

Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente gegen sekundäre Arzneipflanzenmetabolite

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Christian Klein

aus Neustadt an der Weinstraße

Frankfurt am Main, 2004
(DF1)

vom Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe, Frankfurt
1. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dingermann, Frankfurt
2. Gutachter: HD Dr. Th. Winckler, Frankfurt

Datum der Disputation: 17. September 2004

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.2	Struktur und Funktion von Antikörpern.....	1
1.2.1	Struktur eines IgG-Antikörpers.....	1
1.2.2	Isotypen von leichter und schwerer Kette.....	3
1.3	Erzeugung des Antikörperrepertoires.....	4
1.3.1	Antikörpervielfalt durch somatische Rekombination.....	4
1.3.2	Die Organisation der humanen Antikörpergencluster.....	4
1.3.2.1	Die Gencluster für die leichte Kette.....	4
1.3.2.2	Der Gencluster für die schwere Kette.....	5
1.3.3	Der Mechanismus der somatischen V(D)J-Rekombination.....	6
1.3.4	Weitere Mechanismen zur Erzeugung der Antikörpervielfalt.....	9
1.4	Monoklonale Antikörper, rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente.....	10
1.4.1	Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern.....	10
1.4.2	Chimäre und humanisierte Antikörper.....	11
1.4.3	Antikörperfragmente.....	11
1.4.3.1	Proteolytische Spaltung von Immunglobulinen.....	11
1.4.3.2	Rekombinante Antikörperfragmente.....	13
1.5	Heterologe Expression von Antikörperfragmenten in <i>E. coli</i>.....	14
1.5.1	Bakterielle Expression von löslichen scFv- und Fab-Fragmenten.....	14
1.5.2	Phagen-Display von Antikörperfragmenten.....	15
1.6	Antikörper als <i>In-vivo</i>-Diagnostika und Therapeutika.....	17
1.7	Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente in der Naturstoffanalytik.....	21
1.7.1	Antikörper gegen Triterpensaponine.....	23
1.7.2	Rekombinante Antikörperfragmente gegen Pyrrolizidinalkaloide.....	27
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	29

2	MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1	Material.....	30
2.1.1	Chemikalien	30
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.1.3	Antikörper	32
2.1.4	Kits	32
2.1.5	Enzyme	32
2.1.6	Kompetitoren	32
2.1.7	Arbeitsgeräte	33
2.1.8	Allgemeine Lösungen und Puffer	34
2.1.9	Nährmedien.....	35
2.1.9.1	Flüssige und feste Medien	35
2.1.9.2	Antibiotikakonzentrationen für Nährmedien zur Selektion	35
2.1.10	Mikroorganismen	36
2.1.11	Vektoren und Plasmide.....	36
2.1.11.1	Übersicht über die verwendeten Plasmide.....	36
2.1.11.2	Das pAK-Vektor-System	37
2.1.12	Synthetische Oligonukleotide	39
2.1.12.1	Oligonukleotide zur Amplifikation von scFv-Fragmenten	39
2.1.12.2	Oligonukleotide für die Rearrangement-Analyse des κ -Genclusters	41
2.1.12.3	Oligonukleotide für das Screening auf V_{κ} -Pseudogene	42
2.1.12.4	Oligonukleotide für die Sequenzierung	42
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	43
2.2.1	Isolierung von RNA aus Hybridomzellen	43
2.2.2	First strand cDNA-Synthese.....	43
2.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus Hybridomzellen.....	43
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen.....	44
2.2.5	Polymerasekettenreaktion.....	44
2.2.5.1	Amplifikation der variablen Antikörperdomänen.....	44
2.2.5.2	Splicing by overlap extension-PCR (SOE-PCR)	45
2.2.5.3	Inverse Long Range-PCR (iLR-PCR).....	45
2.2.5.4	Inverse Hemi Nested-PCR (iHN-PCR).....	46
2.2.6	Agarose Gelelektrophorese	47
2.2.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	47
2.2.8	Ethanol-fällung von DNA.....	47
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	48
2.2.9.1	Klonierung in pGEM [®] -T	48
2.2.9.2	Klonierung in pAK-Vektoren	48
2.2.10	Transformation von <i>E. coli</i>	49
2.2.10.1	Elektroporation	49
2.2.10.2	CaCl ₂ -Transformation	49
2.2.11	Anlegen von Bakterien-Gefrierstocks	50
2.2.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	50
2.2.12.1	DNA-Mini-Präparation („Minisate“)	50
2.2.12.2	Plasmid-Präparation	50
2.2.13	DNA-Sequenzierung.....	51
2.2.14	Southern Blot	51
2.2.15	Kolonien-Fixierung („Colony-lift“)	52
2.2.16	5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden	52
2.2.17	Hybridisierung von DNA mit radioaktiven Oligonukleotiden	53
2.2.18	Dehybridisierung von radioaktiv markierter DNA („Stripping“)	53

