist ein weiterer Grund monoklonale allergen-spezifische Antikörper-Konstrukte, durch Antikörper-Bibliotheken, zu generieren.

5.3.2. *Stargate*® Bibliothek

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *StarGate*® *combinatorial cloning* System zur Darstellung einer immunen Bibliothek erstmalig verwendet. Dieses System bietet den Vorteil, dass durch klonieren der einzelnen variablen Regionen in die jeweiligen Vektoren und anschließender Fusion, möglichst schnell und effizient vollständige scFv erhalten werden. Dabei würden keine Fragmente durch Hybridisierungen mittels PCR verloren gehen⁵⁶.

Die Verwendung der *StarGate*® Technologie zur Klonierung einer Bibliothek sollte möglichst effizient verlaufen. Dies konnte bei den ersten Reaktionen gezeigt werden. Hierbei wurden Subbibliotheksgrößen im Bereich von $1 - 5 \times 10^6$ Transformanden (v_H : 4.24×10^6 und v_L : 1.8×10^6 , $1 \times 10^9/\mu\text{g}$ DNA) erhalten.

Durch die erhaltenen Größen der Subbibliotheken konnte eine Größe der Fusions-Subbibliothek von mindestens $>1 \times 10^6$ erwartet werden. Rein statistisch gesehen könnte die Bibliothek eine Größe von bis zu 10^{12} ergeben, da theoretisch jede v_H mit jeder v_L durch zu einem scFv fusioniert. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die eingesetzte Menge Fusionsvektor auch nur 4×10^8 Teilchen/ μl beträgt. Bei dem eingesetzten Volumen von $10 \mu\text{l}$ kann also nur eine Bibliotheksgröße von maximal 4×10^9 erwartet werden.

Jedoch konnte bei der Transformation der Fusionsreaktion nur eine Bibliotheksgröße von 2×10^5 (bei $5 \times 10^9/\mu\text{g}$ DNA) erhalten werden. Grund hierfür könnte die Effizienz der komplexen Reaktion sein, da hier drei unterschiedliche Vektoren verwendet wurden, um den Zielvektor, der den avianen scFv beinhaltet, zu generieren. Diese Reaktion fand in einem Schritt statt, wodurch die ungeschnittenen Vektoren pNFUSE, pCFUSE und der Ausgangsfusionsvektor die Transformationseffizienz herabsetzen könnten.

In der anschließenden Transferreaktion wurde der erhaltene scFv in den Phagemidvektor überführt. Diese Reaktion sollte sehr effizient sein, da von einer ähnlichen Kombination der Reaktion ausgegangen werden konnte wie die Generierung der pNFUSE- und pCFUSE-Vektoren. Durch eine vorherige Analyse hätte theoretisch nach Transformation des Ansatzes mit Zellen, die über eine hohe Transformationseffizienz verfügen, eine Bibliotheksgröße im Bereich von 7×10^5 ergeben müssen. Die finale Bibliotheksgröße betrug jedoch 1×10^5 Transformanden (bei $5 \times 10^9/\mu\text{g}$ DNA). Da ein Klon der Bibliothek keinen avianen scFv trug, muss die eigentliche Bibliotheksgröße kleiner als 1×10^5 betrachtet werden und ist somit möglicherweise zu klein für eine erfolgreiche Selektion. Jedoch sollte evaluiert werden, ob die Verwendung einzelner Reaktionen zur Generierung einer Bibliothek ausreichen würden.

Im Allgemeinen könnten störende Faktoren in jeder Reaktion sein, wie z.B. die Ligase, die Pufferlösung oder das Enzym, welche die Effizienz der Transformation herabsetzen könnten.

Durch die anschließende Selektion gegen das Majorallergen Ves v 5 konnte kein Ves v 5-spezifisches Antikörper-Fragment erhalten werden und keine Anreicherung spezifischer Phagen in den Selektionsrunden erzielt werden. Ein möglicher Grund wäre, dass keiner der generierten scFv spezifisch Ves v 5 erkennt.

Die erhaltene Bibliotheksgröße ist möglicherweise zu klein um für eine erfolgreiche Selektion eingesetzt werden zu können. Durch Steigerung der Bibliotheksgröße könnten nach anschließender Selektion antigen-spezifische Antikörperfragmente erhalten werden. Diese Steigerung der Bibliotheksgröße könnte erreicht werden, indem die DNA durch Dialyse oder Fällung gereinigt wird. Ebenfalls könnten Zellen mit einer höheren Transformationseffizienz zu einer größeren Bibliothek führen.

5.3.3. *Gateway*TM Bibliothek

Für die Darstellung einer avianen Bibliothek mittels *Gateway*TM Technologie werden bereits vollständige scFv benötigt. Da eine Hybridisierung der variablen Regionen mittels PCR zu einer Verringerung der Diversität⁵⁶ führt, wurden die fusionierten scFv

aus der *StarGate*® Technologie für die Amplifikation und das Anfügen der *attachment sites* verwendet. Deswegen konnte bei einer Bibliotheksgröße von 1×10^5 von möglichst vielen unterschiedlichen scFv ausgegangen, jedoch keine wesentlich größere Bibliothek erwartet werden. Es wurden 1×10^8 Moleküle für eine PCR verwendet. Die scFv wurden amplifiziert und anschließend die gereinigten scFv in der BP Reaktion eingesetzt. Nach der Reaktion waren nur etwa 70% der erhaltenen Vektoren funktionell, jedoch konnte davon ausgegangen werden, dass die Vektoren, die keinen avianen scFv trugen, in der weiteren LR Reaktion nicht mit umgesetzt wurden, da diesen die *attachment sites* fehlten. Die erhaltene Subbibliotheksgröße von 2.7×10^6 (bei $1 \times 10^9/\mu\text{g}$ DNA) ist deutlich kleiner, befindet sich aber immer noch im Bereich von 1×10^6 .

Die anschließende LR Reaktion ergab erneut eine Bibliotheksgröße von 2×10^6 (bei $1 \times 10^9/\mu\text{g}$ DNA) in denen alle analysierten Kolonien ein Insert trugen. Abschließend wurden noch in F-pilus tragende Zellen mit der erhaltenen Bibliothek retransformiert ($3 \times 10^8/\mu\text{g}$ DNA) um diese anschließend mit Helferphagen superinfizieren zu können. Hierbei ergab sich mit 5×10^6 eine höhere Anzahl an Transformanden, jedoch scheinen die *E.coli* Zellen während dieses Schritts Teile des Vektors wieder aus ihrem Genom zu entfernen, da hier nicht mehr alle überprüften Kolonien einen avianen scFv beinhalten. Ebenfalls ergab die Sequenzierungsanalyse, dass drei der fünf Klone einen *frameshift* in den flankierenden Bereichen der CDR hatten. Zwei dieser *frameshift* wurden wahrscheinlich durch die Oligonukleotide während der Amplifikation des scFv eingefügt. Dies ist auf fehlerhafte Oligonukleotide zurückzuführen, die nicht mittels HPLC gereinigt wurden. Der dritte *frameshift* ist wahrscheinlich während der Primäramplifikation entstanden und kann auf einen Fehler der verwendeten Polymerase zurückgeführt werden, da er sich im mittleren Bereich der variablen Region der schweren Kette befindet.

Nach der Selektion der Bibliothek gegen das Majorallergen Ves v 5 konnte der Phagenklon Anti-Ves v 5 #2 erhalten werden. Dieser scFv wurde aus monoklonalen Phagen der dritten Selektionsrunde gewonnen, jedoch konnte, nach Analyse der zweiten Selektionsrunde, die ebenfalls eine hohe Anreicherung spezifisch bindender polyklonaler Phagen zeigte, kein spezifisch bindender Phagenklon isoliert werden.

Die generierte und funktionelle *Gateway*TM Bibliothek kann zur Selektion gegen weitere Allergene wie Ves v 1 bzw. Ves v 3 sowie gegen das komplette Wespengift eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Selektion gegen das im Bienengift homologe Protein Api m 5, um kreuzreaktive Antikörper-Konstrukte zu erhalten.

Eine initiale Selektion mit drei Selektionsrunden gegen Ves v 3 führte bisher zu keinem Ergebnis. Gründe hierfür könnte sein das kein Ves v 3-spezifischer scFv in der Bibliothek vorhanden ist oder das der während der Immunisierung eingesetzte Giftextrakt eine unzureichende Konzentration des Allergens Ves v 3 aufwies. Neben diesen Möglichkeiten könnten die bereits erwähnten Faktoren, die dazu führen, dass die Zellen die genetischen Informationen des scFv aus ihrem Genom entfernt, Ursache für die ergebnislose Selektion sein.

Das Anti-Ves v 5 #2 Fragment steht nun zur Klonierung in Antikörper-Konstrukte zur Verfügung, wobei hier die Expression des avianen scFv als Vollantikörper im IgE-Format interessant ist. Der aviane Ves v 5-spezifische Antikörper könnte anschließend mit denen aus der Griffin-1 erhaltenen Antikörper-Fragmenten Anti-Ves v 5 #1 und #4 durch ELISA Analysen, β -Hexosaminidase *Assay* und Bindungsstudien verglichen werden. Möglicherweise erkennt dieser ein anderes Epitop und kann dadurch in Basophilen *Assays* mit den bereits generierten Anti-Ves v 5 Antikörper-Konstrukten zu einer Degranulation der Zellen führen.

Die Verwendung der *Gateway*TM Technologie zur Darstellung einer Bibliothek ist generell funktionell, d.h. das Prinzip der Rekombination scheint für den Ansatz einer Bibliotheksklonierung anwendbar zu sein.

5.3.4. StarGate® vs. Gateway®

Die Darstellung immuner avianer Antikörper-Bibliotheken wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen beschrieben. Hierbei wurden in den häufigsten Fällen über Hybridisierungen die scFv in den Phagemidvektor kloniert. Die Einzelklonierung der variablen Regionen in einen Phagemidvektor hat jedoch den Vorteil, dass keine scFv durch Hybridisierungen verloren gehen⁵⁶. Jedoch können hierbei unvollständige Phagemidvektoren entstehen, die nur eine aviane variable Region beinhalten. Ebenfalls

ist ein Nachteil bei der Einzelklonierung, dass die Finale Transformation zum Erhalt einer Bibliothek sehr effizient verlaufen muss.

Die Darstellung avianer Antikörper-Bibliotheken mit Hilfe der Techniken *StarGate*® und *Gateway*™ soll eine Klonierung ermöglichen, die möglichst effizient eine Bibliothek in kurzer Zeit erstellt.

Die *StarGate*® Technologie ist eine äußerst effiziente Methode, um möglichst schnell einzelne Gene in Expressionsvektoren zu klonieren. Die Verwendung dieser Technik für eine Generierung einer gesamten Bibliothek ist schwierig. Hierbei muss beachtet werden, dass jede Transformation möglichst effizient verläuft. Ebenfalls sollte bedacht werden, dass jeder Ausgangsvektor ein möglicher Störfaktor für die Transformationseffizienz ist, da dieser ebenfalls transformiert wird. Ebenfalls werden vermutlich nicht alle variablen Regionen miteinander kombiniert, da der Fusionsvektor nur in einer begrenzten Konzentration ($\sim 4 \times 10^8$ Teilchen/ μ l) in der Reaktion vorhanden ist.

