

Herstellung und Charakterisierung von Lama Schwere-Ketten-Antikörper produzierenden transgenen Mäusen

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
Universität Hamburg

vorgelegt von

Thomas Eden
aus Papenburg

Hamburg, Januar 2018

Erstgutachter

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

Institut für Immunologie

Martinistr. 52, 20246 Hamburg

Zweitgutachter

Prof. Dr. Susanne Dobler

Universität Hamburg

MIN Fakultät - Fachbereich Biologie

Biozentrum Grindel

Martin-Luther-King-Platz 3, 20146 Hamburg

Datum der Disputation

20.04.2018

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für die hervorragende und intensive Betreuung sowie die Möglichkeit und das Vertrauen dieses spannende Projekt bearbeiten zu dürfen.

Ebenfalls herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. Susanne Dobler für das Interesse an diesem Thema und die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Meinen Kollegen am Institut für Immunologie danke ich für ihre Unterstützung, für unzählige Kaffeerunden und die tolle Atmosphäre. Ganz besonders möchte ich mich bei Fabienne Seyfried bedanken, die mir zu Beginn meiner Arbeit sehr geholfen hat, immer eine große Unterstützung war und mir in der Schreibphase den Rücken freigehalten hat. Gudrun, Marion, Joanna und Birte danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Außerdem danke ich meinen Mitdoktoranden Anna, Caro, Philine und Intissar für die tolle und intensive Zeit im Labor.

Bei Björn Rissiek und Sahil Adriouch möchte ich mich für ihre Begeisterung und Diskussionsbereitschaft sowie wertvolle Hilfe bei der Durchflusszytometrie und tierexperimentellen Arbeiten bedanken. Stephan Menzel danke ich für die unzähligen Nanobody-Diskussionen, Unterstützung bei der Analyse von tiefensequenzierten VHH-Bibliotheken sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen BTA-Schülern (Lena Schwinger, Dennis Niewiadomski, Elena Schulmeister, Lynn Dieckow, Birte Albrecht, Franziska Axt, Jasmina Gebert, Lennart Scheufler, Sarah Kolmanitsch), die ich während meiner Doktorarbeit betreuen durfte, für ihre Unterstützung. Besonders danke ich Lynn Dieckow für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung und Analyse von BAC-Rekombinationen sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Für die Durchführung von ELISA-Versuchen zur weiteren Charakterisierung der AAV-spezifischen Nanobodies danke ich Nikolina Pantelic und Stephan Menzel.

Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und ihren Mitarbeitern aus der UKE *Core Facility* „Transgene Mäuse“ danke ich für die Durchführung von Pronukleusinjektionen zur Herstellung Lama IgH-transgener Mäuse. Bei Prof. Mascha Binder und ihren Mitarbeitern aus der UKE *Core Facility* „Immune Repertoire Sequencing“ bedanke ich mich für die Durchführung der DNA-Tiefensequenzierung von VHH-Bibliotheken.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders dafür, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben und in meinem Leben immer hinter mir stehen. Marieke, dir und unserem kleinen Linus danke ich aus tiefstem Herzen dafür, dass ihr immer für mich da seid und mir die schönsten Schreibpausen beschert habt.

Ein Teil der hier gezeigten Ergebnisse wurde bereits publiziert:

Publikationen

Patent

Eden T, Wesolowski J, Koch-Nolte, F. VHH- containing heavy chain antibody and production thereof. **EP16203240** (Dez 2016)

Paper

Eden T, Menzel S, Wesolowski J, Bergmann P, Nissen M, Dubberke G, Seyfried F, Albrecht B, Haag F, Koch-Nolte, F. A cDNA immunization strategy to generate nanobodies against membrane proteins in native conformation. *Front Immunol* 8: 111-13.

Kongressbeiträge

Poster-Präsentationen

Eden T, Wesolowski J, Menzel S, Eichhoff A-M, Dieckow L, Hermans-Borgmeyer I, Haag F, Koch-Nolte F. Nanobody-based biologics from *Lama glama* IgH transgenic mice. Protein & Antibody Engineering Summit, Lissabon (Nov 2017)

Eden T, Wesolowski J, Dieckow L, Hermans-Borgmeyer I, Haag F, Koch-Nolte F. Heavy chain only antibodies from *Lama glama* IgH transgenic mice. Antibody Engineering and Therapeutics, San Diego (Dez 2016)

Nolte F, Eichhoff A, **Eden T**, Schütze K, Menzel S, Rissiek B, Haag F. Engineering single domain antibodies (nanobodies) as potent antagonists of lymphocyte ecto-enzymes, ion channels, and bacterial toxins, European Congress of Immunology, Vienna (Sept 2015)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Inhaltsverzeichnis	v
Zusammenfassung	viii
Abstract.....	ix
1 Einleitung.....	1
1.1 Herstellung und Anwendung von therapeutischen Antikörpern.....	1
1.2 Einzeldomänenantikörper aus Kameliden und Knorpelfischen	4
1.3 Der kamelide Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genlocus (IgH-Lokus).....	8
1.4 Herstellung von konventionellen Antikörpern in transgenen Tieren.....	13
1.5 Herstellung von Schwere-Ketten-Antikörpern in transgenen Tieren	17
1.6 Adeno-Assoziierte Viren (AAVs) in der Gentherapie.....	19
2 Zielsetzung der Arbeit	21
3 Materialien.....	22
3.1 Laborgeräte.....	22
3.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.3 Reagenzsysteme (Kits).....	23
3.4 Chemikalien	24
3.5 Medien	25
3.6 Puffer	25
3.7 Antibiotika	25
3.8 Antikörper.....	26
3.9 Enzyme	26
3.10 DNA-Standards	26
3.11 DNA-Oligonukleotide (Primer).....	26
3.12 Plasmide	27
3.13 Proteine.....	27
3.14 Prokaryotische Zellen	27
3.15 Mauslinien	28
3.16 Software.....	28

4	Methoden	29
4.1	Molekularbiologische Methoden.....	29
4.1.1	Aufreinigung von BAC-DNA	29
4.1.2	Vorbereitung elektrokompeter Zellen und Elektroporation	29
4.1.3	BAC-Rekombination mit dem Red/ET System	30
4.1.4	BAC-Rekombination mit E. coli Stamm SW106	34
4.1.5	RNA Isolierung	42
4.1.6	Reverse Transkription	42
4.1.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	43
4.1.8	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA	46
4.1.9	Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung	46
4.1.10	Quantifizierung von DNA und RNA	47
4.1.11	Ligation von DNA-Fragmenten.....	47
4.1.12	Transformation kompetenter Bakterien	47
4.1.13	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien	48
4.1.14	DNA-Sequenzierung.....	48
4.2	Herstellung und Charakterisierung transgener Mäuse.....	48
4.2.1	Pronukleusinjektion	48
4.2.2	Aufreinigung genomischer DNA aus Gewebeproben	49
4.2.3	PCR-Genotypisierung	50
4.2.4	Immunisierung	51
4.2.5	Präparation der lymphatischen Organe	51
4.3	Immunologische Methoden	52
4.3.1	Durchflusszytometrie (FACS)	52
4.4	Systembiologische Methoden.....	52
4.4.1	Next Generation Sequencing (NGS).....	52
5	Ergebnisse.....	54
5.1	Herstellung des Lama IgH-Transgens TE01	54
5.2	Charakterisierung TE01-transgener Mäuse.....	58
5.2.1	Überprüfung der Keimbahnübertragung von TE01	58
5.2.2	Nachweis rekonstituierter B-Zell-Entwicklung in TE01-transgenen Mäusen	60
5.2.3	Immunisierung der TE01-transgenen Maus 373 mit dem Modellantigen AAV1	62
5.2.4	Amplifikation und Klonierung des VHH-Repertoires	62
5.2.5	Analyse der Immunantwort mittels Next Generation Sequencing (NGS)	65
5.3	Herstellung und Charakterisierung TE02- und TE03-transgener Mäuse.....	72
5.3.1	Klonierung und Übertragung der Lama IgH-Transgene TE02 und TE03	72
5.3.2	Nachweis rekonstituierter B-Zell-Entwicklung in TE02- und TE03-transgenen Mäusen.....	76

6	Diskussion	78
6.1	Klonierung und Übertragung von Lama IgH-Transgenen	78
6.2	Herstellung von VHH-Bibliotheken aus TE01-transgenen Mäusen.....	80
6.3	Analyse der Immunantwort TE01-transgener Mäuse.....	81
6.4	Herstellung und Charakterisierung optimierter Lama IgH-Transgene	84
7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	87
8	Anhang.....	89
8.1	Sequenzen.....	89
8.1.1	BACs.....	89
8.1.2	Primer.....	89
8.2	Plasmidkarten.....	90
9	Verzeichnisse	94
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	94
9.3	Abbildungsverzeichnis	97
9.4	Tabellenverzeichnis	98
10	Literaturverzeichnis	99
	Eidesstattliche Versicherung.....	110

Zusammenfassung

Lamas und andere Kameliden tragen eine Variante des Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genlokus (IgH-Lokus), der die Produktion reiner Schwere-Ketten-Antikörper ermöglicht. Die variable Domäne dieser Antikörper (VHH oder Nanobody) zeichnet sich durch hohe Stabilität und Löslichkeit sowie gute Gewebepenetration aus. Nanobodies werden meist aus immunisierten Kameliden oder synthetischen Bibliotheken gewonnen. Mäuse sind für die Produktion von monoklonalen und rekombinanten Antikörpern besonders geeignet. Ziel dieser Arbeit war die Herstellung Lama IgH-transgener Mäuse als Basis für die Produktion von Schwere-Ketten-Antikörpern in Mäusen. In vorangegangenen Arbeiten in der AG Nolte am Institut für Immunologie des UKE war der Kernbereich des *Lama glama* IgH-Lokus in zwei überlappenden BACs (*bacterial artificial chromosomes*) kloniert und sequenziert worden (Wesolowski, 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollten die essentiellen Elemente für die Produktion von Schwere-Ketten-Antikörpern mittels BAC-Rekombination auf einem DNA-Fragment vereint werden. Es wurden drei DNA-Konstrukte hergestellt: TE01 enthält je ein funktionales V_HH- und V_H-Gen, alle D- und J-Elemente, den IgM-Lokus, den IgG2b-Lokus, sowie Teile der Maus 3' Lokus-Kontrollregion (engl.: *Locus Control Region*, 3'LCR). TE02 enthält zusätzlich fünf weitere Lama V_HH-Gene mit murinen Promotoren sowie größere Teile der Maus 3'LCR. TE03 enthält dieselben Elemente wie TE02, jedoch mit Maus-Exonen für die Transmembran- und membranproximalen Domänen des IgM. Diese DNA-Konstrukte wurden durch pronukleäre Injektion auf Mäuse übertragen. Für alle Konstrukte konnten Nachkommen identifiziert werden, die das vollständige transgene DNA-Fragment weitervererbten. Nach Rückkreuzung auf B-Zell-defiziente IgH-KO Mäuse, wurde für alle Transgene mittels Durchflusszytometrie von Blutlymphozyten eine Rekonstitution der B-Zell-Entwicklung nachgewiesen. Der höhere Anteil zirkulierender B-Zellen bei TE03-transgenen Mäusen spricht für die Funktionalität der optimierten regulatorischen Elemente. Zur Induktion antigen-spezifischer Schwere-Ketten-Antikörper wurde eine TE01-transgene Maus mit AAV1 (Adeno Assoziierter Virus Serotyp 1) immunisiert. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde das VHH-Repertoire aus cDNA von Lymphknoten, Milz und Knochenmark PCR-amplifiziert und mittels DNA-Tiefensequenzierung analysiert. Die Ergebnisse bestätigen produktive VDJ-Rekombinationen, die Expansion von B-Zell-Klonen, den Klassenwechsel von IgM zu IgG, sowie eine ausgeprägte somatische Hypermutation in einigen expandierten Klonen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bereiten eine neue Basis für die Gewinnung von Nanobodies aus transgenen Mäusen.

Abstract

Llamas and other camelids carry a variant of the immunoglobulin heavy chain gene locus (IgH locus), which allows the generation of antibodies composed only of heavy chains. The single variable domain of these antibodies (termed VHH or nanobody) is characterized by high stability and solubility as well as good tissue penetration. Nanobodies are isolated from immunized camelids or synthetic libraries. Mice are well suited for the production of monoclonal and recombinant antibodies. The aim of this work was the generation of llama IgH transgenic mice as a basis for the production of heavy chain antibodies in mice. In a previous work in the Nolte lab at the Institute of Immunology of the UKE, the core region of the *Lama glama* IgH locus had been cloned and sequenced in two overlapping BACs (*bacterial artificial chromosomes*) (Wesolowski, 2011).

In this work, BAC recombineering technology was used to combine the essential elements for the production of heavy chain antibodies in a single DNA construct. Three constructs were generated: TE01 contains one functional V_HH gene, one functional V_H gene, alle D und J elements, the IgM locus, the IgG2b locus, and parts of the mouse 3' locus control region (3'LCR). TE02 contains five additional llama V_HH genes with mouse promoter regions and a larger part of the mouse 3'LCR. TE03 contains the same elements as TE02, but with mouse (instead of llama) exons encoding the transmembrane and membrane-proximal domains of IgM. These constructs were transferred to mice by pronuclear injection. Germline transmission was confirmed for all transgenes. After backcrossing to B cell deficient IgH-KO mice, flow cytometry analyses of blood lymphocytes confirmed that all constructs reconstituted B cell development. The higher fraction of B cells in TE03 mice indicates the functionality of the optimized regulatory elements. To induce an antigen-specific heavy chain antibody response, a TE01 transgenic mouse was immunized with AAV1 (adeno associated virus serotype 1). Three days after the last boost, the VHH repertoire was PCR amplified from lymph node, spleen and bone marrow cDNA, and analyzed by next generation sequencing. The results confirm productive VDJ recombination, class switch from IgM to IgG, the expansion of some B cell clones and extensive somatic hypermutation in some expanded clones. The results of this work provide a novel basis for generating antigen-specific nanobodies from transgenic mice.

1 Einleitung

1.1 Herstellung und Anwendung von therapeutischen Antikörpern

Antikörper (Ak), auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind wichtige Werkzeuge in der Medizin und Forschung (Beck *et al.*, 2010; Brekke *et al.*, 2003; Hudson *et al.*, 2003). Mehr als 60 Produkte, die auf monoklonalen Antikörpern (mAk) basieren, wurde bis zum Jahr 2016 für die Therapie zugelassen. Der weltweite Umsatz im Jahr 2016 betrug etwa \$ 89 Milliarden (Carter *et al.*, 2017), bei gleichbleibendem Wachstum wird für das Jahr 2020 ein Verkaufsvolumen von \$125 Milliarden erwartet (Ecker *et al.*, 2015).

Antikörper bestehen gewöhnlich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die Erkennung des Antigens erfolgt durch die variable Domäne der schweren Kette (VH) im Zusammenspiel mit der variablen Domäne der leichten Kette (VL). Die beiden variablen Domänen werden oberhalb der Gelenkregion (engl.: *hinge-region*) jeweils durch eine konstante Domäne (CH1 und CL) ergänzt. Zusammengenommen werden diese vier Domänen auch als Antigen-bindendes Fragment (engl.: *Fragment antigen binding*, Fab) bezeichnet. Unterhalb der Gelenkregion befindet sich das kristallisierbare Fragment (engl.: *Fragment crytallizable*, Fc), das für die Vermittlung von Effektorfunktionen durch Bindung von Effektorzellen oder Bestandteilen des Komplementsystems verantwortlich ist. Im Menschen findet man 5 verschiedene Immunglobulin-Klassen (IgM, IgD, IgG, IgE und IgA) mit unterschiedlichen Strukturen und Effektorfunktionen.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper wurde erstmals durch Köhler und Milstein im Jahre 1976 beschrieben (Kohler *et al.*, 1976). Bei der als Hybridomatechnik bekannten Methode werden Maus Plasmazellen mit Maus Myelomzellen fusioniert. Das Fusionsprodukt, die sogenannte Hybridomazelle, ermöglicht die Sezernierung großer Mengen Antikörper bei unbegrenzter Teilungsfähigkeit. Murononab-CD3 ist der erste monoklonale Antikörper, der 1986 für die Therapie im Menschen zugelassen wurde. Die murine Herkunft der auf diese Weise hergestellten Antikörper bringt den Nachteil der Immunogenizität und den damit einhergehenden Wirkungsverlust bei wiederholter Anwendung im Menschen mit sich. Um dieses Problem zu umgehen, wurden im Laufe der Jahre verschiedenste Strategien verfolgt (Abb. 1.1).

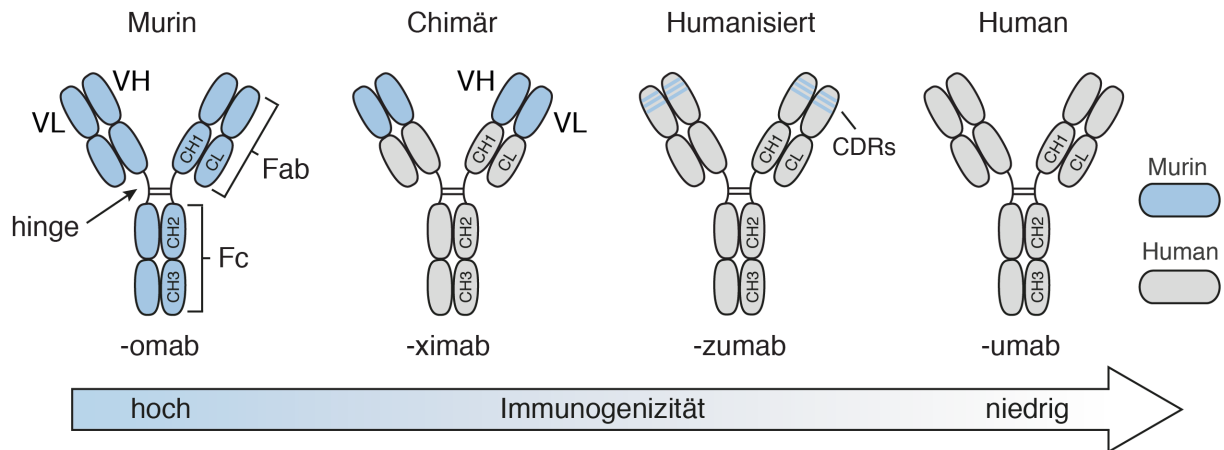


Abb. 1.1 Strategien zur Humanisierung monoklonaler Antikörper.

Abgebildet sind die verschiedenen Entwicklungsschritte der Humanisierung von murinen monoklonalen Antikörpern. Die einfachste Möglichkeit ist die Kombination von murinen variablen Domänen (VH und VL) mit humanen konstanten Domänen (-ximab). Darüber hinaus können humane CDR-Schlaufen auf das Grundgerüst eines murinen Antikörpers transplantiert werden (-zumab). Vollständig humane Antikörper werden aus human-Ig transgenen Tieren gewonnen (-umab). Je größer der Anteil an humanen Sequenzen, desto niedriger ist die potenzielle Immunogenizität bei der Anwendung im Menschen.

Die einfachste Möglichkeit ist die Verwendung von murinen variablen Domänen (VH und VL) in Kombination mit humanen konstanten Domänen. Die auf diese Weise teilhumanisierten Antikörper erkennt man an der Endung „-ximab“. Einer der bekanntesten Vertreter dieser als chimäre Antikörper bezeichneten Gruppe ist der CD20- (engl.: *Cluster of Differentiation 20*) bindende Antikörper Rituximab, der vorwiegend in der Krebstherapie zur Behandlung von malignen Lymphomen eingesetzt wird.

Die nächste Generation therapeutischer Antikörper stellen die humanisierten Antikörper dar. In diesem Fall werden lediglich die an der Antigen-Bindung beteiligten CDR- (engl.: *Complementarity-Determining Region*) Schleifen auf das Grundgerüst eines humanen IgG-Antikörpers übertragen. Ein bekanntes Mitglied dieser Familie mit der Endung „-zumab“, ist der IgE-bindende Antikörper Omalizumab.

Der Prozess der Humanisierung von Antikörpersequenzen wird durch die Herstellung voll-humaner Antikörper, gekennzeichnet durch die Endung „-umab“, abgeschlossen. Die Gewinnung der vollständig humanen Sequenzen erfolgt aus humanen Antikörper-Bibliotheken oder human-Ig transgenen Tieren.

Antikörper-Bibliotheken lassen sich in verschiedene Gruppen aufteilen. Als Immunbibliothek bezeichnet man das IgG Repertoire eines immunisierten Spenders, der bereits eine Immunantwort gegen ein bestimmtes Zielantigen, z. B. einen infektiösen Krankheitserreger, durchlaufen hat (Pelat *et al.*, 2009; Pelat *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009; Trott *et al.*, 2014). Die

darin enthaltenen variablen Domänen weisen somatische Hypermutationen auf, die sich im Verlauf der Affinitätsreifung durch wiederholte Immunisierungen angereichert haben.

Bei naiven Bibliotheken handelt es sich um die variablen Domänen des IgM-Repertoires von B-Zellen eines nicht immunisierten Spenders. Man spricht in diesem Fall von *naiv*, da die Antikörpersequenzen noch keine somatischen Mutationen im Zuge einer Affinitätsreifung erworben haben und sich somit noch in ihrer ursprünglichen Konfiguration befinden. Antikörper naiver Bibliotheken können in verschiedenen Formaten wie z. B. als Fab-Fragment (de Haard *et al.*, 1999) oder Einzelketten-Fragment der variablen Regionen (engl.: *single chain fragment variable*, scFv) (Hust *et al.*, 2011) vorliegen.

Eine weitere Gruppe von Antikörper-Bibliotheken stellen die synthetischen Bibliotheken dar. In diesem Fall werden als Grundgerüst beispielsweise die variablen Domänen eines humanen Antikörpers verwendet und eine oder mehrere CDRs randomisiert (Hayashi *et al.*, 1994; Pini *et al.*, 1998; Tiller *et al.*, 2013).

Zur Selektion von spezifischen Antikörpern aus immunisierten Tieren oder Antikörper Gen-Bibliotheken wurden im Laufe der Jahre verschiedenste Technologien entwickelt. Die älteste und bekannteste Methode ist das sogenannte Phagen-Display. George P. Smith konnte bereits Mitte der 1980er Jahre zeigen, dass Oligopeptide durch Fusion an eines der Hüllproteine des Bakteriophagen M13 auf dessen Oberfläche präsentiert werden können (Smith, 1985). Diese Eigenschaft wurde in der Folge genutzt, um scFv-Fragmente (McCafferty *et al.*, 1990) oder die einzelne variable Domäne von kameliden Schwere-Ketten-Antikörpern (engl.: *variable region of a camelid heavy chain only antibody*, V_HH) (Arbabi Ghahroudi *et al.*, 1997) mittels Phagen-Display Technologie zu selektionieren.

Für jede der genannten Methoden kann das sogenannte *Bio-Panning* zur *in vitro* Selektion von zielstrukturspezifischen Antikörperfragmenten verwendet werden. Im Laufe der Jahre wurden verschiedenste Verfahren zur Immobilisierung des Antigens an unterschiedlichste Oberflächen entwickelt. Die Fixierung erfolgt dabei zum Beispiel auf transfizierten Zellen, an 96-Well Platten (Barbas *et al.*, 1991), Säulen-Matrices (Breitling *et al.*, 1991), Nitrocellulose (Hawlich *et al.*, 2001), Polystyrol (Hust *et al.*, 2002), oder magnetischen Kügelchen (Moghaddam *et al.*, 2003). Nach einer Inkubation der Antikörper-Bibliothek mit dem immobilisierten Antigen werden ungebundene Phagen durch wiederholte Waschschrte entfernt. Je nach Zielsetzung kann durch die Stringenz der Waschschrte die Selektion von Antikörpern unterschiedlicher Affinität beeinflusst werden. Die nach dem Waschen verbleibenden spezifischen Antikörper-Phagen Komplexe können zum Beispiel durch Veränderung des pH-Wertes oder proteolytische

Spaltung eluiert werden. Darüber hinaus ist es möglich, die Affinität der selektionierten Antikörper durch *in vitro* Affinitätsreifung weiter zu steigern (Finlay *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2010).

Monoklonale Antikörper gegen mehr als 30 verschiedene Zielantigene zur Therapie vielzähliger Krankheiten wurden bisher zugelassen. Die meisten Produkte werden für die Therapie von Krebserkrankungen entwickelt (Shepard *et al.*, 2017). Bei bösartigen Entartungen humaner B-Zellen, wie sie im Krankheitsbild der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) vorkommen, hat sich die Therapie mit einem anti-CD20 Antikörper, wie z.B. Rituximab oder Ofatumumab, als sehr effektiv erwiesen (Zhang, 2009). Neben der Krebstherapie leisten monoklonale Antikörper auch in der Therapie von Autoimmunkrankheiten wie rheumatoider Arthritis (Brennan *et al.*, 1989) (Feldmann *et al.*, 2003) und neurologischen Erkrankungen (Bosch *et al.*, 2011) einen wichtigen Beitrag.

Die immense Bedeutung von Antikörper-basierten Produkten für die Medizin spiegelt sich in den seit Jahren stetig steigenden Zahlen an Neuzulassungen wieder. Derzeit sind mehr als 45 monoklonale Antikörper für die Therapie unterschiedlicher Krankheiten zugelassen und allein 50 weitere Produkte befinden sich in der klinischen Phase III (Buss *et al.*, 2012; Ecker *et al.*, 2015; Reichert, 2017). Diese Entwicklung lässt darauf schließen, dass monoklonale Antikörper auch in Zukunft eine wichtige Rolle in der Therapie unterschiedlicher Krankheiten spielen werden.

1.2 Einzeldomänenantikörper aus Kameliden und Knorpelfischen

Zusätzlich zu den heterotetrameren, konventionellen Antikörpern produzieren Lamas und andere Kameliden (Kamele, Dromedare, Alpakas, Vikunjas, Guanakos) homodimere Antikörper, die nur aus zwei schweren Ketten bestehen (Abb. 1.2). Diese ungewöhnlichen Proteine wurden erstmals Anfang der 1990er Jahre im Serum eines Dromedars nachgewiesen (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

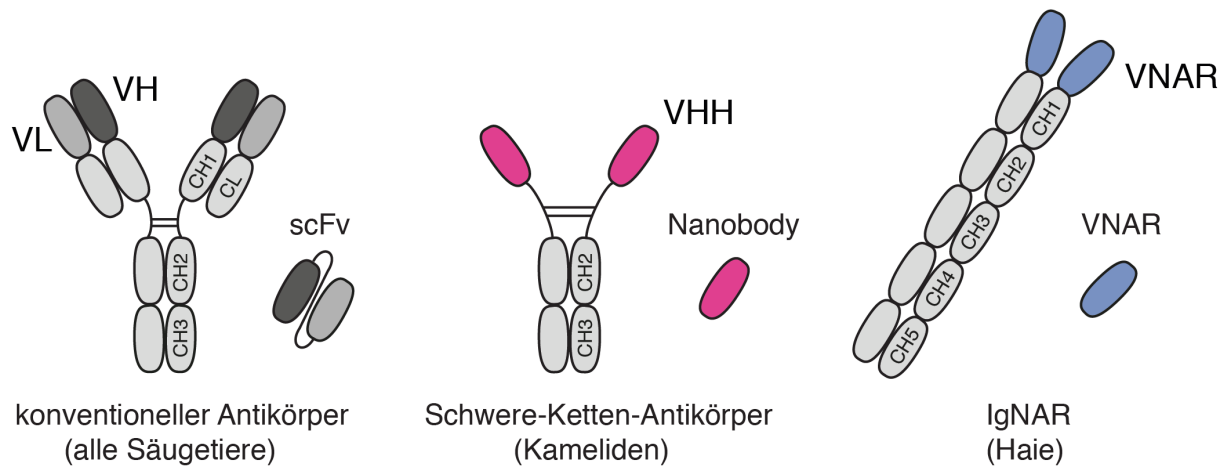


Abb. 1.2 Schematischer Vergleich von konventionellen Antikörpern mit Schwere-Ketten-Antikörpern.

Konventionelle Antikörper bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Der Antigen-bindende Bereich (Paratop) wird in diesem Fall durch die variablen Domänen beider Ketten (VH und VL) kodiert. Im Fall der nur aus zwei schweren Ketten bestehenden Antikörperklassen der Kameliden und Haie wird das Antigen lediglich durch die variable Domäne der schweren Kette (VHH oder VNAR) erkannt.

Die einzelne variable Domäne dieser Antikörper (bezeichnet als VHH oder Nanobody) ist nach der vom Hai stammenden VNAR (engl.: *shark variable new antigen receptor*), die kleinste Antigen-erkennende Domäne, die vom adaptiven Immunsystem erzeugt wird (Zielonka *et al.*, 2015). Die molekulare Grundlage für die Entstehung von Schwere-Ketten-Antikörpern in Kameliden ist die fehlende CH1-Domäne der schweren Kette (Muyldermans *et al.*, 1994). Aufgrund von Spleiß-Mutationen im Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genloкус (IgH-Lokus) werden die CH1-Exone von zwei IgG Isotypen (IgG2b, IgG2c und IgG3) übersprungen (Achour *et al.*, 2008). Da die CH1-Domäne als Bindungspartner maßgeblich an der Verknüpfung von schwerer und leichter Kette beteiligt ist, produzieren Kameliden Antikörper, die nur aus zwei schweren Ketten bestehen. Die Antigenerkennung erfolgt in diesem Fall nur durch die variable Domäne der schweren Kette.

Mit ihrer langen CDR3 können Nanobodies in funktionelle Vertiefungen von Proteinen eindringen, die vom vergleichsweise planaren Epitop konventioneller Antikörper nicht oder nur schlecht erreicht werden können (De Genst *et al.*, 2006; Jahnichen *et al.*, 2010; Maussang *et al.*, 2013). Darüber hinaus verfügen Nanobodies über eine Vielzahl weiterer Vorteile gegenüber den variablen Domänen konventioneller Antikörpern, wie zum Beispiel höhere Stabilität und Löslichkeit, sowie eine bessere Gewebegängigkeit. Die hohe Stabilität der VHHs ist auf ihre Struktur, bestehend aus zwei β -Faltblättern mit insgesamt 9 β -Strängen, zurückzuführen. Die beiden β -Faltblätter sind durch eine konservierte, kanonische Disulfidbrücke über Cystein-Reste in den Gerüstregionen (engl.: *framework*, FR) 1 und 3 miteinander verbunden. Einige VHHs besitzen zusätzlich noch eine zweite Disulfidbrücke, die die CDR3 mit der CDR1

(Lamas) oder der CDR2 (Kamele) verknüpft. Dass Nanobodies außerordentlich gut löslich sind und dabei nicht zur Aggregation neigen, ist auf hydrophile Aminosäuren in der FR2 zurückzuführen. Die Polarität dieser Aminosäuren begünstigt die Wasserlöslichkeit und vermindert zudem die „Klebrigkeit“ der Proteine. In der FR2-Region konventioneller Antikörper findet die Interaktion zwischen VH und VL statt. Die daran beteiligten Aminosäuren in der FR2-Region konventioneller Antikörper sind hydrophob, wodurch die Assoziation zur leichten Kette verstärkt wird (Muyldermans *et al.*, 1994; Wesolowski *et al.*, 2009).

Ein wesentlicher Vorteil von kameliden V_HHs gegenüber den VNARs von Haien ist ihre hohe Sequenzhomologie zu den humanen V_H-Elementen. Eine V_HH unterscheidet sich in ihrer Sequenz von ihrem humanen Gegenstück nur in durchschnittlich 10 von 120 Aminosäuren. Vincke und Kollegen haben gezeigt, dass es möglich ist, die meisten der sich von der humanen Sequenz unterscheidenden Aminosäuren einer V_HH ohne Funktionsverlust zu humanisieren. Das humanisierte V_HH Grundgerüst wurde zudem erfolgreich zur Übertragung weiterer Antigen-Spezifitäten, durch das Einfügen von CDR-Schlaufen anderer Nanobodies, eingesetzt. Auf diese Weise konnte ein universelles Nanobody-Grundgerüst geschaffen werden, das bei verminderter Immunogenizität weiterhin alle vorteilhaften biochemischen Eigenschaften einer VHH aufweist (Vincke *et al.*, 2009).

Bis heute werden die meisten VHHs mithilfe der Phagen-Display Technologie selektioniert, prinzipiell kann dazu aber auch das Hefe-, Bakterien- oder Ribosomen-Display verwendet werden (Arbabi Ghahroudi *et al.*, 1997; Fleetwood *et al.*, 2013; Ryckaert *et al.*, 2010; Yau *et al.*, 2003). In den meisten Fällen wird das VHH-Repertoire aus Blut oder Lymphknoten eines immunisierten Lamas, Alpakas oder Dromedars mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *Polymerase Chain Reaction*, PCR) amplifiziert und in eine Phagen-Display-Bibliothek kloniert. Für die Selektion spezifischer Phagen mittels Bio-Panning wird das Antigen an Zellen, ELISA-Platten oder biotinyliert an Streptavidin-Kügelchen immobilisiert (Wesolowski *et al.*, 2009).

Neben der Gewinnung von rekombinanten Nanobodies aus immunisierten Kameliden, wurde die Entwicklung naiver, semi- und vollsynthetischer VHH-Bibliotheken in den vergangenen Jahren weiter vorangetrieben (Goldman *et al.*, 2006; Monegal *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2014).

Nanobodies lassen sich hervorragend als rekombinantes Protein im *E. coli* Periplasma oder als sekretorisches Protein in Hefe- oder HEK-Zellen produzieren. Die modulare Struktur der VHHs ermöglicht zudem eine problemlose Konvertierung in multivalente Formate, sowie eine einfache Verknüpfung mit funktionellen Gruppen oder Proteinen. Aufgrund der genannten

Vorzüge bieten Nanobodies vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für verschiedene biomedizinische Anwendungen, wie zum Beispiel die Therapie von Krebs, Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen und neurologischen Krankheitsbildern (Saerens *et al.*, 2008).

Die klinische Entwicklung von Nanobodies wird in erster Linie durch die belgische Firma Ablynx vorangetrieben. Der Begriff Nanobody wurde von Ablynx als Handelsmarke für kamelide VHH-Domänen eingeführt. Bis heute wurde allerdings noch kein Nanobody-basiertes Produkt für therapeutische Anwendungen von der FDA (engl.: *Food and Drug Administration*) zugelassen.

Der in der klinischen Entwicklung am weitesten vorangeschrittene Kandidat ist Caplacizumab (ALX-0081), ein bivalentes Konstrukt, bestehend aus zwei humanisierten Nanobodies spezifisch für den von Willebrand Faktor (vWF) (Bartunek *et al.*, 2013). In einer klinischen Phase II- Studie konnte gezeigt werden, dass Caplacizumab die Aggregation von Blutplättchen und die Bildung von Mikroklumpen in Patienten während der akuten, kritischen Phase der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) vermindert (Holz, 2012; Peyvandi *et al.*, 2016). Derzeit durchläuft das Produkt eine klinische Phase III- Studie. Die Markteinführung in Nordamerika und Europa wird für 2018 erwartet.

Ein weiteres vielversprechendes Produkt im Portfolio der Firma Ablynx ist Vobarilizumab (ALX-0061). Dabei handelt es sich um einen Interleukin 6 Rezeptor- (IL6R-) spezifischen Nanobody zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA) oder Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) (Van Roy *et al.*, 2015). Zur Verlängerung der *in vivo* Halbwertszeit wurde der IL6R-Nanobody mit einem zweiten Nanobody, spezifisch für humanes Serum Albumin (HSA), zu einem Dimer kombiniert. In einer 2016 erfolgreich abgeschlossenen klinischen Phase IIb Studie mit 251 RA-Patienten wurde Vobarilizumab eine deutlich höhere Wirksamkeit, verglichen mit Tocilizumab, einer der bisherigen Benchmarks bei der Therapie von RA, bescheinigt (Rinaldi *et al.*, 2017).

Weitere Beispiele Nanobody-basierter Biologika auf dem Weg in die klinische Anwendung zielen auf das Respiratorische Syncytial-Virus (RSV) (Alx-0171; Phase IIb) (Detalle *et al.*, 2015), den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) (Ozoralizumab; Phase IIa), Interleukin 17 A/F (ALX0761/M1095; Phase Ib) und den Liganden des Transmembranrezeptors RANK (engl.: *Receptor Activator of NF- κ B Ligand*, RANKL) (ALX0141; Phase I) ab (Abb. 1.3).

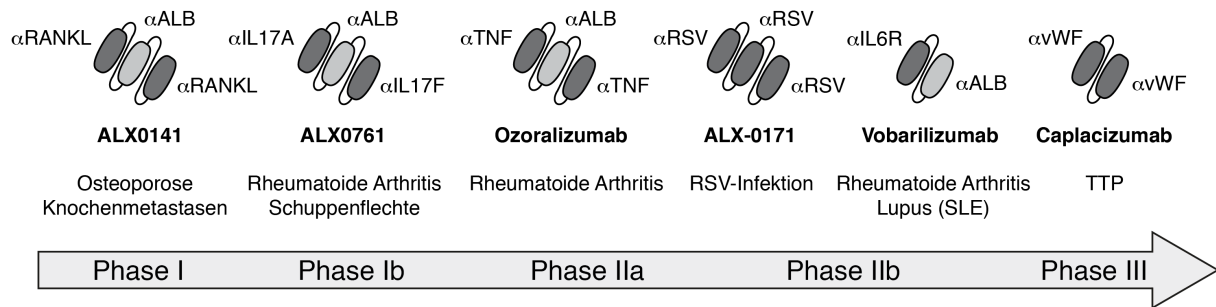
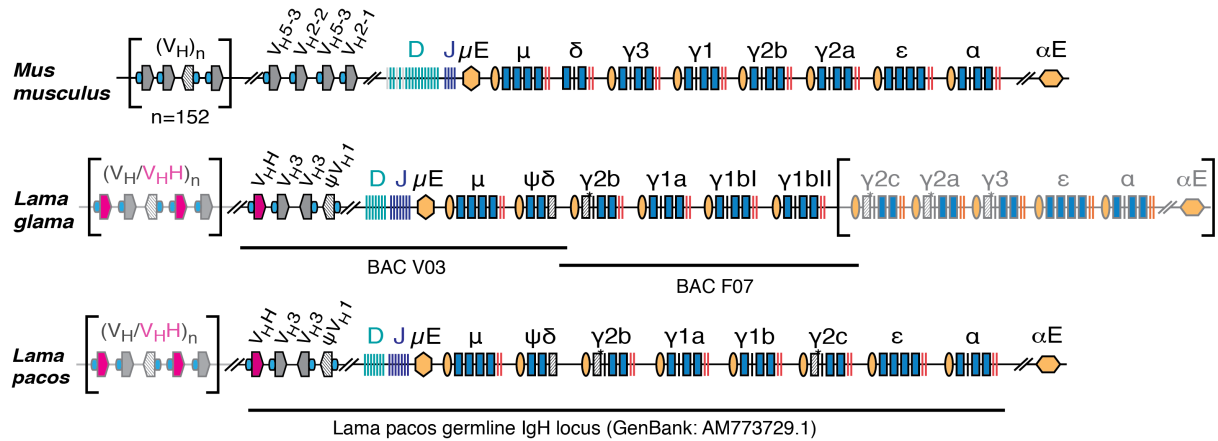


Abb. 1.3 Beispiele für Nanobody-basierte Biologika auf dem Weg in die klinische Anwendung.

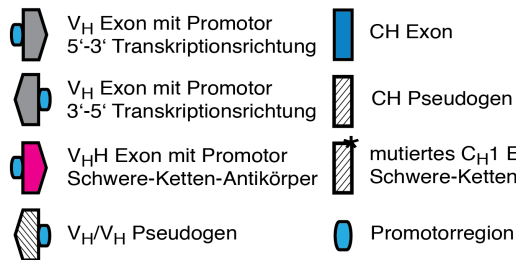
1.3 Der kamelide Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genlocus (IgH-Lokus)

Die im Wesentlichen für die Entwicklung von Schwere-Ketten-Antikörpern verantwortlichen Mutationen traten vermutlich schon in der Familie der Schwielensohler (Tylopoda) auf, deren einzige gegenwärtige Unterfamilie die *Camelidae* ist. Es handelt sich dabei um mutierte Spleißregionen am 3'-Ende der CH1-Domäne mehrerer IgG Isotypen sowie um Mutationen in der FR2-Region einiger V_H-Gene, die eine bessere Löslichkeit der V_H-Domäne in Abwesenheit einer leichten Kette gewähren (Muyldermans *et al.*, 1994). Die defekten Spleißsignale führen dazu, dass die betroffenen Exone während der Transkription übersprungen werden und somit nach Translation im resultierenden Antikörpermolekül fehlen. Da die CH1-Domäne als C_L-Bindungspartner maßgeblich an der Verknüpfung von schwerer und leichter Kette beteiligt ist, produzieren Kameliden Antikörper, die nur aus zwei schweren Ketten bestehen (Nguyen *et al.*, 1999).

Die genetische Information für die Entstehung von Schwere-Ketten-Antikörpern und konventionellen Antikörpern liegt bei den Kameliden auf ein und demselben Genlocus, dem Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genlocus (IgH-Lokus) (Achour *et al.*, 2008). Die Grundstruktur des IgH-Lokus ist bei Kameliden, Menschen, Mäusen und vielen anderen Säugetieren ähnlich aufgebaut (Abb. 1.4).



kodierende Elemente:



regulatorische Elemente:

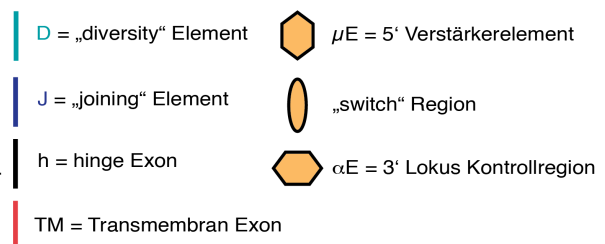


Abb. 1.4 Schematischer Vergleich der IgH-Genloci von Maus, Lama und Alpaka.

Alle Genloci beginnen mit einer unterschiedlichen Anzahl an variablen Domänen gefolgt von D- und J-Elementen sowie dem intronischen Verstärkerelement μ . Daran schließen in jedem Fall konstante Regionen verschiedener Antikörper-Isotypen an. Das Ende wird jeweils durch die 3'-Locus Kontrollregion markiert. Zusätzlich zu den konventionellen Isotypen weisen Alpakas zwei (IgG2b, IgG2c) und Lamas drei (IgG2b, IgG2c und IgG3) konstante Regionen auf, die für Schwere-Ketten-Antikörper codieren. Diese kennzeichnen sich durch eine Spleißmutation im CH1-Exon, wodurch dieses im resultierenden Antikörpermolekül fehlt. Weitere entscheidende Unterschiede findet man im IgD-Lokus. Im Gegensatz zur Maus ist dieser im Fall der Kameliden aufgrund fehlender CH3- und Transmembran-Exone ein Pseudogen (modifiziert nach Wesolowski 2011).

In jedem Fall beginnt der Locus mit einer unterschiedlichen Anzahl an V- (engl.: *variable*), D- (engl.: *diversity*) und J- (engl.: *joining*) Elementen, gefolgt von einer Reihe konstanter Regionen. Die als Translokation-Struktur bekannte Organisation des IgH-Lokus ermöglicht die sequentielle Zusammensetzung der schweren Kette eines Antikörpers aus ihren einzelnen Bestandteilen (Tonegawa, 1983). Während der frühen Phase der B-Zell-Entwicklung wird im Knochenmark ein D- mit einem J-Segment verknüpft, bevor diese an ein V-Element angehängt werden. Der als VDJ-Rekombination bekannte Mechanismus wird durch die Enzyme RAG1/2 (engl.: *Recombination Activated Genes*, RAG) gesteuert. Die Enzyme erkennen DNA-Elemente anhand ihrer Rekombinationssignalsequenz (engl.: *Recombination Signal Sequence*, RSS) und verknüpfen diese zielgerichtet miteinander. Die RSS-Sequenzen, gekennzeichnet durch ihre charakteristische Struktur (Nonamer (9 bp) – *Spacer* (23 bp) – Heptamer (7 bp)), befinden sich jeweils am 3'-Ende eines V-Elements, am 5'- und 3'-Ende eines D-Elements und am 5'-Ende eines J-Segments, wodurch die zielgerichtete Verknüpfung durch RAG1/2

ermöglicht wird. Zusammengenommen kodiert das rekombinierte VDJ-Exon für die variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers. Auf die J-Elemente des IgH-Lokus folgt stromabwärts eine unterschiedliche Anzahl an konstanten Regionen. Dieser Abschnitt beginnt in jedem Fall mit dem IgM- (μ), gefolgt vom IgD- (δ) Locus. Daran schließen sich je nach Spezies unterschiedlich viele IgG- (γ) IgE- (ϵ) und IgA- (α) Isotypen an. Die Verknüpfung der variablen Domäne mit den konstanten Domänen der schweren Kette findet über einen Spleißmechanismus statt. Das J-Element des rekombinierten VDJ-Exons endet auf ein Donor-Spleißsignal und kann auf diese Weise mit dem Akzeptor-Spleißsignal der ersten konstanten Domäne (CH1) des IgM-Lokus verknüpft werden. Aufgrund von defekten CH1-Domänen in einigen kameliden IgG-Regionen, wird das rekombinierte VDJ-Exon in diesen Fällen direkt mit der *hinge*-Region des IgG-Moleküls verknüpft.

