

Aus der
Abteilung für Klinische Chemie
der II. Medizinischen Klinik
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. Ch. Wagener

**Expression mutagenisierter Teildomänen des humanen Carcinoembryonalen
Antigens (CEA) zur Lokalisation eines spezifischen Epitops**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Florian Sophus Lienau

aus Hamburg

Hamburg, 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

15. September 2003

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. M. Neumaier

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. F. Nolte

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. K. Pantel

.....

Für Ulli und Zita Vayu

In Gedenken an Astrid und Birgit

INHALT:

X.	Arbeitshypothese und Fragestellung	8
1.	Einleitung	9
1.1.	Die Netzwerktheorie des Immunsystems	10
1.2.	Das Carcinoembryonale Antigen (CEA)	15
1.3.	Der CEA-spezifische monoklonale Antikörper (Mak) T84.66	18
1.4.	Der monoklonale anti-Idiotyp Antikörper (MaId) 6G6.C4 und seine Homologie zu dem Antigen CEA	21
1.5.	Der filamentöse Helferphage M13KO7	23
2.	Materialien und Bezugsquellen	24
2.1.	Enzyme, Proteine und Antikörper	24
2.2.	Plasmide, Bakterienstämme und Phagen	25
2.2.1.	Plasmide	25
2.2.2.	Bakterienstämme	26
2.2.3.	Phagen	28
2.3.	Sonstige Reagenzien	28
2.4.	Geräte	30
2.5.	Allgemeine Labormaterialien	31
2.6.	Puffer und Medien	32
3.	Methoden	37
3.1.	Allgemeine Arbeitsmethoden	37
3.1.1.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen ..	37
3.1.2.	Photometrische Bakteriendichtebestimmung	37
3.1.3.	Gelanalyse zur Mengen- und Größenbestimmung von DNA	38
3.1.4.	Herstellung von Agarplatten	39
3.1.5.	Einfrieren, Auftauen und Ausstreichen von Bakterien	39

3.2. DNA-Präparationsmethoden	40
3.2.1. Präparation von 1,5-2 ml Bakterienkulturen („TEL-T-Minipräps“)	40
3.2.2. Präparation von 25 ml Bakterienkulturen.....	41
3.2.3. Präparation von 500 ml Bakterienkulturen.....	43
3.2.4. Präparation von ssDNA	45
3.2.5. Präparation von Plasmid-DNA aus Agarosegelen	46
3.2.6. Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
3.3. Gelelektrophorese von DNA.....	48
3.3.1. Agarose Gelelektrophorese	48
3.3.2. Sequenziergele.....	49
3.4. Herstellung von synthetischen Oligonukleotiden.....	51
3.5. Hybridisierung von Oligonukleotiden	52
3.6. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	53
3.6.1. Herstellung der Matrize.....	53
3.6.2. PCR mit spezifischen Primern.....	53
3.6.3. PCR-Deletionsmutagenese mit spezifischen Primern	55
3.6.4. PCR und PCR-Deletionsmutagenese mit bedingt spezifischen Nonamer-Primern	56
3.7. Enzymatische Modifikation von DNA	58
3.7.1. Restriktionshydrolyse mit Endonukleasen	58
3.7.2. Ligation von Nukleinsäurefragmenten in Vektoren.....	58
3.7.3. 5' Phosphorylierung von Oligonukleotiden.....	59
3.7.4. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden.....	61
3.8. DNA Sequenzierungen.....	61
3.8.1. Automatische Sequenzierung	61
3.8.2. Manuelle Sequenzierung.....	62
3.9. Transformation von Bakterien	63
3.9.1. „One-Step“-Transformation	63
3.9.2. Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	64
3.9.3. Elektroporation.....	64

3.10. DNA-Kolonietransfer („Colony screening")	65
3.10.1. DNA-Fixierung auf Nitrocellulosemembranen	65
3.10.2. Markierung einer DNA-Sonde nach dem „random priming“-Prinzip ...	65
3.10.3. Hybridisierung der membrangebundenen DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde.....	66
3.11. Protein-Kolonietransfer („Filterlift")	67
3.12. Proteinherstellung in Bakterien.....	69
3.12.1. Expression in E.coli	69
3.12.2. Extraktion des bakteriellen Periplasmas	69
3.12.3. Extraktion der kompletten Bakterienpellets	70
3.12.4. Bearbeitung von unlöslichen Proteinen („Inclusion bodies").....	70
3.13. Gewinnung von rekombinanten Phagen aus E.coli	71
3.13.1. Phageninfektion von E.coli und Ernte der rekombinanten Phagen	71
3.13.2. Selektionieren der Phagen gegen spezifische Antikörper („Panning") .	71
3.14. Säulenaффinitätschromatographie	72
3.14.1. Reinigung und Anreicherung von Antikörpern.....	72
3.14.2. Reinigung und spezifische Anreicherung von rekombinanten Proteinen	73
3.14.3. Ionenaustauschchromatographie.....	74
3.15. Gelelektrophorese von Proteinen.....	74
3.15.1. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	74
3.15.2. Molekulargewichtstandard	76
3.15.3. Proteinfärbungen von PAA Gelen.....	77
3.16. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot)	78
3.16.1. Elektrobplot	78
3.16.2. Vakuum Dot-Blot.....	79
3.16.3. Immunoblot.....	79
3.16.4. Chemilumineszenzblot	80
3.17. Enzymbindungsimmunoassays (ELISA)	80
3.17.1. Bindungsassay mit löslichen rekombinanten Proteinen	81
3.17.2. Bindungsassay mit rekombinanten Phagen	82

3.18. Proteinbestimmung nach Bradford	83
3.19. Densitometrische Analyse der Vacuum-Blots	83
4. Ergebnisse	85
4.1. 3456 POP: Mutagenese, Klonierung und Sequenzierung.....	85
4.1.1. PCR-Deletionsmutagenese mit 3456 POP	85
4.1.2. Klonierung der 3456 POP-PCR.....	88
4.1.3. Selektionierung der 3456 POP-Klonierung.....	89
4.1.4. Sequenzierung der Klone	90
4.1.4. a) Klone 5.8,5.9,7.9,6.9b,7.8,5.12	90
4.1.4. b) Klon 8.1	91
4.2. Definierte Fragmente CT2NA1, CT2NA2, CT2NA3, C12NA1, C13NA1, C12NA2: Mutagenese, Klonierung und Sequenzierung	92
4.2.1. PCR-Deletionsmutagenese mit definierten Primern	92
4.2.2. Vektorpräparationen aus E.coli.....	95
4.2.3. Klonierung der definierten Deletionsmutanten.....	95
4.2.4. Selektionierung der Klonierungen	96
4.2.5. Sequenzierung der definierten Fragmente	96
4.3. Immunoblot-Analysen	98
4.3.1. Expression der POP-Klon Peptide und ELISA	98
4.3.2. Analysen der definierten Peptide	100
4.3.2. a) Expression als lösliches und unlösliches Protein	100
4.3.2. b) Funktionsanalyse der Protein-Extrakte	104
4.3.2. c) elektrophoretisch aufgetrennte Protein-Extrakte	105
4.4. Ergebnisübersicht	109
5. Diskussion	110
6. Zusammenfassung.....	122
7. Literatur	123

8. Anhang.....	135
A.1. Oligonukleotidsequenzen	135
A. 1.1. Deletionsprimer.....	135
A. 1.1.1. C-terminal.....	135
A. 1.1.2. N-terminal	135
A. 1.2. Sequenzierprimer	136
A.2. schematische Darstellungen der Klone	137
A. 2.1. Aminosäure- und Nukleinsäure-Sequenz der CEA A3 Domäne in pCANTAB5E (Pharmacia) mit Markierungen der β -Stränge der Domäne und der definierten Primer	137
A. 2.2. schematische Darstellung der im Leserahmen sequenzierten Klone ..	138
A. 2.3. schematische Darstellung der POP-Primer und POP-Klone in CEA A3	139
A. 3. Röntgenfilm-Scan des Coloniescreenings.....	140
A. 4. "Filterlift"-Scan.....	141
A. 5. "Multiple Alignment" der 3456 POP Klon-Sequenzen.....	142
A. 6. "Alignment" der Sequenz des Klons 8.1	144
A. 7. "Multiple Alignment" der Sequenzen der definierten Klone	146
A. 8. Integritäten-Tabelle	148
A. 9. Karte des Vektors pCABTAB5E (Pharmacia).....	149
A.10. Abbildungen der Vakuum-Slot-Blots zu Diagramm 4.3.....	150
A.11. Abbildung der Proteinfärbung der aufgetrennten Extrakte	151
A.12. Abkürzungsverzeichnis	152
 Danksagungen	 154
 Erklärung.....	 155

X. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Das Ziel der Arbeit bestand darin, das Epitop, welches von dem monoklonalen Antikörper (MaK) T84.66 auf der A3 Domäne des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) erkannt wird, soweit wie möglich zu präzisieren. Diese Eingrenzung der Bindungsstelle sollte zu einem Peptidfragment der CEA A3 Domäne führen, welches als Surrogat des CEA einsetzbar wäre.

Mit Hilfe dieser Charakterisierung würde man zu weiteren Aussagen zu der intermolekularen Adhäsion und zum anderen zur allgemeinen Antikörper-Antigen Interaktion treffen können. Darüberhinaus würde ein so gewonnenes Peptid gegenüber einem zur Zeit favorisierten monoklonalen anti-idiotyp Antikörper (MaId) Vorteile bei in vivo Applikationen zur Immunisierung oder für "targeting"-Techniken haben, da es kleiner wäre und weniger immunogene und allergene Eigenschaften besäße. Ferner könnte zum Einsatz in in vitro-Assays ein günstiger CEA-Ersatz entstehen.

Als Methode wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) gerichtete Deletionsmutagenese (Chen und Zubay, 1983; Lesley et al., 1991) der vorliegenden cDNA der CEA A3 Domäne und die anschließende Expression in *E. coli* Bakterien und als Phagendisplay gewählt.

Das bakterielle Expressionssystem birgt den Vorteil der unglykosilierten Proteinexpression, da es sich bei dem gesuchten Epitop um einen von Glykosylierung ungestörten Proteinanteil des CEA handelt (Hammarström, 1999). Das Phagendisplay-System baut auf den filamentösen Helferphagen M13KO7, wobei dieser das rekombinante Protein in bis zu vier Kopien auf seiner Oberfläche präsentiert. Somit können in Assays möglicherweise kräftigere Signale erzielt werden. Mit der Deletionsmutagenese vom C-terminalen sowie vom N-terminalen Ende kann gezeigt werden bei welcher Verkürzung der Primärstruktur das Epitop zerstört wird. Das Verfahren wurde der zielgerichteten Punktmutagenese vorgezogen, da diese durch einzelne Mutationen konformationsrelevanter AS das Molekül so verändern kann, dass das Epitop verloren geht, obwohl die Aminosäure (AS) außerhalb des Epitops liegt.

1. EINLEITUNG

Gelb und Blau, mischt man sie zu gleichen Teilen, ergeben Grün, welches zu seinem Komplementär, dem Rot, schon in Harris' Farbkreis gegenübersteht. Obwohl komplementäre Farben als Gegensätze im Farbkreis am weitesten voneinander entfernt sind, verbinden sie sich, mischt man sie, zu der zentralen Farbe des Kreises, dem neutralen Grau.

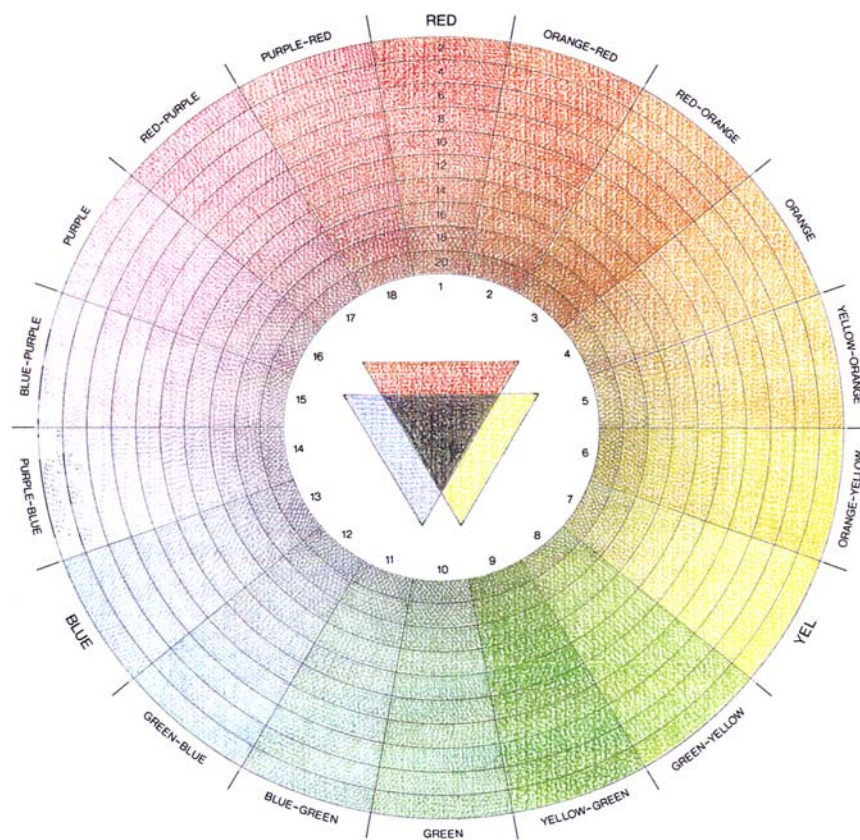


Abb. 1.1. Farbkreis von Moses Harris (1766) aus Silvestrini (1998)

Komplementäre als Gegensätze, die sich anziehen, kann man nicht nur in der Malerei, von Seurat im Pointillismus auf die Spitze getrieben, sondern auch durch die Literatur wie in Shakespeares „Romeo und Julia“ und alle Facetten der zivilisierten Gesellschaft verfolgen. In der Natur kann man Komplementäres bei

Räuber und Beute der Nahrungskette, den schattenspendenden Bäumen und den schattenbenötigenden Bodenpflanzen des Waldes bis hin zum Gegensatz der Geschlechter, die alle erst in ihrer Verbindung funktionieren, beobachten.

Komplementäre Interaktionen auf molekularer Ebene sind der Schlüssel zum Funktionieren von Organismen. Dieses grundlegende Prinzip von Schloss und Schlüssel, der Erkennung der Komplementäre, findet sich im Besonderen bei der Bindung von Antikörpern an die ihnen strukturell komplementären Antigene im Netzwerk des Immunsystems (Jerne 1974) wieder.

1.1. Die Netzwerktheorie des Immunsystems

Die 1974 von Niels Jerne aufgestellte Netzwerktheorie des Immunsystems beschreibt, entgegen der damals vorherrschenden Vorstellung der klonalen Selektionstheorie (Burnet, 1959), die Selbsterkennung der Komponenten als den Mittelpunkt des Systems. Er stellt sich das physiologische Immunsystem als Homöostase der Selbsterkennung vor, die im Falle einer externen Irritation (z.B. Infektion) aus dem Gleichgewicht gerät. Der B-Lymphozyt, welcher die Oberfläche des externen Immunogens erkennt, proliferiert und wird in dem Fall nicht durch suppressive Funktionen der Selbsterkennung gehemmt.

Die antigene Determinante des Antigens (Ag), welche durch einen Antikörper (Ak) erkannt wird (Ab1), wird Epitop und die komplementäre Bindungsstelle auf dem variablen Teil des Ak wird Paratop genannt. In der Konsequenz der Theorie werden die antigenen Determinanten im variablen Bereich des Ak als idiotypische Epitope oder Idiotope (Id) bezeichnet. Im weiteren der Kaskade der Selbsterkennung werden die Ak, die die Idiotope des Ab1 erkennen, anti-Idiotop Ak (Ab2) genannt, wobei der Idiotyp die Gemeinschaft aller Idiotope einer variablen Region eines Ak beschreibt. In der Weiterentwicklung der Theorie erklärt Jerne 1984 die Möglichkeiten der Bindung von Ab1 an Ab2, die noch im gleichen Jahr von Hay et al. präzisiert klassifiziert wurde. In dieser Klassifikation erkennt die α -Variante des Ab2 (Ab2 α) ein Idiotop des Ab1, welches nicht zur Bindungsstelle zwischen Ag und Ab1 gehört, also nicht dem Paratop entspricht. Die γ -Variante (Ab2 γ) erkennt ein Idiotop in der

Nachbarschaft des Paratops, so dass durch ihn die Ab1-Ag Bindung sterisch inhibiert wird. Die β -Variante (Ab2 β) erkennt nun das Paratop, inhibiert die Ab1-Ag Bindung kompetitiv und bildet den "internal-image anti-Idiotop Ak" (s. Abb. 1.2.).

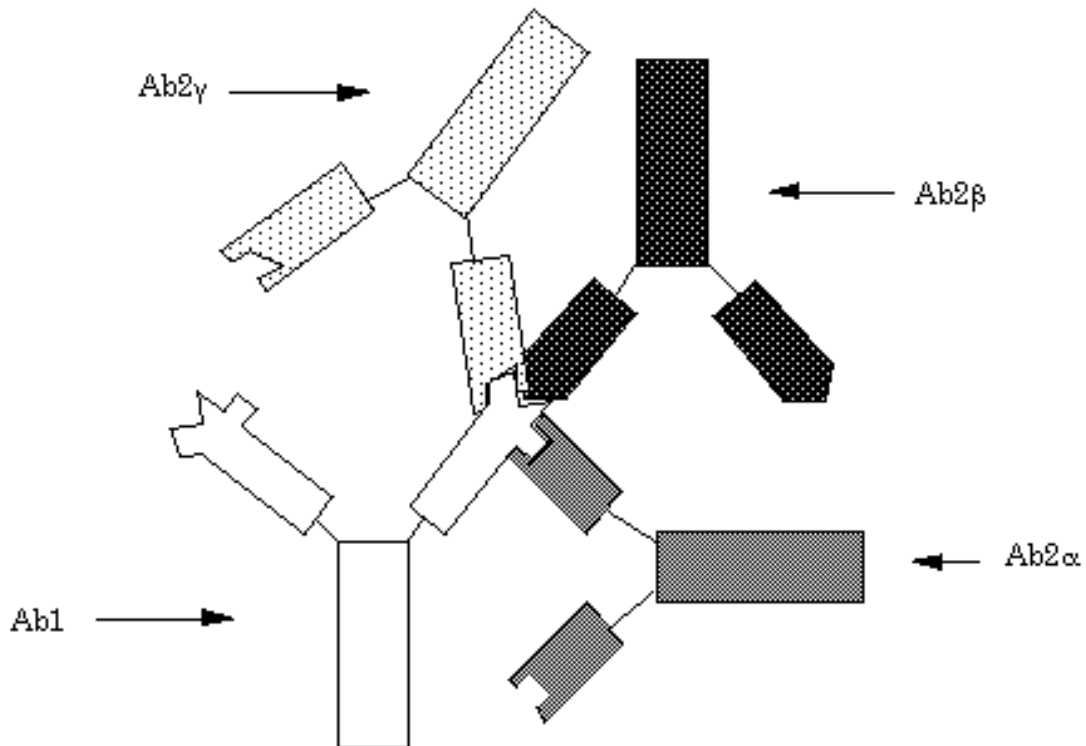


Abb. 1.2. Mögliche Ab1-Ab2 Verbindungen

Viele nachfolgende in vitro und in vivo Untersuchungen konnten das Vorliegen der Ak-Kaskade bestätigen (Cazenave, 1977; Urbain et al., 1977; Paul und Bona, 1982; Bona et al., 1981). Es gelang in Tiermodellen durch Immunisierung mit einem Ab1 einen Ab2 zu erzeugen, der durch Bindungs- und Inhibitionsstudien als internal-image anti-Idiotop Ak identifiziert werden konnte. Als Beispiel ahmte ein so erzeugter Ak Insulin (Sege und Peterson, 1978) nach oder zeigte, als internal-image anti-Idiotop Ak des TSH, eine Hormonwirkung am TSH-Rezeptor (Braun et al, 1993).

Coutinho fasste 1995 die Arbeiten zur Netzwerktheorie zusammen und schloss mit einem Ansatz zur Erklärung von Autoimmunkrankheiten aus der positiven Eigendynamik des Systems der Selbsterkennung. Allerdings weisen Kritiker (Golub,

1991) darauf hin, dass die Repertoiregröße der Gene, die für die variablen Ak-Regionen kodieren, das System so einschränkt, dass vor allem die Reaktionen auf externe Antigene nicht erklärt werden können. Rein rechnerisch müssten die numerischen Möglichkeiten des Netzwerkes bei einem externen Ag-Kontakt gesprengt werden. Das Netzwerk hält, bei einer Gesamtzahl von etwa 10^{12} Lymphozyten des Organismus, ein Repertoire von etwa 10^5 Lymphozyten verschiedener Spezifität bereit. Es benötigt eine hohe Anzahl somatischer Mutationen, um auf ein externes Ag zu reagieren, so dass bei einer nach der Netzwerktheorie zu erwartenden Reaktion mit einer Id-Anti-Id-Kaskade auf jede der Neumutationen bei jedem externen Ag-Kontakt 10^{12} Lymphozyten bei weitem nicht ausreichen würden. Darauf eingehend räumen Varela und Coutinho 1991 ein, dass die Synthese der klonalen Selektionstheorie und der Netzwerktheorie möglicherweise eine erklärende Hypothese darstellt. Hierbei kontrolliert die Netzwerkdynamik die Autoreaktivität, die Selbsterkennung und das Gedächtnis des Systems und definiert im Kern die molekulare Identität des Individuums. Die klonale Reaktion wird am Rande des Netzwerkes als defensives Verhalten einer gestörten Homöostase gesehen.

Immunglobuline (Ig) (bei Hoogenboom et al, 1992 zusammengefasst) bestehen aus einer variablen (Fv-Fragment) und einer konstanten Region. Bevor Ak molekular ganz verstanden waren, wurden sie in ein Fc-Fragment („crystallizable“) und ein Fab-Fragment („antigenbinding“) unterteilt, die sich nach einer enzymatischen Papain-Spaltung in der Gelenkregion („hinge-region“) des Ak ergaben (siehe Abb. 1.2.b). Das Fv-Fragment befindet sich am Aminoende des herkömmlichen Fab-Fragmentes, wobei der Rest des Fab- und das Fc-Fragment als konstante Region gelten, die aus C-Typ Domänen gebildet wird. Das Fc-Fragment ist Ig-Klassen typisch und dient vor allem Effektorfunktionen, wie Bindung an Zelloberflächen oder Serumkomplement.

Das Fv-Fragment von rund 22 kDa besteht seinerseits aus einem konservierten Anteil (Frameworks) und einem nicht konservierten, variablen Anteil (Complementarity Determining Regions, kurz CDRs). Der konservierte Anteil bildet

das Rückrad des variablen Anteils, während dieser die Strukturen für die Antigenerkennung beherbergt. Das Fv-Fragment setzt sich aus Teilen der Leichtkette sowie der Schwereketten, wobei der Ak aus jeweils zwei von ihnen aufgebaut ist, zusammen. Jede der beiden Ketten baut drei CDRs in den variablen Anteil des Fv-Fragmentes ein. Die CDRs der Schwereketten werden H1-H3 („heavy-chain“) und die der Leichtkette L1-L3 („light-chain“) genannt. In der dreidimensionalen Struktur des Ak kommen die sechs CDRs in enger nachbarschaftlicher Position zu liegen und bilden eine hochvariable Oberfläche, die die hohe Spezifität des Ak bedingt. Dieses dreidimensionale Komplementär des Epitopes wird Paratop genannt (Bentley, 1990) (vergl. Abb. 1.2.c).

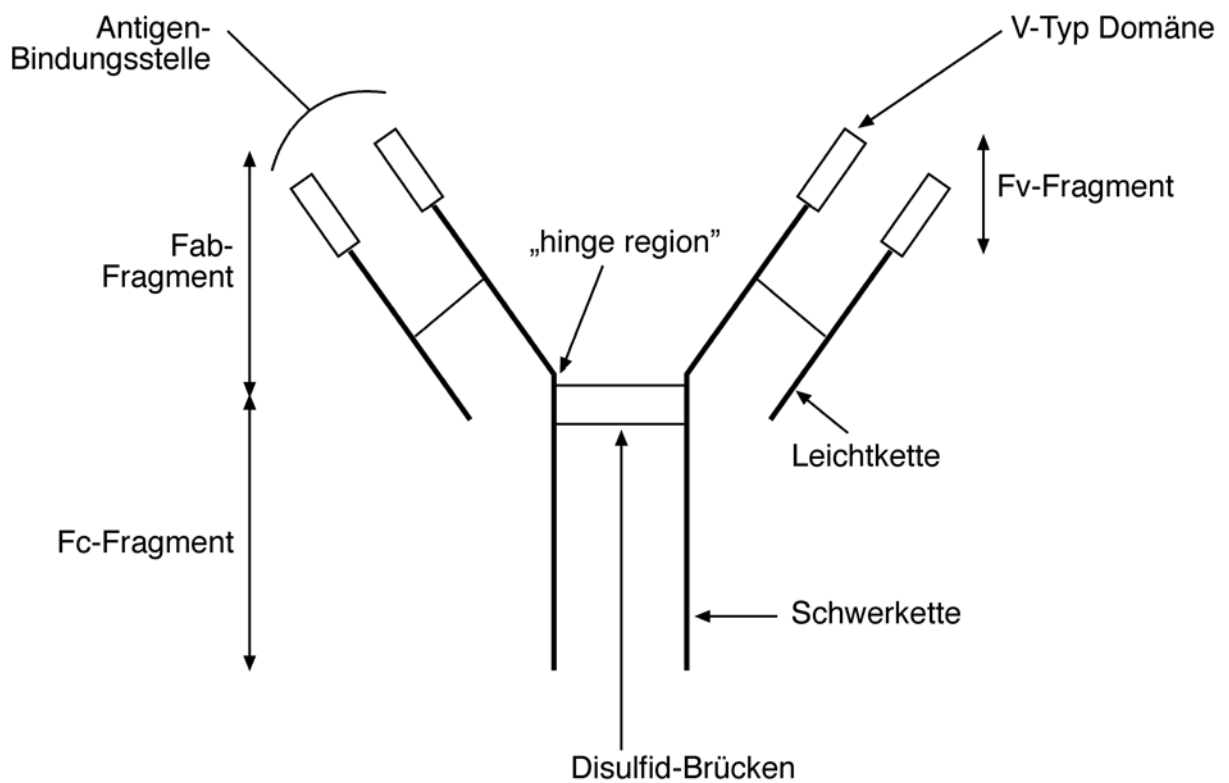


Abb. 1.2.b schematische Darstellung eines Antikörpers
(Beispiel IgG1)

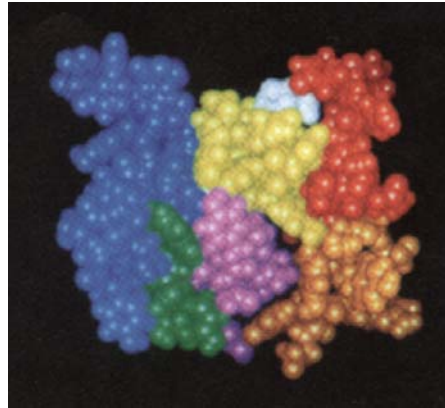


Abb. 1.2.c. Aufsicht auf das Paratop des Mak T84.66 (aus Neumaier, 1997) mit farblicher Unterlegung der verschiedenen CDRs.

Das Fv-Fragment wird von dimeren (Schwerkette und Leichtkette) Domänen des V-Typs gebildet. Jede der Domänen besitzt eine Ig-Faltung („Ig-Fold“), eine sogenannte β -Barrel Struktur mit zwei durch eine Disulfid-Brücke zusammengehaltenen, antiparallelen β -Faltblättern. Am Kopf der jeweiligen Domäne sind jeweils vier β -Stränge („ β -strands“) mit drei in Länge und Sequenz hypervariablen Schleifen („loops“) verbunden. Im Gegensatz zu den C-Typ Domänen der konstanten Region beinhalten die V-Typ Domänen zwei zusätzliche β -strands, um die drei hypervariablen loops möglich zu machen. Diese hypervariablen loops am Kopf der β -Barrel Struktur entsprechen den CDRs zur Ag-Erkennung, während die drei loops am Fußende nicht hypervariabel sind und dem Framework zugerechnet werden (siehe auch Abb. 5.2.).

Die Hypervariabilität der CDRs und somit auch die unterschiedlichen Ag-Spezifitäten, die ein Organismus in seiner Ak-Population vorhält, wird durch drei aufeinanderfolgende Systeme organisiert. Zunächst wird durch das „geneshuffling“ (VDJ-Gen-Rearrangement) des Lymphozyten eine hohe Diversivität der Ag-Bindungsstellen erreicht. Die Verknüpfung der DNA-Segmente (D mit J und V mit DJ) ist dabei nicht exakt und wird mit dem Einbau einzelner Nukleotide in die Verbindungsstellen unabhängig vom Keimbahn-template erneut variabel verändert.

Zuletzt gelangt der Ak bei einem Ag-Kontakt durch die „klonale Selektion“ zu einer Reifung. Durch zufällige Punktmutationen des Fv-Fragmentes wird es permanent leicht verändert, wobei die Mutanten unter einem hohen Selektionsdruck der optimierten Ak-Ag-Affinität stehen. Der Klon mit der höchsten Affinität zu dem Ag wird in seinem Proliferationsdrang unterstützt und beherrscht die polyklonale Immunantwort des Organismus.

1.2. Das Carcinoembryonale Antigen (CEA)

Das Molekül CEA wurde erstmals 1965 von Gold und Freedman beschrieben und wird strukturell zu der Immunglobulin-Superfamilie gerechnet, da es aus insgesamt sieben Ig-typischen Domänen zusammengesetzt ist. Davon sind sechs den Domänen der konstanten Region (C-Typ) der Igs sehr ähnlich, die paarweise insgesamt drei Wiederholungen bilden (siehe Abb. 1.4.). Die einzelne N-terminale Domäne ähnelt denen des Fv-Fragmentes (V-Typ). Die Primärstruktur des membranständigen Glykoproteins wurde 1987 von Oikawa entschlüsselt. Das CEA Molekül entspricht einer relativen Molmasse von 180 kDa mit einem Kohlenhydratanteil von 50-60 % (Paxton, 1987; Zusammenfassung Frangmyr, 2000).

Das Molekül gibt seinen Namen außerdem an die übergeordnete Subfamilie, der CEA-Familie, deren genetische Kodierung (29 Gene) sich im humanen Genom auf dem langen Arm des Chromosoms 19 befindet (Thompson, 1991; Hammarström, 1999). Die Familie teilt sich in den CEA-Arm mit sieben im Menschen vorkommenden Glykoproteinen, dem PSG-Arm („pregnancy specific antigen“) mit elf Genprodukten und elf Pseudogene (Beauchemin, 1999). Die sieben Glykoproteine des CEA-Armes, wobei hier nur das "nonspecific crossreacting antigen" (NCA) und das Biliäre Glykoprotein (BGP) namentlich genannt werden, weisen eine hohe strukturelle Homologie zu CEA auf (Frangmyr, 2000). Hierdurch erklärt sich die hohe Kreuzreaktivität vieler monoklonaler Anti-CEA Antikörper (Hammarström, 1989).

Beauchemin und Mitarbeiter haben 1999 zur besseren Übersicht für die Gen-Familie eine neue einheitlichere Nomenklatur eingeführt, so dass das BGP nun als *CEACAM1*, CEA mit *CEACAM5* und NCA mit *CEACAM6* bezeichnet wird. Die Proteinnamen entsprechen denen der Gene sind aber nicht kursiv gedruckt. Das Protein des CEA-Gens *CEACAM5* behält den alten Namen CEA bei.

Das CEA ist schon lange als tumorassoziiertes Antigen (TAA), besonders bei dem humanen kolorektalen Karzinom, aber auch bei anderen malignen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Mamma, der Lunge und des Pankreas, bekannt (Gaida, 1992; Neumaier, 1997; Hammarström, 1999; Beauchemin, 1999). CEA wird nicht nur in Tumorgewebe, sondern auch in physiologischer Kolonmukosa gefunden und gehört somit nach Old (1981) zu den TAA der Klasse 3. Physiologisch wird CEA in der Kolonmukosa fast ausschließlich luminal polarisiert an den Mikrovilli exprimiert und von dort in das Darmlumen abgegeben. So erreicht CEA nur zu einem geringen Anteil das Blutgefäßsystem. Im Tumorgewebe dagegen konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass die Zellen das CEA unpolarisiert an der gesamten Zelloberfläche exprimieren. Darüber hinaus wird das Protein zusätzlich von Zellen im nicht luminalen Tumorgewebsverband exprimiert und erreicht zu einem hohen Anteil das Blutserum, dessen CEA-Spiegel so im Tumorpatienten erhöht messbar ist. Hochreguliert wird das CEA im Tumorgewebe jedoch meist nicht (Hammarström, 1999).

Den TAA kommt vor dem Hintergrund, dass Tumorerkrankungen hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland darstellen, eine weitreichende Bedeutung zu. Das CEA wird bei 95 % der kolorektalen Karzinome, die neben Lungen- und Mammakarzinomen in der westlichen Welt der nördlichen Hemisphäre zu den häufigsten malignen Erkrankungen gehören, verstärkt in den Blutkreislauf sezerniert.

Unter den TAAs ist das CEA wohl das am besten untersuchte und wird, neben seiner Funktion als Tumormarker (zusammengefasst bei Pokorny, 2000), darüber

hinaus z.B. zum „adenovirus-targeting“ therapeutisch genutzt. Hierbei wurde der CEA-Promoter zusammen mit einem Cytosindeaminase-Gen in das virale Plasmid kloniert, um CEA-produzierende Tumoren (hier Magen-Karzinomzellen) selektiv zu infizieren und für eine Therapie mit 5-Fluorocytosin zugänglich zu machen (Lan, 1996). Auch Peptide als Fragmente von TAAs wurden mittlerweile in Form von Fusionsproteinen zum Beispiel an Doxorubicin gekoppelt zum "drug-targeting" (Arap, 1998) benutzt. Zudem setzte die Arbeitsgruppe um Jeffrey Schlom synthetische Peptide von TAAs ein, um einen Organismus speziell gegen das Epitop eines TAA-spezifischen monoklonalen Ak (Mak) zu immunisieren. Dazu wird aus einer Peptid-Bibliothek ein Peptid selektioniert, dass eine Bindung mit dem Paratop des TAA-spezifischen Ak eingeht. Die cDNA des Peptids wird dann mit einem Virushüllprotein rekombiniert und in Patienten-T-Zellen transduziert, was zu einer spezifischen, aktiven Immunisierung gegen ein TAA führt (Kantor, 1992; Tsang, 1995).

Die bessere molekulare Charakterisierung der TAAs in ihrer Struktur und Funktion scheint bei der Aufklärung des multifaktoriellen Transformationsprozesses von Gewebe während der Kanzerogenese eine wichtige Rolle spielen zu können. In dem physiologischen Schleimhautgewebe des Gastrointestinaltraktes funktioniert CEA als Adhäsions-Molekül (Ishii, 1994; Dobson, 1994), was auf eine homophile Dimerbildung des Proteins zurückgeht (Gaida, 1993; Zhou, 1993) (siehe Abb. 1.4.). Frangmyr und Hammarström zeigten 1999, dass CEA, als zentrales Molekül der Glykokalix der Kolonmukosa, zusammen mit anderen Mitgliedern der CEA-Familie für die epithel-bakteriellen Interaktionen mitverantwortlich ist. Bei den pathologischen Veränderungen des malignen Gewebes konnte schon früh eine Dysregulation von CEA, aber auch des CEACAM6 (NCA) der CEA-Familie, sowie eine Herunterregulierung des CEACAM1 (BGP) (Neumaier, 1993) nachgewiesen werden. Nach Ordonez (2000) unterbricht diese Dysregulation die Gewebspolarisation und Gewebsarchitektur der Schleimhaut. Das CEA, welches auf das Gewebe eine differenzierungsblockierende Wirkung hat (Screaton, 2000) wird vermehrt gebildet und scheint dafür verantwortlich zu sein, dass die physiologische

Anoikis, die Apoptose einer Zelle bei ihrer Ablösung aus dem Gewebeszusammenhang, ausbleibt und es so zur Proliferation kommt. Die differenzierungsblockierende Wirkung des CEA konnte durch die Veränderung seines Glykophosphatidyl-Inositol (GPI) Membran-Ankers, der sich am C-terminalen Ende des Moleküls befindet, aufgehoben werden (Screaton, 2000). Somit könnte sich in der Verankerung des Moleküls in der Membran der Zelle eine Hauptfunktion verbergen.

1.3. Der CEA-spezifische monoklonale Antikörper (Mak) T84.66

Der Mak T84.66 konnte 1983 von Wagener charakterisiert und 1990 von Neumaier kloniert werden. Mit $2,6 \times 10^{10}$ L/Mol besitzt er eine hohe Affinität zu CEA. Seine hohe Spezifität konnte Hammarström (1989) nachweisen und ordnete ihn der GOLD-Gruppe 1 zu, was bedeutet, dass er ausschließlich an CEA und keine Kreuzreaktivität zu anderen verwandten Molekülen aufweist. Nach einem Homologie-Modelling Verfahren nach Blundell et al. 1987 zeigt sich die Oberfläche der Ag-Bindungsstelle des Ak sehr flach ohne ausgeprägte Reliefzeichnung (s. Abb. 1.3.). Daraus lässt sich ableiten, dass die Bindungsaffinität vor allem auf elektrostatische Komplementarität der Flächen beruht (Neumaier, 1997).