Um das Problem der nicht effizient verlaufenden Transferreaktion zu umgehen, könnte man nach der Fusionsreaktion die erhaltenen scFv amplifizieren und mittels klassischer Klonierungstechniken in den Phagemidvektor pHEN2 überführen.

Die Darstellung einer Bibliothek mittels der *Gateway*™ Technologie scheint hier einfacher und effizienter zu verlaufen. Jedoch werden dafür bereits vollständige scFv benötigt, die durch eine Standard Hybridisierung mit den bereits genannten Nachteilen entstehen könnten. Hier kann eine Kombination der *StarGate*®- mit der *Gateway*™ Technologie, wie in dieser Arbeit gezeigt, einige Vorteile bieten. Bei der Klonierung der einzelnen variablen Regionen und der anschließenden Fusion zu einem scFv besteht die Möglichkeit die Hybridisierungen der scFv zu umgehen und dadurch wahrscheinlich eine höhere Diversität zu erhalten. Nach der Amplifikation der scFv können diese durch die anschließenden *Gateway*™ Reaktionen in den Phagemidvektor kloniert werden, da diese Bibliothek bei den finalen Reaktionsschritten eine deutlich höhere Transformationseffizienz aufwies als die finale Transformation der *StarGate*® Bibliothek. Die Anwendung der *StarGate*® Technologie in Kombination mit der *Gateway*™ Methode zur Generierung humaner, immuner Bibliotheken ist sehr interessant. Nach der Generierung der einzelnen v_H und v_L Regionen mit unterschiedlichen Oligonukleotiden

müssen diese anschließend hybridisiert werden, da eine Einzelklonierung der variablen Regionen in den Phagemidvektor hier nicht möglich ist. Eine Hybridisierung aller variablen Regionen ist äußerst aufwendig. Daher könnten hier die Reaktionen der *StarGate*® Technologie bis zur Generierung des Fusionsvektors durchgeführt werden, da diese sehr effizient verlaufen. Unter Einsatz mehrerer Fusionsreaktionen könnten dadurch schnell, jedoch nicht unbedingt kostengünstig, ein Gemisch aus vollständigen scFv generiert werden. Anschließend würden die erhaltenen scFv wieder amplifiziert werden und stünden somit zur Klonierung mittels *Gateway*™ Technologie zur Verfügung. Dies würde schneller und kostengünstiger zu der gewünschten Bibliothek führen, jedoch sollten hier größere Bibliotheken generiert werden, um möglichst viele spezifische Antikörper-Fragmente zu erhalten.

5.4. Ausblick

Synthetische Antikörper-Konstrukte können als humane Referenzseren in diagnostischen *Assay*-Systemen eingesetzt werden, um die Reproduzierbarkeit sowie die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Methoden zu gewährleisten. Hierfür wäre es u.a. denkbar, den Proteingehalt ausgewählter Allergene unter Verwendung unterschiedlichen Antikörper-Konstrukte zu quantifizieren. Dabei muss jedoch die Zugänglichkeit der entsprechenden Epitope auch nach chemischer Modifikation für eine Immobilisierung der Allergene gewährleistet sein. Weiterhin wäre eine Verwendung synthetischer Antikörper-Konstrukte als Standardreagenz in Basophilen-Aktivierungstest denkbar. Mehrere allergen-spezifische Antikörper, die unterschiedliche Epitope erkennen, würden hier durch Zugabe des spezifischen Allergens zu einer Quervernetzung des IgE Rezeptors und somit zur Degranulation der Zelle führen.

Parallel hierzu könnte die Verfügbarkeit der Allergene und somit die Qualität von Extrakten, die für eine SIT verwendet werden, in bislang nicht realisierbarer Art und Weise kontrolliert werden. Hierdurch könnten Therapien optimiert und somit Patienten, deren Therapieversagen auf eine Unterrepräsentation einiger Allergene zurückzuführen ist, effektiver behandelt werden.

Die Generierung chimärer IgGE Antikörper-Konstrukte bietet die Möglichkeit, Informationen über die Faltung der IgE Antikörper zu erhalten. Solche Ansätze und entsprechende Verfeinerungen der chimären Konstrukte könnten grundlegende immunologische Fragen beantworten bzw. aufwerfen, denn sollten Antikörper, die als IgG produziert werden, nach einem Klassenwechsel zu IgE *in vivo* nicht exprimieren, ließe sich die Diversität der humanen IgE Antikörper als weitaus geringer postulieren als bislang vermutet.

Die Anwendung innovativer Klonierungstechniken wie *StarGate*® und *Gateway*™ hat das Potential zu einer schnellen und effizienten Generierung immuner Bibliotheken. Diese Technik ist vor allem im Hinblick auf die Darstellung humaner Spenderbibliotheken einsetzbar, die ein Arbeiten unter Verwendung geringster Probenmengen erfordert. Ebenso sinnvoll ist der Einsatz solcher Techniken bei Präsenz diverser Familien variabler Regionen oder bei hohem Probenaufkommen. Eine Isolierung humaner allergen-spezifischer Antikörper in größerem Maße muß mittelfristig Aufschluss über die Größe und Funktionalität des IgE-Transkriptoms geben und kann darüber hinaus die Analyse der Antigen-Antikörper-Interaktionen auf molekularer Ebene.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insektengift-spezifische scFv genutzt, die durch Selektion der semi-synthetischen Phagen Bibliothek Griffin-1 gegen Antigene aus den Giftextrakten der Honigbiene und der Gemeinen Wespe erhalten wurden, um humane Antikörper-Konstrukte durch Fusion der scFv mit IgFc Regionen der Isotypen E bzw. G darzustellen. Die Charakterisierung der synthetischen IgE Antikörper erfolgte mittels ELISA und AlaBLOT Analysen gegen das jeweilige rekombinante Allergen oder gesamten Giftextrakt. Weiterhin wurden die allergen-spezifischen IgE-Reaktivitäten unter Verwendung der Laborautomaten Immulite 2000 und UniCAP 250 bestimmt. Dabei wird eine mögliche Nutzung dieser Reagenzien als Referenzserum in der Allergiediagnostik anvisiert. Zwei Antikörper-Konstrukte mit Spezifität für Ves v 5 wurden zudem mit Hilfe einer humanisierten rodenten Basophilenzelllinie (RBL-2H3-SX38) auf ihre Bindung an den hoch-affinen IgE Rezeptor FcεR I hin untersucht werden. Unter Verwendung eines Anti-IgE Antikörpers konnte die Rezeptordimerisierung und die Induktion zur Degranulation gezeigt werden. Diese Analysen lassen den Schluß zu, dass es prinzipiell möglich wäre, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten IgE Antikörper-Konstrukte auch in Basophilen-Aktivierungstests als Standardseren einzusetzen. Darüber hinaus wurden die allergen-spezifischen scFv aus der Griffin-1 Bibliothek durch Fusion der γ_1 -Domänen C_{H1} und C_{H2} mit den ϵ -Domänen C_{H3} und C_{H4} zu einem chimären IgGE2 Vollantikörper-Konstrukt assembliert. Auf diese Weise könnten sie einer Detektion mit Anti-IgE Antikörpern und eine Rezeptorbindung an den humanen FcεRI zugänglich gemacht werden. Die erfolgreiche Generierung und Expression dieses chimären IgGE2 Antikörper-Konstrukts konnte gezeigt werden, die Funktionalität wurde weiterhin durch Bindung an das rekombinante Allergen sowie die extrazelluläre Domäne des FcεRIα (AviQuant) in ELISA Analysen bestätigt.

Des Weiteren wurde durch Kombination der zwei Klonierungstechniken *StarGate® combinatorial cloning* und *Gateway™* erstmalig eine aviane, immune Bibliothek generiert, aus deren Selektion aviane Antikörperfragmente erhalten wurden.

7. Abstract

In context of this work scFv were isolated from a semi synthetic library Griffin-1 that are specific for honeybee and common wasp venom allergens. Subsequently, these scFv were reconverted and produced as human antibody constructs by fusing the scFv with the human IgFc regions of the isotypes E and G. The characterization of generated synthetic IgE antibodies was performed by ELISA and AlaBLOT analyses with respect to their antigen binding specificity. Additionally, the constructs were evaluated in automated laboratory analyzers Immulite 2000 and UniCAP 250. These constructs may be used as standard reagents in diagnostic applications.

Two individual Ves v 5-specific antibody constructs were analyzed regarding their ability to bind to the human high affinity Receptor FcεRI. Therefore, the humanized rat basophilic cell line RBL-2H3-SX38 was used. To crosslink the receptors an anti-IgE antibody was selected leading to the degranulation of the cells. This confirms that it would be possible to use these antibody constructs as standard sera in basophil activation assays.

Furthermore, the allergen-specific scFv derived from the Griffin-1 library were fused with the γ_1 -domains C_{H1} and C_{H2} and the ϵ -domains C_{H3} and C_{H4} to generate chimeric IgGE2 full antibody construct. This enables the detection with an anti-IgE antibody as well as receptor binding to the human FcεRI. The chimeric IgGE2 antibody construct was successfully expressed in HEK293 cells. The functionality could be confirmed by ELISA using the recombinant allergen and the extracellular part of FcεRIα (AviQuant) as antigens.

For the first time the combination of two cloning techniques StarGate® combinatorial cloning and Gateway™ were used to generate an avian immune library. Out of this library an additional Ves v 5-specific scFv was obtained.

8. Literatur

1. von Pirquet, C. Allergie. *Münch. Med. Wochenschr.*, 53 1457-1458(1906).
2. Eder, W., Ege, M.J. & von Mutius, E. The asthma epidemic. *The New England journal of medicine* **355**, 2226-35(2006).
3. Kay, A.B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *The New England journal of medicine* **344**, 30-7(2001).
4. Holgate, S.T. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* **402**, B2-4(1999).
5. Galli, S.J., Tsai, M. & Piliponsky, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445-54(2008).
6. Gell, P. & Coombs, R. Clinical Aspects of Immunology. (1963).
7. Schick, B. & von Pirquet, C. Die Serumkrankheit. (1905).
8. Thews, G., Mutschler, E. & Vaupel, P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 153 - 158(1999).
9. Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G. & van Ree, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 490-4(2002).
10. Glimcher, L.H. Trawling for treasure: tales of T-bet. *Nature immunology* **8**, 448-50(2007).
11. Szabo, S.J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-69(2000).
12. Zhu, J. & Paul, W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557-69(2008).
13. Zheng, W. & Flavell, R.A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-96(1997).
14. Akdis, M. & Akdis, C.A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* **119**, 780-91(2007).
15. Geha, R.S., Jabara, H.H. & Brodeur, S.R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature reviews. Immunology* **3**, 721-32(2003).
16. Gould, H.J. & Sutton, B.J. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* **8**, 205-217(2008).