Die initiale Transkription des rearrangierten IgH-Lokus resultiert in eine Boten-Ribonukleinsäure (engl.: *messenger ribonucleic acid*, mRNA), die für eine membranständige schwere Kette des IgM-Moleküls codiert. Alternative Spleißmechanismen und Polyadenylierung können zusätzlich sekretorisches IgM und membranständiges IgD erzeugen. Das im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Schwere-Ketten-Bindeprotein (engl.: *Binding immunoglobulin Protein*) BiP/Grp78 bindet an die CH1-Domäne der schweren Kette des IgM-Moleküls und hält sie auf diese Weise im ER zurück, bis BiP/Grp78 durch eine Ersatz-Leichte-Kette (engl.: *surrogate light chain*) ersetzt wird (Vettermann *et al.*, 2006). Die Ersatz-Leichte-Kette repräsentiert durch die Proteine Vpre-B und $\lambda 5$ die variable (VL) und konstante (CL) Domäne der leichten Antikörperkette (Bankovich *et al.*, 2007; Martensson *et al.*, 2007). Der prä-B-Zell-Rezeptorkomplex, bestehend aus der schweren Kette des IgM-Moleküls gepaart mit der Ersatz-Leichte-Kette, wird daraufhin an die Zelloberfläche transportiert und initialisiert dort durch Signalweiterleitung den Rekombinationsmechanismus zur Umordnung der leichten Antikörperkette. Führt dieser Vorgang zu einer funktionalen leichten Kette, ersetzt diese die Ersatz-Leichte-Kette des prä-B-Zell-Rezeptorkomplexes und komplettiert den jetzt funktionalen B-Zell-Rezeptor. Reife B-Zellen verlassen das Knochenmark und können nach Antigen-Kontakt den IgM-kodierenden Genabschnitt durch einen stromabwärts gelegenen Genabschnitt (IgG, IgE oder IgA) ersetzen. Dieser Rekombinationsmechanismus wird als Klassenwechsel (engl.: *Class Switch Recombination*, CSR) bezeichnet (Chowdhury *et al.*, 2004).

Die große Anzahl an unterschiedlichen Antikörpermolekülen wird neben der kombinatorischen Vielfalt vor allem durch junktionale Diversifizierung bestimmt. Im Verlauf der VDJ-

Rekombination kann das D-Element in drei verschiedenen Leserastern in die variable Domäne der schweren Kette eingefügt werden. Verantwortlich dafür ist zum einen das Enzym Desoxynukleotidyltransferase (TdT), das zusätzliche Nukleotide an den Verknüpfungsstellen anfügt. Zum anderen werden durch Exonukleasen Nukleotide entfernt (Subrahmanyam *et al.*, 2010). Weitere Mutationen in der Antikörpersequenz werden nach Antigenkontakt reifer B-Zellen während ihrer Selektion in den Keimzentren der lymphatischen Organe erzeugt. Bei dem als somatische Hypermutation bekannten Prozess, katalysiert die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (engl.: *Activation-Induced Cytidin Desaminase*, AID) die Hydrolyse von Cytidin- zu Uridinresten in spezifischen Abschnitten der DNA Sequenz des Antikörpers. Auf diese Weise werden hochaffine Varianten eines Antigen-spezifischen Antikörpers erzeugt, die in den Keimzentren positiv selektioniert werden.

An der Steuerung der genannten Prozesse sind zwei lymphoid-spezifische, *cis*-regulatorische Elemente maßgeblich beteiligt. Als grundlegende Kontrollmechanismen werden in diesem Zusammenhang die Dekondensation des Chromatins sowie die DNA-Hypomethylierung beschrieben. Beide Mechanismen erleichtern Polymerasen und Transkriptionsfaktoren die Bindung an das Chromatin (Li *et al.*, 2002).

Zwischen dem letzten J-Element und der *switch*-Region des IgM-Lokus befindet sich ein wichtiger Regulator, das intronische Verstärkerelement μ E. Dabei handelt es sich um einen etwa 220 Basenpaar (bp) großen Kernbereich, bestehend aus Transkriptionsfaktorbindestellen, der von zwei Matrix-bindenden Regionen (engl.: *Matrix Attachment Regions*, MARs) flankiert wird. μ E initiiert die D-J und V_H -D-J Rekombination während der frühen Phase der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark und verstärkt zudem die Transkription der rearrangierten schweren Kette in reifen B-Zellen (Marquet *et al.*, 2014).

Am 3'-Ende des IgH-Lokus befindet sich ein weiteres *cis*-regulatorische Element, die 3'Lokus Kontrollregion (engl.: *3'Locus Control Region*, 3'LCR). Aufgrund der Nähe zum IgA-Lokus spricht man auch vom Verstärkerelement α E (engl.: *α Eenhancer*). Die Kontrollregion besteht insgesamt aus 4 DNaseI-hypersensitiven Bereichen (HS3a, HS1,2, HS3b, HS4). Eine wichtige Aufgabe der 3'LCR ist die Steuerung des Klassenwechsels während der B-Zell-Reifung. Dabei initiiert sie die Transkription sogenannter steriler genomischer Transkripte in den *switch*-Regionen der Ig-Isotypen, wodurch der Klassenwechsel vom IgM zu einer der stromabwärts befindlichen konstanten Regionen (IgG, IgE, IgA) gesteuert wird. Anhand von 3'LCR-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die 3'-Lokus Kontrollregion zusätzlich die

Immunglobulin-Synthese verstärkt und eine wichtige Rolle bei der somatischen Hypermutation spielt (Rouaud *et al.*, 2013; Saintamand *et al.*, 2016; Vincent-Fabert *et al.*, 2010).

In der V-Region des kameliden IgH-Lokus findet man zwischen den konventionellen V_H-Elementen V_HH-Elemente, deren Aminosäuresequenz in der FR2 im Laufe der Evolution an die Expression als Schwere-Ketten-Antikörper angepasst wurde. Am besten charakterisiert wurde das kamelide V-Repertoire bisher für das Alpaka (*Lama pacos*). Dazu wurden V-Elemente aus genomischer DNA amplifiziert und sequenziert. Aus 600 Sequenzen konnten 71 V-Elemente der IgHV3 Familie zugeordnet werden, die IgHV2 und IgHV1 Familien waren mit 11 und 6 Mitgliedern deutlich geringer vertreten. Nur die IgHV3 Familie weist neben den V_H-auch V_HH-Unterfamilien auf. Insgesamt konnten für das Alpaka 6 V_HH-Familien mit insgesamt 17 Familienmitgliedern identifiziert werden (Achour *et al.*, 2008).

Auf die V-Region folgen im IgH-Lokus von Lamas und Alpakas 7 D- und 7 J-Elemente (Wesolowski, 2011). Alle 7 D-Elemente und 5 von 7 J-Elementen konnten in exprimierten Immunglobulinen des Alpakas gefunden werden. Lediglich die Segmente J1 und J5 werden vom Rekombinationsapparat nicht verwendet. Alle funktionalen D- und J-Segmente tauchen sowohl in rearrangierten V_H-D-J als auch V_HH-D-J Transkripten auf, was darauf schließen lässt, dass die schweren Ketten von konventionellen und Schwere-Ketten-Antikörpern sich einen Satz an D- und J-Elementen teilen. In jedem Fall ist das J-Element J4 in exprimierten Immunglobulinen deutlich überrepräsentiert (50-70%) (Achour *et al.*, 2008).

In der C-Region des kameliden IgH-Lokus befinden sich konventionelle konstante Regionen mit intakter CH1 in unmittelbarer Nachbarschaft zu konstanten Regionen von Schwere-Ketten-Antikörpern (C_HH) mit defekter CH1. Für das Alpaka (*Lama pacos*) konnten in einer Cosmid-Bibliothek zwei C_HH-Regionen (IgG2b und IgG2c) identifiziert werden (Achour *et al.*, 2008). Im Fall des Lamas (*Lama glama*) wurde ein BAC (F07) kloniert, der einen IgG-Lokus mit defektem CH1-Exon (IgG2b) sowie drei konventionelle IgG-Loci enthält (Wesolowski, 2011). Der stromaufwärts gelegene IgM-Lokus und die stromabwärts gelegenen IgE- und IgA-Isotypen zeigen für alle bisher untersuchten Kameliden konventionelle Strukturen mit intakter CH1-Domäne. Der IgD-Lokus von Lamas und Alpakas unterscheidet sich von seinem humanen und murinen Äquivalent in mehreren Punkten. Er ist durch mehrere *nonsense*-Mutationen in der CH3-Domäne, sowie fehlende Transmembran-Exone gekennzeichnet. Darüber hinaus besitzt der IgD-Lokus eine eigene *switch*-Region, die er vermutlich zusammen mit dem CH1-Exon durch eine regionale Duplikation von Teilen des stromaufwärts liegenden IgM-Lokus erworben hat (Achour *et al.*, 2008; Wesolowski, 2011).

Früh in ihrer Entwicklung durchlaufen B-Zellen einen kritischen Schritt, indem sich die schwere IgM-Kette mit der Ersatz-Leichte-Kette paart, um an die Zelloberfläche transportiert zu werden und dort durch Signalweiterleitung die Synthese der leichten Kette zu initiieren. Findet keine Expression dieses prä-B-Zell-Rezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche statt, führt dies zur Unterbrechung der B-Zell-Entwicklung. Dieses Phänomen wurde Anfang der 1990er Jahre anhand von sogenannten μ MT-Mäusen untersucht, deren IgM-Transmembranregionen gezielt entfernt wurden (Kitamura *et al.*, 1991).

Es ist unklar, ob die Schwere-Ketten-Antikörper produzierenden B-Zellen der Kameliden den IgM⁺-Status durchlaufen oder ob dieser durch einen frühen Klassenwechsel im Knochenmark zu einem der Schwere-Ketten-IgG-Isotypen übersprungen wird (Achour *et al.*, 2008).

1.4 Herstellung von konventionellen Antikörpern in transgenen Tieren

Mäuse und Ratten haben sich als bevorzugte Tiere zur Herstellung von Antikörpern etabliert. Neben der geringen Größe und den damit einhergehenden niedrigen Haltungskosten sind diese Tiere einfach gentechnisch zu verändern. Entsprechende Technologien, wie die Mikroinjektion von DNA in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) oder Oozyten (Nagy, 2003), sowie die CrisprCas9-Technologie (Jinek *et al.*, 2012) zur gezielten Inaktivierung von Genen, sind erfolgreich etabliert. Dadurch besteht die Möglichkeit, *knockout*-Linien für therapeutisch interessante Zielantigene herzustellen, deren Immunsystem Antikörper gegen konservierte Epitope auf der humanen Variante des Zielantigens induzieren kann. Außerdem sind wichtige Antikörpertechnologien, wie die Fusion von Antikörper-produzierenden Plasmazellen mit Myelomzellen (Hybridoma-Technik) (Kohler *et al.*, 1976) sowie die Phagen-Display Technologie (McCafferty *et al.*, 1990), am besten für diese Tiere etabliert.

Die ersten transgenen Mäuse zur Produktion von humanen Antikörpern wurden Ende der 1980er Jahre hergestellt. Dazu wurde ein Mini-Genloкус, bestehend aus nicht-rearrangierten humanen V_H, D und J Elementen sowie dem humanen μ -Lokus, auf das Mausgenom übertragen (Abb. 1.5 A). Da diese Mäuse zusätzlich zum Transgen noch intakte endogene Antikörper-Genloci trugen, konnten nur auf etwa 4 % der B-Zellen IgM-Antikörper mit humanen schweren Ketten nachgewiesen werden (Bruggemann *et al.*, 1989).

In den Folgejahren haben entscheidende technologische Fortschritte im Bereich der Mikroinjektion von DNA in Eizellen sowie die Verwendung von ES-Zellen dazu geführt, dass immer größere DNA-Konstrukte (Plasmide, Cosmide, BACs, YACs) auf das Mausgenom übertragen werden konnten. Parallel dazu wurden die ersten *knockout*-Linien für den

endogenen IgH-Lokus (Chen *et al.*, 1993; Jakobovits *et al.*, 1993; Kitamura *et al.*, 1991) sowie die endogenen Genloci für die leichten Ketten Igλ und Igκ (Chen *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 1993) entwickelt. Auf diese Weise konnten Mauslinien erzeugt werden, deren Antikörperrepertoire ausschließlich durch die eingebrachten Transgene für die schweren und leichten Antikörperketten bestimmt wurde (Abb. 1.5).

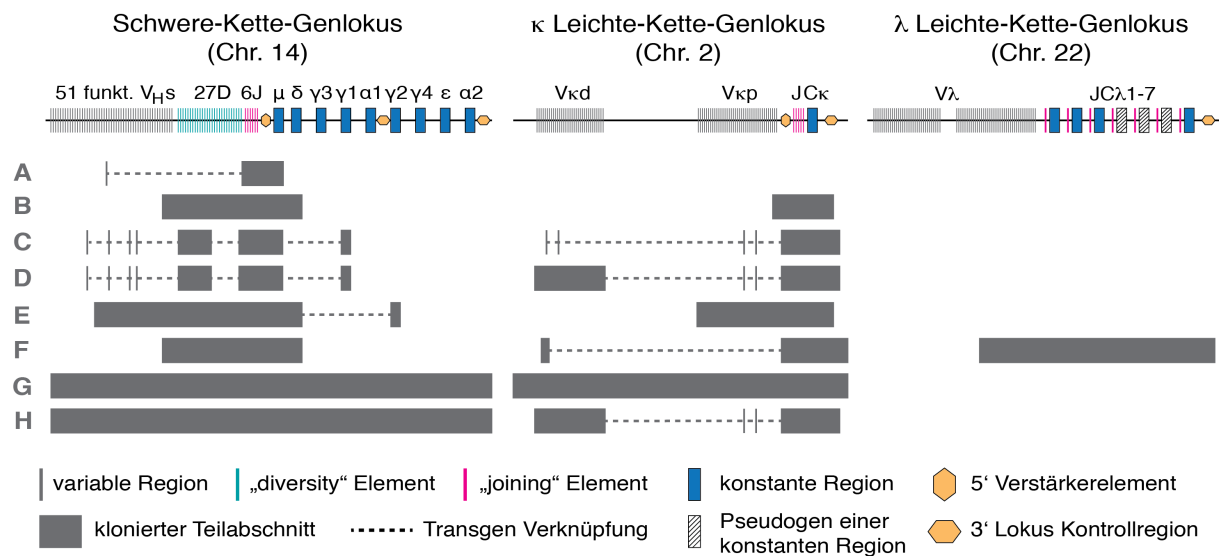


Abb. 1.5 Klonierte Abschnitte humaner Ig-Genloci zur Herstellung human Ig-transgener Mäuse.

Die Genloci für die schwere und die beiden leichten Antikörperketten sind schematisch dargestellt. Die darunter befindlichen Balken symbolisieren die Teilabschnitte der jeweiligen Loci, die auf Mäuse übertragen wurden. A-H stehen für die Publikationen, in denen die aus den abgebildeten Genabschnitten hervorgegangenen, transgenen Mäuse beschrieben werden: Bruggemann *et al.*, 1989 (A), Green *et al.*, 1994 (B), Lonberg *et al.*, 1994 (C), Fishwild *et al.*, 1996 (D), Mendez *et al.*, 1997 (E), Nicholson *et al.*, 1999 (F), Tomizuka *et al.*, 2000 (G), Ishida *et al.*, 2002 (H) (modifiziert nach Wesolowski, 2011).

Die ersten Mäuse, die humane Transgene auf einem genetischen Hintergrund mit inaktivierten endogenen Immunglobulin-Genloci genutzt haben, waren die „XenoMouse“ von Cell Genesys, Inc. (heute Teil von Amgen) sowie die „HuMAb-Mouse“ von Genpharm, Inc. (heute Teil von Bristol-Meyers Squibb). Beide Linien wurden in der Folge kommerziell genutzt und haben bis heute eine Vielzahl an voll-humanen, therapeutischen Antikörpern hervorgebracht.

Im Fall der XenoMouse wurden 2 YACs durch Fusion von Hefe Spheroplasten mit Maus ES-Zellen in das Mausgenom integriert. Die übertragenen Konstrukte codierten für Kernregionen des IgH- und Igκ-Lokus (Abb. 1.5 B). Nach Rückkreuzung auf Ig-KO Mäuse und Immunisierung mit humanem IgE konnten Antigen-spezifische humane Antikörper aus den Mäusen isoliert werden (Green *et al.*, 1994). Zur Weiterentwicklung der XenoMouse wurden deutlich größere Bereiche des IgH- und Igκ-Lokus mithilfe der YAC-Rekombination zusammengefügt und auf Mäuse übertragen (Abb. 1.5 E). Vor allem die größere Anzahl an variablen Domänen in den beiden Loci brachte eine deutliche Steigerung der Antikörper-

Diversität mit sich (Mendez *et al.*, 1997). Später durchgeführte Modifikationen umfassten den Austausch des humanen IgD-Lokus gegen 3 humane IgG-Isotypen (IgG1, IgG2 und IgG4), sowie das Einbringen des humanen Ig λ -Lokus. Der erste von der FDA zugelassene, voll-humane Antikörper aus einer transgenen Maus wurde durch Immunisierung der XenoMouse hergestellt. Dabei handelt es sich um den EGFR- (engl.: *Epidermal Growth Factor Receptor*) spezifischen Antikörper Vectibix (panitumumab), der zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird (Jakobovits *et al.*, 2007).

Parallel zur Entwicklung der XenoMouse arbeitete Genpharm an der HuMAb-Mouse. Die erste Generation dieser Mäuse enthielt molekularbiologisch erzeugte Minimalkonstrukte des humanen IgH- und Ig κ -Lokus (Abb. 1.5 C). Nach Rückkreuzung auf Ig-KO Mäuse zeigten die Miniloci-tragenden Mäuse eine rekonstituierte Reifung von B-Zellen und produzierten spezifische Antikörper nach Immunisierung mit humanem CD4 (engl.: *cluster of differentiation 4*) (Lonberg *et al.*, 1994). Um der geringen Diversität, resultierend aus der niedrigen Anzahl an variablen Domänen, entgegenzuwirken, wurde der Ig κ -Lokus durch ein 450 kb großes YAC-Fragment mit 23 zusätzlichen V κ -Elementen ergänzt (Abb. 1.5 D). Das Antikörper-Repertoire dieser optimierten Mäuse wies eine deutlich höhere Diversität auf. Nach Immunisierung mit humanem CD4 konnten mithilfe der Hybridoma-Technik erneut Antigen-spezifische Antikörper erzeugt werden (Fishwild *et al.*, 1996).

Basierend auf diesen Arbeiten wurden in der Folgezeit weitere transgene Mäuse entwickelt. Der Gruppe um Marianne Brüggemann am Babraham Institut in Cambridge gelang es dabei als erstes, YAC-Fragmente aller 3 humanen Immunglobulin-Loci (IgH, Ig κ , Ig λ) in einer Maus zu vereinen (Abb. 1.5 F) und diese auf einen IgH- und Ig κ -KO Hintergrund rückzukreuzen (Nicholson *et al.*, 1999).

Die Entwicklung der Mikrozell-vermittelten Chromosomentransfers in Maus ES-Zellen machte es in den Folgejahren möglich, immer größere Konstrukte von humanen Chromosomenfragmenten (hCFs) bis hin zu vollständigen Chromosomen auf Mäuse zu übertragen (Kuroiwa *et al.*, 2000; Kuroiwa *et al.*, 2002). Mit dieser Methode gelang es der Kirin Brewery Company, Ltd (heute Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd), zwei humane Chromosomenfragmente mit dem vollständigen IgH- und Ig κ -Lokus auf eine Maus zu übertragen (Abb. 1.5 G). Nach Rückkreuzung auf einen endogenen IgH- und Ig κ -KO Hintergrund produzierten diese TransChromo (TC) Mouse genannten Mäuse ausschließlich humane Antikörper (Tomizuka *et al.*, 2000). Die Technologie des Chromosomentransfers brachte jedoch auch erhebliche Nachteile, wie zum Beispiel den Verlust des Transchromosoms

während der Meiose und Mitose, mit sich (Kakeda *et al.*, 2005). Im Fall der TC Mouse betraf die Instabilität in erster Linie das Ig κ Chromosomenfragment, was durch Kreuzung mit der HuMAb Maus (Abb. 1.5 H) weitgehend behoben werden konnte (Ishida *et al.*, 2002).

Ein vollkommen neuer Ansatz wurde durch Regeneron Pharmaceuticals, Inc zur Herstellung ihrer VelocImmune Maus verfolgt. In diesem Fall wurden durch sequentielle, zielgerichtete Modifikation die murinen variablen Domänen des IgH- und Ig κ -Lokus gegen humane Varianten ausgetauscht (Macdonald *et al.*, 2014). Die resultierenden Mäuse produzierten folglich chimäre Antikörper mit humanen variablen Domänen und murinen Fc-Regionen. Die Nutzung der endogenen Genloci in Kombination mit der Verwendung von murinen Fc-Regionen brachte höhere Antikörpertiter und eine robustere Immunantwort mit sich (Murphy *et al.*, 2014).

Bis heute wurden bereits mehr als 7 humane Antikörper aus den genannten Mäusen für therapeutische Anwendungen im Menschen zugelassen und über 30 weitere befinden sich in klinischen Studien. Immer mehr Firmen stellen inzwischen eigene transgene Mäuse zur Produktion von therapeutischen Antikörpern her. Beispiele dafür sind die Trianni Mouse (Trianni, Inc.) die KyMouse (Lee *et al.*, 2014), die H2L2-Mouse (Harbour BioMed), sowie die Omni-Mouse (Ligand Pharmaceuticals, Inc.). Um die Herstellung bispezifischer Antikörper zu erleichtern, hat Merus die Memo-Mouse (Merus) mit einer fixierten leichten Kette entwickelt. Neben Mäusen werden zusehends auch andere Spezies zur Herstellung von humanen therapeutischen Antikörpern genutzt. Beispiele für transgene Ratten sind OmniRat (Ma *et al.*, 2013; Osborn *et al.*, 2013) und OmniFlic (fixierte leichte Kette) von Ligand Pharmaceuticals. Neben Mäusen und Ratten werden inzwischen auch Kaninchen (Flisikowska *et al.*, 2011), Kühe (Hooper *et al.*, 2014; Matsushita *et al.*, 2014; Sano *et al.*, 2013) und Hühner (Collarini *et al.*, 2015) zur Herstellung humaner Antikörper genutzt.

Die Immunisierung bringt, neben der klonalen Expansion von B-Zellen, die Selektion und Anreicherung von Antigen-spezifischen Molekülen als entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Methoden mit sich. Das Antikörperrepertoire eines immunisierten Tieres enthält üblicherweise einen viel größeren Anteil an spezifischen Molekülen mit hoher Affinität zum Ziel-Antigen im Vergleich zu Bibliotheken, die nicht aus einer Immunisierung hervorgegangen sind (Lim *et al.*, 2016). Aus diesen Gründen ist davon auszugehen, dass die Entwicklung und Nutzung von transgenen Tieren zur Herstellung von therapeutischen Antikörpern bei weitem noch nicht abgeschlossen ist.

1.5 Herstellung von Schwere-Ketten-Antikörpern in transgenen Tieren

Bereits Mitte der 2000er Jahre wurden erste Untersuchungen zur Expression von Schwere-Ketten-Antikörpern in Mäusen durchgeführt. Dazu wurde ein Minimalkonstrukt, bestehend aus einer rearrangierten kameliden variablen Domäne ($V_{\text{H}}\text{H-D-J}$), gefolgt vom Dromedar Verstärkerelement μE und dem Dromedar Schwere-Ketten-Isotyp IgG2a, in NOS-Myelomzellen (Nguyen *et al.*, 2003) und Mäuse (Zou *et al.*, 2005) eingebracht. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass Mäuse membrangebundene und sekretorische, homodimere IgG-Moleküle produzieren können, ohne vorher einen IgM^+ -Status durchlaufen zu müssen.

Janssens *et al.* haben kurze Zeit später eine Serie an transgenen Mäusen zur Untersuchung der molekularen Grundlage für die Produktion von Schwere-Ketten-Antikörpern hergestellt (Janssens *et al.*, 2006). Dazu wurden chimäre Konstrukte aus zwei nicht-rearrangierten, genomischen Lama $V_{\text{H}}\text{H}$ -Gene, gefolgt von humanen D- und J-Elementen, sowie unterschiedlichen Konfigurationen der humanen Genloci für IgM, IgD, IgG2 und IgG3 auf B-Zell-defiziente Mäuse übertragen. Ein intakter IgM-Lokus im Konstrukt führte dabei zur Unterbrechung der B-Zell-Entwicklung, da die korrekte Zusammensetzung des membrangebundenen IgM-Moleküls durch die Anwesenheit der $V_{\text{H}}\text{H}$ -Domäne gestört wurde. Erst die Entfernung der CH1-Domäne oder des gesamten IgM-Lokus führte, in Kombination mit der Entfernung der CH1-Domänen der IgG-Loci, zur Entwicklung reifer B-Zellen. Das alleinige Einfügen der kameliden CH1-Spleißmutationen hat in der Maus nicht zu einer Entfernung der CH1-Domänen geführt. Entsprechende transgene Mäuse haben folglich keine reifen B-Zellen entwickelt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Reifung von IgG-produzierenden B-Zellen auch in Abwesenheit eines IgM-Lokus möglich ist. Die Anwesenheit des IgM-Lokus mit intakter CH1-Domäne führt dagegen nach Kombination mit einer kameliden $V_{\text{H}}\text{H}$ -Domäne zur Unterbrechung der B-Zell-Entwicklung, da die Zusammensetzung eines intakten B-Zell-Rezeptors sowie dessen Präsentation auf der Zelloberfläche gestört wird. Nach Immunisierung transgener Mäuse ohne IgM-Lokus und ohne CH1-Domänen in den IgG-Loci, konnten Antikörperantworten gegen verschiedene Modellantigene, wie zum Beispiel lösliche Proteine und Viren, nachgewiesen werden. Die Klonierung und Sequenzierung spezifischer Klone wies eine produktive $V_{\text{H}}\text{H-D-J}$ Rekombination sowie eine effiziente somatische Hypermutation auf (Janssens *et al.*, 2006).

Basierend auf der Arbeit von Janssen *et al.* hat das niederländische *Startup* Harbour Antibodies (heute Harbour BioMed) weitere Schwere-Ketten-Antikörper produzierende transgene Mäuse entwickelt. Dazu wurden die Lama $V_{\text{H}}\text{H}$ -Domänen gegen humane $V_{\text{H}}3$ -Regionen ausgetauscht

und die humanen konstanten Regionen durch murine Varianten ersetzt (Drabek *et al.*, 2016). Durch die Verwendung von murinen konstanten Regionen wird die Präsentation und Signalweiterleitung der Immunglobuline auf B-Zellen verstärkt, was einen effizienteren Klassenwechsel sowie eine gesteigerte somatische Hypermutation zur Folge hat (Abb. 1.6).

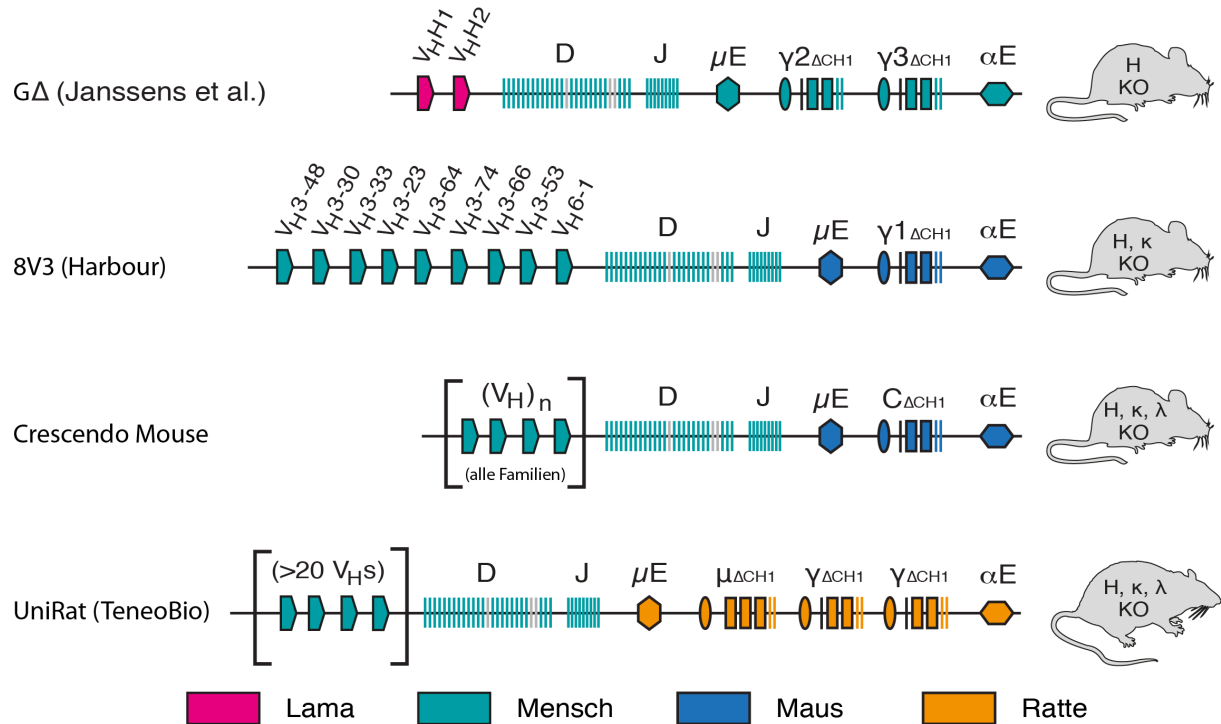


Abb. 1.6 Konstrukte zur Produktion von Schwere-Ketten-Antikörpern in transgenen Mäusen und Ratten. Janssens et al. übertrugen ein Konstrukt bestehend aus zwei Lama V_{HH} s, humanen D- und J-Elementen sowie den konstanten Regionen IgG2 und IgG3 mit entfernten CH1-Domänen auf B-Zell-defiziente μ MT Mäuse. Harbour Antibodies verwendete zur Herstellung der 8V3-Maus 8 humane V_{H3} s in Kombination mit der murinen IgG1-Region ohne CH1-Domäne. Die resultierenden transgenen Mäuse wiesen einen IgH- und Igk-*knockout* auf. Ein ähnliches Konstrukt wurde von Crescendo auf eigens hergestellte *Tripple-Knock-Out* (TKO) Mäuse (IgH-, Igk- und Igλ-KO) übertragen. Ein wesentlicher Unterschied besteht in Anzahl und Zusammensetzung der verwendeten V_H Familien. Während Harbour Antibodies nur V_{H3} s verwendet, enthält das Transgen von Crescendo eine nicht genannte Anzahl an V_{HS} aller Familien. Zur Herstellung der UniRat wurden über 20 humane V_{HS} , humane D- und J-Elemente mit 3 konstanten Regionen der Ratte ohne CH1-Domänen kombiniert und auf eigens hergestellte *Tripple-Knock-Out* (TKO) Ratten (IgH-, Igk- und Igλ-KO) übertragen.

Das 2009 aus dem Londoner Babraham Institut hervorgegangene *Startup* Crescendo Biologics hat ebenfalls eine V_H -Plattform (Humabody) zur Produktion von humanen Schwere-Ketten-Antikörpern in transgenen Mäusen entwickelt. Die Firma hat dazu ein Transgen aus humanen V_H -, D- und J- Elementen, gefolgt von murinen konstanten Regionen durch YAC-Rekombination assembliert und auf eigens hergestellte *Tripple-Knock-Out*- (TKO-) Mäuse (IgH-, Igk- und Igλ-KO) übertragen.

Zusätzlich zu den transgenen Mäusen wurde dieselbe Technologie inzwischen auch für Ratten in Form der UniRat von Open Monoclonal Technologies (OMT) (heute Ligand Pharmaceuticals, Inc) etabliert. In diesem Fall wurde ein Konstrukt aus humanen V_{H3} -, D- und

J-Elementen, gefolgt von konstanten Regionen der Ratte mit entfernten CH1-Domänen auf eigens hergestellte Immunglobulin *knockout* Ratten (IgH-, Igκ- und Igλ-KO) (Menoret *et al.*, 2010; Osborn *et al.*, 2013) übertragen.

Die genannten Beispiele für die Produktion von therapeutischen Schwere-Ketten-Antikörpern in transgenen Mäusen und Ratten haben gemeinsam, dass variable Domänen humanen Ursprungs (vorzugsweise humane V_H3-Regionen) verwendet werden. Aufgrund ihrer hydrophoben FR2-Regionen neigen humane VH-Domänen jedoch häufig zur Aggregation, bzw. Bindung an freie leichte Ketten. Dieses erschwert die klinische Entwicklung von humanen VH tragenden Schwere-Ketten-Antikörpern. Die V_HH-Domänen kamelider Spezies wurden durch 50 Millionen Jahre Evolutionsgeschichte an die Expression als Schwere-Ketten-Antikörper angepasst. Die daraus hervorgegangenen, biochemischen Eigenschaften (hohe Stabilität, Löslichkeit und gute Gewebepenetration *in vivo*) zeichnen sie im Vergleich zu humanen V_H-Domänen aus. Die hohe Stabilität und gute Löslichkeit der V_HHs verhindert deren Aggregation und bringt damit erhebliche Vorteile für die therapeutische Anwendung mit sich. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung von Lama IgH-transgenen Mäusen als Basis für die Gewinnung von besser löslichen Nanobodies und Nanobody-basierter Schwere-Ketten-Antikörpern. Eine Humanisierung dieser Antikörper wäre technisch einfach *ex-vivo* zu bewältigen, nämlich durch Austausch der *hinge*-, CH2- und CH3-Domänen sowie ggf. durch zielgerichtete Mutation einzelner Aminosäuren der VHH Domäne (Vincke *et al.*, 2009).

1.6 Adeno-Assoziierte Viren (AAVs) in der Gentherapie

Adeno-assozierte Viren (AAVs) gehören zur Familie der *Parvoviridae* und wurden erstmals Mitte der 60er Jahre beschrieben (Atchison *et al.*, 1965). Die hohe Transduktionseffizienz für verschiedene Zell- und Gewebetypen (Muller *et al.*, 2003), gepaart mit einem ausgezeichneten Sicherheitsprofil (Afione *et al.*, 1996), haben Adeno-assozierte virale Vektoren (AAV-Vektoren) für gentherapeutische Anwendungen etabliert. Die AAV-Technologie wurde in der Klinik bereits für einige Erkrankungen, wie z. B. Gerinnungsstörungen, angeborener Erblindung und neurodegenerativen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt (Colella *et al.*, 2018). Bisher wurden AAV-Vektoren hauptsächlich aus den natürlicherweise vorkommenden Serotypen erzeugt (Asokan *et al.*, 2012; Balakrishnan *et al.*, 2014). Die Klassifizierung der 12 Serotypen ist auf Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Kapsidproteine zurückzuführen. In den letzten Jahren wurden rekombinante AAV-Vektoren (rAAVs) mit modifizierten Kapsiden hergestellt, um die Zellspezifität von AAVs für bestimmte Zelltypen

zu verbessern oder zu begrenzen (Munch *et al.*, 2013; Weinmann *et al.*, 2017). Eine weitere Strategie zur Steuerung der Zellspezifität ist die Verwendung von Adaptern zwischen dem AAV und einem Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle (Bartlett *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wird AAV als Modellantigen zur Induktion von Schwere-Ketten-Antikörpern in Lama IgH-transgenen Mäusen eingesetzt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Übertragung der essentiellen Abschnitte des Lama IgH-Lokus auf B-Zell-defiziente Mäuse als Basis für die Herstellung von Lama Nanobodies und Schwere-Ketten-Antikörpern in Mäusen. In Vorarbeiten der AG Nolte waren die Kernelemente des *Lama glama* IgH-Lokus bereits in zwei überlappende BACs (*bacterial artificial chromosomes*) kloniert und sequenziert worden (Wesolowski, 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollen die essentiellen Elemente für die Produktion von Schwere-Ketten-Antikörpern auf einem DNA-Abschnitt mittels BAC-Rekombination vereint werden (ein V_{HH} -Gen, ein V_H -Gen, alle D- und J-Elemente, ein modifizierter IgM-Lokus, ein IgG2b-Lokus, sowie ein Teil der Maus 3'LCR). Darüber hinaus sollen zwei weitere optimierte BACs generiert werden (durch Einfügung von zusätzlichen Lama V_{HH} -Genen mit Maus Promotoren, einem größeren Teil der Maus 3'LCR, sowie von Maus-Exonen für die Transmembran- und membranproximalen Domänen von IgM). Diese DNA-Konstrukte sollen durch pronukleäre Injektion auf Mäuse übertragen werden. Nach Rückkreuzung auf B-Zell-defiziente IgH-KO Mäuse, sollen Nachkommen mittels Durchflusszytometrie von Blut-Lymphozyten auf die Rekonstitution ihrer B-Zell-Entwicklung untersucht werden. Schließlich sollen Schwere-Ketten-Antikörper durch Immunisierung einer transgenen Maus mit AAV1 (Adeno Assoziiertes Virus Serotyp 1) induziert werden. Durch Tiefensequenzierung des PCR-amplifizierten VHH-Repertoires aus Lymphknoten, Milz und Knochenmark soll überprüft werden, ob in den transgenen Tieren eine produktive VDJ-Rekombination, ein Klassenwechsel von IgM zu IgG, eine klonale Expansion von B-Zellen, sowie somatische Mutation erfolgt.

3 Materialien

3.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaage	Type 1412	Sartorius
Autoclav	Varioclave	H+P Labortechnik
Bioanalyzer	Agilent 2100	Agilent
DNA Gelelektrophorese	40-0708	Peqlab biotechnology
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Biosciences
Elektroporationsgerät	MicroPulser	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Heizblock / Thermoschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf
Homogenisator	Tissue Lyser II	Qiagen
Inkubationsschüttler	HT INFORS	Unitron
Inkubator	B6060	Heraeus
Kanülen	Verschiedene Größen	Braun
Mikrowelle	M 637 EC	Miele
NGS-Maschine	MiSeq	Illumina
PCR-Maschine	T3	Biometra
pH-Meter		Mettler
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c	Peqlab biotechnology
Pipetten	Research-Linie	Eppendorf
Pipettierhilfe		Integra
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Xcell II MiniCell	Invitrogen
Spannungsgeräte	BI0105 LVD	Biometra
	Power Pac 200	BioRad
Sterile Werkbänke	BSB4	GELAIR
	HeraSafe	Heraeus
Transilluminator	Type TI 1	Biometra
Vortex		Neolab
Wasserbad	Type 1007	Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifugen	Rotanta 460 R	Hettich
	5417R	Eppendorf
	5430	Eppendorf
	Biofuge pico	Heraeus

3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Name	Firma
Einwegpipetten steril	versch. Größen	BD Biosciences
Elektroporationsküvetten	Gene pulser 0,1 cm	Bio-Rad Laboratories, Inc.
FACS Tubes	Rundbodenröhrchen 12 x 75 ml	FALCON (Corning)
Kulturschalen	10 cm, 25 cm	Greiner Bio-One
Heparin Tubes	Micro tube 1,3 ml LH	Sarstedt
Metallkügelchen	Tungsten Carbide beads	Qiagen
Parafilm		VWR
Pipettenspitzen, div. Größen	Tipstack	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Safeseal, 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Sterilfiltrationsapparaturen	Steriflip, Stericup	Millipore
Untersuchungshandschuhe	Perform	Aurelia
Zellsieb	Cell Stainer 70 µm Nylon	FALCON (Corning)
Zentrifugenröhrchen, steril	Cellstar Tubes, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One

3.3 Reagenzsysteme (Kits)

Anwendung	Name	Firma
Gelextraktion	Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
PCR-Aufreinigung	Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
PCR-Klonierung	CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas
Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
BAC-Präparation	PhasePrep BAC DNA Kit	Sigma Aldrich
RNA-Präparation	InnuPrep RNA Mini Kit	Analytik Jena
Genotypisierung	Platinum Blue PCR SuperMix	Thermo Fischer Scientific

3.4 Chemikalien

Chemikalie	Firma
2xYT	BD/Difco
Agar	BD/Difco
Agarose	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	Braun
Bacto-Agar	Gibco-BRL
Bacto-Hefeextrakt	Gibco-BRL
Bacto-Trypton	Gibco-BRL
BSA	PAA
Carbenicillin	Serva
DMSO	Merck
DNA-loading dye 6x	Fermentas
dNTPs	Invitrogen
DTT	Invitrogen
EDTA	Calbiochem
Ethanol, reinst, getrocknet	Merck
Ethanol, vergällt	Walter CMP GmbH
FACS-Lysing Solution	BD
Firststrand-Buffer	Invitrogen
GeneRuler 1 kb-DNA-Ladder	Fermentas
Hexamere	Invitrogen
Isopropanol	Carl Roth
Kanamycin	Novagen
KOD-Puffer	Novagen
L-Arabinose	Carl Roth
LB Agar	BD/Difco
LB Broth	BD/Difco
3M Natriumacetat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Baker
PBS	Gibco
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth
RNaseOut	Invitrogen
Roti Gel-Stain	Carl Roth
SDS	Serva
SOC-medium	Sigma Aldrich
Spermidine	Sigma Aldrich
Spermine	Sigma Aldrich
Sucrose	Merck
TAE, DNA typing grade, 50x	Invitrogen
Tris-Base	Sigma Aldrich
Tris-Cl	Sigma Aldrich

3.5 Medien

Medium	Zusammensetzung
2xYT	31 g/l in de-ionisiertem Wasser
2xYT-Agar	2xYT, 30 g/L Agar
LB	25 g/l in de-ionisiertem Wasser
LB-Agar	30.5 g/l in de-ionisiertem Wasser
NoSalt-Medium	0,5 % Hefeextrakt 1 % Tryptone
SOC-Medium	0.5 % Hefeextrakt 2 % Trypton 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose

3.6 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
BAC-Injektionspuffer	10 mM Tris, pH 7,5 0,5 mM EDTA 30 nM Spermine 70 nM Spermidine 0,1 M NaCl
low TE	10 mM Tris-Cl 0,1 mM EDTA
Lysepuffer (Gewebe-lyse von Maus-Biopsien)	0,1 M Tris-Base 0,5 mM EDTA 0,2 M NaCl 0,2 % SDS 100 µg/ml Proteinase K

3.7 Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Vorratslösung	Endkonzentration
Carbenicillin	Aqua ad iniectabilia	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol absolut	34 mg/ml	15 µg/ml
Kanamycin	Aqua ad iniectabilia	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin	Aqua ad iniectabilia	50 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	Aqua ad iniectabilia	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	50 % Ethanol	10 mg/ml	10 µg/ml

3.8 Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
Maus CD19	1D3	FITC	eBioscience
Maus CD3	17A2	BV421	BioLegend
Maus CD45	30-F11	PE/Cy7	eBioscience
Maus CD16/CD32	2.4G2	-	BioXCell

3.9 Enzyme

Enzym	Firma
<i>PciI</i>	NEB
<i>NotI</i>	NEB
<i>BcgI</i>	NEB
<i>ScaI</i>	NEB
<i>DpnI</i>	NEB
<i>EcoRI</i>	NEB
<i>EcoRV</i>	NEB
<i>ClaI</i>	NEB
<i>BstZ17I</i>	NEB
<i>NruI</i>	NEB
<i>SnaBI</i>	NEB
<i>XhoI</i>	NEB
<i>HindIII</i>	NEB
Proteinase K	Carl Roth
T4 DNA Ligase	NEB
Antarktische Phosphatase	NEB
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
KOD Hot Start Polymerase	Novagen
Perfect Match PCR Enhancer	Agilent Genomics
SuperscriptIII Reverse Transkriptase	Invitrogen

3.10 DNA-Standards

Standard	Firma
GeneRule, 1kB	Fermentas

3.11 DNA-Oligonukleotide (Primer)

Alle Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer befinden sich im Anhang (8.1.2)

3.12 Plasmide

Name	Gen von Interesse	Vektor	Firma/Herkunft
V03	Lama IgH-Lokus (4V-7D-7J-IgM-IgD)	pRED/ET	GeneBridges
F07	Lama IgH-Lokus ($\gamma 2b$ - $\gamma 1a$ - $\gamma 1b$ I- $\gamma 1b$ II)	pCC1 BAC	Epicentre
TE01	Lama IgH-Transgen Version 1	pCC1 BAC	UKE
TE02	Lama IgH-Transgen Version 2	pCC1 BAC	UKE
TE03	Lama IgH-Transgen Version 3	pCC1 BAC	UKE
pBS_SRK	VHHs aus TE01-transgenen Mäusen SRK-Kassette (sacB-rpsL-neo)	pCSE2.5_h-Fc pCSE2.5_rb-Fc pBlueScriptII SK(-)	T. Schirrmann (TU-Braunschweig) UKE AG Kornau (ZMNH, Hamburg)
pTE#5	5'50_SRK_3'50	pJET1.2	Fermentas
pTE#11	5'50_Spectinomycin_3'50	pJET1.2	UKE
pTE#16	5'68_Tetracyclin_3'50	pUC57_Amp	GENENWIZ
pTE#20	5'50_lox71-Kana-lox66_3'50	pUC57_Kana	GENENWIZ
JW#128	<i>Lama glama</i> IgG2b aus BAC F07	pUC57_Amp	GENENWIZ
pTE#17	5'285_lox71-Amp-lox66_3'270	pBlueScriptII KS(+)	Agilent
pTE#22	5'285_IgG2b	pBlueScriptII KS(+)	UKE
pTE#23	5'285_IgG2b_lox71-Amp-lox66_3'270	pBlueScriptII KS(+)	UKE
pTE#24	5'90_lox71-Amp-lox66_3'LCR-P1_3'86	pUC57_Kana	GENENWIZ
pTE#50	CH2CH3_lox71-Amp-lox66_TM1-TM2	pUC57_Kana	GENENWIZ
pTE#55	5'390_lox71-Amp-lox66_5V _H _3'388	pUC57_Kana	GENENWIZ

3.13 Proteine

Name	Anwendung	Firma
Adeno Assoziierter Virus Serotyp 1	Antigen zur Immunisierung	UKE Vektor Facility

3.14 Prokaryotische Zellen

Zellen	Firma
<i>E. coli</i> XL-2 Blue	Stratagene
<i>TransforMax</i> EPI300	Epicentre
<i>E. coli</i> SW106	NCI Frederick

3.15 Mauslinien

Linie	Firma
C57BL/6J x CBA	Zentrum Für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)
C57BL/6J	UKE
LgIgHtg_JHT_TE01 (TE01)	UKE
LgIgHtg_JHT_TE02 (TE02)	UKE
LgIgHtg_JHT_TE03 (TE03)	UKE
JHT	Max Delbrück Center (AG Rajewsky)

3.16 Software

Programm	Firma/Publikation
FlowJo	BD
Lasergene	DNASTAR, Inc
MiSeq Reporter	Illumina
MiXCR	Bolotin et al., 2015
VDJtools	Shugay et al., 2015

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Aufreinigung von BAC-DNA

Zur Aufreinigung von BAC-DNA aus den *E. coli* Stämmen *Epi300* und *SW106* wurde das PhasePrep BAC DNA Kit (Sigma Aldrich, heute Merck) verwendet. Alle Aufreinigungen wurden nach Angaben des Herstellers im Mini-Maßstab durchgeführt. Zur Überprüfung der Integrität von BAC-Klonen vor und nach einer homologen Rekombination sowie zur Beurteilung von DNA Modifikationen wurde das resultierende BAC-DNA Pellet in einem 50 µl Verdau-Ansatz, bestehend aus 1 µl Restriktionsenzym, 5 µl des kompatiblen NEB-Puffers sowie 44 µl demineralisiertes Wasser (ddH₂O), aufgenommen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für alle weiteren Anwendungen (PCR, Pronukleus-Injektion) wurde das Pellet in 50 µl low-TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Im Fall der Aufreinigung von BAC DNA für die Pronukleus-Injektion wurde die Inkubation der Bakterien mit Lysepuffer abweichend von den Angaben des Herstellers von 5 min auf 2 min reduziert, um die Gefahr der Entstehung von BAC-Bruchstücken durch die harschen Bedingungen des Lysepuffers zu minimieren.