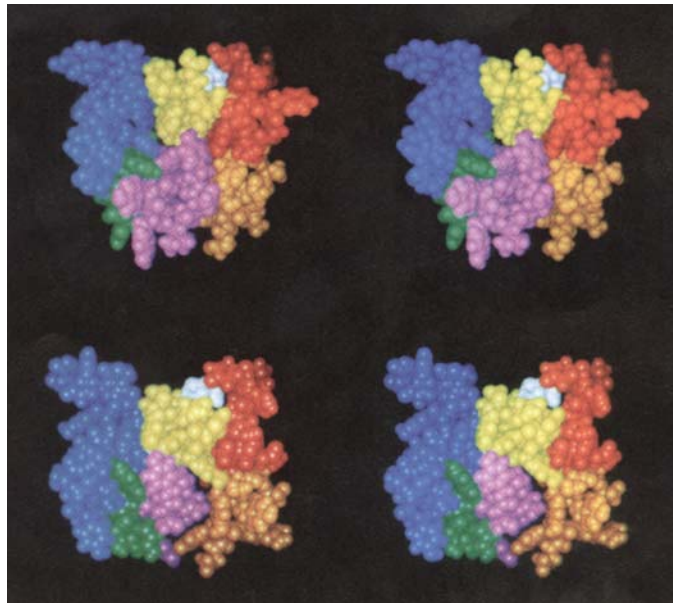


Abb. 1.3.a

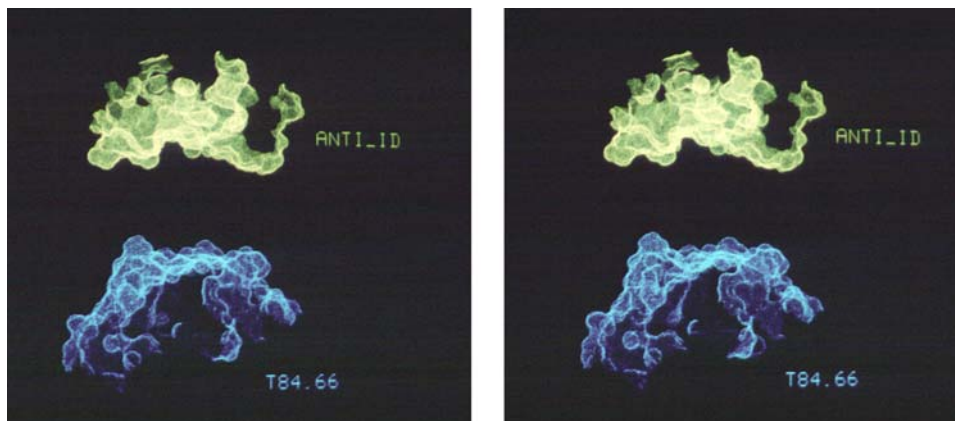


Abb. 1.3.b

Abb. 1.3.a und b: T84.66 und 6G6.C4 Oberflächendarstellung 3D

aus Neumaier, 1997 (Stereoview)

- a) Flächenaufsicht: oben 6G6C4, unten T84.66
- b) Seitenansicht: oben 6G6C4, unten T84.66

In immunhistochemischen Arbeiten konnte seine Bindung an die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes, den Pankreasgang und an Karzinome des Gastrointestinaltraktes gezeigt werden (Nap, 1992).

Maks, vorausgesetzt sie haben eine hohe Spezifität zu einem TAA, gewinnen

zunehmend an Bedeutung in der Medizin. Nachdem sie schon früh zur Charakterisierung von Epitopen (Epitope werden durch Maks definiert) verwendet wurden, finden sie auch Verwendung als Träger bei der Radioaktivmarkierung von TAA-positiven Tumoren (Mangili, 1996), als Träger zum "drug-targeting" (Juweid, 1996; Chester, 2000) oder als Wegweiser bei radioimmun-gerichteter Chirurgie (Kim, 2000). Wong setzte 1999 chimären T84.66 an Yttrium-90 gekoppelt in Patienten mit CEA-produzierenden Lungenkarzinomen ein und unterstützte dies mit einer autologen Stammzellimplantation, was hoffnungsvolle Ergebnisse zeigte. Einen weiteren modernen Therapieversuch beschrieb Xu (2000), bei dem er einen CEA-spezifischen Mak als Fusionsprotein mit Interleukin-2 (IL-2) in transgenen Mäusen einsetzte.

Der Mak T84.66 konnte 1993 durch Gaida zur Aufklärung des Adhäsionsmechanismus des CEA-Moleküls beitragen (s. 1.2.). Er zeigte eine spezifische Bindung an die A3-Domäne des CEAs, während sein monoklonaler anti-Idiotyp-Ak (MaId) 6G6.C4 (s. Abb. 1.4.) spezifisch an die N-Domäne des CEAs bindet. Diese Konstellation ließ die Hypothese der doppelten reziproken intermolekularen Adhäsion des CEA-Moleküls bei der Dimerbildung zu. Eine weitere Bestätigung der These zeigte die Bindungsuntersuchung zwischen der N- und der A3B3-Domäne des CEAs, die durch T84.66 inhibiert werden konnte (Zhou, 1993). (s. Abb. 1.4.)

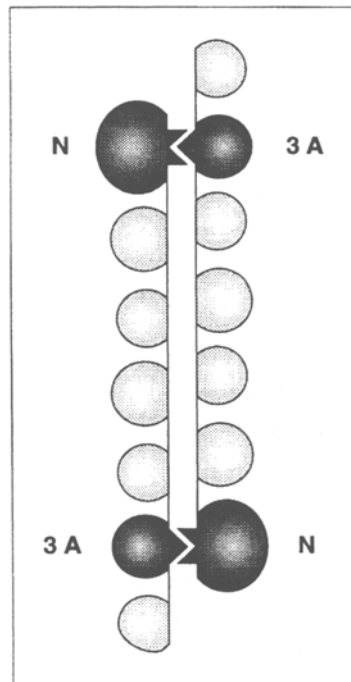


Abb. 1.4.

Abb. 1.4. CEA Dimer aus Gaida 1993

In vitro konnte eine Bindung von T84.66 an die A3-Domäne, nicht aber an die N-Domäne nachgewiesen werden (Gaida, 1993), wobei die Affinitätskonstante des rekombinanten, bakteriell exprimierten Peptids der A3-Domäne gegenüber dem Mak um das zehnfache kleiner waren als die des CEAs (Hefta, 1998).

1.4. Der monoklonale anti-Idiotyp Antikörper (MaId) 6G6.C4 und seine Homologie zu dem Antigen CEA

In Vorarbeiten wurde der CEA-spezifische Ak T84.66 als Immunogen benutzt, um antiidiotypische Ak herzustellen. Als Ziel galt die Isolierung eines internal-image Ak, die als Surrogat des CEA dienen konnten. Für einige internal-image Ak konnten schon als Tumor-Vakzin in Patienten vielversprechende therapeutische Ergebnisse erzielt werden (Foon, 1995; bei Bhattachary-Chatterjee, 2000 zusammengefasst).

Der MaId 6G6.C4 wurde 1992 von Gaida isoliert und kloniert. Der Ak zeigte

in Inhibitionsbindungsstudien, dass er den Anforderungen an einen "internal-image" Ak für das CEA Epitop, das durch den Mak T84.66 definiert wird (s. 1.1.), genügt. Im Tiermodell konnte eine anti-CEA Immunantwort nach Immunisierung mit 6G6.C4 nachgewiesen werden. Das zugrundeliegende Prinzip ist die immunologische Homologie des Ab2 einer anti-Idiotyp Kaskade gegenüber dem primären Antigen (Losman, 1994), was bedeutet, dass der Ab2 das eigentliche Ag nachahmt und eine Immunreaktion gegen das ursprüngliche Ag auslöst. Es ist naheliegend, dass sich hinter einer hohen Homologie zweier Proteinoberflächen auf immunologischer Ebene zumindest eine gewisse strukturelle Homologie verbirgt. Darüber hinaus gehören beide Proteine der Ig-Superfamilie an und haben somit einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Allerdings scheint durch die dreidimensionale Anordnung der AS in den tertiären Proteinstrukturen die Möglichkeit eines linearen Epitopes eher gering. In einem Vergleich der Primärstrukturen von CEA A3 und den CDRs (s. Abb. 1.2.) des MaIds 6G6.C4 (Gaida, 1993) (s. Abb. 1.5.) kann man sich dem möglichen Epitop dennoch hypothetisch nähern.

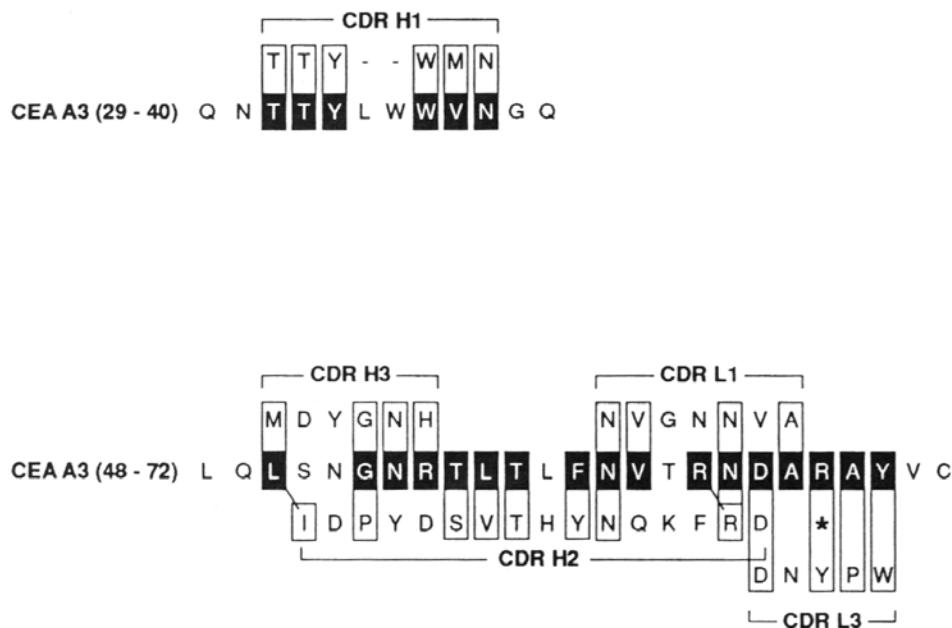


Abb. 1.5. Homologiestudie aus Gaida, 1993

Dieser Vergleich weist dem C-terminalen Teil der Domäne eine hohe Homologie zu. Da die CDRs L3 und H3 das Zentrum der Ag Bindungsstelle ausmachen (s. Abb. 1.3.) und auch meistens in die Ag-Ak Interaktion involviert sind (Bentley et al., 1990), steht die Möglichkeit einer Konformation der beiden entsprechenden homologen Sequenzabschnitte im Raum.

1.6. Der filamentöse Helferphage M13KO7

Zur Präsentation der rekombinanten Proteine wurde der Helferphage M13KO7 benutzt. Dieser exprimiert bis zu vier Kopien des Proteins auf seiner Oberfläche und kann dann zur Charakterisierung des Peptids in Bindungsassays eingesetzt werden.

Die rekombinanten E. coli Bakterien werden mit M13KO7 Helferphage über den f-pili infiziert. Der rekombinante Phage, der das rekombinante Protein auf seiner Oberfläche trägt, kann sich daraufhin in der Wirtszelle reproduzieren. Da es sich um einen filamentösen Phagen handelt führt die Expression desselben nicht zu der Lyse der Wirtszelle (E. coli) sondern wird mittels Exozytose in das Medium abgegeben (s. auch 2.2.3.).

2. MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN

2.1. Enzyme, Proteine und Antikörper

AmpliTaq® DNA Polymerase	Applied Biosystems/PE, Weiterstadt
AmpliTaq® DNA Polymerase, FS	Applied Biosystems/PE, Weiterstadt
anti-CEA Antikörper	Dako,Hamburg
anti-CEA Antikörper, POD konj.	Dako, Hamburg
anti-E tag muriner Ig Antikörper	Pharmacia Biotech, Freiburg
anti-Human Ig Antikörper, POD konj.	Dianova, Hamburg
anti-Kanin. Ig Antikörper, POD konj.	Dako, Hamburg
anti-Maus Ig Antikörper, AP konj.	Sigma, Deisenhofen
anti-Maus Ig Antikörper, POD konj.	Dako, Hamburg
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
BSA	Sigma, Deisenhofen
CEA	City of Hope, Los Angeles, CA, USA
chimärer T84.66 Ig Antikörper	Klinische Chemie, UKE Hamburg
DNA-Polymerase I (Klenow Fragment)	NEB, Schwalbach
DNA-Restriktionsenzyme: Hind III	GibcoBRL, Eggenstein
BamH I	GibcoBRL, Eggenstein
Sfi I	NEB, Schwalbach
Not I	NEB, Schwalbach
Pst I	GibcoBRL, Eggenstein
Hae III	GibcoBRL, Eggenstein
Bgl II	GibcoBRL, Eggenstein
Hpa II	GibcoBRL, Eggenstein
Eco R I	GibcoBRL, Eggenstein
Lysozym (Hühnereiweiß)	Sigma, Deisenhofen
muriner T84.66 Ig Antikörper	City of Hope, Los Angeles Ca. USA
muriner T84.66 Ig Antikörper	Klinische Chemie, UKE Hamburg
RNase A (Rinderpankreas)	Boehringer, Mannheim
Sequenase®	US Biochemical, Bad Homburg
T4 DNA Ligase	NEB, Schwalbach
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Niederlande
T4 Phosphonukleotid Kinase	NEB, Schwalbach
Taq-Polymerase	GibcoBRL, Eggenstein

2.2. Plasmide, Bakterienstämme und Phagen

2.2.1. Plasmide

pCANTAB5E (Expression Module Manual, 1995)
(Pharmacia Biotech, Freiburg)

ist ein Plasmid von 4522bp Größe. Die Expression von rekombinanten M13 Phagen wird durch einen Replikationsursprung der M13 Phagen und der Wirtszelle, die das vorgeschaltete Amber-Stopkodon mit einer Suppressorfunktion (supE) übergeht, möglich. Das Plasmid beinhaltet die Gen 3 Sequenz, die für das Gen 3-Protein kodiert - ein Oberflächenprotein des M13-Phagen-, woran das rekombinante Protein gebunden dargestellt wird. Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch das lac-Gen kontrolliert. Zwischen der „multiple cloning site“ (MCS) und dem Amber-Stopkodon befindet sich die Sequenz für das lineare E-tag Protein, mit dem das rekombinante Genprodukt detektiert und aufgereinigt werden kann. Der Replikationsursprung (ColE1) kontrolliert die Eigenreplikation, während es die Ampicillinresistenz ermöglicht, rekombinante Wirtszellen zu selektionieren. (Vektorkarte s. Anhang 10)

pCR™ II (TA Cloning® Instruction Manual, 1993)
(Invitrogen, Niederlande)

ist ein Plasmid, welches zur Weiterverarbeitung von PCR-Produkten konstruiert wurde. Es ist 3932bp groß, beinhaltet eine MCS, ein lac Z-Gen und den f1-Replikationsursprung. Das Plasmid wird linearisiert, mit Thymidin-Überhängen an den Enden geliefert, in die ein PCR-Produkt, das mit der Taq®-Polymerase amplifiziert worden ist, direkt hineinligiert werden kann, da die Taq®-Polymerase an den Enden des PCR-Produktes Adenosin-Überhänge stehen lässt. Über spezifische Primerbindungsstellen vor und hinter der Ligierungsstelle wird eine Sequenzierung erleichtert.

pAX 4a+ (Germino und Bastia, 1984)
(Medac, Hamburg)

ist ein 6204bp großes Plasmid mit einer MCS, einem lacZ- Gen, das den lac-Operator enthält, einem Gen für eine kollagene Bindungsregion, einem Gen für die Endoproteinase-Xa-Schnittstelle und dem Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1. Der Replikationsursprung pBR322 ist für die Eigenreproduktion verantwortlich und enthält das Gen für die Ampicillinresistenz, über die Wirtsbakterien selektioniert werden können.

pBluescript KS +/- (Short et al., 1988)
(Stratagene, Heidelberg)

ist 2958bp groß und stammt von dem pUC19 Plasmid (Yanish-Perron, 1985) ab. Es besitzt eine (MCS) mit 21 Schnittstellen für singuläre Restriktionsendonukleasen, sowie einen Replikationsursprung aus dem Phagen f1, der es zu einem Phagmid macht.

2.2.2. Bakterienstämme

E.coli TG-1
(Pharmacia Biotech, Freiburg)
K12D(lac-pro), supE, thi, hsdD5/F'[traD36, proAB, lacIq, lacZDM15]

E.coli HB 2151
(Pharmacia Biotech, Freiburg)
K12D(lac-pro), ara, nalr, thi/F'[proAB, lacIq, lacZDM15]

E.coli N 4830-1 (Gottesman et al., 1980)
(Pharmacia Biotech, Freiburg)
F', galK8, thi1, thr1, leuB6, lacY1, fhuA21, supE44, rfbD1, merA1, his, ilv, D(hem F-
esp), D(bio-uvrB), l[DBam, D(cro-attR), N+, cI857]

E.coli XL1-Blue (Bullock et al., 1987)
(Stratagene, Heidelberg)
supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi, relA1, lac-, F' [proAB, lacIq, lacZDM15,
Tn10 (tetr)]

E.coli KS 474 (Strauch und Beckwith, 1988)
(Universität Göttingen)
F', Dlac-X74, galE, galK, rpsL, DphoA(Pvu II), degP41(DPst I- Kanr)

E.coli JM 109 (Dower, 1990)
(Clontech, Heidelberg)
endA1, gyrA96, hsdR17, mcrB+, recA1, relA1, D(lac-proAB), thi, supE44, F'[traD36,
proAB, lacIq ZDM15], l-

E.coli DH 5α (Hanahan, 1985)
(Clontech, Heidelberg)
F'-, recA1, endA1, gyrA96, hsdR17, supE44, relA1, l-, F80d [lacIq, lacZDM15], thi-1

E.coli OneShot™ (TA Cloning®-Kit)
(Invitrogen, Niederlande)
lacZ, eingefrorene kompetente E. coli Zellen

2.2.3. Phagen

M13KO7 Helferphage (Vieira und Messing, 1987)
(Pharmacia Biotech, Freiburg)

ist ein gentechnisch veränderter M13 Phage von 8,7 kb Größe. Nach Superinfektion verpackt er Plasmid-DNA, die den Replikationsursprung der filamentösen Phagen enthält, vorrangig. Zusätzlich enthält er einen Plasmid Replikationsursprung (p15A), wodurch die Phagen-DNA unabhängig von eigenen viralen Genprodukten vermehrt werden kann, sowie eine Kanamycinresistenz, mit der helferphagetragende Bakterien selektioniert werden können. Durch ein mutiertes Gen II Produkt aus dem Phagen M13mp1 (Messing et al, 1977) ist die Eigenvermehrung gegenüber dem Wildtyp stark vermindert. Die Infektion mit dem Phagen erfolgt über Sexpili, so dass Wirtsbakterien das F'-Plasmid tragen müssen.

2.3. Sonstige Reagenzien

$\alpha^{32}\text{P}$ ATP	NEN Dupont, Bad Homburg
$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP	NEN Dupont, Bad Homburg
$\alpha^{35}\text{S}$ dNTP	NEN Dupont, Bad Homburg
Acrylamid/Bis (19:1) 40%	Serva, München
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	BioRad, München
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	DIFCO, USA
Bacto-Tryptone	DIFCO, USA
Bacto-Yeast Extrakt	DIFCO, USA
BCIP	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt

DAB-Tabletten	Sigma, Deisenhofen
DNA Sequenzierung T7 Dye Primer-Kit	Applied Biosystems/PE, Weiterstadt
dNTPs- β Cyanoethyl-Phosphoramidite	Pharmacia/LKB, Freiburg
ECL™-Chemilumineszenz-Kit	Amersham, Braunschweig
EDTA- Na_2 (Titriplex)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll (400)	Sigma, Deisenhofen
Glycerol (ultrapure)	GibcoBRL, Eggenstein
Coomassie	Sigma, Deisenhofen
H_2O_2 (Perhydrol)	Merck, Darmstadt
Harnstoff (ultrapure)	Sigma, Deisenhofen
IPTG	BTS Biotech, St.Leon-Rot
Kanamycin Monosulfat USP	ICN Biochemicals, Meckenheim
Lambda-DNA	GibcoBRL, Eggenstein
Megaprime™ DNA Labeling-Kit	Amersham, England
Naphtol Blue Black	Sigma, Deisenhofen
NBT	Boehringer, Mannheim
OPD-Tabletten	Sigma, Deisenhofen
PEG	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Protein Assay	BioRad, München
Rapid-hyp-Kit	Amersham, Braunschweig
Scintillationsflüssigkeit (Ultima Gold)	Canberra Packard, Frankfurt
Sequenase-Kit	USB, Bad Homburg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Siliconfett	Merck, Darmstadt
Taq Dye Deoxy Terminator-Kit	Applied Biosystems/PE, Weiterstadt
TEMED	BioRad, München
Tris (Trizma)	Sigma, Deisenhofen
TRITON X-100	Merck, Darmstadt
TWEEN-20	Sigma, Deisenhofen
Ultrapure dNTP	Pharmacia Biotech, Freiburg
X-Gal	Biomol, Hamburg
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

sonstige Standard Laborchemikalien
(Anorganika & Organika)

Merck, Darmstadt und
Sigma, Deisenhofen

2.4. Geräte

Adobe Photoshop

Adobe Systems Inc., München

Apple Macintosh Performa 450

Apple, München

Arcus-Scanner

Agfa, Köln

Cirrus 1.5.1.

Canto, Berlin

Durchflusskühler

Eppendorf, Hamburg

Elektrophoreseeinheit (Protein)

Biometra, Göttingen

Elektrobloteinheit

Biometra, Göttingen

Gene Assembler Plus

Pharmacia/LKB, Freiburg

Gene Pulser[®] (Elektroporation)

BioRad, München

Heizblock (DB-1)

Techne, Wertheim

Hybridisierofen

GFL, Burgwedel

Klin. Zentrifuge (Hermle, ZK 380)

Hermle, Gosheim

Klin. Zentrifuge (Rotosilenta KS)

Hettich, Tuttlingen

Kühltruhe (-70°C) Jumotron

Kyrotec, Hamburg

MacMolly Tetra 1.0

Apple, München

Mikrotiterplatten wellwasher 4

Denley, München

Mikrotiterplatten-Photometer (SFplus)

SLT, Crailsheim

Mini/Maxielektrophorese-Einheit (DNA)

Hoefer (Serva), Heidelberg

Miniautoklav

Tecnomara, Fernwald

MinicyclerTM(PTC-150)

Biozym, Hess. Oldendorf

Minifold[®] Vakuum-Einheit (SS 072/0)

Schleicher&Schüll, Dassel

MS-Excel 4.0

Microsoft, München

MS-Word 5.1a

Microsoft, München

NIH Image 1.61/fat

NIH, USA

Oligo 4.0-s

National Biosciences, USA

Polaroidfotoeinheit (MP4+)	Polaroid, USA
Powersupply (EPS 3500)	Pharmacia/LKB, Freiburg
Schüttelinkubator TEQ® (OSFT-20-HS)	CLF, Emersacker
Sequenzieranlage (Ephortec 100cm)	Haake&Buchler, München
SpeedVac (Vakuumzentrifuge)	Savant, USA
Strahlungshandmessgerät (LB 1210 B)	Berthold, München
Szintillationszähler (Tricarb)	Canberra Packard, Frankfurt
Tisch-Rotator (REAX 2)	Heidolph, Kalheim
Tischschüttler (Kühner)	B.Braun, Melsungen
Tischzentrifuge (Eppendorf)	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator (302 nm)	Herolab, St.Leon-Rot
Zentrifuge (Sorvall RC5C)	Sorvall, Bad Homburg
UV Spektrometer (UV-160)	Shimadszu, Japan
Vakuumcontainer (syringe-Aufsatz)	Promega/Serva, Heidelberg
Vakuumofen	Elektro-Wärme, Aachen
Vakuumpumpe (MZ 2)	Vacuubrand, Wertheim
Verstärkerfolien	NEN Dupont, Bad Homburg
Vortexer VF2 Janke&Kunkel	IKA, Staufen i.Br.
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellinkubator (B5042E)	Heraeus, Hanau

2.5. Allgemeine Labormaterialien

Centricon SR3, 30 (Ultrafilter-Einheit)	Amicon, USA
Filterpapier (3mm)	Whatman, England
Gene Assembler Supports	Pharmacia/LKB, Freiburg
Glassmax spin column (Plasmid-Präp.)	GibcoBRL, Eggenstein
Hitrap® Protein G Sepharose Säulen	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikrotiterplatten (24 well, 96 well)	Greiner, Nürtingen
Nap-5 columns (Sephadex G25)	Pharmacia Biotech, Freiburg
NC-Rundfilter (Ø 82 mm)	Schleicher&Schüll, Dassel

Nitrocellulosefolien (0,45 µm)	Schleicher&Schüll, Dassel
Nylonmembranen	NEN Dupont, Bad Homburg
Plastikartikel	Eppendorf, Hamburg
(Pipettenspitzen, Pipetten,	Greiner, Nürtingen
Petrischalen, Küvetten, Cyrogefäße,	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße)	Nunc, Wiesbaden
Qiaex II-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Ultrafree-Biomax 5 (Ultrafilter-Einheit)	Millipore, USA
Ultrazentrifugengefäße	Sorvall, Bad Homburg
Wizard Midi DNA-Präparation-Kit	Promega/Serva, Heidelberg

2.6. Puffer und Medien (nach Herstellerangaben, bzw. Sambrook et al. 1989)

TE-Puffer:	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
TBE-Puffer:	90 mM Tris-Borat 1 mM EDTA pH 8,0
PBS:	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl titriert auf pH 7,4

Beschichtungspuffer:	0,1 M Na_2CO_3 0,1 M NaHCO_3 pH 9,3
Waschpuffer:	0,1 M K_2HPO_4 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5
Detektionspuffer:	0,1 M Na_3Citrat 0,1 M Citrat pH 5,0
Ladepuffer: (Proteinelektrophorese)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 5,0% (v/v) β - ME 2,0% (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Bromphenolblau 10,0% (w/v) Glycerol
Ladepuffer: (DNA-Elektrophorese)	0,04% (w/v) Bromphenolblau 0,04% (w/v) Xylencyanol FF 2,5% (w/v) Ficoll (400) in TAE-Puffer
SSC-Lösung (1x):	150 mM NaCl 15 mM Na_3Citrat pH 7,0
TBS-Puffer für DAB-Färbung:	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 5 mM MgCl_2
TES-Puffer (1x):	0,2 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,5 mM EDTA 0,5 M Sucrose

TSS-Puffer:	10 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt 5 g/l NaCl 100 g/l PEG (M.W. 3350) 50 ml/l DMSO 50 mM MgCl ₂ pH 6,5
LB-Medium:	10 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt 10 g/l NaCl pH 7,0 15 g/l Bacto-Agar für Festmedien
YT-Medium:	8 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt 5 g/l NaCl pH 7,0 15 g/l Bacto-Agar für Festmedien
SOC-Medium:	20 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt 0,5 g/l NaCl 0,2 g/l KCl pH 7,0 Nach dem Autoklavieren einstellen auf: 20 mM MgSO ₄ (sep. autoklaviert) 20 mM MgCl ₂ (sep. autoklaviert) 20 mM Glukose, filtersteril

SB-Medium:	35 g/l Bacto-Tryptone 20 g/l Bacto-Yeast Extrakt 5 g/l NaCl pH 7,5
Minimal Medium:	10,5 g/l KH_2PO_4 4,5 g/l K_2HPO_4 0,5 g/l NaCl 1,0 g/l NH_4Cl Nach dem Autoklavieren einstellen auf: 1 mM MgSO_4 (sep. autoklaviert) 0,2 % (w/v) Glukose, filtersteril 0,001 % (w/v) Thiamin-Cl, filtersteril 15 g/l Bactoagar für Festmedien
SOBAG-Medium:	20 g/l Bacto-Tryptone 5g/l Bacto-Yeast Extrakt 0,5 g/l NaCl Nach dem Autoklavieren einstellen auf: 10 mM MgCl_2 (sep. autoklaviert) 2 % (w/v) Glukose, filtersteril 100 mg/l Ampicillin, filtersteril 15 g/l Bacto-Agar für Festmedien
Bakterielle Selektionsmedien:	Flüssig- oder Festmedien enthalten folgende Antibiotikakonzentrationen: 100 µg/ml Ampicillin 50 µg/ml Kanamycin

Blau/Weiß Selektionsplatten:
(β -Galaktosidase Test)

Beschichtung der Festmedien mit
25 μ l 4 % (w/v) X-Gal in DMF pro
 $\varnothing$ 82 mm Petrischale

Induktionsmedien zur bakteriellen
Proteinsynthese:

Flüssig- und Festmedien enthalten
1 mM IPTG

3. METHODEN

3.1. Allgemeine Arbeitsmethoden

3.1.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen

Absorptionsbestimmungen wurden mit einem UV Spektrometer (Shimadzu) durchgeführt. Eine Quarz-Halbmikroküvette von 1 cm Schichtdicke diente zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren, die bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm bestimmt wurden. Nach Sambrook et al. (1989) entspricht die OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von:

50 µg/ml dsDNA

40 µg/ml ssDNA

Die Reinheit der DNA Präparation lässt sich über den Quotienten E_{260}/E_{280} abschätzen und sollte im Bereich von 1,8-2,0 liegen. Quotienten geringer als 1,8 sprechen für eine Proteinkontamination (Absorption bei 280 nm), während Quotienten über 2,0 eine RNA Kontamination offenbaren (Absorption bei 260 nm).

Für Oligonukleotide und synthetisch hergestellte Primer wurde wie oben verfahren, nur dass die Konzentration über den aus der Sequenz zu bestimmenden Extinktionskoeffizienten berechnet wurde (Sambrook et al., 1989). Der Nullwert wurde mit dem entsprechenden Puffer (bei hohen Salzkonzentrationen) oder ddH₂O eingestellt.

3.1.2. Photometrische Bakteriendichtebestimmung

Das bakterielle Wachstum, speziell die Phase der logarithmischen Vermehrung (log-Phase), wurde in Plastikküvetten, Schichtdicke 1 cm in dem UV

Spektrometer (Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (log-Phase: OD₆₀₀: 0,5-1,0). Zur Nullwerteinstellung diente das entsprechende Wachstumsmedium.

3.1.3. Gelanalyse zur Mengen- und Größenbestimmung von DNA

Zur Abschätzung der DNA-Menge und Größe im Agarosegel wurden die Längenmarker (s. Tabelle 1; 3.3.1.) als Vergleich herangezogen.

Bei der Berechnung der Standardkurve der DNA Größe musste die Laufstrecke in cm (Ordinate) gegen den Logarithmus der Größe der Längenmarkerfragmente in bp (Abszisse) aufgetragen werden. Der Logarithmus der Fragmentlänge der zu untersuchenden DNA-Bande konnte entweder in einem Koordinatenkreuz an der Regressionsgeraden abgelesen, oder über die sich ergebende lineare Funktion berechnet werden, wenn man die Laufstrecke in cm einsetzte. Wenn die lineare Funktion der Regressionsgeraden $f(x) = mx + y$ ist, wobei m der Regressionssteigung entspricht, gilt für die Berechnung der DNA Größe in bp (G):

$$G(x) = 1/\log(mx + y)$$

Die DNA Menge wurde über den Vergleich der Bandenintensität der zu untersuchenden Bande mit der entsprechend ähnlich intensen Markerbande abgeschätzt. Da die Längenmarker in einer DNA-Konzentration von 20 ng/μl eingesetzt wurden, und die Längenmarkerbanden nach dem relativen Anteil an dem Gesamtplasmid definierte DNA-Konzentrationen enthielten, konnte über den Dreisatz die Konzentration der untersuchenden Bande näherungsweise errechnet werden.

3.1.4. Herstellung von Agarplatten

Die Herstellung von Agarplatten erfolgte, je nach Bedarf mit dem geeigneten Medium und dem nötigen Zusatz für Selektion (Antibiotika, X-Gal Beschichtung) oder Induktion (IPTG) (s. 2.6.), nach Herstellerangaben und nach Sambrook et al. (1989).

Nachdem das Medium auf 55°C abgekühlt war, wurde der Flaschenhals mit dem Bunsenbrenner innen und außen abgeflammt. Jetzt konnte die Flüssigkeit in die Petrischalen gegossen werden, um anschließend vor dem Auspolymerisieren noch einmal oberflächlich mit dem Brenner abgeflammt zu werden. So wurden die Plattenoberflächen glatt und blasenfrei, sowie ein steriles Arbeiten erreicht.

3.1.5. Einfrieren, Auftauen und Ausstreichen von Bakterien

Zur Aufbewahrung von Bakterienklonen wurde entweder von einem Dreiösenausstrich eine einzelne Kolonie mit einem Zahnstocher abgenommen und damit eine 3 ml LB-Kultur inokuliert (monoklonal), oder eine Agarplatte vollständig abgewaschen und die Bakteriensuspension noch mal in LB-Medium verdünnt. Nach einer Inkubation bei 37°C (Heraeus) in einem Rotationsrevolver (Heraeus) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (Photometer: Shimadzu) (Phase des exponentiellen Wachstums), konnten 800 µl der Kultur mit 200 µl 80% (w/v) Glycerol in zuvor autoklavierten Cyroglasgefäßen (Sarstedt) vermischt und als Glycerolstock bei -70°C eingefroren werden.

Zum erneuten Ausstreichen von Glycerolstocks sollte die Zeit außerhalb des Gefrierfachs so kurz wie möglich gehalten werden. Die Cryogefäße wurden nur einzeln und auf Eis aus der Gefriertruhe (Kryotec) entnommen, sofort wurde mit einer glühenden Metallöse gefrorene Kultur aus dem Gefäß gekratzt und als Dreiösenausstrich auf eine vorbereitete LB-Agarplatte aufgetragen. Der

Glycerolstock taute nicht auf und konnte umgehend wieder eingefroren werden. Zur Sicherheit wurden wichtige Bakterienklone als Glycerolstock doppelt angelegt.

Zu Zwecken der Testung von Bakterienkolonien auf Rekombinanz oder funktioneller Proteinexpression mussten Verdünnungsreihen einer 3 ml Vorkultur mit einem L-förmigen Glasstäbchen gleichmäßig auf eine Agarplatte verteilt werden, um viele einzelnstehende Kolonien unterscheiden zu können.

3.2. DNA-Präparationsmethoden

3.2.1. Präparation von 1,5 - 2 ml Bakterienkulturen („TELT-Minipräps“)

Mit den Minipräps konnte die Plasmid-DNA von vielen Bakterienkolonien in kurzer Zeit gewonnen werden, die im Bezug auf Qualität und Quantität für Restriktionsanalysen und Sequenzierungen ausreichte. Die „TELT“-Methode ist eine Weiterentwicklung der „Boiled-Präp“-Methode (Holmes und Quigley, 1981) von F. Buck (Institut für Zellbiochemie/UKE).

3 ml Kulturen aus LB-Medium mit 1% (w/v) Glukose (sterilfiltriert) und Ampicillin wurden zunächst mit je einer sterilen Bakterienkultur angeimpft und anschließend über Nacht bei 37°C unter Rotation inkubiert.

Nachdem 1,5-2 ml der Kulturen in Eppendorf-Röhrchen überführt und 15s bei 14.000 U/min zentrifugiert (Tischzentrifuge: Eppendorf) worden sind, konnte der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl „TELT-Lysis-Puffer“ resuspendiert werden.

TELT-Lysis-Puffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	62,6 mM EDTA
	2,5 M LiCl
	0.4% Triton X-100

Die Suspensionen mussten, nachdem sie jeweils mit 25 µl frisch angesetztem Lysozym (10 mg/ml) versetzt und gevortext (Vortexer: Janke&Kunkel) worden waren, 5 min auf Eis inkubiert, 1-2 min im siedenden Wasserbad (GFL) erhitzt und nochmals 5 min auf Eis inkubiert werden und konnten anschließend 10 min bei 14.000 U/min und RT abzentrifugiert werden. Man erhielt zähe, schleimige Pellets, die leicht mit sterilen Zahnstochern entfernt werden konnten.

Die Überstände wurden nun zweimal mit dem gleichen Volumen (250 µl) Phenol/Chloroform (Gemisch 1:1) und einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt, indem die Phasen zur Vermischung gevortext und zur Trennung 4 min bei 10.000 U/min und RT rotiert wurden. Nach der Chloroformtrennung mussten die oberen, wässrigen Phasen in ein frisches Röhrchen überführt und die DNA mit einem Volumen Isopropanol bei RT gefällt werden, wobei gleich gevortext und direkt 20 min bei 14.000 U/min bei RT zentrifugiert wurde, um nicht zu viele Verunreinigungen mitzupräzipitieren. Anschließend konnten die Pellets mit 150 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert und, nachdem das Ethanol abpipettiert war, getrocknet werden. Die DNA zur Sequenzierung musste in ddH₂O gelöst werden, während die DNA zur Restriktionsanalyse auch in TE-Puffer aufgenommen werden konnte (je 21 µl).

3.2.2. Präparation von 25 ml Bakterienkulturen

Die Präparationen von 25 ml Kulturen sind mit dem Wizard™ Midiprep Kit (Promega) durchgeführt worden. Das Prinzip des Kits basiert auf einer Alkalilyse (Sambrook, 1989) und auf der Bindung der Plasmid-DNA an ein Silikatharz, welches durch Vakuumsog in einer Minisäule aufgefangen wird.

Zunächst wurde die Bakterienkultur bei 4°C für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert (Sorvall) und das Pellet in 3 ml „Cell-Resuspension-Solution“ sorgfältig resuspendiert.

Cell-Resuspension-Solution: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 10 mM EDTA
 100 µg/µl RNase A

Die Suspension konnte dann mit 3 ml „Cell-Lysis-Solution" versetzt und gemischt werden, bis die Lösung klar war.

Cell-Lysis-Solution: 0,2 M NaOH
 1% SDS

Zu den 6 ml klarer Lösung mussten anschließend 3 ml „Neutralization-Solution" gegeben und durch invertieren des Röhrchens vermenget werden.

Neutralization-Solution: 1,32 M KAcetat (pH 4,8)

In der Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Sorvall RC5C) wurde bei 4°C für 15 min und 14.000 x g der Zelldebris pelletiert und der Überstand mit 10 ml Silikatharz vermischt. Nachdem die Minisäule auf den dafür vorgesehenen Vakuumaufsatz (Promega) aufgesetzt worden war, konnte das DNA/Silikatharzegemisch unter Vakuum (Vacuubrand) in die Säule gezogen werden und anschließend zweimal mit 15 ml der „Column-Wash-Solution" gewaschen werden.

Column-Wash-Solution: 83,6 mM NaCl
 8,4 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 2,1 mM EDTA
 55% (v/v) Ethanol

Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Säule über den Vakuumsog 5-10 min getrocknet, um anschließend von ihrem Reservoir abgetrennt und auf ein Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf) aufgesetzt für 2 min bei 14.000 U/min und RT zentrifugiert (Eppendorf) zu werden. Nun mussten 300 µl auf 65-70°C

vorgewärmtes ddH₂O oder TE-Puffer auf die Säule aufgetragen werden um die DNA zu eluieren. Nach einer Minute Inkubationszeit konnte die Säule auf ein Röhrchen aufgesteckt und wie zuvor zentrifugiert werden. Das Eluat wurde in dem Röhrchen aufgefangen und musste zur Sequenzierung gelegentlich noch mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Isopropanol gefällt werden (Protokoll s. 3.2.1.), um die nötige Reinheit zu erreichen.