17. Larche, M., Akdis, C.A. & Valenta, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **6**, 761-771(2006).
18. Niederberger, V. et al. Evolution of IgM, IgE and IgG(1-4)antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur J Immunol* **32**, 576-584(2002).
19. Kraft, S. & Novak, N. Fc receptors as determinants of allergic reactions. *Trends Immunol* **27**, 88-95(2006).
20. Sampson, H.A. et al. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *The Journal of allergy and clinical immunology* **115**, 584-91(2005).
21. Fallon, P.G. & Mangan, N.E. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nature reviews. Immunology* **7**, 220-30(2007).
22. Hawrylowicz, C.M. & O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature reviews. Immunology* **5**, 271-83(2005).
23. Romagnani, S. Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* **119**, 1511-3(2007).
24. Position paper: Immunotherapy. (EAACI) The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* **48**, 7-35(1993).
25. Hoffman, D.R. & Jacobson, R.S. Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting? *Ann Allergy* **52**, 276-278(1984).
26. Fitzgerald, K.T. & Flood, A.A. Hymenoptera Stings. *Clinical Techniques in Small Animal Practice Practical Toxicology* **21**, 194-204(2006).
27. Schröder, E. et al. Haemolytic activity and action on the surface tension of aqueous solutions of synthetic melittins and their derivatives. *Experientia* **27**, 764-5(1971).
28. Shkenderov, S. & Koburova, K. Adolapin--a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **20**, 317-21(1982).
29. Edery, H. et al. Venoms of vespidae. In: S. Bettini Ed. *Arthropod Venoms* 691-777(1978).

30. Kolarich, D. et al. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *The FEBS journal* **272**, 5182-90(2005).
31. Blank, S. et al. Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 5403-13(2010).
32. Seismann, H. et al. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Molecular immunology* (2009).doi:10.1016/j.molimm.2009.10.005
33. Zheng, L. et al. Fine epitope mapping of humanized anti-IgE monoclonal antibody omalizumab. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **375**, 619-622(2008).
34. Loveless, M. Immunological studies of pollenosis. I. The presence of two antibodies reacted to the same pollen antigen in the serum of treated hay fever patients. *J. Immunol.* **38**, 25-50(1940).
35. Lichtenstein, L.M., Holtzman, N.A. & Burnett, L.S. A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **101**, 317-24(1968).
36. Cooke, R. et al. Serological evidence of immunity with co-existing sensitisation in a hay fever type of human allergy. *J. Exp. Med.* **62**, 733-750(1938).
37. Nouri-Aria, K.T. et al. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 3252-9(2004).
38. Jonuleit, H. et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1213-22(2000).
39. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497(1975).
40. Ward, E.S. et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **341**, 544-6(1989).
41. Hoogenboom, H.R. & Winter, G. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* **227**, 381-388(1992).

42. Hoogenboom, H.R. et al. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering* **4**, 1-20(1998).
43. Hoogenboom, H.R. et al. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* **19**, 4133-4137(1991).
44. Hoogenboom, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature biotechnology* **23**, 1105-16(2005).
45. Hoogenboom, H.R. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **178**, 1-37(2002).
46. Burton, D.R. et al. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10134-10137(1991).
47. Clackson, T. et al. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-628(1991).
48. KleinJan, A. et al. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* **15**, 491-7(2000).
49. Barbas, C.F. et al. Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J. Mol. Biol.* **230**, 812-823(1993).
50. Cai, X. & Garen, A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6537-6541(1995).
51. Chester, K.A. et al. Phage libraries for generation of clinically useful antibodies. *Lancet* **343**, 455-456(1994).
52. Kettleborough, C.A. et al. Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments. *Eur. J. Immunol.* **24**, 952-958(1994).
53. Davies, J.M., O'Hehir, R.E. & Suphioglu, C. Use of phage display technology to investigate allergen-antibody interactions,. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**, 1085-1092(2000).

54. Finlay, W.J. et al. Exploiting the avian immunoglobulin system to simplify the generation of recombinant antibodies to allergenic proteins. *Clin Exp Allergy* **35**, 1040-1048(2005).
55. Finlay, W.J. et al. Generation of high-affinity chicken single-chain Fv antibody fragments for measurement of the *Pseudonitzschia pungens* toxin domoic acid. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3343-3349(2006).
56. Sapats, S.I. et al. Generation of chicken single chain antibody variable fragments (scFv) that differentiate and neutralize infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol* **148**, 497-515(2003).
57. Sapats, S.I. et al. Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol* **151**, 1551-1566(2006).
58. Yamanaka, H.I., Inoue, T. & Ikeda-Tanaka, O. Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. *J. Immunol.* **157**, 1156-1162(1996).
59. Lang, I.M., Barbas, C.F. & Schleef, R.R. Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage- display library against human alpha-granules. *Gene* **172**, 295-298(1996).
60. Arbabi Ghahroudi, M. et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS. Lett.* **414**, 521-526(1997).
61. Skerra, A. & Plückthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041(1988).
62. Huston, J.S. et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5879-5883(1988).
63. Bird, R.E. et al. Single chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426(1988).
64. Better, M. et al. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**, 1041-1043(1988).
65. Clark, M.A. et al. Isolation of human anti-c-erbB-2 Fabs from a lymph node-derived phage display library. *Clin. Exp. Immunol.* **109**, 166-174(1997).
66. Pereira, S. et al. Combinatorial antibodies against human malignant melanoma. *Hybridoma* **16**, 11-16(1997).
67. de Wildt, R.M. et al. Heavy chain CDR3 optimization of a germline encoded recombinant antibody fragment predisposed to bind the U1A protein. *Protein Eng.* **10**, 835-841(1997).

68. Graus, F. et al. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2866-2872(1997).
69. Moreno de Alboran, I. et al. Human monoclonal Fab fragments specific for viral antigens from combinatorial IgA libraries. *Immunotechnology* **1**, 21-28(1995).
70. Marks, J.D. et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581-597(1991).
71. de Haard, H.J. et al. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol.Chem.* **274**, 18218-18230(1999).
72. Vaughan, T.J. et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.* **14**, 309-314(1996).
73. Hoogenboom, H.R. et al. Building antibodies from their genes. *Immunol. Rev.* **130**, 41-68(1992).
74. Barbas, C.F. et al. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4457-4461(1992).
75. Garrard, L.J. & Henner, D.J. Selection of an anti-IGF-1 Fab from a Fab phage library created by mutagenesis of multiple CDR loops. *Gene* **128**, 103-109(1993).
76. Soderlind, E., Vergeles, M. & Borrebaeck, C.A. Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions. *Gene* **160**, 269-272(1995).
77. Nissim, A. et al. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *Embo. J.* **13**, 692-698(1994).
78. Griffiths, A.D. et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J* **13**, 3245-3260(1994).
79. Knappik, A. et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* **296**, 57-86(2000).
80. Perelson, A.S. & Oster, G.F. Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *Journal of theoretical biology* **81**, 645-70(1979).
81. Hanes, J. et al. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature biotechnology* **18**, 1287-92(2000).

82. Cook, G.P. & Tomlinson, I.M. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunology today* **16**, 237-42(1995).
83. Frippiat, J.P. et al. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Human molecular genetics* **4**, 983-91(1995).
84. Tomlinson, I.M. et al. The structural repertoire of the human V kappa domain. *The EMBO journal* **14**, 4628-38(1995).
85. McCormack, W.T., Tjoelker, L.W. & Thompson, C.B. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annual review of immunology* **9**, 219-41(1991).
86. Pickel, J.M. et al. Differential regulation of V(D)J recombination during development of avian B and T cells. *International immunology* **5**, 919-27(1993).
87. McCormack, W.T. & Thompson, C.B. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light-chain gene. *Advances in immunology* **48**, 41-67(1990).
88. Reynaud, C.A. et al. Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* **59**, 171-183(1989).
89. Reynaud, C. et al. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* **48**, 379-388(1987).
90. Reynaud, C.A., Anquez, V. & Weill, J.C. The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire. *European journal of immunology* **21**, 2661-70(1991).
91. McCormack, W.T., Hurley, E.A. & Thompson, C.B. Germ line maintenance of the pseudogene donor pool for somatic immunoglobulin gene conversion in chickens. *Molecular and cellular biology* **13**, 821-30(1993).
92. McCormack, W.T. & Thompson, C.B. Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity. *Genes & development* **4**, 548-58(1990).
93. Hof, D., Hoeke, M.O. & Raats, J.M. Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens. *Clinical and experimental immunology* **151**, 367-77(2008).
94. Leslie, G.A. & Clem, L.W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of experimental medicine* **130**, 1337-52(1969).

95. Sun, S. et al. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **15**, 708-12(2001).
96. Fellah, J.S. et al. Phylogeny of immunoglobulin heavy chain isotypes: structure of the constant region of *Ambystoma mexicanum* epsilon chain deduced from cDNA sequence. *Immunogenetics* **38**, 311-7(1993).
97. Warr, G.W., Magor, K.E. & Higgins, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology today* **16**, 392-8(1995).
98. Faith, R.E. & Clem, L.W. Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population. *Immunology* **25**, 151-64(1973).
99. Graham, F.L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74(1977).
100. Kinet, J.P. et al. A cDNA presumptively coding for the alpha subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Biochemistry* **26**, 4605-10(1987).
101. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.* (1989).
102. Saiki, R.K. et al. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-166(1986).
103. Saiki, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491(1988).
104. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467(1977).
105. Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145(1988).
106. Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175(1989).
107. Mandel, M. & Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162(1970).
108. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523(1979).
109. Bushman, W. et al. Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science (New York, N.Y.)* **230**, 906-11(1985).

110. Hartley, J.L., Temple, G.F. & Brasch, M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* **10**, 1788-95(2000).
111. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685(1970).
112. Boel, E. et al. Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods* **239**, 153-166(2000).
113. Huls, G.A. et al. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* **17**, 276-281(1999).
114. Norderhaug, L. et al. Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *J. Immunol. Methods* **204**, 77-87(1997).
115. Persic, L. et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* **187**, 9-18(1997).
116. Kozak, M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8301-8305(1990).
117. Kozak, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**, 8125-8148(1987).
118. Boussif, O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7297-301(1995).
119. Hartley, R.W. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 450-454(1989).
120. Braren, I. et al. Generation of human monoclonal allergen-specific IgE and IgG antibodies from synthetic antibody libraries. *Clinical chemistry* **53**, 837-44(2007).
121. Wurzburg, B.A., Garman, S.C. & Jardetzky, T.S. Structure of the human IgE-Fc C epsilon 3-C epsilon 4 reveals conformational flexibility in the antibody effector domains. *Immunity* **13**, 375-385(2000).
122. Feige, M.J. et al. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Molecular cell* **34**, 569-79(2009).