4.1.2 Vorbereitung elektrokompenter Zellen und Elektroporation

BAC-tragende *E. coli* Stämme wurden aus Glycerolstocks auf antibiotikahaltigen 2YT-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C (*Epi300* + *pRED/ET*) bzw. 32 °C (*SW106*) inkubiert. Am Folgetag wurde aus einer Einzelkolonie eine Starterkultur in 2,5 ml NoSalt-Medium mit geeigneten Antibiotika angesetzt und über Nacht bei 30 °C (*Epi300* + *pRED/ET*) bzw. 32 °C (*SW106*) und 220 rpm kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 20 ml antibiotikahaltiges NoSalt-Medium mit 1,5 ml der Starterkultur inokuliert und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 im Thermoschüttler bei 800 rpm kultiviert. Nach Expression der Rekombinasen wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C für 15 min pelletiert und danach in 20 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt und dabei das Volumen von 20 über 10 auf 1,5 ml ddH₂O reduziert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Die Bakterien wurden letztendlich in 50 µl eiskaltem ddH₂O mit 10% Glycerol (v/v) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

Zur Elektroporation wurde ein Aliquot (50 µl) der elektrokompenten *E. coli* Zellen (*Epi300* oder *SW106*) mit 20 ng Plasmid-DNA, 100-500 ng PCR-Produkt oder 500 ng BAC-DNA

jeweils in einem Volumen von 1-5 μ l ddH₂O versetzt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Bio-Rad Laboratories, Inc.) überführt. Alle Elektroporationen fanden im MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, Inc.) bei 1800 V für 4,8-5,5 ms (Programm 1-*E. coli*) statt. Die Bakterien wurden anschließend in 1 ml vorgewärmtem 2YT- oder SOC-Medium aufgenommen und für 60 min bei 30 °C (*Epi300* + *pRED/ET*) bzw. 32 °C (*SW106*) und 800 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden 50 und 450 μ l der Bakteriensuspension auf 2YT-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika plattiert und über Nacht bei 30 °C (*Epi300* + *pRED/ET*) bzw. 32 °C (*SW106*) inkubiert.

4.1.3 BAC-Rekombination mit dem Red/ET System

Im Jahr 1998 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die vom Phagen abstammenden Proteine *recE* und *recT* nur 42 bp lange Homologiearme benötigen, um die homologe Rekombination zwischen einem linearen DNA-Molekül und zirkulärer DNA zu vermitteln (Zhang *et al.*, 1998). Kurze Zeit später wurde das System erweitert, indem *recE* und *recT* durch ihre funktionellen Gegenstücke *red α* und *red β* des Phagen Lambda ersetzt wurden (Muyrers *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde das *Counter Selection BAC Modification Kit* (GeneBridges) mit den enthaltenen Reagenzien nach Protokoll des Herstellers genutzt. In dem zweistufigen Verfahren wird zunächst eine Selektionskassette an der zu modifizierenden Stelle eingefügt und im zweiten Schritt durch nicht-selektierbare DNA ersetzt. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde die im Kit enthaltene *rpsL-neo*-Selektionskassette gegen die *SacB-RpsL-Kanamycin*- (SRK-) Selektionskassette ausgetauscht (Bartoi *et al.*, 2010). Neben den Genen *rpsL* (vermittelt Sensitivität gegenüber Streptomycin) und *neo* (vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin) enthält die SRK-Kassette zusätzlich noch das Gen *sacB* (vermittelt Sensitivität gegenüber Succrose), wodurch der Selektionsdruck im zweiten Rekombinationsschritt zusätzlich erhöht werden kann.

Folgende Rekombinationen wurden mit diesem Verfahren durchgeführt:

Austausch des Lama IgD-Pseudogens gegen eine Spectinomycin Selektionskassette

Um in Lama IgH-transgenen Mäusen den Immunglobulin-Klassenwechsel zum IgD-Pseudogen zu vermeiden, wurde dieses in einem zweistufigen Rekombinationsverfahren entfernt. Dazu wurde der IgD-Lokus zunächst gegen die SRK-Selektionskassette ausgetauscht, welche in einem zweiten Rekombinationsschritt durch ein Spectinomycin-Resistenzgen ersetzt wurde.

Im ersten Schritt wurde der BAC V03-P2 tragende *E. coli*-Stamm *TransformMax Epi300* (Epicentre) mit dem Expressionsplasmid pRed/ET durch Elektroporation transformiert (Absatz 4.1.2). Die SRK-Kassette wurde durch PCR-Amplifikation aus dem Plasmid pBS_SRK (AG Kornau, ZMNH) mit den Primern TE#18 und TE#19 mit 50 bp langen Homologiearmen flankiert (Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4). Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung des CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben in den im Kit enthaltenen Vektor pJET1.2 kloniert. Aus diesem Plasmid (pTE#5) wurde die SRK-Kassette inklusive der Homologiearme mit den Primern TE#20 und TE#21 amplifiziert (Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4). Um falsch positive Kolonien nach der Rekombination zu vermeiden, wurde das Ausgangsplasmid (pTE#5) vor der PCR-Amplifikation mittels *BcgI*- und *ScaI*-Restriktionsverdau linearisiert (Absatz 4.1.8). Die amplifizierte SRK-Kassette wurde zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut (Absatz 4.1.8), um letzte Spuren intakter Plasmid-DNA zu entfernen. Vor der Elektroporation wurde der PCR-Ansatz über ein Agarosegel größenfraktioniert, die SRK-Kassette ausgeschnitten und aufgereinigt (Absatz 4.1.9). Aus insgesamt 12 PCR-Ansätzen wurde auf diese Weise 50 µl der Selektionskassette mit einer Konzentration von 80 ng/µl erzeugt. Die Expression der Rekombinasen Red/ET wurde durch Zugabe von 10 %iger L-Arabinoselösung (Endkonzentration 0,3 - 0,4 %) und Temperaturerhöhung von 30 °C auf 37 °C für 1 h induziert. Nach 3 Waschschritten mit eiskaltem ddH₂O wurde ein 50 µl Aliquot der Bakteriensuspension mit 1 µl (80 ng) der SRK-Selektionskassette durch Elektroporation transformiert (Absatz 4.1.2). Nach erfolgter Elektroporation vermitteln die zuvor exprimierten Rekombinasen Red/ET den zielspezifischen Austausch des IgD-Lokus gegen die SRK-Selektionskassette. Kolonien mit modifiziertem BAC konnten über ihr *Neomycin*-Gen auf Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) selektioniert werden.

Im zweiten Schritt wird die in den BAC eingefügte Selektionskassette in der Regel durch nicht-selektierbare DNA ersetzt. Da dieser Schritt jedoch im Vergleich zur direkten Selektion über ein Resistenzgen mit deutlich geringerer Effizienz abläuft, wurde zur Rückgewinnung der SRK-Selektionskassette das Spectinomycin-Resistenzgen verwendet. Zur Anheftung von Homologiearmen an das Resistenzgen wurde dieses mit entsprechenden Primern (TE#20 und TE#37) aus dem Plasmid pTE#11 amplifiziert (Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6), mit *DpnI* verdaut (Absatz 4.1.8) und über ein Agarosegel gereinigt (Absatz 4.1.9). Aus insgesamt vier PCR-Ansätzen konnten 30 µl der Spectinomycin-Selektionskassette mit einer Konzentration von 360 ng/µl erzeugt werden. Für die Elektroporation wurde davon 1 µl (360 ng) eingesetzt. Die technische Durchführung der homologen Rekombination erfolgte analog zur Insertion der SRK-Kassette. Kolonien mit korrekt modifizierten BACs konnten über ihr Spectinomycin-Resistenzgen auf Agarplatten mit Spectinomycin (50 µg/ml) selektioniert werden (Abb. 4.1). Die Entfernung des IgD-Lokus durch Integration der SRK-Kassette sowie der Austausch der SRK-Kassette gegen das Spectinomycin-Resistenzgen wurden durch PCR und Sequenzierung mit flankierenden Primern (TE#26 und TE#27) nachgewiesen. Dazu wurde BAC-DNA aufgereinigt (4.1.1), der modifizierte Abschnitt mithilfe der KOD Hot-Start Polymerase (Novagen) nach Herstellerangaben amplifiziert und die PCR-Produkte unter Verwendung derselben Primer (TE#26 und TE#27) sequenziert (4.1.14).

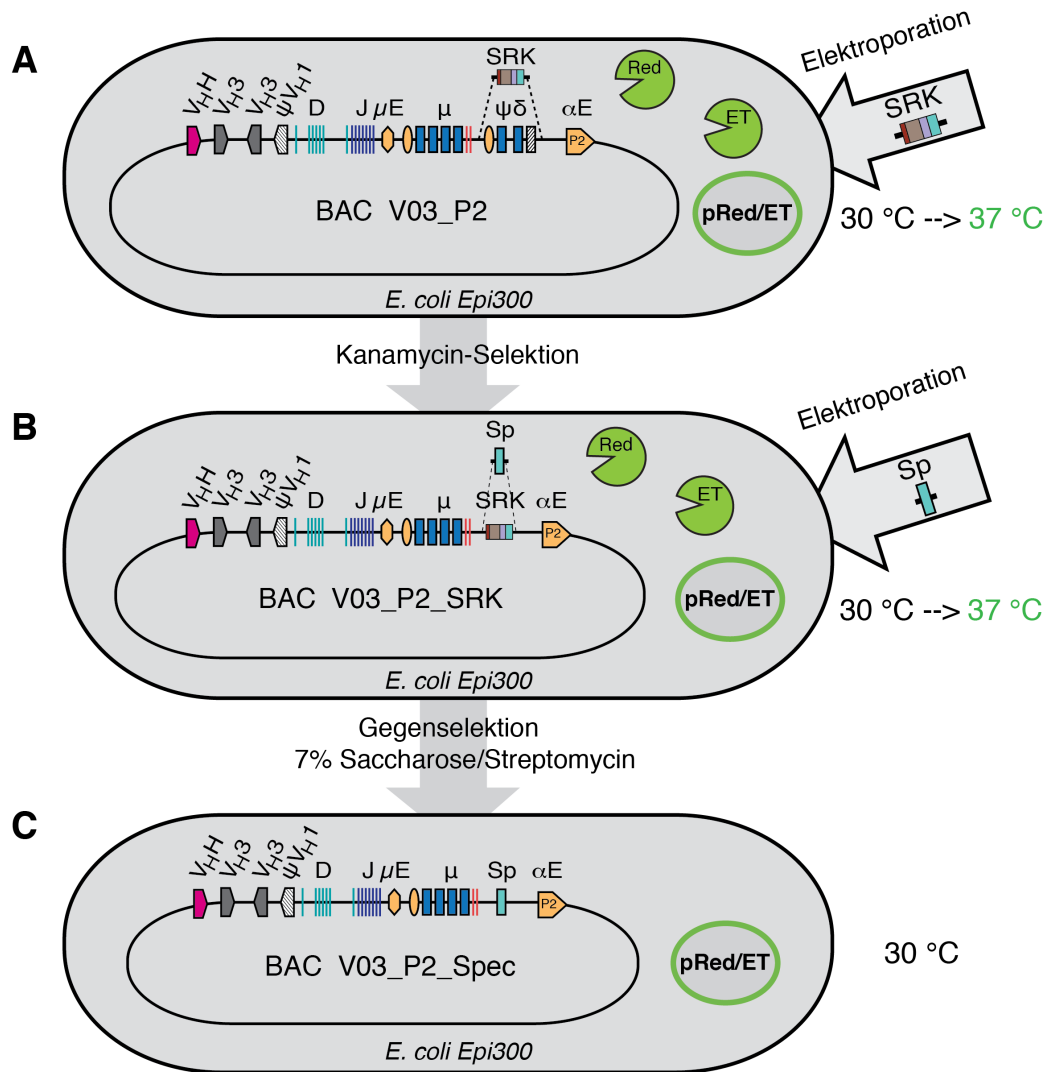


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der homologen Rekombination mit dem Red/ET System.

Beispielhaft ist der Austausch des Lama IgD-Pseudogens gegen eine Spectinomycin Selektionskassette dargestellt. **A)** Im ersten Schritt wurde die mit 50 bp langen Homologiearmen amplifizierte SRK-Gegenselektionskassette in *E. coli* Epi300 Zellen elektroporiert, die den zu modifizierenden BAC V03-P2 trugen und mit dem Plasmid pRed/ET transformiert waren. Die Expression der Rekombinasen Red/ET wurde durch Zugabe von 10 %iger L-Arabinoselösung und Temperaturerhöhung von 30 °C auf 37 °C induziert. Die Integration der SRK-Kassette in den BAC erfolgte zielgerichtet über ihre Homologiearme. Nur Klone mit integrierter SRK-Kassette wuchsen aufgrund der neu erworbenen Kanamycin-Resistenz (K) in Anwesenheit des Antibiotikums. **B)** Im zweiten Schritt wurde die SRK-Kassette gegen eine Spectinomycin-Selektionskassette ausgetauscht. Unter Verwendung der gleichen 50 bp Homologieregionen wurde das Spectinomycin-Resistenzgen PCR-amplifiziert und in korrekt modifizierte Klone aus dem ersten Schritt elektroporiert. Die Induktion der Rekombinasen erfolgte wie bereits in **(A)** beschrieben. **C)** Klone, die die SRK-Kassette gegen das Spectinomycin-Resistenzgen ausgetauscht hatten, konnten auf Spectinomycin-haltigen Agarplatten selektiert werden. Durch Zugabe von Saccharose und Streptomycin wurde der Selektionsdruck zusätzlich erhöht.

4.1.4 BAC-Rekombination mit *E. coli* Stamm SW106

Der Rekombinationsstamm *E. coli* SW106 verfügt über eine hitzeinduzierbare Expression der Lambda-Prophagen-Rekombinationsproteine *exo*, *bet* und *gam* unter strenger Kontrolle des temperaturempfindlichen Repressors *ci857* (Lee *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2000). Eine 15-minütige Inkubation bei 42 °C reicht aus, um die Expression von *exo*, *bet* und *gam* in ausreichendem Maße für die homologe Rekombination zu induzieren. Die Rekombinationsproteine werden nicht exprimiert, wenn die Bakterien bei 32 °C gehalten werden.

Nachdem doppelsträngige DNA in den *E. coli* Stamm eingebracht wurde, wird diese von der 5'-3'-Exonuklease *exo* mit 3'-Überhängen versehen. Das Paarungsprotein *bet* bindet an die 3'-Überhänge und verknüpft diese mit komplementärer DNA auf dem BAC. Die lineare DNA-Kassette wird gleichzeitig über den Inhibitor *gam* vor Degradation durch die *E. coli* Exonuklease *RecBCD* geschützt.

Die SW106-Zellen tragen zusätzlich ein über L-Arabinose induzierbares *Cre*-Gen (Warming *et al.*, 2005), wodurch die Rückgewinnung der verwendeten Selektionskassetten nach erfolgreicher BAC-Rekombination ermöglicht wird. In dieser Arbeit wurden dazu die Resistenzgene Ampicillin oder Kanamycin mit *loxP*-Mutanten flankiert und an das 5'- oder 3'-Ende der zu integrierenden DNA-Kassette gekoppelt. Nach erfolgreicher Integration in den BAC konnte die Selektionskassette über eine *Cre/lox*-Rekombination wieder ausgeschnitten werden. Nach jeder *Cre/lox*-Rekombination verbleibt eine *lox*-Erkennungssequenz am Rekombinationsort. Diese setzt sich jeweils aus der Hälfte (17 bp) der am 5'- und 3'-Ende des Resistenzgens platzierten *lox*-Sequenzen zusammen. Bei der Verwendung von zwei Wildtyp-*loxP*-Erkennungssequenzen würde dies den Verbleib einer intakten *loxP*-Sequenz am Rekombinationsort bedeuten. Dies würde die mehrstufige Modifikation eines BACs ausschließen, da jede neu eingefügte *loxP*-Sequenz nach *Cre*-Induktion ungewollte Rekombinationen im BAC zur Folge haben könnte. Aus diesem Grund wurden die *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* verwendet, deren kombinierte Sequenz (*lox72*) nach einer *Cre/lox*-Rekombination eine um etwa 50 % reduzierte Affinität zur *Cre*-Rekombinase aufweist (Parrish *et al.*, 2011). Dieses zweistufige Selektionsverfahren ermöglicht es, DNA zu modifizieren, ohne einen selektierbaren Marker an der Modifikationsstelle zu hinterlassen (siehe Abb. 4.2).

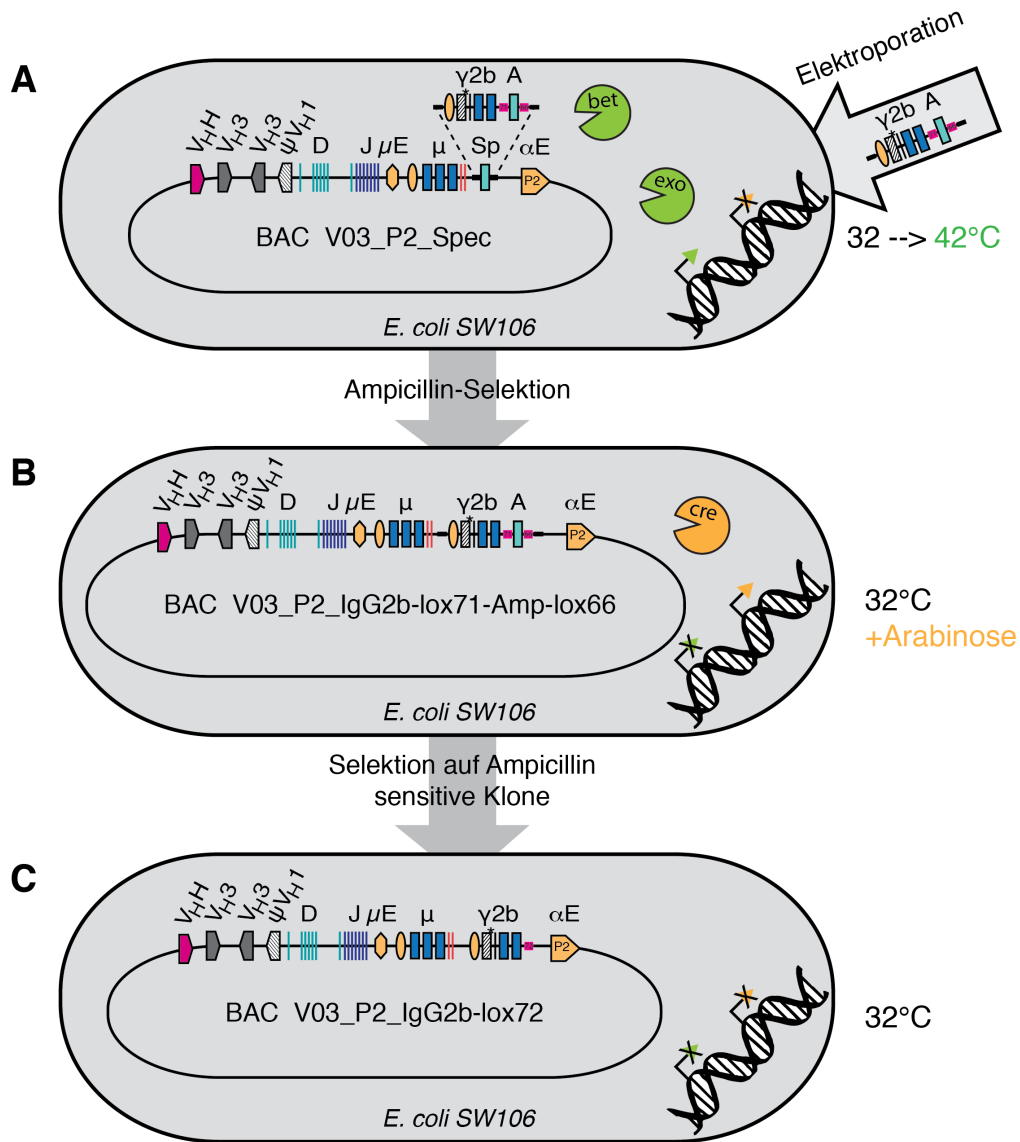


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der homologen Rekombination mit dem *E. coli* Stamm SW106.

Beispielhaft ist der Austausch der Spectinomycin-Selektionskassette gegen den Lama IgG2b-Lokus dargestellt. **A)** Im ersten Schritt wurde der Lama IgG2b-Lokus mit Homologiearmen und einem Ampicillin-Resistenzgen verknüpft, das mit den *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* flankiert wurde. Das resultierende Konstrukt wurde anschließend in *E. coli* SW106 Zellen elektroporiert, die den BAC V03_P2_Spec trugen. Die Expression der Rekombinasen *exo* und *bet* wurde durch Temperaturerhöhung von 32 °C auf 42 °C für 15 min induziert. Der 14 kb große IgG2b-Lokus wurde zielgerichtet über die 285 bp und 270 bp langen Homologiearme in den BAC integriert. Klone mit integriertem IgG2b-Lokus konnten über die eingefügte Ampicillin-Kassette selektioniert werden. **B)** Im zweiten Schritt wurde die von *lox71* und *lox66* flankierte Ampicillin-Kassette per *Cre/lox*-Rekombination entfernt. Die Expression der *Cre*-Rekombinase wurde durch Zugabe von L-Arabinose induziert. **C)** Klone, bei denen das Ampicillin-Resistenzgen durch *Cre/lox*-Rekombination entfernt wurde, konnten durch einen Vergleichsausstrich auf 2YT-Agarplatten mit und ohne Carbenicillin (100 µg/ml) indentifiziert werden.

Folgende Rekombinationen zur Herstellung der Transgene TE01, TE02 und TE03 wurden mit diesem Verfahren durchgeführt:

Herstellung von Lama IgH-Transgen TE01

Entfernung der Wildtyp-loxP-Erkennungssequenz im BAC Vektor

Um mehrere, hintereinandergeschaltete DNA Modifikationen an einem BAC-Konstrukt mit dem *E. coli* Stamm *SW106* durchführen zu können, muss sichergestellt werden, dass sich keine Wildtyp-*loxP*-Erkennungssequenz im Konstrukt befindet, da dies zu unspezifischen Rekombinationen während der *Cre/lox*-Rekombination führen könnte. Aus diesem Grund wurde die Wildtyp-*loxP*-Erkennungssequenz in BAC pCC1 gegen eine Tetracyclinkassette ausgetauscht.

Dazu wurde die Selektionskassette *in silico* mit einer 68 bp großen Homologieregion am 5'-Ende und einer 50 bp großen Homologieregion am 3'-Ende homolog zur 5'- und 3'-flankierenden Region der *loxP*-Erkennungssequenz auf dem BAC designt. Das Konstrukt wurde von der Firma GENEWIZ synthetisiert, in den Klonierungsvektor pUC57 mit Kanamycin-Resistenz kloniert und als DNA-Minipräparation geliefert. Aus diesem Plasmid (pTE#16) wurde die Selektionskassette mit den Primern TE#39 und TE#40 amplifiziert (Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6), mit *DpnI* verdaut (Absatz 4.1.8) und über ein Agarosegel gereinigt (Absatz 4.1.9). Aus 7 PCR-Ansätzen wurden insgesamt 50 µl der DNA-Kassette mit einer Konzentration von 250 ng/µl erzeugt. Die Rekombination wurde unter Verwendung des Rekombinationsstammes *E. coli SW106* durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem zu modifizierenden BAC transformiert (Absatz 4.1.2) und die Expression der Rekombinationsenzyme *exo*, *bet* und *gam* durch Temperaturerhöhung von 32 °C auf 42 °C für 15 min induziert. Nach drei Waschschritten mit eiskaltem ddH₂O wurde ein 50 µl Aliquot der Bakteriensuspension mit 1-1,5 µl (250 - 375 ng) der zuvor amplifizierten DNA-Kassette durch Elektroporation transformiert (Absatz 4.1.2). Die Rekombinasen *exo* und *bet* konnten daraufhin den zielspezifischen Austausch der Wildtyp-*loxP*-Sequenz gegen die eingebrachte Tetracyclin-Selektionskassette vermitteln. Kolonien mit modifiziertem BAC konnten über ihr Tetracyclin-Gen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (10 µg/ml) selektioniert werden. Mit Tetracyclin-resistenten Klonen wurde eine BAC-Aufreinigung, gefolgt von einem *EcoRV*-Verdau, durchgeführt (Absatz 4.1.1). Anhand des resultierenden Bandenmusters nach Auftrennung auf einem 0,7 %igen Agarosegel konnten korrekt modifizierte BACs identifiziert sowie deren Integrität beurteilt werden. Die korrekte Integration der Selektionskassette wurde

zusätzlich durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung mit flankierenden Primern (TE#45 und TE#46) bestätigt.

Entfernung der CH1-Domäne im Lama IgM-Lokus

Um die Paarung von schweren und leichten Ketten während der B-Zell-Entwicklung zu vermeiden, wurde die CH1-Domäne des Lama IgM-Lokus in BAC V03_P2_delta-*loxP* entfernt. Dazu wurde *in silico* ein DNA-Konstrukt bestehend aus einer Kanamycin-Resistenzkassette designt, welche mit den beiden *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* flankiert wurde. Am 5'- und 3'-Ende wurden jeweils 50 bp lange Überhänge platziert, die homolog zu flankierenden Sequenzen der CH1-Domäne im IgM-Lokus auf dem BAC waren. Das Konstrukt wurde von der Firma GENEWIZ synthetisiert, in den Klonierungsvektor pUC57 mit Ampicillin-Resistenz kloniert und als DNA-Minipräparation geliefert. Aus diesem Plasmid (pTE#20) wurde das Konstrukt mit den Primern TE#41 und TE#42 amplifiziert (Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6), mit *DpnI* verdaut (Absatz 4.1.8) und über ein Agarosegel gereinigt (Absatz 4.1.9). Aus 8 PCR-Ansätzen wurden insgesamt 50 µl der DNA-Kassette mit einer Konzentration von 345 ng/µl erzeugt.

Die technische Durchführung der homologen Rekombination mit dem *E. coli* Stamm *SW106* erfolgte analog zur bereits beschriebenen Entfernung der *loxP*-Erkennungssequenz. Für die Elektroporation wurde 1 µl (345 ng) der DNA-Kassette eingesetzt. Kolonien mit korrekt modifizierten BACs konnten über ihr Kanamycin-Gen auf Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) selektioniert werden. Mit Kanamycin-resistenten Klonen wurde eine BAC-Aufreinigung gefolgt von einem *EcoRI*-Verdau durchgeführt (Absatz 4.1.8). Anhand des resultierenden Bandenmusters nach Auftrennung auf einem 0,7 %igen Agarosegel konnten korrekt modifizierte BACs identifiziert sowie deren Integrität beurteilt werden.

Im zweiten Schritt wurde die von den *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* flankierte Kanamycin-Kassette mittels *Cre/lox* Rekombination entfernt. Die Expression der *Cre*-Rekombinase wurde durch Zugabe von 10 %iger L-Arabinose (Endkonzentration 0,1 %) für 1 h bei 32 °C induziert. Klone, bei denen das Ampicillin-Resistenzgen durch *Cre/lox* Rekombination entfernt wurde, konnten durch einen Vergleichsausstrich auf Platten mit und ohne Carbenicillin (100 µg/ml) identifiziert werden. Die korrekte Entfernung der CH1-Domäne wurde zusätzlich durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung mit flankierenden Primern (TE#4 und TE#2) bestätigt.

Integration des Lama IgG2b-Lokus

Um den Klassenwechsel (engl.: *Class Switch Recombination*, CSR) zu einem Schwere-Ketten-IgG-Isotyp zu ermöglichen, wurde die an Position des IgD-Lokus eingefügte Spectinomycin-Selektionskassette durch den *Lama glama* IgG2b-Lokus ersetzt, der Vorarbeiten in der AG Nolte aus BAC F07 isoliert und in den Vektor pBluescript-II-KS-(+)/LIC (JW#128) kloniert wurde (Wesolowski, 2011). Um den IgG2b-Lokus mit Homologieregionen zu flankieren, wurde ein Gensyntheseprodukt designt, das zwei Homologieregionen, flankiert von JW#128-kompatiblen Klonierungsstellen (*ClaI* und *BstZ17I*), enthielt. Die 270 bp große 3'-Homologieregion wurde zusätzlich mit einer Ampicillin-Selektionskassette gekoppelt, die von den beiden *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* flankiert wurde. Das Konstrukt wurde von der Firma GENEWIZ synthetisiert, in den Vektor pUC57 mit Kanamycin-Resistenz kloniert und als DNA-Minipräparation geliefert. Aus diesem Plasmid (pTE#17) wurde zunächst die 285 bp große 5'-Homologieregion per *ClaI*-Restriktionsverdau isoliert (Absatz 4.1.8) und nach einer Gelreinigung (Absatz 4.1.9) in die *ClaI*-Schnittstelle stromaufwärts des IgG2b-Lokus in JW#128 kloniert (Absatz 4.1.11). Das resultierende Plasmid (pTE#22) wurde als Zielvektor für die Insertion des 270 bp großen 3'-Homologiearms inklusive Ampicillin-Selektionskassette verwendet. Das Konstrukt wurde dazu mittels *BstZ17I*-Restriktionsverdau aus pTE#17 isoliert (Absatz 4.1.8) und anschließend in die entsprechende Schnittstelle stromabwärts des IgG2b-Lokus in pTE#22 kloniert (Absatz 4.1.11). Der gesamte IgG2b-Lokus mit beiden Homologiearmen und der Ampicillin-Selektionskassette (pTE#23) wurde mit glatten Enden durch Restriktionsverdau über *NruI*-Restriktionsstellen isoliert (Absatz 4.1.8), die jeweils im äußeren Ende der Homologieregionen kodiert waren. In 10 Ansätzen wurden insgesamt 90 µg einer DNA-Maxipräparation von pTE#23 mit *NruI* verdaut (Absatz 4.1.8) und dabei 30 µl des IgG2b-Lokus mit einer Konzentration 275 ng/µl isoliert und über ein Agarosegel gereinigt (Absatz 4.1.9).

Die technische Durchführung der homologen Rekombination mit dem *E. coli* Stamm *SW106* erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Modifikationen. Die Zellen wurden in diesem Fall mit 1,5 µl (412 ng) des vorbereiteten IgG2b-Lokus durch Elektroporation transformiert (Absatz 4.1.2). Kolonien mit modifiziertem BAC konnten über die eingefügte Selektionskassette auf Agarplatten mit Carbenicillin (100 µg/ml) selektioniert werden. Zur Qualitätskontrolle wurde eine BAC-Aufreinigung, gefolgt von einem *EcoRI*-Restriktionsverdau (Absatz 4.1.1), durchgeführt.

Im zweiten Schritt wurde die von den *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* flankierte Ampicillin-Kassette mittels *Cre/lox*-Rekombination entfernt. Die Expression der *Cre*-Rekombinase wurde durch Zugabe von 10 %iger L-Arabinose (Endkonzentration 0,1 %) für 1 h bei 32 °C induziert. Klone, bei denen das Ampicillin-Resistenzgen durch *Cre/lox* Rekombination entfernt wurde, konnten durch einen Vergleichsausstrich auf Platten mit und ohne Carbenicillin (100 µg/ml) identifiziert werden. Die korrekte Modifikation der BACs sowie deren Integrität wurde anhand eines *EcoRI*-Restriktionsverdaus beurteilt (Absatz 4.1.8).

Herstellung von Lama IgH-Transgen TE02

Ergänzung der Maus 3'-Lokus-Kontrollregion durch die Elemente HS3a und HS1,2

Um die Effizienz des Klassenwechsels und der somatischen Hypermutation zu steigern, wurden die Komponenten *HS3a* und *HS1,2* (P1) der Maus 3'-Lokus-Kontrollregion stromaufwärts von *HS3b/HS4* (P2) eingefügt. Die Elemente *HS3b* und *HS4* waren in Vorarbeiten bereits in das 3'-Ende von BAC V03 eingefügt worden (Wesolowski, 2011).

Zur Vervollständigung des regulatorischen Elements wurde ein DNA-Konstrukt, bestehend aus einer Ampicillin-Selektionskassette, gefolgt von den Elementen *HS3a* und *HS1,2* designt. Die Resistenzkassette wurde durch die *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* flankiert. Am 5'-Ende des Konstrukts wurde eine 90 bp große und am 3'-Ende eine 86 bp große Sequenz platziert, die homolog zu der zu modifizierenden Region auf BAC TE01 war. Um das 3700 bp große Konstrukt später mit glatten Enden isolieren zu können, wurde am jeweils äußeren Ende beider Homologieregionen eine *SnaBI*-Restriktionsschnittstelle platziert. Das Konstrukt wurde von der Firma GENEWIZ synthetisiert, in den Klonierungsvektor pUC57 mit Kanamycin-Resistenz kloniert und als DNA-Minipräparation geliefert. Aus diesem Plasmid (pTE#24) wurde eine DNA-Maxipräparation angefertigt und die DNA-Kassette per *SnaBI*-Restriktionsverdaus (Absatz 4.1.8) mit glatten Ende isoliert. Um einen Hintergrund an falsch positiven Kolonien durch Plasmid-DNA nach der Rekombination zu minimieren, wurde das Ausgangsplasmid zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *NruI* verdaut (Absatz 4.1.8). Aus 10 Ansätzen wurden insgesamt 60 µl der DNA-Kassette mit einer Konzentration von 265 ng/µl erzeugt.

Die technische Durchführung der homologen Rekombination erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Modifikationen. Die Zellen wurden in diesem Fall mit 2 µl (530 ng) der vorbereiteten DNA-Kassette durch Elektroporation transformiert (Absatz 4.1.2). Zur Entfernung der verwendeten Selektionskassette wurde im zweiten Schritt eine *Cre/lox*-Rekombination durchgeführt. Korrekt modifizierte BACs wurden anhand eines *EcoRI*-

Restriktionsverdau identifiziert (Absatz 4.1.8). Die korrekte Entfernung der Selektionskassette wurde durch PCR-Amplifikation mit flankierenden Primern (TE#56 und TE#57) bestätigt.

Insertion von 5 zusätzlichen V_HH-Elementen

Zur Steigerung der Antikörper-Diversität in Lama IgH-transgenen Mäusen wurde eine synthetische DNA-Kassette mit fünf zusätzlichen V_HH-Elementen am 5'-Ende von Transgen TE01 eingefügt. Dazu wurden die fünf kameliden V_HH-Elemente *Lama glama* V_HH1 (Genbank: AF305944.1), *Lama glama* V_HH4 (Genbank: AF305947.1), *Lama pacos* V_HH3-S12 (Genbank: AM939752.1), *Lama glama* V_HH5 (Genbank: AF305948.1) und *Lama pacos* V_HH3-S1 (Genbank: AM773548.1) in ein Gerüst aus Sequenzen des Maus IgH-V-Lokus transplantiert. Mit Ausnahme der variablen Domäne *Lama pacos* V_HH3-S12 lagen alle V_HH-Regionen in ihrer Keimbahnkonfiguration vor. Die variable Domäne V_HH3-S12 wurde nach Vorgaben aus der Literatur an 8 Positionen (A15P, E49G, R50L, F52A, A74S, K83R, P84A und G86D; Nummerierung nach Kabat (Kabat *et al.*, 1991)) auf Aminosäuren-Ebene humanisiert (Vincke *et al.*, 2009). Die fünf V-Elemente wurden durch Sequenzen flankiert, die im Maus IgH-V-Lokus funktionale und häufig in cDNA-Sequenzen vorkommende V-Elemente umgeben. Dabei wurde *nonsense*-DNA, wie zum Beispiel virale DNA-Insertionen, entfernt, um die Größe des Konstrukts zu minimieren. Als Promotorsequenzen wurden die beiden starken Maus IgH-V-Promotorregionen 186.2 (Genbank: M58532.1) (Tantin *et al.*, 2002) und 17.2.25 (Genbank: M12421.1) (Grosschedl *et al.*, 1985) oder Kombinationen aus beiden Sequenzen (Tantin *et al.*, 2004) verwendet. Für das *Leader*-Peptid kodierende Exon, die Intron-Sequenz zwischen diesem und dem V_HH-Exon, sowie die RSS-Sequenz am 3'-Ende des V_HH-Exons wurde jeweils die kamelide Keimbahnkonfiguration beibehalten. Die Selektionskassette wurde wie gewohnt von den beiden *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* flankiert. Das gesamte Konstrukt wurde am 5'-Ende mit einer 390 bp großen Homologieregion und am 3'-Ende mit einer 388 bp großen Homologieregion ausgestattet. Das jeweils äußere Ende der Homologieregionen kodierte für eine *NruI*-Restriktionsschnittstelle.

Das Konstrukt wurde von der Firma GENEWIZ synthetisiert, in den Klonierungsvektor pUC57 mit Kanamycin-Resistenz kloniert und als DNA-Minipräparation geliefert. Aus diesem Plasmid (pTE#55) wurde eine DNA-Maxipräparation angefertigt (Absatz 4.1.13) und das V_HH-Konstrukt über einen *NruI*-Restriktionsverdau mit glatten Enden isoliert (Absatz 4.1.8). Um einen Hintergrund durch falsch positive Kolonien nach der Rekombination zu reduzieren, wurde das Ausgangsplasmid zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *XhoI* verdaut

(Absatz 4.1.8). Aus 10 Ansätzen wurden insgesamt 60 µl der DNA-Kassette mit einer Konzentration von 116 ng/µl erzeugt.

Die technische Durchführung der homologen Rekombination erfolgte ansonsten analog zu den bereits beschriebenen Modifikationen. Die Zellen wurden in diesem Fall mit 4 µl (464 ng) der V_HH-Kassette durch Elektroporation transformiert (Absatz 4.1.2). Zur Entfernung der verwendeten Selektionskassette wurde im zweiten Schritt eine *Cre/lox*-Rekombination durchgeführt. Korrekt modifizierte BACs wurden anhand eines *EcoRV*-Restriktionsverdaus identifiziert und deren Integrität durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* bestätigt (Absatz 4.1.8).

Herstellung von Lama IgH-Transgen TE03

Austausch der CH3-CH4-TM1-TM2 Region des Lama IgM-Lokus durch Maus-Sequenzen

Um die Expression des transgenen B-Zell-Rezeptors auf der Oberfläche der Maus B-Zellen zu verbessern und die intrazelluläre Signalweiterleitung zu optimieren, wurde die CH3-CH4-TM1-TM2 Region des Lama IgM-Lokus in Transgen TE02 durch Maus Sequenzen ersetzt.

Dazu wurde die genomische Sequenz des Maus IgM-Lokus von der CH3-Domäne bis zur Transmembrandomäne 2 (TM2) mit 45 bp großen Homologieregionen passend zu den entsprechenden Sequenzen auf dem Lama IgM-Lokus versehen. Eine Ampicillin-Selektionskassette, flankiert von den beiden *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66*, wurde in der Intron-Sequenz zwischen CH4- und TM1-Exon platziert. Das jeweils äußere Ende der beiden Homologieregionen kodierte für eine *SnaBI*-Restriktionsschnittstelle. Das Konstrukt wurde von der Firma GENEWIZ synthetisiert, in den Klonierungsvektor pUC57 mit Kanamycin-Resistenz kloniert und als DNA-Minipräparation geliefert. Aus einer DNA-Maxipräparation von diesem Plasmid (pTE#50) konnte die DNA-Kassette über einen *SnaBI*-Restriktionsverdau mit glatten Ende isoliert werden (Absatz 4.1.8). Um einen Hintergrund durch falsch positive Kolonien nach der Rekombination zu reduzieren, wurde das Ausgangsplasmid zusätzlich mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *ClaI* verdaut (Absatz 4.1.8). Aus 10 Ansätzen wurden insgesamt 60 µl der DNA-Kassette mit einer Konzentration von 230 ng/µl erzeugt.