3.2.3. Präparation von 500 ml Bakterienkulturen

Für Präparationen großer Bakterienkulturen wurde das Qiagen Maxi Kit verwendet (Qiagen), das wie das Promega-Kit für Midi-Präparationen auf einer Alkalilyse und einer DNA-Harz-Bindung basiert, jedoch keinen Vakuumsog benötigt.

Die Kultur sollte zunächst bis zu einer Dichte von OD₆₀₀=1,0-1,5 hochgewachsen (Schüttelinkubator: CLF) sein, bevor die Zellen bei 4°C und 6.000 x g für 15 min abzentrifugiert und in 10 ml P1-Puffer resuspendiert werden konnten.

P1-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	10 mM EDTA
	100 µg/µl RNase A

Nach der Zugabe von 10 ml P2-Puffer und sorgfältigem Mischen musste die Suspension zur Lyse 5 min bei RT inkubiert werden, um die Probe dann mit gekühltem (4°C) P3-Puffer zu versetzen und, nach Vermengung durch Invertieren des Röhrchens, 20 min auf Eis zu inkubieren.

P2-Puffer:	200 mM NaOH
	1 % (w/v) SDS

P3-Puffer:	3,0 M K-Acetat
	pH 5,5

Mit der Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Sorvall RC5C) wurde der Zelldebris bei 4°C und 30.000 x g in 30 min abzentrifugiert und der klare Überstand gewonnen, der nun auf die vorher mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte Harz-Säule (Qiagen-tip 500) aufgetragen wurde und durch Gravitationsfluss einlief. Anschließend wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen.

QBT-Puffer:	750 mM NaCl
	50 mM MOPS (pH 7,0)
	15 % (v/v) Isopropanol
	0,15 % (v/v) Triton X-100

QC-Puffer:	1 M NaCl
	50 mM MOPS (pH 7,0)
	15 % (v/v) Isopropanol

Die DNA wurde dann mit 15 ml QF-Puffer aus der Säule eluiert, um sie anschließend mit 0,7 Volumina Isopropanol bei RT zu fällen, sofort bei 4°C und 15.000 x g für 30 min zu zentrifugieren und zuletzt kurz mit kaltem 70% (v/v) Ethanol zu waschen.

QF-Puffer:	1,25 M NaCl
	50 mM Tris-HCl (pH 8,5)
	15 % Isopropanol

Nachdem das Pellet bei RT getrocknet war, konnte es in einem beliebigen Volumen an TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen werden.

3.2.4. Präparation von ssDNA

Die Gewinnung von Einzelstrang-DNA (ssDNA) wurde nach dem Protokoll von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Der M13KO7 Helferphage (Pharmacia) konnte in Verbindung mit einem die supE-Funktion beinhaltenden E.coli-Stamm (z.B. TG-1), der das Amber-Stopkodon des pCANTAB5E-Vektors (Pharmacia) überliert, zur Produktion von ssDNA benutzt werden. Die so gewonnene ssDNA wurde anschließend zur manuellen Sequenzierung (3.8.2.) eingesetzt.

Mit einer über Nacht bei 37°C inkubierten bakteriellen Vorkultur wurde 10 ml 2x YT-Medium mit Glukose und Ampicillin (2.6.) inokuliert und bis zu einer $OD_{600}=0,5$ (Photometer: Shimadzu) im Schüttelinkubator (CLF) wachsen gelassen, um dann mit 3×10^{10} plaqueformenden Einheiten (pfu) des M13KO7 Helferphagen infiziert und eine weitere Stunde bei gleichen Bedingungen inkubiert zu werden. Die infizierten Zellen wurden daraufhin vorsichtig bei 4°C und 1.000 x g in 10 min von einer klinischen Zentrifuge (Hettich) abzentrifugiert und nachdem der Überstand verworfen war, das Pellet in 10 ml frischem 2xYT-Medium mit Ampicillin und Kanamycin resuspendiert. Unter diesen Selektionsbedingungen konnte die Kultur zur Phagenreplikation über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert werden (CLF).

Am nächsten Tag musste der Überstand, nachdem die Zellen bei 4°C und 1.000 x g in 20 min pelletiert worden waren, sorgfältig abgenommen und in Zentrifugenröhrchen (Sorvall) überführt werden. Hier wurde die Probe mit 1/5 Volumen 20% (w/v) PEG/NaCl (M.W. 8.000) versetzt, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert, bevor die gefällten Phagen für 20 min bei 4°C und 10.000 x g abzentrifugiert wurden.

20% (w/v) Polyethylenglykol (PEG)/NaCl (M.W.8000):

200 g/l PEG M.W. 8000 (Sigma)

146,1 g/l NaCl

Wird unter leichtem Erwärmen und Rühren ad 1 l ddH₂O in Lösung gebracht.

Das PEG-Pellet wurde durch invertieren auf einem Papierhandtuch von den Resten des Überstandes befreit. Nachdem die Phagen in 120 µl H₂O aufgenommen waren, wurden sie Phenol/Chloroform extrahiert und über Nacht bei -70°C Isopropanol gefällt (Protokoll s. 3.2.1.).

3.2.5. Präparation von Plasmid-DNA aus Agarosegelen

Plasmid-DNA wurde mit dem GlassMAX™ Spin Cartridge-Kit (GibcoBRL) aus Agarosegelen extrahiert. Das Prinzip basiert auf der Bindung von DNA an die in der Zentrifugenpatrone enthaltene Silikatmembran (Vogelstein und Gillespie, 1979) unter Anwesenheit von NaJ.

Die gewonnene und restriktionsverdaute Plasmid-DNA (Protokolle s. 3.2.1. -3.2.3. und 3.7.1.) wurde in einem Agarose Gel von übriger DNA getrennt dargestellt und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Das Stück Agarose musste in ein Reaktionsröhrchen (Eppendorf) überführt und gewogen werden, bevor pro 0,1 g Agarose 0,45 ml „Binding Solution“ dazupipettiert werden konnten.

Binding Solution: 6 M NaJ

Die Agarose wurde durch gelegentliches vortexen und mit Hilfe eines auf 50°C vorgeheizten Wasserbads (GFL) in Lösung gebracht. Bis zu 550 µl der Lösung konnten dann auf die GlassMAX™ Patrone aufgetragen und in 20 s bei 13.000 x g und RT mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf) filtriert werden (bei größeren Volumen musste die Patrone mehrfach hintereinander beladen werden). Der Durchlauf wurde von einem Auffanghütchen aufgefangen, ein zweites Mal durch die Patrone zentrifugiert um die Ausbeute zu erhöhen und anschließend aufbewahrt bis die eluierte DNA nachgewiesen war. Die Membran musste nun dreimal mit 0,4 ml des kalt gelagerten (4°C) Waschpuffers (Gibco BRL) gespült werden (Zentrifugation s.o.), bevor die Patrone 1 min. bei 13.000 x g und RT trockenzentrifugiert werden konnte.

Die DNA wurde daraufhin mit 40 µl auf 65°C vorgewärmtem TE-Puffer oder ddH₂O eluiert, wobei die Patrone in ein „Sample Recovery Tube“ eingesetzt und wieder 20 s bei RT und 13.000 x g zentrifugiert werden musste.

3.2.6. Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Da das GlassMAX™-Kit bei kleineren DNA-Fragmenten eine ungenügende Ausbeute zeigte, wurde zu der Extraktion von DNA-Fragmenten kleiner als 1000 bp aus Agarosegelen das Qiaex II DNA-Extraktion Kit benutzt. Das Prinzip kombiniert das Wissen um die Bindung von DNA an eine Silikatmatrix (Vogelstein und Gillespie, 1979) mit der DNA Strukturanalyse bei hohen Satzkonzentrationen (Hamaguchi und Geiduschek, 1962) und kann so auf den Einsatz von NaJ verzichten.

Bei den Oligonukleotiden handelte es sich um über Restriktionsverdau ausgeschnittene Inserts eines rekombinanten Plasmids, PCR-Produkte oder vorher zusammenligierte Oligonukleotide, die, nach Trennung über die Elektrophorese von Nukleotiden anderer Größe, aus der Gelmatrix herausgelöst werden mussten.

Nachdem die DNA als Bande aus einem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen worden war, konnte das Gel in einem Volumen-Gewichtsverhältnis von 3:1 (bei DNA-Fragmenten unter 100bp 6:1) in QX1 Puffer (Qiagen) unter kräftigem Schütteln aufgelöst werden.

Die gemischte Qiaex II Suspension (Silikat-Kügelchen) wurde im Verhältnis 30 µl pro 10 µg DNA mit dem Ansatz versetzt, gemischt und bei 50°C im Wasserbad (GFL) für 10 min inkubiert. Hierbei musste die DNA/Silikat-Suspension alle 2 min. gevortext werden. Die Silikat-Kügelchen wurden anschließend 30 s bei 14.000 U/min und RT abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen, bevor das Pellet erst einmal mit 500 µl QX1 Puffer und dann zweimal mit 500 µl PE Puffer (Qiagen) gewaschen werden konnte. Jeweils zum Pelletieren der Silikat-Kügelchen wurde wie oben zentrifugiert. Für 10-15 min wurde das Pellet jetzt an der Raumluft getrocknet bis es weiß war, um daraus anschließend die DNA entweder mit 20 µl ddH₂O, 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) oder TE-Puffer zu eluieren.

Dazu wurde das Pellet in der Elutionslösung suspendiert, 5 min bei RT inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Für das Erreichen einer höheren Ausbeute, aber zu Lasten der DNA Konzentration, konnte der Elutionsschritt noch einmal wiederholt und die Volumina kombiniert werden.

3.3. Gelelektrophorese von DNA

3.3.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht wurde die Agarosegelelektrophorese angewendet (Sambrook, 1989).

Die Standard Agarose (Biozym) konnte je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente (0,3-5 kbp) von 0,7-2% (w/v) eingesetzt werden, während bei der Verwendung von Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (NuSieve Agarose, Biozym) zur Auftrennung von besonders kleinen Polynukleotiden (50-400 bp) die Möglichkeit bestand, diese bis zu 4% (w/v) zu konzentrieren.

Das Agarose Pulver wurde unter Erhitzen in TAE-Puffer gelöst. Pro 100 ml Agaroselösung mussten 3 µl Ethidiumbromid (Merck) dazupipettiert werden. Nach dem Abkühlen unter 60°C konnte das Gel gegossen werden, um die Gel-Gießkammer (Hoefer) nicht zu beschädigen. Die Gel-Gießkammer wurde auf einer waagrecht eingestellten Unterlage platziert, der Gelhalter eingesetzt und der Kamm für die Probenaussparungen (Wells) kurz angepasst. Nach dem Gießen wurden Luftbläschen mit einer Pipettenspitze entfernt, der Well-Kamm gesetzt und das Gel zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

Das auspolymerisierte Gel sollte zum Ziehen des Kammes mit wenig TAE-Puffer überschichtet werden, um die Wells nicht zu beschädigen. Mit dem Gelhalter konnte das Gel aus der Gießkammer herausgehoben und Überstände mit einem sauberen Skalpell abgetrennt werden, bevor es in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Hoefer) eingesetzt wurde, so dass es komplett von Puffer überschichtet war.

Jetzt konnten die vorher vorbereiteten DNA-Proben mit 1/10 Volumen 10 x Ladepuffer (Protokoll s. 2.6.) vermischt vorsichtig in die Wells einpipettiert und mit einer Spannung bis 90 V für Minigele und bis 120 V für Maxigele aufgetrennt werden. Bis die Proben aus den Wells in die Gelmatrix eingelaufen waren, wurde die Spannung noch niedriger eingestellt (60-70 V).

Die Laufdauer der Gele bei RT richtete sich nach ihrer Agarosekonzentration und die Lauflänge der Ladepuffermarker nach den zu betrachtenden DNA-Fragmenten, bzw. nach ihren Größenunterschieden.

Als Größen- und Mengenmarker, die als Vergleich zu den DNA-Proben aufgetragen wurden, wurden zum einen kommerzielle 100 bp- und 1000 bp-Leitern (GibcoBRL), zum anderen standardisierte, restriktionsverdaute Plasmid-DNA verwandt:

Tabelle 3.1.

Plasmid-DNA (je 20 µg/ml)	λ-DNA (GibcoBRL)	λ-DNA (GibcoBRL)	pBluescript+KS (s.2.2.1.)
Restriktionsenzyme	Hind III	EcoR I u. Hind III	Hae III
Fragmentlängen in bp	23130	21226	605
	9416	5148	458
	6557	4973	434
	4361	4268	293
	2322	3530	267
	2027	2027	243
	564	1904	174
	125	1584	142
		1375	102
		947	80
		831	79
		564	58
		125	18
			11

Die DNA-Banden stellten sich auf dem Gelbetrachter (Herolab), einer UV-Lampe (302 nm), durch das dort angereicherte Ethidiumbromid orange-rot dar und konnten mit der Polaroidfotoeinheit schwarz-weiß fotografiert werden.

3.3.2. Sequenziergele

Die manuelle Sequenzierung wurde auf 100 x 20 x 0,4 cm PAA-Gelen (6%) in 7 M Harnstoff mit einer Ephortec Sequenzieranlage (100cm Sequenzierer/Haake & Buchler) durchgeführt. Die Glasplatten mussten zunächst mit Seifenlauge gründlich gereinigt werden, um anschließend erst mit Aceton und dann mit 3,2% (v/v) Ammoniak in Isopropanol mit einem fusselfreien Tuch abgerieben zu werden. Die kurze Glasplatte wurde silikonisiert, um später ein leichteres Ablösen des Gels zu ermöglichen.

Die Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

42 g Harnstoff (7 M)

15 ml 40% (w/v) Acrylamid/Bis (19:1)

auf 80 ml mit ddH₂O aufgefüllt und mit
leichter Wärmezufuhr aufgelöst

10 ml TBE

entgast im Exsikkator (10 min.)

1 ml Ammoniumpersulfat (APS)

12 µl TEMED

ad 100 ml mit ddH₂O aufgefüllt

Die Zugabe von APS und TEMED startete die Polymerisation, wonach das Gel zügig gegossen werden musste. Den mit einem 0,4 cm Spacer voneinander getrennten Platten wurde unten ein Gummischuh (Fill Adaptor) übergezogen und an diesen ein entlüftetes System aus Perfusionsleitung mit erhöht befestigter

Perfusorspritze angeschlossen. Die Apparatur ermöglichte ein blasenfreies, aufsteigendes, fast verlustfreies Einschwemmen des langen Gels. Zum Auspolymerisieren wurde es über Nacht bei RT stehen gelassen. Vor der Gelbeladung musste eine Vorlaufzeit von 30 min bei RT, 2000 V und 150 mA eingehalten werden und die Wells mit einer Pasteurpipette von Harnstoffresten befreit werden. Die Sequenzierproben (s. 3.7.2.) wurden vor dem Auftragen (3 µl) 2 min auf 80°C erhitzt. Der Hauptlauf dauerte 4-10 h bei 2500 V/150 mA, wobei der Laufpuffer (TBE) alle 2 h ausgetauscht werden musste, da das System über keine Pufferumwälzung verfügte.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf ein 3 MM Filterpapier aufgezogen, in einem Gelrockner (Ephortec) getrocknet und 24-48 h bei RT autoradiographiert (FujiRX oder Kodak XOMat Röntgenfilme). Der Film wurde automatisch entwickelt.

3.4. Herstellung von synthetischen Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die als Northernblot-Sonde, Sequenzierprimer oder PCR-Primer Verwendung fanden, wurden mit dem Syntheseautomaten (Gene Assembler) der Fa. Pharmacia hergestellt. Dem Syntheseprozess liegt das Phosphoramidit-Verfahren nach Caruthers (1987) zugrunde.

Nach der Synthese mussten die matrixgebundenen Oligonukleotide entkoppelt und entsalzt werden, wozu die Synthesekartuschen zunächst in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 1 min bei RT und 14.000 U/min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) von den Reagenzienrückständen befreit wurden. Die Kartusche konnte dann in einem 2 ml Reagenzgefäß mit Schraubverschluss (Sarstedt) mit 1 ml 36% (v/v) Ammoniak zur Äquilibration unter gleichen Bedingungen zentrifugiert werden. Die Probe wurde in ein Szintillationsgefäß, in das ebenfalls 1 ml 36% Ammoniak vorgelegt worden war, überführt. Die Schraubverschlüsse der Gefäße wurden mit Parafilm verschlossen, damit der

NAP-Puffer: 10 mM Na₂HPO₄
10 mM NaH₂PO₄
titriert auf pH 7,5

3.5. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die phosphorilierten (s. 3.7.4.) Oligonukleotide, d.h. der Sense-Oligonukleotid und der Antisense-Oligonukleotid, wurden in äquimolaren Mengen in 6xSSC angesetzt um eine Schmelzpunkterhöhung zu erreichen und im Wasserbad (GFL) 10 min bei 70°C inkubiert.

Hybridisierungsansatz:

- 50 µl Sense-Oligonukleotid (55 mM)
- 100 µl Antisense-Oligonukleotid (25 mM)
- 65,2 µl 6 x SSC
- ddH₂O ad 215,2 µl

Der Ansatz wurde nach der Inkubation bei RT auf 30°C abgekühlt, um anschließend 20 min auf Eis gestellt und bis zur Ligation an das fertige PCR-Produkt bei -20°C aufbewahrt zu werden.

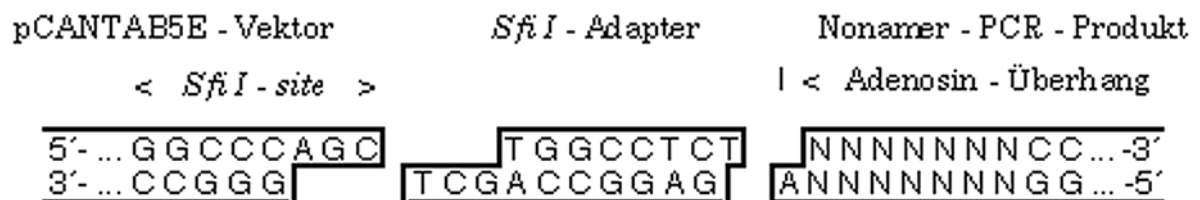


Abb. 3.1.

3.6. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

3.6.1. Herstellung der Mutagenese-Matrize

Als Matrize (Template) der Deletionsmutagenese diente eine von F.-J. Gaida (1992) in pBluescript klonierte cDNA der CEA A3B3 Domäne, deren Sequenz geprüft und die in einem *E. coli* Stamm (JM 109) bei -80°C konserviert war. Nachdem der Bakterienstamm aus der Masterkultur ausgestrichen (s. 3.1.5.) und in Flüssigmedium hochgewachsen war, konnte mit Hilfe einer DNA-Präparation (s. 3.2.2.) das Plasmid gewonnen werden (s. 3.2.5.).

3.6.2. PCR mit spezifischen Primern

Die PCR mit spezifischen Primern wurde zur Herstellung von CEA-Deletionsmutationen und der Kontrolle von Plasmidinsertionen verwandt. Als Templates dienten rekombinante Plasmide, aus rekombinanten Plasmiden restriktionsenzymatisch ausgeschnittene Inserts oder aus anderen PCRs

hervorgegangene dsDNA.

Bei jeder durchgeführten PCR wurde pro Primerpaar eine Negativkontrolle ohne Template mituntersucht. Das Pipettieren der PCR Ansätze fand an einem Arbeitsplatz mit einem Abzug statt, wobei die Reagenzien in einem anderen Raum gelagert wurden. Die Ansätze enthielten ein Gesamtvolumen von je 100 µl, das in ein Sarstedt PCR Röhrchen mit Kolben-Schraubverschluss einpipettiert wurde, um eine Kondensation von Wasser an der Deckelunterseite während der Reaktion zu vermeiden.

Pipettierschema:

Reagenzien	Probe	Neg.-Kontr.	[c]
DNA-Template	1-5 µl	0 µl	
5'-Primer (4 µM)	10 µl	10 µl	0,4 µM
3'-Primer (4 µM)	10 µl	10 µl	0,4 µM
5x PE Puffer	20 µl	20 µl	
d NTPs (1,25 mM)	16 µl	16 µl	0,2 mM
ddH ₂ O	ad 99,5 µl	ad 99,5 µl	
Taq®-Polymerase	0,5 µl	0,5 µl	
Gesamt	100 µl	100 µl	

Die Taq®-Polymerase (GibcoBRL) wurde erst nach dem ersten Aufkochen der Ansätze in der PCR-Maschine (Minicycler, Biozym) hinzugegeben ("hotstart").

5x PE Puffer:

- 250 mM KCl
- 50 mM Tris-HCl
- 7,5 mM MgCl₂
- 0,05% (w/v) Gelatine
- pH 8,3

Die "Annealing" Temperatur wurde jeweils nach Primer und Matrizensequenzen mit dem Oligo 4.0-s Programm errechnet:

C-terminale Primer	N-terminale Primer	"Annealing" Temperatur
CEA3ACT2 -	CEA3ANA1:	54°C
CEA3AC12 -	CEA3ANA1:	54°C
CEA3AC13 -	CEA3ANA1:	51°C
CEA3ACT2 -	CEA3ANA2:	60°C
CEA3ACT2 -	CEA3ANA3:	60°C
CEA3AC12 -	CEA3ANA2:	60°C

Die genauen Primerbeschreibungen finden sich in Anhang 1.

Die Zyklusbedingungen wurden wie folgt gewählt:

- 1 - 5 min 95°C
- 2 - 2 min 94°C
- 3 - 2 min Annealing Temperatur (35-60°C)
- 4 - 2 s pro 1°C Anstieg bis Synthesetemperatur (72°C)
- 5 - 30 s 72°C
- 6 - 29 x zurück zu Schritt 2
- 7 - 10 min 72°C

Nach dem Durchlauf wurden die PCR-Produkte entweder bei -20°C aufbewahrt, oder mit der Gelelektrophorese getestet, bzw. aufgereinigt (s. 3.3.1. und 3.2.6.).

3.6.3. PCR-Deletionsmutagenese mit spezifischen Primern

Mit definierten Primern sollten definierte Fragmente der CEA A3 Domäne amplifiziert werden. Die N-terminalen Primer wurden so entworfen, dass sie die Sfi I Restriktionsstelle sowie die Kodons für Met-Ala, die als Proteinase-Schnittstelle für die Pectat Lyase dienen (s. 3.12.2.), beinhalteten (s. Anhang 1). Die C-terminalen

Primer bauten die Not I Restriktionsstelle in das Amplifikat ein (s. Anhang 1). Die Primerbindungsstellen auf der Matrize wurden so gewählt, dass zum einen die volle Länge umfasst, zum anderen jeweils durch einen Deletionsschritt die Domänenstruktur um ein β -strand verkleinert wurde (s. Anhang 2).

3.6.4. PCR und PCR-Deletionsmutagenese mit Nonamer-Primern

Eine PCR, die verschieden lange 5'-Deletionen der CEA3A cDNA amplifizieren sollte, wurde mit variablen, neun Basenpaare langen (Nonameren) 5'-Primern (3456 POP; s. Anhang 1) und einem fixen 3'-Primer (CEA3ACT2; s. Anhang 1) durchgeführt. Die Nonamere wurden mit zwei definierten Cytidinen an ihrem 3'-Ende entworfen. Dies sollte zum einen zu einem ausreichenden Annealing der kurzen Primer führen und andererseits bestimmte theoretische Bindungspositionen im Template im richtigen Leserahmen favorisieren (s. Anhang 2.3.). Die zehn möglichen Nonamere, die einen am 3'-Ende im Leserahmen befindlichen, doppelten Cytidin-Rest beinhalteten, wurden übereinander gelegt und ergaben eine Konsensussequenz der Nonamer-Population (s. Anhang 1.1.2.). Es entstand eine Population mit 3456 möglichen Kombinationen, woraus sich der Name der Nonamer-Population "3456 POP" ergab.

Da aus der variablen Oligoproduktion von 3456 Nonameren nur zehn vollständig bindende Primer resultierten, musste die 5'-Primer Konzentration in dem PCR-Ansatz erhöht werden. Die $MgCl_2$ Konzentration des Reaktionsmilieus wurde anhand einer Verdünnungsreihe in einem Vorversuch bei 1.25 mM zusätzlich zu der Konzentration des PE-Puffers (1,25 mM) optimiert (s. 4.1.1.). Die optimale Annealingtemperatur wurde mit dem Oligo 4.0s-Programm errechnet.

Pipettierschema der Nonamer-PCR:

	Probe	Negativ- Kontrolle	[c]
DNA-Matrize:	10 µl	0 µl	
5'-Primer(Nonamere) (61 µM)	68,5 µl	68,5 µl	41,8 µM
3'-Primer (75 µM)	0,5 µl	0,5 µl	0,365 µM
10x PE	10 µl	10 µl	
dNTPs (2,5 mM)	8 µl	8 µl	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl	2,5 µl	1,25 mM
dd H ₂ O	0 µl	10 µl	
Taq®-Polymerase	0,5 µl	0,5 µl	
Gesamt	100 µl	100 µl	

Die Polymerase wurde erst nach dem Erreichen von 95°C hinzupipettiert. Die Reaktion lief nach folgendem Zyklus (Programm F2 var.) ab:

- 1- 5 min 95°C
- 2- 2 min 94°C
- 3- 2 min 35°C (Annealing)
- 4- 2 s pro 1°C Anstieg bis Synthesetemperatur
- 5- 30 s 72°C
- 6- 29x zurück zu 2
- 7- 10 min 72°C

Die Proben wurden anschließend entweder direkt auf einem Agarose Gel kontrolliert oder bei -20°C aufbewahrt.

3.7. Enzymatische Modifikation von DNA

3.7.1. Restriktionshydrolyse mit Endonukleasen

Die Restriktionshydrolyse (Restriktionsverdau) von Nukleinsäuren mit Endonukleasen war zur Klonierungsvorbereitung, zur Analyse präparierter DNA, sowie zur Insertkontrolle in rekombinanten Plasmiden notwendig. Die Endonukleasen wurden von den Firmen GibcoBRL und NEB bezogen, die die Reaktionspuffer zu den jeweiligen Enzymen mitlieferten. Analytische Ansätze wurden in kleinen Volumina (10-20 μ l) durchgeführt, während Verdauungen zur Insertgewinnung 50 μ l umfassten. In Relation zu der zu verdauenden DNA enthielten die Ansätze 5 U/ μ g Restriktionsenzym und wurden mit Mineralöl überschichtet nach Herstellerangaben in einem mit Seesand gefüllten Heizblock (Techne) inkubiert. In dem Fall von zwei Restriktionshydrolysen mit verschiedenen Enzymen hintereinander wurde der erste Reaktionspuffer dem zweiten Enzym durch hinzufügen von einzelnen Reagenzien angepasst. Die Inkubationszeiten variierten von 1h bis zu 12h, wobei diese von der Enzymaktivität und dem Zweck (analytische Ansätze kürzer, präparative länger) der Restriktion abhängig waren. Nach der Reaktion wurden die Enzyme bei einer Inkubation von 65°C für 1h zerstört, um nicht mit nachfolgenden Reaktionen (z.B. Ligationen) zu interagieren.

3.7.2. Ligation von Nukleinsäurefragmenten in Vektoren

Die Ligation von DNA wurde zur Klonierung in Vektoren, sowie zum Anstücken des Sfi I-Adapters an das Nonamer PCR-Produkt eingesetzt. Die Ligationen in die beiden zur Klonierung benutzten Vektoren waren beide Zusammenschlüsse kohäsiver Enden. Zum einen konnten PCR-Produkte der Taq-Polymerase Reaktion mit ihren Adenosin-Überhängen direkt in den pCR II Vektor (Invitrogen) hinein kloniert werden, der seinerseits Thymidin-Überhänge als Klonierungsschnittstelle beherbergte, zum anderen enthaltene der pCANTAB5E Vektor (Pharmacia) am 5'-Insertende eine vorgeschnittene Sfi I-Schnittstelle und

am 3'-Insertende eine solche für Not I, in die Sfi I/Not I vorgeschchnittene Inserts kohäsiv ligiert werden konnten.

Die durch spezifische Primer amplifizierten CEA A3 - Deletionen konnten zunächst in den pCR II Vektor (Invitrogen) ligiert werden. Da die Primer je nach Terminus die Sfi I- bzw. Not I- Restriktionsstelle enthielten, war es möglich die Fragmente aus der resultierenden pCR II Plasmid-DNA herauszuschneiden. Anschließend konnten die Fragmente in der richtigen Orientierung in den pCANTAB5E Vektor (Pharmacia) zur Expression kloniert werden.

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei das Insert im dreifach molaren Verhältnis zu dem eingesetzten Vektor stand und die Ligation bei 12°C über Nacht (Invitrogen) bzw. 16°C für 1-4h (Pharmacia) durchgeführt wurde. Der Reaktionspuffer und die T4-Ligase wurden von den Vektorherstellern mitgeliefert.

Die Ligation des Sfi-Adapters an das Nonamer PCR-Produkt (gelanalytisch abgeschätzt 200 ng DNA vor Aufreinigung) musste in 6x SSC durchgeführt werden, da die vorangegangene Oligohybridisierung in diesen Konditionen erfolgte und die hohe Salzkonzentration das Hybrid während der Ligation stabilisierte. Um das Reaktionsvolumen möglichst klein zu halten, wurde das PCR Produkt nach der Phosphorylierung mit 3 M NaAcetat (pH 5,3) in Isopropanol gefällt und das Pellet in 10 µl phosphoryliertem Sfi-Adapter in 6x SSC, 1,5 µl 10x Ligasepuffer (NEB) und 2,5 µl ddH₂O resuspendiert. 1 µl T4-Ligase (NEB), d.h. 400 U, ergänzte das Volumen auf 15 µl, welches über Nacht bei 16°C in dem Minicycler (Biozym) inkubiert wurde. (s. 3.5.)

3.7.3. 5' Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Zur Ligation des Sfi I- Adapters an das Nonamer PCR-Produkt wurden die Oligonukleotiden vor der Hybridisierung (s. 3.5.) sowie das PCR-Produkt am 5'-Ende phosphoryliert (Gaida, 1992). Die Oligonukleotide wurden in folgendem Reaktionsansatz phosphoryliert:

50	μl	Oligonukleotid (40 bzw. 120 mM)
10	μl	10x LK-Puffer
10	μl	10 mM ATP
28	μl	ddH ₂ O
2	μl	T4 Polynukleotidkinase (NEB)
100	μl	Gesamtvolumen

Die Inkubationszeit betrug 45 min bei 37°C.

Um den Reaktionsansatz zur Phosphorylierung des PCR-Produktes möglichst niedrig zu halten wurde die DNA Lösung in einer Amicon 30 Ultrafiltereinheit konzentriert und mit 0,5x LK-Puffer gewaschen. Dieser Ansatz konnte auf die Hälfte des Volumens evaporisiert und so in 1x LK-Puffer direkt in die Reaktion eingesetzt werden:

33	μl	DNA in 1x LK-Puffer
4	μl	10 mM ATP
0,7	μl	10x LK-Puffer
1	μl	T4-Polynukleotidkinase (NEB)
1,3	μl	ddH ₂ O
40	μl	Gesamtvolumen

Die Inkubation wurde wie oben durchgeführt.

10x LK-Puffer: 0,7 M Tris-HCl (pH 7,6)
 0,1 M MgCl₂
 0,05 M DTT

3.7.4. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die Radioaktivmarkierung von Nukleinsäuren war zum einen für die Herstellung radioaktiver Hybridisierungssonden zum DNA-Koloniescreening (s. 3.10.) notwendig, zum anderen wurde sie zur Markierung bei der manuellen Sequenzierung (s. 3.8.2.) eingesetzt.

Die Hybridisierungssonden wurden wie unter 3.7.3. beschrieben phosphoryliert, nur dass anstelle des ATP 2 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (entspricht 20 µCi) eingesetzt wurde. Die spezifische Aktivität betrug $1\text{--}2 \times 10^9$ cpm/µg DNA.

3.8. DNA-Sequenzierungen

3.8.1. Automatische Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mit dem Taq DyeDeoxy™ Terminator Kit für selbst hergestellte Sequenzierungsprimer oder dem ABI PRISM™ Cycle Sequencing Core Kit für definierte Herstellerprimer automatisch durchgeführt (Applied Biosystems/Perkin Elmer), die auf das System des statistischen Kettenabbruches bei dem Einbau von 2',3'-Dideoxynukleotiden basieren (Sanger et al., 1977). Die Ansätze wurden streng nach Herstellerprotokoll behandelt, wobei besonders die Reinheit der eingesetzten dsDNA, die vorher Phenol/Chloroform extrahiert wurde, und der selbst hergestellten Primer für die Qualität der Ergebnisse entscheidend waren. Bei Sequenzierungen von Inserts in pCR II (Invitrogen) konnten die definierten Herstellerprimer T7 und SP6 (s. Anhang 1) verwendet werden, da der Vektor die nötigen komplementären Sequenzen in seiner MCS enthielt. Zur Sequenzierung von Inserts in pCANTAB5E (Pharmacia) mussten mit dem Gene Assembler (Pharmacia) Sequenzierungsprimer hergestellt werden (s. Anhang 1). Für letztere Ansätze wurde ein passendes Zyklus-Programm (TAQTERMF) erarbeitet:

- 1- 30 s 96°C
- 2- 15 s 50°C
- 3 - 1 s pro 1°C Anstieg bis 60°C
- 4 - 4 min 60°C
- 5 - 24x zurück zu 1

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben Isopropanol gefällt, getrocknet und in einem Service-Labor (Prof. Richter, Institut für Zellbiochemie/ UKE, Hamburg) automatisch sequenziert.

3.8.2. Manuelle Sequenzierung

Bei einigen Inserts der Nonamer PCR (s. 3.7.2.) zeigte die automatische Sequenzierung keine befriedigenden Ergebnisse, so dass diese Proben manuell nach Sambrook et al. (1989) sequenziert wurden.

Zur Vorbereitung der Prozedur musste die DNA zunächst als Einzelstrang präpariert werden (s. 3.2.4.) und ein entsprechendes PAA Gel mit 7 M Harnstoff gegossen werden (s. 3.3.2.). Für die Sequenase Reaktion (Tabor und Richardson, 1987) wurde das USB Sequenase-System verwandt. Bei dem Ansatz wurden 3 µg DNA und 10 ng des jeweiligen Primers (s. Anhang 1) in 10 µl Sequenase Puffer (USB) pro Probe aufgenommen, auf 65°C im Wasserbad (GFL) erhitzt und bei RT auf eine Temperatur unter 30 °C abgekühlt. Daraufhin wurden die Proben mit je 6 µl vorbereiteten MasterMix versetzt.

Mastermix 4,2x:	4,2 µl 0,1 M DTT
	8,5 µl Labelmix 1:10 (USB)
	2,5 µl α ³⁵ S dATP
	8,5 µl 1:8 Sequenase
	1,5 µl ddH ₂ O
	25,2 µl Gesamtvolumen

Nachdem die Proben 5 min bei RT inkubiert worden waren, musste jede geviertelt werden, um jedes Viertel mit 2,5 µl eines Terminatorenansatzes (A,G,C oder T) zu versetzen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C, konnte jedes Röhrchen (Probenviertel) mit 4 µl Stop Puffer versehen und die Proben auf das Gel geladen werden (s. 3.3.2.).

3.9. Transformation von Bakterien

3.9.1. „One-Step“-Transformation

Das Protokoll der One-Step Transformation basiert auf den Herstellerangaben des Vektors pCANTAB5E (Pharmacia) über die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformationsprozedur (Chung et al., 1989). Die E.coli Bakterien wurden in einem Schritt kompetent gemacht und mit den rekombinanten Vektoren transformiert.

5 ml LB-Medium mit 2% (w/v) Glukose wurden mit einer einzelnen von einer MM-Platte steril gepickten Kolonie des gewünschten E.coli-Stammes inokuliert und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 37°C (30°C) rotierend inkubiert. Die Kultur wurde daraufhin bei 4°C und 2500 x g für 15 min abzentrifugiert und das Pellet in 1/10 des Volumens in eiskaltem (0°C) TSS Puffer resuspendiert. Auf Eis gelagert waren die Zellen 2-3 Stunden zur Transformation kompetent.

Pro Transformation wurden je 100 µl kompetente Zellen in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf Röhrchen vorgelegt und mit je 5 µl Ligationsansatz oder Plasmid (1-3 ng) versetzt, kurz geschwenkt und 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend erhielten die Ansätze 45 s in einem vorher auf 42°C eingestellten Wasserbad (GFL) einen Hitzeschock, um sofort wieder 2 min auf Eis abgekühlt zu werden. Pro Ansatz wurde in je einem 12 ml Polypropylen Röhrchen (Falcon) 900 µl LBG-Medium auf 30°C vorgewärmt, anschließend mit 105 µl Transformationsansatz versetzt und 1h bei 37°C (30°C) unter Rotieren inkubiert.

Jeder Ansatz wurde auf vier SOBAG-Platten 10 µl, 50 µl, 100 µl und der Rest der

Kultur mit einer L-förmigen Pasteurpipette ausplattiert und über Nacht bei 37°C (30°C) inkubiert. Bei jeder Transformation wurde eine Kontrolle mit 1 ng ungeschnittenem Plasmid mitgeführt, von dem nur 10 µl ausplattiert wurden, was zur Berechnung der Transformationsqualität (üblicherweise $1\text{-}5 \times 10^6$ cfu/µg DNA) sowie der Rekombinanz der anderen Ansätze diente. Als Negativkontrolle wurden untransformierte kompetente Bakterien ausplattiert.

3.9.2. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Um Bakterien für die Elektroporation (s. 3.9.3.) kompetent zu machen, wurden diese wie oben beschrieben kultiviert und zentrifugiert und anschließend in dem gleichen Volumen eiskaltem 1mM HEPES (pH 7,0) resuspendiert. Die Zellen mussten nochmals sedimentiert und das Pellet diesmal in 0,5 Volumen eiskaltem 1 mM HEPES (pH 7,0) aufgenommen werden, um abschließend nach erneuter Sedimentation in 1/50 Volumen eiskaltem 10% (v/v) Glycerol (ultrapur) aufgenommen und in 50 µl Aliquots bei -70°C aufbewahrt zu werden.