123. Bernard, P. & Couturier, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of molecular biology* **226**, 735-45(1992).
124. Braren, I. *Darstellung Allergen-spezifischer Antikörper und ihrer Rezeptoren als zentrale Komponenten für Diagnostik und Therapie der IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktion*. 284(Görich und Weiershäuser: 2007).
125. Andrade, E.V. et al. Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. *Journal of biochemistry* **128**, 891-5(2000).
126. Braren, I. et al. Comparative expression of different antibody formats in mammalian cells and *Pichia pastoris*. *Biotechnology and applied biochemistry* **47**, 205-14(2007).
127. Spillner, E. *Selektion und Expression von rekombinanten Antikörpern für analytische und therapeutische Applikationen*. (Hamburg, 2002).
128. Wang, J., Godbold, J. & Sampson, H. Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 1219-24(2008).
129. Wood, R.A. et al. Accuracy of IgE antibody laboratory results. *Ann Allergy Asthma Immunol* **99**, 34-41(2007).
130. Hendershot, L. et al. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Cell Biol.* **104**, 761-7(1987).
131. Wurzburg, B.A. & Jardetzky, T.S. Conformational flexibility in immunoglobulin E-Fc 3-4 revealed in multiple crystal forms. *Journal of molecular biology* **393**, 176-90(2009).
132. Wurzburg, B.A. & Jardetzky, T.S. Structural insights into the interactions between human IgE and its high affinity receptor Fc[ϵ]RI. *Molecular Immunology* **38**, 1063-1072(2002).
133. Henry, A.J. et al. Conformation of the isolated cepsilon3 domain of IgE and its complex with the high-affinity receptor, FcepsilonRI. *Biochemistry* **39**, 7406-13(2000).
134. Vangelista L, Laffer S, Turek R, Grönlund H, Sperr WR, Valent P, Pastore A, V.R. The immunoglobulin-like modules Cepsilon3 and alpha2 are the minimal units necessary for human IgE-FcepsilonRI interaction. *J Clin Invest.* **103**, 1571-8(1999).

135. Baird B, S.R. Interaction of IgE with its high-affinity receptor. Structural basis and requirements for effective cross-linking. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **88**, 23-8(1989).
136. Chapman, M.D., Heymann, P.W. & Platts-Mills, T.A. Epitope mapping of two major inhalant allergens, Der p I and Der f I, from mites of the genus *Dermatophagoides*. *J Immunol* **139**, 1479-1484(1987).
137. Garman, S.C. et al. Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc[epsilon]RI[alpha]. **406**, 259-266(2000).
138. Weetall, M.S. Mapping the site of interaction between murine IgE and its high affinity receptor with chimeric Ig. *J. Immunol.* **145**, 3849-3854(1990).
139. McDonnell, J.M. et al. The structure of the IgE Cepsilon2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity receptor FcepsilonRIalpha. *Nature structural biology* **8**, 437-41(2001).
140. Cook, J.P. et al. Identification of contact residues in the IgE binding site of human FcepsilonRIalpha. *Biochemistry* **36**, 15579-88(1997).
141. Wan, T. et al. The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Nat Immunol* **3**, 681-686(2002).
142. Bousquet, J., Lockey, R. & Malling, H.J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* **102**, 558-562(1998).
143. Andris-Widhopf, J. et al. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J Immunol Methods* **242**, 159-181(2000).
144. Chiliza, T.E., Van Wyngaardt, W. & Du Plessis, D.H. Single-Chain Antibody Fragments from a Display Library Derived from Chickens Immunized with a Mixture of Parasite and Viral Antigens. *Hybridoma* **27**, 413-421(2008).
145. Kühn, R. & Torres, R. Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting. *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols* 175-204 (2002).doi:10.1385/1-59259-178-7:175
146. Kaufman, J. The simple chicken major histocompatibility complex: life and death in the face of pathogens and vaccines. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **355**, 1077-84(2000).

9. Anhang

9.1. Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von metabion Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

Universelle Sequenzier-Oligonukleotide

LMB3	CAGGAAACAGCTATGAC
Fd-seq	GAATTTTCTGTATGAGG
T7 promotor for	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH back	TAGAAGGCACAGTCGAGG
M13 universal	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAA
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCATGA
EF1 α	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC

Oligonukleotide zur Generierung der avianen cDNA

GSP vh	gcggacgaagcggacaacaggcag
IgY lc back	ccccagtgggactattagca
oligodT24	tttttttttttttttttttt

Oligonukleotide zur Überprüfung der avianen cDNA

chgaphdfor	atttgccgtattggccgcc
chgaphdback	CAGCAGCCTTCACTACCCTC

Oligonukleotide zur Amplifikation der avianen variablen Regionen

Chicken Vh for	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGG
Chicken Vh back	GGAGGAGACGATGACTTCGGTCC

Chicken VI for	GCGCTGACTCAGCCGTCCTCGGTG
Chicken VI back	ACCTAGGACGGTCAGGGTTGTCCC

Oligonukleotide zur Amplifikation und Analyse der StarGate® Technologie

SG-CHIVHfor	GATTAGCGTCTCC' AATGGCCGTGACGTTGGACGAGT CCGG*G
SG-CHIVHback	GATTAGCGTCTCCTCCCG' GAGGAAACGATGACTTCG GTCC*C
SG-CHIVLfor	GATTAGCGTCTCC' AATGGCGCTGACTCAGCCGTCCT CGGT*G
SG-CHIVLback	GATTAGCGTCTCCTCCC' ACCTAGGACGGTCAGGGTT GTCC*C
ch scFv IBA20 for	GATCGTCTCCAATGGCCGTGACG
ch scFv IBA20 back	GATCTCCTCCCACCTAGGACGGT
pENTRY-IBA20 seq for	GGGTTATTGTCTCATGAGCG
pENTRY-IBA20 seq rev	CCCCTGATTCTGTGGATAACCG
pASG44for	GAGTTATTTTACCACTCCCTATC
chvH-pASG_for	GATCCGTCTCCAATGGCCGTGACGTTGGACGAGTCC
ch vL-pASG_rev	GATCCGTCTCCTCCCACCTAGGACGGTCAGGGT

Oligonukleotide zur Amplifikation und Analyse der Gateway™ Technologie

Ch vH attB1 for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCGT GACGTTGGACGAGTCCGGG
Ch vL attB2 neu back	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGGA CGGTCAGGGTTGTCCC

Oligonukleotide zur Generierung von IgE_{CH2-4} und IgG₄CH₂₋₃ Antikörper-Konstrukten

vH Smi QVQLVQ	GATCATTTAAATGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGT GCAG
vH Smi EVQLV	GATCATTTAAATGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGT GG
scFv KLTVLG Sgs	GATCGGCGCGCCACCTAGGACGGTCAGCTTG

Oligonukleotide zur Generierung von Vollantikörper-Konstrukten

vH Smi QVQLVQ	GATCATTTAAATGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGT GCAG
vH Smi EVQLV	GATCATTTAAATGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGT GG
PLA9 vH Xho back	GATCCTCGAGACGGTGACCAGGGT
vL Sda QTVVTQ for	GATCCCTGCAGGGTGCCAGATGTCAGACTGTGGTGA CTCAGG
VL2/7-sbf for	GATCCCTGCAGGGTGCCAGATGTCTTCAGTCTGTGCT GACTCAGCCAC
vL KLTVLG Sgs kappa back	GATCGGCGCGCCACAGTTCGACCTAGGACGGTCAG CTTG

Oligonukleotide zur Generierung der chimären IgGE Vollantikörper-Konstrukte

IgG xho for	GATCCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCC
IgG CH1hinge back	CACGGTTGGGCACGGTGGGCATG
IgG1 CH2 back	CGGGTTGACCCCTTTGGCTTTGGAGATGG
IgE CH2 for	CACCGTGCCCAACCGTGAAGATCTTACAGTCG
IgE CH3 for	GCCAAAGGGTCCAACCCGAGAGGGGTG
IgE Sfi 5xHis rev	GATCGGCCAGCCGGCCTCAATGGTGGTGATGGT GTTTACCGGGATTACAGACACCG

9.2. Sequenzdaten

9.2.1. Verwendete Sequenzen

Die CDR der variablen Region der schweren Kette sind fett und kursiv, die CDR der variablen Region der leichten Ketten sind fett dargestellt.

Anti-Api m 2 Klon 9

```

caggtgcagctggtgcagctctgcagcagaggtgaaaaagcccgaggagctctctgaagatc      60
  Q V Q L V Q S A A E V K K P G E S L K I
tcctgtgaaggggtctggatacagttttaccagctactggatcggtcggtgcgccagatg      120
  S C K G S G Y S F T S Y W I G W V R Q M
cccggaaggggctggagtggtggatggggatcatctatcctggtgactctgataccagatac      180
  P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y
agcccgctccttccaaggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgcctac      240
  S P S F Q G Q V T I S A D K S I S T A Y
ctgcagtgaggcagcctgaaggcctcgacacggccgtgtattactgtgcaagactgtat      300
  L Q W S S L K A S D T A V Y Y C A R L Y
tttggtacgtttgactattggggccaaggtaccctggtcaccgtctcgagtgggtggaggc      360
  F G T F D Y W G Q G T L V T V S S G G G
gggttcaggcggaggtggctctggcggtagtgacttcagtcgtgctgactcagccacc      420
  G S G G G G S G G S A L Q S V L T Q P P
tcagcgtctgggacccccgggcagaggggtcaccatctcttgttctggaagcagctccaac      480
  S A S G T P G Q R V T I S C S G S S S N
atcggaagtaataactgtaaactggtaccagcagctcccaggaacggcccccaactcctc      540
  I G S N T V N W Y Q Q L P G T A P K L L
atcnatagtaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtct      600
  I X S N N Q R P S G V P D R F S G S K S
Ggcacctcagcctccctggccatcagtggggtccagtcgtgaggatgaggctgattattac      660
  G T S A S L A I S G L Q S E D E A D Y Y
tgtgcagcatgggatgacagcctgcagcgtgtattcggcgaggaggaccaagctgaccgtc      720
  C A A W D D S L Q R V F G G G T K L T V
cta
L
723

```

Anti-Api m 3

```

gaggtgcagctggtggagctctgggggaggtgtggtacggcctggggggtccctgagactc      60
  E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L
tcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatggcatgagctgggtccgccaagct      120
  S C A A S G F T F D D Y G M S W V R Q A
ccaggggaaggggctggagtggttctctggtattaattggaatggtggttagcacaggttat      180
  P G K G L E W V S G I N W N G G S T G Y
gcagactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactccctgtat      240
  A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
ctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcaagaaagctg      300
  L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R K L
ttgcctcttctattggggccaaggtaccctggtcaccgtctcgagtgggtggaggcggttca      360
  L P L H W G Q G T L V T V S S G G G G S
ggcggaggtggctctggcggtagtgacttcagactgtggtgactcaggagccatcgttc      420
  G G G G S G G S A L Q T V V T Q E P S F
tcagtgctccctggagggacagtcacactcacttggtggttgagctctggctcagtcctct      480
  S V S P G G T V T L T C G L S S G S V S

```

actagttactaccctagctggtaccagcagaccccaggccaggtccacgcacgctcatc 540
T S Y Y P S W Y Q Q T P G Q A P R T L I
 tacagcacaaacactcgcctcttctggtggtccctgatcgcttctctggtccatccttggg 600
 Y S T N T R S S G V P D R F S G S I L G
 aacaaagctgccctcaccatcacggggggccaggcagatgatgaatctgattattactgt 660
 N K A A L T I T G A Q A D D E S D Y Y C
 gtgctgtatatgggtagtggtttgtattcggcggaggggaccaagctgaccgtccta 717
V L Y M G S G F V F G G G T K L T V L