Die technische Durchführung der homologen Rekombination erfolgte ansonsten analog zu den bereits beschriebenen Modifikationen. Die *SW106* Zellen wurden in diesem Fall mit 2 µl (460 ng) der DNA-Kassette durch Elektroporation transformiert (Absatz 4.1.2). Korrekt modifizierte BACs wurden anhand eines *EcoRV*-Restriktionsverdaus identifiziert (Absatz 4.1.8). Zur Entfernung der Selektionskassette wurde im zweiten Schritt eine *Cre/lox*-Rekombination durchgeführt und mittels *HindIII*-Restriktionsverdau verifiziert (Absatz 4.1.8).

4.1.5 RNA Isolierung

Die Aufreinigung von RNA aus Gewebeproben wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit (analytik Jena) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden Zellen aus den lymphatischen Organen der Maus (Milz, Knochenmark und Lymphknoten) verwendet. Diese wurden zunächst in Lösung gebracht, mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml Lysepuffer aus dem innuPREP RNA Mini Kit (analytik Jena) resuspendiert (Absatz 4.2.5). Das Zelllysat wurde unmittelbar zur Präparation der RNA eingesetzt. Die Elution erfolgte in 50 µl RNase-freiem Wasser. Nach der RNA-Aufreinigung wurde eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung sowie eine Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese (Absatz 4.1.9) durchgeführt. Die Konzentration lag in der Regel zwischen 100-200 ng/µl. Die RNA wurde entweder direkt für die Reverse Transkription (Absatz 4.1.6) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.1.6 Reverse Transkription

Aufgereinigte RNA aus lymphatischen Organen wurde mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde die RNA mit zufälligen Hexameren (*random hexamers*) (Invitrogen) für 10 min bei 70 °C inkubiert und danach auf 4 °C abgekühlt:

Tabelle 4.1 RNA-Hexamer-Inkubation

Komponente	Volumen
RNA (1,6-3,2 µg)	16 µl
Hexamere	3 µl
RNaseOut	1 µl
	20 µl

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden 6 µl des Ansatzes für eine Agarose-Gelelektrophorese verwendet und die restlichen 14 µl nach Zugabe von reverser Transkriptase, dNTPs, DTT und Puffer in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 4.2 cDNA-Synthese

Komponente	Volumen (µl)
RNA-Hexamer-Mix	14
dNTPs (100 mM - je 0,1 µl)	0,4
firststr-Buffer	4
DTT	1
SuperscriptIII	1
	20,4

Temperatur (°C)	Zeit (min)
24	10
50	20
95	2
4	-

4.1.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von Selektionskassetten und Anheftung von Homologearmen für die Homologe Rekombination, zur Amplifikation von modifizierten BAC-Teilabschnitten, zur Amplifikation von V_HH- und V_H Fragmenten aus cDNA Lama IgH-transgener Mäuse, zur Anheftung von Linker-, Adapter- und Barcode-Sequenzen für die Tiefensequenzierung sowie zur Anheftung von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung verwendet. Als Polymerasen wurden dazu die KOD Hot-Start Polymerase (Novagen) sowie die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) jeweils mit den im Kit enthaltenen Puffern und Reagenzien eingesetzt.

Zur Anheftung von Homologieregionen an die SRK-Selektionskassette, die im ersten Schritt der Entfernung des Lama IgD-Lokus verwendet wurde, wurden SRK-spezifische Primer mit 50 bp großen Überhängen (TE#18 und TE#19) eingesetzt. Aufgrund der besonderen Anforderung durch die Länge der Primer wurde die PCR unter Zusatz des Perfect Match PCR Enhancer (Agilent) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen PCR-Zusatz, der die Spezifität und Ausbeute von primären PCR-Amplifikaten erhöht, indem fehlgepaarte Primer-Template-Komplexe destabilisiert werden, die ansonsten zu einer heterogenen Population amplifizierter Moleküle führen würden. Der Zusatz wird dabei erst nach der Anlagerung (*Annealing*) der Primer an die Template-DNA (Tabelle 4.3) hinzugefügt. Diese PCR-Variante wurde zur Amplifikation der SRK-Kassette aus den Plasmiden pBS_SRK (Primer TE#18 und TE#19) und pTE#5 (Primern TE#20 und TE#21) eingesetzt (Absatz 4.1.3).

Tabelle 4.3 Anheftung von Homologearmen an die SRK-Selektionskassette: Annealing

Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (s)
ddH ₂ O	1,2	95	300
KOD Puffer (10x)	1	95	20
dNTPs (2 mM each)	2		
25 mM MgSO ₄	0,6		
f. Primer: (10 µM)	0,6		
r. Primer: (10 µM)	0,6		
DMSO	2		
50 ng linearisiertes Plasmid (<i>BcgI</i> und <i>ScaI</i>)	2		
	10 µl		

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dem Ansatz nachfolgender Zusatz zugefügt und die PCR unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Anheftung von Homologearmen an die SRK-Selektionskassette: Amplifikation

Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
ddH ₂ O	7,5	95	120	
KOD Puffer (10x)	1	95	20	
25 mM MgSO ₄	0,6	39	20	10x
Perfect Match	0,5	70	100	
KOD Polymerase	0,4	95	20	
	10 µl	80	20	20x
		70	100	
		70	420	
		4	-	

Zur Vorbereitung von Selektionskassetten für die homologe Rekombination wurden diese aus Gensyntheseprodukten inklusive der flankierenden Homologieregionen amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils mit der KOD-Polymerase unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5 Amplifikation von Selektionskassetten für die homologe Rekombination

Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
ddH ₂ O	32	95	120	
KOD Puffer (10x)	5	95	20	
dNTPs (2 mM each)	5	60	20	30x
25 mM MgSO ₄	2	70	30	
f. Primer: (10 µM)	2	70	600	
f. Primer: (10 µM)	2	4	-	
Plasmid DNA (10 ng)	1			
KOD Polymerase	1			
	50 µl			

Die verwendeten Primerpaare und Ausgangsplasmide zur Amplifikation unterschiedlicher Selektionskassetten für verschiedene Anwendungen sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

Tabelle 4.6 Primerpaare zur Amplifikation von Selektionskassetten mit Homologieregionen

Amplifikat	Rekombination	Ausgangsplasmid	f. Primer	r. Primer
Spectinomycin	Entfernung des IgD-Lokus	pTE#11	TE#20	TE#37
Tetrazyklin	Entfernung der loxP-Stelle	pTE#16	TE#39	TE#40
Kanamycin	Entfernung der IgM CH1-Domäne	pTE#20	TE#41	TE#42

Zur Analyse der Immunantwort TE01-transgener Mäuse nach Immunisierung mit AAV1 wurde das VHH-Repertoire aus cDNA der lymphatischen Organe mit IgM- und IgG-spezifischen Primern (Tabelle 4.8) unter folgenden Bedingungen amplifiziert (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7 Amplifikation von VHH- und VH-Fragmenten aus cDNA mit der KOD Polymerase

Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
ddH ₂ O	32	95	120	30x
KOD Puffer (10x)	5	95	30	
dNTPs (2 mM each)	5	58	20	
25 mM MgSO ₄	2	70	20	
Primer 1 (10µM)	2	70	600	
Primer 2 (10µM)	2	4	-	
cDNA	1			
KOD Polymerase	1			
	50 µl			

Tabelle 4.8 Primerpaare zur Amplifikation von VHH- und VH-Fragmente

Amplifikat	Isotyp	5'Schnittstelle	3'Schnittstelle	f. Primer	r. Primer
VHH/VH	IgM	-	-	TE#131	TE#85
VHH/VH	IgG2b	-	-	TE#131	TE#127

In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die Amplifikate mit Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 versehen (Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9 Anheften von Restriktionsschnittstellen an VHH- und VH-Fragmente mit der Q5 Polymerase

Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
ddH ₂ O	18,5	98	30	30x
Q5 Puffer (5x)	10	98	10	
dNTPs (2 mM each)	5	65	20	
Q5 High GC Enhancer (5x)	10	72	40	
Primer 1 (10µM)	2,5	72	120	
Primer 2 (10µM)	2,5	4	-	
cDNA	1			
Q5 Polymerase	0,5			
	50 µl			

Zum Anheften der Restriktionsschnittstellen wurden dabei folgende Primer-Kombinationen verwendet (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10 Primerpaare zum Anheften von Restriktionsschnittstellen an VHH- und VH-Fragmente

Amplifikat	Isotyp	5'Schnittstelle	3'Schnittstelle	f. Primer	r. Primer
VHH/VH	IgM	<i>PciI</i>	<i>NotI</i>	TE#133	TE#134
VHH/VH	IgG2b	<i>PciI</i>	<i>NotI</i>	TE#133	TE#135

Zur Vorbereitung von VHH-Amplifikaten (Tabelle 4.7) für die Tiefensequenzierung wurden diese in zwei weiteren PCR-Reaktionen zunächst mit Linker-Sequenzen und im zweiten Schritt mit Adapter- und Barcode-Sequenzen verlängert (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11 Anheftung von Linker-, Adapter- und Barcode- Sequenzen für die Tiefensequenzierung

Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
ddH ₂ O	18,5	98	30	
Q5 Puffer (5x)	10	98	10	
dNTPs (2 mM jeweils)	5	55	20	4x
Q5 High GC Enhancer (5x)	10	72	40	
Primer 1 (10µM)	2,5	98	10	
Primer 2 (10µM)	2,5	67	20	29x
cDNA	1	72	20	
Q5 Polymerase	0,5	72	120	
	50 µl	4	-	

Die dazu verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 4.12 aufgelistet.

Tabelle 4.12 Primerpaare zur Anheftung von Linker-, Adapter- und Barcode-Sequenzen an VHH- und VH-Fragmente

Amplifikat	Isotyp	5'Anhang	3'Anhang	f. Primer	r. Primer
VHH/VH	IgM	Linker	Linker	TE#136	TE#137
VHH/VH	IgM	Barcode	Adapter	Barcode-spezifisch	TE#139
VHH/VH	IgG2b	Linker	Linker	TE#136	TE#138
VHH/VH	IgG2b	Barcode	Adapter	Barcode-spezifisch	TE#139

4.1.8 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA

Zum Restriktionsverdau von DNA (Plasmid-Vektoren, BACs, PCR-Produkte) wurden Restriktionsenzyme von NEB eingesetzt. Die Puffer und Reaktionsbedingungen wurden mithilfe der *NEB Interactive Tools* wie z. B. dem *Double Digest Finder* auf der NEB-Webseite ermittelt. Inkubationen wurden abhängig von Ausgangsmaterial und Anwendung in 20 µl oder 50 µl Reaktionsvolumen für 1 bis 7 Stunden durchgeführt. Vektor-DNA für die Klonierung wurde anschließend mit 1 µl Antarctic Phosphatase (NEB) und 1/10 (v/v) des dazugehörigen Puffers versetzt und für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert.

4.1.9 Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung

DNA- und RNA- Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese größenfraktioniert. Abhängig von der Anzahl der Proben und der Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,7-1,5 % (w/v) Agarose in 50-150 ml TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen mit 0,005 % (v/v) Roti Gel-Stain (Carl Roth) versetzt. Die Proben wurden mit 1/6 (v/v) Probenpuffer (6 x DNA-loading dye, Fermentas) gemischt und in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte abhängig von der Größe der Fragmente bei einer

Spannung von 70-90 V für 1-3 h. Die DNA- oder RNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und fotografiert. Alternativ wurden die DNA-Fragmente zur weiteren Verwendung aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des Nucleospin Extract II Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Eluiert wurden die DNA-Fragmente in 15-50 µl destilliertem Wasser, das zuvor auf 60 °C vorgewärmt wurde.

4.1.10 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Konzentration und Reinheit doppelsträngiger DNA- und RNA-Proben wurde nach deren Aufreinigung routinemäßig mithilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop 2000c) überprüft. Dazu wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und mithilfe von spezifischen Faktoren für DNA ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$) und RNA ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$) in Konzentrationen umgerechnet. Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} wurde als Marker für die Reinheit verwendet. DNA-Präparationen mit einem Wert zwischen 1,8-2,0 sowie RNA-Präparationen mit einem Wert zwischen 2,0 - 2,2 wurden als ausreichend rein angesehen.

4.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden diese mit 100 - 200 ng des Vektors in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) gemischt. Alle Ligationsreaktionen wurden mit der T4-DNA-Ligase (NEB) im mitgelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 20 µl, die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

4.1.12 Transformation kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente Bakterienstämme wurden mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurden 100 µl kompetente Bakterienzellen für 30 min auf Eis aufgetaut. Abhängig vom Ausgangsmaterial wurden 1 µl (Plasmid-Mini- oder Maxi-Präparation) bzw. 3 µl (Ligationsreaktionen) zu den kompetenten Zellen gegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde daraufhin für 30 s bei 42 °C im Wasserbad erwärmt und sofort für weitere 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde dem Ansatz 900 µl 42 °C-warmes SOC-Medium zugegeben und die Zellsuspension für 60 min bei 37 °C und 800 rpm im Thermoschüttler inkubiert. 50 und 450 µl der Zellsuspension wurden auf Antibiotika-haltige Agarplatten plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.13 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden 5 ml (Miniprep) bzw. 100 ml (Maxiprep) Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe der Qiaprep Spin Miniprep- oder Maxiprep-Kits nach den Protokollen des Herstellers (Qiagen, Hilden).

4.1.14 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden 15 µl gereinigte DNA mit einer Konzentration von 50-100 ng/µl (Plasmide) bzw. 1-10 ng/µl (PCR-Produkte) mit 2 µl (10 µM) des entsprechenden Sequenzier-Primers versetzt. DNA-Sequenzierungen wurden von Eurofins durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SeqMan aus dem Softwarepaket Lasergene (DNASTAR, Inc.).

4.2 Herstellung und Charakterisierung transgener Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden entweder in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) oder der Versuchstierhaltung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) gezüchtet und gehalten. Alle Tierversuche unterlagen den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und wurden in den Räumlichkeiten der zentralen Versuchstierhaltung durchgeführt.

4.2.1 Pronukleusinjektion

Die Vorbereitung der Transgene und die Durchführung der Pronukleusinjektionen erfolgte durch Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und ihren Mitarbeitern der *Core Facility* „Transgene Mäuse“ im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH).

Die BAC-Konstrukte TE01, TE02 und TE03 wurden jeweils nach ihrer Aufreinigung mittels *NotI*-Restriktionsverdau in einem Volumen von 400 µl über Nacht bei 37 °C linearisiert. Die Ansätze wurden anschließend mit gleichem Volumen eines Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Gemisches (25/24/1) versetzt und für 15 min durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die BAC-DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol absolut gefällt. Nach zwei Waschschritten mit 70 %igem Ethanol wurde das Pellet in BAC-Injektionspuffer gelöst und vor Gebrauch mindestens zwei Tage bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde 1/10 des Ansatzes zur Qualitätskontrolle auf ein 0,7 %iges

Agarosegel geladen, die DNA-Konzentration im Nanodrop2000c (ThermoFischer Scientific) bestimmt und mit BAC-Injektionspuffer auf 1 ng/µl eingestellt. Das lineare Konstrukt wurde in den männlichen Pronukleus befruchteter Embryonen im Einzellstadium aus C57BL/6J x CBA (B6/CBA) Mäusen nach Standardverfahren injiziert und anschließend in scheinchwangere Ammen implantiert (Nagy, 2003). *Founder*-Mäuse wurden auf Ig-defiziente JHT-Mäuse (Gu *et al.*, 1993) rückgekreuzt.

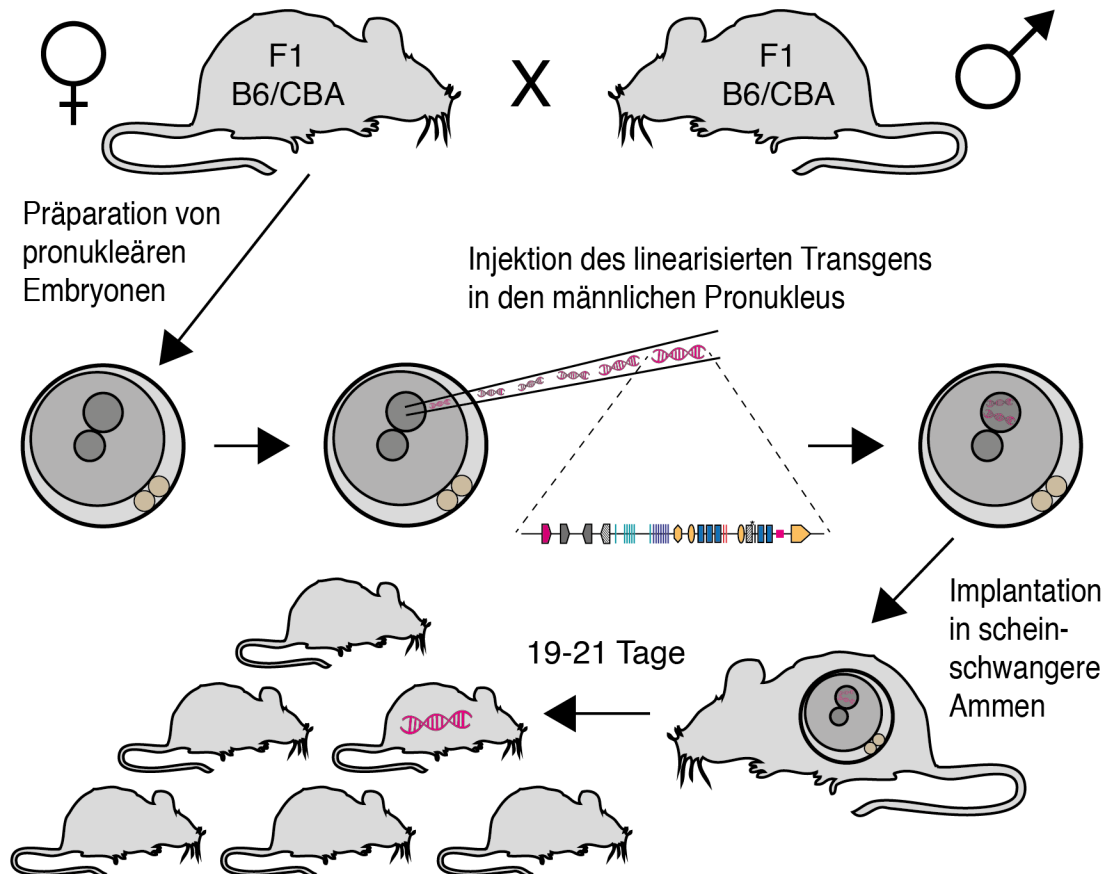


Abb. 4.3 Schematische Darstellung zur Herstellung BAC-transgener Mäuse.

Nach Verpaarung von B6/CBA-Mäusen aus der F1-Generation werden pronukleäre Empryonen im Einzellstadium präpariert. Das linearisierte Transgen wird durch eine dünne Glaskapillare in den männlichen Pronukleus der Eizelle injiziert. Die Embryonen werden daraufhin in scheinchwangere Ammen der B6/CBA-F1-Generation implantiert. Die Nachkommen werden auf Integration des Transgens untersucht.

4.2.2 Aufreinigung genomischer DNA aus Gewebeproben

Zur Identifizierung von Transgen-tragenden Mäusen wurde genomische DNA aus Ohrbiopsien von 4 Wochen alten Mäusen isoliert. Die Lyse des Gewebes erfolgte durch Zugabe von 600 µl Lysepuffer, versetzt mit 60 µg Proteinase K (100 µg/mL) und Inkubation über Nacht im Heizblock bei 55 °C unter leichtem Schütteln. Am Folgetag wurden Gewebereste durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm abgetrennt. Die Fällung der genomischen DNA aus

dem Überstand erfolgte durch Vermischen mit 600 µl Isopropanol. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand durch Dekantieren entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Um das DNA-Pellet vollständig in Lösung zu bringen, wurden die Proben für weitere 2-3 Stunden bei 55 °C im Heizblock inkubiert.

4.2.3 PCR-Genotypisierung

Um die Keimbahn-Übertragung der BAC-Transgene TE01, TE02 und TE03 zu überprüfen, wurden PCR-Reaktionen auf genomischer Maus-DNA mit dem Platinum Blue PCR SuperMix (ThermoFisher Scientific) unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13 Amplifikation von Transgen-Fragmenten aus genomischer Maus-DNA

Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
Platinum Blue PCR SuperMix	18	95	20	30x
f.Primer (10µM)	1	60	30	
r.Primer (10µM)	1	72	60	
genomische DNA (100 ng)	1	72	10	
	21	4	-	

Es wurden insgesamt vier Primer-Paare verwendet, die für die 5'- und 3'-Enden des Transgens (V_HH und 3'LCR) sowie die konstanten Regionen IgM und IgG2b spezifisch waren (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14 Primerpaare zur Genotypisierung Lama IgH-transgener Mäuse

Lokus	Amplifikatgröße	f. Primer	r. Primer
V _H H	375 bp	TE#49	TE#50
3'LCR	762 bp	TE#47	r.pCC1
IgM	1783 bp	TE#4	TE#2
IgG2b	188 bp	TE#16	TE#17

Der Defekt des endogenen IgH-Lokus (Deletion der J-Elemente und des µ-Verstärkerelements) von B-Zell-defizienten JHT-Mäusen wurde unter Verwendung derselben PCR-Bedingungen verifiziert. Die Amplifikation mit den Primern TE#115 und TE#116 resultierte für C57BL/6J Wildtyp-Mäuse in einem 572 bp großen Amplifikat. Homozygote JHT-Mäuse ließen sich durch Abwesenheit des PCR-Produkts erkennen.

4.2.4 Immunisierung

Um die Fähigkeit zur Herstellung von funktionellen IgM- und IgG-Schwere-Ketten-Antikörpern zu verifizieren, wurde eine TE01-transgene Maus mit dem Modellantigen Adeno Assoziierter Virus Serotyp 1 (AAV1) immunisiert. Die Viren wurden von der UKE-internen Vektor-*Facility* durch Ingke Braren hergestellt und aufgereinigt. An jedem Immunisierungszeitpunkt wurden insgesamt 1×10^{11} virale Genome in 100 μ L PBS intramuskulär (IM) in die Oberschenkelmuskulatur der Hinterbeine injiziert. Die Maus erhielt in dreiwöchigen Intervallen insgesamt fünf Immunisierungen. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Maus getötet, um die Zellen aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark zu isolieren.

4.2.5 Präparation der lymphatischen Organe

Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde die TE01-transgene Maus getötet und die lymphatischen Organe präpariert. Milz, inguinale und axilläre Lymphknoten wurden unmittelbar nach der Präparation in 3 ml FACS-Puffer überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Ober- und Unterschenkelknochen der Mäuse wurden im Bereich der Hüftgelenkpfanne vom Tier getrennt. Haut- und Muskelgewebe wurde entfernt und die Knochen bis zur weiteren Verwendung in FACS-Puffer auf Eis gelagert. Später wurden die Gelenkköpfe der Knochen abgeschnitten und das Knochenmark mit FACS-Puffer durch eine Kanüle aus den Knochen in eine Petrischale gespült. Durch wiederholtes Einsaugen und Ausspülen durch eine Kanüle wurden größere Gewebeteile zerkleinert. Die Zellsuspension wurde danach in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer aus dem innuPREP RNA Mini Kit (analytik Jena) resuspendiert und direkt für die RNA-Aufreinigung eingesetzt.

Die Milz wurde dazu mit einer Schere zerkleinert und die Gewebestücke durch ein Zellsieb gerieben. Die Zellen wurde in einer mit FACS-Puffer benetzten Petrischale aufgefangen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die pelletierten Zellen jeweils in 1 ml Lysepuffer aufgenommen und direkt zur RNA-Präparation eingesetzt.

Die isolierten Lymphknoten wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Lysepuffer und einer kleinen Metallkugel (Tungsten Carbide beads, Qiagen) versetzt und anschließend im Tissue Lyser II (Qiagen) für 1 min bei einer Frequenz von 30 s^{-1} lysiert. Das Lysat wurde direkt für die RNA-Aufreinigung eingesetzt.

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Um die Rekonstitution der B-Zell-Entwicklung durch die Lama IgH-Transgene TE01, TE02 und TE03 in IgH-KO Mäusen (JHT) zu bestätigen, wurde eine Lymphozytenfärbung aus Blut transgener Mäuse unter Verwendung von CD45-, CD3- und CD19-spezifischen, Fluorochrom-konjugierten Antikörpern durchgeführt. Als Kontrollen wurden JHT- und C57BL/6J-Mäuse eingesetzt. Den Mäusen wurde jeweils etwa 100 µl Blut abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in Heparin-Tubes bei 4°C gelagert. Die Antikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben mit FACS-Puffer verdünnt und gemischt. Vor der Färbung wurden 50 µL Vollblut mit einem unkonjugierten CD16/CD32-spezifischen Antikörper (BioXCell) nach Herstellerangaben vorinkubiert, um unspezifische Bindung von Immunglobulinen an Fc-Rezeptoren zu vermeiden. Zur Färbung wurde das vorbehandelte Vollblut mit 50 µl des Antikörper-Gemisches für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Proben wurden anschließend mit 1 ml der zuvor 1:10 in ddH₂O verdünnten FACS-Lysing Solution (BD Biosciences) versetzt, um Erythrozyten unter hypotonen Bedingungen zu lysieren. Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis wurden alle Proben mit 3 ml FACS-Puffer aufgefüllt und für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Analyse auf Eis gelagert. Alle Messungen wurden im FACS CantoII Durchflusszytometer durchgeführt, die Auswertungen erfolgten mit der Software FlowJo (BD Biosciences).

4.4 Systembiologische Methoden

4.4.1 Next Generation Sequencing (NGS)

PCR-amplifizierte VHH-Bibliotheken aus den lymphatischen Organen der mit AAV1 immunisierten TE01-transgenen Maus wurden in zwei weiteren PCR-Reaktionen für die DNA-Tiefensequenzierung vorbereitet. Dabei wurden die VHHs zunächst mit Adapter- und Barcode-spezifischen Linker-Sequenzen versehen, die in einem zweiten PCR-Schritt durch Adapter- und Barcode-Sequenzen verlängert wurden (Tabelle 4.11 und Tabelle 4.12). Die VHH-Bibliotheken wurden in einem äquimolaren Verhältnis gemischt und an die UKE *Core Facility* „*Immune Repertoire Sequencing*“ übergeben. Die Qualitätskontrolle im Bioanalyzer (Agilent) sowie die Tiefensequenzierung im Illumina MiSeq-System wurde von Mitarbeitern der *Core Facility* durchgeführt. Die Tiefensequenzierung erfolgte mit 2 x 300 Zyklen als *Paired-End*-Läufe (Abb. 4.4). Die *Fastq*-formatierte Datenausgabe wurde vom MiSeq-Reporter erstellt. Rohe

Sequenzen wurden zu Ig VDJ-Klonotypen auf der Basis des MiXCR-Analysewerkzeugs (Bolotin *et al.*, 2015) verarbeitet. Dabei wurden Vor- und Rückwärtssequenzen zusammengeführt, in Aminosäuresequenzen übersetzt und Klonfrequenzen bestimmt. Die Verwendung von V-, D- und J-Elementen sowie die Berechnung und Visualisierung von Bibliotheksgröße und -vielfalt wurde mit der Software VDJtools (Shugay *et al.*, 2015) analysiert. Klone mit identischen CDR3-Sequenzen wurden als Familie gruppiert und diese anhand ihrer Größe (Anzahl der identischen Sequenzen) sortiert. Die bioinformatische Auswertung der generierten Daten wurde mit Unterstützung der UKE Bioinformatik *Facility* in Person von Malik Alawi durchgeführt.

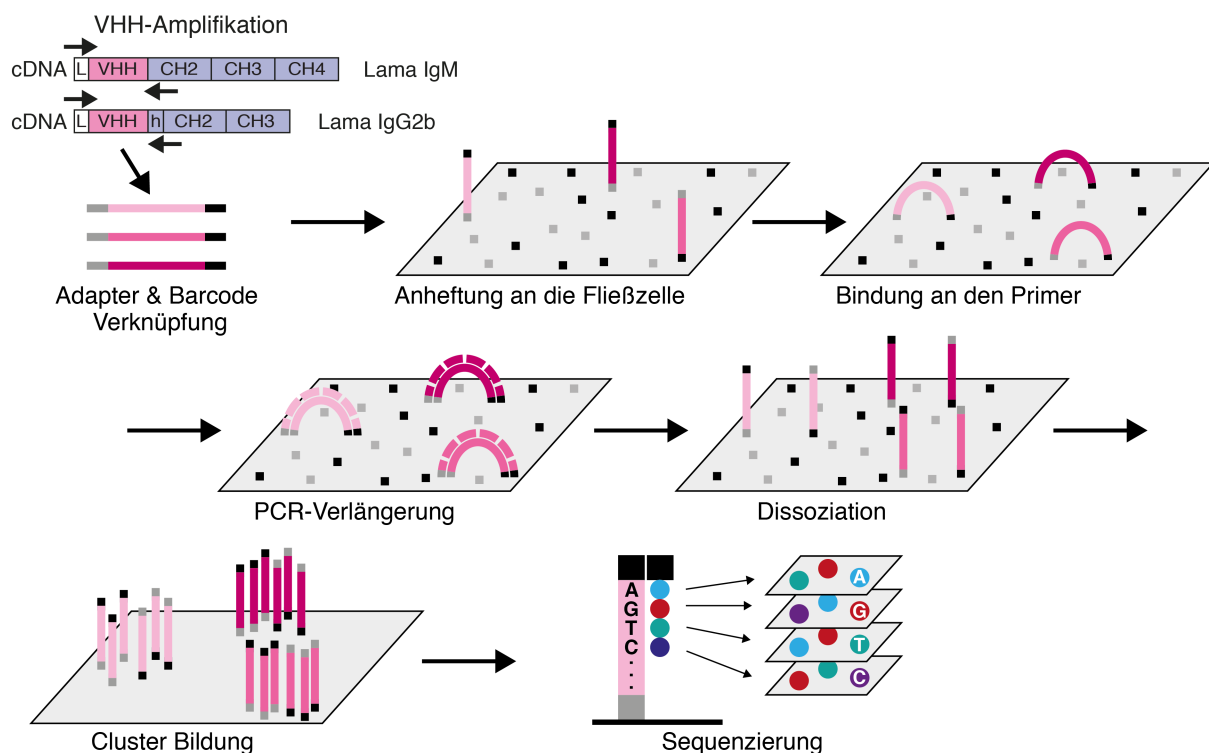


Abb. 4.4 Schematische Darstellung der DNA-Tiefensequenzierung mit dem Illumina MiSeq-System.

VHH-Fragmente werden über IgM- und IgG-spezifische PCR-Reaktionen aus cDNA lymphatischer Organe TE01-transgener Mäuse amplifiziert. Über zwei weitere PCR Reaktionen werden die VHH-Fragmente mit Adapter- und Barcodesequenzen verknüpft. Die Fragmente binden an Primer-beladene Fließzellen und Brücken-PCR-Reaktionen amplifizieren jedes gebundene Fragment, um Cluster von Fragmenten zu erzeugen. Während jedes Sequenzierungszyklus wird ein Fluorochrom-konjugiertes Nukleotid zu den wachsenden Strängen gegeben. Ein Laser regt die Fluorochrome in den Fragmenten an und ein optischer Scanner sammelt die Signale der einzelnen Fragmentcluster (modifiziert nach (Lu *et al.*, 2016)).

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung des Lama IgH-Transgens TE01

In Vorarbeiten der AG Nolte waren aus einer genomischen *Lama glama* BAC-Bibliothek zwei BACs isoliert worden, die den Kernbereich des Lama IgH-Lokus abdecken (Wesolowski, 2011) (Abb. 5.1). BAC V03 enthält ein V_HH -Gen, zwei V_H3 -Gene und ein V_H1 -Pseudogen. Eins der beiden V_H3 -Gene sowie das V_H1 -Pseudogen liegen in inverser (3'-5') Transkriptionsrichtung vor. Des Weiteren sind in BAC V03 jeweils alle natürlich im Lama vorkommenden D- und J-Elemente, das 5'-Verstärkerelement μE , das Gensegment für die konstante IgM-Region und das IgD Pseudogen enthalten. BAC F07 enthält die Genabschnitte für die konstanten Regionen von IgG2b, IgG1a, IgG1bI und IgG1bII. Der IgG2b-Lokus zeichnet sich durch eine Donor-Spleißmutation am 3'-Ende des CH1-Exons aus, eine Voraussetzung für die Produktion von entsprechenden IgG2b-Schwere-Ketten-Antikörpern im Lama (Achour *et al.*, 2008; Wesolowski, 2011).

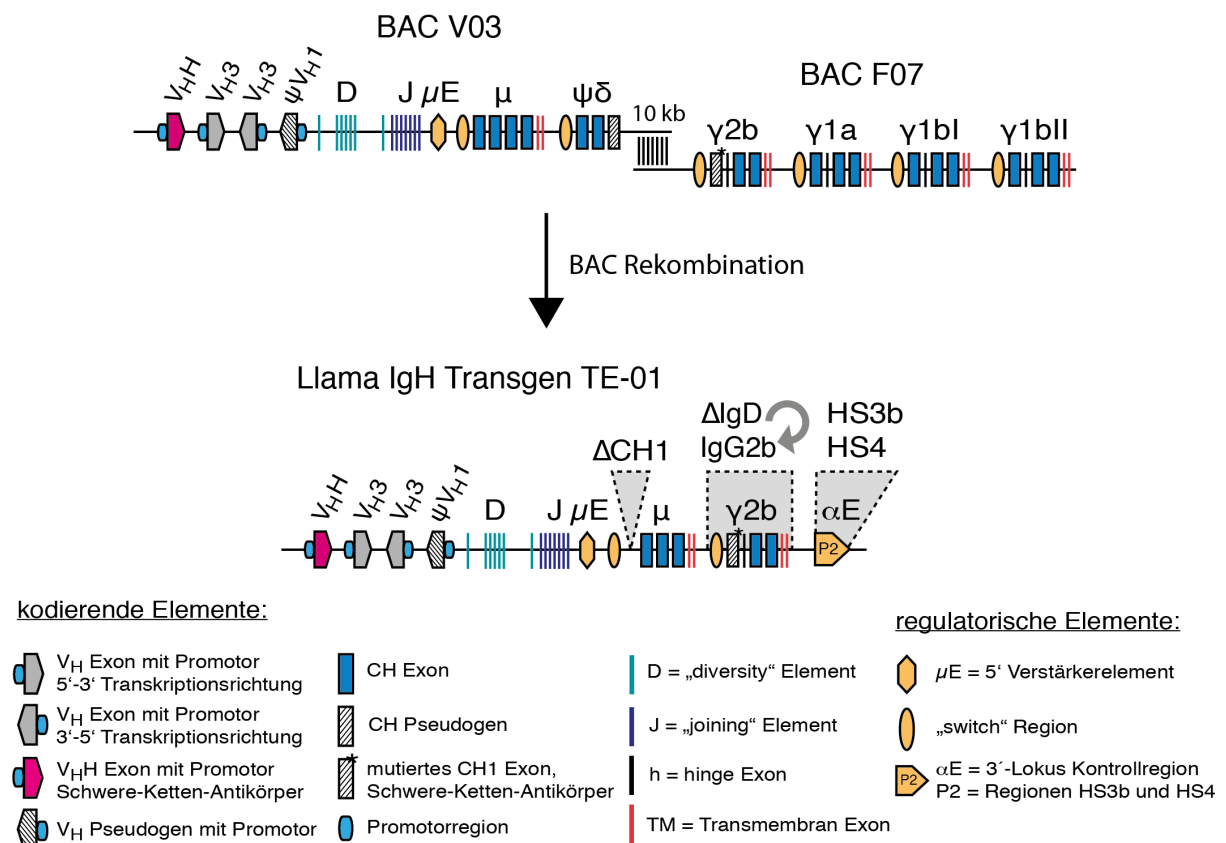


Abb. 5.1 Genetische Modifikationen zur Herstellung eines Lama IgH-Transgens.

Schematische Darstellung der aus einer genomischen *Lama glama* Bibliothek isolierten BACs V03 und F07 (Wesolowski, 2011), sowie der zur Herstellung eines funktionalen Lama IgH-Transgens notwendigen genetischen Modifikationen.

Um aus BAC V03 ein Lama IgH-Transgen zu erzeugen, das die Herstellung von kameliden Schwere-Ketten-Antikörpern in transgenen Mäusen ermöglicht, müssen mehrere DNA-Modifikationen vorgenommen werden (Abb. 5.1).

Zur Erkennung und Aktivierung des Lokus an einem zufälligen Integrationsort sowie zur Verstärkung der Immunglobulin-Synthese, des Klassenwechsels und der somatischen Hypermutation, wird die Maus 3'Lokus-Kontrollregion am 3'-Ende des Transgens benötigt. Diese besteht aus den Elementen HS3a, HS1,2, HS3b und HS4 (Pinaud *et al.*, 2001). Die beiden letztgenannten DNA-Abschnitte wurden bereits in einer vorangegangenen Arbeit in das 3'-Ende von BAC V03 eingefügt (Wesolowski, 2011). Die Entfernung der CH1-Domäne des IgM-Lokus soll die Paarung von schwerer und leichter Antikörperkette während der B-Zell-Entwicklung verhindern. Um den Klassenwechsel zu einem IgG-Isotyp zu ermöglichen, soll das IgD-Pseudogen durch den Schwere-Ketten-IgG2b-Lokus ersetzt werden.

In Abb. 5.2 sind die durchgeführten Modifikationen schematisch dargestellt. Die Elemente HS3b und HS4 waren in Vorarbeiten bereits in das 3'-Ende von BAC V03 eingefügt worden (Wesolowski, 2011). Zur Bestätigung dieser DNA-Modifikation wurde ein *EcoRI*-Verdau des modifizierten BACs durchgeführt. Durch die neu eingebrachte *EcoRI*-Schnittstelle entstehen anstelle der 8176 bp Bande in BAC V03 (Abb. 5.2 A und B, Sternchen 1) zwei Banden (9207 bp und 2452 bp) (Abb. 5.2 A und B, Sternchen 2 und 3). Die 9207 bp große Bande überlagert sich auf dem Agarosegel mit einer weiteren Bande ähnlicher Größe und ist durch Zunahme der Intensität zu erkennen (Abb. 5.2 B, Sternchen 2).

Als Nächstes wurde der IgD-Lokus gegen eine SRK-Selektionskassette ausgetauscht, die im zweiten Schritt durch ein Spectinomycin-Resistenzgen ersetzt wurde (Abb. 4.1). Die Entfernung des IgD-Lokus durch Integration der SRK-Kassette sowie der Austausch der SRK-Kassette gegen das Spectinomycin-Resistenzgen wurden durch PCR und Sequenzierung mit flankierenden Primern nachgewiesen.

Aufgrund der Ineffizienz des in Abb. 4.1 dargestellten Red/ET-Rekombinationsverfahrens, wurden alle weiteren BAC-DNA Modifikationen mit dem Rekombinationsstamm *E. coli* SW106 durchgeführt (Abb. 4.2). Voraussetzung für die mehrstufige Modifikation eines BACs, unter Verwendung von Selektionskassetten die von *loxP*-Mutanten flankiert werden (Parrish *et al.*, 2011), ist die Abwesenheit von Wildtyp-*loxP*-Erkennungssequenzen. Da das Vektorgerüst von BAC V03 eine *loxP*-Sequenz aufweist, wurde diese mittels homologer Rekombination in *E. coli* SW106 gegen ein Tetracyclin-Resistenzgen ausgetauscht. Die Integrität des BACs, sowie die erfolgreiche Entfernung der *loxP*-Sequenz, wurde anhand eines *EcoRV*-

Restriktionsverdau bestätigt. Die korrekte Integration der Selektionskassette wurde durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung mit flankierenden Primern verifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Für die Entfernung der CH1-Domäne im IgM-Lokus wurde diese gegen eine Kanamycin-Selektionskassette ausgetauscht, die von den *loxP*-Mutanten *lox71* und *lox66* umgeben wurde. Nach erfolgter Rekombination wurde die Integration der Kanamycin-Selektionskassette per PCR-Amplifikation mit flankierenden Primern bestätigt. Der Modifikation folgte eine *Cre/lox*-Rekombination zur Entfernung der Selektionskassette. Die Entfernung der CH1-Domäne führt nach PCR-Amplifikation mit flankierenden Primern zu einer Reduzierung der Größe des PCR-Produkts von 2139 bp auf 1783 bp (Abb. 5.2 C). Zur Bestätigung der Modifikation wurden beide Amplifikate sequenziert (Abb. 5.2 D). Die Ergebnisse zeigen, dass die CH1-Domäne im IgM-Lokus entfernt und durch die 32 bp große *loxP*-Mutante *lox72* ersetzt wurde.

Die Herstellung des Lama IgH-Transgens TE01 wurde durch die Insertion des kameliden IgG2b-Lokus komplettiert. Die Integration des 13,9 kb großen Konstrukts konnte anhand eines *EcoRI*-Restriktionsverdau nachgewiesen werden, da der neu eingebrachte Genlokus drei interne *EcoRI*-Schnittstellen enthielt. Die zusätzlichen *EcoRI*-Fragmente (8631, 5125 und 2072 bp) nach Restriktionsverdau des modifizierten BACs sind in Abb. 5.2 A und B mit den Sternchen 4, 5 und 6 markiert.

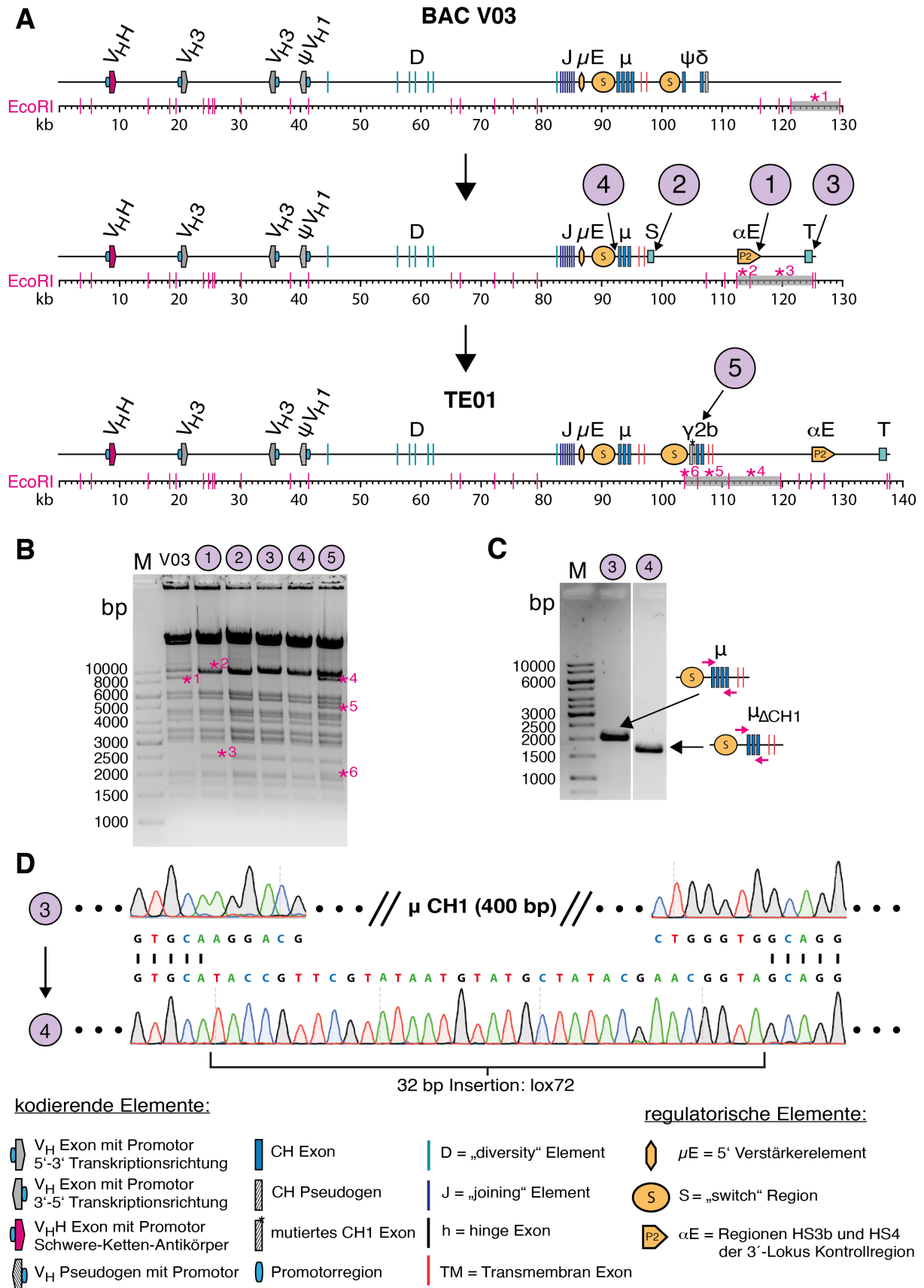


Abb. 5.2 Schrittweise DNA-Modifikation von BAC V03 zur Herstellung des Lama IgH-Transgens TE01.