3.9.3. Elektroporation

Die Elektroporation nach Dower et al. (1988) wurde mit dem Gene Pulser (BioRad) durchgeführt. Bei dem Verfahren konnten die elektrokompetenten E.coli-Bakterien (s. 3.9.2.) bei einem Küvettenabstand von 0,2 cm, 25 µF, 2,0 kV und 200 W mit einem Elektropuls von 4,5 ms transformiert werden. Bei dem Elektroporationsansatz wurden 40 µl Bakterien in 10% (v/v) Glycerol auf Eis mit 1-2 µl DNA (40-100 pg) versetzt, sofort in die vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert, mit einem wie oben definierten Schock manipuliert, sofort in 1 ml SOB-Medium suspendiert und 1 h bei 37°C rotierend inkubiert. Das weitere Prozedere verlief wie unter 3.9.1. beschrieben.

3.10. DNA-Kolonietransfer („Colony screening“)

3.10.1. DNA-Fixierung auf eine Nitrocellulosemembran

Die auf dem Selektionsmedium gewachsenen Kolonien der transformierten Nonamer PCR Klone beinhalteten häufig nur ein sehr kurzes Insert, das aus dem Sfi-Adapter und dem Restriktionsrest des Not I-Verdaus bestand. Um die tatsächlich rekombinanten Kolonien zu identifizieren, wurde nach Gaida (1992) ein Plattenabklatsch mit Nitrocellulosefolie (Schleicher&Schüll) angefertigt, dessen DNA an dem Medium fixiert und mit einer spezifischen, radioaktiven Sonde hybridisiert wurde. Während des Abklatschens der Filter wurde dessen Orientierung auf der Agarplatte mit Hilfe einer mit wasserunlöslicher Tinte gefüllten Spritze markiert. Nach dem Abziehen wurden die Filter kurz auf 3MM Whatmanpapier getrocknet. Die Filter musste nacheinander für folgende Zeiten auf verschiedene Lösungen zur Inkubation aufgelegt werden:

2 min 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl

5 min 0,5 M Tris-HCl (pH8,0); 1,5 M NaCl

1 min 0,2 M Tris-HCl (pH7,5); 2x SSC

Zwischen den Schritten wurden die Membranen jedes Mal kurz auf Whatmanpapier getrocknet. Die DNA konnte dann durch backen im Vakuumofen für 2 h bei 80°C an die Nitrozellulose fixiert werden.

3.10.2. Markierung einer DNA-Sonde nach dem „random priming“-Prinzip

Nach dem Megaprime System (Amersham) (Feinberg und Vogelstein, 1983 und 1984) wurde die Sonde mit random Nonamer-Primern, $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (0,051 Ci) als Markierung und der Klenow Polymerase I Reaktion auf der cDNA-Vorlage der CEA3A Domäne strikt nach Herstellerangaben produziert. Die markierte Sonde

wurde mittels Ausschlusschromatographie über eine NAP-5 Säule (Pharmacia) von der nicht inkorporierten Radioaktivität getrennt und mit 1 ml TE-Puffer (pH 8,0) eluiert. Das Eluat konnte dann mit dem Szintillationsmessgerät quantifiziert werden, indem 1 µl in 5 ml Scintillationsentwickler gegeben und im Scintillator gemessen wurden (spezifische Aktivität: $3\text{-}4 \times 10^4$ cpm/µl).

3.10.3. Hybridisierung der membranfixierten DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde

Der Hybridisierungskolben wurde mit 20 ml Rapid hyp Puffer (Amersham) versehen und bei 65°C 20 min im Hybridisierungsofen (GFL) vorgewärmt. Anschließend konnten die mit 2x SSC befeuchteten Filter mit der fixierten DNA nach innen gerichtet in die Hybridisierungskolben eingelegt werden. Die Prähybridisierung der Folien betrug 30 min bei 65°C. Nachdem die Sonde (s. 3.10.2.) 5 min denaturiert wurde, konnten 300 µl (entspricht einer spezifischen Aktivität von $1,2 \times 10^7$ cpm) dem Ansatz zugegeben und für 1 h bei 65°C hybridisiert werden. Die Hybridisierlösung wurde aus dem Kolben pipettiert, und die Filter wurden viermal wie folgt gewaschen:

1x 20 min	RT, 50 ml 2x SSC; 0,1% (w/v) SDS
2x 15 min	65°C, je 50 ml 0,5x SSC; 0,1% (w/v) SDS
1x 1 h	65°C, 50 ml 0,1x SSC; 0,1% (w/v) SDS

Die Filter wurden zur Exposition in Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei RT in einer Röntgenkassette auf Röntgenfilm (Kodak, Fudji) gelegt.

3.11. Protein-Kolonietransfer („Filterlift“)

Antibiotikaresistente Bakterienklone wurden mit dieser Methode auf eine Expression rekombinanter Peptide untersucht. Dazu wurde eine „Colony-Lift“-Methode nach Sambrook et al. (1989) benutzt. Der Nachweis einer Proteinexpression wurde mit einem murinen α E-tag Ak (5 μ g/ml) gegen das C-terminale E-tag der Peptide geführt. Mit einem polyklonalen α CEA Ak (10 μ g/ml) konnten die Kolonien auf eine CEA-spezifische Expression getestet werden und mit dem T84.66 (10 μ g/ml) auf das Vorliegen des für ihn spezifischen CEA-Epitops.

Dazu wurden auf selektiven Festmedien (SOBAG-Platten) multiklonale Bakteriensuspensionen ausgestrichen, so dass die Kolonien nach Inkubation über Nacht bei 37°C (30°C) zum größten Teil einzeln standen. Zunächst mussten die Kolonien auf Nitrocellulosefolie (Schleicher&Schüll) (s. 3.10.) durch Abklatsch übertragen werden. Die Filter wurden dann mit den abgeklatschten Kolonien nach oben auf IPTG-haltigen und glukosefreien Festmedien (LB-IPTG) bei 37°C für 2h induziert. Durch Schwenken der Membranen in Lyse-Puffer für 1h und RT konnten die Zellen zerstört und die intrazellulären Proteine an die Filter gekoppelt werden. Die Zellreste wurden mit einem fusselfreien Papiertuch abgewischt.

Lyse-Puffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	3 % (w/v)	BSA
	0,025 % (w/v)	Lysozym
	0,01 % (w/v)	DNase in PBS

Anschließend wurden die Membranen 1h bei RT in 5% (w/v) Boehringer Blocking (BB) Reagenz blockiert und weitere 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schütteln mit den jeweiligen 1. Ak (s.o.) inkubiert. Die Filter mussten 3x 5 min in

PBS mit 0,5% Tween 20 gewaschen werden, um sie mit dem 2. Ak (1/1000 verdünnt in 5% (w/v) BB-Reagenz in PBS) für 1h bei RT zu inkubieren. Der 2. Ak war entsprechend dem 1. Ak gewählt (α mouse-Ak oder α human-Ak) und entweder Peroxydase (POD)- oder Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert. Nachdem die Nitrocellulosefolien noch mal wie oben gewaschen waren, konnte je nach Konjugat die jeweilige Substratreaktion erfolgen und so die positiven Kolonien sichtbar gemacht werden.

Für das POD-Konjugat wurde Diaminobenzidin (DAB) -Tabletten (Sigma) als Substrat eingesetzt. Eine DAB-Tablette musste in 15 ml TBS-Puffer (s. 2.6.) aufgelöst, über einen 0,45 mm Filter (Sartorius) gegeben und mit 12 μ l 32% (v/v) H_2O_2 versetzt werden. 5 ml der frisch angesetzten Substratlösung wurden auf jeden Filter gegeben und 15 min bei RT geschwenkt.

Die Substratlösung der AP-Reaktion bestand aus einem Gemisch Nitro Blue Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (BCIP) (beides Boehringer Mannheim), das wie folgt zusammengestellt wurde:

NBT/BCIP-Lösung:	1 ml	1 M Tris-HCL (pH 9,5)
	200 μ l	5 M NaCl
	250 μ l	2 M $MgCl_2$
	ad 10 μ l	dd H_2O
	44 μ l	NBT mischen bis homogen
	33 μ l	BCIP mischen

Bei diesen Filterlifts diente zum einen die benutzte untransformierte Zellreihe, zum anderen ein abgetrennter Teil des Filters, der nicht mit dem 1. Ak inkubiert wurde, als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle diente ein sicher positives Protein (z.B. CEA bei T84.66 und α CEA Ak und ein E-tag enthaltendes Protein bei α E-tag Ak), das als Dot-Blot (3-5 μ l) auf den Filter aufgetragen wurde.

3.12. Proteinherstellung in Bakterien

3.12.1. Expression in E.coli

Die rekombinanten Bakterienklone wurden nach Herstellerangaben in 2x YT Medium entweder bei 37°C oder 30°C (E.coli N 4830-1 und HB 2151) exprimiert. Zur Induktion der Proteinproduktion wurde bei einigen E.coli Spezies IPTG benötigt, während bei anderen die Abwesenheit von Glukose ausreichte. Dabei musste darauf geachtet werden, dass zur guten Belüftung das Kolbenvolumen das Vierfache des Mediumvolumens betrug. Die Expressionsdauer wurde auf 6h bei 37°C und 6h bis über Nacht bei 30°C bakterienspezifisch austitriert (log-phase: OD₆₀₀ 0,5-1,0).

3.12.2. Extraktion des bakteriellen Periplasmas

Mit der periplasmatischen Bakterienextraktion konnte selektiv das periplasmatische Protein, welches von allen Zellkompartimenten den höchsten Anteil an rekombinantem Protein enthalten, gewonnen werden. Das rekombinante Protein wird zunächst membranständig in dem periplasmatischen Raum gebildet, wo es aufgrund der Erkennungssequenz Methionin-Alanin (M-A) proteolytisch entsprechend der Pectat Lyase (PL) abgetrennt wird und so löslich in dem Periplasma vorliegt (Lei et al., 1987). Die PL wird von den ursprünglichen pUC Plasmiden codiert und durch ein vorgeschaltetes Signalpeptid bevorzugt in den Periplasmatischen Raum exprimiert. Diese Eigenschaft macht sich der pUC abstammende pCANTAB5E Vektor zunutze, um durch das pelB Gen, das das Signalpeptid der PL kodiert, sein rekombinantes Protein entsprechend zu exprimieren. Dazu war die Kodierung der Erkennungssequenz (ATG GCC) in den N-terminalen Primern der Deletions-PCR notwendig (s. Anhang 1).

Im Phagensystem des Helferphagen M13KO7 werden die rekombinanten Proteine auf der Phagenoberfläche exprimiert und mit dem filamentösen Phagen aus der Zelle geschleust. Hier ist demnach die M-A Erkennungssequenz nicht notwendig.

Nach dem Pharmacia Protokoll wurde ein Pellet einer 25 ml Expressionskultur in

0,5 ml eiskaltem TES Puffer (s. 2.6.) resuspendiert und mit 0,75 ml 1/5 TES (TES-Puffer wird 1 von 5 Teilen mit ddH₂O verdünnt) versetzt und gevortext, um einen sanften osmotischen Schock zu erzeugen. Rechnerisch beträgt die Endkonzentration des Puffers dann 0,104 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,26 mM EDTA und 0,26 M Sukrose. Die Suspension musste 30 min auf Eis inkubiert werden, bevor sie in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 14.000 U/min 10 min abzentrifugiert werden konnte. Der Überstand enthielt den Extrakt, der bei -20°C aufbewahrt wurde. Dem Pellet nach Extraktion des PP wurde wie unter 3.12.3. beschrieben der Rest des löslichen zellulären Proteins entzogen.

3.12.3. Extraktion des kompletten Bakterienpellets (LCE)

Bei der Extraktion des löslichen Gesamtproteins der pelletierten Bakterien aus der Expression wurde nach Sambrook et al. (1989) eine Hitzeextraktion angewandt. Das Pellet einer 25 ml Expressionskultur wurde nach PPE in 0,5 ml PBS resuspendiert und 5 min. in einem siedenden Wasserbad (GFL) inkubiert, um anschließend den Zelldebris abzuzentrifugieren und den Überstand zu gewinnen, der das lösliche Protein enthielt. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt. Das überbleibende Zelldebris (ZD) wurde zur Untersuchung der unlöslichen Proteinfraction in 0,5 ml PBS suspendiert oder der weiteren Aufbereitung nach 3.12.4. zugeführt.

3.12.4. Bearbeitung von unlöslichen Proteinen („Inclusion bodies“/IBE)

Einige der rekombinanten Proteine fanden sich löslich weder im periplasmatischen noch im zytoplasmatischen Zellkompartiment, konnten jedoch in der Suspension des Zelldebris mit PBS nachgewiesen werden. Bei dieser Ultraschall-Präparation nach Sambrook et al. (1989) wurde das Pellet einer 25 ml Expressionskultur zunächst in 2,77 ml eines Lysepuffers resuspendiert.

Lysepuffer: 2,5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 2 mM EDTA

(pro 25 ml 25 µl 10 mg/ml Lysozym
Bakterienkultur) 250 µl 1% (v/v) Triton

Die Suspension wurde 5 min auf Eis dem Ultraschall ausgesetzt und anschließend 20 min bei 12.000 x g und 4°C in der Zentrifuge (Sorvall) pelletiert. Das Protein befand sich dann im Überstand. Das Pellet wurde sicherheitshalber in 2-3 ml PBS resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.13. Gewinnung von rekombinanten Phagen aus E.coli

3.13.1. Phageninfektion von E.coli und Ernte der rekombinanten Phagen

Der pCANTAB5E Vektor kann benutzt werden, um mit Hilfe eines replikationsdefizitären Helferphagen M13KO7 ein filamentöses Phagenpartikel in E.coli herzustellen. Das Phagenpartikel stellt das rekombinante Protein als g3-Fusionsprotein in bis zu vier Kopien an der Oberfläche dar. Der Phagendisplay der rekombinanten Proteine wurde genutzt um diese in anschließenden ELISA-Assays oder im Panning auf Antikörperbindung zu untersuchen.

Nach dem Pharmacia-Protokoll wurde zunächst eine Kultur der transformierten Zellen als Vorkultur hochgezogen, um anschließend 900 µl der Bakteriensuspension mit 9,1 ml 2x YT-AG Medium zu verdünnen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wachsen zu lassen (ca. 2h). Diese Kultur konnte dann mit 4x 10¹⁰ pfu M13KO7 infiziert werden und musste 1h bei 180 U/min und 37°C inkubiert werden. Die infizierten Bakterien wurden 10 min bei 1000 x g abzentrifugiert und in 10 ml frischem 2x YT-AK Medium resuspendiert. Die Inkubation wurde 6h bis über Nacht bei 26-30°C und 180 U/min durchgeführt. Die Zellen mussten dann 20 min bei 1000 x g pelletiert werden, um den phagenhaltigen Überstand zu gewinnen. Die Phagen wurden direkt PEG gefällt (s. 3.2.4.) und anschließend entweder bei 4°C aufbewahrt oder direkt in einen ELISA-Assay eingesetzt oder über das Panning-Verfahren (s. 3.13.2.) selektioniert.

3.13.2. Selektionieren der Phagen gegen spezifische Antikörper („Panning“)

Die geernteten rekombinanten Phagen der Nonamer-PCR-Transformation wurden dem Panning nach Sambrook et al. (1989) gegen spezifische Antikörper (T84.66, α CEA Ak) zugeführt. Nachdem die Phagensuspension PEG gefällt und über einen 0,45 μ m Filter gegeben war, konnte sie auf eine vorbereitete 24-Well Zellkulturplatte (Nunc) aufgetragen werden (500 μ l pro Well). Die Platte war zuvor über Nacht mit einem spezifischen Ak (10 μ g/ml) beschichtet (in Beschichtungspuffer s. 2.6.), 3x mit PBS gewaschen, 2h mit 2 ml 1 % (w/v) BB-Reagenz bei RT blockiert und wieder 3x mit PBS gewaschen worden. Die Proben wurden 2h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend erst 20x mit PBS und dann 20x mit PBS+ 0,1% (v/v) Tween-20 gewaschen, wobei je 5 Waschschritte in ein Aliquot zusammengefasst aufgefangen wurden. In die Wells wurden nun je 500 μ l einer vorher vorbereiteten E. coli TG-1 Suspension ($OD_{600}=0,3$) pipettiert und diese unter Rotieren 1h bei 37°C inkubiert. Die wieder aufgefangenen Zellen wurden auf SOBAG-Platten in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert und über Nacht bei 30°C behandelt. Bei negativem Ergebnis mussten darauf die aufgefangenen Waschschritte zusätzlich nach Reinfektion überprüft werden, indem sie 1:1 mit der TG-1 Suspension vermischt wurden und wie oben weiter bearbeitet wurden.

3.14. Säulenaffinitätschromatographie

3.14.1. Reinigung und Anreicherung von Antikörpern

Zur Anreicherung und Aufreinigung von IgG-Ak wurden HiTrap® Protein G Sepharose® Säulen (Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 1 ml verwandt. Da nur murine Antikörper als Proben in Frage kamen, war Protein G dem Protein A als feste Phase vorzuziehen. Das Prinzip der Aufreinigung basiert auf den

verschiedenen Affinitäten von Maus-IgG zu Protein G in verschiedenen pH-Milieus, so dass die Proben bei pH 7,0 gebunden und bei pH 2,7 eluiert werden konnten. Die Vorgehensweise hielt sich streng an die Herstellerangaben. Die gereinigten Antikörper wurden anschließend spektrometrisch quantifiziert (s. 3.18.) und mit einem ELISA-Assay (s. 3.17.) auf Funktion geprüft.

3.14.2. Reinigung und spezifische Anreicherung von rekombinanten Proteinen

Zur Anreicherung rekombinanter Proteine wurde der α E-tag Ak an eine HiTrap Protein G Säule gekoppelt (s. 3.14.1.). Die rekombinanten Proteine waren durch die pCANTAB5E Komposition an den E-tag, ein 13 AS langes, lineares Peptid, gekoppelt. Die Firma Pharmacia stellte zu diesem Markierungspeptid mit dem α E-tag Ak einen spezifischen, murinen IgG-Antikörper zur Verfügung, der sich zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine besonders eignete.

Das Protokoll hielt sich streng an die Herstellerangaben, wobei der Antikörper bei pH 8,2 an die Matrix gebunden, mit Dimethyl Pimelimidat Dihydrochlorid (DMP) kovalent fixiert und der nicht gebundene Ak-Rest mit 0,1 M Glycin pH 2,8 blind eluiert wurde. Der kovalent gebundene Antikörper konnte so zur Affinitätschromatographie verwendet werden.

Die Proteinextrakte mussten zunächst gefiltert werden (0,45 μ m) und in PBS vorliegen. Nachdem die Säule mit 3 Bettvolumina PBS equilibriert worden war, konnte die Probe mit einer Perfusorpumpe (Braun/Melsungen) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 ml/min aufgetragen werden. Die Säule wurde erst mit 10 ml PBS und anschließend mit 5 ml 0,1 M Glycin pH 5,0 gewaschen. Eluiert wurde das Protein mit 5-10 ml 0,1 M Glycin pH 2,8, wobei das Eluat in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen und dabei sofort mit vorgelegten 300 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert wurde. Die Fraktionen wurden in einem Bradford-Assay (s. 3.18.) auf ihren Proteingehalt überprüft und weiter in Bindungsassays bearbeitet.

Die Säule konnte nach Gebrauch mit 2 Bettvolumen 0,1 M Glycin pH 2,8 regeneriert

und mit 5 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert werden, so dass sie mehrfach wiederverwendet werden konnte. Zuletzt wurde die Säule mit reichlich PBS gespült und zur längeren Aufbewahrung bei 4°C mit PBS + 0,01% (v/v) Thiomersal gefüllt.

3.14.3. Ionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie wurde versucht eine höhere Reinheit und eine höhere Konzentration des Proteinextraktes zu erzielen.

Hierzu wurde eine Mono Q - Säule (Pharmacia), die mit Ammoniumionen vorgepackt als starker Anionenaustauscher wirkt, in eine FPLC-Anlage (Pharmacia) eingesetzt. Nach einem Vorlauf mit 250 ml dd H₂O wurde die Probe, die zunächst durch einen 0,22 µm Filter (Millipore/Eschborn) steril filtriert wurde, in 500 µl Startpuffer verdünnt und mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gekoppelt. Die Elution wurde unter den gleichen Laufbedingungen mit dem Elutionspuffer durchgeführt und in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen. Bei der Elution gehen die Cl⁻-Ionen mit den Ammoniumionen in Bindung und geben so das Protein frei.

Startpuffer:	25 mM	Tris pH 7,5
	1 mM	EDTA
	2 mM	β-Mercaptoethanol

Elutionspuffer:	Startpuffer
	+ 0,5 M NaCl

3.15. Gelelektrophorese von Proteinen

3.15.1. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Mit der PAGE wurden rohe, sowie gereinigte Proteinextrakte nach ihrem Laufverhalten in der Gelmatrix unter denaturierenden Bedingungen (SDS)

aufgetrennt. Das Protokoll wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Als Elektrophoreseeinheit wurde die Minigelanlage (6 ml Gelvolumen) von Biometra verwendet.

Das Polyacrylamid Gel bestand aus einer Trenngelfraktion von 5 ml (je nach Gel 12-17% (w/v) Acrylamid-Bis 19:1), die zuerst gegossen werden und auspolymerisieren musste, bevor die Sammelgelfraktion von 1 ml (3 % (w/v) Acrylamid-Bis) als obere Schicht aufgetragen und in dieser der Well-Kamm platziert werden konnte.

Die Gelfraktionen wurden wie folgt angesetzt:

5 ml Sammelgel (3%):

3,15 ml	ddH ₂ O
0,50 ml	30 % (w/v) Acrylamid-Bis 19:1
1,25 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
50 µl	10% (w/v) SDS
2,5 µl	TEMED
50 µl	10 % (w/v) APS

10 ml Trenngel (15%):

2,3 ml	ddH ₂ O
5,0 ml	30 % (w/v) Acrylamid-Bis 19:1
2,5 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
0,1 ml	10 % (w/v) SDS
0,1 ml	10 % (w/v) APS
4 µl	TEMED

Bei anderen Acrylamidanteilen der Gele änderten sich die sonstigen Komponenten entsprechend. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, konnten die in Ladepuffer (s. 2.6.) aufgenommenen Proben 5 min. im Wasserbad (GFL) aufgeköcht und sofort wieder auf Eis abgekühlt werden. Das Gel wurde in die Gelkammer eingesetzt, die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und der Kamm gezogen.

Laufpuffer:	14,4 % (w/v)	Glycin
	3 % (w/v)	Tris-HCl
	1 % (w/v)	SDS
	in ddH ₂ O, justiert auf pH 8,8	

Die Probestaschen mussten durch Ausspülen von Gelresten befreit werden, bevor die kurz anzentrifugierten Proben aufgetragen werden konnten. Bei 10 mA liefen die Proben in die Gelmatrix ein und verdichteten sich im Sammelgel, um anschließend bei 20 mA im Trenngel aufgetrennt zu werden. Je nach Acrylamidanteil des Gels dauerte ein Durchlauf 3-5 h. Die Proteine konnten dann entweder durch Elektroblothen (s. 3.16.1.) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden, oder in der Gelmatrix direkt angefärbt werden (s. 3.15.3.).

3.15.2. Molekulargewichtstandard

Als Molekulargewichtsstandard wurde der Low Range Standard von Sigma verwendet, da die zu untersuchenden Proteine ein Molekulargewichtsintervall von 8-12 kD aufwiesen.

Sigma Low Range Standard:	kD
-	31,0
-	20,4/19,7
-	16,9
-	14,4
-	8,1
-	6,2
-	2,5

Der Standard musste entweder mit der anschließenden Proteinfärbung des Gels sichtbar gemacht werden, oder nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran separat mit Amido-Schwarz angefärbt werden.

Amido-Schwarz:	0,02 % (v/v)	Naphtol Blue Black
	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

Amido-Schwarz Entfärber:	20 % (v/v)	Ethanol
	5 % (v/v)	Essigsäure

Der Streifen des Molekulargewichtsstandards auf der Membran wurde abgetrennt und in Amido-Schwarz geschwenkt bis die Membran gut eingefärbt war. Durch das anschließende Entfärben wurden die Banden gut sichtbar. Zuletzt musste die Membran mindestens 15 min in ddH₂O gespült werden, um die Entfärberreste auszuwaschen.

3.15.3. Proteinfärbungen von PAA Gelen

Die Proteinbanden in PAA Gelen wurden mit Silbernitrat nach Sambrook et al., 1989 angefärbt.

Die Silbernitratfärbung konnte auf ungeblottete und schon geblottete Gele angewendet werden, wobei nach dem Blotvorgang einige schwache Banden möglicherweise nicht mehr zu sehen waren.

Zunächst musste das Gel entweder bei RT 30 min, oder bei 4°C über Nacht in 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure fixiert werden, bevor es in 5 % (v/v) Methanol und 7,5 % (v/v) Essigsäure für 10 min bei RT aufgequollen wurde und so seine ursprüngliche Größe wieder erreichte. Nachdem das Gel zweimal 1 min in ddH₂O gewaschen war, konnte es mit 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat behandelt werden. Wiederum zweimal 1 min mit ddH₂O gewaschen, wurde es 30 min bei RT im Dunklen mit 0,2 % (w/v) Silbernitrat und 1 mM Formaldehyd gefärbt. Nachdem das Gel wie oben noch zweimal gewaschen worden war, konnte es in 6 % (w/v) Natriumcarbonat und 6 mM Formaldehyd bis zum Erscheinen der Banden entwickelt werden. Mit 2,3 M Zitronensäure wurde die Reaktion gestoppt und das

Gel 15 min mit ddH₂O gespült, bevor es in 20 % (v/v) Ethanol konserviert werden konnte.

3.16. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot)

3.16.1. Elektroblob

Um die Proteinbanden, die in der SDS-PAGE (s. 3.15.1.) aufgetrennt worden waren, auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurde das Elektroblob-Verfahren mit der Bloteinheit von Biometra gewählt.

Zur Vorbereitung mussten pro Blot neun 3MM Whatmanpapierstücke von 11x11 cm und Nitrocellulosefolie (Schleicher&Schüll) von 10x10 cm zugeschnitten werden. Drei Filterpapierstücke mussten jeweils in 10x Anodenpuffer, Anodenpuffer und Kathodenpuffer getränkt werden.

Anodenpuffer (10-fach) :	0,3 M Tris
	10 % Methanol
	in dd H ₂ O, justiert auf pH 10,4

Kathodenpuffer :	25 mM	Tris
	192 mM	6-Aminohexansäure
	10 %	Methanol
	in dd H ₂ O, justiert auf pH 9,4	

Die Blotkammer musste auf 14°C über einen Wasserkreislauf abgekühlt werden, bevor auf die Bodenplatte der Blotkammer (Anode) zunächst die drei in 10x Anodenpuffer getränkten Whatmanfilter mit reichlich 10x Anodenpuffer blasenfrei aufgelegt werden konnten. Darauf wurden die drei in Anodenpuffer getränkten Filter ebenso sorgfältig aufgelegt. Auf den letzten Anodenfilter musste eine Schicht Anodenpuffer aufpipettiert werden, in die die Nitrocellulosemembran getränkt

werden konnte. Noch mal mit reichlich Anodenpuffer überschichtet wurde das PAA Gel blasenfrei aufgelegt. Nun konnten die Kathodenfilter folgen. Um die wichtige Blasenfreiheit zu gewährleisten, wurde jeder Filter mit einem Glasstab durch Abrollen an die unteren Schichten angepresst. Zuletzt wurde die Bloteinheit mit dem Deckel (Kathode) verschlossen und bei 250 mA für 45-60 min dem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Gele wurden wie unter 3.15.3. beschrieben weiterbearbeitet, während die Nitrocellulosemembranen entweder immunchemisch (s. 3.16.3.) gefärbt, oder mit dem Chemilumineszenz-Verfahren (s. 3.16.4.) auf Röntgenfilm sichtbar gemacht wurden.

3.16.2. Vakuum Dot-Blot

Die Proteinextrakte wurden mit dem Vakuum-Dot-Blot quantitativ auf spezifische Proteine untersucht, ohne nach Molekulargewicht aufgetrennt worden zu sein. Das Minifold®II-Gerät (Schleicher&Schüll) ist eine Vakuumkammer mit 72 Probenschlitzen in 3 Reihen, die auf 0,75 x 8 mm (6 mm²) normiert sind. In dem Versuchsaufbau nach Herstellerprotokoll wird eine in PBS getränkte Nitrocellulosefolie (Schleicher&Schüll) in die Vakuumkammer eingelegt, die Kammer an eine Vakuumpumpe angeschlossen (Vakuubrand) und ein Unterdruck von 200 hPa aufgebaut. Pro Slot wurden 50 µl Probe aufgetragen, die durch das Vakuum zügig und präzise auf die 6 mm² Slotfläche begrenzt durch die Nitrocellulose gesogen wurden, wobei die Proteine von der Membran adsorbiert wurden. Nachdem die Folie der Kammer entnommen war, konnte sie in Plastikfolie eingeschweißt 1h bei RT mit 5 % (w/v) BB-Reagenz blockiert werden und wurde wie unter 3.11. beschrieben weiterbearbeitet. Außer zum Waschen wurde die Folie nicht in Petrischalen geschwenkt, sondern mit den jeweiligen Reagenzien in Plastikfolie eingeschweißt.

3.16.3. Immunoblot

Die Nitrocellulosemembranen, auf die über das Elektroblobverfahren (s.

3.16.1) die Proteinbanden der SDS-PAGE (s. 3.15.1) übertragen worden waren, wurden immunchemisch wie unter 3.11. beschrieben weiterbehandelt. Bei der Gelelektrophorese (wie auch bei dem Vakuum Dot-Blot s. 3.16.2) wurde immer eine Negativkontrolle in Form eines Extraktes untransformierter Bakterien mitaufgetragen, um unspezifische Reaktionen der verwendeten Antikörper auf bakterielle Proteine zu entdecken. Die Extrakte mussten außerdem ohne den 1.Ak geprüft werden, um auszuschließen, daß es sich bei der Färbung nicht um eine unspezifische Reaktion mit dem 2. Ak handelte. Die angefärbten Banden konnten mit dem Amido-Schwarz gefärbten Molekulargewichtsstandard entsprechend auf ihre Größe berechnet werden (s. 3.1.3.).

3.16.4. Chemilumineszenzblot

Westernblots wurden wegen der höheren Sensitivität mit der Chemilumineszenz-Methode nach Isacson (1974) auf Röntgenfilm sichtbar gemacht, wobei enzymatisch Luminol (ein Diacylhydrazid) in sein Peracid reagiert und dabei Licht emittiert.

Der Immunoblot (s. 3.16.3.), bei dem als zweiter Ak ein Peroxidase-Konjugat verwendet worden war, wurde nach den Waschschritten mit dem Chemilumineszenz-Kit ECL (Amersham) weiter bearbeitet. Hierbei mussten die beiden Detektionsreagentien (DR 1 und DR 2) in gleichen Volumina zusammengegeben werden, worin die Membran eine Minute inkubiert wurde. Nachdem das Reagenz von der Membran abgelaufen war, wurde diese blasenfrei in Zellophanfolie eingepackt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Nach 5-60 min Expositionszeit wurde der Film maschinell entwickelt.

3.17. Enzymbindungsimmunoassays (ELISA)

Die löslichen Proteinextrakte sowie die rekombinanten Phagen wurden in dem hoch sensitiven Plattenbindungsassay in ihrer nativen Form funktionell

untersucht. Der Assay wurde in Anlehnung an das Pharmacia-Protokoll auf Nunc Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Versuchsaufbau sah meistens ein Sandwichassay mit dem matrixgebundenen spezifischen und einem POD konjugiertem Detektions-Ak vor.

Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei RT mit dem 1.Ak (5-10 µg/ml) in 100 ml Beschichtungspuffer (s. 2.6.) beschichtet, mit 200 µl 5 % BB-Reagenz 2h bei RT blockiert und mit 100 µl Antigenprobe (lösliches Protein oder Phagensuspension) in verschiedenen Konzentrationen 1,5-2 h inkubiert. Bei dem ersten Waschschrift mussten die Wells 3x mit Waschpuffer (s. 2.6.) gespült werden, wobei bei allen Waschschriften der Mikrotiterplatten-Wellwasher (Denley) benutzt wurde. Bei dem nächsten Schritt wurden die Wells mit dem 1/1000 verdünnten POD konjugierten Detektions-Ak (100 µl) für 1h bei RT im Dunklen inkubiert, um anschließend im zweiten Waschschrift 5x mit Detektionspuffer (s. 2.6.) gespült zu werden. Zur Farbreaktion wurde je eine OPD-Tablette (o-Phenyl-Diamin) von 15 mg (Sigma) in 16,75 ml Detektionspuffer (s. 2.6.) aufgelöst, durch eine 0,45 µm Porengröße gefiltert und mit 1 µl Perhydrol (30% H₂O₂) / 1 mg OPD versetzt. Dieses Substrat wurde mit 100 µl pro Well eingesetzt und die Reaktion nach 15 min mit 100 µl pro Well 3 M HCl gestoppt. Die Extinktionen der Farbreaktionen wurden in einem computergesteuerten Mikrotiterplatten-Photometer (SLT) bei 492 nm gemessen und gegen eine Leerextinktion abgeglichen.

Als Kontrollwerte wurden immer Wells ohne Beschichtungs-Ak, ohne Antigen und Positivkontrollen mit CEA oder einem sicher positiven Protein mitpipettiert. Alle Werte wurden als Doppelbestimmung erhoben und der Mittelwert gebildet, um Pipettierfehler zu erkennen und auszuschließen.

3.17.1. Bindungsassay mit löslichen rekombinanten Proteinen

Nach der T84.66-Beschichtung (s. 3.17.2.), die jedoch mit chimärem T84.66 durchgeführt werden musste, wurde das lösliche rekombinante Protein aufgetragen. Anschließend wurde mit dem murinen α E-tag Ak detektiert und ein α mouse POD Konjugat zur Substratumsetzung gebunden (Abb. 3.2.).

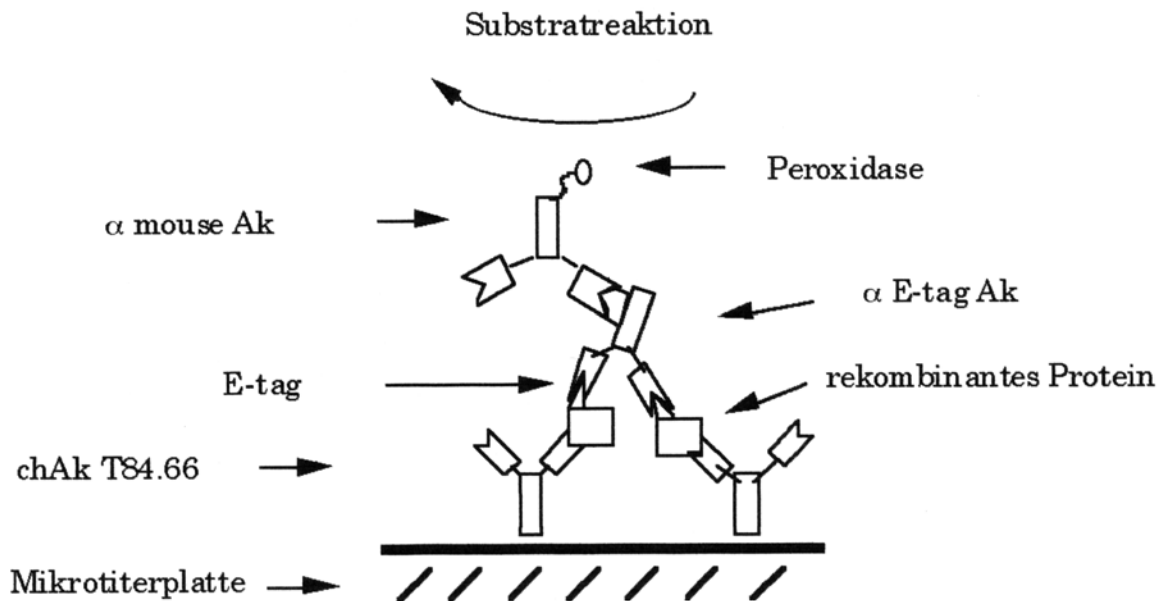


Abb. 3.2.

3.17.2. Bindungsassay mit rekombinanten Phagen

Zu den M13K07-Helferphagen lieferte der Hersteller (Pharmacia) einen hochsensitiven konjugierten α M13 Ak mit, der zur Detektion eingesetzt werden konnte. Die rekombinanten Phagen stellten sich als sehr instabil heraus, so dass sie am Tag der Gewinnung direkt in einen vorbereiteten ELISA-Assay eingesetzt werden mussten. Versuche die Phagen mit Proteinasenhemmern (Aprotinin, EDTA, Pepstatin) zu stabilisieren blieben ohne Verbesserung der Ergebnisse.

Bei dem Assay-Design (s. Abb. 3.3.) wurden die Wells der Mikrotiterplatte (Nunc) zunächst mit dem spezifischen Antikörper Mak T84.66, gegen den das rekombinante Protein getestet werden sollte, in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ beschichtet. Die zweite Lage des Sandwichs wurden die rekombinanten Phagen in einer Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:32), die in dem Blockierungspuffer verdünnt waren, eingesetzt. Als Drittes wurden die gebundenen M13K07-Phagen mit einem α M13K07-Ak, der POD-konjugiert war, detektiert.

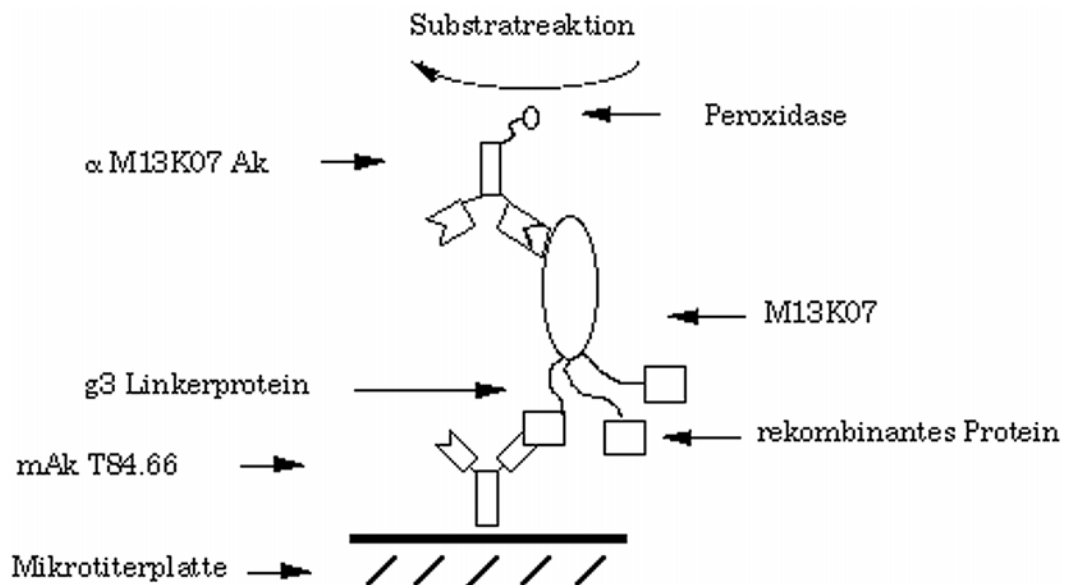


Abb. 3.3.