2.3	Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur	54
2.3.1	Expression von scFv-Antikörperfragmenten in <i>E.coli</i>	54
2.3.1.1	Expression im analytischen Maßstab	54
2.3.1.2	Expression im präparativen Maßstab	54
2.3.1.3	Periplasmaextraktion	55
2.3.2	Phagen-Display und Phagen-Panning von scFv-Fragmenten	55
2.3.2.1	Phagen-Display	55
2.3.2.2	Phagen-Panning	56
2.3.2.3	Reinfektion von <i>E. coli</i>	56
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.3.4	Coomassie-Färbung von Proteingelen	58
2.3.5	Western Blot	58
2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	60
2.3.7	Lyophilisation von Proteinlösungen	60
2.3.8	Etablierung von Hybridomzelllinien zur Produktion von monoklonalen Antikörpern	60
2.3.9	Reinigung von Hybridomzellen über einen Ficoll-Gradienten	60
2.3.10	Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern	61
2.3.10.1	Reinigung von IgG-Antikörpern über eine Sepharose Protein-A-Säule	61
2.3.10.2	Ammoniumsulfatfällung von IgM-Antikörpern	62
2.3.11	Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)	63
2.3.11.1	Indirekter ELISA	63
2.3.11.2	Checkpoint-ELISA	64
2.3.11.3	Indirekter Kompetitions-ELISA	64
2.3.11.4	Direkter Kompetitions-ELISA	65
2.3.12	Herstellung von Oleanolsäure-Protein-Konjugaten	65
2.3.12.1	Kopplung von Oleanolsäure und BSA	65
2.3.12.2	Kopplung von Oleanolsäure und β -Galactosidase	66
2.4	Phytochemische und analytische Methoden	67
2.4.1	Extraktion von Arzneipflanzen	67
2.4.1.1	Wässrige Extraktion	67
2.4.1.2	Methanolische Extraktion	67
2.4.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	67

3	ERGEBNISSE	68
3.1	Generierung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen das pentazyklische Triterpensapogenin Oleanolsäure	68
3.1.1	Etablierung verschiedener Hybridomzelllinien	68
3.1.1.1	Herstellung der Proteinkonjugate für die Immunisierung	68
3.1.1.2	Immunisierung und Screening	69
3.1.2	Synthese von Oleanolsäure-BSA-Konjugaten für die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	69
3.1.2.1	Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat	69
3.1.2.2	Proteinkopplung nach dem gemischten Anhydridverfahren	70
3.1.2.3	Reinigung und Charakterisierung der Proteinkonjugate	71
3.1.3	Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Antikörper	72
3.1.4	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper	73
3.1.4.1	Affinitätschromatographische Reinigung der IgG-Antikörper der Zelllinien 6C2 und 7A6	73
3.1.4.2	Reinigung der IgM-Antikörper der Zelllinie 10F10 durch Ammoniumsulfatfällung	74
3.1.5	Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den indirekten ELISA	75
3.1.6	Checkpoint-ELISA	77
3.1.6.1	Antikörper der Zelllinie 6C2	77
3.1.6.2	Antikörper der Zelllinie 7A6	79
3.1.6.3	Antikörper der Zelllinie 10F10	80
3.1.7	Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 7A6	81
3.1.7.1	Übersicht über die eingesetzten Kompetitoren	81
3.1.7.2	Indirekter Kompetitions-ELISA	82
3.1.7.3	Etablierung und Screening von Subklonen der Zelllinie 7A6	85
3.1.7.4	Reinigung der von den 7A6-Subklonen sezernierten Antikörper	86
3.1.7.5	Charakterisierung des Antikörpers der Subklonzelllinie 7A6B4	87
3.1.7.6	Klonierung und Sequenzierung der variablen Antikörperdomänen	88
3.1.8	Charakterisierung der Antikörper der Zelllinien 6C2 und 10F10	90
3.1.8.1	Indirekter Kompetitions-ELISA mit Antikörpern der Zelllinie 6C2	90
3.1.8.2	Indirekter Kompetitions-ELISA mit Antikörpern der Zelllinie 10F10	91
3.1.9	Kreuzreaktivitäten mit anderen Triterpenen und strukturell nicht verwandten Pflanzeninhaltsstoffen	92
3.1.9.1	Steroide und Phytosterole	92
3.1.9.2	Herzglykoside	93
3.1.9.3	β -Boswelliasäuren	94
3.1.9.4	Strukturell nicht verwandte Pflanzeninhaltsstoffe	96
3.2	Untersuchung von Arzneipflanzenextrakten mit monoklonalen Antikörpern	100
3.3	Etablierung eines direkten Kompetitions-ELISAs auf der Basis eines Oleanolsäure-β-Galaktosidase-Konjugats	103
3.3.1	Prinzip des direkten ELISAs	103
3.3.2	Kopplung von Oleanolsäure und <i>E.coli</i> β -Galaktosidase	103
3.3.3	Checkpoint-ELISA mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat	105
3.3.4	Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den direkten ELISA	106
3.3.5	Bestimmung der Nachweisgrenze des direkten ELISA	107
3.3.6	Direkter Kompetitions-ELISA mit einem wässrigen Extrakt von <i>Quillaja saponaria</i>	107