A) Schematische Darstellung der schrittweisen Modifikationen von BAC V03 zur Herstellung von Lama IgH-Transgen TE01. Eine Skala in Kilobasen (kb) sowie die Position von *EcoRI* Restriktionsschnittstellen (Magenta) sind unter jedem Konstrukt angegeben. *EcoRI*-Fragmente, die sich als Folge von DNA-Modifikationen verändert

haben, sind mit einem nummerierten Sternchen in Magenta markiert. Folgende DNA Modifikationen wurden mittels homologer Rekombination durchgeführt: 1) Insertion von HS3b und HS4 (α E-P2) der Maus 3'-Lokus-Kontrollregion am 3'-Ende des IgH-Lokus (Wesolowski, 2011). 2) Austausch des IgD-Pseudogens gegen eine Spectinomycin-Selektionskassette (S). 3) Austausch der *loxP*-Erkennungssequenz am 3'-Ende des BACs gegen eine Tetracyclin-Selektionskassette (T). 4) Entfernung der CH1-Domäne im Lama IgM-Lokus. 5) Austausch der Spectinomycin-Selektionskassette gegen den Lama IgG2b-Lokus. B) Agarosegel-Analyse des *EcoRI*-Restriktionsverdaus der o. g. Konstrukte. Durch die Klonierungen veränderte *EcoRI*-Banden sind wie in (A) mit einem entsprechenden, nummerierten Sternchen in Magenta markiert. C) Agarosegel-Analyse der PCR-Produkte des Lama IgM-Lokus vor (3) und nach (4) Entfernung der CH1-Domäne (irrelevante Spuren zwischen (d) und (e) wurden zur besseren Übersicht ausgeschnitten). D) Sanger Sequenzierung der in (C) gezeigten PCR-Produkte vor (3) und nach (4) Entfernung der CH1-Domäne.

Nachdem alle DNA-Modifikationen erfolgreich durchgeführt und verifiziert waren, wurde das linearisierte BAC-Transgen mittels pronukleärer Injektion auf C57BL/6J x CBA Mäuse übertragen (Absatz 4.2.1). Die Charakterisierung der resultierenden, TE01-transgenen Mäuse wird im nachfolgenden Kapitel 5.2 beschrieben.

5.2 Charakterisierung TE01-transgener Mäuse

TE01-transgene Mäuse wurden mit verschiedenen Methoden charakterisiert. Zunächst wurde die Integration des Transgens sowie dessen Keimbahnübertragung mittels PCR-Amplifikation von BAC-Fragmenten verifiziert (Absatz 5.2.1). Danach wurde die Rekonstitution der B-Zell-Entwicklung mittels durchflusszytometrischer Analyse von peripheren Blutzellen überprüft (Absatz 5.2.2). Zur Charakterisierung der Immunantwort wurde eine TE01-transgene Maus mit AAV1 (Adeno Assoziierter Virus Serotyp 1) immunisiert (Absatz 5.2.3), das resultierende IgM- und IgG-Antikörperrepertoire aus cDNA lymphatischer Organe amplifiziert (Absatz 5.2.4) und mittels Tiefensequenzierung analysiert (Absatz 5.2.5). Parallel dazu wurden die PCR-Amplifikate des VHH-Repertoires in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert (Absatz 5.2.4), die Sequenzen von 100 Klonen mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt und mit den Daten aus der Tiefensequenzierung verglichen.

5.2.1 Überprüfung der Keimbahnübertragung von TE01

Drei Wochen nach Implantation der mit BAC-DNA injizierten Eizellen in scheinsschwangere Ammen wurden Nachkommen geboren, deren genomische DNA aus Ohr-Gewebeproben isoliert wurde (Absatz 4.2.2). Um BAC-transgene Mäuse zu identifizieren und die Vollständigkeit des insertierten BACs zu überprüfen, wurden vier PCR-Reaktionen pro Tier durchgeführt, mit denen die 5'- und 3'-Enden des Transgens sowie Teile des IgM- und IgG2b-Lokus amplifiziert wurden (Absatz 4.2.3). Die Lokalisation der verwendeten Primerpaare auf dem BAC-Transgen TE01, sowie die erwarteten Größen der resultierenden PCR-Produkte sind

in Abb. 5.3 A angegeben. Von 100 analysierten Nachkommen konnten für zwei Tiere (4459#66 und 4459#78) alle getesteten Bereiche des BACs nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur offensichtlich vollständigen Integration des Transgens in diesen potentiellen Gründungs-Tieren (*Founder*) zeigten ~10 % der getesteten Tiere lediglich Teilintegration des BACs. Für *Founder* 4459#66 konnte im weiteren Verlauf keine Rekonstitution der B-Zell-Entwicklung gezeigt werden. Deshalb werden im Folgenden nur die Ergebnisse zur Charakterisierung von *Founder* 4459#78 beschrieben.

Die PCR-Analyse der genomischen DNA des Founders 4459#78 (F) im Vergleich zu gereinigter BAC-DNA (T) deutet auf die vollständige Integration des Transgens TE01 in das Genom des *Founders* 4459#78 hin (Abb. 5.3 B). Als Negativkontrolle (K) wurde genomische DNA einer C57BL/6J Wildtyp-Maus verwendet. Nach Kreuzung der Lama IgH-transgenen Maus mit einer C57BL/6J Wildtyp-Maus wurden die Nachkommen zur Überprüfung der Keimbahnübertragung erneut auf Integration des Transgens untersucht. In drei von fünf Mäusen eines Wurfs konnten die 5'- und 3'-Enden von BAC TE01 identifiziert werden (Abb. 5.3 C).

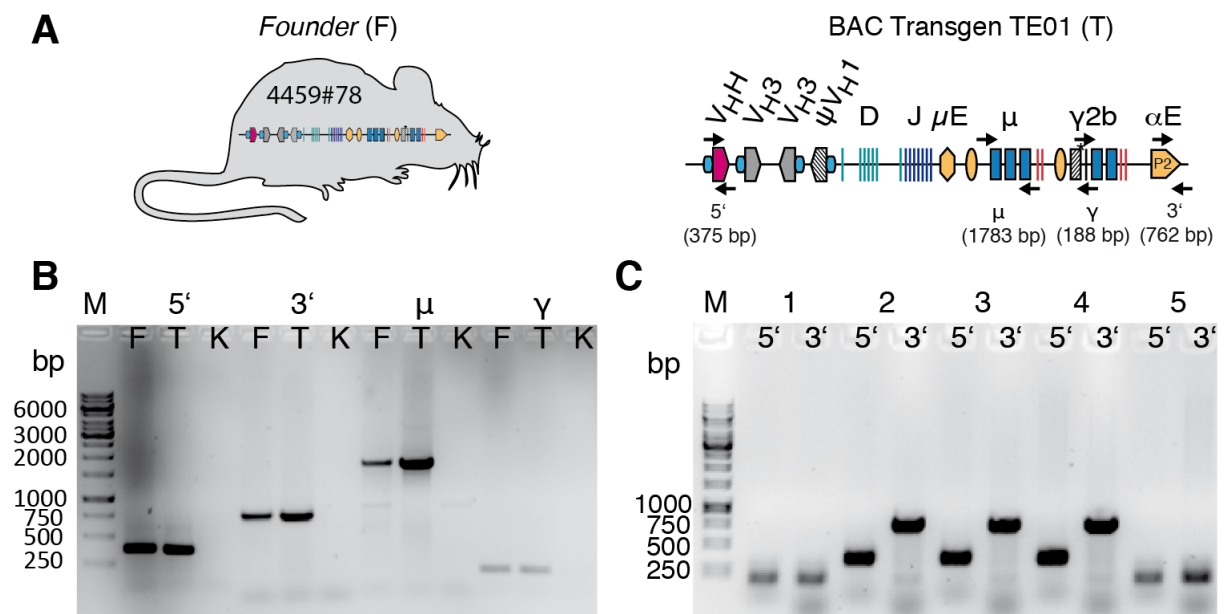


Abb. 5.3 Nachweis der Keimbahnübertragung von Lama IgH-Transgen TE01.

A) Schematische Darstellung des Lama IgH-Transgens TE01 mit Lokalisierung der zur Genotypisierung verwendeten PCR-Primer. B) Agarosegel-Analyse der PCR-Produkte aus genomischer DNA des TE01-*Founders* 4459#78 (F), einer C57BL/6J WT-Maus (K) und dem BAC-Transgen TE01 (T) mit den vier in (A) gezeigten Primer-Paaren (5', μ, γ, 3'). C) Agarosegel-Analyse der PCR-Produkte (5', 3') aus genomischer DNA von fünf Nachkommen (1-5) einer Kreuzung zwischen TE01-*Founder* 78 und einer C57BL/6J WT-Maus.

Im weiteren Zuchtverlauf fiel auf, dass nur die weiblichen Nachkommen eines TE01-transgenen Männchens das BAC-Transgen trugen. Dies lässt auf eine X-chromosomale Integration des Transgens schließen.

5.2.2 Nachweis rekonstituierter B-Zell-Entwicklung in TE01-transgenen Mäusen

Nach erfolgreicher Bestätigung der Keimbahnübertragung wurden Nachkommen des TE01-transgenen *Founders 78* auf B-Zell-defiziente JHT-Mäuse mit endogenem IgH-*knockout* (IgH-KO) rückgekreuzt. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die Entwicklung von B-Zellen ausschließlich durch ein funktionstüchtiges Lama IgH-Transgen gesteuert wird. Aufgrund von fehlenden J-Elementen, kann in JHT-Mäusen keine VDJ-Rekombination erfolgen. Dies verhindert die Produktion eines intakten Maus B-Zell-Rezeptors und blockiert somit die Entwicklung reifer B-Zellen (Gu *et al.*, 1993).

Um zu prüfen, ob das Lama IgH-Transgen TE01 in IgH-KO Mäusen die Entwicklung von B-Zellen rekonstituiert, wurden periphere Blutzellen von 9-12 Wochen alten Mäusen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD45 (Lymphozyten), CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 5.4). Die Ergebnisse zeigen für Nachkommen von *Founder 78* auf dem IgH-KO Hintergrund (F3: Mäuse 326, 345, 347 und 373) in der Tat eine rekonstituierte B-Zell-Entwicklung. Allerdings liegt der relative Anteil der B-Zellen bei diesen Nachkommen mit 0,5 - 4 % deutlich unter dem von Wildtyp Tieren (50-60%). Für die Zucht wurden in der Folge jeweils Tiere mit relativ hohem Anteil von B-Zellen ausgewählt. Die folgende Generation (F4: Mäuse 17, 19, 25 und 29) zeigte einen B-Zell-Anteil zwischen 3,3 und 9,9 %. Der höchste bisher erzielte B-Zell-Anteil einer TE01-Maus betrug 13% (s. unten, Abb. 5.14).

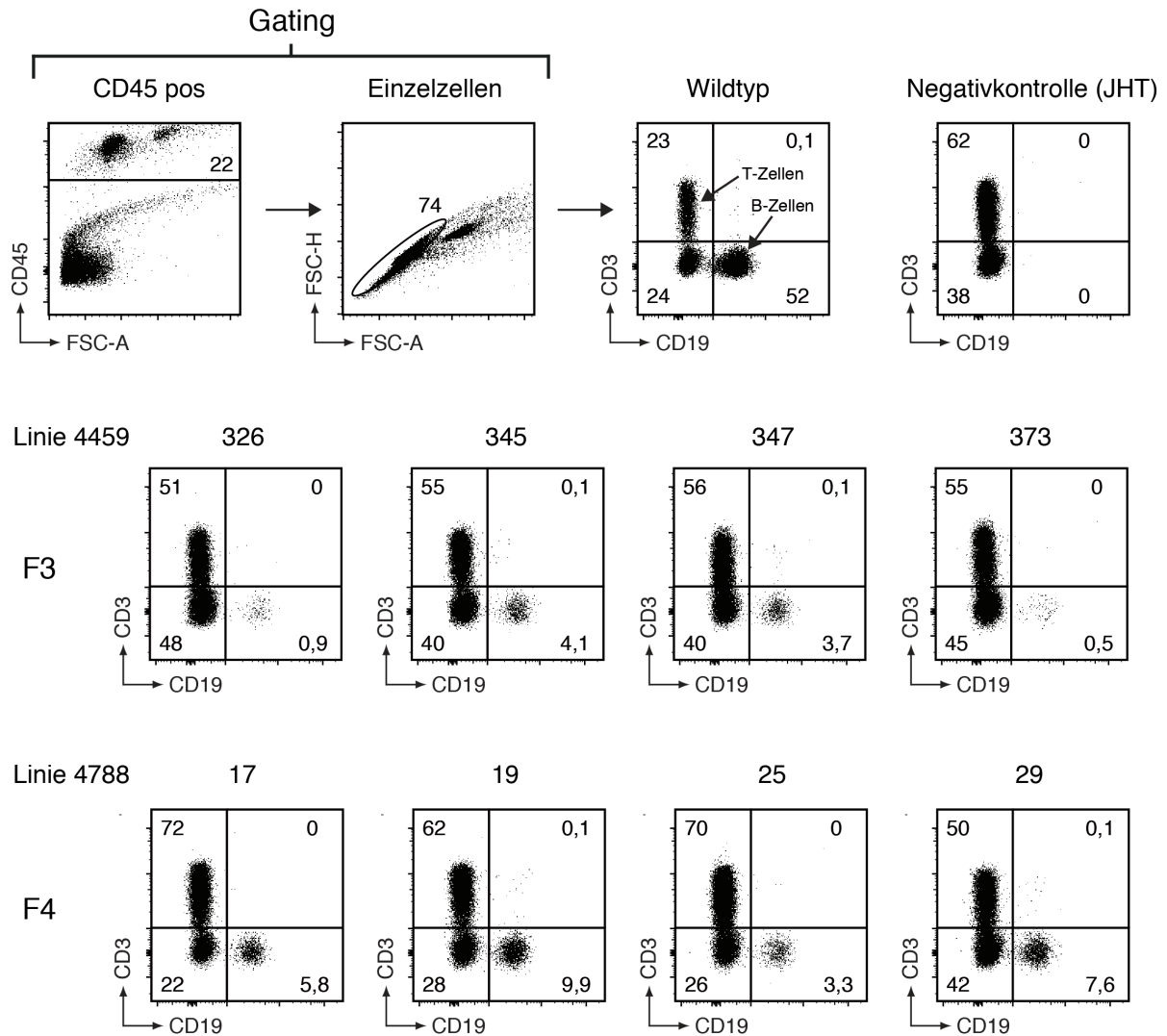


Abb. 5.4 Lama IgH-Transgen TE01 rekonstituiert die Entwicklung von B-Zellen in IgH-KO Mäusen.

Periphere Blutzellen von 9-12 Wochen alten Mäusen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD45 (Lymphozyten), CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) angefärbt, gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde ein "gating" auf CD45⁺ Einzelzellen durchgeführt. Zahlen in den jeweiligen Quadranten zeigen den relativen Anteil der jeweiligen Population (in % der CD45⁺ Einzelzellen). Zum Vergleich wurden Zellen aus Wildtyp (WT) und IgH-KO Mäusen (JHT) analysiert. Gezeigt sind Analyse-Ergebnisse von Nachkommen der dritten (F3: 326, 345, 347, 373) und vierten (F4: 17, 19, 25, 29) Generation des TE01-Founders 78. Ab der vierten Generation wurden die Tiere unter einem neuen Linien-Namen (4788) weitergeführt.

Aufgrund der Verwendung von Mäusen mit hohem B-Zell-Anteil für die Zucht, konnten zunächst nur Mäuse mit geringerem B-Zell-Anteil für die Immunisierung zur Induktion Antigen-spezifischer Schwere-Ketten-Antikörper eingesetzt werden. Die Mäuse 326 (0,9 % B-Zellen) und 373 (0,5 % B-Zellen) wurden für die Immunisierung mit dem Zielantigen AAV1 eingesetzt. Nachfolgend werden die dabei erhaltenen Ergebnisse für Maus 373 beschrieben.

5.2.3 Immunisierung der TE01-transgenen Maus 373 mit dem Modellantigen AAV1

Um die Fähigkeit von TE01-transgenen Mäusen zur Herstellung funktionaler IgM- und IgG-Schwere-Ketten-Antikörper zu untersuchen, wurde Maus 373 mit gereinigten AAV1-Viruspartikeln immunisiert. Dazu wurden insgesamt fünf intramuskuläre Injektionen in dreiwöchigen Intervallen mit je 1×10^{11} viralen Genomen AAV1 durchgeführt (Abb. 5.5).

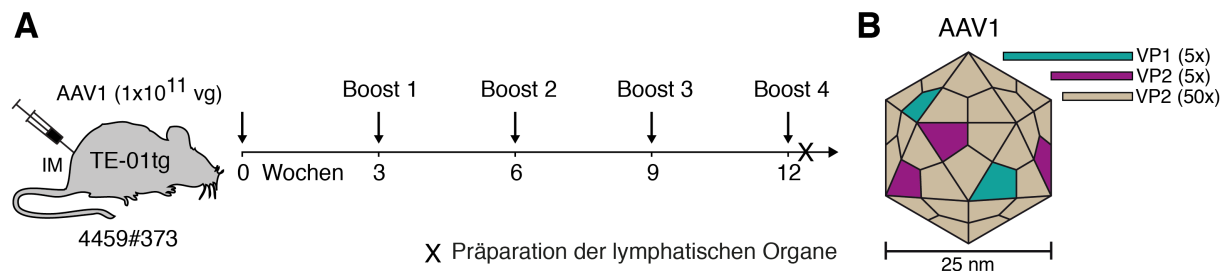


Abb. 5.5 Schematische Darstellung der Immunisierung einer TE01-transgenen Maus mit AAV1.

A) Die TE01-transgene Maus 373 wurde fünfmal (schwarze Pfeile) intramuskulär mit AAV1 Viruspartikeln immunisiert (1×10^{11} virale Genome in 100 μ l PBS). Drei Tage nach der letzten Boost-Immunisierung wurde die Maus getötet und Zellen aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark isoliert. **B)** Schematische Darstellung des Immunogens AAV1. Die Virushülle (Kapsid) setzt sich aus 60 Hüllproteinen (5x VP1, 5x VP2 und 50x VP3) zusammen.

Drei Tage nach der letzten Boost-Immunisierung wurde die Maus getötet um Zellen aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark zu gewinnen.

5.2.4 Amplifikation und Klonierung des VHH-Repertoires

Aus den lymphatischen Organen der Maus 373 wurde RNA extrahiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 5.6 A). Die Ergebnisse deuten auf eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Degradation der RNA (relative schwache 28S-RNA Bande). Die RNA wurde unter Verwendung von randomisierten Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben und das VHH-Repertoire anschließend mit IgM- und IgG-spezifischen Primern PCR-amplifiziert (PCR1). Resultierende PCR-Amplifikate wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 5.6 B). Im Fall von IgM-spezifischen Primern zeigen die Ergebnisse deutliche Banden der erwarteten Größe bei Milz und Knochenmark, im Fall von IgG-spezifischen Primern ist eine schwache Bande der erwarteten Größe nur bei der Milz sichtbar. Die PCR-Produkte auf Höhe der erwarteten Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und einer zweiten PCR unterzogen, bei der Adapter- und Barcode-spezifische Linkersequenzen über entsprechende Primer-Überhänge angefügt wurden (PCR2). Die Ergebnisse einer weiteren Agarosegel-Analyse zeigen nun deutliche Banden der erwarteten Größe auch bei den Reamplifikaten mit IgG-spezifischen Primern (Abb. 5.6 C). In einem dritten PCR-Schritt

wurden die gereinigten PCR-Produkte aus der PCR2 mit Illumina-Adaptersequenzen verlängert und ein probenspezifischer Barcode hinzugefügt (PCR3). Die Ergebnisse einer weiteren Agarosegel-Analyse zeigen deutliche Banden der erwarteten Größe bei IgM aus Milz und Knochenmark sowie bei IgG aus Milz- und Lymphknoten (Abb. 5.6 D). Die VHH-spezifischen Banden wurden gereinigt und als Ausgangsmaterial für die Tiefensequenzierung eingesetzt (Absatz 5.2.5).

Parallel zur Amplifikation der VHHs für die Tiefensequenzierung, wurden die gereinigten PCR-Produkte aus der PCR1 in einem weiteren PCR-Schritt mit Restriktionsschnittstellen (*PciI* und *NotI*) für die Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 versehen (PCR4). Die Ergebnisse einer Agarosegel-Analyse der PCR4 zeigen Banden der erwarteten Größe in allen Proben, die bei IgG aus Lymphknoten und Knochenmark allerdings nur sehr schwach sind. Auffällig ist eine prominente 1 kb Bande bei Lymphknoten IgG, die deutlich stärker ist als die darunterliegende Bande auf Höhe des erwarteten VHH-Produktes (Abb. 5.6 E). Amplifikate der erwarteten Größe wurden gereinigt, einem Restriktionsverdau unterzogen und in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 kloniert. Dieser Vektor enthält bereits die kodierenden Sequenzen für den Maus Ig κ -Leader, ein Intron, sowie die kodierenden Sequenzen für die hinge-, CH2- und CH3-Domänen des Kaninchen-IgG. Das Expressionskonstrukt sowie der darin kodierte Schwere-Ketten-Antikörper sind schematisch in Abb. 5.6 F dargestellt.

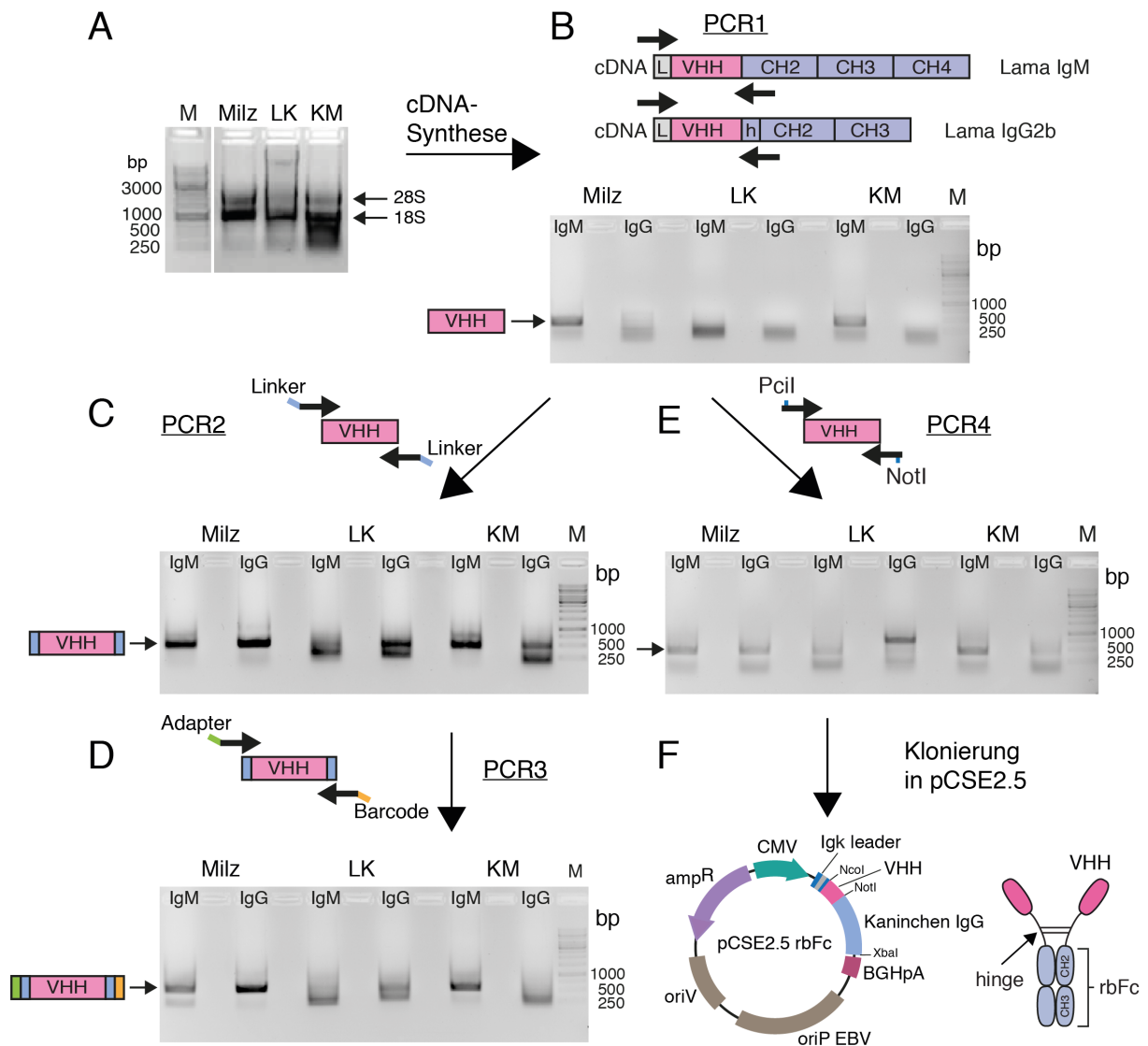


Abb. 5.6 PCR-Amplifikation des IgM- und IgG-Repertoires aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark der mit AAV1 immunisierten TE01-transgenen Maus 373.

A) Agarosegel-Analyse präparierter RNA aus den Zellen der mit AAV1 immunisierten Maus 373. Die RNA wurde mittels randomisierter Hexamer Primer in cDNA transkribiert. **B-E)** Das VHH-Repertoire wurde dann wie schematisch dargestellt in jeweils 2-3 aufeinander folgenden PCR-Schritten amplifiziert. Die PCR-Amplifikate wurden dabei für die Tiefensequenzierung mit Barcodes bzw. mit geeigneten Restriktionsenzym-Schnittstellen für die Klonierung versehen. **B)** Agarosegel-Analyse der 1.Schritt-PCR-Amplifikate mit IgM- und IgG-spezifischen Primern. **C)** Verlängerung der PCR-Produkte mit Adapter- und Barcode-kompatiblen Linker-Sequenzen. **D)** Anheftung von Adapter- und Barcode-Sequenzen. Die mit dem Pfeil markierten Banden wurden gereinigt und als Ausgangsmaterial für die Tiefensequenzierung eingesetzt. **E)** Agarosegel-Analyse der 2.Schritt-PCR, bei der die Amplifikate mit Restriktionsschnittstellen versehen wurden. **F)** Klonierung des VHH-Repertoires in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pCSE2.5), der bereits die kodierenden Sequenzen für den Maus Igk-Leader, sowie für die hinge, CH2- und CH3-Domänen des Kaninchen-IgG enthält.

5.2.5 Analyse der Immunantwort mittels Next Generation Sequencing (NGS)

Wie bereits in Absatz 5.2.4 beschrieben, wurden die PCR-amplifizierten VHH-Bibliotheken aus den lymphatischen Organen der TE01-transgenen Maus 373 mit Linker-, Adapter- und Barcode-spezifischen Primern für die Illumina-Sequenzierung reamplifiziert. Die Tiefensequenzierung wurde mit 2 x 300 Zyklen als *Paired-End*-Läufe durchgeführt (Abb. 4.4). Die MiXCR-Dateiausgabe diente als Input für eine *Rarefaction*-Analyse, die mit der Software VDJtools (Shugay *et al.*, 2015) zur Berechnung und Visualisierung von Bibliotheksgröße und -vielfalt angefertigt wurde (Abb. 5.7).

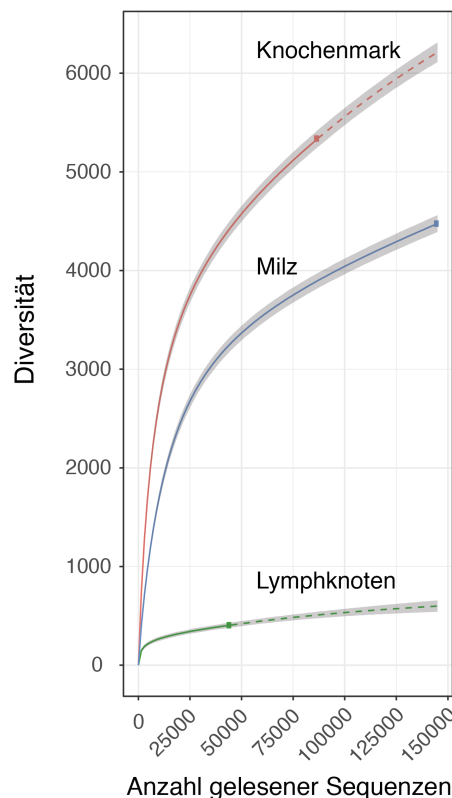


Abb. 5.7 Rarefaction-Analyse der tiefensequenzierten VHH-Bibliotheken zeigt hohe Diversität in Knochenmark und Milz.

Die in Abb. 1.6 E gezeigten, mit Adaptern und Barcodes versehenen PCR-Produkte aus Knochenmark, Milz und Lymphknoten der AAV1-immunisierten Maus 373 wurden einer Tiefensequenzierung unterzogen. Mit der erhaltenen Sequenzbibliothek wurde eine Rarefaction-Analyse durchgeführt. Dabei wurden Sequenzen, die eine identische CDR3 kodieren, als Klone zusammengefasst. Dargestellt ist die Anzahl intakter gelesener Sequenzen gegen die Diversität (Anzahl unterschiedlicher CDR3-Regionen). Durchgezogene Linien zeigen die tatsächlich analysierten Sequenzen (LK ca. 40.000, Milz ca. 150.000, Knochenmark ca. 80.000). Gestrichelte Linien sind interpoliert.

Der *Rarefaction*-Plot gibt Auskunft über die Größe (Anzahl intakter gelesener Sequenzen), sowie die Diversität (Anzahl unterschiedlicher CDR3-Regionen) der erstellten Bibliotheken. Für die Lymphknoten-Bibliothek konnten ca. 40.000 intakte VHH-Sequenzen mit etwa 400 unterschiedlichen CDR3-Regionen identifiziert werden. Im Fall der VHH-Bibliothek aus dem

Knochenmark wurden ca. 80.000 intakte Sequenzen mit ungefähr 5300 verschiedenen CDR3-Regionen gelesen und für die Milz-Bibliothek lagen die Werte bei ca. 150.000 intakten Sequenzen mit etwa 4500 verschiedenen CDR3-Regionen. Der Verlauf der Kurven gibt zudem Auskunft darüber, wie tief die Bibliothek sequenziert wurde. Der steigende Kurvenverlauf der Bibliotheken aus Milz (blau) und Knochenmark (rot) deutet an, dass seltene Sequenzen aus den Bibliotheken nicht gelesen wurden. Die Kurve der Lymphknoten-Bibliothek (grün) hat dagegen eine nahezu horizontale Asymptote erreicht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass jede Sequenz mindestens einmal gelesen wurde. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die VHH-Bibliotheken aus Milz und Knochenmark eine höhere Diversität aufweisen als die Lymphknoten-Bibliothek (Abb. 5.7).

Die MiXCR-Dateiausgabe liefert ferner Informationen zu der Verwendung von V-, D- und J-Elementen. VHHs mit identischen CDR3-Sequenzen wurden als Klone gruppiert und Klone nach ihrer Größe (Anzahl der identischen Sequenzen) sortiert. Eine Übersicht über die 30 häufigsten Klone liefert Tabelle 5.1. Es fällt auf, dass einige Klone (1, 2, 14, 15, 16, 19, 23, 25, 28 und 29) sowohl in Milz und/oder Lymphknoten, als auch im Knochenmark vorkommen. Dies deutet darauf hin, dass diese Klone bereits zu einem früheren Immunisierungszeitpunkt induziert wurden und somit zum Zeitpunkt der Tötung des Tieres bereits ins Knochenmark migriert waren.

Tabelle 5.1 Tiefensequenzierung des VHH-Repertoires der lymphatischen Organe bestätigt klonale Expansion sowie V_HH-D-J-Rekombination mit junktionalen Insertionen und Deletionen.

Sequenzen mit identischer CDR3 wurden als Klone gruppiert und gemäß der Häufigkeit in den jeweiligen Organen sortiert. Die Summe gibt die addierte Häufigkeit in allen drei untersuchten Organen an. Die Aminosäuresequenz der CDR3-Region mit dem darin enthaltenen D-Elements (D) ist für jeden Klon gezeigt. Aminosäuren, die durch das jeweilige D-Element kodiert werden, sind unterstrichen. Grau hervorgehoben sind CDR-Regionen, die sich in nur ein oder zwei Aminosäuren (rot) von der CDR3-Region des Klon 1 unterscheiden und daher als Familie (Klonfamilie 1) zusammengefasst werden können. Sofern vorhanden, wurden die per Sanger Sequenzierung aus der pCSE2.5-Bibliothek identifizierten Klone mit identischer CDR3-Sequenz angegeben (pCSE-Klon).

Klon	Summe	Milz	LK	KM	CDR3-Region	D	pCSE-Klon
1	25960	6130	197	19633	DTGLGPWYDY	D5	174/176/147/13A4
2	13699	8621	1441	3637	DTGL ^{HT} WYDY	D5	
3	10005	7668	2336	1	SG	D4	60
4	9614	7515	2097	2	PPYGSSWYTDY	D6	153
5	8700	7753	947	0	GDGSSWWGYGMDY	D6	
6	7595	5918	1675	2	AYGSSWSYDY	D6	
7	6962	5589	1373	0	SSYGSSWGFGS	D6	
8	6254	4978	1274	2	RTGAGENGMDY	D5	
9	6187	0	6187	0	RGGTWEQYDN	D6	
10	6137	4825	1310	2	GSSWYDGEYDY	D6	
11	5197	4173	1023	1	DTGTVVAGTNGMDY	D6	
12	4913	3896	1017	0	DEGTVVAGTDFGS	D6	
13	4573	3651	921	1	DLVVAGGNGMDY	D6	57
14	4503	2491	0	2012	RTVVAGEYDY	D6	
15	4212	24	4065	123	RGSRWEEYDY	D6	
16	4137	1707	1655	775	DTGLG ^T WYDY	D5	
17	3454	2813	641	0	GDYSGSYYYGMDY	D2	
18	3149	2567	582	0	DSSSWLYEYDY	D6	
19	2710	888	0	1822	GMEVAGRGYYGMEY	D6	
20	2344	1906	438	0	EPYYSGSYYYNYGMDY	D2	
21	2332	2130	202	0	GRTYYSGSYYYEYDY	D2	
22	2202	2037	165	0	DDRRLRYSGSYYDYGYGMDY	D2	
23	2194	1149	862	183	DRDYSGSYYDY	D2	
24	2035	1864	171	0	GRNYYSYDYDEYDY	D4	
25	1649	285	0	1364	DRVIVVVTTVPDY	D2	
26	1386	1269	46	71	GGRREYDY	D6	146
27	1103	1103	0	0	GKKREYDY	D6	
28	978	451	1	526	RGSTWEEYDC	D6	
29	919	829	36	54	ERGSSWYALDA	D6	
30	867	0	867	0	^E TGLGPWYDY	D5	13B6

Darüber hinaus gibt die rechte Spalte der Tabelle 5.1 Auskunft darüber, ob die jeweilige CDR3-Sequenz eines Klons auch unter den ~100 mittels Sanger-Sequenzierung bestimmten VHH-Sequenzen der parallel klonierten pCSE-Bibliothek (Abb. 5.6) gefunden wurde. Dies trifft für sechs der 30 häufigsten NGS-Klone zu. Die CDR3-Sequenz von Klon 1 wurde in vier Sanger-Sequenzen (174, 176, 147, 13A4) wiedergefunden, die sich durch somatische Mutationen an anderen Positionen in der VHH-Domäne unterscheiden (Abb. 5.8). Es zeigt sich weiterhin, dass diese CDR3-Sequenz in leicht abgewandelter Form noch in weiteren Klonen (2, 16, 30) vorkommt. Diese und weitere Mitglieder der als Klonfamilie 1 zusammengefassten Gruppe an Klonen mit ähnlicher CDR3-Sequenz sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Tabelle 5.2 Sortierung von Mitgliedern der Klonfamilie 1 anhand ihrer Häufigkeiten in der Tiefensequenzierung.

Sequenzen mit identischer CDR3 wurden als Klone gruppiert und anhand der Häufigkeit der erhaltenen Sequenzen sortiert. Die Summe gibt die addierte Häufigkeit in allen drei untersuchten Organen an. Die Aminosäuresequenz der CDR3-Region ist für jeden Klon gezeigt. Mutationen in der CDR3-Region im Vergleich zum Hauptklon (DTGLGPWYDYW) sind rot hervorgehoben. Sofern vorhanden, wurden die per Sanger-Sequenzierung aus der pCSE2.5-Bibliothek identifizierten Klone mit identischer CDR3-Sequenz angegeben (pCSE-Klon).

Klon	Summe	Milz	LK	KM	CDR3	pCSE-Klon
1	25960	6130	197	19633	DTGLGPWYDY	174/176/147/13A4
2	13699	8621	1441	3637	DTGL ^{HT} WYDY	-
16	4137	1707	1655	775	DTGLG ^T WYDY	-
30	867	0	867	0	^{ET} TGLGPWYDY	13B6
35	669	0	669	0	^{ES} GL ^{HT} WYDY	-
39	581	258	35	288	DTGL ^{YT} WYDY	53
41	544	166	64	314	^{ET} TGLGPWYDY	163/13D5
53	351	0	351	0	DTG ^R GPWYDY	-
71	255	0	255	0	DTG ^R G ^T WYDY	-
86	196	0	196	0	DTGL ^{HT} WYD ^C	-
294	52	0	52	0	DTGL ^L PWYDY	-
634	32	0	32	0	DTGLGPWYD ^W	-
829	27	8	19	0	^{ET} TGL ^{HT} WYDY	-
1156	22	0	22	0	DTG ^R GPWYDY	-
2424	14	0	14	0	^{ES} GLGPWYDY	-

Fünf der sieben häufigsten Klone dieser Familie (1, 2, 16, 39 und 41) kommen in allen Organen vor. Für die Klone 1, 30, 39 und 41 wurden Sanger-Sequenzen mit identischer CDR3-Sequenzen in der pCSE2.5-Bibliothek ermittelt. Zur Beurteilung der Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation wurden die ermittelten Sanger-Sequenzen aus Klonfamilie 1 einem Aminosäuresequenz-Alignment unterzogen (Abb. 5.8).

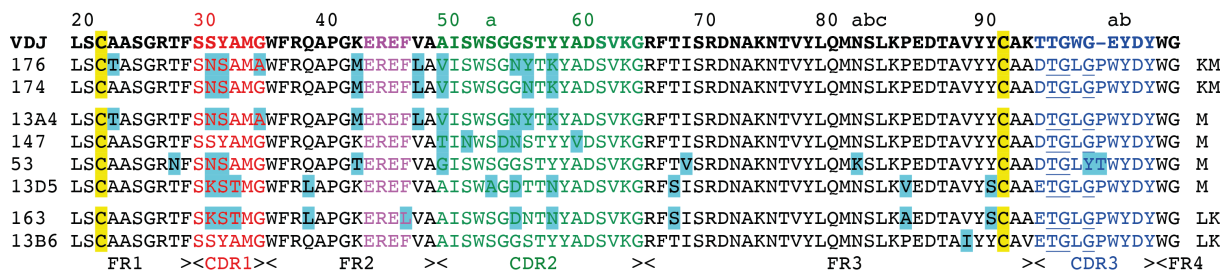


Abb. 5.8 Aminosäuresequenz-Alignment von unterschiedlichen Mitgliedern einer Klonfamilie zeigt ausgedehnte somatische Hypermutation.

Die Abbildung zeigt ein Aminosäuresequenz-Alignment von Mitgliedern der Klonfamilie 1, die aus Knochenmark (KM), Milz (M), und Lymphknoten (LK) der TE01-transgenen Maus 373 isoliert wurden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der V_HH-, D- (in blauer Schrift) und J-Elementen in der Keimbahnkonfiguration ist zum Vergleich in Fettschrift über der Klonfamilie gezeigt. Aminosäurereste in der CDR3, die durch das D- oder J-Element in Keimbahnkonfiguration in den rearrangierten Klonen codiert werden, sind unterstrichen. Aminosäuren in der VHH-Region, die sich aufgrund einer somatischen Hypermutation von der Keimbahnkonfiguration unterscheiden, sind in Cyan hinterlegt. Die Nummerierung von Aminosäureresten oben und die Abgrenzung von framework regions (FR1-4) und coding-regions (CDR1-3) entspricht dem Kabat-Schema für V-Domänen (Kabat *et al.*, 1991). Die CDR-Regionen sind in rot (CDR1), grün (CDR2) und blau (CDR3) angegeben. Die beiden Cysteinreste, die die konservierte kanonische Disulfidbrücke vermitteln, sind gelb markiert.

Mit Ausnahme von Klon 13B6 (nur Lymphknoten) wurden die CDR3-Sequenzen der gezeigten Klone in allen drei lymphatischen Organen mit teils hohen Frequenzen gefunden (Tabelle 5.2). Die Klone weisen eine überwiegend hohe Anzahl an somatischen Mutationen (7-10) auf, die sich primär auf die CDR-Regionen 1 und 2 konzentrieren. Lediglich Klon 13B6 liegt, bis auf eine Mutation in der FR3-Region, in Keimbahnkonfiguration vor. Ein ähnliches Muster an Mutationen ist für die Klone 176, 174 und 13A4 zu erkennen. Die Klone 13D5 und 163 sind sich ebenfalls sehr ähnlich, weisen jedoch völlig unterschiedliche Mutationen verglichen mit den anderen Klonen auf. Das Mutationsmuster des Klons 147 lässt sich in keinem der anderen Familienmitglieder wiederfinden.

In Tabelle 5.3 sind die in Tabelle 5.1 bereits gezeigten Klone nach Länge ihrer CDR3-Region sortiert. Die Klone weisen eine hohe Bandbreite an CDR3-Längen von 2-19 Aminosäuren auf. Als zusätzliche Information sind neben den D-Elementen auch die verwendeten J-Elemente angegeben. Für die Rekombination der 30 häufigsten VHH-Klone hat die TE01-transgene Maus 373 offensichtlich jeweils 4 von 7 der genomischen D- (D2, D4, D5 und D6) und J-Elemente (J3, J4, J6 und J7) des Lamas verwendet.

Tabelle 5.3 Tiefensequenzierung des VHH-Repertoires aus Lymphknoten, Milz und Knochenmark zeigt eine hohe Bandbreite an CDR3 Längen.

Diese Tabelle zeigt dieselben Daten wie Tabelle 5.1, hier sortiert nach aufsteigender Länge der CDR3, von 2 bis 19 Aminosäuren. Dargestellt ist die CDR3-Region mit drei N-terminalen V-Nukleotiden (grün). Aminosäuren in der CDR3-Region, die durch das verwendete J-Element kodiert werden, sind blau hervorgehoben. Aminosäuren des D-Elements in Keimbahn-Konfiguration sind unterstrichen. Klone mit ähnlicher CDR3-Sequenz sind gelb, grau und orange hervorgehoben. Abweichende Aminosäuren eines Klons sind in rot dargestellt.