3.18. Proteinbestimmung nach Bradford

Eine quantitative Proteinbestimmungsmethode stellt der Assay nach Bradford dar. Die Proteinproben mussten 1/5 mit dem Bradford-Reagenz (BioRad) versetzt werden, um dann die Extinktion der Farbreaktion in einer Mikrotiterplatte mit dem Plattenphotometer (SLT), oder auf 1 ml zu verdünnen, um die Proben in dem herkömmlichen Spektrometer (Shimadzu) bei 592 nm zu messen. Zur Konzentrationsberechnung diente eine exakt gleich hergestellte Eichkurve aus bekannten IgG-Konzentrationen für Antikörper-Messungen, oder eine BSA-Verdünnungsreihe für nicht IgG-verwandte Proteine.

3.19. Densitometrische Analyse der Vakuum-Blots

Nachdem der Vakuum-Blot (s. 3.16.2.) mit einem Scanner (Agfa) als PICT-Datei vorliegt, wurde er densitometrisch mit Hilfe des NIH Image 1.61/fat

Programm quantitativ ausgewertet (Rasband und Bright, 1995).

Zunächst wurde die Reihe der Schlitze (je 6 mm²) als Plot dargestellt und ergab eine Kurve, in der die gemessenen Pixel gegen Slotfläche aufgetragen waren. Dieser Plot musste in ein neues Image kopiert, über die Thresholdfunktion in eine binäre Funktion verändert und die Pixels der Achsen auf 260 (y-Achse) bzw. 163/164 (x-Achse) justiert werden. Über die Berechnung der Pixel Aspekt Ratio (PAR) wurde bei der Überführung der Einheiten in mm die Skalenrelation ausgeglichen:

$$\text{Pixel (y260)} \times \frac{164}{260} = \text{Pixel (y163)}$$

$$\frac{\text{Pixel (x)}}{\text{Pixel (y163)}} = \text{PAR}$$

Nun konnte eine Baseline, die das Hintergrundrauschen des Blots ausklammert, gelegt werden. Unter den einzelnen Peaks der Kurve wurde nun das Integral (mean area) in mm² bestimmt, welches dann von Messung zu Messung vergleichbar war.

4. ERGEBNISSE

4.1. 3456 POP: Mutagenese, Klonierung und Sequenzierung

Wie in 3.6.1. beschrieben, wurde als Matrize die cDNA eines CEA A3 rekombinanten E.coli-Stammes von Gaida (1992) gewonnen.

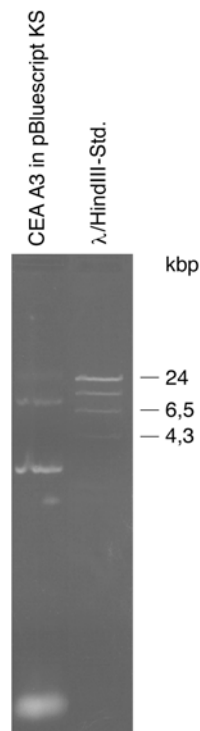


Abb. 4.1. Darstellung der gewonnenen rekombinanten Plasmid-DNA

4.1.1. PCR-Deletionsmutagenese mit 3456 POP

Zur PCR-Deletion wurde zunächst eine Primer-Population mit Hilfe einer teilrandomisierten Nonamernukleinsäure (s. Anhang 1) erstellt, wie in 3.6.4. beschrieben. Die möglichen resultierenden Primer sind schematisch im Anhang 2 (A. 2.3.) dargestellt.

Durch den niedrigen Anteil an bindenden Primern in 3456 POP musste die

Konzentration so hoch wie möglich gewählt und dementsprechend auch die Mg-Konzentration, die in einem Vorversuch auf zusätzliche 1,25 mM MgCl₂ optimiert wurde, angepasst werden (s. 3.6.4.)(Abb. 4.2.).

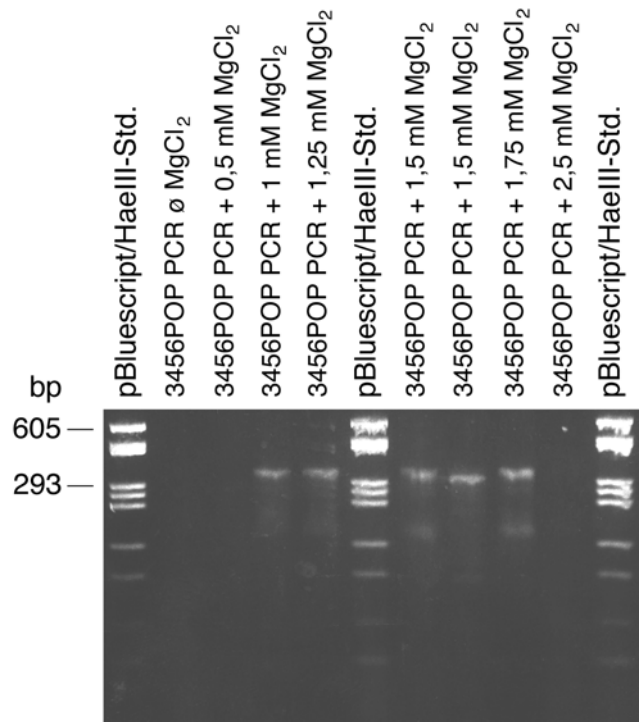


Abb. 4.2.

Die Abbildung zeigt die PCR-Produkte bei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen, wobei der Zusatz von 1,25 mM die kräftigste Bande bei ca 300 bp zeigt und die beste Differenzierung der Banden im kleineren Bereich (200-300 bp).

Das PCR-Produkt (Abb. 4.3.) wurde wie in 3.5. und 3.7.3. beschrieben in den Vektor pCANTAB5E ligiert und mit den Primer R1 und CEA3ACT2 (s. Anhang 1) mit einer Annealing-Temperatur von 60°C, wie in 3.6.1. beschrieben, zur Kontrolle noch einmal amplifiziert (Abb. 4.4.)

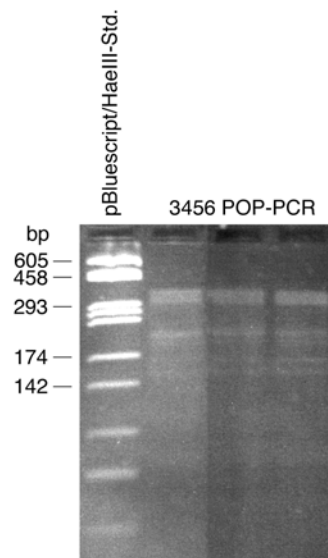


Abb. 4.3. PCR-Produkt mit 3456 POP Primern

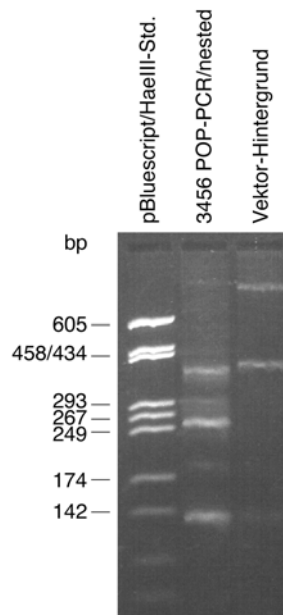


Abb. 4.4. erneut amplifiziertes 3456 POP PCR-Produkt mit einer "nested PCR"

Die Bilder zeigen viele, nicht scharf getrennte DNA-Banden verschiedener Länge mit einem erwarteten Spektrum von etwa 150-350 bp.

4.1.2. Klonierung der 3456 POP-PCR

Das Ligationsprodukt von 4.1.1. wurde wie in 3.9.1. beschrieben in den E.coli Stamm TG-1 (Pharmacia) transformiert. Als Kontrollen wurde zum einen unligierter pCANTAB5E Vektor (Pharmacia) als Vektorhintergrund und zum anderen ein ungeschnittenes pBluescript KS (Stratagene) Plasmid zur Berechnung der Transformationseffizienz (in cfu = "colony forming unit") parallel transformiert.

1 ng des ungeschnittenen Plasmids wurde in 500 µl kompetente Zellen transformiert. Auf einer Platte, auf die 100 µl der transformierten Zellen ausplattiert worden waren, ergab die Koloniezählung 2120 Kolonien.

$$\frac{5 \times 2120 \times 1000}{1} = 1,06 \times 10^7 \text{ cfu/}\mu\text{g DNA}$$

Das Ligat wurde mit 30 µl auf 400 µl kompetente Zellen eingesetzt und ergab 4600 Kolonien auf einer Platte, auf der 50 µl Bakterien ausplattiert worden waren. In der Vektorhintergrund-Kontrolle, die in gleicher Relation eingesetzt wurde, ergaben 100 µl 2400 Kolonien. Die Rekombinanz der Transformation errechnet sich nun wie folgt:

$$1 - \frac{4 \times 2400}{8 \times 4600} = 0,74$$

Das bedeutet eine rechnerische Rekombinanz der transformierten Zellen von 74 %.

4.1.3. Selektionierung der 3456 POP-Klonierung

Die Selektionierung der Population der rekombinanten Kolonien von den nicht Rekombinanten gestaltete sich zunächst problematisch. Das zunächst gewählte Verfahren des "Phage-Panning" (s. 3.13.3.) hätte bei der Verwendung des polyklonalen (pkl) α CEA Ak direkt auf die Funktion des Proteins und das Einsetzen des monoklonalen (mkl) Ak T84.66 sogar auf die Epitopfunktionalität selektiert. Allerdings konnte mit dem Verfahren kein Klon isoliert werden.

Der nächste Versuch basierte auf der Erkennung der Rekombinanz auf Nukleinsäurebasis mit einer radioaktiv markierten DNA Sonde.

Die auf Festmediumplatten gewachsenen Kolonien der Transformation in E.coli TG-1 Zellen (Pharmacia) (s. 4.1.1.) wurden auf rekombinante DNA mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde (CEA A3 Fragmente) wie in 3.10. beschrieben abgeklatscht auf Nitrocellulose-Filtern detektiert. Mit dieser Methode zeigte fast jede Kolonie ein Signal. Die so ausfindig gemachten Klone waren bis auf eine Ausnahme (Klon 8.1) nicht rekombinant.

Nachdem der Primer CEA3ACT2 wie in 3.7.4. beschrieben mit $\gamma^{32}\text{P}$ markiert worden war, wurde dieser als Sonde benutzt bei sonst unverändertem Protokoll (s. 3.10.). Mit den sich auf Röntgenfilm dunkel darstellenden Abbildungen der einzelnen Kolonien wurden durch Übereinanderlegen des Films mit der Masterplatte die vermutlich rekombinanten Kolonien ausfindig gemacht. Auf den vier Filtern zeigten sich 15 Signale (s. Abb. Anhang 3), die Kolonien zugeordnet werden konnten. In der anschließenden Restriktionsanalyse der DNA-Präparation (s. 3.2.1. und 3.7.1.) zeigten zehn von 15 Klonen ein rekombinantes Insert (s. Abb. 4.5.).

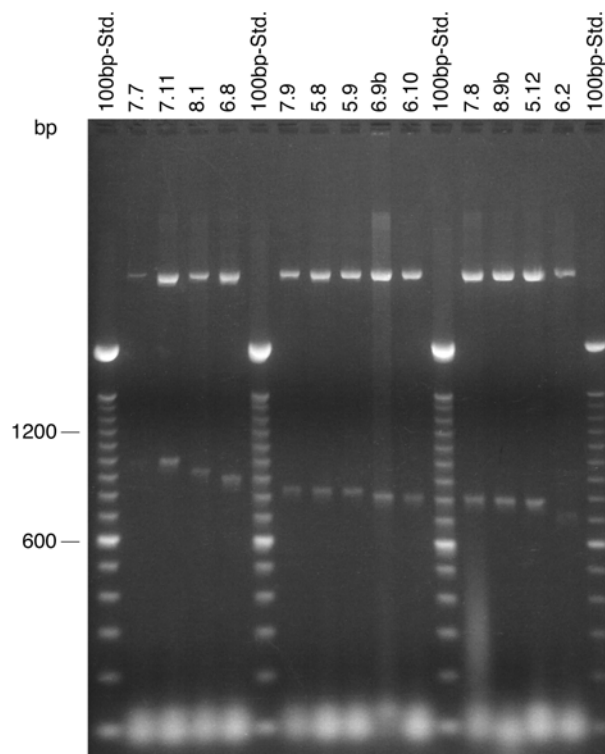


Abb. 4.5. DNA-Plasmid-Präparationen nach einem doppelten Restriktionsverdau

Hier sind die einzelnen rekombinanten DNA-Fragmente im erwarteten Bereich von 750-1000 bp gut zu sehen. Die Proben ohne Fragment (7.7 und 6.2) entsprechen nicht rekombinanten Präparationen.

4.1.4. Sequenzierung der Klone

4.1.4. a) Klone 5.8,5.9,7.9,6.9b,7.8,5.12

Von den (s. 4.1.3.) rekombinanten Klonen wurden Sequenzierungen vom 5'- sowie vom 3'- Ende angesetzt (s. 3.8.1.), die dann von einem Servicelabor (Prof. Richter / Inst. für Zellbiochemie UKE) automatisch ausgewertet wurden. Aus den Sequenzdaten ergab sich, dass viele der rekombinanten Klone nicht in dem richtigen Leserahmen vorlagen und so auch nicht für ein sinnvolles Proteinsyntheseprodukt kodierten. Für die oben angeführten sechs Klone konnte der richtige Leserahmen nachgewiesen werden (s. Anhang 5). Die Sequenzen

zeigten durchgängig eine Mutation (T188C), die zu einem AS Austausch V63A führte, was auf eine Mutation der initial benutzten Matrize zurückzuführen war. Die Nukleinsäurelängen der Inserts zeigten teilweise Übereinstimmungen, so dass drei verschieden lange Peptide kodiert wurden (s. A. 2.2. und A. 2.3.).

Tab.4.1.

<u>DNA-Klone</u>	<u>resultierendes Peptid</u>
5.8, 5.9, 7.9	45PEP93
6.9b, 7.8	50PEP93
5.12	60PEP93

Das resultierende Peptid ist dargestellt wie folgt:

- die erste Zahl steht für die Position der AS in der CEA A3 Proteinsequenz mit der das rekombinante Peptid beginnt
- PEP steht für Peptid
- die zweite Zahl steht für die Position der AS in der CEA A3 Proteinsequenz mit der das rekombinante Peptid endet

4.1.4. b) Klon 8.1

Die automatische Sequenzierung (s. 3.8.1.) des Klons 8.1 zeigte ein unbefriedigendes Ergebnis, so dass dieser Klon, wie in 3.8.2. beschrieben, manuell sequenziert werden musste (s. 3.3.2.). Als Sequenzierungsprimer wurde das Oligonukleotid R2 (s. Anhang 1) verwendet. Das Ergebnis stellte ein Fragment dar, welches im korrekten Leserahmen vorlag (s. Anhang 6). Bis auf die in 4.1.4.a) beschriebene Mutation entsprach es den NS 25 bis 279 der cDNA der CEA A3 Domäne (s. A. 2.2. und A. 2.3.) und kodierte somit für das Peptid 9PEP93 (vgl. Tab. 4.1.).

4.2. Definierte Fragmente CT2NA1, CT2NA2, CT2NA3, C12NA1, C13NA1, C12NA2: Mutagenese, Klonierung und Sequenzierung

Neben dem unter 4.1. geschildertem System wurden auch definierte Deletionen eingeführt (s. 3.6. und A. 2.1.).

Mit den Primern CEA3ACT2 und CEA3ANA1 (s. Anhang 1) wurde das CEA A3 Fragment amplifiziert (Abb. 4.6.) und in den Vektor pCRTMII (Invitrogen) ligiert, in dem es als Matrize für die anschließende Deletionsmutagenese diente. Das sauber zur Darstellung kommende PCR-Produkt liegt im passenden Größenbereich (Abb. 4.6.).

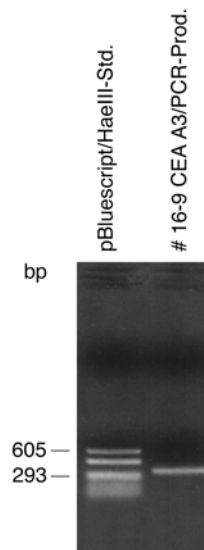


Abb. 4.6. CT2NA1 PCR-Produkt

4.2.1. PCR-Deletionsmutagenese mit definierten Primern

Die PCR wurde wie in 3.6.1. beschrieben durchgeführt und auf Agarosegelen (s. 3.3.) analysiert (Abb. 4.7./4.8./4.9./4.10.). Die PCR des Fragmentes CT2NA1 wurde erneut durchgeführt, um im Vergleich mit den anderen Fragmenten keinen methodischen Unterschied zu produzieren.

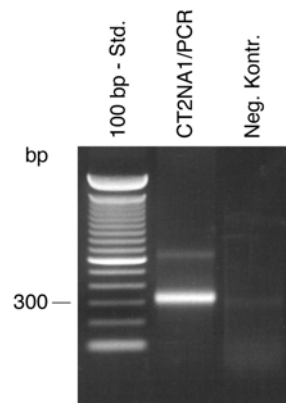


Abb. 4.7. CT2NA1 PCR-Produkt

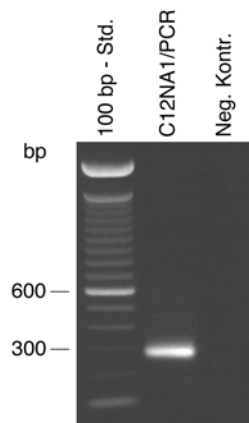


Abb. 4.8. C12NA1 PCR-Produkt

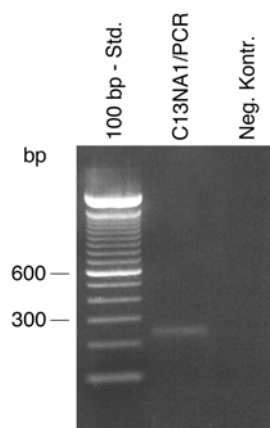


Abb. 4.9. C13NA1 PCR-Produkt

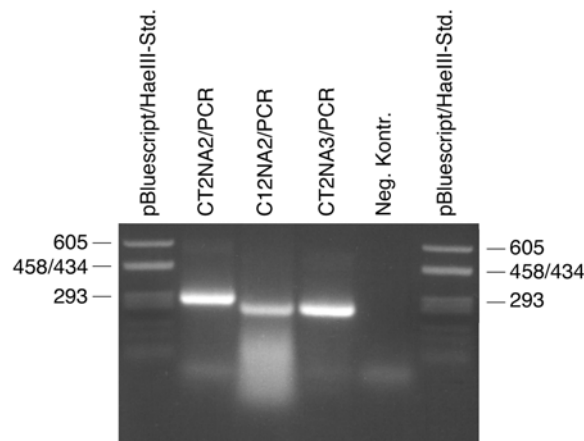


Abb. 4.10. PCR-Produkte CT2NA2, C12NA2, CT2NA3

Bis auf C13NA1 konnten kräftige Signale erreicht werden, die alle in den berechneten Größenbereichen lagen.

Die jeweiligen PCR-Produkte wurden zunächst in den pCRTMII Vektor (Invitrogen) ligiert (s. 3.7.2.) und in kompetenten OneShotTM E. coli Bakterien (Invitrogen) nach Herstellerangaben transformiert. Die rekombinanten Kolonien konnten aufgrund ihrer weißen Farbe von den nicht rekombinanten (blau) unterschieden werden. Nach dem Kultivieren und der Präparation einer monoklonalen Bakterienkultur (s. 3.2.), konnte mit einem doppelten Restriktionsverdau (s. 3.7.1.) mit den Endonukleasen Sfi I und Not I der rekombinante DNA-Abschnitt herausgetrennt werden und auf einem Agarosegel (1%) dargestellt werden (Abb. 4.11.).

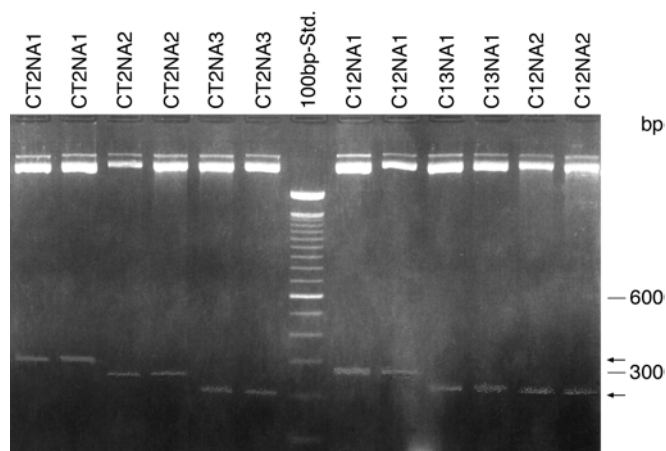


Abb. 4.11. rekombinante Plasmid-DNA nach einem doppelten Restriktionsverdau

Die rekombinanten Fragmente sind schwach sichtbar. Die Klone zeigen alle ein rekombinantes Fragment mit Längen in dem erwarteten Bereich von 200-300 bp (Pfeile).

4.2.2. Vektorpräparation von pCANTAB5E

Aus Kostengründen wurde der Vektor pCANTAB5E mit einem Probeinsert kloniert und präpariert (s. 3.2.3. und 3.2.5)

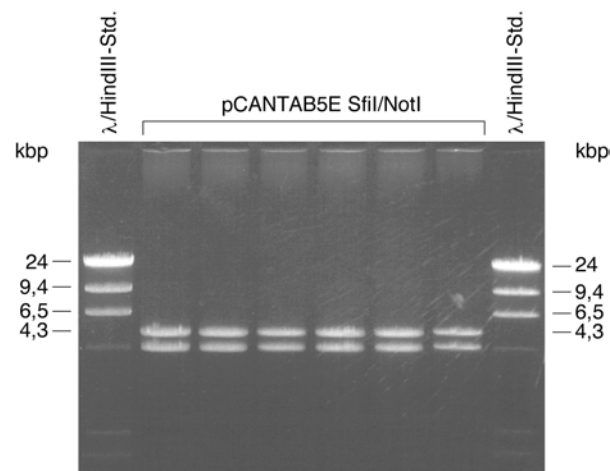


Abb. 4.12. Vektor pCANTAB5E nach doppeltem Restriktionsverdau mit Sfi I und Not I Endonukleasen

Es zeigen sich zwei kräftige, gut voneinander getrennte Banden, wobei die obere den linearisierten Vektor, die untere den doppelt verdauten Vektor, der das Probeinsert komplett verloren hat, darstellt. Durch die saubere Trennung gelingt eine kontaminationsfreie Gelexzision der unteren Bande.

4.2.3. Klonierung der definierten Deletionsmutanten in E.coli

Nachdem die Fragmente aus dem Gel exzidiert und nach dem Qiagen-Protokoll (s. 3.2.6.) herausgelöst worden waren, konnten sie in den mit Sfi I und Not

I vorgeschnittenen Vektor (s. 3.2.5.) pCANTAB5E (Pharmacia) (Abb. 4.12.) kohäsiv ligiert werden (s. 3.7.3.). Das Ligat wurde per Elektroporation (s. 3.9.3.) in XL-1 Blue transformiert (s. 3.9.2.). Die Transformationseffizienz und die Rekombinanzrate waren mit denen der "One-Step-Transformation" (s. 4.1.2. und 3.9.1.) vergleichbar. Die ungeschnittenen Plasmide einer DNA-Präparation (s. 3.2.1.) wurde zusätzlich andere E. coli Stämme (s. 2.2.2.) mit dem "One-Step Transformation" (s. 3.9.1.) Verfahren umtransformiert. Bei den Transformationen mit ungeschnittenem Plasmid war die Rekombinanzrate "per definitionem" 100% und die Transformationseffizienz der in 4.1.2. vergleichbar.

4.2.4. Selektionierung der Klonierungen

In dem pCRTMII System, in "One Shot" Zellen (Invitrogen) klonierte rekombinante DNA der definierten Fragmente, zeigten alle rekombinanten Klone durch die lacZ Funktion weißen Kolonien.

Die in pCANTAB5E (Pharmacia) ligierten Fragmente konnten identifiziert werden, in dem die nach der Transformation gewachsenen Kolonien (s. 4.2.3.), wie in 3.11. beschrieben, per „Filterlift“ auf ihre rekombinante Proteinexpression untersucht wurden (s. Abb. Anhang 4). Bei dem "Filterlift" wurde für jedes der sechs untersuchten Fragmente eine einzelne Membran angefertigt. Einzeln stehende Kolonien wurden monoklonal gepickt und zur Sequenzierung bzw. Proteinexpression in Glycerolstocks aufbewahrt (s. 3.1.5.)

4.2.5. Sequenzierung der sechs definierten Fragmente

Die Sequenzierungen (s. Anhang 7) erfolgten nach der automatischen Methode (s. 3.8.1.) und entsprachen der antizipierten Sequenz (s. Anhang 2) bis auf einige einzelne Mutationen. Eine Mutation (Austausch zweier AS, die an Stelle 80 M statt S einbauen (NS 237-240 Triplet AGT zu ATG)), welche anhand der Sequenzierung retrospektiv in dem Primer CEA3AC12 (s. Anhang 1) gefunden

wurde, verkürzte die Analogie der NS-Sequenz der betroffenen Klone (C12NA1 und C12NA2) am 3'-Ende um 6 bp und der Peptidsequenz um 2 AS. Eine weitere Punktmutation in C12NA2 an AS 19 von D zu H (NS 60 C statt G), so daß für dieses Peptid eine durchgehende Homologie von AS 20 bis 79 bestand. Im Klon C12NA1 zeigte sich eine zweite Punktmutation an AS 2 M für L (NS 4 A für C), so dass sich die Homologie auf AS 3 bis 79 beschränkte (vgl. A. 2.1. und A. 2.2.).

Daraus folgt die Peptidhomologie der Klone:

Tab. 4.2.

Klonbezeichnung	weitere Bezeichnungen	homologe Peptidsequenz
CT2NA1	A / A+1 / A+2	1PEP93
CT2NA2	B / B+1	17PEP93
CT2NA3	C / C+1 / C+2	31PEP93
C12NA1	D / D+1 / D+2	3PEP79
C13NA1	E / E+1 / E+2	1PEP66
C12NA2	F / F+1 / F+2	20PEP79

Das resultierende Peptid ist dargestellt wie folgt:

- die erste Zahl steht für die Position der AS in der CEA A3 Proteinsequenz mit der das rekombinante Peptid beginnt
- PEP steht für Peptid
- die zweite Zahl steht für die Position der AS in der CEA A3 Proteinsequenz mit der das rekombinante Peptid endet

4.3. Immunoblot-Analyse

4.3.1. Expression der POP-Klon-Peptide und ELISA

Das resultierende Peptid der rekombinanten Klone, die im richtigen Leserahmen sequenziert worden waren (s. 4.1.4.), konnten auf der Phagenoberfläche des Helferphagen M13K07 (Pharmacia) wie in 3.13.1 und 3.13.2. beschrieben in nativer Form exprimiert werden, wenn sie in E.coli TG-1 vorlagen, die das "amber stop"-Kodon des pCANTAB5E Vektors (Pharmacia) mit ihrer supE Funktion überlesen konnten.

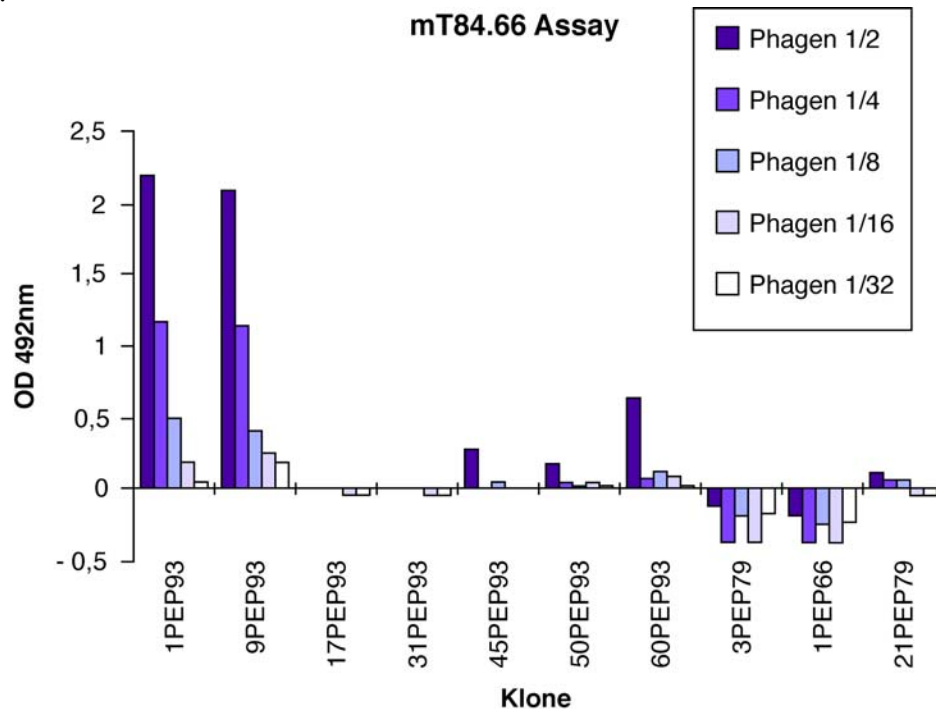
Nach der Phagenernte mussten die rekombinanten Phagen sofort in einen vorbereiteten Assay (s. 4.3.1.) eingesetzt werden, da sie nur über etwa 48 Stunden Lagerung (4°C) stabil blieben. Ergebnisse in den Bindungsassays konnten mit der selben Phagenernte in einem späteren Assay nicht reproduziert werden.

Einen Versuch der Stabilisierung der rekombinanten Phagen mit Hilfe der Proteinaseinhibitoren Aprotinin, EDTA und Pepstatin A in verschiedenen Konzentrationen ergab keine Änderung der Degeneration. Auch eine Verlängerung der Präsentation des rekombinanten Proteins konnte nicht erreicht werden (Experimente der Zeitreihen nicht gezeigt).

Die über die 3456 POP Primer entstandenen rekombinanten Peptide ließen sich nur im Phagendisplay untersuchen, da ihnen die Proteinase-Schnittstelle wie für die Pectat Lyase (s. 3.12.2.) fehlte.

Die ELISA-Assays des Phagendisplays wurden wie in 3.17.2. beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse des Assays (s. Diagr. 4.1.) wurden als Mittelwerte einer Doppelbestimmung erstellt, nachdem Leerextinktion und Hintergrund (Signal ohne Helferphagen) abgezogen worden waren.

Diagr. 4.1.



Die Klone 1PEP93, d.h. die komplette CEA A3 Domäne, und 9PEP93 zeigten eindeutig positive Bindungsergebnisse zu dem Mak T84.66, die auch in der Verdünnungsreihe entsprechend abnahmen und reproduziert werden konnten und somit als spezifisch zu werten sind. Vergleichbar verhielt sich die Positivkontrolle mit CEA, welches jedoch mit einem anderen 2.Ak detektiert werden musste.

Alle übrigen Klone zeigten kein eindeutig positives Ergebnis. Bei den Klonen 45PEP93 und 50PEP93 konnte in der 1/2 Verdünnung ein leicht positives Signal abgelesen werden, wobei diese in Relation zu dem Hintergrundsignal klein waren ("Peak-Noise-Ratio"< 1). Der Peak des Klones 60PEP93 ist in der 1/2 Verdünnung eindeutig positiv, jedoch reduziert er sich nicht gemäß der Verdünnungsreihe und konnte nicht reproduziert werden.

4.3.2. Definierte Peptide

4.3.2. a) Expression als lösliches und unlösliches Protein

Wie in 3.12. beschrieben konnten die primerdefinierten Fragmente, da sie die Proteinase-Schnittstelle wie für Pectat Lyase enthielten (s. 3.12.2.), als lösliches Protein exprimiert werden. Entsprechend 4.2.3. wurden die rekombinanten Plasmide in E.coli Stämme (z.B. HB 2151, N 4830-1, KS474) umtransformiert, die eine bessere Proteinexpression als TG-1 versprachen. Bei der Bakterienexpression werden die Proteine meistens in das Periplasma abgegeben. Abhängig von dem rekombinanten Peptid verbleiben die exprimierten Proteine aber auch löslich im Zytoplasma oder werden bei Unlöslichkeit in intrazelluläre Kompartimente, sogenannte „inclusion bodies“, verpackt.

Zunächst wurde, wie in den Herstellerangaben empfohlen und wie in 3.12.1. und 3.12.2. beschrieben, das bakterielle Periplasma extrahiert sowie das gesamte lösliche Protein der Zellen (LCE) gewonnen. Die Extrakte wurden mit dem murinen α E-tag Ak in einem Westernblot als Vakuum-Dot-Blot Verfahren (s. 3.16.2.) auf rekombinantes Protein untersucht (s. Abb. 4.13.). Da in diesen Zellkompartimenten nicht für alle Klone (besonders B+1 und C+2) eine ausreichende Expression nachgewiesen werden konnte, wurde zudem auch das Debris der extrahierten Zellen (ZD), welches die unlöslichen Bestandteile enthielt untersucht (s. Abb. 4.14.).

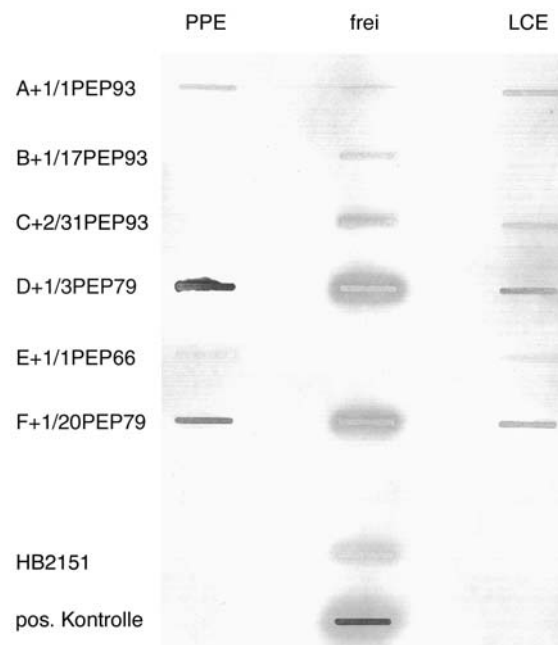


Abb. 4.13. Vakuum-Dot-Blot der löslichen Extrakte (ungereinigt)

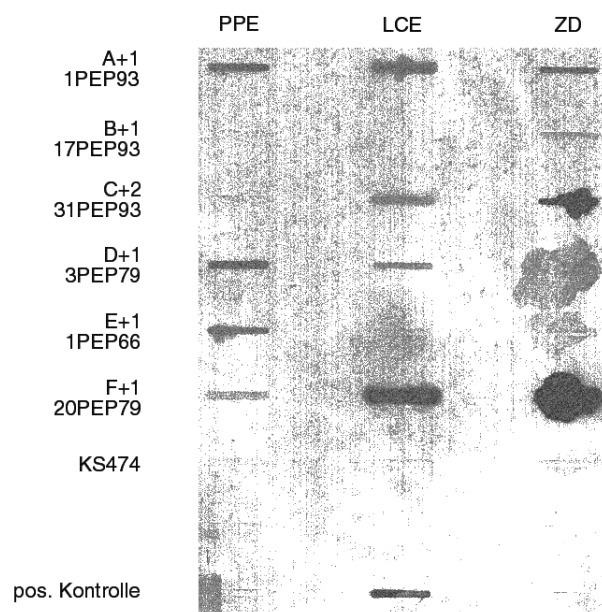


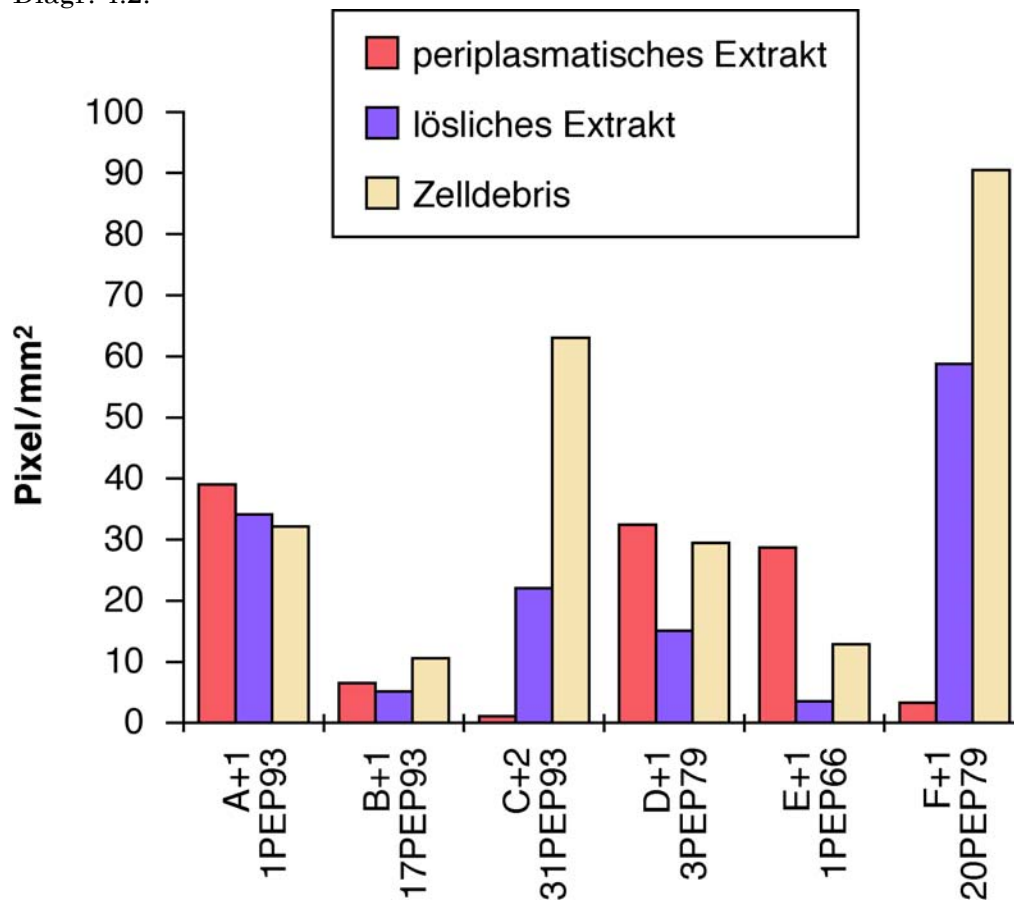
Abb. 4.14. Vakuum-Dot-Blot löslicher und unlöslicher Extrakte (ungereinigt)

Legende : zur Bezeichnung der Klone siehe Tab. 4.2.
 (zu Abb. 4.13. und 4.14.) PPE = periplasmatisches Extrakt (s. 3.12.2.)
 (50 µl Probe entsprechen 1ml Suspensionskultur)
 LCE = lösliches zelluläres Extrakt (s. 3.12.3.)
 (50 µl Probe entsprechen 2,5 ml Suspensionskultur)
 ZD = Zelldebris nach LCE (s. 3.12.3.)
 (50 µl Probe entsprechen 2,5 ml Suspensionskultur)
 pos. Kontrolle: Ein α E-tag positives Protein
 (scFv-Fragment)

In der Datenanalyse (s. 3.19.), wurden die Negativkontrollen (KS474-Hintergrund sowie das Signal ohne α E-tag Ak (nicht abgebildet)) von den Signalen subtrahiert. Das Signal in Pixel über den 6 mm² messenden Slots wurde in einer zweidimensionalen Kurve dargestellt. Für jedes Signal wurde das Integral berechnet (Fläche unter der Kurve) und als Zahlenwert in Pixel/mm² ausgedrückt.