Anti-Api m 5

gagggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtcaagcctggagggtccctgagactc 60
 E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L
 tcctgtgcagcctctggattcaccttcagtgactactacatgagctggatccgccaggt 120
 S C A A S **G F T F S D Y Y M S** W I R Q A
 ccagggaaggggctggagtggtttcatacattagtagtagtggttagtaccatatactac 180
 P G K G L E W V S Y I S S S G S T I Y Y
 gcagactctgtgaagggccgattcaccatctccaggggacaacgccaagaactcactgtat 240
A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcaagacatggg 300
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R **H G**
 gcggtgtcttggtggccnaggtagccctggtcaccgtctcgagtggtggaggcggttcaggc 360
A G A W G X G T L V T V S S G G G G S G
 ggagggtggtctctggcggtagtgcacttcagtcctgtgttgacgcagccgccctcagtgct 420
 G G G S G G S A L Q S V L T Q P P S V S
 gggggcccgaggcaggggtcaccatctcctgactgggagcagctccaacattggggcg 480
 G A P G Q R V T I S C **T G S S S N I G A**
 gggttatgtgtacattggtagcagcctccaggaacagccccaaactcctcatctat 540
G Y V V H W Y Q Q L P G T A P K L L I Y
 ggtaacagcaatcgccctcaggggtccctgaccaattctctggtccaaagtctggcacc 600
 G N S N R P S G V P D Q F S G S K S G T
 tcagcctccctggccatcactggactccagtcctgaggatgaggctgattattactgcaaa 660
 S A S L A I T G L Q S E D E A D Y Y C **K**
 gcatgggataacagcctggtattcggcggaggggaccaagctgaccgtccta 711
A W D N S L V F G G G T K L T V L

Anti-Ves v 3

taggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtacagcctggcaggtccctgagactc 60
 - V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L
 tcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgcactgggtccggcaagct 120
 S C A A S **G F T F D D Y A M H** W V R Q A
 ccagggaagggcctggagtggtctcaggtattagttggaatagtggttagcataggctat 180
 P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y
 gcggactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactccctgtat 240
A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
 ctgcaaatgaacagctctgagagctgaggacacggccgtgtattactgtgcaagaatgagt 300
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R **M S**
 ccgcagttggttgactattggggccaaggtaccctggtcaccgtctcgagtggtggaggc 360
P Q L F D Y W G Q G T L V T V S S G G G
 ggttcaggcggagggtggctctggcggtagtgcacttcagtcctgtgtgactcagccaccc 420
 G S G G G G S G G S A L Q S V L T Q P P
 tcagcgtctgggacccccgggcagaggggtcaccatctcttggtctggaagcagctccaac 480
 S A S G T P G Q R V T I S C **S G S S S N**
 atcggaagtaattatgtatactggtagcagcctcccaggaacggccccaaactcctc 540
I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L L
 atctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggtccaaagtct 600
 I Y R N N Q R P S G V P D R F S G S K S

ggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgattattac 660
 G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y
 tgtgcagcatgggatgacagcctgggtattcggcgaggaggaccaagctgaccgtccta 717
 C **A A W D D S L V** F G G G T K L T V L

Anti-Ves v 5 Klon 1

cagggtgcagctgggtgcagtcctggggctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtc 60
 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
 tcctgcaaggcttctgggttacacctttaccagctatgggtatcagctgggtgacagggcc 120
 S C K A S **G Y T F T S Y G I S** W V R Q A
 cctggacaagggttgagtgggatgggatgagcgttacaatggtaacacaaaactat 180
 P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y
 gcacagaagctccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctac 240
A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y
 atggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcaagaggtgcg 300
 M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R **G A**
 gggttttctcattggggccaaggtaccctgggtcaccgtctcgagtggtggaggcggttca 360
G F S H W G Q G T L V T V S S G G G G S
 ggcggaggtgggtctggcggtagtgcactttctctgagctgactcaggaccctgctgtg 420
 G G G G S G G S A L S S E L T Q D P A V
 tctgtggccttgggacagacagtcnggatcacatgccaaaggagacagcctcagaagctat 480
 S V A L G Q T V X I T C **Q G D S L R S Y**
 tatgcaagctgggtaccagcagaagccaggacaggccccctgtacttgtcatctatggtaaa 540
Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y **G K**
 aacaaccggccctcagggtaccagacgtattctctgggtccagctcaggaaacacagct 600
N N R P S G I P D R F S G S S S G N T A
 tccttgaccatcactggggctcaggcggaagatgagggtgactattactgtaactcccg 660
 S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C **N S R**
 gacagcagtggttacgggtattcggcgaggaggaccaagctgaccgtccta 708
D S S G T V F G G G T K L T V L

Anti-Ves v 5 Klon 4

cagggtgcagctgggtgcagtcctggggctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtt 60
 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
 tcctgcaaggcttctgggatacaccttcactagctatgctatgcattgggtgacgagggcc 120
 S C K A S **G Y T F T S Y A M H** W V R Q A
 cccggacaaaaggcttgagtgggatgggatgagcgtggcaatggtaacacaaaaatat 180
 P G Q R L E W M G **W I N A G N G N T K Y**
 tcacagaagttccagggcagagtcaccattaccaggacacatccgcgagcacagcttac 240
S Q K F Q G R V T I T R D T S A S T A Y
 atggagctgagcagcctgagatctgaagacacggccgtgtattactgtgcaagacgtacg 300
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R **R T**
 ttgaataatgaggcgtattattggggccaaggtaccctgggtcaccgtctcgagtggtgga 360
L N N E A Y Y W G Q G T L V T V S S G G
 ggcgggttcaggcgagggtgggtctggcggtagtgcacttcagtctgtgctgactcagcca 420
 G G S G G G G S G G S A L Q S V L T Q P
 ccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcttgttctggaagcagctcc 480
 P S A S G T P G Q R V T I S C **S G S S S**
 aacatcggaagtaattatgtatactgggtaccagcagctcccagggaacggccccaaactc 540
N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L
 ctcatctataggaataatcagcgccctcaggggtccctgaccgattctctggtccaag 600
 L I Y **R N N Q R P S G V P D** R F S G S K
 tctggcacctcagcctccctggccatcagtggggtccggtccgaggatgaggctgattat 660
 S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y
 tactgtgcagcatgggatgacagcctgctgggtattcggcgaggaggaccaagctgaccgtc 720
 Y C **A A W D D S L L V** F G G G T K L T V

9.2.2. Sequenzen der chimären schweren Ketten IgGE1 und IgGE2

Der Übergang zwischen der IgG und der IgE schweren Kette ist in den Sequenzen unterstrichen.

IgGE1 schwere Kette

```

tccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggc      60
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G
acagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgg      120
T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
aactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctacagtcctcagga      180
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G
ctctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctac      240
L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaa      300
I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K
tcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccaaccgtgaagatcttacagtcgtcc      360
S C D K T H T C P P C P T V K I L Q S S
tgcgacggcgggcgggcacttccccccgaccatccagctcctgtgcctcgtctctgggtac      420
C D G G G H F P P T I Q L L C L V S G Y
accccaggggactatcaacatcacctggctggaggacgggcaggtcatggacgtggacttg      480
T P G T I N I T W L E D G Q V M D V D L
tccaccgcctctaccacgcaggaggggtgagctggcctccacacaaagcgagctcaccctc      540
S T A S T T Q E G E L A S T Q S E L T L
agccagaagcactgggtgtcagaccgcacctacacctgccaggtcacctatcaaggtcac      600
S Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y Q G H
acctttgaggacagcaccaagaagtgtgcagattccaacccgagaggggtgagcgcctac      660
T F E D S T K K C A D S N P R G V S A Y
ctaagccggcccgcccgcttgcacctgttccatccgcaagtcgcccacgatcacctgtctg      720
L S R P S P F D L F I R K S P T I T C L
gtgggtggacctggcaccacagcaaggggaccgtgaacctgacctgggtcccggggccagtg      780
V V D L A P S K G T V N L T W S R A S G
aagcctgtgaaccactccaccagaaaggaggagaagcagcgcgaatggcacgttaaccgtc      840
K P V N H S T R K E E K Q R N G T L T V
acgtccaccctgccggtggggcaccagactggatcgagggggagacctaccagtgagg      900
T S T L P V G T R D W I E G E T Y Q C R
gtgaccacccccacctgccagggccctcatgcggtccacgaccaagaccagcggcccg      960
V T H P H L P R A L M R S T T K T S G P
cgtgctgccccggaagtctatgcgtttgcgacgccggagtgccggggagccggggacaag      1020
R A A P E V Y A F A T P E W P G S R D K
cgcaccctcgctgctgatccagaacttcatgcctgaggacatctcggtgcagtggctg      1080
R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L
cacaacgaggtgcagctccccggacgcccggcacagcacgacgcagccccgcaagaccaag      1140
H N E V Q L P D A R H S T T Q P R K T K
ggctccgggttcttctgtcttcagccgcctggaggtgaccagggccgaatgggagcagaaa      1200
G S G F F V F S R L E V T R A E W E Q K
gatgagttcatctgccgtgcagtccatgaggcagcgagcccctcacagaccgtccagcga      1260
D E F I C R A V H E A A S P S Q T V Q R
gcggtgtctgtaaatccccggtaaa      1284
A V S V N P G K

```

IgGE2 schwere Kette

tccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggg	60
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G	
acagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtg	120
T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W	
aactcaggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttccccggctgtcctacagtcctcagga	180
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G	
ctctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttggggcacccagacctac	240
L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y	
atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaaggtggacaagagagttgagcccaa	300
I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K	
tcttgtagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccg	360
S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P	
tcagtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgag	420
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E	
gtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtac	480
V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y	
gtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagc	540
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S	
acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag	600
T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E	
tacaagtgaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaa	660
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I <u>S K</u>	
gccaaaggggtccaacccgagaggggtgagcgcctacctaagccggcccagcccgttcgac	720
<u>A K G S N</u> P R G V S A Y L S R P S P F D	
ctgttcatccgcaagtcgcccacgatcacctgtctggtgggtggacctggcacccagcaag	780
L F I R K S P T I T C L V V D L A P S K	
gggaccgtgaacctgacctgggtcccggggagcgggaagcctgtgaaccactccaccaga	840
G T V N L T W S R A S G K P V N H S T R	
aaggaggagaagcagcgcgaatggcacgttaaccgtcacgtccaccctgcccgggtgggcacc	900
K E E K Q R N G T L T V T S T L P V G T	
cgagactggatcgagggggagacctaccagtgacgggtgacccacccccacctgcccagg	960
R D W I E G E T Y Q C R V T H P H L P R	
gccctcatgcggtccacgaccaagaccagcggcccgcggtgctgccccggaagtctatgcg	1020
A L M R S T T K T S G P R A A P E V Y A	
tttgcgacgcccggagtggccggggagccggggacaagcgcaccctcgctgcctgatccag	1080
F A T P E W P G S R D K R T L A C L I Q	
aacttcatgcctgaggacatctcggtgcagtggtgcacaacgaggtgcagctcccggac	1140
N F M P E D I S V Q W L H N E V Q L P D	
gcccggcacagcacgacgcagccccgcaagaccaaggggtccgggttcttctgctcttcagc	1200
A R H S T T Q P R K T K G S G F F V F S	
cgcttgagggtgaccagggccgaatgggagcagaaagatgagttcatctgccgtgcagtc	1260
R L E V T R A E W E Q K D E F I C R A V	
catgaggcagcagccccctcacagaccgtccagcgcggtgtctgttaaattcccggtaaa	1320
H E A A S P S Q T V Q R A V S V N P G K	

9.2.3. Bibliothekssequenzen

9.2.3.1. Bibliothekssequenzen aus der Gateway™ Bibliothek

Die *frameshift* der Klone GW 2-4 wurden mit einem * in der Nukleotidsequenz markiert, und sowohl in dieser als auch in der Aminosäuresequenz grau unterlegt. Die CDR der variablen Region der schweren Kette sind fett und kursiv, die CDR der variablen Region der leichten Ketten sind fett hervorgehoben.