Klon	Häufigkeit	Milz	LK	KM	3' V-CDR3-Region	D	J	Länge
3	10005	7668	2336	1	CAASG	D4	<u>J4</u>	2
26	1386	1269	46	71	CAKGGREYDY	D6	<u>J4</u>	8
27	1103	1103	0	0	CAKGGKREYDY	D6	<u>J4</u>	8
6	7595	5918	1675	2	CAAAYGSSWSYDY	D6	<u>J4</u>	10
1	25960	6130	197	19633	CAADTGLGPWYDY	D5	<u>J4</u>	10
2	13699	8621	1441	3637	CAADTGLHTWYDY	D5	<u>J4</u>	10
16	4137	1707	1655	775	CAADTGLGTWYDY	D5	<u>J4</u>	10
30	867	0	867	0	CAVETGLGPWYDY	D5	<u>J4</u>	10
14	4503	2491	0	2012	CAARTVVAGEYDY	D6	<u>J4</u>	10
9	6187	0	6187	0	CSKRGGTWEQYDN	D6	<u>J4</u>	10
15	4212	24	4065	123	CSKRGSRWEYDY	D6	<u>J4</u>	10
28	978	451	1	526	CTKRGSTWEYDC	D6	<u>J4</u>	10
4	9614	7515	2097	2	CAAPPYGSSWYTDY	D6	<u>J4</u>	11
7	6962	5589	1373	0	CAASSYGSSWGFSG	D6	<u>J6</u>	11
8	6254	4978	1274	2	CAARTGAGENGMDY	D5	<u>J7</u>	11
10	6137	4825	1310	2	CAAGSSWYDGEYDY	D6	<u>J4</u>	11
18	3149	2567	582	0	CAADSSSWLYEYDY	D6	<u>J4</u>	11
29	919	829	36	54	CAKERGSSWYALDA	D6	<u>J3</u>	11
13	4573	3651	921	1	CAADLVVAGGNGMDY	D6	<u>J7</u>	12
23	2194	1149	862	183	CAKDRDYSGSYYYDY	D2	<u>J4</u>	12
5	8700	7753	947	0	CAKGDGSSWWGYGMDY	D6	<u>J7</u>	13
12	4913	3896	1017	0	CAADEGTVVAGTDFGS	D6	<u>J6</u>	13
17	3454	2813	641	0	CAAGDYSGSYYYGMDY	D2	<u>J7</u>	13
24	2035	1864	171	0	CAKGRNYYSYDYDEYDY	D4	<u>J4</u>	13
25	1649	285	0	1364	CVADRVIVVVTTVPDY	D2	<u>J4</u>	13
11	5197	4173	1023	1	CAADTGTVVAGTNGMDY	D6	<u>J7</u>	14
19	2710	888	0	1822	CAAGMEVAGRGYYGMEY	D6	<u>J7</u>	14
21	2332	2130	202	0	CAKGRYYSGSYYYEYDY	D2	<u>J4</u>	15
20	2344	1906	438	0	CAAEPYYSGSYYYNYGMDY	D2	<u>J7</u>	16
22	2202	2037	165	0	CAKDDRLRYSGSYYYDYGMDY	D2	<u>J7</u>	19

In den Sequenzen sind die durch das V- und J-Element kodierten Aminosäuren jeweils grün bzw. blau hervorgehoben, die durch das D-Element kodierten Aminosäuren sind unterstrichen. Es ist zu erkennen, dass Sequenz und Länge der CDR3 durch Insertion und Deletion von junktionalen Nukleotiden stark variiert wird. Klone, bei denen während der Rekombination beispielsweise das D-Element D6 mit dem J-Element J4 verknüpft wurde, weisen eine Spanne in ihrer CDR3-Länge von 8 (Klon 26) bis 11 (Klon 4) Aminosäuren auf, was auf die Insertion und Deletion von Nukleotiden während der VDJ-Rekombination zurückzuführen ist. Eine Analyse der DNA-Sequenzen nach VDJ-Rekombination der Klone 146 und 153 bestätigt die Insertion und Deletion von junktionalen Nukleotiden (Abb. 5.9).

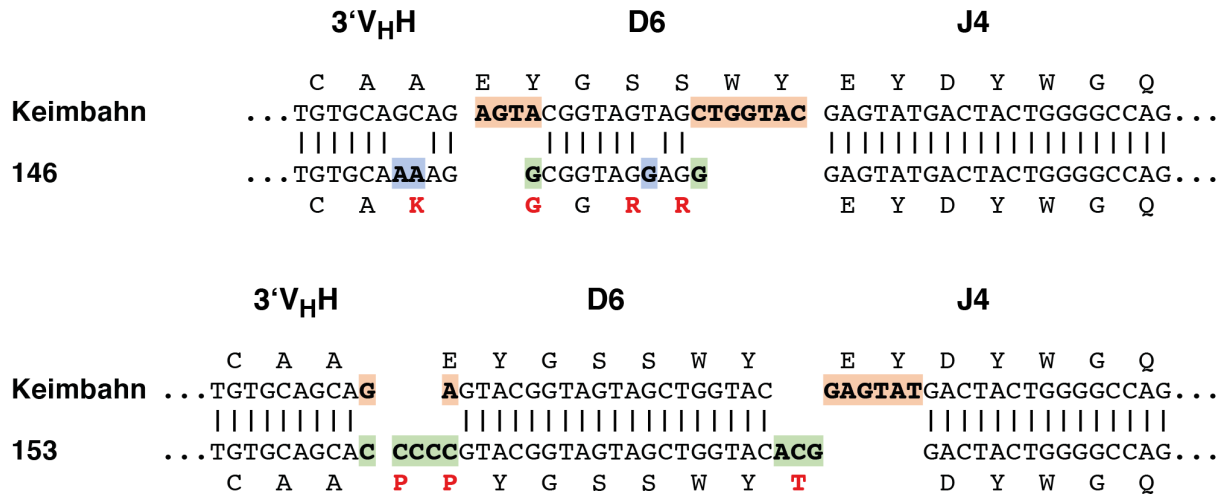


Abb. 5.9 Analyse der V_HH-D-J Verknüpfungsstellen zeigt ausgedehnte Deletion und Insertion von junktionalen Nukleotiden.

Die Abbildung zeigt eine Analyse der V_HH-D-J Verknüpfungsstellen von zwei Klonen (146 und 153) aus der mit AAV1-immunisierten TE01-transgenen Maus 373. Die Nukleotidsequenzen des 3'-Endes der V_HH-Region, des D-Elements, sowie des 5'-Endes des J-Elements sind jeweils in der Keimbahnkonfiguration über den entsprechenden Sequenzen der Einzelklone dargestellt. Während der Verknüpfung entfernte (orange) oder hinzugefügte (grün) Nukleotide sind farblich hervorgehoben. Nukleotide, die sich aufgrund von somatischer Hypermutation von der Keimbahn- bzw. rearrangierten Konfiguration unterscheiden, sind in blau markiert. Veränderungen in der Aminosäuresequenz gegenüber der Keimbahnkonfiguration sind rot hervorgehoben.

Aus demselben D-Element (D6) werden unterschiedliche CDR3-Aminosäuresequenzen mit einer Längendifferenz von 3 Aminosäuren kodiert. Bei Klon 146 wurden 11 Nukleotide des D-Elements entfernt (orange) und an beiden Enden je ein neues Nukleotid hinzugefügt (grün). Bei Klon 153 wurden an den Verknüpfungsstellen insgesamt 8 Nukleotide (grün) hinzugefügt und 8 Nukleotide entfernt (orange).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass bei der VDJ-Rekombination unterschiedliche D- und J-Elemente des Lama IgH-Transgens verwendet wurden und die Diversität durch junktionale Diversifizierung weiter gesteigert wurde. Ferner deuten die Ergebnisse auf eine Expansion und Migration Antigen-spezifischer Klone nach Immunisierung einer TE01-transgenen Maus. In der Zwischenzeit wurde tatsächlich die Antigen-Spezifität der in Abb. 5.8 gezeigten Mitglieder aus Klonfamilie 1 mittels ELISA-Analyse im Rahmen einer Masterarbeit bestätigt (Pantelic, 2018).

5.3 Herstellung und Charakterisierung TE02- und TE03-transgener Mäuse

5.3.1 Klonierung und Übertragung der Lama IgH-Transgene TE02 und TE03

Das Lama IgH-Transgen TE01 ist ein relativ einfaches Konstrukt, das die grundsätzliche Machbarkeit des Projekts bestätigt. Es stellte sich nun die Hypothese, dass die Funktionalität des Transgens durch DNA-Modifikationen weiter verbessert werden kann. Um dies zu überprüfen, wurden ausgehend von TE01 zwei weitere Versionen eines Lama IgH-Transgens hergestellt (TE02 und TE03). Die dazu durchgeführten BAC-Rekombinationen sind schematisch in Abb. 5.10 abgebildet.

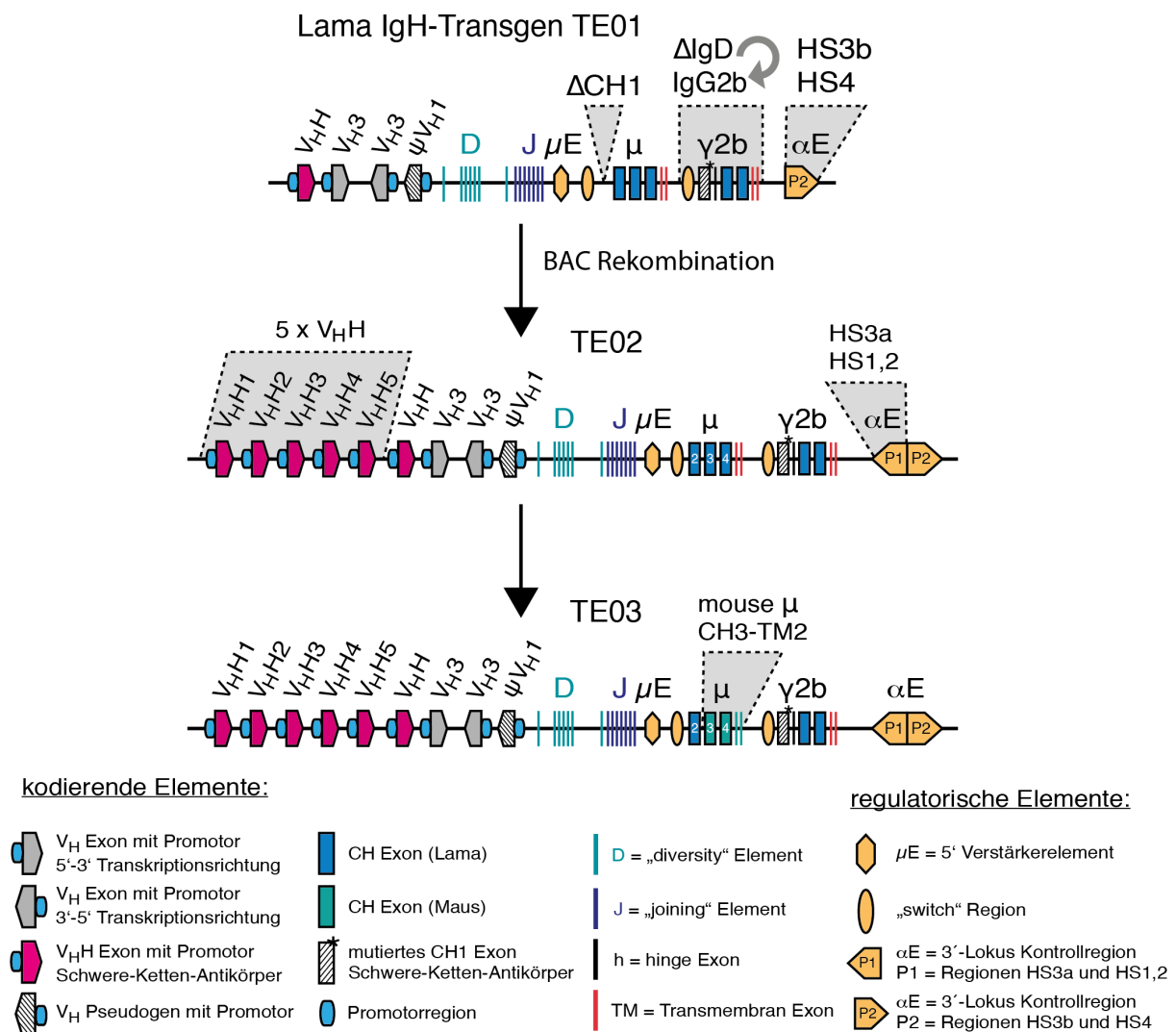


Abb. 5.10 DNA-Modifikationen zur Herstellung der Lama IgH-Transgene TE02 und TE03.

Schematische Darstellung der BAC-Rekombinationen zur Herstellung der Lama IgH-Transgene TE02 und TE03. Eine synthetische DNA-Kassette, die fünf zusätzliche V_HH-Gene codiert, wurde am 5'-Ende von TE01 eingefügt. Die Komponenten HS1,2 und HS3a (P1) der Maus 3'-Lokus-Kontrollregion (αE = alpha-Enhancer) wurden stromaufwärts von HS3b und HS4 (P2) eingefügt. Schließlich wurde die CH3-CH4-TM1-TM2 Region des Lama IgM-Lokus durch die entsprechenden Elemente der Maus ersetzt.

Im ersten Schritt wurden die bereits in das Transgen TE01 eingebrachten Elemente HS3b und HS4 der Maus 3'Lokus-Kontrollregion (Wesolowski, 2011) durch die Elemente HS3a und HS1,2 ergänzt (Abb. 5.10). Diese sollen eine verstärkte Immunglobulin-Synthese, einen effizienteren Klassenwechsel, sowie eine gesteigerte somatische Hypermutation vermitteln (Saintamand *et al.*, 2016). Die Verifizierung dieser und weiterer DNA-Modifikationen erfolgte wieder mittels BAC-DNA Restriktionsverdau und/oder PCR-Amplifikation mit flankierenden Primern und Sequenzierung der modifizierten Regionen (Ergebnisse nicht gezeigt).

In einem weiteren Schritt wurden zur Steigerung der Diversität fünf zusätzliche V_HH-Gene eingefügt (Abb. 5.11 A). Bei der Auswahl dieser Gene wurde sowohl auf eine hohe Diversität als auch auf eine häufige Nutzung in bekannten V_HH cDNA-Sequenzen geachtet. Für das Alpaka waren 6 V_HH Familien (A-F) mit insgesamt 17 Mitgliedern beschrieben (Achour *et al.*, 2008), mit hohen Ähnlichkeiten innerhalb einer Familie und hoher Diversität zwischen den Familien. Eigene Datenbankrecherchen haben ergeben, dass das einzige Mitglied der Familie E, V_HH3-S15 (AM939766), nicht oder nur sehr selten in cDNA-Sequenzen des Alpakas vorkommt. Für das Lama (*Lama glama*) waren fünf genomische V_HH-Elemente (V_HH1-V_HH5) aus Gendatenbanken bekannt (Genbank: AF305944-AF305948), die sich den o. g. V_HH-Familien des Alpakas zuordnen lassen: V_HH1 und V_HH2 der Familie D, V_HH3 und V_HH4 der Familie B, und V_HH5 der Familie F. V_HH1 (Genbank: AF305944.1) und V_HH4 (Genbank: AF305947.1) wurden als Repräsentanten der Familien D und B gewählt, da sie häufiger in cDNA-Sequenzen vorkommen. Familie F wird im synthetischen V_HH-Konstrukt durch die *Lama glama* V_HH5 (Genbank: AF305948.1) repräsentiert. Für Familie A des Alpakas war keine entsprechende Sequenz auf Seiten des Lamas bekannt. Aus diesem Grund wurde die Alpaka Sequenz V_HH3-S1 (Genbank: AM773548.1) als bester Repräsentant dieser Familie ausgewählt. Familie C des Alpakas ist bereits in Form der *Lama glama* V_HH aus BAC V03 (Wesolowski, 2011) in Transgen TE01 enthalten. Da es sich bei dieser Familie C um die am häufigsten in cDNA vorkommenden V-Elemente handelt, wurde zusätzlich der beste Repräsentant dieser Familie auf Seiten des Alpakas (V_HH3-S12) ausgewählt und nach Vorgaben aus der Literatur "humanisiert" (Vincke *et al.*, 2009). Dazu wurden an 8 Positionen (A15P, E49G, R50L, F52A, A74S, K83R, P84A und G86D; Nummerierung nach (Kabat *et al.*, 1991)) häufig in humanen V_H3-Sequenzen vorkommende Aminosäuren eingefügt (Abb. 5.11 C). Das zur Rekombination eingesetzte DNA-Konstrukt umfasste demnach 5 kamelide V_HH-Gene. Ein Alignment der entsprechenden Aminosäuresequenzen bestätigt die hohe Diversität der ausgewählten Elemente (Abb. 5.11 B).

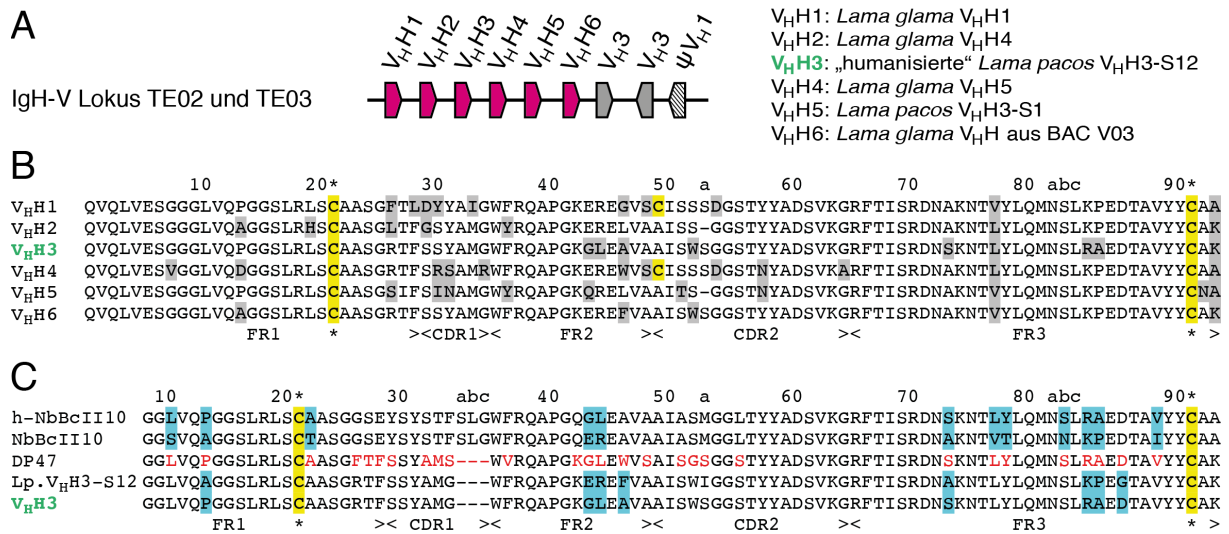


Abb. 5.11 Aminosäuresequenz-Alignment transgener V_HHs in TE02 und TE03 zeigt hohe Diversität.

A) Schematische Darstellung des IgH-V-Lokus der Transgene TE02 und TE03 inklusive Annotation der enthaltenen V_HH-Regionen. **B)** Aminosäuresequenz-Alignment transgener V_HH-Elemente in TE02 und TE03. Aminosäuren in der V_HH-Region, die sich von der Konsensus-Sequenz unterscheiden, sind grau hervorgehoben. **C)** Das Aminosäuresequenz-Alignment der humanen Keimbahn IgH-V-Region DP-47 [Genbank: Z12347.1] mit der FR1-FR3 des Nanobodies NbBcII10 sowie dessen humanisierter Variante h-NbBcII10 (Vincke et al., 2009) dienten als Matrize zur Humanisierung der *Lama pacos* V_HH3-S12 [Genbank: AM939752.1]. Rot markierte Aminosäuren in der DP47-Sequenz unterscheiden sich mindestens zu einer der beiden kameliden Sequenzen NbBcII10 und Lp.V_HH3-S12. Humanisierte Aminosäuren sowie die entsprechende Position in der Ausgangssequenz sind cyan hervorgehoben. Die Nummerierung von Aminosäureresten oben und die Abgrenzung von *framework* Regionen (FR1-3) und kodierenden Regionen (CDR1-2) entspricht dem Kabat-Schema für V-Domänen (Kabat et al., 1991). Sowohl freie Cysteine (Position 50) als auch Cysteinreste, die die konservierte kanonische Disulfidbrücke vermitteln, sind gelb markiert.

Um die Expression der ausgewählten V_HH-Gene zu optimieren, wurden die V_HH-Exone von Maus DNA-Sequenzen flankiert, die funktionale, stark transkribierte und häufig in cDNA-Sequenzen vorkommende VH-Exone umgeben (Abb. 5.12). Dabei wurden virale DNA-Insertionen und andere *nonsense* DNA-Abschnitte entfernt, um die Größe des Konstrukts zu minimieren. Auf genomischer Ebene variiert die Distanz zwischen zwei Maus V-Elementen von 2-60 kb. Die Größe des synthetischen V_HH-Konstrukts mit fünf V_HH-Elementen, inklusive Ampicillin-Selektionskassette und zwei 390 bp großen Homologieregionen, beträgt 9,7 kb. Als Promotorsequenzen wurden die starken Maus IgH-V-Promotorregionen 186.2 und 17.2.25 oder Kombinationen aus beiden Sequenzen verwendet. Für das *Leader*-Peptid kodierende Exon, die Intron-Sequenz zwischen diesem und dem V_HH-Exon, sowie die RSS-Sequenz am 3'-Ende des V_HH-Exons wurde jeweils die kamelide Keimbahnkonfiguration beibehalten. Durch Intergration dieses synthetischen V_HH-Konstrukts stromaufwärts der bereits in Transgen TE01 enthaltenen V_HH-Region wurde das neue Transgen TE02 fertiggestellt (Absatz 4.1.4).

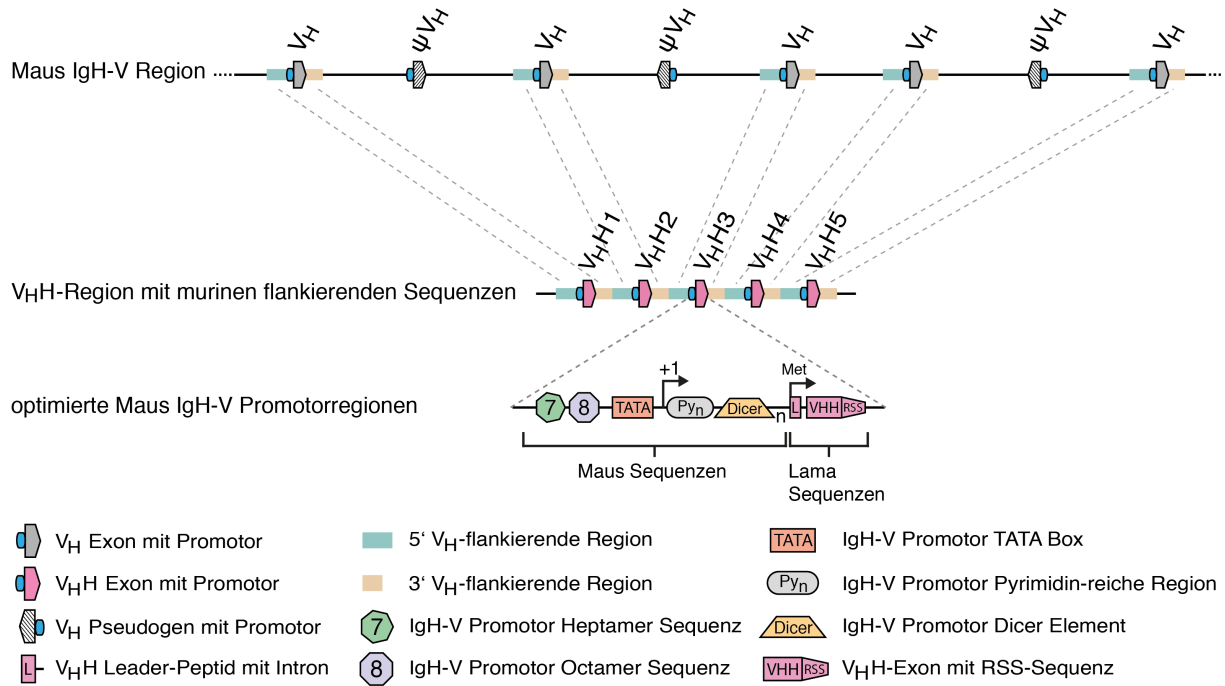


Abb. 5.12 Design eines synthetischen Konstrukts aus Promotoren und V_HHs.

Zur Entwicklung des synthetischen Promotor-V_HH-Konstrukts wurden 5 genomische V_HH-Regionen (Leader-Intron-V_HH-RSS = Rekombinations-Signal-Sequenz, rot) aus Lama bzw. Alpaka mit murinen Sequenzen flankiert, die im Genom der Maus funktionale und häufig verwendete V_H-Regionen umgeben. Als Promotoren wurden die starken Maus IgH-V-Promotorregionen 17.2.25, 186.2 oder Kombinationen aus beiden Sequenzen eingesetzt. Die Sequenzen enthielten jeweils folgende Elemente: Heptamer (grün), Octamer (lila), TATA-Box (orange), eine Pyrimidin-reiche Region (Pyn, grau) unmittelbar nach dem Transkriptionsstart (+1 Pfeil) sowie ein oder mehrere Dicer-Elemente (gelb).

Zur Herstellung des Transgens TE03 wurden in Transgen TE02 die Exone für die Transmembrandomänen und die membranproximalen Domänen des Lama IgM-Lokus gegen die entsprechenden Sequenzen der Maus ausgetauscht (Abb. 5.10). Die Strukturen des IgM-Lokus der Maus sowie der Transgene TE01, TE02 und TE03 sind in Abb. 5.13 A vergleichend dargestellt. Den daraus jeweils resultierenden B-Zell-Rezeptorkomplex (BCR) auf der Oberfläche reifer B-Zellen zeigt Abb. 5.13 B. Die Hypothese ist dabei, dass der Austausch der o. g. Domänen die Interaktion des membranständigen IgM mit den für die Signaltransduktion verantwortlichen Untereinheiten Ig α und Ig β des B-Zell-Rezeptorkomplexes verbessert.

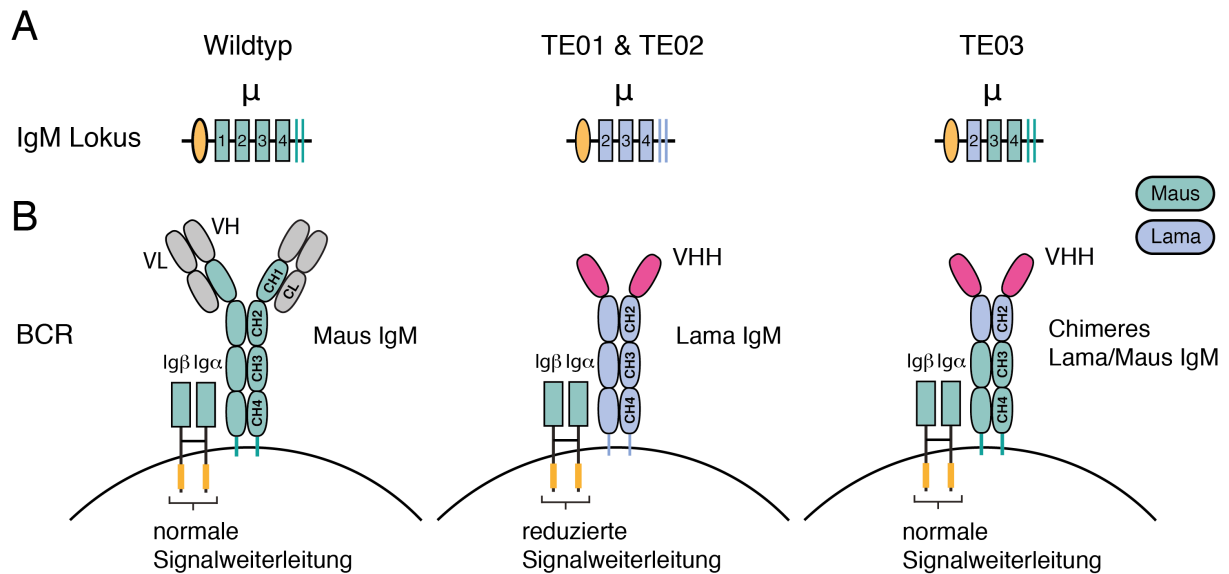


Abb. 5.13 Optimierung der Signalweiterleitung des B-Zell-Rezeptorkomplexes durch Klonierung eines chimären Lama/Maus B-Zell-Rezeptors.

A) Schematische Darstellung des IgM-Lokus der Maus, des IgM-Lokus des Lamas (in TE01 und TE02 enthalten), und des chimären Lama/Maus IgM-Lokus (in TE03 enthalten). Murine Exone sind in grün, Lama Exone in hellblau dargestellt. **B)** Schematische Darstellung des exprimierten B-Zell-Rezeptorkomplexes in Wildtyp-Mäusen, in TE01- und TE02-transgenen Mäusen und TE03-transgenen Mäusen. Lama V_HH -Domänen sind in rot, Lama C_H -Domänen in blau, Maus V_H -Domänen und die murine Leichte-Kette in grau, C_H -Domänen der Maus und akzessorische Proteine des B-Zell-Rezeptorkomplexes ($Ig\alpha$, $Ig\beta$) in grün dargestellt.

Die Transgene TE02 und TE03 wurden, wie bereits T01 beschrieben, mittels pronukleärer Injektion auf C57BL/6J x CBA Mäuse übertragen (Absatz 4.2.1). Transgen-positive Nachkommen wurden mittels PCR-Genotypisierung (Absatz 4.2.3) identifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt) und auf B-Zell-defiziente Mäuse (JHT) rückgekreuzt. Dabei konnten in der TE02-transgenen Linie sechs und in der TE03-transgenen Linie acht *Founder*-Tiere identifiziert werden.

5.3.2 Nachweis rekonstituierter B-Zell-Entwicklung in TE02- und TE03-transgenen Mäusen

Um zu überprüfen, ob sich die B-Zell-Entwicklung in Ig-KO Mäusen auch durch die Transgene TE02 und TE03 rekonstituieren lässt, wurden periphere Blut-Lymphozyten mit B-Zell (CD19) und T-Zell (CD3) spezifischen Antikörpern gefärbt (Abb. 5.14). Die Ergebnisse bestätigen, dass auch die Transgene TE02 und TE03 die Entwicklung von B-Zellen ermöglichen. Der höhere Anteil von B-Zellen bei TE03-Mäusen (27%) gegenüber TE01- (13%) und TE02-Mäusen (19 %) spricht für die Funktionalität der optimierten regulatorischen Elemente.

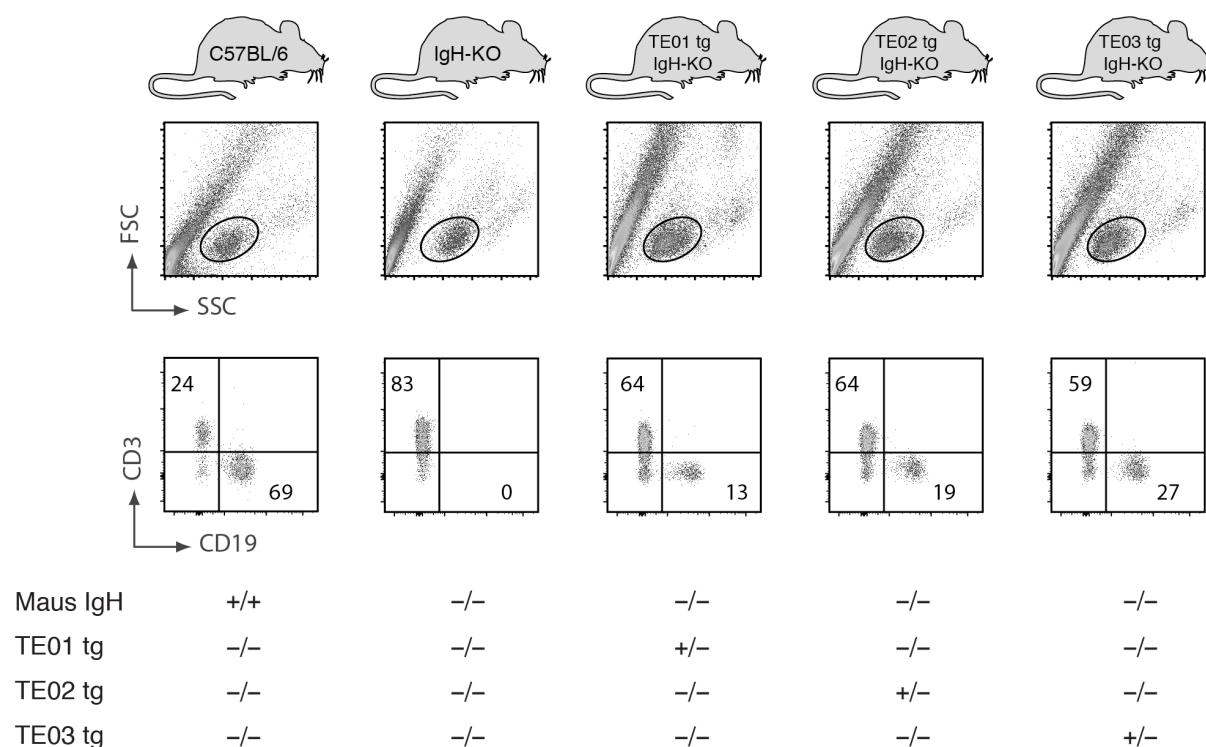


Abb. 5.14 Rekonstitution der B-Zell-Entwicklung durch Lama IgH-Transgene TE02 und TE03.

Periphere Blutzellen von 9-12 Wochen alten Mäusen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) angefärbt, gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde ein *gating* mittels *forward scatter* (FSC) und *sideward scatter* (SSC) auf lebende Lymphozyten durchgeführt. Zahlen in den jeweiligen Quadranten zeigen den relativen Anteil der jeweiligen Population (in % der durch das *gating* selektierten Zellen). Zum Vergleich wurden Zellen aus Wildtyp (C57BL/6J), IgH-KO und TE01-transgenen Mäusen analysiert. Gezeigt sind Analyseergebnisse von Nachkommen der fünften (TE01) bzw. der ersten (TE02, TE03) Generation.

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von Lama IgH-transgenen Mäusen als Basis für die Gewinnung von Nanobodies und Nanobody-basierten Schwere-Ketten-Antikörpern.

6.1 Klonierung und Übertragung von Lama IgH-Transgenen

In dieser Arbeit wurden mehrere BAC-Modifikationen zur Herstellung der Lama IgH-Transgene TE01, TE02 und TE03 durchgeführt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Zunächst sollte der Lama IgD-Lokus aus BAC V03 entfernt werden, um einen möglichen Klassenwechsel zum IgD-Pseudogen zu unterbinden. Diese Modifikation wurde mit dem Red/ET Rekombinationssystem von Genebridges erfolgreich durchgeführt (Abb. 5.2). In diesem zweistufigen Verfahren ging jedoch insbesondere der Austausch der Gegenselektionskassette durch nicht-selektierbare DNA mit einer schlechten Effizienz einher. Aus diesem Grund wurden weitere BAC-Rekombinationen mit dem Rekombinationsstamm *E. coli* SW106 durchgeführt (Warming *et al.*, 2005). In Kombination mit Selektionskassetten, die von *loxP*-Mutanten flankiert wurden (Parrish *et al.*, 2011), konnte die mehrstufige Modifikation eines BACs erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 5.2 und Abb. 5.10). Dabei zeigte sich, dass die Entfernung der Selektionskassette mittels Cre/*lox*-Rekombination mit jeder zusätzlichen Modifikation weniger effizient erfolgte und zunehmend unspezifische Rekombinationen passierten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass nach jeder Modifikation die *loxP*-Mutante *lox72* (Kombination aus *lox71* und *lox66*) am Rekombinationsort verbleibt. Diese weist insgesamt 10 DNA-Mutationen im Vergleich zur Wildtyp *loxP*-Sequenz auf und besitzt damit eine um 50 % reduzierte Reaktivität mit der Cre-Rekombinase (Parrish *et al.*, 2011). Mit jeder DNA-Modifikation verbleibt demnach ein weiterer, potenzieller Reaktionspartner für die Cre-Rekombinase im BAC, wodurch die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Rekombinationen zunimmt. Um die Effizienz erneut zu steigern, bieten *FRT*-Mutanten (Nakano *et al.*, 2001; Senecoff *et al.*, 1988; Takata *et al.*, 2011) in Kombination mit dem Rekombinationsstamm *E. coli* SW105 (Warming *et al.*, 2005) eine effektive Alternative.

Mit den hergestellten Transgenen wurden, in Kooperation mit der UKE Core Facility „Transgene Mäuse“, drei transgene Mauslinien (TE01, TE02 und TE03) nach pronukleärer Injektion von BAC DNA in befruchtete Eizellen etabliert. Dabei wurde jeweils eine gezielte Linearisierung des BACs mittels *NotI*-Restriktionsverdau vorgenommen, da sich die kodierenden Bereiche über die gesamte BAC-Sequenz erstrecken. Möglich ist auch die Injektion von zirkulärer DNA, wodurch die Insertion von Bruchstücken weiter reduziert werden

könnte (Van Keuren *et al.*, 2009). Die Funktionalität der Transgene könnte in diesem Fall durch Öffnung der Ringstruktur an zufälliger Stelle beeinträchtigt werden, auch wenn Studien zeigen, dass die Integration zirkulärer Fragmente als Tandem-Array erfolgt. Demnach werden extrachromosomale Konkatomere von Monomeren gleicher Orientierung durch homologe Rekombination zwischen Transgenmolekülen erzeugt (Bishop, 1996; Luciw *et al.*, 1983; Wagner *et al.*, 1996).

Ein Nachteil der pronukleären Injektionen zur Herstellung BAC-transgener Mäuse ist die zufällige Integration des Transgens in das Wirtsgenom. Die Anzahl integrierter Kopien sowie der Integrationsort können nur über aufwendige Verfahren wie die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder mittels DNA-Tiefensequenzierung (Dubose *et al.*, 2013) ermittelt werden. Darüber hinaus kann die Integration exogener DNA zu komplexen Umlagerungen des Transgens und des Wirtsgenoms führen. In mehreren transgenen Linien wurden Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen im Bereich des Integrationsortes beobachtet (Chandler *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2012; Le Saux *et al.*, 2010).

Aufgrund der vielen Variablen bei der Herstellung transgener Mäuse mittels pronukleärer Injektion, ist eine vergleichende Charakterisierung mehrerer *Founder*-Tiere empfehlenswert (Bishop, 1996). Im Fall der TE01-transgenen Linie konnte für eins von zwei untersuchten *Founder*-Tieren (4459#78) eine rekonstituierte Entwicklung von B-Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil zirkulierender B-Zellen von Nachkommen des *Founders* 4459#78 schwankte zwischen ~ 1-13 % und lag im Mittel bei rund ~ 7 %. In der TE02-transgenen Linie wurde bisher eine rekonstituierte B-Zell-Entwicklung für 15 Nachkommen von 3 unterschiedlichen *Founder*-Mäusen nachgewiesen. Der B-Zell-Anteil an den peripheren Blut-Lymphozyten lag dabei im Mittel bei ~ 12 %. Innerhalb der TE03-transgenen Linie wurden bisher zwei *Founder*-Tiere mit rekonstituierter B-Zellentwicklung identifiziert. Der durchschnittliche Anteil zirkulierender B-Zellen der fünf bisher charakterisierten Nachkommen lag bei ~ 19 % und damit etwa 7 % über dem mittleren Wert der TE02-transgenen Linie. Die Ergebnisse sprechen für eine gesteigerte Funktionalität der Transgene in den Linien TE02 und TE03 gegenüber dem zu Herstellung der TE01-transgenen Linie verwendeten Konstrukt. Die vergleichende Analyse von Nachkommen unterschiedlicher *Founder*-Mäuse verringert zudem die Wahrscheinlichkeit, dass die gezeigten Unterschiede auf den Integrationsort des Transgens zurückzuführen sind.

6.2 Herstellung von VHH-Bibliotheken aus TE01-transgenen Mäusen

Das VHH-Repertoire der AAV1-immunisierten TE01-transgenen Maus wurde aus cDNA der lymphatischen Organe amplifiziert. Die Herstellung von Zelllysaten für die RNA-Isolierung erfolgte im Fall von Lymphknoten durch mechanische Zerkleinerung des Gewebes im Tissue Lyser II (Qiagen), im Fall von Milzzellen schonender mithilfe eines Zellsiebs (Absatz 4.2.5). Die Agarosegel-Analyse der RNA zeigt für Lymphknoten im Vergleich zur Milz eine stärkere Degradation der 28S-RNA (Abb. 5.6 A). In Zukunft könnte die Herstellung einer Zellsuspension mithilfe eines Zellsiebs auch im Fall der Lymphknoten zu einer besseren RNA-Qualität führen. Die partielle Degradation der RNA aus dem Knochenmark könnte an der hohen Zellzahl der Probe liegen. Eine Anpassung der Zellzahl an die Kapazität der Säulen könnte demnach künftig zu einer Steigerung der RNA-Qualität beitragen.

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte in dieser Arbeit mithilfe randomisierter Hexamer-Primer. Diese binden zufällig an unterschiedlichen Positionen der RNAs, wodurch ein cDNA-Pool mit Fragmenten unterschiedlicher Länge erzeugt wird (Zhang *et al.*, 1999).

Alternativ könnten Oligo(dT)-Primer aufgrund ihrer Homologie zur Poly-Adenin-Sequenz am 3'-Ende der mRNAs eingesetzt werden. Auch eine Kombination von Zufalls- und Oligo(dT)-Primern ist möglich. Zur Herstellung von VHH-Bibliotheken aus immunisierten Lamas wurden z. B. randomisierte Dekamere mit 18 bp großen Oligo(dT)-Primern eingesetzt (Fridy *et al.*, 2014). Längere Oligonukleotide begünstigen dabei möglicherweise die Synthese größerer Fragmente und umgekehrt (Zhang *et al.*, 1999).

Ferner könnten sequenzspezifische Primer zur gezielten Synthese von Immunglobulin-kodierenden cDNAs eingesetzt werden (Zhang *et al.*, 1999). Die Verwendung von IgM- bzw. IgG2b-spezifischen Primern könnte die Qualität der VHH-Bibliotheken aus immunisierten Lama IgH-transgenen Mäusen verbessern.

Für die PCR-Amplifikation des VHH-Repertoires müssen bei Kameliden degenerierte Primer und/oder Multiplex-PCR-Reaktionen verwendet werden, um die große Vielfalt an unterschiedlichen V_HH-Elementen abzudecken. Dabei können Abweichungen in den Primer-Verhältnissen, fehlerhafte Primer-Bindungen und suboptimale *Annealing*-Temperaturen die Verteilung von Klonen und V-Elementen verfälschen (Carlson *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014).

Gegenüber dem endogenen Repertoire von Kameliden weisen die Lama IgH-transgenen Mäuse den Vorteil auf, dass deren gesamtes VHH-Repertoire mit zwei Primerpaaren (IgM- und IgG-spezifisch) amplifiziert werden kann (Abb. 5.6). Bei der Insertion der fünf zusätzlichen VHH-

Gene zur Herstellung der TE02- und TE03-transgenen Mäuse wurde deshalb darauf geachtet, dass ein Vorwärts-Primer auch für alle neu hinzugefügten V_HH-Elemente spezifisch ist.

Bei der Herstellung von VHH-Bibliotheken aus den lymphatischen Organen der TE01-transgenen Maus wurden auch V_H3-haltige Klone amplifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Obwohl der verwendete Vorwärts-Primer für beide V_H3-Elemente im Transgen kompatibel ist, enthielten die sequenzierten Klone nur Transkripte der V_H3, die auf dem Transgen in richtiger (5'-3') Orientierung vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass die invers vorliegende V_H3 vom Rekombinationsapparat der Maus nicht verwendet wird. Aufgrund der schlechteren Löslichkeit von V_H3-Domänen gegenüber VHH-Domänen, ist ein Ausschluss von V_H3-Sequenzen aus den Bibliotheken erstrebenswert. Die amplifizierten V_H3-Sequenzen könnten durch Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate mit einem Restriktionsenzym, dessen Erkennungsstelle nur in V_H3- und nicht in VHH-Sequenzen vorkommt (z. B. *BsaI*), vor Klonierung der Bibliotheken entfernt werden. Eine Alternative wäre die Deletion bzw. der Austausch des entsprechenden V_H3-Elements auf dem Transgen mittels BAC Rekombination.