Es zeigte sich für den in Abb. 4.14. dargestellten Vakuum-Blot folgende Verteilung:

Diagr. 4.2.



Legende: Y-Achse zeigt die Signalstärke in Pixel/mm²
 (entspricht der Fläche unter der Kurve/Integral)
 PPE = periplasmatisches Extrakt
 LCE = lösliches zelluläres Extrakt
 ZD = Zelldebris nach LCE

Unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass das PPE vor dem LCE und vor dem ZD das rekombinante Protein am saubersten, d.h. mit am wenigsten verunreinigenden anderen Proteinen, enthielt, wurden die Extrakte der einzelnen Klone für die Funktionsanalysen ausgesucht. Der Klon A+1 zeigt eine ähnlich gute Expression in allen Extrakten, so dass mit dem PPE weitergearbeitet wurde. Der Klon B+1 wurde insgesamt schlecht exprimiert, so dass das beste Expressionsergebnis im ZD für die Entscheidung ausschlaggebend war, um

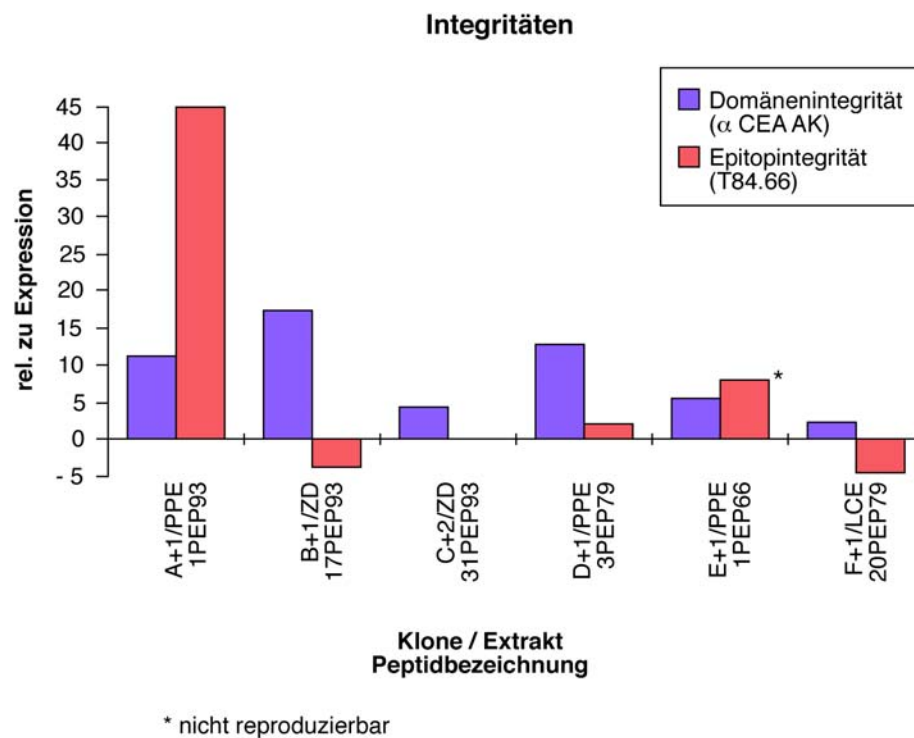
überhaupt ein Signal zu erhalten. Bei dem Klon C+2 zeigte sich das Signal im ZD deutlich überlegen, so dass auch hier damit weitergearbeitet wurde. Der Klon D+1 reagierte im PPE und ZD ähnlich stark, so dass die sauberere Expressionsmethode im PPE den Ausschlag gab. Der Klon E+1 zeigte im PPE das deutlich beste Signal, wodurch kein anderes Extrakt in Frage kam. Von dem Klon F+1 wurde das LCE weiterverwandt, obwohl das ZD das höhere Signal zeigte. Das LCE-Signal war jedoch auch ausreichend gut und versprach eine höhere Qualität des Extraktes.

4.3.2. b) Funktionsanalyse der Proteinextrakte

Die ausgewählten Extrakte (s. 4.3.2. a)) wurden in Vakuum-Dot-Blots eingesetzt und mit dem Mak T84.66 sowie mit einem polyklonale α CEA Ak untersucht (Abbildungen s. Anhang 10). Die Vakuum-Dot-Blots wurden wie in 3.16.2. angegeben angefertigt. Die Banden wurden analog zu 4.3.2. a) ausgewertet. Dabei wurden die erhaltenen Signale um den unspezifischen Hintergrund korrigiert (nicht abgebildet) und zu der relativen Expressionsleistung der einzelnen Klone zum A+1 Klon (s. 4.3.2. a)) ins Verhältnis gesetzt (vgl. Tabelle in Anhang 8).

Es ergibt sich folgendes Diagramm 4.3.:

Diagr. 4.3.



Zu ersehen ist aus der Domänenintegrität, daß je kürzer das Peptid, desto kleiner die Integrität, d.h. desto weniger repräsentiert das Peptid die CEA A3 Domäne. Aus der Epitopintegrität geht hervor, dass außer dem Klon A+1 (1PEP93), der die komplette CEA A3 Domäne umfasst, kein anderer der untersuchten Klone das Epitop des Mak T84.66 repräsentiert.

4.3.2. c) elektrophoretische Auftrennung der Proteinextrakte

Die Proteine wurden in einem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.15.1), um anschließend mit dem Elektroblob-Verfahren (s. 3.16.1) auf eine Nitrocellulosemembran überführt zu werden. Anschließend wurden die Membranen wie in 3.16.3. beschrieben behandelt.

Durch die Auftrennung der Proteine in dem SDS-haltigen PAA-Gel, lagen die Proteine in denaturierter Form vor.

Die Abb. 4.15. zeigt die Auftrennung der PPE der definierten Klone, die über ein Sandwichassay mit murinem α E-tag Ak und einem α mouse-POD Ak angefärbt

worden sind.

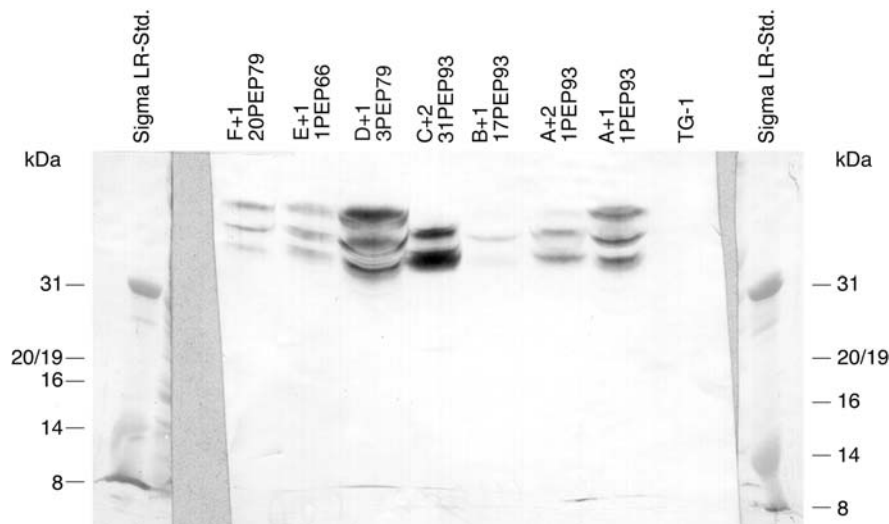


Abb. 4.15. Westernblot der PPE (ungereinigt) und α E-tag-Detektion
(jeweils 16 μ l Extrakt aus 0,32 ml Suspensionskultur und 4 μ l 5fach Ladepuffer)

Der Westernblot zeigte positive Signale für alle untersuchten Klone und kein Signal des Leerextraktes von TG-1 Zellen. Das Gros der angefärbten Proteine war für das berechnete Gewicht der rekombinanten Proteine viel zu schwer und entsprach am ehesten dem rekombinanten Protein, das an das g3-Linkerprotein gebunden vorliegt, da die hier für die Expression verwendeten TG-1 Zellen mit ihrer supE Funktion zum großen Teil das "amber-stop" Kodon des Vektors pCANTAB5E (Pharmacia) überlesen (Proteinfärbung der Extrakte s. Anhang 11).

Zum Teil wurden die rekombinanten Proteine auch ohne das g3-Protein exprimiert und stellen sich als teilweise sehr schwache Bande etwa zwischen 8 und 9 kD bei allen Klonen dar. Eine präzise Größencharakterisierung ist in dieser Abbildung für diesen Bereich nicht möglich. Der Blot zeigt, dass die rekombinanten Peptide allein und als g3-Fusionsprotein exprimiert werden.

Das Molekulargewicht für die Peptide der einzelnen Klone errechnet sich aus der Peptidlänge (110 Da/AS)(s. Tab. 4.3.).

Tab. 4.3.

Klon	Peptid	Molekulargew. in kD
A+1	1PEP93	10,2
B+1	17PEP93	8,5
C+2	31PEP93	6,9
D+1	3PEP79	8,5
E+1	1PEP66	7,3
F+1	20PEP79	6,6

Dazu muss man bei dem Laufverhalten in der PAGE noch die Expression des E-tag berücksichtigen, der aus 13 AS gebildet wird und dementsprechend das jeweilige Molekulargewicht um 1,4 kD erhöht.

In den Abb. 4.16. und 4.17. sind zwei Chemilumineszenz-Blots abgebildet. Als 1. Ak wurde in Abb. 4.16. der polyklonale murine α CEA Ak und in Abb. 4.17. der murine Mak T84.66 verwendet, die beide mit einem α mouse POD-Konjugat detektiert wurden.

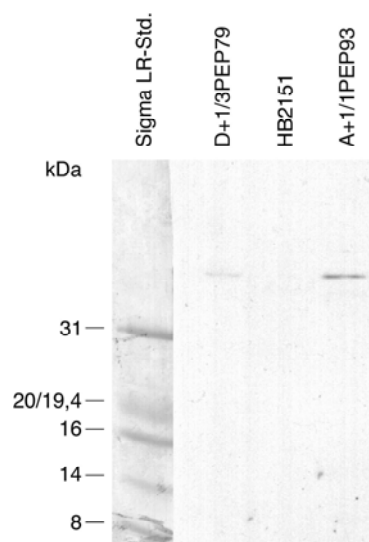


Abb. 4.16. Chemilumineszenz-entwickelter Westernblot des PPE (ungereinigt) mit polyklonaler α CEA Ak Detektion (jeweils 16 μ l Extrakt aus 0,32ml Suspensionskultur)

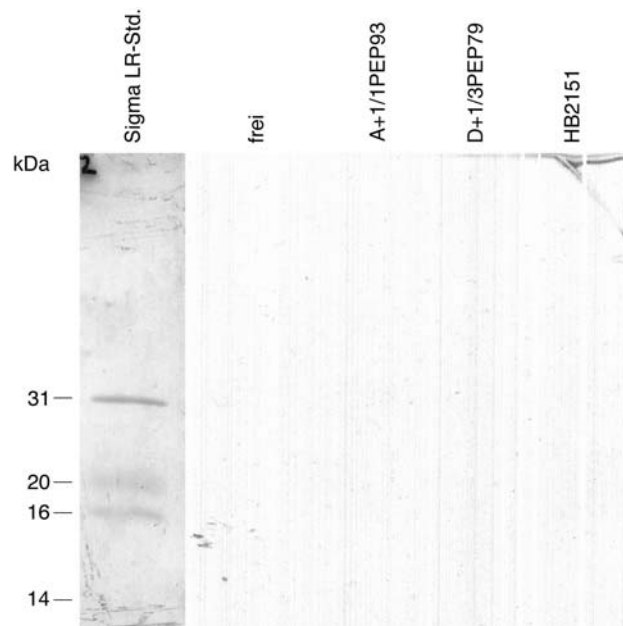


Abb. 4.17. Chemilumineszenz-entwickelter Westernblot des PPE (ungereinigt) mit monoklonaler Mak T84.66 Detektion (jeweils 16 µl Extrakt aus 0,32 ml Suspensionskultur)

Man kann erkennen, dass bei den beiden untersuchten Klonen A+1 (1PEP93) und D+1 (3PEP79) mit dem polyklonalen α CEA Ak spezifisch nachweisbar sind. Das Signal ist bei > 31 kD, also in Verbindung mit dem g3-Linkerpeptid, zu sehen und weder in dem HB2151 Leerextrakt, noch in der Kontrolle ohne 1. Ak (nicht abgebildet) nachvollziehbar. Der zu CEA hochaffine Mak T84.66 zeigte keine Bindung zu der Proteinbande. Daraus geht hervor, dass exprimierte CEA-Epitope detektierbar sind, jedoch das T84.66-Epitop nicht nachweisbar ist.

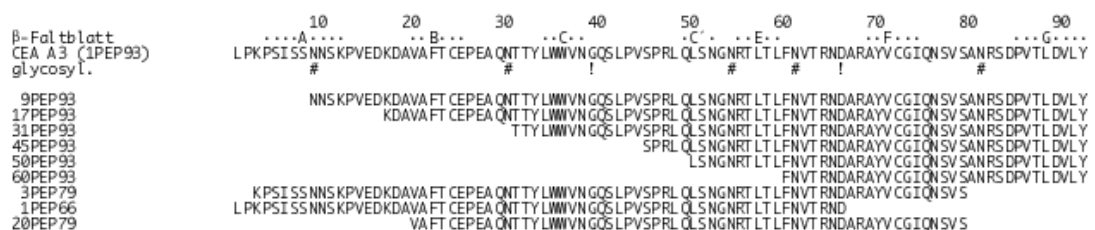


Abb. 4.18. Multiples Alignment der untersuchten CEA A3-Mutanten (#= Glycosylierung der nativen CEA-Domänen; != Glycosylierung der nativen CEA-Domänen ausser CEA A3)

4.4. Ergebnisübersicht

Tab. 4.4.

Peptide	System	α E-tag Ak	pkl α CEA Ak	T84.66 Ak
1PEP93	ELISA mit Peptiden im Phagendisplay	n.u.	n.u.	+
9PEP93		n.u.	n.u.	+
17PEP93		n.u.	n.u.	-
31PEP93		n.u.	n.u.	-
45PEP93		n.u.	n.u.	-
50PEP93		n.u.	n.u.	-
60PEP93		n.u.	n.u.	-
3PEP79		n.u.	n.u.	-
1PEP66		n.u.	n.u.	-
20PEP79		n.u.	n.u.	-
1PEP93	Vakuum-Dot-Blot	+	+	+
17PEP93		+	+	-
31PEP93		+	+	-
3PEP79		+	+	-
1PEP66		+	+	-
20PEP79		+	+	-
1PEP93	Westernblot	+	n.u.	n.u.
17PEP93		+	n.u.	n.u.
31PEP93		+	n.u.	n.u.
3PEP79		+	n.u.	n.u.
1PEP66		+	n.u.	n.u.
20PEP79		+	n.u.	n.u.
1PEP93	Chemilumineszenz- blot	n.u.	+	-
3PEP79		n.u.	+	-

Legende : n.u. : nicht untersucht
 + : spezifisches positives Signal
 - : negatives Signal
 Peptide: XPEPY
 X : erste AS in CEA 3A-Sequenz
 Y : letzte AS in der CEA 3A-Sequenz
 PEP : Peptid

5. DISKUSSION

In der Arbeit wurden Fusionsproteine der immunglobulinartigen Domäne des Carcinoembryonalen Antigens konstruiert und hergestellt. Die rekombinanten Peptide konnten zum einen „löslich“ an ein Signalpeptid gekoppelt exprimiert, zum anderen im Zusammenhang mit einem Linkerpeptid als „Phagendisplay“ präsentiert werden.

Die Expression der Peptide auf der Phagenoberfläche und deren immunologische Aktivität konnte in ELISA-Untersuchungen nachgewiesen werden (s. 4.3.1., Diagr. 4.1.). Der Nachweis der Expression der „löslichen“ Peptide gelang mit Hilfe des E-tag Signalpeptids als Vakuum-Dot-Blot (s. 4.3.2.a), Diagr. 4.2.). Hierbei zeigte die Expression in verschiedenen Zellkompartimenten, dass die Peptide wahrscheinlich aufgrund von Faltungsproblemen in der E.coli-Expression zum Teil wasserunlöslich in „inclusion-bodies“ abgelegt wurden.

Es gelang das Epitop des Mak T84.66 in zwei Peptiden als Phagendisplay mittels ELISA zu charakterisieren (Diagr. 4.1.). Die T84.66 positiven Klone waren in einer Verdünnungsreihe reproduzierbar zu titrieren. Als kleinstes T84.66-bindendes rekombinantes Peptid fand sich der Klon 8.1 (9PEP93); eine N-terminal um 8 AS deletierte, 85 AS umfassende Mutante.

In den Untersuchungen der „löslichen“ Peptide zeigte sich ausschließlich für das Peptid 1PEP93, welches die gesamte CEA 3A Domäne abbildet, eine positive Reaktion mit T84.66 im Vakuum-Dot-Blot (9PEP93 konnte nicht untersucht werden). Allerdings konnte für alle untersuchten Peptide mit einem polyklonalen α CEA Ak das Vorliegen von CEA-Epitopen nachgewiesen werden, wobei das Signal entsprechend der Peptidlänge abnahm (s. 4.3.2.b), Diagr. 4.3.). In den Untersuchungen nach elektrophoretischer Auftrennung konnte die Expression der Peptide in einem Westernblot nachgewiesen werden (s. 4.3.2.c), Abb.4.15.). Exemplarisch zeigte sich für die Peptide 1PEP93 und 3PEP79 ein spezifisches Signal für den polyklonalen α CEA Ak im Chemilumineszenzblot, was eine

immunologische Aktivität der Peptide beweist. Nach der denaturierenden SDS-PAGE ging das Epitop für T84.66 auch für das Peptid 1PEP93 verloren.

Die löslich produzierten Peptide zeigten in dem ELISA keine Signale, was möglicherweise an einer sterischen Behinderung in dem Assay liegt. An dem relativ kleinen Peptid müssen zwei Ak binden, dessen Bindungsstellen womöglich direkt benachbart liegen, damit es zu einer Farbreaktion kommt (vgl. Abb. 3.2.). Das E-tag Signalpeptid (13 AS) ist am C-terminalen Ende der jeweiligen Deletionsmutanten angeknüpft, an dem auch die Bindungsstelle des T84.66 Ak vermutet wird (s. 1.4.). Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 3.3. schematisch die relativ große Distanz der Ak Mak T84.66 und α M13KO7 Ak bei der Bindung an den Helferphagen im Phagenassay, in dem ein spezifisches Signal auf T84.66 erzielt werden konnte. Die relative Molekülmasse eines Ak vom IgG-Typ beträgt etwa 150 000, während das lösliche Peptid 1PEP93 nur eine relative Molekülmasse von 25 000 umfasst, wodurch die Relationen der molekularen Strukturen deutlich werden. Dagegen wartet der Helferphage mit den Abmessungen 895 x 9 nm auf und die Ak-Bindungsstellen stehen sich im Phagenassay der Länge nach gegenüber, so dass sterische Behinderungen der Ak keine Rolle spielen.

Eine mögliche sterische Interaktion könnte auch von einer Assoziation des Signalpeptids an das größere rekombinante Peptid ausgehen. Bei einer solcher intermolekularen Bindung wäre der E-tag durch den α E-tag Ak nicht mehr zu detektieren.

Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Reaktion der „löslichen“ Proteine im ELISA ist eine fehlende oder fehlerhafte Faltung der Peptide, wobei das Epitop verloren geht. Die Peptide haben in Verbindung mit dem g3-Linkerprotein des Phagendisplays die Möglichkeit einer kooperativen Faltung. Die Faltung kurzer rekombinanter Peptide findet zum Teil nicht korrekt statt, wobei sich intermolekulare Komplexe zwischen den einzelnen Peptiden bilden können. In Verbindung mit einem großen Protein, welches sich korrekt faltet, kann das Peptid

auch zu einer korrekten Faltung und so zu einer immunologischen Aktivität kommen (Stahl und Nygren, 1997).

Die Faltungsprobleme der löslichen Proteine im ELISA (s.o.) könnten außerdem für ein primäres Faltungsproblem des *E. coli* Expressionssystems sprechen (Buchner und Rudolph, 1991). Dies führt, besonders bei cysteinhaltigen Peptiden, meistens zu einer Bildung von Einschlußkörpern ("inclusion-bodies") und kann für die Klone B+1 (17PEP93) und C+2 (31PEP93), die vor allem in die unlösliche Bakterienfraktion exprimierten, angenommen werden (s. 4.3.2.a), Diagr. 4.2.). Ein primäres Faltungsproblem scheint bei längeren N-terminalen Deletionen der Domäne demnach möglich. Für die Expression der Gesamtdomäne in Klon A+1 (1PEP93), dessen lösliches Protein in der Vakuum-Blot Analyse ein epitopspezifisches Signal zeigte (s. 4.3.2.b), Diagr. 4.3.), kann die primäre Faltungsproblematik keine Rolle spielen.

Das rekombinante Peptid 1PEP93 zeigte als einziges neben der Domänenintegrität auch eine Epitopintegrität (s. 4.3.2.b), Diagr. 4.3.; Tab. A. 8.). Der polyklonale α CEA Ak geht aus einer Serumreaktion einer Kaninchenimmunisierung mit CEA hervor, so dass die entstandene Ak Population die gesamte Moleküloberfläche des nativen CEA komplementär abbildet. Je kleiner die relative Oberfläche des Domänenfragmentes im Vergleich zu der hier gewählten Referenz, der CEA A3 Domäne, desto kleiner ist sein immunologischer Anteil an der Domäne, desto schwächer fällt das Signal in einem Assay gegen den polyklonalen α -CEA Ak aus. Die Relation findet sich in dem Ausdruck der Domänenintegrität, also dem Anteil an der Gesamtdomäne CEA A3, wieder.

Die Domänenintegrität konnte in dieser Berechnung zeigen (Diagr. 4.3.), wie, entsprechend der Verkürzung der Peptide, das Signal gegenüber dem polyklonalen α CEA Ak abnahm, und so weniger der immunogenen Oberfläche des CEA Moleküls repräsentierte. Die Signale wurden in Relation mit ihrer jeweiligen Expressionsleistung gesetzt und waren so untereinander vergleichbar (Anhang 8). Die Blot-Signale wurden densitometrisch quantifiziert (s. 3.19.).

Die Epitopintegrität stellt die entsprechende Relation zu dem von dem Mak T84.66 erkannten spezifischen CEA-Epitop auf der CEA A3 Domäne dar. Bei einer nur geringfügigen Veränderung des Epitopes durch die Mutagenese würde man eine Bindung des Ak mit einer weniger hohen Affinität erwarten und somit ein schwächeres, aber kein ausgelöschtes Signal in einem Bindungsassay. Entsprechend der Domänenintegrität wurde hier das T84.66 Signal abzüglich des Leerextrakt-Signals durch die relative Expressionsleistung dividiert.

In den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zeigte neben dem A+1 Klon (1PEP93) lediglich der E+1 Klon (1PEP66) in der Berechnung des Vakuum-Blots ein kleines Signal für die Epitopintegrität. Das E+1-Signal konnte jedoch in Vakuum-Dot-Blot Kontrolluntersuchungen nicht reproduziert werden und fand auch im Phagen-ELISA keine Bestätigung. Eine wahre Epitopintegrität konnte demnach für keinen außer dem A+1 Klon nachgewiesen werden.

In den Vakuum-Dot-Blot Assays wird das Protein in nativer Form, membrangebunden getestet. Hier konnte der 8.1 Klon nicht untersucht werden, da er nicht mit der notwendigen pelB-Signal Sequenz ausgestattet war und so nicht löslich exprimiert werden konnte. Für die Proteinfaltung hat, nach den kinetischen Analysen von Jennings (1991), der in den 3456 POP-Klonen also auch in Klon 8.1 (9PEP93) stattgefundenen Austausch V63A einer hydrophoben durch eine neutrale Seitenkette keine Relevanz und auch die Epitopfunktion schien dadurch nicht beeinträchtigt (s. 4.1.3.), so daß die Mutation das Ergebnis nicht beeinflusst und dementsprechend unberücksichtigt bleiben kann.

In der Westernblot-Analyse der in *E. coli* löslich exprimierten Peptide konnte die Anwesenheit des Proteins aufgrund der E-tag Detektion (s. 4.3.2. c); Abb. 4.15.) nachgewiesen werden. Zum einen zeigte sich eine Bande in etwa der vorausgerechneten Peptidgröße zwischen 8 bis 10 kD mit relativ schwachem Signal, zum anderen in einer Größe von mehr als 40 kD in größeren Mengen. Dabei handelt es sich am ehesten um das Ergebnis der zu 80% stattfindende Überlesung des "amber-stop" Kodons des pCABTAB5E Plasmids in *E. coli* TG 1 (Pharmacia-

Herstellerangaben). Dadurch liegt das Peptid allein an das Signalpeptid gebunden und in Verbindung mit dem g3-Linkerprotein vor.

Nach der Auftrennung in dem reduzierenden SDS-PAGE konnte mit dem Chemilumineszenz-Verfahren stellvertretend für die Peptide 1PEP93 und 3PEP79 ein polyklonales α CEA Ak-Signal bei 40 kD gezeigt werden; eine Bindung von T84.66 konnte allerdings nicht mehr nachgewiesen werden.

Hass et al. (1991) sowie Buchner und Rudolph (1991) berichteten, dass sich CEA Epitope unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE während des Blotvorganges nicht komplett zurückfalten und so Konformationsepitope verloren gehen können. Aus diesem Grund haben Hass et al. (1991) ihre Ergebnisse unter nicht reduzierenden Bedingungen erzielt. Gaida et al. (1993) haben allerdings gezeigt, dass die Bindung zwischen der CEA A3 Domäne und T84.66 auch unter reduzierten Bedingungen im Westernblot nachweisbar ist. Hass et al. (1991) und Gaida et al. (1993) wählten bei der Domänenexpression einen Fusionsproteinansatz (CKS bzw. β -Galaktosidase) und erreichten mit dem jeweils gewählten Vektor (pTB210 bzw. pAX4+) und E.coli-Stamm (JM109) eine sehr hohe Expressionsleistung. Der hier gewählte Vektor pCANTAB5E beinhaltet die supE-Funktion, die die Möglichkeit des Phagen-Displays bietet, was allerdings zu einer deutlich geringeren Expressionsleistung bei den löslichen Proteinen führt.

Das fehlende Signal im Westernblot ist demnach auf die zu niedrige Expressionsleistung und möglicherweise auch auf den hier nicht gewählten Fusionsproteinansatz zurückzuführen.

Während die Deletionsmutagenese-Verfahren mit festgesetzten Primern (Lesley et al., 1991; Joshi et al., 1996), über Restriktionsverdau (Chen und Zubay, 1983) oder mit komplett randomisierten Primern (Affranchino und Gonzalez, 1997) etablierte Methoden darstellen, ist der initial eingeschlagene Weg, Deletionsmutanten über eine PCR-Deletion mit teilrandomisierten Primern (s. 3.6.4.) zu klonieren, bis heute nicht in der Literatur zu finden. Die Methode versprach eine elegante Lösung der sonst aufwendigen Klonierungsarbeit bei der

Herstellung von Deletionsmutanten mit hoher Diversität zu sein, da in einem PCR-Schritt alle Mutanten eines Deletionsendes auf einmal hergestellt werden konnten. Bei der Festlegung der Primer-Population spielt die DNA-Sequenz der Matrize eine entscheidende Rolle, die in anderen Fällen, die mit einer kleineren Primer-Population auskommen, zu einer höheren Effizienz führen könnte. Die Sequenzen der rekombinanten Klone zeigten einen unregelmäßigen Einbau des Sfi I-Linkers (s. 3.5.; Abb. 3.1.), ein synthetisches zweistrangiges Oligonukleotid, bei der Ligation in das Plasmid pCANTAB5E (Pharmacia), was zu häufigen Leserahmenmutationen und so zu Nonsense-Translationen führte und dementsprechend weitere verschiedene PCR-Produktlängen aussortierte. Ein länger gewähltes Linker-Peptid oder ein in den Primer eingebauten Linker könnte auch dieses Problem minimieren und so die Methode für eine ähnliche Fragestellung bei einem anderen Protein attraktiv machen. In diesem Fall war die Ausbeute an unterschiedlichen Peptidlängen von vier bei zehn theoretisch avisierten für das neue Verfahren befriedigend. Für die vollständige Beantwortung des Arbeitsziels zeigte sich der Lösungsansatz jedoch nicht umfassend geeignet.

Die Bindung von T84.66 an die A3-Domäne des CEA Moleküls toleriert, nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, eine N-terminale 8 AS Deletion mit vergleichbar hohen Signalen im ELISA (s. 4.3.1.) gegenüber der kompletten Domäne, aber nicht eine 16 AS Deletion, die zum Verlust des ersten (A) β -Stranges der Domäne führt (s. A. 2.1.). Hier handelt es sich, nach den Homologiestudien (Gaida et al., 1992; Bates et al., 1992), um eine unter den einzelnen CEA-Domänen hoch konservierte Region, die eine Glykosylierungsstelle sowie einen versteckten, nach Bates (1992) auf die Tertiärstruktur des Moleküls Einfluss nehmenden, Asparagininrest beinhaltet. Die hohe Homologie (s. Abb. 5.1.) der Primärsequenz der CEA Domänen in dieser Region spricht nicht für eine Sequenz als Teil eines Epitopes desjenigen Antikörpers (T84.66), der für eine einzelne Domäne (A3) spezifisch ist. Ob die Deletion des A β -Stranges zu einer weitreichenden Änderung der Tertiärstruktur der Mutante ausreicht, um mittels einer

Konformationsänderung die Zerstörung des eigentlichen Epitopes zu erklären, ist eher unwahrscheinlich, da die intermolekulare Disulfidbrücke an C25, die hauptsächlich an der Bildung des β -Strang Rahmens beteiligt ist (Wells, 1991), noch erhalten blieb. Näher liegt die Vermutung, dass es in dem Expressionssystem der E.coli Bakterien bei einer weitreichenden N-terminalen Deletion zu missgefalteten Proteinen kommt (Buchner und Rudolph, 1991), wofür auch die Tatsache spricht das die N-terminal deletierten Klone unlösliche Proteine exprimierten, und so das Epitop verloren geht. Hierbei kann die weniger gut regulierte Translation und Proteinfaltung in E. coli Bakterien im Gegensatz zu Eukaryonten eine Rolle spielen. Im E. coli System falten sich die Proteine direkt nach der Translation vom N-terminalen Ende beginnend, wobei eine N-terminale Deletion entscheidend zu einer Malfunktion zu Beginn der Faltung beitragen kann. Auch in der ELISA Untersuchung, wo Faltungsstörungen der membrangebundenen Proteine selten sind, konnte kein Signal für das Peptid 17PEP93 nachgewiesen werden. Allerdings ist der ELISA auch anfällig für eine mögliche Proteaseaktivität, wofür möglicherweise die negativen Ergebnisse der löslichen Peptide im ELISA sprechen. Aber auch im SDS-PAGE Verfahren, wo die Proteasen zum einen denaturiert werden und zum anderen von den Peptiden getrennt werden ließ sich kein spezifisches T84.66-Signal nachweisen. Renaturierungsversuche des löslichen Proteins, die weitere Hinweise zu dieser Problematik liefern könnten, wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Der erste Deletionsschritt am C-terminalen Ende des CEA Moleküls von 14 AS (3PEP79) wurde von der T84.66-Bindung nicht toleriert. Die Region umfasst nach Bates (1992) eine Glykosylierungsstelle (N82) und den G β -Strang, der seinerseits einen verborgenen Valin- und einen verborgenen Tyrosin-Rest beinhaltet. Die beiden Seitengruppen tragen (wie oben angeführt) zur „Patching“-Faltung der tertiären β -Barrel Struktur (Chothia und Lesk, 1987; Rees und de la Paz, 1996) der Ig-Domäne bei, so dass bei ihrem Fehlen eine Epitop-zerstörende Konformationsänderung möglich ist. Der Ansatz der intermolekularen Disulfidbrücke auf der C-terminalen Hälfte der A3-Domäne (C73), die die Struktur

demnach für eine hoch spezifische Ak-Bindung relevant sein. Ein interessantes Detail der Darstellung ist die Markierung der Glykosylierungsstellen der einzelnen Domänen die mit dem Symbol „#“ gekennzeichnet sind, wenn sie alle Domänen tragen. Das „!“ Symbol kennzeichnet die Glykosylierungsstellen der Domänen mit Ausnahme der CEA A3 Domäne. Es handelt sich hierbei um die AS 39 und 65, wobei erstere zur C-C'Schleife und letztere zur E-F Schleife gehört. An diesen Stellen ist demnach die Proteinoberfläche der CEA A3 Domäne im Gegensatz zu den anderen nicht von einem Zuckerrest bedeckt. An der AS 65 könnte der fehlende Zuckerrest für eine Ak-Bindung interessant sein, da die folgende Sequenz des CEA eine starke Diversität gegenüber den verwandten Domänen zeigt. Für die Bindungsstelle ist gezeigt, dass sie im glykosylierten und unglykosylierten Protein existiert. Es handelt sich demnach um eine reine Protein-Protein Interaktion, die im nativen, glykosylierten Zustand des Proteins nicht gestört wird.

Kombiniert man den Vergleich der Primärsequenzen der CEA Domänen und den der CDRs des Ab2 6G6.C4 mit der CEA A3 Primärsequenz (Gaida, 1993) (s. 1.4.; Abb. 1.5.), zeigt sich für den G β -Strang keine Homologie mit dem Ab2, aber gerade für die Sequenz mit der hohen intermolekularen Diversität zwischen den einzelnen CEA Domänen und in der Nähe der in CEA A3 nicht besetzten Glykosylierungsstelle AS 65 eine auffallende Homologie mit der L3-Kette des Ab2 (AS 66-70).

Eine weitere entscheidende CDR einer Ag-Bindungsstelle ist die H3 Sequenz, die zusammen mit der L3 Sequenz das Zentrum der molekularen Oberfläche der variablen Ak-Region bildet (s. Abb. 1.2.). Die Homologie dieser Sequenz des Ab2 6G6.C4 projiziert sich auf den C' β -Strang (AS 50-55), bzw. auf die C'- E Schleife der CEA A3-Domäne. Aus der dreidimensionalen Darstellung der CEA A3 Domäne aus Neumaier (1997) (s. Abb 5.2.), die auf Sequenzhomologie-Berechnungen von Bates (1992) beruhen, kann die strukturelle Zusammengehörigkeit der β -Stränge im Raum und in Bezug auf die molekulare Oberfläche ersehen werden. Die beiden in CEA A3 nicht vorhandenen Glykosylierungsstellen zeigen sich hier in räumlich

engem Zusammenhang und verdecken möglicherweise nicht die zu den verwandten Domänen hoch diversen β -Stränge F und G bzw. die C-terminale EF-Schleife.

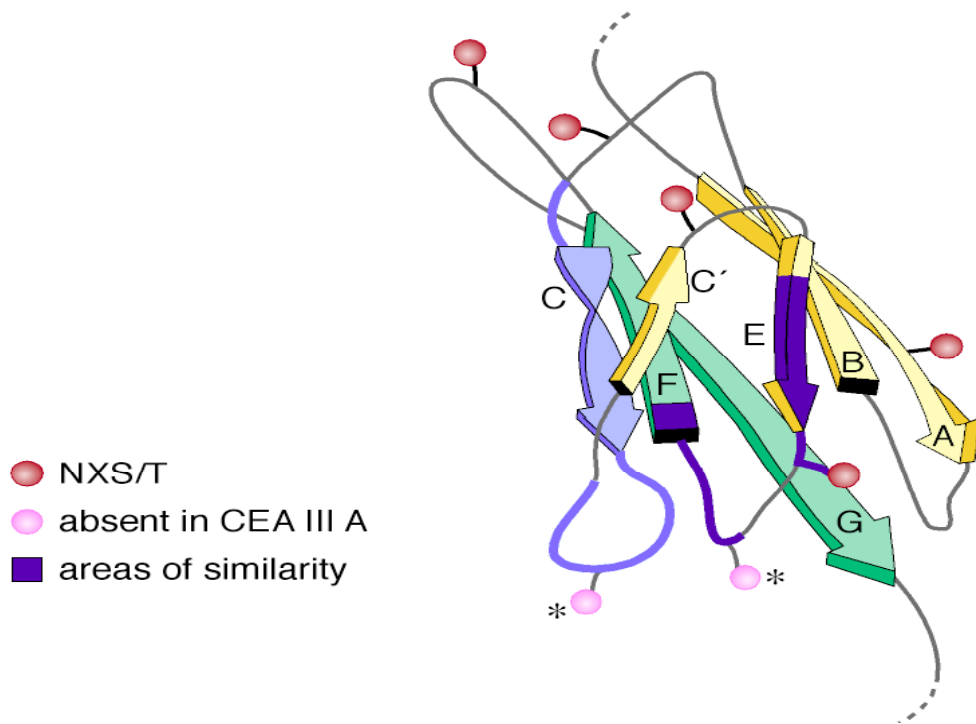


Abb. 5.2. 3D Domänenstruktur von CEA A3 aus Neumaier (1997)

Die Abb. 5.2. zeigt die Projektion der AS-Reste auf der CDR-Oberfläche des Ab2 6G6.C4 in einem Modell der CEA A3 Domäne schematisch. Die mit „*“ gekennzeichneten Glykosylierungsstellen sind in CEA A3 nicht vorhanden.