GW 1

```

acaagttttgtacaaaaaagcaggctccgccgtgacggttgacgagtcaggggggcggcctc      60
T S L Y K K A G S A V T L D E S G G G L
cagacgcccggaggaaacgctcagcctcgctctgcaaggcctccgggtttgacttcagcagc      120
Q T P G G T L S L V C K A S G F D F S S
tacgacatgcactgggtgacagggcgcttggaaggggctggaatgggtcgctggtatt      180
Y D M H W V R Q A P G K G L E W V A G I
cagtgtatttggcggttacacatactacggggccggcggtgaaggggccgtgccaccatctcg      240
Q C I G G Y T Y Y G P A V K G R A T I S
agggacaacgggcagagcactctgaggctgcaactgaacaacctcaggggctgaggacacc      300
R D N G Q S T L R L Q L N N L R A E D T
ggcacctacttctgcgccaaagcttatgggtggttatgggttggttgagtagtcatact      360
G T Y F C A K A Y G G Y G C G W S S H T
tctgctctaatacgacacatggggccacgggaccgaagtcacgcgtttcctccgggagcggc      420
S A L I D T W G H G T E V I V S S G S G
ggttctggtggcggtggcagcggtggcggtggtcaatggcgctgactcagccgtcctcg      480
G S G G G G S G G G G S M A L T Q P S S
gtgtcagcaaacccaggagaaaccgtcaagatcacctgctccgggggtggcaactatggt      540
V S A N P G E T V K I T C S G G G N Y G
ggaagttactattatggctggtaccagcagaagtcctcctggcagtgcccctgtcactgtg      600
G S Y Y Y G W Y Q Q K S P G S A P V T V
atctatgaaaacaccggtagaccctcgaacatcccttcacgattctccggttccacatct      660
I Y E N T G R P S N I P S R F S G S T S
ggctccacaaccacattaaccatcactgggggtccaagccgaggacgaggctgtctatttc      720
G S T T T L T I T G V Q A E D E A V Y F
tgtggtgactgggacagcagcagtaatgctggtatatttggggccgggacaaccctgacc      780
C G D W D S S S N A G I F G A G T T L T
gtcctaggaccagctttcttgtacaaagtgggt      813
V L G P S F L V Q S G

```

GW 2

```

acaagttttgtacaaaaaagcaggctccgccgtgacggttgacgagtcaggggggcggcctc      60
T S L Y K K A G S A V T L D E S G G G L
cagacgcccggaggagcgctcagcctcgctctgcaaggcctccggatttgacttcagcagt      120
Q T P G G A L S L V C K A S G F D F S S
tatgagatgcagtgggtgacagggcccccgcaagggttgaaagtgggtcgcggttatt      180
Y E M Q W V R Q A P G K G L K W V A G I
tacagtgatggaagtggcataagatacgggtcagcggtgcagggccgcgccaccatttcg      240
Y S D G S G I R Y G S A V Q G R A T I S
agggacaatgggcagaggacagtgaggctgcagctgaacaacctcaggggctgaggacacc      300
R D N G Q R T V R L Q L N N L R A E D T
ggcatctactactgcgccaaaggtgctggttagtggtgctggttggttggttggtgt      360
G I Y Y C A K G A G S G A G C V V G W C

```

tctgctggtgagatcgacgcat*gggtcacgggaccgaagtcatcgtttcctccgggagc 420
S A G E I D A W G H G T E V I V S S G S
ggcggttctggtggcggtggcagcggtggcggtggctcaatggcgctgactcagccgtcc 480
G G S G G G G S G G G G S M A L T Q P S
tcggtgtcagcaaaccaggagaaaccgtcaagatcacctgctccgggggtagtggcagc 540
S V S A N P G E T V K I T C **S G G S G S**
tatggaagttattactattatggctggtaccagcagaagtctcctggcagtggccctgtc 600
Y G S Y Y Y Y G W Y Q Q K S P G S A P V
actctgatctatgacaacaccaacagaccctcgaacatcccttcacgattctccggttcc 660
T L I Y **D N T N R P S N I P S** R F S G S
ctatccggctccacaaacacattaaccatcactggggtccaagtcgaggacgaggctatc 720
L S G S T N T L T I T G V Q V E D E A I
tatttctgtgggagctacgaagacagcatttagtggtgttgtatttggggccgggacaacc 780
Y F C **G S Y E D S I S G V V** F G A G T T
ctgaccgtcctaggaaccagcttttctgtacaaagtgg 816
L T V L G P S F L V Q S G

GW 3

acaagtttgtacaaaaaagcaggctccg*cgtagcgttgagcaggtccgggggaggcctc 60
T S L Y K K A G S **A** V T L D E S G G G L
cagacgcccggagggaacgctcagccctcgctctgcaaggcctccgggtttgacttcagcagt 120
Q T P G G T L S L V C K A S **G F D F S S**
tatggcatggcctgggtgagcagggcgcccggaagggttgagttcgctcgcaactatt 180
Y G M A W V R Q A P G K G L E F V A **T I**
aacagggatgctggttgacagggctacggggcgggcggtgaaggggccgtgccaccatctcg 240
N R D A G W T Y G A A V K G R A T I S
agggacaacgggcagagcacagtgaggctgcagctgaacaacctcagggtgaggacacc 300
R D N G Q S T V R L Q L N N L R A E D T
ggctcctactactgcgccagatctactcgggggtcatactagtgggtggtacttggcatatt 360
G S Y Y C A R **S T R G H T S G G T W H I**
gatgctggtagcctcgacgcatggggccacgggaccgaagtcatcgtttcctccgggagc 420
D A G S L D A W G H G T E V I V S S G S
ggcggttctggtggcggtggcagcggtggcggtggctcaatggcgctgactcagccgtcc 480
G G S G G G G S G G G G S M A L T Q P S
tcggtgttngcaaaccaggagaaaccgtcaagatcacctgctccgggggtaccagtggc 540
S V X A N P G E T V K I T C **S G G T S G**
tatgcttatggctggtaccagcagaagtctcctggcagtggccctgtcactgtgatctat 600
Y A Y G W Y Q Q K S P G S A P V T V I Y
gacaacaccaacagaccctcgacatcccttcacgattctccggttccgcatccggctcc 660
D N T N R P S D I P S R F S G S A S G S
acagccacattaaccatcactggggtccaagccgacgacgaggctgtctatttctgtggg 720
T A T L T I T G V Q A D D E A V Y F C **G**
agcagggacagcagctatgttggtatatatttggggccgggacaaccctgaccgtcctagga 780
S R D S S Y V G I F G A G T T L T V L G
cccagctttctgtacaaagtgg 804
P S F L V Q S G

GW 4

acaagtttgtacaaaaaagcaggctccg*cgtagcgttgagcaggtccgggggaggcctc 60
T S L Y K K A G S **A V** T L D E S G G G L
cagacgcccggaggagcgctcagccctcgctctgcaaggcctccgggttcaccttcagcagc 120
Q T P G G A L S L V C K A S **G F T F S S**
ttcaacatgttctgggtgagcagggcgcccggaagggttggaatacgtcggtcaaatt 180
F N M F W V R Q A P G K G L E Y V G **Q I**
accaaggatggtgctggcacagaatatggggcgggcggtgaaggggccgtgccaccatctcg 240
T K D G A G T E Y G A A V K G R A T I S

agggacaacgggcagagcacagtgaggtgcacctgaacaacctcagggctgaggacacc 300
 R D N G Q S T V R L H L N N L R A E D T
 ggcacctacttctgcgcaaaagtgcgtggttagttgtcctagaccttgtggtggtgattac 360
 G T Y F C A K **S A G S C P R P C G G D Y**
 atcgacgcatggggccatgggaccgaagtcacgtttcctccgggagcggcggttctggt 420
I D A W G H G T E V I V S S G S G G S G
 ggcggtggcagcggtggcggtggctcaatggcgctgactcagccgtcctcggtgtcagca 480
 G G G S G G G G S M A L T Q P S S V S A
 aaccaggaggaaccgtcgagatcacctgctccgggagtagtggtactatggctggcac 540
 N P G G T V E I T C **S G S S G Y Y G** W H
 cagcagaagtctcctggcagtgcccttgtcactgtgatctataacaacgaccagagacc 600
 Q Q K S P G S A L V T V I Y **N N D Q R P**
 tcgaacatcccttcacgattctccggttccagatccggctccacggccacattgaccatc 660
S N I P S R F S G S R S G S T A T L T I
 actggggtccaagccgaggacgaggtgtctatttctgtggtggctggaacgacacttat 720
 T G V Q A E D E A V Y F C **G G W N D T Y**
 gctgatgttactatTTTTTggggccgggacaacctgaccgtcctaggaccagcttttctt 780
A D V T I F G A G T T L T V L G P S F L
 gtacaaagtgggt 792
 V Q S G

GW 5

acaagtttgtacaaaaaagcagggtccgccgtgacgttggacgagtccgggggcggcctc 60
 T S L Y K K A G S A V T L D E S G G G L
 cagacgcccggaggagcgctcagcctcacctgcaaggcctccgggttcaccttcagcagc 120
 Q T P G G A L S L T C K A S **G F T F S S**
 ttctacatgttctaggtgcgacagacacccggcaaggggctcgaatgggtcgctgatatt 180
F Y M F - V R Q T P G K G L E W V A D I
 ggcagcagtggttagttggacagagtatggggcggcggtgaagggccgtgccaccatctcg 240
G S S G S W T E Y G A A V K G R A T I S
 agggacaacgggcagagcacactgaggtgcagctgaacaacctcagggctgaggacacc 300
 R D N G Q S T L R L Q L N N L R A E D T
 ggcacctactactgcgcaaggggcgcttatttctagttggactactgctgaagatatcgac 360
 G T Y Y C A K **G A Y S S W T T A E D I D**
 gcatggggccacgggaccgaagtcacgtttcctccgggagcggcggttctggtggcggt 420
A W G H G T E V I V S S G S G G S G G G
 ggcagcggtggcggtggctcaatggcgctgactcagccgtcctcggtgtcagcaaaccg 480
 G S G G G G S M A L T Q P S S V S A N P
 ggagaaaaccgtcaagatcacctgctccgggggtagtggcagcatctactatggctggtac 540
 G E T V K I T C **S G G S G S I Y Y G** W Y
 cagcagaagtctcctggcagtgccctgtcactctgatctattacaacaccaacagaccc 600
 Q Q K S P G S A P V T L I Y **Y N T N R P**
 tcgaacatcccttcacgattctccggttccaaatccgggtccacagccacattaaccatc 660
S N I P S R F S G S K S G S T A T L T I
 actggggtccaagccgacgacgaggtgtctattactgtgggagtgacagacgacgagcgt 720
 T G V Q A D D E A V Y Y C **G S A D S S S**
 atatttggggccgggacaacctgaccgtcctaggaccagcttttcttgtacaaagtgggt 780
I F G A G T T L T V L G P S F L V Q S G

9.2.3.2. Bibliothekssequenzen aus der StarGate® Bibliothek

Die CDR der variablen Region der schweren Kette sind fett und kursiv, die CDR der variablen Region der leichten Ketten sind fett hervorgehoben.