6.3 Analyse der Immunantwort TE01-transgener Mäuse

Zur Charakterisierung der Immunantwort wurde die TE01-transgene Maus 373 mit AAV1 immunisiert (Absatz 5.2.3). Drei Tage nach der letzten Boost-Immunisierung wurden Zellen aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark isoliert, d. h. zu einem Zeitpunkt der erwarteten starken klonalen Expansion von B-Zellen in den lymphatischen Organen. Die Migration expandierter Klone aus Milz und Lymphknoten zum Knochenmark ist abhängig von Art und Applikationsform des Antigens, sowie vom Protokoll der Immunisierung (Eden *et al.*, 2018). Zusätzlich zu den Bibliotheken aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark könnte das VHH-Repertoire aus den peripheren Blut-Lymphozyten kloniert werden, um migrierende Klone abzubilden.

Zur Vorbereitung von VHH-Bibliotheken für die DNA-Tiefensequenzierung wurden drei PCR-Schritte durchgeführt. Die Agarosegel-Analyse der Produkte aus dem ersten Schritt zeigte eine Bande in der erwarteten Höhe lediglich bei IgM-spezifischen Amplifikaten aus Milz und Knochenmark (Abb. 5.6 B). In einer zweiten PCR mit internen Primern wurden sichtbare Banden auf der erwarteten Höhe auch bei IgG-Amplifikaten aus Milz, Knochenmark und Lymphknoten generiert (Abb. 5.6 C). Diese Ergebnisse deuten die Fähigkeit TE01-transgener Mäuse an, einen Klassenwechsel von IgM zu IgG vollziehen zu können.

Die Tiefensequenzierung des VHH-Repertoires erlaubte zudem eine Analyse der Verwendung und Verknüpfung von V-, D- und J-Elementen. In den 30 häufigsten Klonen wurden je 4 der 7 genomischen D- (D2, D4, D5 und D6) und J-Elemente (J3, J4, J6 und J7) des Lamas verwendet (Tabelle 5.3). Seltener Klone enthielten ferner die Elemente D1, D3, D7 und J2 (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies ist im Einklang mit publizierten cDNA-Sequenzen aus Lama und Alpaka, bei denen 7 D-Elemente und 5 von 7 J-Elementen gefunden wurden. Lediglich die beiden Segmente J1 und J5 werden offensichtlich vom Rekombinationsapparat nicht verwendet und können daher als Pseudogene bezeichnet werden (Achour *et al.*, 2008). Das J4-Element ist mit einem relativen Anteil von 50-70% in exprimierten Immunglobulinen des Alpakas deutlich überrepräsentiert (Achour *et al.*, 2008). In Maus 373 konnte J4 in 19 der 30 häufigsten Klone (63 %) identifiziert werden, was dessen bevorzugter Nutzung in Alpakas entspricht (Tabelle 5.3).

Die vergleichende Analyse der Verknüpfungsstellen zweier Klone mit identischen V-, D- und J-Elementen zeigte, dass TE01-transgene Mäuse junktionale Diversität durch Insertion und Deletion von Nukleotiden erzeugen können (Abb. 5.9).

Durch Analyse des VHH-Repertoires verschiedener Organe (Milz, Lymphknoten und Knochenmark) ließ sich zudem der Reifestatus, sowie die Expansion und Migration von Klonen abschätzen (Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2). Klone, die mit großer Häufigkeit sowohl in Milz/Lymphknoten als auch im Knochenmark vorkommen, wurden vermutlich zu einem früheren Immunisierungszeitpunkt induziert, so dass sie bereits zu Plasmazellen differenziert und ins Knochenmark migriert waren. Bei der letzten Boost-Immunisierung wurden diese Klone dann offensichtlich reaktiviert, um in Milz/Lymphknoten erneut zu expandieren. Andere expandierte Klone traten (fast) ausschließlich in den Bibliotheken aus Milz und/oder Lymphknoten auf. In diesen Fällen wurde die Expansion der Klone vermutlich erst durch die letzte Boost-Immunisierung induziert, so dass noch keine Differenzierung zu langlebigen Plasmazellen mit anschließender Migration ins Knochenmark stattgefunden hatte.

Zur Analyse der Affinitätsreifung in TE01-transgenen Mäusen wurden Mitglieder einer expandierten Klonfamilie einem Aminosäuresequenz-Alignment unterzogen. Dies zeigte Variationen in Anzahl und Muster an Mutationen gegenüber der Keimbahn V_HH-Sequenz (Abb. 5.8). Die unterschiedlichen Muster an Mutationen werfen die Frage auf, ob diese im Zuge der Affinitätsreifung entstanden oder auf Fehler in der Probenvorbereitung zurückzuführen sind. Es ist zumindest denkbar, dass chimäre VHH-Konstrukte durch RNA-Bruchstücke,

unvollständige cDNA-Synthese oder fehlerhafte PCR-Amplifikation generiert werden können (Baum *et al.*, 2012; Shugay *et al.*, 2014).

Während der Fertigstellung dieser Arbeit wurden von Nikolina Pantelic und Stephan Menzel VHHs aus der AAV1-immunisierten Maus als Schwere-Ketten-Antikörper produziert und mittels ELISA auf spezifische Bindung an AAV1 überprüft (Abb. 6.1). Die Ergebnisse bestätigten für alle der in Abb. 5.8 dargestellten Klone eine spezifische Bindung an AAV1 (Pantelic, 2018).

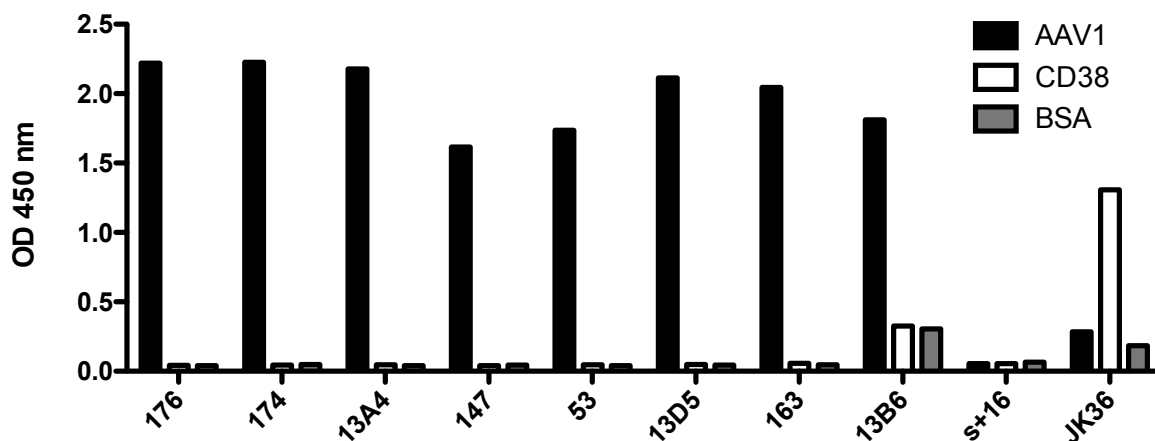


Abb. 6.1 ELISA-Analyse zur Identifizierung AAV1-spezifischer Schwere-Ketten-Antikörper.

Die spezifische Bindung von Schwere-Ketten-Antikörpern an das zur Immunisierung verwendete Antigen (AAV1) wurde mittels ELISA analysiert. Die Vertiefungen wurden über Nacht mit dem Immunogen (gereinigte Viren mit 10^9 Virus Genomen/Vertiefung) oder mit Kontrollantigenen (BSA, CD38, 100 ng/Napf) beschichtet. Alle Proben wurden als HEK-6E-Zellüberstände (1:20 in PBS verdünnt; 100 µl pro Vertiefung) eingesetzt. Ein irrelevanter VHH-Kaninchen-IgG-Schwere-Ketten-Antikörper (s+16a) wurde als Negativkontrolle verwendet. Ein CD38-spezifischer VHH-Kaninchen-IgG-Schwere-Ketten-Antikörper (JK36) wurde als Positivkontrolle für mit CD38 beschichtete Vertiefungen verwendet.

Lediglich Klon 13B6 zeigt eine schwache, unspezifische Reaktion mit den verwendeten Kontrollproteinen CD38 und BSA. Das Aminosäuresequenz-Alignment zeigt, dass dieser Klon, abgesehen von einer Mutation in der FR3-Region, in Keimbahnkonfiguration vorliegt (Abb. 5.8). Die „Klebrigkeit“ des Klons 13B6 könnte demzufolge auf einen niedrigen Reifestatus oder eine fehlerhafte PCR-Amplifikation zurückzuführen sein. Die Mutationen der anderen Klone könnten als Zeichen einer fortgeschrittenen Affinitätsreifung gewertet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der DNA-Tiefensequenzierung für eine Expansion und Migration von B-Zell-Klonen in der AAV1-immunisierten Maus sprechen. Zur Rekombination der variablen Domänen wurden offensichtlich unterschiedliche D- und J-Elemente des Lama IgH-Transgens verwendet und dabei die Diversität durch junktionale Insertion und Deletion von Nukleotiden gesteigert. Vergleichende Sequenzanalysen eines

Antigen-spezifischen Klons zeigen ausgeprägte Mutationen und deuten damit auf eine funktionierende Affinitätsreifung. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass bereits durch Immunisierung von TE01-transgenen Mäusen, die nur ein V_HH-Element und eine unvollständige 3'LCR enthalten, eine funktionale Schwere-Ketten-Antikörper Immunantwort induziert werden kann.

6.4 Herstellung und Charakterisierung optimierter Lama IgH-Transgene

Um die Diversität des Antikörperrepertoires und die Funktionalität des IgH-Lokus in Lama-IgH-transgenen Mäusen zu steigern, wurden weitere DNA-Modifikationen zur Herstellung optimierter Transgene (TE02 und TE03) vorgenommen.

Es ist denkbar, dass der Klassenwechsel von IgM zu IgG durch Insertion der Elemente HS3a und HS1,2 der Maus 3'Lokus-Kontrollregion verstärkt werden kann. In Studien mit *knockout*-Mäusen wurde gezeigt, dass sich die Entfernung von mindestens zwei Elementen aus der 3'LCR negativ auf die Funktionalität (CSR, SHM und Ig-Synthese) des IgH-Lokus auswirkt (Saintamand *et al.*, 2016) (Abb. 6.2). TE01-transgenen Mäusen fehlen die beiden Elemente HS3a und HS1,2. Für *knockout*-Mäuse mit ähnlicher 3'LCR-Konfiguration ($\Delta leftPAL$ -Maus) wurde ein eingeschränkter Klassenwechsel beschrieben (Saintamand *et al.*, 2016). Dies könnte auch im Fall von TE01-transgenen Mäusen die stärkere Amplifikation des IgM- gegenüber dem IgG-Repertoire erklären (Abb. 5.6 B). Zur Herstellung der TE02- und TE03-transgenen Mäuse wurde daher die 3'LCR in den BAC-Transgenen um die fehlenden Elemente HS3a und HS1,2 ergänzt (Abb. 5.10). Die Steigerung des B-Zell-Anteils an den peripheren Blut-Lymphozyten von 13 % (TE01) auf 19 % (TE02) deutet darauf hin, dass die Komplettierung der 3'LCR einen positiven Einfluss auf die Entwicklung von B-Zellen hat (Abb. 5.14).

Ein Unterschied der 3'LCR in den TE02- und TE03-transgenen Mäusen verglichen mit den in Abb. 6.2 beschriebenen Konfigurationen besteht darin, dass die palindromischen Sequenzabschnitte (dunkelgraue Pfeile) zwischen den Elementen HS3a, HS1,2, und HS3b nicht enthalten sind. Die 3'LCR in den transgenen Mäusen besteht aus den direkt verknüpften Kernelementen HS3a, HS1,2, HS3b und HS4 (hellgraue Kreise). Auch in dieser Konfiguration bilden die Elemente HS3a, HS1,2 und HS3b ein Palindrom mit HS1,2 als Mittelpunkt. Eine Studie zur Bedeutung der palindromischen Struktur innerhalb der Maus 3'LCR gibt Grund zur Annahme, dass eine Ausdehnung entsprechender Sequenzabschnitte auf die Wildtypkonfiguration einen positiven Einfluss auf die Funktionalität der 3'LCR hätte (Saintamand *et al.*, 2016).

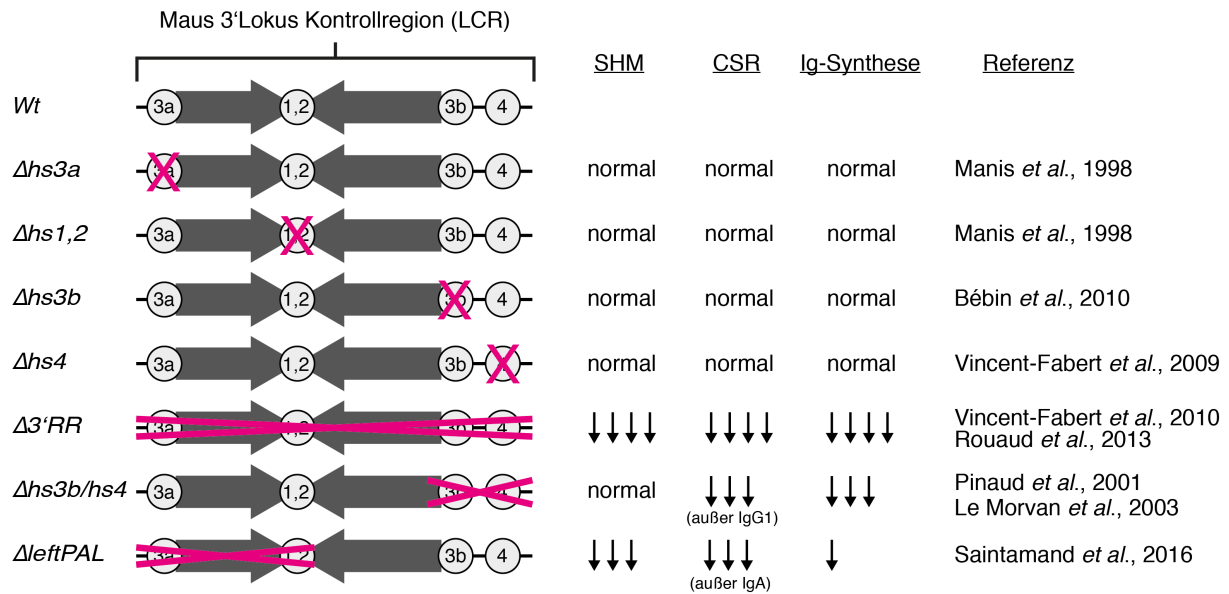


Abb. 6.2 Mutationen in der Maus 3'-Lokus Kontrollregion beeinflussen die Funktionalität des IgH-Lokus. Schematisch dargestellt ist die Maus 3'-Lokus Kontrollregion unterschiedlicher *knockout*-Mäuse mit Angabe der jeweils entfernten Bereiche (rotes Kreuz). Die palindromischen Sequenzabschnitte von HS3a bis HS3b sind durch dunkelgraue Pfeile gekennzeichnet. Die Auswirkungen der Mutanten auf verschiedene Charakteristika der Funktionalität des IgH-Lokus (SHM = somatische Hypermutation, CSR = *Class Switch Recombination*, Ig-Synthese = Immunglobulin-Synthese) sind neben jedem Genloкус angegeben. Die Originalpublikationen zu den jeweiligen Mutanten gehen aus der rechten Spalte hervor: (Bébin *et al.*, 2010; Manis *et al.*, 1998; Morvan *et al.*, 2003; Pinaud *et al.*, 2001; Rouaud *et al.*, 2013; Vincent-Fabert *et al.*, 2010; Vincent-Fabert *et al.*, 2009) (modifiziert nach (Saintamand *et al.*, 2016)).

Neben der Vervollständigung der Maus 3'LCR durch die Elemente HS3a und HS1,2, wurde zur Herstellung von Transgen TE02 ein synthetisches DNA-Konstrukt mit 5 kameliden V_HH-Elementen in das 5'-Ende von Transgen TE01 integriert (Abb. 5.11 B). Vier V_HH-Gene liegen dabei in ihrer Keimbahnkonfiguration vor, während das V_HH3-S12-Gen analog zu einem V_HH-Gen des Dromedars (Vincke *et al.*, 2009) an 8 Positionen "humanisiert" wurde (Abb. 5.11 C). Falls dieses Gen nach Immunisierung von TE02-/TE03-Mäusen *in vivo* die Entwicklung funktionaler und stabiler humanisierter VHHs ermöglicht, könnten analog weitere humanisierte V_HH-Elemente in das Transgen eingebracht werden. Um eine optimale Expression der transgenen VHHs in TE02- und TE03-Mäusen zu ermöglichen, wurden diese mit den starken Maus IgH-V-Promotorregionen 186.2 (Genbank: M58532.1) (Tantin *et al.*, 2002) und 17.2.25 (Genbank: M12421.1) (Grosschedl *et al.*, 1985) bzw. einer Kombinationen aus diesen beiden Sequenzen (Tantin *et al.*, 2004) flankiert.

Für das Leader-Peptid, die Intron-Sequenz zwischen Leader-Peptid und V_HH-Exon, sowie die RSS-Sequenz am 3'-Ende des V_HH-Exons wurden jeweils die kameliden Keimbahnkonfigurationen beibehalten. Die kameliden RSS-Sequenzen sollen dabei eine

optimale Rekombination mit den ebenfalls kameliden RSS-Sequenzen der D- und J-Elemente gewährleisten. Im Fall der TE01-transgenen Mäuse hat die Analyse der Verwendung von V-, D-, und J-Elementen ergeben, dass bestimmte Elemente bevorzugt (D6, J4, J7), andere Elemente hingegen nicht (J1, J5) oder nur sehr selten vom Rekombinationsapparat verwendet werden (Tabelle 5.3). Durch das Einfügen weiterer natürlicher oder synthetischer D-Elemente mit kompatiblen RSS-Sequenzen könnte die kombinatorische Diversität von Lama IgH-transgenen Mäusen künftig weiter erhöht werden.

Bei der Herstellung des Transgens TE03 wurden die Exone für die membranproximalen konstanten Regionen sowie für die Transmembrandomänen des Lama IgM-Lokus gegen die entsprechenden Sequenzen der Maus ausgetauscht (Abb. 5.13 A), um die Signalweiterleitung durch den B-Zell-Rezeptorkomplex und damit das Überleben und die Proliferation von B-Zellen zu verstärken (Abb. 5.13 B). Ähnliche Modifikationen im Fall von human-Ig transgenen Mäusen brachten höhere Antikörpertiter und eine robustere Immunantwort mit sich (Murphy *et al.*, 2014). Es ist bekannt, dass die Signalweiterleitung durch Interaktion von Ig α und Ig β mit den membranproximalen, konstanten Regionen des B-Zell-Rezeptors erfolgt. Durch Einfügen von Mutationen in die konstanten Domänen eines Maus IgM-Moleküls konnte gezeigt werden, dass Ig α und Ig β primär mit der CH4-Domäne interagieren (Radaev *et al.*, 2010). Der relativ hohe B-Zell-Anteil an peripheren Blut-Lymphozyten von 15-27 % bei TE03-Mäusen (Abbildung Abb. 5.14) deutet an, dass die murinen IgM-Anteile tatsächlich die Entwicklung und das Überleben von B-Zellen in diesen Mäusen positiv beeinflussen.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf, dass die vorgenommenen DNA-Modifikationen zur Herstellung der Transgene TE02 und TE03 zu einer Steigerung der Transgen-Funktionalität geführt haben, was sich anhand des steigenden Anteils zirkulierender B-Zellen an den peripheren Blutlymphozyten ablesen lässt (Abb. 5.14).

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Übertragung der Kernelemente des Lama IgH-Lokus auf IgH-KO Mäuse zur Entwicklung von reifen B-Zellen führt. Nach Immunisierung einer Maus mit dem Zielantigen AAV1, konnte durch Tiefen-DNA-Sequenzierung des VHH-Repertoires die klonale Expansion von B-Zellen nachgewiesen werden. Dabei wird die Diversität des Repertoires durch Verwendung unterschiedlicher D- und J-Elemente sowie durch Insertion und Deletion von junktionalen Nukleotiden während der VDJ-Rekombination gewährleistet. Somatische Mutationen in den VHH-Sequenzen expandierter Klone deuten zudem auf eine funktionierende Affinitätsreifung. Die Ergebnisse stützen die Schlussfolgerung, dass bereits ein 'Minimalkonstrukt' (TE01) mit nur einem V_HH Gen und einer partiellen 3'LCR eine produktive Immunantwort in Lama IgH-transgenen Mäusen ermöglicht. Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit konnte die Antigen-Spezifität ausgewählter Mitglieder einer expandierten Klonfamilie bestätigt werden (Pantelic, 2018).

Um die Diversität des Antikörperrepertoires und die Funktionalität des IgH-Lokus zu steigern, wurden bei der Herstellung des Transgens TE02 fünf weitere VHH Gene sowie zwei weitere Elemente der 3'LCR eingefügt, und bei der Herstellung des Transgens TE03 Abschnitte des IgM-Lokus durch murine Sequenzen ersetzt. Eine vergleichende Analyse der B-Zell-Entwicklung in TE01-, TE02- und TE03-transgenen Mäusen deutet darauf hin, dass die Funktionalität des Lama IgH-Lokus durch die vorgenommenen Modifikationen tatsächlich gesteigert werden konnte. Jedoch wird erst die Charakterisierung der durch Immunisierung induzierten Antikörper Aufschluss darüber geben, ob die Optimierungen auf genetischer Ebene auch zu besseren, spezifischen Nanobodies und Schwere-Ketten-Antikörpern *in vivo* führen.

Ein vorteilhafter Aspekt der hier verwendeten BAC-basierten experimentellen Strategie ist, dass BACs einfach genetisch modifiziert werden können. Durch den modularen Austausch einzelner Elemente des Lama IgH-Genlokus können spezialisierte Prototypen Lama IgH-transgener Mäuse entwickelt werden. Dabei wären z. B. Modifikationen der CDR3-Schleife als Antigen-bindender Bereich interessant. Mit langen CDR3-Schleifen können kamelide VHHs in funktionelle Vertiefungen von Proteinen eindringen, die für konventionelle Antikörper nicht oder nur schwer zugänglich sind. Der Austausch bzw. das Einfügen zusätzlicher D-Elemente könnte die Ausprägung neuartiger CDR-Schleifen ermöglichen und damit eine neue Basis für die Herstellung spezialisierter Nanobody-Varianten bereiten. Die bestehenden Lama D-Elemente könnten zudem durch Strukturdomänen ersetzt oder ergänzt werden, die normalerweise nicht in Antikörpern gefunden werden. Conotoxine, die aus 10-30 Aminosäuren

(pfam: PF07365) bestehen, können z. B. die Aktivität von Ionenkanälen modulieren (Terlau *et al.*, 2004) und sind daher interessant für pharmakologische Anwendungen (Olivera *et al.*, 2007). Auch Cystein-Knoten oder Cystein-Knoten-ähnliche Peptide (pfam: PF00007) bieten aufgrund ihrer beträchtlichen Stabilität vielzählige biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten (Craik *et al.*, 2001).

Ferner könnten auch natürliche D-Elemente anderer Spezies mit besonderen Eigenschaften verwendet werden, etwa die ultrlangen D-Elemente der Kuh (Stanfield *et al.*, 2016).

Diese Beispiele verdeutlichen das Potential der Weiterentwicklung von spezialisierten Lama IgH-transgenen Mäusen für die Produktion neuer Nanobodies.

Aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften sind Nanobodies u. a. zur strukturellen und funktionellen Proteincharakterisierung, *in vitro*- und *in vivo*-Bildgebung, sowie in Diagnostik und Therapie einsetzbar (Fridy *et al.*, 2014; Peyvandi *et al.*, 2016; Staus *et al.*, 2016). Nanobodies haben sich bereits als nützliche neue Therapeutika in der Onkologie, Infektiologie, und bei entzündlichen Erkrankungen erwiesen (Saerens *et al.*, 2008; Steeland *et al.*, 2016). Die modulare Struktur der VHHs ermöglicht in einem einfachen Klonierungsschritt die Formatierung in einen Schwere-Ketten-Antikörper jeden beliebigen Isotyps. Zudem lassen sich Nanobodies einfach in bi- und multispezifische Formate umwandeln und mit funktionellen Gruppen oder Proteinen verknüpfen. Die Zulassung des ersten therapeutischen Nanobodies (Caplacizumab) wird für 2018 erwartet (Peyvandi *et al.*, 2016). Es ist zu erwarten, dass die Markteinführung von Caplacizumab den Weg für weitere Nanobody-basierte Produkte in die klinische Anwendung ebnen wird. Die wachsende Nachfrage nach spezialisierten Nanobody-Produkten könnte durch Lama IgH-transgene Mäuse gedeckt werden. Gegenüber synthetischen Bibliotheken werden dabei die Vorzüge des natürlichen Immunsystems (Affinitätsreifung und Expansion von spezifischen Klonen) genutzt. Anders als bei großen Tieren können bei Mäusen Antikörper-produzierende Zellen einfach aus Milz und Knochenmark gewonnen werden. Darüber hinaus ist die Adressierung konservierter Epitope auf humanen Targets nach Kreuzung mit entsprechenden Target-KO-Mäusen möglich. Die in dieser Arbeit hergestellten Lama IgH-transgenen Mäuse vereinen also leistungsstarke Technologien zur Herstellung von Nanobodies für biomedizinische Anwendungen.

8 Anhang

8.1 Sequenzen

8.1.1 BACs

Die Sequenzen von BAC V03 und BAC F07 wurden in der NCBI Genbank unter den Zugangsnummern JQ684648 bzw. JQ684647 hinterlegt.

8.1.2 Primer

Name	Sequenz (5' – 3')	Firma
TE#18	TCGCCACGTCCGGTCAATGCTGCCTTCCTAGCTTCCGGGGGCGGCCAGCACCTCGTTGA CGTCCACATATACCTGC	Sigma Aldrich
TE#19	GCGAAGTACTCCCAGGTGCATCCGGCCTCCGAGGTGCTGCCTGTGCTCCTGGGTGGGTC AGAAGAACTCGTCAAG	Sigma Aldrich
TE#20	GTCCGGTCAATGCTGCCT	Sigma Aldrich
TE#21	ACTCCCAGGTGCATCCG	Sigma Aldrich
TE#37	CGAGGTGCTGCCTGTGCTC	Sigma Aldrich
TE#26	ACACCTACACGAGCGTCCCAGCAG	Sigma Aldrich
TE#27	GTGTCCTGGCAGGATGCCTCAGAG	Sigma Aldrich
TE#39	GGCCTCTGTCGTTTCCTTTCTCTG	Sigma Aldrich
TE#40	CGACACCCGCCAACACCCGCTGAC	Sigma Aldrich
TE#41	GAGAGTGCTGGCATCCGCTGCATG	Sigma Aldrich
TE#42	CTGCAGGGAAAGACAGAGCGTCAG	Sigma Aldrich
TE#45	CGGTGATCCGACAGGTTACG	Sigma Aldrich
TE#46	CAATCTGCTCTGATGCCGCATAG	Sigma Aldrich
TE#56	GCAGATCAATGTGAACGTGTGCACGG	Sigma Aldrich
TE#57	CTCAGTCCCTTTCAACCATGGCTAGCC	Sigma Aldrich
TE#131	GTGTCCAGGCTCAGGTGCAGCTGG	Eurofins
TE#85	GCATGAAGAGTGTACGCTGG	Eurofins
TE#127	AGAGGACGTCCTTGGGTTTCGG	Eurofins
TE#133	TCGCACATGTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	Eurofins
TE#134	ATGAAGAGTGTACGCTGGGCGGCCCTTGGGTCTGAGGAGACGGTGACC	Eurofins
TE#135	AGGATTGGGTTGTGGTGC GGCCGCTGGTTGTGGTTTGGTGTCTTGGGTTC	Eurofins
TE#136	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	Eurofins
TE#137	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTGGGTTCTGAGGAGACGGTGACC	Eurofins
TE#138	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGGTTTC	Eurofins
TE#139	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGAGAGACGGTGACCTGG	Eurofins
TE#2	AGGCGGTCAGTAGCAGGTG	Sigma Aldrich
TE#4	CTGGCTGACACTGGGCTGACCT	Sigma Aldrich
TE#16	AATCCGTCCTGCCCTATGCC	Sigma Aldrich
TE#17	AAGGTGGTTGGCTTGTCTGAC	Sigma Aldrich
TE#49	GTGGTTGTGAGTGAGGGAATCAGGACG	Sigma Aldrich
TE#50	TGTCTGCTGCACAGTAATAAACGGCCG	Sigma Aldrich
TE#47	AAGGACGAGTCACAGAGGACTTCCTGG	Sigma Aldrich
r.pCC1	TGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATC	UKE
TE#115	CCACCATCACAGACCTTTCTCC	Eurofins
TE#116	AACTCCACCTGCCTGCTCTGTC	Eurofins

8.2 Plasmidkarten

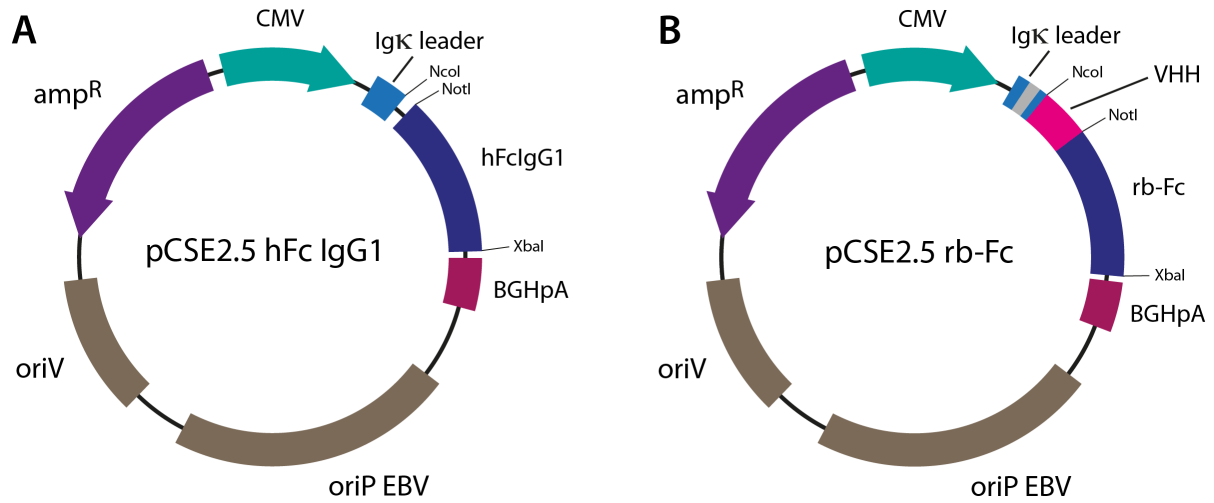


Abb. 8.1 Plasmidkarten pCSE2.5 human IgG1 und pCSE2.5 Kaninchen IgG

A) pCSE2.5 hFc IgG1; zur Verfügung gestellt von Thomas Schirrmann (TU Braunschweig, Yumab GmbH)

B) pCSE2.5 rb-Fc; ausgehend von A) kloniert; enthält die hinge, CH2- und CH3-Domänen vom Kaninchen IgG

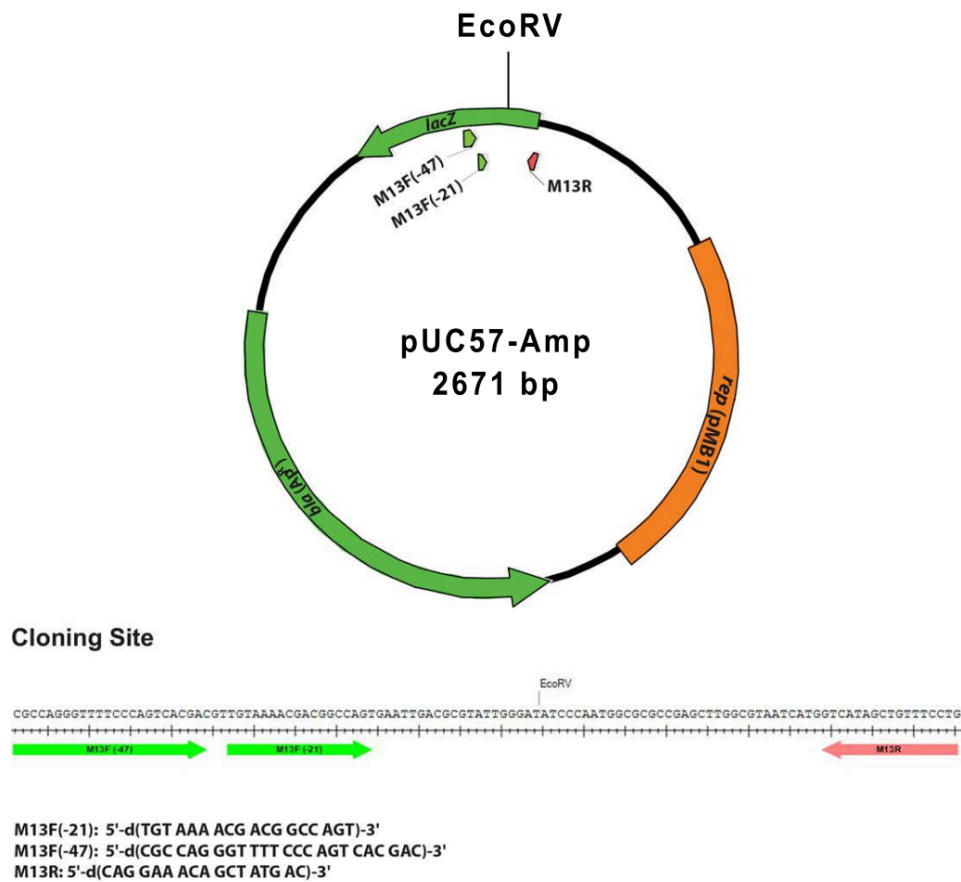


Abb. 8.2 Plasmidkarte des pUC57-Amp Klonierungsvektor

Zur Verfügung gestellt von GENEWIZ (https://www.geneviz.com/File/GENEWIZ_pUC57_Plasmid_Map.pdf)

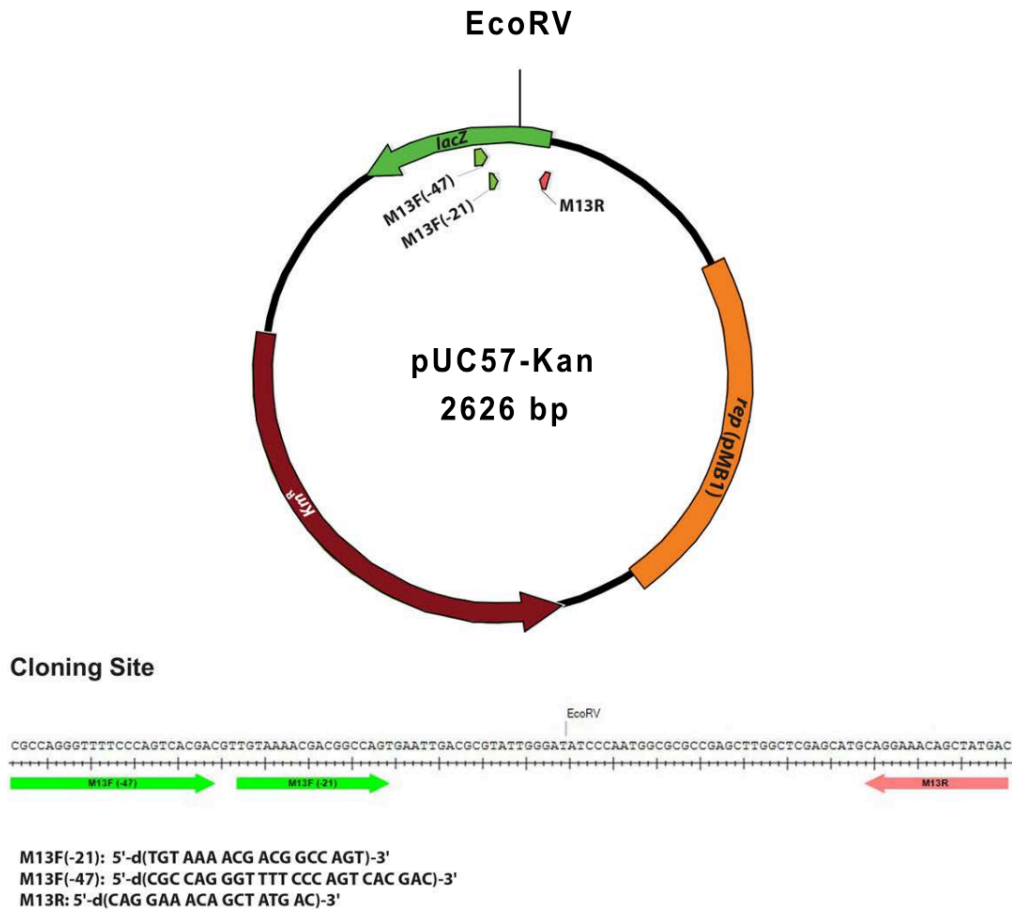


Abb. 8.3 Abb. 8.4 Plasmidkarte des pUC57-Kan Klonierungsvektor

Zur Verfügung gestellt von GENEWIZ (https://www.genewiz.com/File/GENEWIZ_pUC57_Plasmid_Map.pdf)

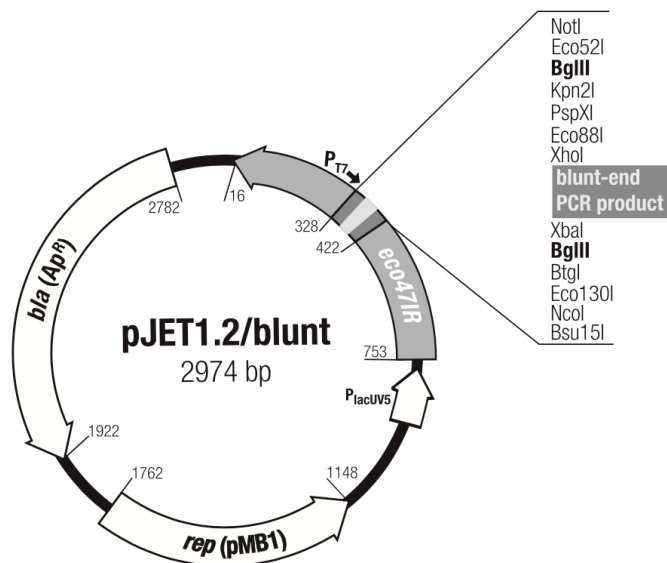


Abb. 8.5 pJET1.2/blunt (Fermentas)

Plasmidkarte aus Manual zum CloneJET™ PCR Cloning Kit (#K1231, #K1232)

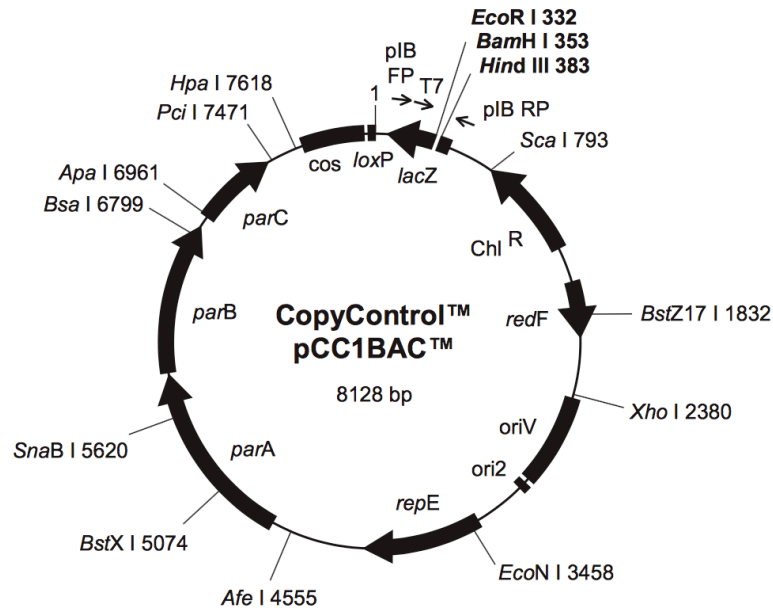
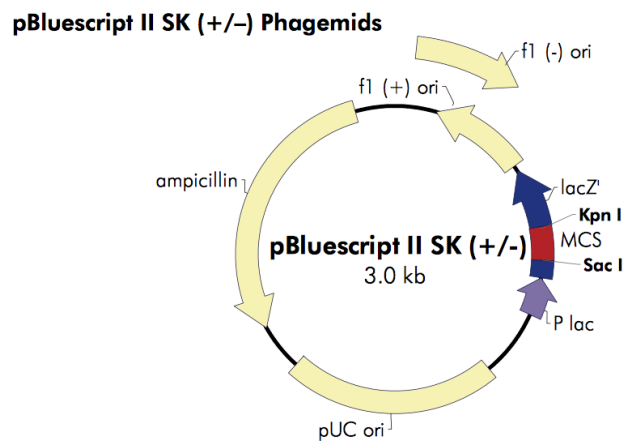


Abb. 8.6 CopyControl™ pCC1BAC™ (HindIII Cloning-Ready) Vector (Epicentre)
Plasmidkarte aus Manual (Cat. Nos. CBAC311B, CBAC311H, and CBAC311E)



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)

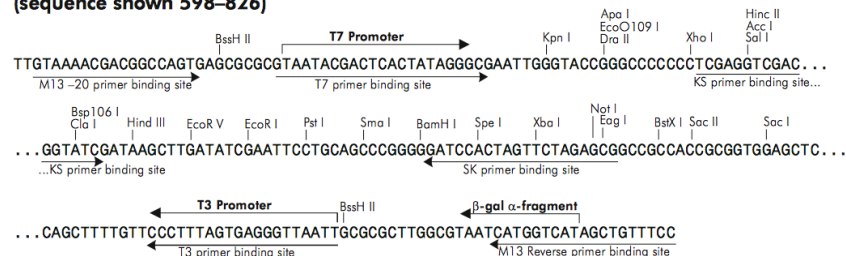


Abb. 8.7 pBluescript II SK(+/-) (Agilent)
Plasmidkarte aus Manual: pBluescript II Phagemid Vectors (Catalog #212205, #212206, #212207 and #212208)

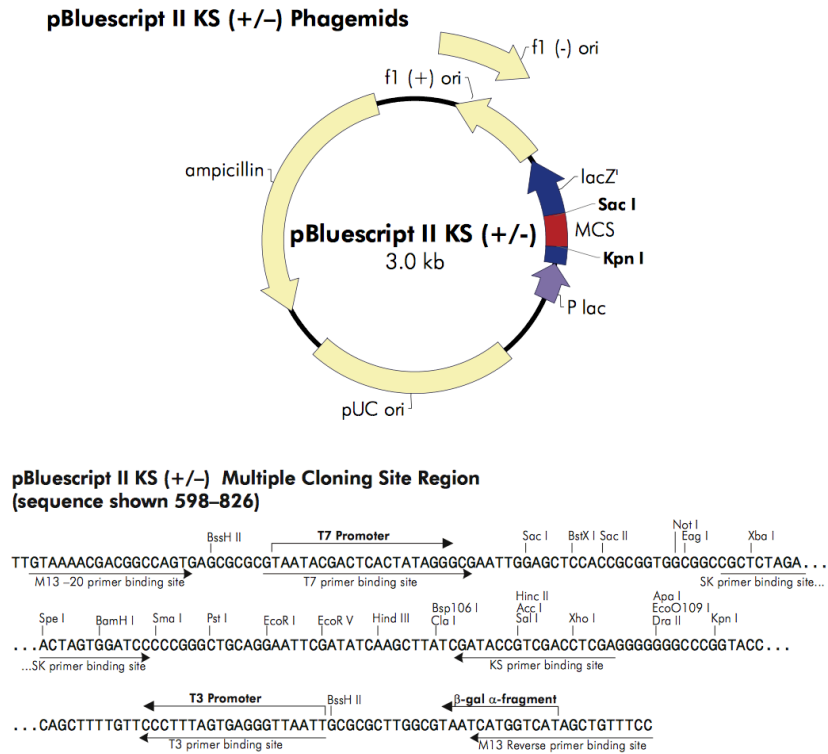


Abb. 8.8 pBluescript II KS (+/-) (Agilent)

Plasmidkarte aus Manual: pBluescript II Phagemid Vectors (Catalog #212205, #212206, #212207 and #212208)