Wells (1991) beschreibt globuläre Protein-Protein Bindungen, wie sie von einem Ak (T84.66) und einer Ig-Domäne vom C-Typ (CEA A3) gebildet werden, mit einer großen Interaktionsfläche von $650-1200 \text{ \AA}^2$, die von zehn bis 20 Seitenketten gebildet werden und nur in Ausnahmefällen einer kontinuierlichen Primärsequenz entsprechen, sondern zumeist aus diskontinuierlichen Sequenzabschnitten, die sich konformationell in der Tertiärstruktur zusammenfinden, entstehen. Des weiteren stellt er zwar heraus, daß Schleifenstrukturen zwischen den β -Strängen meistens solche Bindungsflächen produzieren, jedoch nicht vernachlässigt werden sollte, dass auch die Außenflächen der β -Barrels durchaus solche Bindungsoberflächen

beherbergen können.

Boehm und Mitarbeiter (1996) stellen heraus, dass die Seite des CC'FG β -Faltblattes von Ig-Domänen vom C-Typ häufig als Rezeptorbindungsstelle in verwandten Molekülen des CEA fungieren. Ihre auf Daten einer Röntgen- und einer Neutronen-Auflösungsstreuung beruhenden Überlegungen zu der Tertiärstruktur von CEA, die auch mögliche Oligosaccharidreste in den sterischen Berechnungen miteinbezieht, kommt zu einem Zick-Zack-förmigen Modell des membranständigen Moleküls. Dabei wird betont, daß die Oberfläche des CC'FG β -Faltblattes eine der wenigen ist, die anscheinend nicht von Zuckerresten verdeckt ist. Boehm favorisiert diese Struktur deshalb und wegen weiterführender sterischer Überlegungen als Adhäsionsstelle der intermolekularen Dimerbildung, die zur interzellulären Bindung führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der von Gaida (1993) haben gezeigt, daß CEA und die CEA A3 Domäne in Abwesenheit von Zuckerresten spezifisch von T84.66 erkannt wird aber auch natives, als glykosyliertes CEA detektiert wird. Diese Zusammenhänge sprechen für eine Region, die von Oligosacchariden in vivo unbedeckt bleibt, was nach Gaida (1993) und Boehm (1996) für die Oberfläche des CC'FG β -Faltblattes zutrifft.

Die dreidimensionalen Darstellungen der Oberfläche der Ag-Bindungsregionen des Mak T84.66 und des MaId 6G6.C4 (s. Abb. 1.2.) aus Neumaier (1997) zeigen den flachen Charakter der Bindungsstelle des Mak zu seinem "internal-image". In der Komplementarität zu dem von T84.66 definierten Epitop des CEA Moleküls und ausgehend von einer Protein-Protein Bindung ist es wahrscheinlich, dass auch diese für die Idiotypkaskade ursächliche Antigenoberfläche eine flache Struktur besitzt. Eine β -Faltblattoberfläche zeigt, im Gegensatz zu den Schleifen zwischen den β -Strängen (Loops), ebenfalls eine flache Oberflächenbeschaffenheit (Boehm et al., 1996).

Beleuchtet man die genannten Zusammenhänge unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit, scheint zum einen eine größere N-terminale Deletion am

ehesten durch eine Veränderung der Faltungsstruktur der Domäne zum Verlust des Epitopes zu führen. Zum anderen geht eine C-terminale Deletion der CEA A3-Domäne, die 14 AS umfasst und zum Verlust des G β -Strangs führt, mit einer Destruktion des T84.66 Epitopes einher. Das gibt Grund zu der Annahme, dass der G β -Strang maßgeblich an der Bildung des Konformationsepitopes von CEA für den hochspezifischen Mak T84.66 an der relativ flachen Oberfläche des CC'FG β -Faltblattes beteiligt ist. Naheliegend scheinen dann die 6G6.C4-homologen Sequenzen der CEA A3 Domäne mit ausgesprochener Diversität zu den übrigen CEA Domänen (Bates et al., 1992; Gaida et al., 1993) des C'- und des F β -Stranges das Konformationsepitop zu ergänzen und zu dessen besonderer Spezifität zu führen.

Auch wenn mit den Ergebnissen der Arbeit keine definitiven Aussagen zu der Bindungsstelle zwischen dem Mak T84.66 und der CEA A3- Domäne möglich sind, tragen sie trotzdem als Teil des Mosaiks zur Definition des untersuchten komplexen globulären Konformationsepitopes bei und bieten neue Ansätze für weiterführende Untersuchungen. Neue Aspekte könnten Untersuchungen mit chimären Domänen aufzeigen. Domänenanteile von CEA A3, z.B. ein β -Faltblatt oder ein β -Strang, würden in einer anderen, verwandten, nicht T84.66-bindenden Domäne, wie z.B. von CEACAM1, CEACAM6 oder einer Domänen CEA A1 oder A2, ausgetauscht. Möglichen Faltungsproblemen oder Konformationsänderungen ginge man damit aus dem Weg und würde mit einer spezifischen Reaktion auf T84.66 einen positiven Nachweis des Epitopes für das getauschte Fragment erbringen.

Wenn man metaphorisch das Epitop, welches wir versuchen zu beschreiben, mit einem komplexen Rot vergleicht, so ist uns dessen komplementäres Grün bekannt. Der Farbkasten aus dem wir dieses Rot mischen sollen entspricht den uns zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Möglichkeiten. Dann ist diese Farbauswahl momentan nicht ausreichend, um die Komplexität des Farbtones wiederzugeben, obwohl wir ein einfacheres aber sehr ähnliches Rot auf unserer Farbpalette anmischen konnten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das tumorassoziierte Antigen CEA wird von seinem spezifischen Mak T84.66 durch ein Epitop erkannt, welches der intermolekularen Adhäsion zugrunde liegt. Die intermolekulare Vernetzung des CEA bildet mit CEACAM6 und CEACAM1 das zur Epithel-Bakterien-Interaktion notwendige Glykokalix-Gerüst der Kolonmukosa. Die molekulare Beschreibung dieses Epitopes ist eventuell für Anwendungen in der Medizin sowie für grundlagenwissenschaftliche Zusammenhänge von Interesse.

In dieser Arbeit wird das Epitop der spezifischen Bindung zwischen CEA und Mak T84.66 auf ein 85AS langes Peptid als Fragment der CEA A3 Domäne eingegrenzt.

Die vollständige CEA A3 Domäne und das N-terminal deletierte 85AS-Peptid zeigten auf den Mak T84.66 eine spezifische, ähnlich starke Reaktion im ELISA als Phagendisplay, während die kürzeren CEA A3 Fragmente im ELISA, Westernblot und Vakuum-Dot-Blot keine Bindung zeigten. Gegenüber dem polyklonalen α CEA Ak zeigten die Fragmente eine größenabhängig abnehmende Signalintensität im Vakuum-Dot-Blot.

Die Fragmente der CEA A3 Domäne wurden durch eine teilrandomisierte und durch eine definierte PCR-Deletions-mutagenese auf Nukleinsäureebene hergestellt und in ein E.coli-Expressionssystem kloniert. Es konnten insgesamt zehn Peptid-Fragmente als Phagendisplay oder als lösliches Protein gewonnen und in den oben genannten Assays untersucht werden.

Aufgrund der Ergebnisse und der vorliegenden Literatur konnte eine Hypothese zur Lokalisation des CEA-Epitops für T84.66 erstellt werden, in der der F β -Strang des CC'FG β -Faltblattes die zentrale Rolle spielt.

Folgerichtig scheinen Untersuchungen mit chimären Domänen erfolgversprechend, bei denen ein Austausch mit hoch-homologen aber nicht epitoptragenden Domänenanteilen einen positiven Epitopnachweis erbringen könnten.

7. LITERATUR

- Affranchino, J.L.** and Gonzalez, S.A. Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6. *J Gen Virol.* 78:1949-1955, **1997**.
- Arap, W.;** Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. Cancer Treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279:377-380, **1998**.
- Beauchemin, N.;** Draber, P.; Dveskler, G.; Gold, P.; Gray-Owen, S.; Grunert, F.; Hammarström, S.; Holmes, KV.; Karlsson, A.; Kuroki, M.; Lin, S-H.; Lucka, L.; Najjar, SM.; Neumaier, M.; Öbrink, B.; Shively, JE.; Skubitz, KM.; Stanners, CP.; Thomas, P. Nomenclatur Announcement. Redefined nomenclature for members of the Carcinoembryonic Antigen family. *Experimental Cell Research* 252:243-249, **1999**.
- Bentley, GA.;** Boulot, G.; Riottot, MM. and Poljak, RJ. Three-dimensional structure of an idiotope - anti-idiotope complex. *Nature* 348:254-257, **1990**.
- Bhattachary-Chatterjee, M.;** Nath Baral, R.; Chatterjee, SK. and Foon, KA. Counterpoint. Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotypic vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 49:133-141, **2000**.
- Blundell, TL.;** Sibanda, BL.; Sternberg, MJ. and Thornton, JM. Knowledgebased prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 326:347-352, **1987**.

- Boehm, MK.;** Mayans, MO.; Thornton, JD.; Begent, RHJ.; Keep, PA. and Perkins, SJ. Extended glycoprotein structure of the seven domains in carcinoembryonic antigen by X-ray and neutron solution scattering and an automated curve fitting procedure: implications for cellular adhesion. *J Mol Biol* 259:718-736, **1996**.
- Braun, JM.,** Marion, S., Charreire, J. and Ropars, A. Produktion of Ab2 beta, anti-idiotypic monoclonal antibodies, specific for human thyrotropin receptor. *Cell Immunology* 148 (2):316-330, **1993**
- Buchner, J. and** Rudolph, R. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol* 9:157-162, **1991**.
- Bullock, WO.,** Fernandez, JM. and Short, JM. XL-1 Blue: A high efficiency plasmid transforming *rec A Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5:376-378, **1987**.
- Burnet, FM.** The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press **1959**.
- Caruthers, MH.;** Barone, AD.; Beaucage, SL.; Dodds, DR.; Fischer, EF., McBride, LJ.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z. and Tang, RY. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Meth Enzymol* 154:287-313, **1987**.
- Chen, HZ. and** Zubay, G. Analysis of ColE1 Expression in vitro after chromosome fragmentation. *J Bact* 154:650-655, **1983**.

- Chester**, KA.; Mayer, A.; Bhatia, J. and Begent, RH. Recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibodies for targeting cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl.:S8-S12, **2000**.
- Chothia**, C. and **Lesk**, AM. Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-917, **1987**.
- Chung**, CT.; Niemela, SL. and Miller, RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(7):2172-2175, **1989**.
- Coutinho**, A. The Network Theory: 21 Years later. *Scand J Immunol* 42:3-8, **1995**.
- Dobson**, H.; Pignatelli, M.; Hopwood, D. and DtauArrigo, C. Cell adhesion molecules in oesophageal epithelium. *Gut* 35:1343-1347, **1994**.
- Dower**, W.J. Genetic Engineering-Principles and Methods, New York: Plenum Publishing Corp., **1990**. pp. Vol 12:275-296.
- Feinberg**, AP. and Vogelstein, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13, **1983**.
- Feinberg**, AP. and Vogelstein, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum *Anal Biochem* 137:266-267, **1984**.
- Foon**, KA.; Chakraborty, M.; John, WJ.; Sherratt, A.; Köhler, H. and Bhattacharya-Chatterjee, M. Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic antibody vaccine. *J Clin Invest* 96:334-342, **1995**.

Frangsmyr, L.; Baranov, V. and Hammarström, S. Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumor Biol* 20:277-292, **1999**.

Frangsmyr, L.; Israelsson, A.; Teglund, S.; Matsunaga, T. and Hammarström, S. Evolution of the carcinoembryonic antigen family. structures of CGM9, CGM11 and pregnancy-specific glycoprotein promoters. *Tumor Biol* 21:63-81, **2000**.

Gaida, FJ. Herstellung von Anti-Idiotyp Antikörpern gegen ein monoklonales Immunglobulin, spezifisch für das humane Carcinoembryonale Antigen (CEA). Immunchemische Charakterisierung und Klonierung der Gene eines "internal image" Anti-Idiotyp Antikörpers. Dissertationsarbeit: Gaida, FJ; Aachen, **1992**.

Gaida, FJ.; Fenger, U.; Wagener, C. and Neumaier, M. A monoclonal anti-idiotypic Antibody bearing the image of an epitope specific to the human Carcinoembryonic Antigen. *Int J Cancer* 51: 459-465, **1992**.

Gaida, FJ.; Pieper, D.; Roder, UW.; Shively, JE.; Wagener, C. and Neumaier, M. Molecular characterization of a cloned idiotypic cascade containing a network antigenic determinant specific for the human carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem* 268:14138-14145, **1993**.

Golup, ES. The selfish Id: An alternative view of the idiotypic network. *Scand J Immunol* 33:489-494, **1991**.

Gottesman, ME.; Adhya, S. and Das, A. Transcription antitermination by bacteriophage lambda N gene product. *J Mol Biol* 140(1):57-75, **1980**.

Hamaguchi, K. and Geiduschek, EP. The effect of electrolytes on the stability of desoxyribonucleate helix. JACS 84:1329-1337, **1962**.

Hammarström, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. Semin Cancer Biol 9:67-81, **1999**.

Hammarström, S.; Shively, JE.; Paxton, RJ.; Kalthoff, H.; Wagener, C. and Tsujisaki, M. Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. Cancer Res 46:4852-4858, **1989**.

Hanahan, D. Techniques for transformation in E.coli. In: DNA cloning. A practical approach, **1985**. pp. Vol. I:109-135.

Hay, FC., Thanavala, Y. and Roitt, IM. Idiotypic Vaccines In: Immun intervention. New Trends in Vaccines, Academic Press:Roitt, IM., **1984**.

Hefta, LJ.; Neumaier, M. and Shively, JE. Kinetic and affinity constants of epitope specific anti-carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibodies for CEA and engineered CEA domain constructs. Immunotech 4:49-57, **1998**.

Holmes, DS. and Quigley, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Ann Biochem 114:193-197, **1981**.

Hoogenboom, HR.; Marks, JD.; Griffiths, AD. and Winter, G. Building Antibodies from their Genes. Imm Rev 130:41-68, **1992**.

Imperiali, B. and O'Conner, SE. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. Curr Opin Chem Biol 3:643-649, **1999**

Isacsson, U. and Watermark, G. . Ann Chim Acta 68:339-362, **1974**.

Ishii, S.; Steele, G.; Goldenberg, DM. and Jessup, JM. Normal colonic epithelium adheres to carcinoembryonic antigen and type IV collagen. Gastroenterology 106:1242-1250, **1994**.

Jennings, PA.; Saalau-Bethell, SM.; Finn, BE.; Chen, X. and Matthews, CR. Mutational Analysis of Protein Folding Mechanisms. Meth Enzym 202:113-126, **1991**.

Jerne, NK. Towards a Network Theory of the Immune System. Ann Immunol 125C:373-389, **1974**.

Jerne, NK. Idiotypic Networks and other preconceived Ideas. Imm Rev 79:5-24, **1984**.

Joshi, S.; Cao, GJ.; Nath, C. and Shah, J. Oligomycin sensitivity conferring protein of mitochondrial ATP synthase: deletions in the N-terminal end cause defects in interactions with F1, while deletions in the C-terminal end cause defects in interactions with F0. Biochem 35:12094-12103, **1996**.

Juweid, M.; Sharkey, RM.; Behr, TM. and Hansen, HJ. Clinical evaluation of tumor targeting with the anticarcinoembryonic antigen murine monoclonal antibody fragment, MN-14 F(ab) 2. Cancer 78:157-168, **1996**.

Kantor, J.; Irvine, K.; Abrams, S. and Schlom, J. Antitumor activity in immune responses induced by a recombinant anti-carcinoembryonic antigen - vaccinia virus vaccine. J Natl Cancer Inst 84:1084-1091, **1992**.

Kim, JC.; Kim, WS.; Ryu, JS. and Bodmer, WF. Applicability of carcinoembryonic

antigen specific monoclonal antibodies to radioimmunoguided surgery for human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 60:4825-4829, **2000**.

Lan, KH.; Kanai, F. and Omata, M. Tumor-specific gene expression carcino-embryonic antigen-producing gastric cancer cells using adenovirus vektor. *Gastroenterology* 111:1241-51, **1996**.

Lei, SP.; Lin, HP. and Wilcox, G. Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB Gene and its produkt pectat lyase. *J Bact* 169 (9):4379-4383, **1987**.

Lesley, SA.; Brow; MAD. and Burgess, RR. Use of in vitro protein synthesis from Polymerase Chain Reaction-generated templates to study interaction of *Escherichia coli* transcription factors with core RNA Polymerase and for epitope mapping of monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 4:2632-2638, **1991**.

Losman, M.; Novick, K.; Goldenberg, DM. and Monestier, M. Mimicry of a carcinoembryonic antigen epitope by a rat monoclonal anti-idiotyp antibody. *Int J Cancer* 56:580-584, **1994**.

Mangili, F.; Sassi, I.; Di Rocco, M.; Leone, BE.; Garancini, P. and Santambrogio, G. Breast carcinoma detection with a combination of radiolabeled monoclonal antibodies. Promising results from immunohistochemistry studies. *Cancer* 78:2334- 2339, **1996**.

Nap, M.; Hammarström, ML.; Börmer, O.; Hammarström, S.; Wagener, C. and Lamerz, R. Specifity and affinity of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. *Cancer Res*

52:2329-2339, 1992.

Neuhoff, V.; Arold, N; Taube, D. and Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250 . Electrophoresis 9:255-262, 1988.

Neumaier, M.; Shively, L.; Chen, FS.; Gaida, FJ.; Ilgen, C.; Paxton, RJ.; Shively, JE. and Riggs, AD. Cloning of the genes for T84.66, an antibody that has a high specificity and affinity for the carcinoembryonic antigen (CEA), and expression of chimeric human/mouse T84.66 genes in myeloma and CHO cells. Cancer Res 50:2128-2134, 1990.

Neumaier, M.; Paululat, S.; Chan, A.; Matthaes, P. and Wagener, C. Biliary Glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is downregulated in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 90:10744-10748, 1993.

Neumaier, M.; Gaida, FJ.; Pieper, D.; Sherman, MA. and Shively, JE. Immunological and Molecular Characterization of an Idiotypic Cascade specific for the Human Carcinoembryonic Antigen. In: Idiotypes in Medicine: Autoimmunity, Infection And Cancer, edited by Shoenfeld, Y., Kennedy, RC. And Ferrone, S. Amsterdam: Elsevier Science, pp 461-475, 1997.

Oikawa, S.; Imajo, S.; Noguchi, T.; Kosaki, G. and Nakazato, H. The carcinoembryonic antigen (CEA) contains multiple immunoglobulin-like domains. Biochem Biophys Res Commun 144:634-642, 1987.

Old, LJ. Cancer Immunology: The search for specificity - GHA Cowes memorial lecture. *Cancer Res* 41:361-375, **1981**.

Ordonez, C.; Screaton, RA.; Ilantzis, C. and Stanners, CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 60:3419-3424, **2000**.

Paxton, RJ.; Mooser, G.; Pande, H.; Lee, TD. and Shively, JE. Sequenz analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:920-924, **1987**.

Pokorny, RM.; Hunt, L. and Galandiuk, S. What is new with tumor markers for colorectal cancer? *Dig Surg* 17:209-215, **2000**.

Rasband, W.S. and Bright, D.S. NIH Image: A public domain image processing program for the Macintosh. *Microbeam Analysis Society Journal* 4:137-149, **1995**.

Raychaudhuri, S. and Köhler, H. Tumor Idiotypic Vaccines: Analysis and correlation of structural, idiotypic and biologic properties of protective and nonprotective Ab2. *J Immunol* 145:760-767, **1990**.

Rees, A. and de la Paz, P. Investigating antibody specificity using computer graphics and protein engineering. *TIBS* 11:144-148, **1986**.

Rodney, GE. Anti-idiotypic antibodies and regulation of immune responses. *Transfusion* 32:361-376, **1992**.

Saiki, RK.; Gelfand, DH.; Stoffel, S.; Scharf, SJ.; Higuchi, R.; Horn, GT.; Mullis, KB. and Ehrlich, HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, **1988**.

Sambrook, J.; Fritsch, EF. and Maniatis, T. Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**. Ed. 2nd

Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467, **1977**.

Screaton, RA.; DeMarte, L.; Draber, P. and Stanners, CP. The specificity for differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycoposphatidyl-inosityl anchor. J Cell Biol 150:613-625, **2000**.

Sege, K and Peterson, PA. Use of anti-idiotypic antibodies and cell-surface receptor probes. Proc Natl Acad Sci USA 75:2443-2447, **1978**.

Short, JM.; Fernandez, JM.; Sorge, JA. and Huse, WD. lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. Nucl Acids Res 16(15):7583-7600, **1988**.

Silvestrini, N, Fischer, EP. und Stromer, K. Farbsysteme in Kunst und Wissenschaft, Köln: Dumont, pp. 41-44 **1998**.

Stahl, S. and Nygren, PA. The use of gene fusion protein A and protein G in immunology and biotechnology. Pathol Biol (Paris) 45(1):66-76, **1997**.

Strauch, K. and Bechwith, J. An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplastic proteins. Proc Natl Acad Sci USA 85:1576-1580, **1988**.

- Tabor, S.** and Richardson, CC. DNA sequence analysis with modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4767-4771, **1987**.
- Thompson, JA.;** Grunert, F. and Zimmermann, W. Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Ana* 5:344-366, **1991**.
- Tsang, KY.;** Zaremba, S.; Nieroda, CA. and Schlom, J. Generation of cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 87:982-990, **1995**.
- Varela, FJ.** and Coutinho, A. Second generation immune networks. *Immunol Today* 12:159-166, **1991**.
- Vieira, J.** and Messing, J. Production of single-stranded Plasmid-DNA. *Meth Enzymol* 153:3-11, **1987**.
- Vogelstein, B.** and Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:615-619, **1979**.
- Wagener, C.;** Clark, BR.; Rickard, KJ. and Shively, JE. Antibodies for carcinoembryonic antigen and related antigens as a model system: Determination of affinities and specificities of monoclonal antibodies using biotin-labeled antibodies and avidin as precipitating agent in a solution phase immunoassay. *J Immunol* 130:2302-2307, **1983**.

- Wells, JA.** Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces.
Meth Enzym 202:390-411, **1991**.
- Wong, JYC.; Somlo, G.; Shively, JE. and Raubitschek, A.** Initial clinical experience evaluating Yttrium-90-chimeric T84.66 anticarcinoembryonic antigen antibody and autologous hematopoietic stem cell support in patients with carcinoembryonic antigen-producing metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 5:3224s-3231s, **1999**.
- Wormland, MR. and Dwek, RA.** Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. Structure Fold Des 7:R155-R160, **1999**.
- Xu, X.; Clarke, P.; Szalai, G.; Shively, JE. and Primus, FJ.** Targeting and therapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors in transgenic mice with an antibody-Interleukin 2 fusion protein. Cancer Res 60:4475-4484, **2000**.
- Zhou, H.; Fuks, A.; Alcaraz, G.; Bolling, TJ. and Stanners, CP.** Homophilic Adhesion between Ig Superfamily Carcinoembryonic Antigen Molecules Involves Double Reciprocal Bonds. J Cell Biol 122:951-960, **1993**.

8. ANHANG

Anhang (A) 1: Oligonukleotidsequenzen

A 1.1. Deletionsprimer

A 1.1.1. C-terminal

CEA3ACT2 5'- TAATATTCTGCGGCCGCATAGAGGACATCCAGGGTG - 3'

(36 mer; 5'- 9bp Überhang / *Not* I-site / 19bp CEA A3-match: NS 261-279 - 3')

CEA3AC12 5'- AAAAGGAAAAGCGGCCGCTGCCATCACTGAGTTCTGG - 3'

(37 mer; 5'- 10bp Überhang / *Not* I-site / 19bp CEA A3-match: NS 225-243 - 3')

CEA3AC13 5'- AAAAGGAAAAGCGGCCGCATTTCTTGTGACATTGAAT - 3'

(37 mer; 5'- 10bp Überhang / *Not* I-site / 19bp CEA A3-match: NS 180-198 - 3')

A 1.1.2. N-terminal

3456 POP 5'- N (A/C/T) (C/G) (A/C/T) N N (A/C/T) C C - 3'

(Degeneriertes Nonamer; Variablen nach zehn möglichen "in frame"

Bindungsstellen mit einem zweifachen Cystein, NS 1-171, s.Anhang 2)

CEA3ANA1

5'- AATAATGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGCTGCCCAAGCCCTCCA - 3'

(44 mer; 5'- 6bp Überhang / *Sfi* I-site / PL-site / 19bp CEA A3-match: NS 1-19 - 3')

CEA3ANA2

5'- AATAATGGCCCAGCCGGCCATGGCCGACAAGGATGCTGTGGCC - 3'

(43 mer; 5'- 6bp Überhang / *Sfi* I-site / PL-site / 19bp CEA A3-match: NS 49-66 - 3')

CEA3ANA3

5'- AATAATGGCCCAGCCGGCCATGGCCAACACAACCTACCTGTGG - 3'

(43 mer; 5'-6bp Überhang /*Sfi* I-site /PL-site /19bp CEA A3-match: NS 91-108 - 3')

A 1.2. Sequenzierprimer

Sp6 5'- ATTTAGGTGACACTATA - 3'

(17 mer reverser Primer spezifisch für den pCRTMII Vektor; 80bp Abstand zu dem Insert)

T7 5'- TAATACGACTCACTATAGGG - 3'

(20 mer forward Primer spezifisch für den pCRTMII Vektor (Invitrogen); 68bp Abstand zu dem Insert)

R1 5'- CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC - 3'

(26 mer reverse Primer spezifisch für den pCANTAB5E Vektor (Pharmacia); 74bp Abstand zu dem Insert)

R2 5'- CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC - 3'

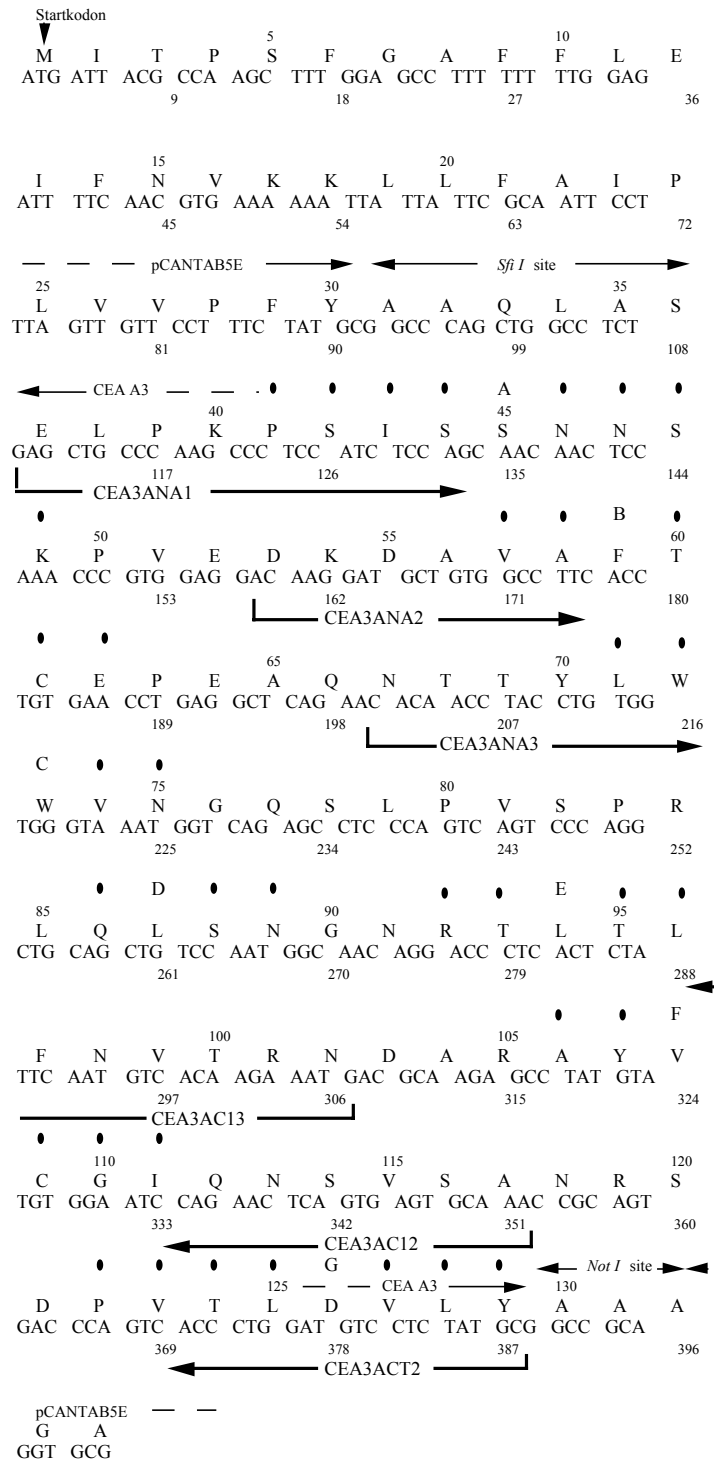
(25 mer forward Primer spezifisch für den pCANTAB5E Vektor (Pharmacia); 108bp Abstand zu dem Insert)

L3 5'- GACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCC - 3'

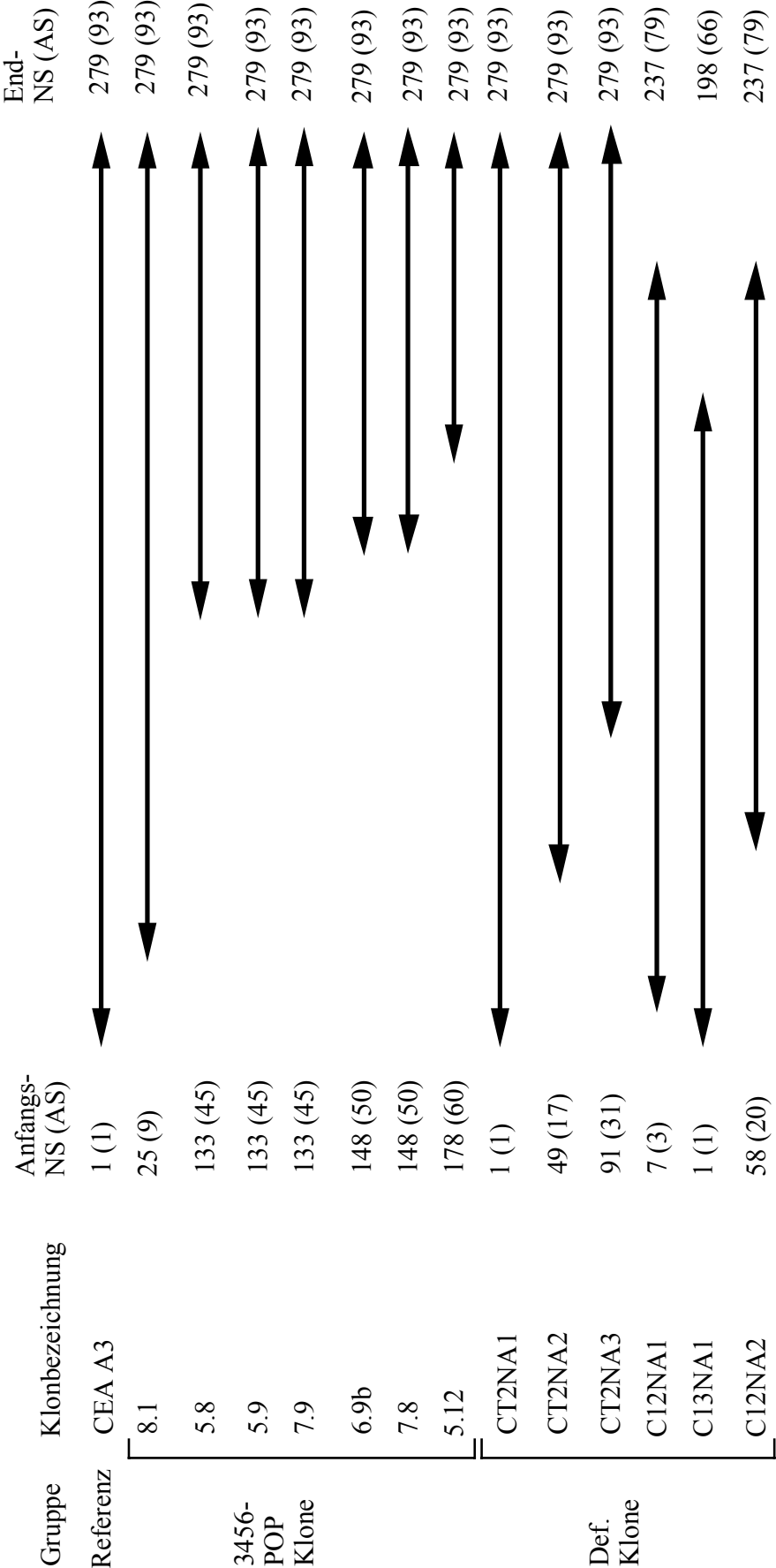
(27 mer reverse Primer spezifisch für den pAX4+ Vektor (Medac))

Anhang (A) 2: schematische Darstellungen der Klone

A.2.1. Aminosäure- und Nukleinsäure-Sequenz der CEA A3 Domäne in pCANTAB5E (Pharmacia) mit Markierungen der β -sheets der Domäne und der definierten Primer (s. A.1.)

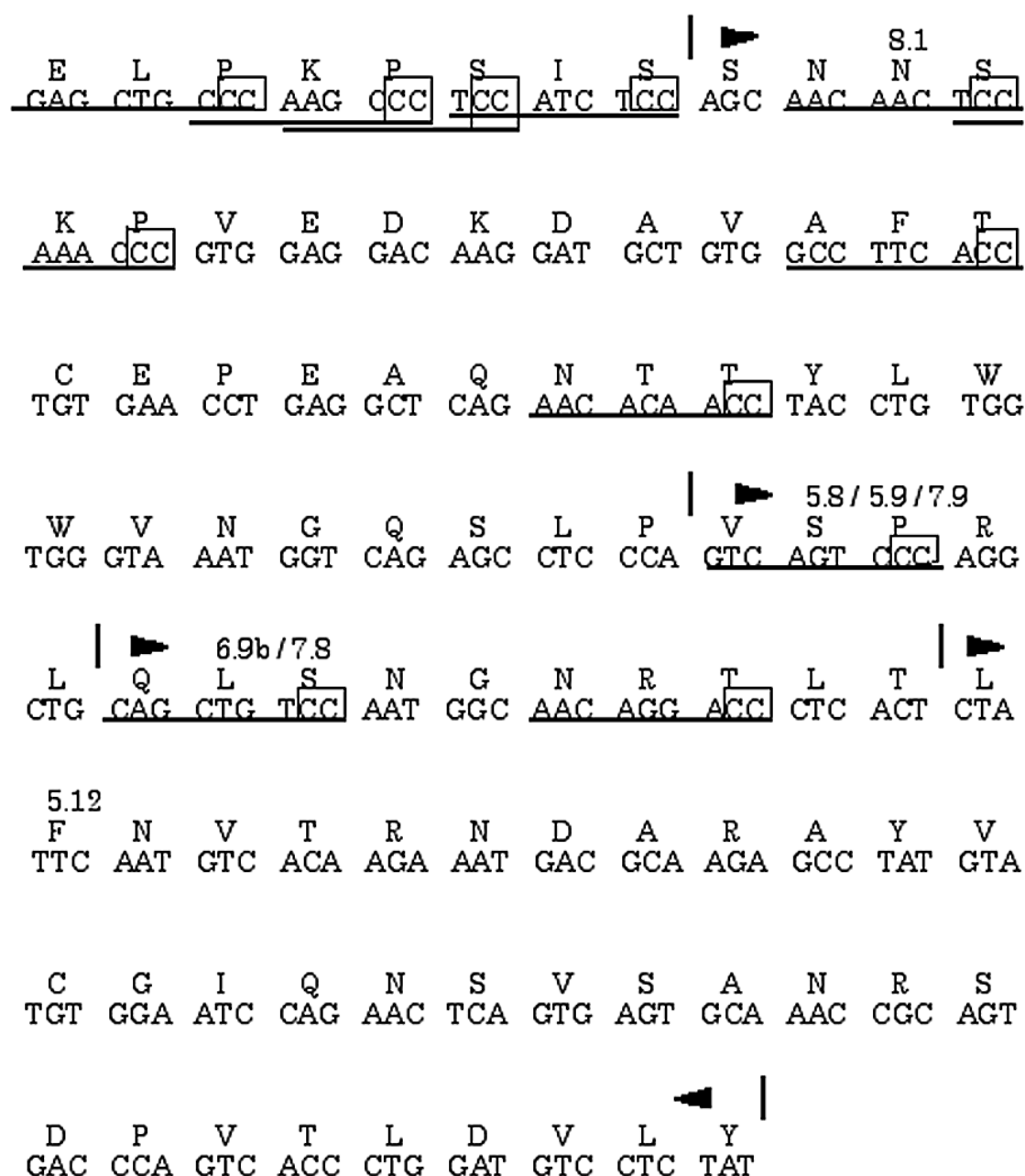


A. 2.2. schematische Darstellung der im Leserahmen sequenzierten Klone



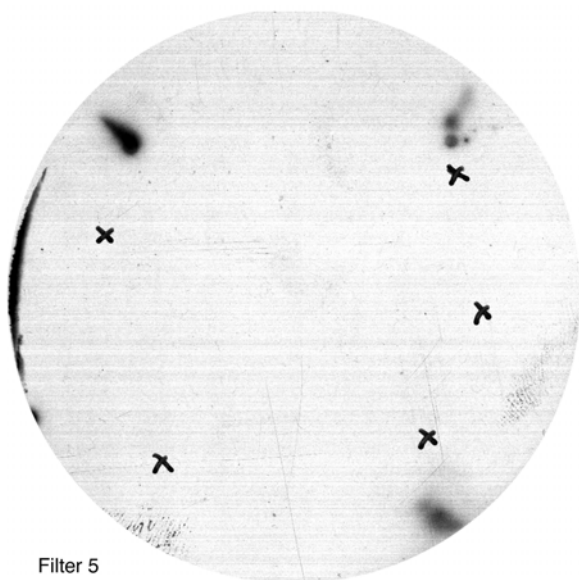
Legende zur Klonbezeichnung s. Tab. 4.1. und 4.2.