Klon 1

```

atggccgtgacgttggacgagtcggtggggcgccctccagacgcccggaggagcgtcagc      60
M A V T L D E S G G G L Q T P G G A L S
ctcgtctgcaaggcctccgggttcaccttaagcagttacgacatgttctgggtgcccag    120
L V C K A S G F T L S S Y D M F W V R Q
gctccaggcaaggggctggaattcgtcgcaagtattagcaatactggtactgagacatca    180
A P G K G L E F V A S I S N T G T E T S
tacgcgcggcggtgaagggccgtgccaccatctcgagggacaacgggcagagcacagt    240
Y A P A V K G R A T I S R D N G Q S T V
aggctgcagctgaacaacctcagggtgaggacaccgccacctaacttctgcgcaaaaatt    300
R L Q L N N L R A E D T A T Y F C A K I
gctgttagtagttggtgcggtagtggttagtggttagtgaaatcgacgcatggggccacggg    360
A V S S W C G S G S G S E I D A W G H G
accgaagtcatcgtttcctccgggagcggttctggtggcggtggcagcggtggcggt    420
T E V I V S S G S G G S G G G S G G G
ggctcaatggcgctgactcagccgtcctcggtgtcagcaaacccaggagaaaccgtcaag    480
G S M A L T Q P S S V S A N P G E T V K
atcacctgctccgggggtgacagcagctactatggctggcaccagcagaagtctcctggc    540
I T C S G G D S S Y Y G W H Q Q K S P G
agtgccttgtcactgtgatctatgacaacaccaagagaccctcgaacatccattcacga    600
S A L V T V I Y D N T K R P S N I P S R
ttctccgggttccaaatccgggtccacgggcacattaaccatcactgggggtccaagccgag    660
F S G S K S G S T G T L T I T G V Q A E
gacgaggctgtctatcttctgtgggaatggagacagcagtgctggttatgttggtataatt    720
D E A V Y F C G N G D S S A G Y V G I I
ggggccggggacaaccctgaccgtcctaggtggg      753
G A G T T L T V L G G

```

Klon 2

```

atggccgtgacgttggacgagtcggtggggcgccctccagacgcccggaggagggtcagc      60
M A V T L D E S G G G L Q T P G G G L S
ctcgtctgcaaggcctccgggttcacatcagcaattacgacatgggttggtgagcag    120
L V C K A S G F T I S N Y D M G W V R Q
gcgcccggcaaggggctggagttcgtcgccagaattaacagtggtagttacacaaac    180
A P G K G L E F V A R I N S G G S Y T N
tacggggcggtgaagggccgtgccaccatctcgagggacaacgggcagagcacagt    240
Y G A A V K G R A T I S R D N G Q S T V
aggctgcagctgaacaacctcagggtgaggacaccgccacctaactactgcgcaaaaagt    300
R L Q L N N L R A E D T A T Y Y C A K S
gctgggtattgtagtggtgtttctagtcgggtgttcttatgctggtaccatcgacgcatgg    360
A G Y C S G V S S R C S Y A G T I D A W
ggccacgggaccgaagtcacgttttcctccgggagcggttctggtggcggtggcagc    420
G H G T E V I V S S G S G G S G G G S
ggtggcggtggctcaatggcgctgactcagccgtcctcggtgtgtgcaaacctgggagga    480
G G G G S M A L T Q P S S V C A N L G G
accgtcgagatcacctgctccgggggtagtggcagctatggctggtaccaggagaagtca    540
T V E I T C S G G S G S Y G W Y Q E K S
cctggcagtgcccctgtcactctgatctatggtaataaccaagaccctcgacatccct    600
P G S A P V T L I Y G N T N R P S D I P
tcacgattctccgggttcgcatctgtctccacgggcacattgaccatcactgggggtccga    660
S R F S G S A S V S T G T L T I T G V R

```

gccgaggacgaggtgtctattactgtgggagctacgacagcgggtgttggtatatatttggg 720
 A E D E A V Y Y C **G S Y D S G V G I F G**
 gccgggacaaccctgaccgtcctaggtggg 750
 A G T T L T V L G G

Klon 3

atggccgtgacgttggacgagtcggggggcgccctccagacgcccggaggagcgctcagc 60
 M A V T L D E S G G G L Q T P G G A L S
 ctcgctcgcaaggcctccggcttcaccttcagcagttatgagatgcagtggggtgcgccag 120
 L V C K A S **G F T F S S Y E M Q** W V R Q
 gcgcccggcaaggggtggaatacgtcgcgagtattagcagtggtggttagttacacaggc 180
 A P G K G L E Y V A **S I S S G G S Y T G**
 tacgggtcggcggtgaagggccgtgccaccatctcgagggacaacggggcagagcacagtg 240
Y G S A V K G R A T I S R D N G Q S T V
 aggtgcagctgaacaacctcaggggtgaggacaccggcatctactactgcgccaaaaat 300
 R L Q L N N L R A E D T G I Y Y C A K **N**
 gctgggtggtaacggtacttctgctgcctgcacctttttctatccttctgccttatact 360
A G G N G T S A A C T F F Y P S C P Y T
 tctgggtactatcgacgcgtggggccacgggaccgaagtcacgcgtttcctccgggagcggc 420
S G T I D A W G H G T E V I V S S G S G
 ggttctggtggcggtggcagcgggtggcggtggctcaatggcgctgactcagccgtcctcg 480
 G S G G G G S G G G G S M A L T Q P S S
 gtgtcagcaaaccaggagaaaccgtcaagatcacctgctccgggggtggcagcagcagc 540
 V S A N P G E T V K I T C **S G G G S S S**
 tactatggctggtaccagcagaagtcctcctggcagtgcccccgctcactgtgatctatggt 600
Y Y G W Y Q K S P G S A P V T V I Y **G**
 aacaccaacagaccctcgaacatcccttcacgattctccggttccaaatctggctccaca 660
N T N R P S N I P S R F S G S K S G S T
 aacacattaaccatcactgggtccgagccgaggacgaggtgtgtctatttctgtggtgcc 720
 N T L T I T G V R A E D E A V Y F C **G A**
 tacgacagcagcacttatgtgtctatatttggggccgggacaaccctgaccgtcctaggt 780
Y D S S T Y A A I F G A G T T L T V L G
 ggg 783
 G

Klon 4

atggccgtgacgttggacgagtcggggggcgccctccagacgcccgggaagagcgctcagc 60
 M A V T L D E S G G G L Q T P G R A L S
 ctcgctcgcaaggcctccaggttcaccttcagcagttacgacatggcctgggtgcgacag 120
 L V C K A S **R F T F S S Y D M A** W V R Q
 gcgcccggcaaggggtggaatacgtcgctggtattggcaacactggtagatacacaggc 180
 A P G K G L E Y V A **G I G N T G R Y T G**
 tacgggtcggcggtggatggccgtgccaccatctcgagggacaacggggcagagtacagtg 240
Y G S A V D G R A T I S R D N G Q S T V
 aggtgcagctgaacaacctcaggggtgaggacaccggcacctactactgcgccaaaact 300
 R L Q L N N L R A E D T G T Y Y C A K **T**
 actggtaaatgggttactgtggttggagtggttgtagattcgggtggtaatatcgacgca 360
T G N G Y C G W S G C T R F G G N I D A
 tggggccacgggaccgaagtcacgcgtttcctccgggagcggcggttctggtggcggtggc 420
 W G H G T E V I V S S G S G G S G G G G
 agcgggtggcggtggctcaatggcgctgactcagccgtcctcggtgtcggcgaaccaggga 480
 S G G G G S M A L T Q P S S V S A N P G
 gaaaccgtcaagatcgctgctccgggggttagcagtggttatggttatggctggtatcgg 540
 E T V K I A C **S G G S S G Y G Y G** W Y R
 cagaagtctcctggcagtagccctgtcactgtgatctatgccaacgacaagagaccctcg 600
 Q K S P G S T P V T V I Y **A N D K R P S**

Klon 5

9.2.4. Selektierter scFv Anti-Ves v 5 #2 (aus der Gateway® Bibliothek)

acaagtttgtacaaaaaagcagggctccgccgtgacgttggacgagtcggggggcggcctc	60
T S L Y K K A G S A V T L D E S G G G L	
cagacaccgaaaggaggggctcagcctcgctcgcgaggcctccgggttcaccttcaatagt	120
Q T P K G G L S L V C E A S G F T F N S	
tacgacatgatgtgggtgcgacaggcgcccggaaggggctggagttcgtcgctggtatt	180
Y D M M W V R Q A P G K G L E F V A G I	
agcaatgacggcagtgacacaggatatggggcgggcggtgaagggccgtgccaccatctcg	240
S N D G S D T G Y G A A V K G R A T I S	
agggacaacggtcagagcacagtgagactgcagctgaacgacctcagggctgaggacgcc	300
R D N G Q S T V R L Q L N D L R A E D A	
ggcacctactactgcgccagagatcacggcacttggtggttattattgggattctggctgc	360
G T Y Y C C A A R D H G T C T G Y Y W D S G G C	
atcgacgcatggggccacgggagcgaagtcatcgttcctccgggagcggcggttctggt	420
I D A W G H G T E V I V S S G S G G S G	

```

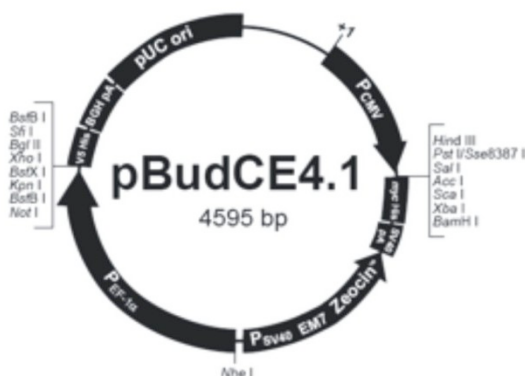
ggcgggtggcagcgggtggcgggtgggtcaatggcgctgactcagccgtcctcgggtgtcagcg      480
G G G S G G G G S M A L T Q P S S V S A
aaccggggagaaaaccgtcgagatcacctgctccgggggcagccgtactacagctggcac      540
N P G E T V E I T C S G G S R Y Y S W H
cagcagaagtcacctggcagtgccctgtcactgtgatctatgctaacaccaacagaccc      600
Q Q K S P G S A P V T V I Y A N T N R P
tcaaacatcccttcacgattctccggttctgcatccgggtccacaggcacattaaccatc      660
S N I P S R F S G S A S G S T G T L T I
actgggggtccgagggcgaggacgaggtgtctattactgtgggagtgacacagcagcact      720
T G V R G E D E A V Y Y C G S A D S S T
aatgctacatttggggccgggacaaccctgaccgtcctaggacccagcttttctgtacaa      780
N A T F G A G T T L T V L G P S F L V Q
agtgggt      786
S G