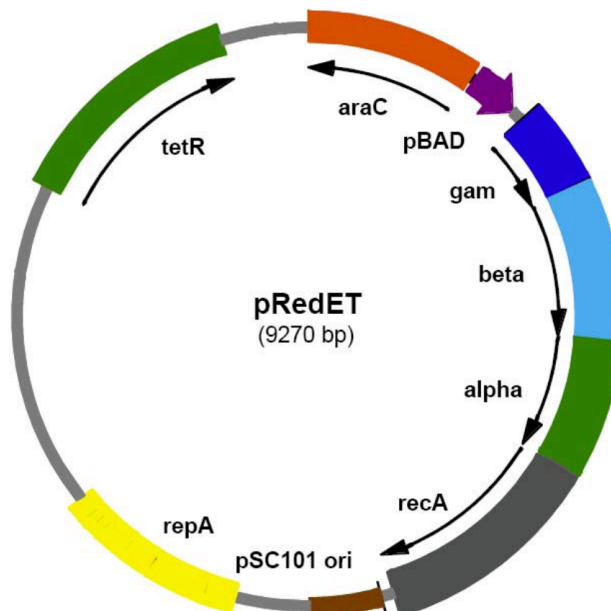


Abb. 8.9 Vektorkarte des Red/ET Expressionsplasmids pRedET (GeneBridges)

Plasmidkarte aus Manual: Counter-Selection BAC Modification Kit (Cat. No. K002)

9 Verzeichnisse

9.1 Abkürzungsverzeichnis

3'αE	3'α-Verstärkerelement (3'α <i>Enhancer</i>)
AAV1	Adeno Assoziierter Virus Serotyp 1
AAVs	Adeno Assoziierte Viren
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>)
ARTC2	ADP-Ribosyltransferase 2
AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
BCR	B-Zell-Rezeptorkomplex
BiP	<i>Binding immunoglobulin Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CDC	Komplementabhängige Zytolyse (<i>Complement Dependent Cytolysis</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CDR	komplementaritätsbestimmende Regionen (<i>Complementary Determining Region</i>)
CH	Konstant Domäne der schweren Antikörperkette
C _H H	konstanten Region eines Schwere-Ketten-Antikörpers auf dem kameliden Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genlocus
C _κ	Konstant Domäne der leichten κ-Kette konventioneller Antikörper
C _L	Konstant Domäne der leichten Kette konventioneller Antikörper
C _λ	Konstant Domäne der leichten λ-Kette konventioneller Antikörper
CLL	Chronischen Lymphatische Leukämie
CSR	Immunglobulin Klassenwechsel (<i>Class Switch Recombination</i>)
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Deoxynucleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immuno-Assay (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Embryonale Stammzellen
Fab	Antigen-bindendes Fragment (<i>Fragment antigen binding</i>)
FACS	Durchflusszytometrie

Fc	kristallisierbare Fragment (<i>Fragment crytallizable</i>)
FDA	Behörde für Lebens- und Arzneimittel (<i>Food and Drug Administration</i>)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	Gerüstregion (<i>Framework</i>)
hCFs	humanen Chromosomenfragmente
HS	DNaseI-hypersensitiver Bereich
HSA	Humanes Serum Albumin
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgH	Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genlocus
Igκ	κ Leichte-Ketten-Immunglobulin-Genlocus
Igλ	λ Leichte-Ketten-Immunglobulin-Genlocus
IgM	Immunglobulin M
IL6R	Interleukin 6 Rezeptor
IM	Intramuskulär
KO	<i>knockout</i>
3'LCR	3'Lokus Kontrollregion (3' <i>Locus Control Region</i>)
MARs	Kernmatrixanheftungsregionen (<i>Matrix Attachment Regions</i>)
mAk	Monoklonale Antikörper
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	DNA-Tiefensequenzierung (<i>Next Generation Sequencing</i>)
OD	Optische Dichte
OMT	<i>Open Monoclonal Technologies</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RA	Rheumatoide Arthritis
rAAVs	rekombinante AAV-Vektoren
RAG	Rekombination-aktivierende-Gene (<i>Recombination Activated Genes</i>)
RANKL	Ligand des Transmembranrezeptors RANK (<i>Rezeptor Activator of NF-κB Ligand</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minuste (<i>Rounds per minute</i>)
RSS	Rekombinationssignalsequenz (<i>Recombination Signal Sequence</i>)
RSV	Respiratorische Syncytial-Virus
scFv	Einzelketten-Fragment der variablen Regionen (<i>Single chain fragment variable</i>)
SHM	Somatische Hypermutation (<i>Somatic Hpermutation</i>)

SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	TransChromo
TdT	Desoxynukleotidyltransferase
TKO	<i>Tripple-Knock-Out</i>
TM	Transmembran
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura
v/v	Volumen pro Volumen
VHH	Variable Domäne der schweren Antikörper-Kette von kameliden Schwere-Ketten-Antikörpern
V _H H	V-Element im IgH-Lokus, dass nach Rekombination mit einem D- und J-Element für die variable Domäne der schweren Antikörperkette eines kameliden Schwere-Ketten-Antikörpers kodiert
VH	Variable Domäne der schweren Antikörperkette konventioneller Antikörper
V _H	V-Element im IgH-Lokus, das nach Rekombination mit einem D- und J-Element für die variable Domäne der schweren Antikörperkette eines konventionellen Antikörpers kodiert
VL	Variable Domäne der leichten Antikörperkette konventioneller Antikörper
vWF	von Willebrand Faktor
VNAR	<i>Shark Variable New Antigen Receptor</i>
w/v	Gewicht pro Volumen

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Strategien zur Humanisierung monoklonaler Antikörper.	2
Abb. 1.2 Schematischer Vergleich von konventionellen Antikörpern mit Schwere-Ketten-Antikörpern.	5
Abb. 1.3 Beispiele für Nanobody-basierte Biologika auf dem Weg in die klinische Anwendung.	8
Abb. 1.4 Schematischer Vergleich der IgH-Genloci von Maus, Lama und Alpaka.	9
Abb. 1.5 Klonierte Abschnitte humaner Ig-Genloci zur Herstellung human Ig-transgener Mäuse.	14
Abb. 1.6 Konstrukte zur Produktion von Schwere-Ketten-Antikörpern in transgenen Mäusen und Ratten.	18
Abb. 4.1 Schematische Darstellung der homologen Rekombination mit dem Red/ET System.	33
Abb. 4.2 Schematische Darstellung der homologen Rekombination mit dem <i>E. coli</i> Stamm <i>SW106</i> .	35
Abb. 4.3 Schematische Darstellung zur Herstellung BAC-transgener Mäuse.	49
Abb. 4.4 Schematische Darstellung der DNA-Tiefensequenzierung mit dem Illumina MiSeq-System.	53
Abb. 5.1 Genetische Modifikationen zur Herstellung eines Lama IgH-Transgens.	54
Abb. 5.2 Schrittweise DNA-Modifikation von BAC V03 zur Herstellung des Lama IgH-Transgens TE01.	57
Abb. 5.3 Nachweis der Keimbahnübertragung von Lama IgH-Transgen TE01.	59
Abb. 5.4 Lama IgH-Transgen TE01 rekonstituiert die Entwicklung von B-Zellen in IgH-KO Mäusen.	61
Abb. 5.5 Schematische Darstellung der Immunisierung einer TE01-transgenen Maus mit AAV1.	62
Abb. 5.6 PCR-Amplifikation des IgM- und IgG-Repertoires aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark der mit AAV1 immunisierten TE01-transgenen Maus 373.	64
Abb. 5.7 Rarefaction-Analyse der tiefensequenzierten VHH-Bibliotheken zeigt hohe Diversität in Knochenmark und Milz.	65
Abb. 5.8 Aminosäuresequenz-Alignment von unterschiedlichen Mitgliedern einer Klonfamilie zeigt ausgedehnte somatische Hypermutation.	68
Abb. 5.9 Analyse der V _H H-D-J Verknüpfungsstellen zeigt ausgedehnte Deletion und Insertion von junktionalen Nukleotiden.	71
Abb. 5.10 DNA-Modifikationen zur Herstellung der Lama IgH-Transgene TE02 und TE03.	72
Abb. 5.11 Aminosäuresequenz-Alignment transgener V _H Hs in TE02 und TE03 zeigt hohe Diversität.	74
Abb. 5.12 Design eines synthetischen Konstrukts aus Promotoren und V _H Hs.	75
Abb. 5.13 Optimierung der Signalweiterleitung des B-Zell-Rezeptorkomplexes durch Klonierung eines chimären Lama/Maus B-Zell-Rezeptors.	76
Abb. 5.14 Rekonstitution der B-Zell-Entwicklung durch Lama IgH-Transgene TE02 und TE03.	77
Abb. 6.1 ELISA-Analyse zur Identifizierung AAV1-spezifischer Schwere-Ketten-Antikörper.	83
Abb. 6.2 Mutationen in der Maus 3'-Lokus Kontrollregion beeinflussen die Funktionalität des IgH-Lokus.	85
Abb. 8.1 Plasmidkarte pCSE2.5 human IgG1 und pCSE2.5 Kaninchen IgG	90
Abb. 8.2 Plasmidkarte des pUC57-Amp Klonierungsvektor	90
Abb. 8.3 Abb. 8.4 Plasmidkarte des pUC57-Kan Klonierungsvektor	91
Abb. 8.5 pJET1.2/blunt (Fermentas)	91
Abb. 8.6 CopyControl™ pCC1BAC™ (HindIII Cloning-Ready) Vector (Epicentre)	92
Abb. 8.7 pBluescript II SK(+/-) (Agilent)	92
Abb. 8.8 pBluescript II KS (+/-) (Agilent)	93
Abb. 8.9 Vektorkarte des Red/ET Expressionsplasmids pRedET (GeneBridges)	93

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 RNA-Hexamer-Inkubation _____	42
Tabelle 4.2 cDNA-Synthese _____	42
Tabelle 4.3 Anheftung von Homologiearmen an die SRK-Selektionskassette: Annealing _____	43
Tabelle 4.4 Anheftung von Homologiearmen an die SRK-Selektionskassette: Amplifikation _____	44
Tabelle 4.5 Amplifikation von Selektionskassetten für die homologe Rekombination _____	44
Tabelle 4.6 Primerpaare zur Amplifikation von Selektionskassetten mit Homologieregionen _____	44
Tabelle 4.7 Amplifikation von VHH- und VH-Fragmenten aus cDNA mit der KOD Polymerase _____	45
Tabelle 4.8 Primerpaare zur Amplifikation von VHH- und VH-Fragmente _____	45
Tabelle 4.9 Anheften von Restriktionsschnittstellen an VHH- und VH-Fragmente mit der Q5 Polymerase ____	45
Tabelle 4.10 Primerpaare zum Anheften von Restriktionsschnittstellen an VHH- und VH-Fragmente _____	45
Tabelle 4.11 Anheftung von Linker-, Adapter- und Barcode- Sequenzen für die Tiefensequenzierung _____	46
Tabelle 4.12 Primerpaare zur Anheftung von Linker-, Adapter- und Barcode-Sequenzen an VHH- und VH-Fragmente _____	46
Tabelle 4.13 Amplifikation von Transgen-Fragmenten aus genomischer Maus-DNA _____	50
Tabelle 4.14 Primerpaare zur Genotypisierung Lama IgH-transgener Mäuse _____	50
Tabelle 5.1 Tiefensequenzierung des VHH-Repertoires der lymphatischen Organe bestätigt klonale Expansion sowie V _H H-D-J-Rekombination mit junktionalen Insertionen und Deletionen. _____	67
Tabelle 5.2 Sortierung von Mitgliedern der Klonfamilie 1 anhand ihrer Häufigkeiten in der Tiefensequenzierung. _____	68
Tabelle 5.3 Tiefensequenzierung des VHH-Repertoires aus Lymphknoten, Milz und Knochenmark zeigt eine hohe Bandbreite an CDR3 Längen. _____	70

10 Literaturverzeichnis

- Achour, I., Cavelier, P., Tichit, M., Bouchier, C., Lafaye, P., Rougeon, F. (2008) Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *J Immunol* **181**: 2001-2009.
- Afione, S. A., Conrad, C. K., Kearns, W. G., Chunduru, S., Adams, R., Reynolds, T. C., Guggino, W. B., Cutting, G. R., Carter, B. J., Flotte, T. R. (1996) In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol* **70**: 3235-3241.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., Muyldermans, S. (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* **414**: 521-526.
- Asokan, A., Schaffer, D. V., Samulski, R. J. (2012) The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol Ther* **20**: 699-708.
- Atchison, R. W., Casto, B. C., Hammon, W. M. (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**: 754-756.
- Balakrishnan, B., Jayandharan, G. R. (2014) Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* **14**: 86-100.
- Bankovich, A. J., Raunser, S., Juo, Z. S., Walz, T., Davis, M. M., Garcia, K. C. (2007) Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science* **316**: 291-294.
- Barbas, C. F., 3rd, Kang, A. S., Lerner, R. A., Benkovic, S. J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7978-7982.
- Bartlett, J. S., Kleinschmidt, J., Boucher, R. C., Samulski, R. J. (1999) Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol* **17**: 181-186.
- Bartoi, T., Rigbolt, K. T., Du, D., Kohr, G., Blagoev, B., Kornau, H. C. (2010) GABAB receptor constituents revealed by tandem affinity purification from transgenic mice. *J Biol Chem* **285**: 20625-20633.
- Bartunek, J., Barbato, E., Heyndrickx, G., Vanderheyden, M., Wijns, W., Holz, J. B. (2013) Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a Nanobody directed towards von Willebrand factor. *J Cardiovasc Transl Res* **6**: 355-363.
- Baum, P. D., Venturi, V., Price, D. A. (2012) Wrestling with the repertoire: the promise and perils of next generation sequencing for antigen receptors. *Eur J Immunol* **42**: 2834-2839.
- Bebin, A. G., Carrion, C., Marquet, M., Cogne, N., Lecardeur, S., Cogne, M., Pinaud, E. (2010) In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J Immunol* **184**: 3710-3717.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., Corvaia, N. (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* **10**: 345-352.
- Bishop, J. O. (1996) Chromosomal insertion of foreign DNA. *Reprod Nutr Dev* **36**: 607-618.
- Bolotin, D. A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I. Z., Putintseva, E. V., Chudakov, D. M. (2015) MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods* **12**: 380-381.
- Bosch, X., Saiz, A., Ramos-Casals, M., Group, B. S. (2011) Monoclonal antibody therapy-associated neurological disorders. *Nat Rev Neurol* **7**: 165-172.
- Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., Little, M. (1991) A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**: 147-153.
- Brekke, O. H., Sandlie, I. (2003) Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 52-62.

- Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R., Feldmann, M. (1989) Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**: 244-247.
- Bruggemann, M., Caskey, H. M., Teale, C., Waldmann, H., Williams, G. T., Surani, M. A., Neuberger, M. S. (1989) A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6709-6713.
- Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., de Haan, L. (2012) Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol* **12**: 615-622.
- Carlson, C. S., Emerson, R. O., Sherwood, A. M., Desmarais, C., Chung, M. W., Parsons, J. M., Steen, M. S., LaMadrid-Herrmannsfeldt, M. A., Williamson, D. W., Livingston, R. J., Wu, D., Wood, B. L., Rieder, M. J., Robins, H. (2013) Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. *Nat Commun* **4**: 2680.
- Carter, P. J., Lazar, G. A. (2017) Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nat Rev Drug Discov*.
- Chandler, K. J., Chandler, R. L., Broeckelmann, E. M., Hou, Y., Southard-Smith, E. M., Mortlock, D. P. (2007) Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression. *Mamm Genome* **18**: 693-708.
- Chen, J., Trounstein, M., Alt, F. W., Young, F., Kurahara, C., Loring, J. F., Huszar, D. (1993) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* **5**: 647-656.
- Chen, J., Trounstein, M., Kurahara, C., Young, F., Kuo, C. C., Xu, Y., Loring, J. F., Alt, F. W., Huszar, D. (1993) B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin kappa light chain genes. *EMBO J* **12**: 821-830.
- Chiang, C., Jacobsen, J. C., Ernst, C., Hanscom, C., Heilbut, A., Blumenthal, I., Mills, R. E., Kirby, A., Lindgren, A. M., Rudiger, S. R., McLaughlan, C. J., Bawden, C. S., Reid, S. J., Faull, R. L., Snell, R. G., Hall, I. M., Shen, Y., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Daly, M. J., Lee, C., Morton, C. C., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Talkowski, M. E. (2012) Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet* **44**: 390-397, S391.
- Chowdhury, D., Sen, R. (2004) Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunol Rev* **200**: 182-196.
- Colella, P., Ronzitti, G., Mingozzi, F. (2018) Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* **8**: 87-104.
- Collarini, E., Leighton, P., Pedersen, D., Harriman, B., Jacob, R., Mettler-Izquierdo, S., Yi, H., van de Lavoie, M. C., Etches, R. J. (2015) Inserting random and site-specific changes into the genome of chickens. *Poult Sci* **94**: 799-803.
- Craik, D. J., Daly, N. L., Waine, C. (2001) The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* **39**: 43-60.
- De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S., Wyns, L. (2006) Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4586-4591.
- de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W., Hoogenboom, H. R. (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* **274**: 18218-18230.
- Detalle, L., Stohr, T., Palomo, C., Piedra, P. A., Gilbert, B. E., Mas, V., Millar, A., Power, U. F., Stortelers, C., Allosery, K., Melero, J. A., Depla, E. (2015) Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the

- Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 6-13.
- Drabek, D., Janssens, R., de Boer, E., Rademaker, R., Kloess, J., Skehel, J., Grosveld, F. (2016) Expression Cloning and Production of Human Heavy-Chain-Only Antibodies from Murine Transgenic Plasma Cells. *Front Immunol* **7**: 619.
- Dubose, A. J., Lichtenstein, S. T., Narisu, N., Bonnycastle, L. L., Swift, A. J., Chines, P. S., Collins, F. S. (2013) Use of microarray hybrid capture and next-generation sequencing to identify the anatomy of a transgene. *Nucleic Acids Res* **41**: e70.
- Ecker, D. M., Jones, S. D., Levine, H. L. (2015) The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* **7**: 9-14.
- Eden, T., Menzel, S., Wesolowski, J., Bergmann, P., Nissen, M., Dubberke, G., Seyfried, F., Albrecht, B., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2018) A cDNA immunization strategy to generate nanobodies against membrane proteins in native conformation. *Frontiers in Immunology*.
- Feldmann, M., Maini, R. N. (2003) Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* **9**: 1245-1250.
- Finlay, W. J., Cunningham, O., Lambert, M. A., Darmanin-Sheehan, A., Liu, X., Fennell, B. J., Mahon, C. M., Cummins, E., Wade, J. M., O'Sullivan, C. M., Tan, X. Y., Piche, N., Pittman, D. D., Paulsen, J., Tchistiakova, L., Kodangattil, S., Gill, D., Hufton, S. E. (2009) Affinity maturation of a humanized rat antibody for anti-RAGE therapy: comprehensive mutagenesis reveals a high level of mutational plasticity both inside and outside the complementarity-determining regions. *J Mol Biol* **388**: 541-558.
- Fishwild, D. M., O'Donnell, S. L., Bengoechea, T., Hudson, D. V., Harding, F., Bernhard, S. L., Jones, D., Kay, R. M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Lonberg, N. (1996) High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol* **14**: 845-851.
- Fleetwood, F., Devoogdt, N., Pellis, M., Wernery, U., Muyldermans, S., Stahl, S., Lofblom, J. (2013) Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cell Mol Life Sci* **70**: 1081-1093.
- Flisikowska, T., Thorey, I. S., Offner, S., Ros, F., Lifke, V., Zeitler, B., Rottmann, O., Vincent, A., Zhang, L., Jenkins, S., Niersbach, H., Kind, A. J., Gregory, P. D., Schnieke, A. E., Platzer, J. (2011) Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One* **6**: e21045.
- Fridy, P. C., Li, Y., Keegan, S., Thompson, M. K., Nudelman, I., Scheid, J. F., Oeffinger, M., Nussenzweig, M. C., Fenyo, D., Chait, B. T., Rout, M. P. (2014) A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat Methods* **11**: 1253-1260.
- Goldman, E. R., Anderson, G. P., Liu, J. L., Delehanty, J. B., Sherwood, L. J., Osborn, L. E., Cummins, L. B., Hayhurst, A. (2006) Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem* **78**: 8245-8255.
- Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., David, N. E., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D. G., Hales, J. F., McGuinness, R. P., Capon, D. J., Klapholz, S., Jakobovits, A. (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* **7**: 13-21.
- Grosschedl, R., Baltimore, D. (1985) Cell-type specificity of immunoglobulin gene expression is regulated by at least three DNA sequence elements. *Cell* **41**: 885-897.

- Gu, H., Zou, Y. R., Rajewsky, K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**: 1155-1164.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**: 446-448.
- Hawlich, H., Muller, M., Frank, R., Bautsch, W., Klos, A., Kohl, J. (2001) Site-specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets. *Anal Biochem* **293**: 142-145.
- Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dubel, S., Breitling, F., Little, M. (1994) Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *Biotechniques* **17**: 310, 312, 314-315.
- He, L., Sok, D., Azadnia, P., Hsueh, J., Landais, E., Simek, M., Koff, W. C., Poignard, P., Burton, D. R., Zhu, J. (2014) Toward a more accurate view of human B-cell repertoire by next-generation sequencing, unbiased repertoire capture and single-molecule barcoding. *Sci Rep* **4**: 6778.
- Holz, J. B. (2012) The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Apher Sci* **46**: 343-346.
- Hooper, J. W., Brocato, R. L., Kwilas, S. A., Hammerbeck, C. D., Josleyn, M. D., Royals, M., Ballantyne, J., Wu, H., Jiao, J. A., Matsushita, H., Sullivan, E. J. (2014) DNA vaccine-derived human IgG produced in transchromosomal bovines protect in lethal models of hantavirus pulmonary syndrome. *Sci Transl Med* **6**: 264ra162.
- Hudson, P. J., Souriau, C. (2003) Engineered antibodies. *Nat Med* **9**: 129-134.
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H. J., Reinard, T. (2002) The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *J Virol Methods* **106**: 225-233.
- Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rulker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M. I., Schutte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dubel, S. (2011) A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J Biotechnol* **152**: 159-170.
- Ishida, I., Tomizuka, K., Yoshida, H., Tahara, T., Takahashi, N., Ohguma, A., Tanaka, S., Umehashi, M., Maeda, H., Nozaki, C., Halk, E., Lonberg, N. (2002) Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. *Cloning Stem Cells* **4**: 91-102.
- Jahnichen, S., Blanchetot, C., Maussang, D., Gonzalez-Pajuelo, M., Chow, K. Y., Bosch, L., De Vrieze, S., Serruys, B., Ulrichs, H., Vandevelde, W., Saunders, M., De Haard, H. J., Schols, D., Leurs, R., Vanlandschoot, P., Verrips, T., Smit, M. J. (2010) CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20565-20570.
- Jakobovits, A., Amado, R. G., Yang, X., Roskos, L., Schwab, G. (2007) From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* **25**: 1134-1143.
- Jakobovits, A., Vergara, G. J., Kennedy, J. L., Hales, J. F., McGuinness, R. P., Casentini-Borocz, D. E., Brenner, D. G., Otten, G. R. (1993) Analysis of homozygous mutant chimeric mice: deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2551-2555.
- Janssens, R., Dekker, S., Hendriks, R. W., Panayotou, G., van Remoortere, A., San, J. K., Grosveld, F., Drabek, D. (2006) Generation of heavy-chain-only antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15130-15135.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816-821.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K., Foeller, C., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. (U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, ed. 5, 1991).
- Kakeda, M., Hiratsuka, M., Nagata, K., Kuroiwa, Y., Kakitani, M., Katoh, M., Oshimura, M., Tomizuka, K. (2005) Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts. *Gene Ther* **12**: 852-856.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., Rajewsky, K. (1991) A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* **350**: 423-426.
- Kobayashi, N., Oyama, H., Kato, Y., Goto, J., Soderlind, E., Borrebaeck, C. A. (2010) Two-step in vitro antibody affinity maturation enables estradiol-17beta assays with more than 10-fold higher sensitivity. *Anal Chem* **82**: 1027-1038.
- Kohler, G., Milstein, C. (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* **6**: 511-519.
- Kuroiwa, Y., Tomizuka, K., Shinohara, T., Kazuki, Y., Yoshida, H., Ohguma, A., Yamamoto, T., Tanaka, S., Oshimura, M., Ishida, I. (2000) Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. *Nat Biotechnol* **18**: 1086-1090.
- Kuroiwa, Y., Yoshida, H., Ohshima, T., Shinohara, T., Ohguma, A., Kazuki, Y., Oshimura, M., Ishida, I., Tomizuka, K. (2002) The use of chromosome-based vectors for animal transgenesis. *Gene Ther* **9**: 708-712.
- Le Saux, A., Houdebine, L. M., Jolivet, G. (2010) Chromosome integration of BAC (bacterial artificial chromosome): evidence of multiple rearrangements. *Transgenic Res* **19**: 923-931.
- Lee, E. C., Liang, Q., Ali, H., Bayliss, L., Beasley, A., Bloomfield-Gerdes, T., Bonoli, L., Brown, R., Campbell, J., Carpenter, A., Chalk, S., Davis, A., England, N., Fane-Dremucheva, A., Franz, B., Germaschewski, V., Holmes, H., Holmes, S., Kirby, I., Kosmac, M., Legent, A., Lui, H., Manin, A., O'Leary, S., Paterson, J., Sciarrillo, R., Speak, A., Spensberger, D., Tuffery, L., Waddell, N., Wang, W., Wells, S., Wong, V., Wood, A., Owen, M. J., Friedrich, G. A., Bradley, A. (2014) Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol* **32**: 356-363.
- Lee, E. C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D. A., Court, D. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (2001) A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**: 56-65.
- Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X., Stamatoyannopoulos, G. (2002) Locus control regions. *Blood* **100**: 3077-3086.
- Lim, T. S., Chan, S. K. (2016) Immune Antibody Libraries: Manipulating The Diverse Immune Repertoire for Antibody Discovery. *Curr Pharm Des* **22**: 6480-6489.
- Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstein, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C. C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J. G., et al. (1994) Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* **368**: 856-859.

- Lu, J., Panavas, T., Thys, K., Aerssens, J., Naso, M., Fisher, J., Ryczyn, M., Sweet, R. W. (2014) IgG variable region and VH CDR3 diversity in unimmunized mice analyzed by massively parallel sequencing. *Mol Immunol* **57**: 274-283.
- Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., Walter, R., Next Generation Sequencing in Aquatic Models, in *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges"*, J. K. Kulski, Ed. (2016).
- Luciw, P. A., Bishop, J. M., Varmus, H. E., Capecchi, M. R. (1983) Location and function of retroviral and SV40 sequences that enhance biochemical transformation after microinjection of DNA. *Cell* **33**: 705-716.
- Ma, B., Osborn, M. J., Avis, S., Ouisse, L. H., Menoret, S., Anegon, I., Buelow, R., Bruggemann, M. (2013) Human antibody expression in transgenic rats: comparison of chimeric IgH loci with human VH, D and JH but bearing different rat C-gene regions. *J Immunol Methods* **400-401**: 78-86.
- Macdonald, L. E., Karow, M., Stevens, S., Auerbach, W., Poueymirou, W. T., Yasenchak, J., Friendewey, D., Valenzuela, D. M., Giallourakis, C. C., Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Murphy, A. J. (2014) Precise and in situ genetic humanization of 6 Mb of mouse immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 5147-5152.
- Manis, J. P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A., Alt, F. W. (1998) Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* **188**: 1421-1431.
- Marquet, M., Garot, A., Bender, S., Carrion, C., Rouaud, P., Lecardeur, S., Denizot, Y., Cogne, M., Pinaud, E. (2014) The Emu enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J Immunol* **193**: 1171-1183.
- Martensson, I. L., Keenan, R. A., Licence, S. (2007) The pre-B-cell receptor. *Curr Opin Immunol* **19**: 137-142.
- Matsushita, H., Sano, A., Wu, H., Jiao, J. A., Kasinathan, P., Sullivan, E. J., Wang, Z., Kuroiwa, Y. (2014) Triple immunoglobulin gene knockout transchromosomal cattle: bovine lambda cluster deletion and its effect on fully human polyclonal antibody production. *PLoS One* **9**: e90383.
- Maussang, D., Mujic-Delic, A., Descamps, F. J., Stortelers, C., Vanlandschoot, P., Stigter-van Walsum, M., Vischer, H. F., van Roy, M., Vosjan, M., Gonzalez-Pajuelo, M., van Dongen, G. A., Merchiers, P., van Rompaey, P., Smit, M. J. (2013) Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. *J Biol Chem* **288**: 29562-29572.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., Chiswell, D. J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554.
- Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Jia, X. C., Maynard-Currie, C. E., Yang, X. D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C. M., Abderrahim, H., Kirschenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. H., Fukushima, A., Hales, J. F., Klapholz, S., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M., Jakobovits, A. (1997) Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet* **15**: 146-156.
- Menoret, S., Iscache, A. L., Tesson, L., Remy, S., Usal, C., Osborn, M. J., Cost, G. J., Bruggemann, M., Buelow, R., Anegon, I. (2010) Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur J Immunol* **40**: 2932-2941.
- Moghaddam, A., Borgen, T., Stacy, J., Kausmally, L., Simonsen, B., Marvik, O. J., Brekke, O. H., Braunagel, M. (2003) Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *J Immunol Methods* **280**: 139-155.

- Monegal, A., Ami, D., Martinelli, C., Huang, H., Aliprandi, M., Capasso, P., Francavilla, C., Ossolengo, G., de Marco, A. (2009) Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library. *Protein Eng Des Sel* **22**: 273-280.
- Morvan, C. L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A., Cogne, M. (2003) The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* **102**: 1421-1427.
- Muller, O. J., Kaul, F., Weitzman, M. D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J. A., Trepel, M. (2003) Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* **21**: 1040-1046.
- Munch, R. C., Janicki, H., Volker, I., Rasbach, A., Hallek, M., Buning, H., Buchholz, C. J. (2013) Displaying high-affinity ligands on adeno-associated viral vectors enables tumor cell-specific and safe gene transfer. *Mol Ther* **21**: 109-118.
- Murphy, A. J., Macdonald, L. E., Stevens, S., Karow, M., Dore, A. T., Pobursky, K., Huang, T. T., Poueymirou, W. T., Esau, L., Meola, M., Mikulka, W., Krueger, P., Fairhurst, J., Valenzuela, D. M., Papadopoulos, N., Yancopoulos, G. D. (2014) Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 5153-5158.
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A., Hamers, R. (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* **7**: 1129-1135.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Testa, G., Stewart, A. F. (1999) Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res* **27**: 1555-1557.
- Nagy, A., *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States, ed. 3rd, 2003), pp. 764.
- Nakano, M., Ishimura, M., Chiba, J., Kanegae, Y., Saito, I. (2001) DNA substrates influence the recombination efficiency mediated by FLP recombinase expressed in mammalian cells. *Microbiol Immunol* **45**: 657-665.
- Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S. (1999) Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol* **36**: 515-524.
- Nguyen, V. K., Zou, X., Lauwereys, M., Brys, L., Bruggemann, M., Muyldermans, S. (2003) Heavy-chain only antibodies derived from dromedary are secreted and displayed by mouse B cells. *Immunology* **109**: 93-101.
- Nicholson, I. C., Zou, X., Popov, A. V., Cook, G. P., Corps, E. M., Humphries, S., Ayling, C., Goyenechea, B., Xian, J., Taussig, M. J., Neuberger, M. S., Bruggemann, M. (1999) Antibody repertoires of four- and five-feature translocus mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes. *J Immunol* **163**: 6898-6906.
- Olivera, B. M., Teichert, R. W. (2007) Diversity of the neurotoxic Conus peptides: a model for concerted pharmacological discovery. *Mol Interv* **7**: 251-260.
- Osborn, M. J., Ma, B., Avis, S., Binnie, A., Dilley, J., Yang, X., Lindquist, K., Menoret, S., Iscache, A. L., Ouisse, L. H., Rajpal, A., Anegón, I., Neuberger, M. S., Buelow, R., Bruggemann, M. (2013) High-affinity IgG antibodies develop naturally in Ig-knockout rats carrying germline human IgH/Igkappa/Iglambda loci bearing the rat CH region. *J Immunol* **190**: 1481-1490.
- Pantelic, N. (2018) Selection and characterization of AAV-specific nanobodies, Master Thesis, University of Applied Sciences Bremen, University Medical Center Hamburg, Institute of Immunology.
- Parrish, M., Unruh, J., Krumlauf, R. (2011) BAC modification through serial or simultaneous use of CRE/Lox technology. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 924068.

- Pelat, T., Hust, M., Hale, M., Lefranc, M. P., Dubel, S., Thullier, P. (2009) Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC Biotechnol* **9**: 60.
- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M. P., Dubel, S., Thullier, P. (2007) High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2758-2764.
- Peyvandi, F., Scully, M., Kremer Hovinga, J. A., Cataland, S., Knobl, P., Wu, H., Artoni, A., Westwood, J. P., Mansouri Taleghani, M., Jilma, B., Callewaert, F., Ulrichs, H., DUBY, C., Tersago, D., Investigators, T. (2016) Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med* **374**: 511-522.
- Pinaud, E., Khamlichi, A. A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., Cogne, M. (2001) Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**: 187-199.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P., Neri, D. (1998) Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* **273**: 21769-21776.
- Radaev, S., Zou, Z., Tolar, P., Nguyen, K., Nguyen, A., Krueger, P. D., Stutzman, N., Pierce, S., Sun, P. D. (2010) Structural and functional studies of Ig α and its assembly with the B cell antigen receptor. *Structure* **18**: 934-943.
- Reichert, J. M. (2017) Antibodies to watch in 2017. *MAbs* **9**: 167-181.
- Rinaldi, M., Bogaert, T. V., van Roy, M., Bontinck, L., Hohlbaum, A., Snoeck, V., Dombrecht, E., Van Beneden, K., Schoen, P., Ulrichs, H., poster presented at the ACR/ARHP Annual Meeting, Assessment of dose-dependent effects of vobarilizumab, an anti-IL-6 receptor (IL-6R) Nanobody, on systemic biomarkers in patients with moderate-to-severe rheumatoid arthritis (RA): Results of two Phase 2b studies, San Diego, 2017.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogne, M., Denizot, Y. (2013) The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med* **210**: 1501-1507.
- Ryckaert, S., Pardon, E., Steyaert, J., Callewaert, N. (2010) Isolation of antigen-binding camelid heavy chain antibody fragments (nanobodies) from an immune library displayed on the surface of *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **145**: 93-98.
- Saerens, D., Ghassabeh, G. H., Muyldermans, S. (2008) Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **8**: 600-608.
- Saintamand, A., Vincent-Fabert, C., Garot, A., Rouaud, P., Oruc, Z., Magnone, V., Cogne, M., Denizot, Y. (2016) Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region. *Nat Commun* **7**: 10730.
- Sanchez, P., Drapier, A. M., Cohen-Tannoudji, M., Colucci, E., Babinet, C., Cazenave, P. A. (1994) Compartmentalization of lambda subtype expression in the B cell repertoire of mice with a disrupted or normal C kappa gene segment. *Int Immunol* **6**: 711-719.
- Sano, A., Matsushita, H., Wu, H., Jiao, J. A., Kasinathan, P., Sullivan, E. J., Wang, Z., Kuroiwa, Y. (2013) Physiological level production of antigen-specific human immunoglobulin in cloned transchromosomal cattle. *PLoS One* **8**: e78119.
- Senecoff, J. F., Rossmeissl, P. J., Cox, M. M. (1988) DNA recognition by the FLP recombinase of the yeast 2 μ plasmid. A mutational analysis of the FLP binding site. *J Mol Biol* **201**: 405-421.
- Shepard, H. M., Phillips, G. L., C, D. T., Feldmann, M. (2017) Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clin Med (Lond)* **17**: 220-232.

- Shugay, M., Bagaev, D. V., Turchaninova, M. A., Bolotin, D. A., Britanova, O. V., Putintseva, E. V., Pogorelyy, M. V., Nazarov, V. I., Zvyagin, I. V., Kirgizova, V. I., Kirgizov, K. I., Skorobogatova, E. V., Chudakov, D. M. (2015) VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput Biol* **11**: e1004503.
- Shugay, M., Britanova, O. V., Merzlyak, E. M., Turchaninova, M. A., Mamedov, I. Z., Tuganbaev, T. R., Bolotin, D. A., Staroverov, D. B., Putintseva, E. V., Plevova, K., Linnemann, C., Shagin, D., Pospisilova, S., Lukyanov, S., Schumacher, T. N., Chudakov, D. M. (2014) Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods* **11**: 653-655.
- Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-1317.
- Stanfield, R. L., Wilson, I. A., Smider, V. V. (2016) Conservation and diversity in the ultralong third heavy-chain complementarity-determining region of bovine antibodies. *Sci Immunol* **1**.
- Staus, D. P., Strachan, R. T., Manglik, A., Pani, B., Kahsai, A. W., Kim, T. H., Wingler, L. M., Ahn, S., Chatterjee, A., Masoudi, A., Kruse, A. C., Pardon, E., Steyaert, J., Weis, W. I., Prosser, R. S., Kobilka, B. K., Costa, T., Lefkowitz, R. J. (2016) Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature* **535**: 448-452.
- Steeland, S., Vandenbroucke, R. E., Libert, C. (2016) Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today* **21**: 1076-1113.
- Subrahmanyam, R., Sen, R. (2010) RAGs' eye view of the immunoglobulin heavy chain gene locus. *Semin Immunol* **22**: 337-345.
- Sun, L., Lu, X., Li, C., Wang, M., Liu, Q., Li, Z., Hu, X., Li, J., Liu, F., Li, Q., Belser, J. A., Hancock, K., Shu, Y., Katz, J. M., Liang, M., Li, D. (2009) Generation, characterization and epitope mapping of two neutralizing and protective human recombinant antibodies against influenza A H5N1 viruses. *PLoS One* **4**: e5476.
- Takata, Y., Kondo, S., Goda, N., Kanegae, Y., Saito, I. (2011) Comparison of efficiency between FLPe and Cre for recombinase-mediated cassette exchange in vitro and in adenovirus vector production. *Genes Cells* **16**: 765-777.
- Tantin, D., Sharp, P. A. (2002) Mouse lymphoid cell line selected to have high immunoglobulin promoter activity. *Mol Cell Biol* **22**: 1460-1473.
- Tantin, D., Tussie-Luna, M. I., Roy, A. L., Sharp, P. A. (2004) Regulation of immunoglobulin promoter activity by TFII-I class transcription factors. *J Biol Chem* **279**: 5460-5469.
- Terlau, H., Olivera, B. M. (2004) Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev* **84**: 41-68.
- Tiller, T., Schuster, I., Deppe, D., Siegers, K., Strohn, R., Herrmann, T., Berenguer, M., Poujol, D., Stehle, J., Stark, Y., Hessling, M., Daubert, D., Felderer, K., Kaden, S., Kolln, J., Enzelberger, M., Urlinger, S. (2013) A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *MAbs* **5**: 445-470.
- Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., Ishida, I. (2000) Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 722-727.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**: 575-581.
- Trott, M., Weibeta, S., Antoni, S., Koch, J., von Briesen, H., Hust, M., Dietrich, U. (2014) Functional characterization of two scFv-Fc antibodies from an HIV controller selected on soluble HIV-1 Env complexes: a neutralizing V3- and a trimer-specific gp41 antibody. *PLoS One* **9**: e97478.

- Van Keuren, M. L., Gavrilina, G. B., Filipiak, W. E., Zeidler, M. G., Saunders, T. L. (2009) Generating transgenic mice from bacterial artificial chromosomes: transgenesis efficiency, integration and expression outcomes. *Transgenic Res* **18**: 769-785.
- Van Roy, M., Ververken, C., Beirnaert, E., Hoefman, S., Kolkman, J., Vierboom, M., Breedveld, E., t Hart, B., Poelmans, S., Bontinck, L., Hemeryck, A., Jacobs, S., Baumeister, J., Ulrichs, H. (2015) The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **17**: 135.
- Vettermann, C., Herrmann, K., Jack, H. M. (2006) Powered by pairing: the surrogate light chain amplifies immunoglobulin heavy chain signaling and pre-selects the antibody repertoire. *Semin Immunol* **18**: 44-55.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogne, M., Pinaud, E., Denizot, Y. (2010) The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur J Immunol* **40**: 3306-3311.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogne, N., Cogne, M., Denizot, Y. (2010) Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* **116**: 1895-1898.
- Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogne, N., Cogne, M., Denizot, Y. (2009) Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol* **182**: 6926-6932.
- Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S., Conrath, K. (2009) General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem* **284**: 3273-3284.
- Wagner, S. D., Gross, G., Cook, G. P., Davies, S. L., Neuberger, M. S. (1996) Antibody expression from the core region of the human IgH locus reconstructed in transgenic mice using bacteriophage P1 clones. *Genomics* **35**: 405-414.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* **33**: e36.
- Weinmann, J., Grimm, D. (2017) Next-generation AAV vectors for clinical use: an ever-accelerating race. *Virus Genes* **53**: 707-713.
- Wesolowski, J. (2011) Klonierung des Lama glama Schwereketten-Antikörper Genlokus und Herstellung von Konstrukten für Lama Antikörper produzierende transgene Mäuse, Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D. V., Goldbaum, F. A., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* **198**: 157-174.
- Yan, J., Li, G., Hu, Y., Ou, W., Wan, Y. (2014) Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Transl Med* **12**: 343.
- Yau, K. Y., Groves, M. A., Li, S., Sheedy, C., Lee, H., Tanha, J., MacKenzie, C. R., Jermutus, L., Hall, J. C. (2003) Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library. *J Immunol Methods* **281**: 161-175.
- Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Court, D. L. (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5978-5983.
- Zhang, B. (2009) Ofatumumab. *MAbs* **1**: 326-331.

- Zhang, J., Byrne, C. D. (1999) Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J* **337** (Pt 2): 231-241.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muylers, J. P., Stewart, A. F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* **20**: 123-128.
- Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Konning, D., Barelle, C. J., Kolmar, H. (2015) Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *MAbs* **7**: 15-25.
- Zou, X., Piper, T. A., Smith, J. A., Allen, N. D., Xian, J., Bruggemann, M. (2003) Block in development at the pre-B-II to immature B cell stage in mice without Ig kappa and Ig lambda light chain. *J Immunol* **170**: 1354-1361.
- Zou, X., Smith, J. A., Nguyen, V. K., Ren, L., Luyten, K., Muyltermans, S., Bruggemann, M. (2005) Expression of a dromedary heavy chain-only antibody and B cell development in the mouse. *J Immunol* **175**: 3769-3779.
- Zou, Y. R., Takeda, S., Rajewsky, K. (1993) Gene targeting in the Ig kappa locus: efficient generation of lambda chain-expressing B cells, independent of gene rearrangements in Ig kappa. *EMBO J* **12**: 811-820.

Die Silhouetten der Tiere in den Abbildungen 1.6, 4.3, 5.3, 5.5 und 5.15 stammen von der Internetseite <http://all-silhouettes.com/>.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich danke Lynn Dieckow (Institut für Immunologie, UKE School of Life Sciences) für Unterstützung bei der Durchführung und Analyse von BAC-Rekombinationen (Abb. 5.2 und 5.10), Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (ZMNH) für Unterstützung bei der Durchführung von Pronukleus-Injektionen und der Analyse von *Founder* Tieren (Abb. 5.3), Fabienne Seyfried und Dr. Björn Rissiek (Institut für Immunologie, UKE) für Unterstützung bei FACS-Analysen muriner Blut-Lymphozyten (Abb. 5.4 und 5.14), Dr. Sahil Adriouch (Institut für Immunologie, UKE und INSERM, Rouen) für Unterstützung bei der Durchführung von AAV-Immunisierungen (Abb. 5.5), Prof. Mascha Binder, Malik Alawi und Dr. Stephan Menzel (Institut für Immunologie, UKE) für Unterstützung bei der Durchführung und Analyse von DNA-Tiefensequenzierungen (Abb. 5.7, Tabelle 5.1, 5.2 und 5.3) sowie Dr. Stephan Menzel und Nikolina Pantelic (Institut für Immunologie, UKE) für Unterstützung bei der Selektion und Charakterisierung AAV-spezifischer Klone (Abb. 6.1).

Hamburg, den 19.06.2018



Thomas Eden