A. 2.3. schematische Darstellung der POP-Primer und POP-Klone in CEA A3

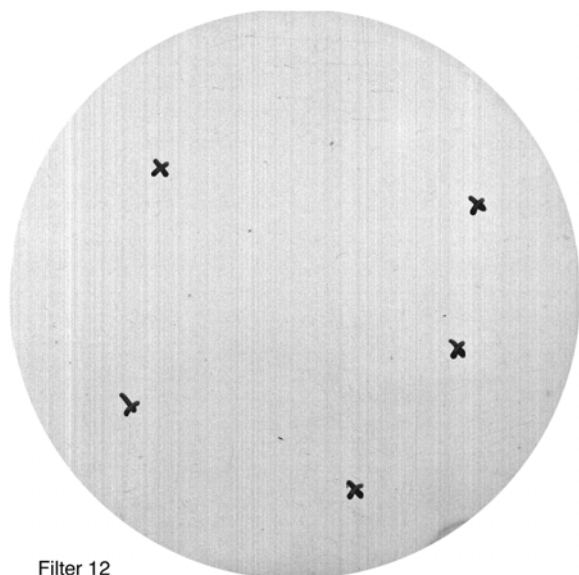


Legende: obere Reihe - Aminosäuresequenz von CEA A3
 untere Reihe - Nukleinsäuresequenz von CEA A3
 - antizipierte Primer zum Design der Nonamer-Population (s. Anhang 1)
 |  XX - Beginn der isolierten Klone
 | - Ende der isolierten Klone

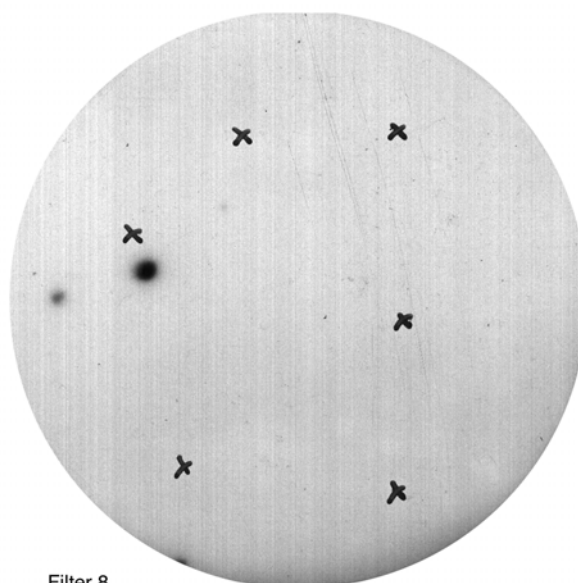
Anhang (A) 3 : Röntgenfilmscan Coloniescreening



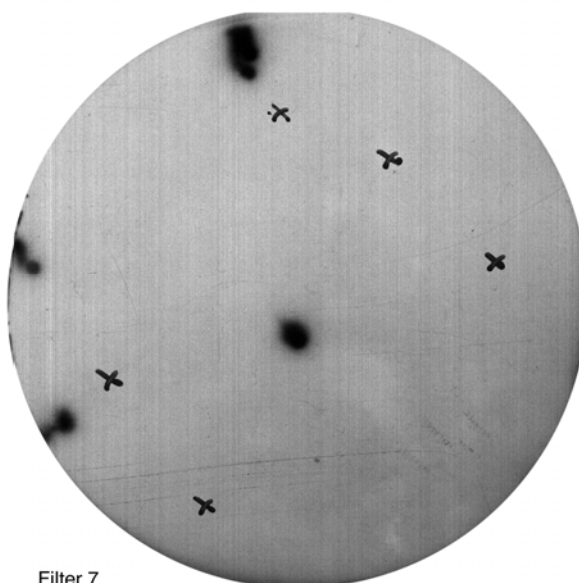
Filter 5



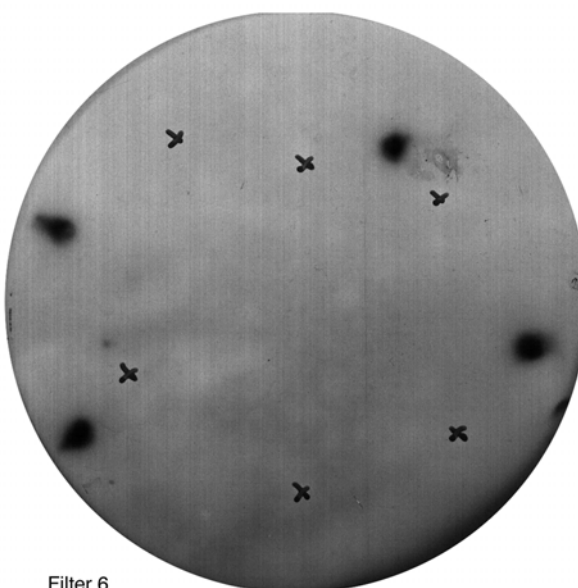
Filter 12



Filter 8

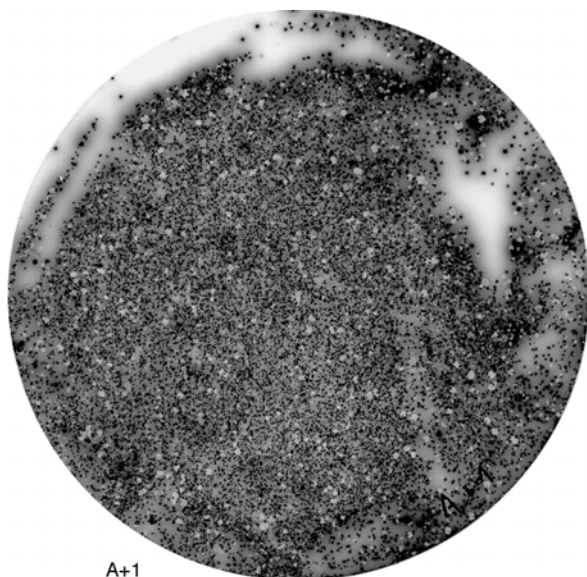


Filter 7

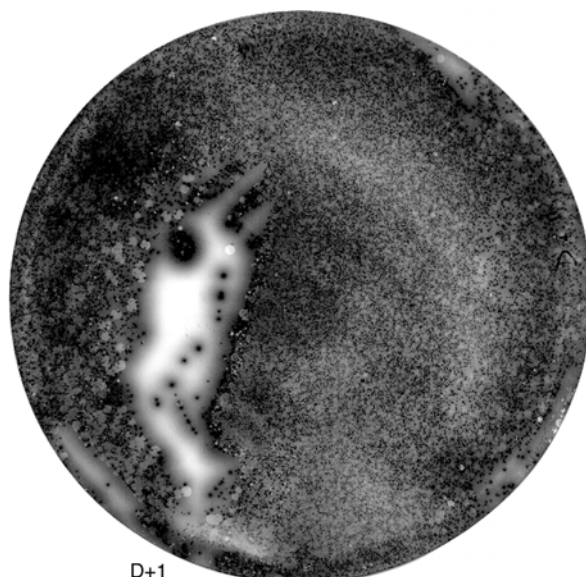


Filter 6

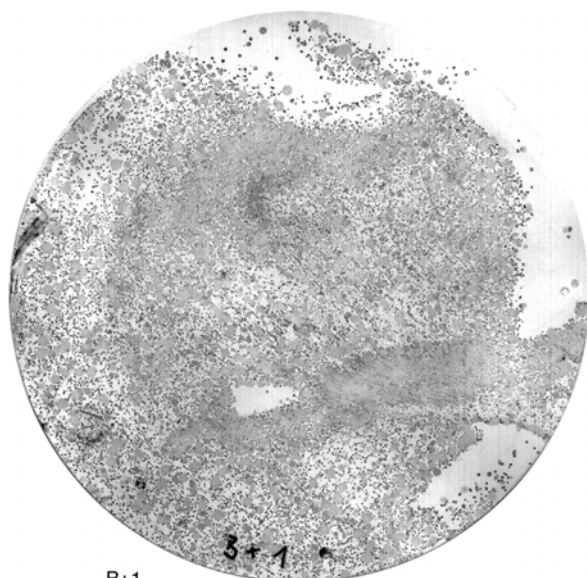
Anhang (A) 4: Filterlift Scan: α E-tag vom 210597 (ZIPFLO-Filterlifts)



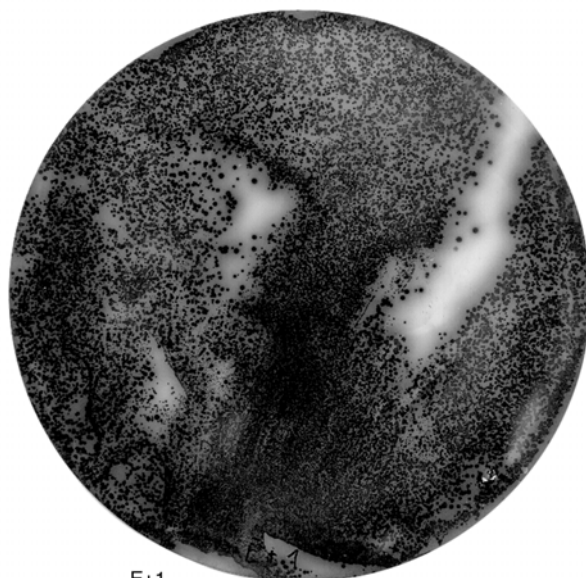
A+1



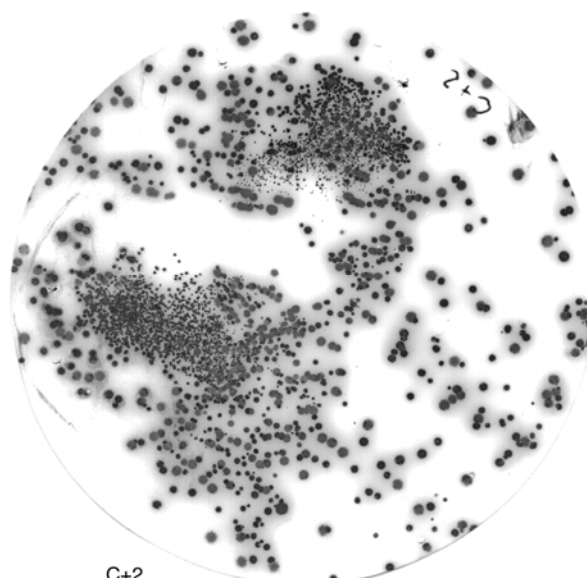
D+1



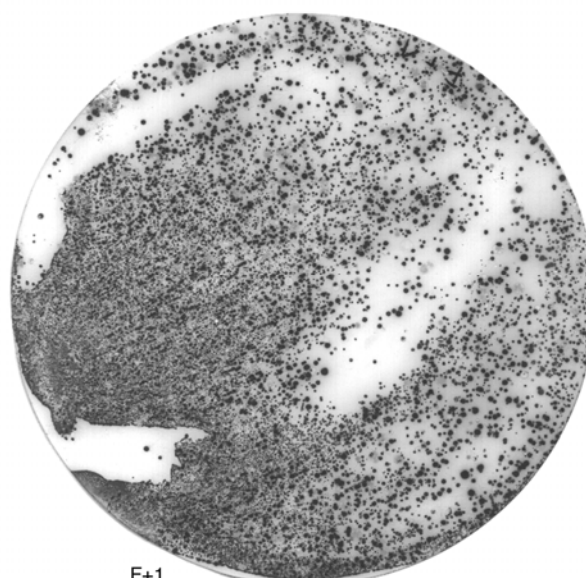
B+1



E+1



C+2



F+1

Anhang (A) 5:

Multiple Alignment 3456 POP-Klone

CEA A3	CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGG	40
5.8	ATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGG	
5.9	ATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTNTTTTGG	
7.9	ATGACCATGATTACACCNAGCTTTGGAGCCTTTNTGTGG	
6.9b	ATGACCATGATNACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGG	
7.8	ATGACCATGATTACGCCAAGCTGTGGAGCCTTTNTNTGG	
5.12	ATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGG	
CEA A3	AGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	80
5.8	AGATTTTCAACGTGAACAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
5.9	AGATTNTCAACGTGAAGAAANTATTATTCGCAATTCCTTT	
7.9	AGATTNTCAACGTGNAAAAAATTANTATTCGCAATTCCTTT	
6.9b	AGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTANTCGCAATTCCTTT	
7.8	AGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
5.12	AGATTTTCAACGTGNAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
CEA A3	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTGGCCTCTGAGCTG	120
5.8	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTGGCCTCT_____	
5.9	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTGGCCTCT_____	
7.9	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTGGCCTCT_____	
6.9b	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTG_____	
7.8	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTG_____	
5.12	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTGGCCTCT_____	
CEA A3	CCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCGTGG	160
5.8	_____	
5.9	_____	
7.9	_____	
6.9b	_____	
7.8	_____	
5.12	_____	
CEA A3	AGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGC	200
5.8	_____	
5.9	_____	
7.9	_____	
6.9b	_____	
7.8	_____	
5.12	_____	
CEA A3	TCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGC	240
5.8	_____	
5.9	_____	
7.9	_____	
6.9b	_____	
7.8	_____	
5.12	_____	

		280
CEA A3	CTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACA	
5.8	_____GTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACA	
5.9	_____GTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACA	
7.9	_____GTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACA	
6.9b	_____TCCAATGGCAACA	
7.8	_____TCCAATGGCAACA	
5.12	_____	
		320
CEA A3	GGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCAAG	
5.8	GGACCCTCACTCTATTCAATGCCACAAGAAATGACGCAAG	
5.9	GGACCCTCACTCTATTCAATGCCACAAGAAATGACGCAAG	
7.9	GGACCCTCACTCTATTCAATGCCACAAGAAATGACGCAAG	
6.9b	GGACCCTCACTCTATTCAATGCCACAAGAAATGACGCAAG	
7.8	GGACCCTCACTCTATTCAATGCCACAAGAAATGACGCAAG	
5.12	_____CTATTCAATGCCACAAGAAATGACGCAAG	
		360
CEA A3	AGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAC	
5.8	AGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAC	
5.9	AGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAC	
7.9	AGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAC	
6.9b	AGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAC	
7.8	AGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAC	
5.12	AGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAAC	
		400
CEA A3	CGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGGCCG	
5.8	CGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGGTCTG	
5.9	CGCAGTGACCCAGTCACCCTGGNTGTCCTCTATGCGGGCG	
7.9	CGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGTGGNCG	
6.9b	CGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGGCCG	
7.8	CGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGGGCG	
5.12	CGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGGNCG	

Legende: _____ - deletierte Sequenz
 Zahlen rechts vom Block - NS-Nummer
 schattierte NS - Mutation

Anhang (A) 6: Alignment der Sequenz des Klons 8.1

CEA A3	CCATGAT TACGCCAAGC TTTGGAGCCT TTT	
	S * * * **** M	
8.1	NNCCNCCGT CTCGNTCGNA TTNNNNCTTG CTT	
CEA A3	TTTTGGA GATTTTCAAC GTGAAAAAAT	57
8.1	TTTGGA GATTTTCACC GTGAAAAAAT	60
CEA A3	TATTATTCGC AATTCCTTTA GTTGTCCTT	
	. M?	
8.1	TTTATTCGC AATTCCTTTA GTTGTCCTT	
CEA A3	TCTATGCGGC CCAGCTGGCC TCTGAGCTGC	117
8.1	TCTATGCGGC CC_____	99
CEA A3	CCAAGCCCTC CATCTCCAGC AACAACTCCA	
	:::::::::::::::	
8.1	_____ _AGC AACAACTCCA	
CEA A3	AACCCGTGGA GGACAAGGAT GCTGTGGCCT	177
8.1	AACCCGTGGA GGACAAGGAT GCTGTGGCCT	146
CEA A3	TCACCTGTGA ACCTGAGGCT CAGAACACAA	
8.1	TCACCTGTGA ACCTGAGGCT CAGAACACAA	
CEA A3	CCTACCTGTG GTGGGTAAAT GGTGAGAGCC	237
8.1	CCTACCTGTG GTGGGTAAAT GGTGAGAGCC	206
CEA A3	TCCCAGTCAG TCCCAGGCTG CAGCTGTCCA	
8.1	TCCCAGTCAG TCCCAGGCTG CAGCTGTCCA	
CEA A3	ATGGCAACAG GACCCTCACT CTATTCAATG	297
8.1	ATGGCAACAG GACCCTCACT CTATTCAATG	266
CEA A3	TCACAAGAAA TGACGCAAGA GCCTATGTAT	
	M	
8.1	CCACAAGAAA TGACGCAAGA GCCTATGTAT	
CEA A3	GTGGAATCCA GAACTCAGTG AGTGCAAACC	357
8.1	GTGGAATCCA GAACTCAGTG AGTGCAAACC	326

CEA A3	GCAGTGACC CAGTCACCCTG GATGTCCTCT
8.1	GCAGTGACC CAGTCACCCTG GATGTCCTCT

CEA A3	ATGCGGCCGC AGGTGCGCC	406
8.1	ATGCGGCCGT TAGGANN NCTGNTTGGN	386

Legende:

	-	übereinstimmende Sequenz
*	-	in der Sequenz NS nicht eindeutig zuzuordnen
M	-	Mutation

sonstige Legende siehe A.5 und A.7

Anhang (A) 7:

Multiple Alignment der definierten Fragmente in pCANTAB5E mit Pectat Lyase Signalsequenz (ATG GCC) am 5'-Ende

		40
CEA A3	AGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
CT2NA1	AGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
CT2NA2	CGAGTGCCCAATTTGAAAAAATTATTATTCGCGGTCCCTTT	
CT2NA3	 TATTATTCGCAATTCCTTT	
C12NA1	 TTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
C13NA1	 TTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
C12NA2	AGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTT	
		80
CEA A3	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCTGGCC_T__CTGAG	
CT2NA1	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAG	
CT2NA2	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC__	
CT2NA3	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC__	
C12NA1	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAG	
C13NA1	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAG	
C12NA2	AGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC__	
		120
CEA A3	CTGCCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCG	
CT2NA1	CTGCCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCG	
CT2NA2	_____	
CT2NA3	_____	
C12NA1	ATGCCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCG	
C13NA1	CTGCCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCG	
C12NA2	_____	
		160
CEA A3	TGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGA	
CT2NA1	TGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGA	
CT2NA2	_____GACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGA	
CT2NA3	_____	
C12NA1	TGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGA	
C13NA1	TGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGA	
C12NA2	_____ GACAAGCATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGA	
		200
CEA A3	GGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAG	
CT2NA1	GGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAG	
CT2NA2	GGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAG	
CT2NA3	_____ AACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAG	
C12NA1	GGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAG	
C13NA1	GGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAG	
C12NA2	GGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAG	
		240
CEA A3	AGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCA	
CT2NA1	AGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCA	
CT2NA2	AGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCA	
CT2NA3	AGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCA	

C12NA1	AGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCA
C13NA1	AGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCA
C12NA2	AGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCA

280

CEA A3	ACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGC
CT2NA1	ACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGC
CT2NA2	ACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGC
CT2NA3	ACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGC
C12NA1	ACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGC
C13NA1	ACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAAT_____
C12NA2	ACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGC

320

CEA A3	AAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCA
CT2NA1	AAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCA
CT2NA2	AAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCA
CT2NA3	AAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCA
C12NA1	AAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGATGGCA
C13NA1	_____
C12NA2	AAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGATGGCA

360

CEA A3	AACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGG
CT2NA1	AACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGG
CT2NA2	AACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGG
CT2NA3	AACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGCGG
C12NA1	_____ GCGG
C13NA1	_____ GCGG
C12NA2	_____ GCGG

400

CEA A3	CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACC
CT2NA1	CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACC
CT2NA2	CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACC
CT2NA3	CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACC
C12NA1	CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACC
C13NA1	CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACC
C12NA2	CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACC

CEA A3	GCGTGCCGCATAG
CT2NA1	GCGTGCCGCATAG
CT2NA2	GCGTGCCGCATAG
CT2NA3	GCGTGCCGCATAG
C12NA1	GCGTGCCGCATAG
C13NA1	GCGTGCCGCATAG
C12NA2	GCGTGCCGCATAG

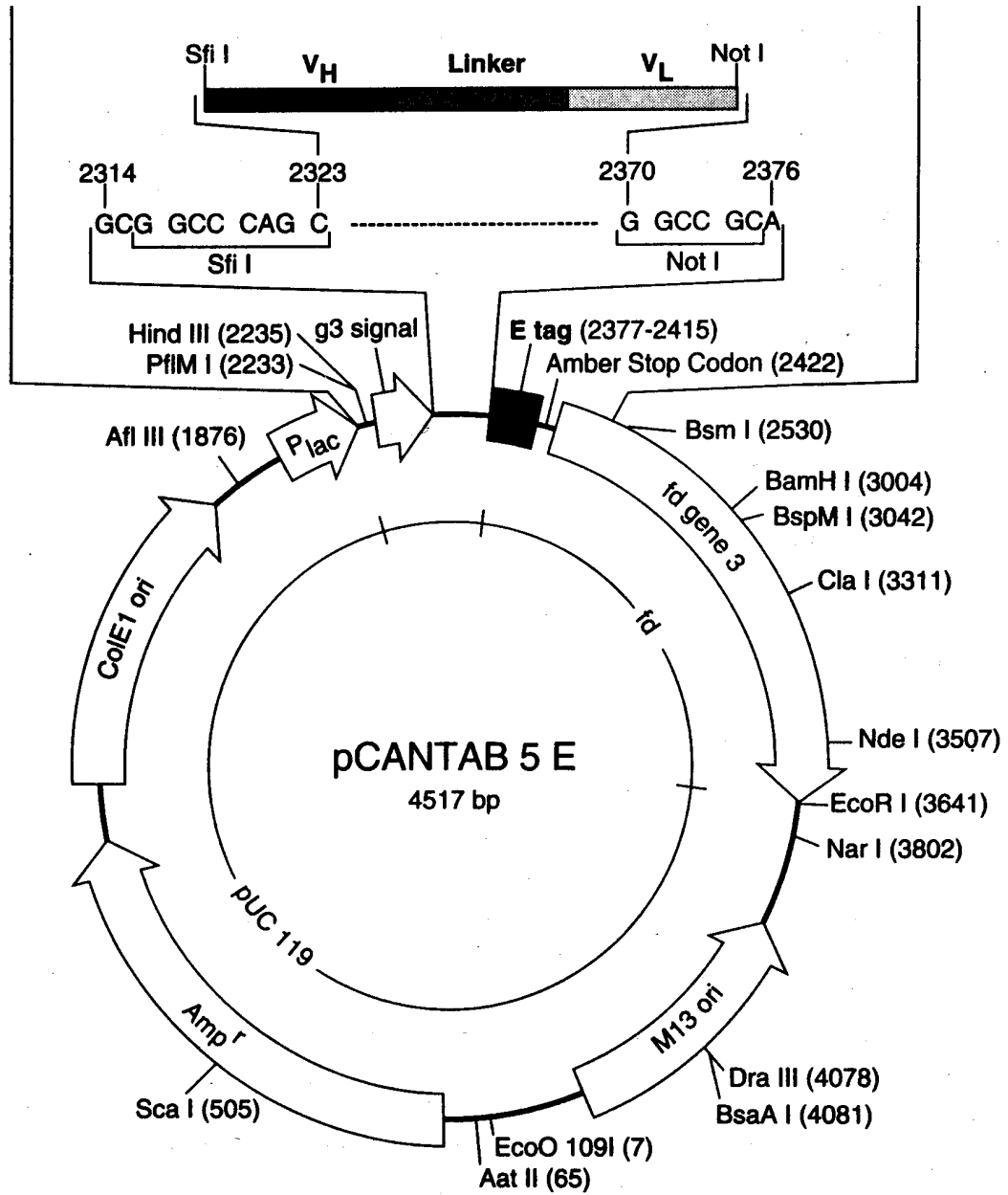
Legende:	_____	-	deletierte Sequenz
	Zahlen rechts vom Block	-	NS-Nummer
	schattierte NS	-	Mutation

Anhang (A) 8:

Integritäten					
spez. Signale auf die Proteinkonstrukte relativ zur Expressionsleistung					
PBS-Suspension des Zelldebris nach TSS- und Hitzeextraktion					
		pkl. Signal	Domänen-integr.	mkl. Signal	Epitop-integr.
	Expressions-leistung	spez. Signal abzügl.	rel. Signal zur	spez. Signal abzügl.	rel. S. zur
Klone	rel. zu A+1	spez. Leerextr.-S.	Expressions-leistung	spez. Leerextr.-S.	Expressions-leistung
A+1	1	5,4	5,4	14,5	14,5
B+1	0,3	5,9	17,6	-1	-2,9
C+2	2	8,8	4,5	-0,3	-0,2
D+1	0,9	7,1	7,7	1,2	1,3
E+1	0,4	5,4	13,3	5,2	12,9
F+1	2,8	6,8	2,4	1,2	0,4
Leerextr.	0	0	n. ber.-bar	0	n. ber.-bar
Lösl. Cytopl. Extr. (LCE) durch Hitzeextraktion nach TSS-Extraktion					
		pkl. Signal	Domänen-integr.	mkl. Signal	Epitop-integr.
	Expressions-leistung	spez. Signal abzügl.	relat. Signal zur	spez. Signal abzügl.	rel. Signal zur
Klone	rel. zu A+1	spez. Leerextr.-S.	Expressions-leistung	spez. Leerextr.-S.	Expressions-leistung
A+1	1	6,6	6,6	57,3	57,3
B+1	0,2	7,8	49,5	-7,5	-47
C+2	0,6	10,1	15,8	-7,7	-12
D+1	0,5	5,4	12	-8	-17,7
E+1	0,1	4,5	41,4	-9,3	-86,1
F+1	1,7	4,3	2,5	-8,4	-4,9
Leerextr.	0	0	n. ber.-bar	0	n. ber.-bar
Periplasmatisches Extrakt des Zellpellets (50ml Kultur) durch TSS-Extraktion					
		pkl. Signal	Domänen-integr.	mkl. Signal	Epitop-integr.
	Expressions-leistung	spez. Signal abzügl.	rel. Signal zur	spez. Signal abzügl.	rel. Signal zur
Klone	rel. zu A+1	spez. Leerextr.-S.	Expressions-leistung	spez. Leerextr.-S.	Expressions-leistung
A+1	1	11,1	11,1	44,8	44,8
B+1	0,2	5,3	30,1	10,7	60,8
C+2	0,1	6,6	209,1	6,1	194,8
D+1	0,8	10,7	12,9	1,6	1,9
E+1	0,7	4,1	5,6	5,9	8
F+1	0,1	8,2	88	4,4	47,4
Leerextr.	0	0	n. ber.-bar	0	n. ber.-bar

Legende: rel. : relativ(es) S. : Signal
 Leerextr. : Leerextrakt spez. : spezifisch(es)
 -integr. : -integrität
 n.ber.-bar : nicht berechenbar

Anhang (A) 9.: Karte des Vektors pCANTAB5E (Pharmacia) aus dem Herstellermanual



Anhang (A) 10.: Abbildungen zu Diagramm 4.3.

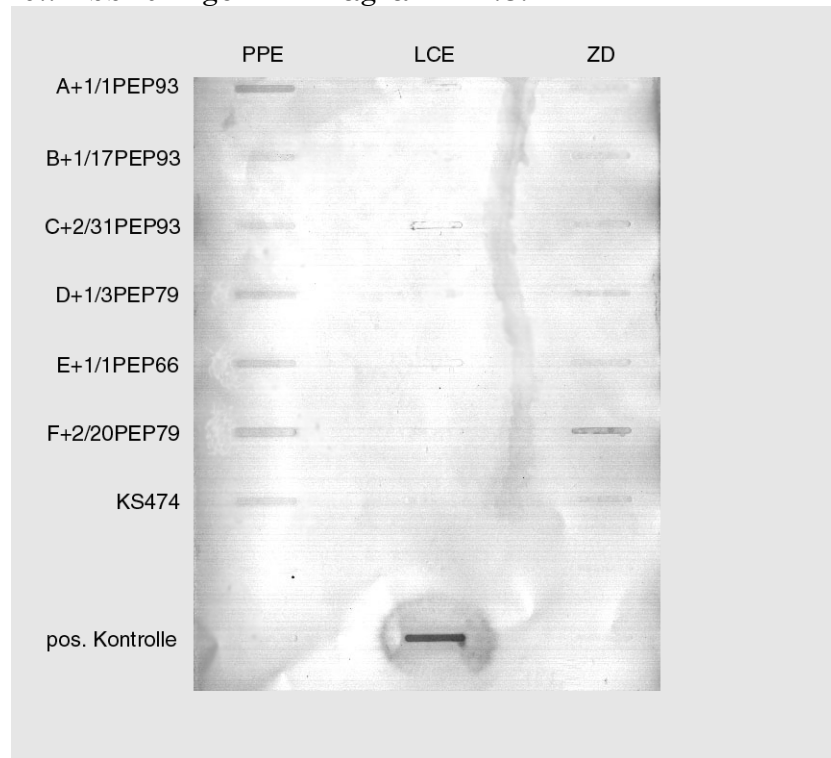


Abb. A. 10.1.: Vakuum-Dot-Blot der Extrakte (ungereinigt) mit polyklonaler α -CEA Detektion

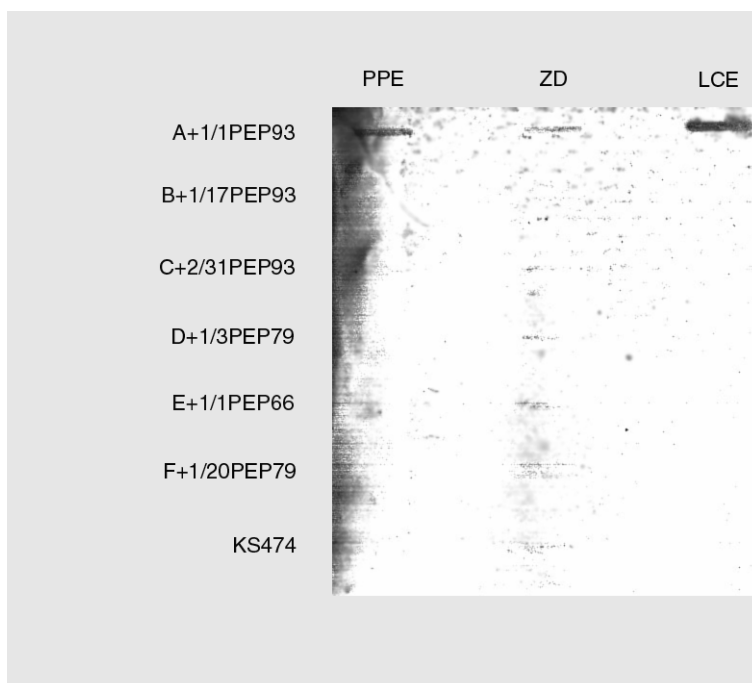


Abb. A.10.2.: Vakuum-Dot-Blot der Extrakte (ungereinigt) mit T84.66 Detektion

Legende : PPE = periplasmatisches Extrakt (s. 3.12.2.)
 (zu Abb. A.10.1. (50 µl Probe entsprechen 1ml Suspensionskultur)
 und A.10.2.) LCE = lösliches zelluläres Extrakt (s. 3.12.3.)
 (50 µl Probe entsprechen 2,5 ml Suspensionskultur)
 ZD = Zelldebris nach LCE (s. 3.12.3.)
 (50 µl Probe entsprechen 2,5 ml Suspensionskultur)
 pos. Kontrolle: Ein α E-tag positives Protein (scFv-Fragment)

Anhang (A) 11: Proteinfärbung der aufgetrennten Extrakte

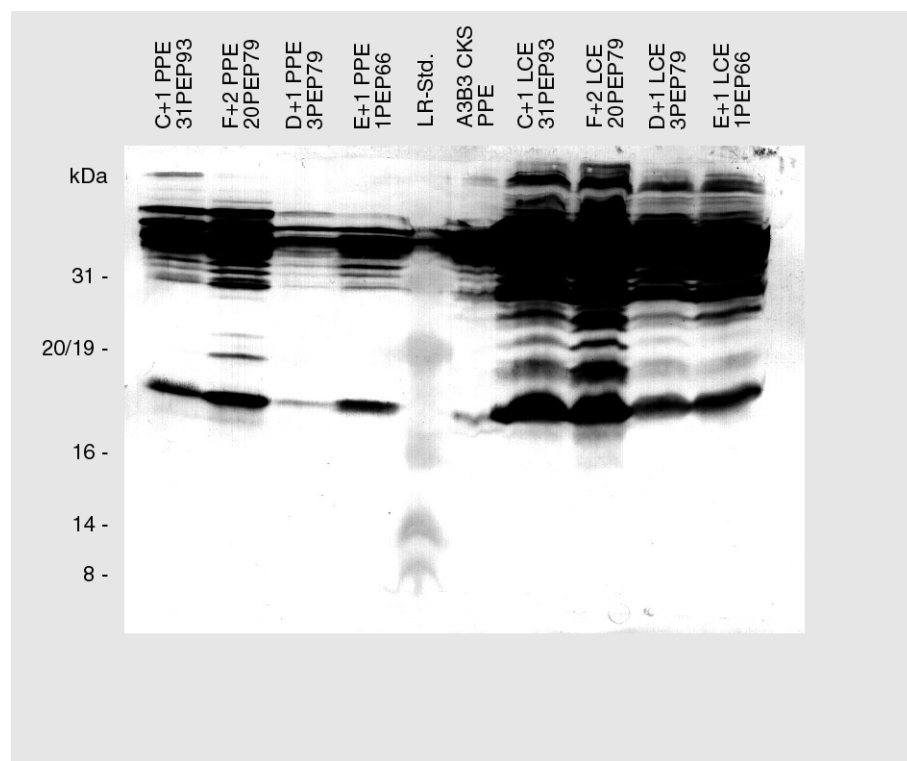


Abb. A.11.1.: PPE und LCE Extrakte (ungereinigt) einiger beispielhafter Klone in Amido-Schwarz Färbung (s. 3.15.2.)

Legende : PPE = periplasmatisches Extrakt (s. 3.12.2.)
 (9 µl Probe entsprechen 0,18 ml Suspensionkultur)
 LCE = lösliches zelluläres Extrakt (s. 3.12.3.)
 (9 µl Probe entsprechen 0,45 ml Suspensionskultur)
 LR-Std. = Low-Range Standard (Sigma)

Anhang (A) 12.: Abkürzungen

Ab1	1.Antikörper der Idiotypkaskade
Ab2	2.Antikörper der Idiotypkaskade
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BCIP	5-Bromo- 4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BGP	biliäres Glykoprotein
cDNA	codierende DNA (ohne Introns)
CDR	"complementarity determining regions"
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cfu	"colony forming unit"
DAB	Diamino-Benzidin
Diag.	Diagramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	"enzyme-linked-immunosorbent-assay"
Fc	konstanter Antikörperteil
FPLC	"fast protein liquid chromatography"
Fv	variabler Antikörperteil
GPI	Glukophosphatidyl-Inositol
IBE	"inclusion body"-Extrakt
Id	Idiotyp
Ig	Immunglobulin
LCE	lösliches cytosolisches Extrakt
MaId	monoklonaler anti-Idiotyp (Antikörper)
Mak	monoklonaler Antikörper
mkl	monoklonal
NBT	"nitro blue tetrazolium"
NCA	"non-specific crossreacting antigen"
OPD	o-Phenyl-Diamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	"polymerase chain reaction"
pfu	"plaque forming unit"
pkl	polyklonal
POD	Peroxidase
PPE	periplasmatisches Extrakt
RT	Raumtemperatur
ssDNA	„single stranded“ DNA
TAA	tumorassoziiertes Antigen

Tab.
w/v
ZD

Tabelle
weight/volume"
Zelldebris

DANKSAGUNGEN

Zuallererst möchte ich meiner jungen kleinen Familie mit meiner Frau Ulrike und meiner Tochter Zita Vayu danken, die mich mit ihrer Lebensfreude immer neu motivieren und mir für diese Arbeit viel Freiraum gegeben haben.

Meinen Eltern danke ich für alle Unterstützungen, jeglicher Art. Nicht nur finanziell, sondern vor allem emotional waren sie während dieser Arbeit -und sind es weiterhin- ein stabilisierendes Gespann.

Im Bezug auf die Widmung möchte ich mich an Astrid und Birgit erinnern, die mir sehr nahe standen und während der Laborarbeiten für diese Arbeit beide in Nebengebäuden des Institutes auf dem Gelände des UKE viel zu früh gestorben sind.

Im Laborteam, dem insgesamt mein Dank für die gute Zusammenarbeit gilt, möchte ich vor allem Kerstin Reher für ihre hervorragende technische Betreuung und Sabine Wuttke für die Graphik danken. Ali Ebrahimnejad (Ebi) und Peter Nollau sind für die vielen fruchtbaren Diskussionen, zum Teil bis tief in die Labornächte, und für ihre herzliche Freundschaftlichkeit hervorzuheben.

Als Schirmherr und Direktor des Institutes möchte ich Professor Wagener für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren danken.

Ganz besonderer Dank gilt Michael Neumaier für seine Betreuung und seine Freundschaft. Seinem Erfahrungsschatz und seiner Art zu denken erwachsen immer neue Ideen und problemorientierte Anregungen. Er bewies Toleranz und Geduld und hatte trotz hoher Geschäftigkeit immer ein offenes Ohr für mich. Ich danke ihm für sein kritisches, einnehmendes und herzliches Wesen.

ERKLÄRUNG:

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....