```

9.3. Vektorkarten

Nachfolgend sind alle Vektorkarten der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren dargestellt. Die Vektoren pBudCE4.1/Zeo und pCDNA3.1/Zeo dienen der Expression in HEK293-Zellen, die Vektoren pDONRTM21 (C) und pHEN2 (D) dienen zur Klonierung der GatewayTM Bibliothek und die Vektoren pNFUSE-IBA-link2 (E), pCFUSE-IBA (F), pENTRY-IBA20 (G), pASG-IBA102-p3 (H) in die StarGate[®] Bibliothek. Beide Klonierungssysteme wurden in *E.coli* exprimiert

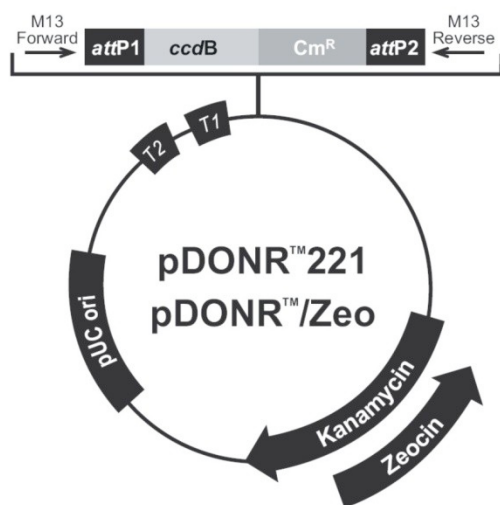
(A)



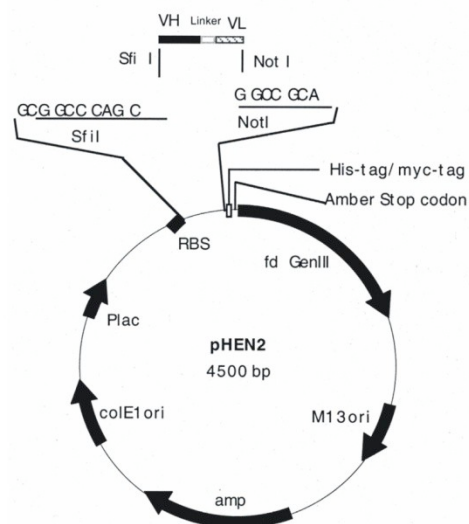
(B)



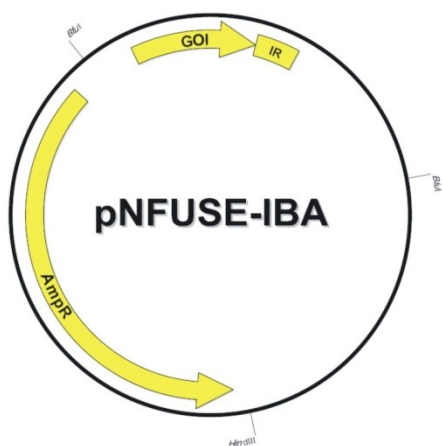
(C)



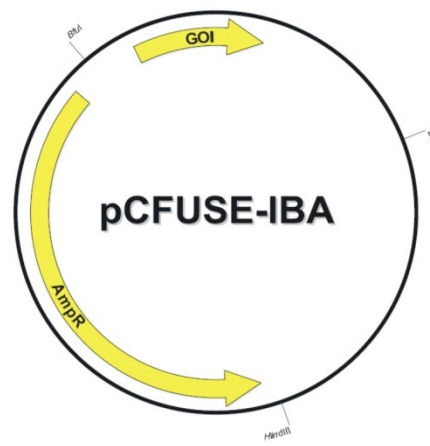
(D)



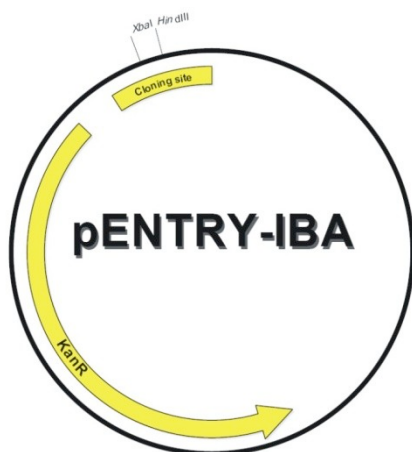
(E)



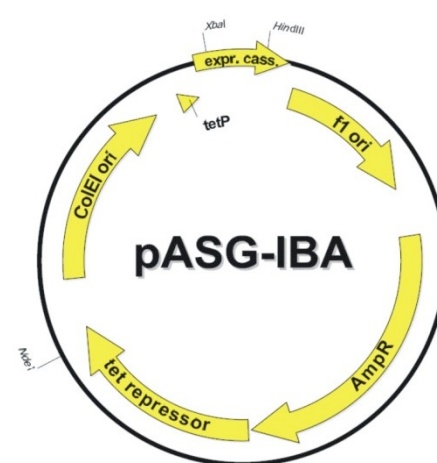
(F)



(G)



(H)



9.4. Entsorgung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entsprechend ihren R- und S-Sätzen gehandhabt und nach der Verordnung über gefährliche Stoffe (Gefahrgutverordnung) entsorgt.

Organische halogenfreie und halogenhaltige Lösungsmittel wurden getrennt in gekennzeichnete Behälter überführt. Kontaminierte Betriebsmittel wurden in dafür vorgesehenen Behältern gesammelt. Ethidiumbromid-Abfälle wurden in gesondert gekennzeichnete Behälter entsorgt.

Die Arbeit mit humanen Zellen war auf Zellkultur-Laboratorien beschränkt. S1-kontaminierter Abfall wurde vor der Entsorgung in einem Autoklav durch wassergesättigten, unter Druck (5 bar) stehenden Dampf 20 Minuten bei 120°C hitzesterilisiert.

9.5. Gefahrstoffe und Sicherheitsdaten

Folgende Reagenzien und Lösungsmittel waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen nach §6 der Gefahrstoffverordnung versehen:

Verbindung	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze
ABTS	Xi	36/37/38	26-36
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Acrylamid	T	45-46-20/21-25-36/38- 43-48/23/24/25-62	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
BCIP	-	-	22-24/25
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Dithiothreitol	Xi	36/37/38	36/37/39-22

EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Xn	22	-
Eisessig	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Kanamycinsulfat	T	61	26-36/37-39-45
Methanol	F,T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natronlauge	C	35	26-37/39-45
Ni-NTA-Agarose	Xn	10-22-40-42/43	13-26-36-46
NBT	Xn	20/21-33	22-45
Phenol (Tris-gesättigt)	T	24/25-34	28.6-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
Salzsäure, konz.	C	34-37	26-36/37/39-45
SDS	Xn	22-36/38	22-24/25
TEMED	C, F	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
TNBS	T	1-25-34-43	26-36/37/39-45
Trichloressigsäure	C, N	35-50/53	26-36/37/39-45-60-61
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Tris	Xi	36/38	-
Wasserstoffperoxid 30%	C	34	3-28-36/39-45
Xylen Cyanol FF	Xi	36	24
Zitronensäure	Xi	36	24/25

9.6. Gefahrensymbole

E	explosionsgefährlich	O	brandfördernd
C	ätzend	F	leichtentzündlich
F+	hochentzündlich	T	giftig
T+	sehr giftig	Xn	gesundheitsschädlich
Xi	reizend	N	umweltgefährlich

9.7. Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge

Aufgelistet sind hier die Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge für die Stoffe, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

R-Sätze (Hinweise auf besondere Gefahren)

R 1	in trockenem Zustand explosionsgefährlich
R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 10	entzündlich
R 11	leichtentzündlich
R 20	gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 21	gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
R 22	gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 23	giftig beim Einatmen
R 24	giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	giftig beim Verschlucken
R 26	sehr giftig beim Einatmen
R 33	Gefahr kumulativer Wirkungen
R 34	verursacht Verätzungen
R 35	verursacht schwere Verätzungen
R 36	reizt die Augen
R 37	reizt die Atmungsorgane
R 38	reizt die Haut
R 39	ernste Gefahr irreversiblen Schadens
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 45	kann Krebs erzeugen
R 46	kann vererbare Schäden verursachen
R 48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition
R 50	sehr giftig für Wasserorganismen
R 53	kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 61	kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 62	kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen

Kombination der R-Sätze

R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

S-Sätze (Sicherheitsratschläge)

S 3	kühl aufbewahren
S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 9	Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
S 13	von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
S 16	von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen
S 22	Staub nicht einatmen
S 23.2	Dampf nicht einatmen
S 24	Berührung mit der Haut vermeiden
S 25	Berührung mit den Augen vermeiden
S 26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel...(vom Hersteller anzugeben)
S 28.2	Wasser und Seife
S 28.6	Polyethylenglycol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser
S 29	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
S 33	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S 37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen
S 39	Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

- | | |
|------|--|
| S 46 | Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen |
| S 53 | Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – nur für den berufsmäßigen Verwender |
| S 60 | Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen |
| S 61 | Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen |

Kombination der S-Sätze

- | | |
|------------|--|
| S 24/25 | Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden |
| S 36/37 | Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen |
| S 36/37/39 | Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen |
| S 36/39 | Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen |
| S 37/39 | Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen |

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst möchte ich mich für die Unterstützung und Überlassung des Interessanten Themas bedanken, sowie bei Herrn Prof. Dr. Uli Hahn für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. habil. Edzard Spillner und Frau Dr. Ingke Braren danke ich für die Unterstützung in den letzten Jahren, die sehr fruchtbaren Diskussionen und die Denkanstöße, die meine Arbeit sehr bereichert haben.

Des Weiteren danke ich für die schnelle Durchsicht meiner Arbeit Herrn Dr. habil. Edzard Spillner, Dr. Ingke Braren, Dr. Kerstin Greunke, Dr. Simon Blank, Dr. Henning Seismann, Dirk Heinrich Melanie Plum, Julia Hecker und Yvonne Michel.

Stefanie Etzold danke ich für die Unterstützung bei der Bibliotheksklonierung sowie der Präparation diverser kompetenter Zellen.

Des Weiteren danke ich Julia Hecker, Yvonne Michel, Stefanie Etzold und Hélène Ginglinger sowie Dirk Heinrich für die stets unterhaltsamen Stunden, sowie die regen Diskussionen.

Der restlichen aktuellen sowie ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Connie West, Dr. Thomas Grunwald, Dr. Maria Rogacheva, Thorsten Mix, Nadine Markus, Daniela Scholz, Sandra Wu, Lea Kling, Anne Schramm, Judith Schulz und Frank Bantleon danke ich für das tolle Arbeitsklima und die unterhaltsamen Gespräche „zwischen durch“.

Meinen Freunden, im Besonderen Katja Mätzold, Andrea Christan, Susann Hauschild, Lisa Schöll und Christian Lenz danke ich für die jahrelange Unterstützung vor allem in schweren Zeiten.

Mein Besonderer Dank gilt meiner Familie insbesondere meiner Mutter und meiner Schwester, die immer zu mir gestanden und mich unterstützt haben. Abschließend möchte ich meiner „Ersatzmutter“ Margit gedenken, die diesen Tag leider nicht miterleben durfte und die mir immer noch sehr fehlt.