3.4	Konstruktion und Expression von rekombinanten scFv-Antikörperfragmenten gegen Oleanolsäure	108
3.4.1	Konstruktion der scFv-Fragmente und Ligation in die Plasmide pAK100, pAK300 und pAK400	108
3.4.2	Screening auf V κ -Pseudogensequenzen	110
3.4.2.1	Auswahl der Oligonukleotide für das Pseudogenscreening.....	111
3.4.2.2	Screening der Anti-Oleanolsäure-scFv-Konstrukte auf das V κ -Pseudogen.....	112
3.4.3	Auswahl von Bakterienklonen, die ein vollständiges scFv-Fragment exprimieren	113
3.4.4	Sequenzierung der Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente	113
3.4.4.1	DNA- und Aminosäure-Sequenz des 6C2-scFv-Fragments	114
3.4.4.2	DNA- und Aminosäuresequenz des 7A6-scFv-Fragments	115
3.4.4.3	DNA- und Aminosäuresequenz des 10F10-scFv-Fragments	116
3.4.4.4	Aminosäuresequenzvergleich der Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente	117
3.4.5	Expression und Charakterisierung von löslichen scFv-Fragmenten.....	118
3.4.5.1	Etablierung der Expressionsbedingungen	118
3.4.5.2	Periplasmatische Expression der scFv-Fragmente.....	119
3.4.5.3	Antigen-Bindungsversuche mit den heterolog exprimierten scFv-Antikörperfragmenten	120
3.4.6	Phagen-Display und Phagen-Panning der 10F10-scFv-Antikörperfragmente	124
3.4.6.1	Konstruktion eines 10F10-scFv-Fragments und Ligation in den Phagemid-Vektor pAK100.....	124
3.4.6.2	Phagen-Display und Phagen-Panning	125
3.5	Konstruktion und Expression von rekombinanten scFv-Fragmenten gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin	127
3.5.1	Konstruktion der scFv-Fragmente und Ligation in das Plasmid pAK400	127
3.5.2	Sequenzierung des Anti-Retrorsin-scFv-Fragments.....	128
3.5.3	Expression der Anti-Retrorsin-scFv-Fragmente.....	129
3.6	Rearrangement-Analytik der Antikörpergene in Hybridomzelllinien	130
3.6.1	Das Prinzip der Rearrangement-Analytik des κ -Genclusters	130
3.6.2	Methodenetablierung	133
3.6.2.1	Isolierung von genomischer DNA aus Hybridomzellen.....	133
3.6.2.2	<i>Hind</i> III-Hydrolyse und Religation der gDNA.....	134
3.6.2.3	Inverse Long-Range-PCR und inverse Hemi-Nested-PCR	134
3.6.3	Rearrangement-Analytik des κ -Genclusters der Hybridomzelllinie 10F10	135
3.6.3.1	<i>Hind</i> III-Verdau und Religation der 10F10-gDNA sowie PCR-Amplifikation des unbekanntes V κ -Gensegments.....	135
3.6.3.2	Southern-Blot-Hybridisierungsexperimente	136
3.6.3.3	Sequenzierung der DNA-Fragmente.....	137

4	DISKUSSION	138
4.1	Monoklonale Antikörper gegen Triterpene und ihr Einsatz in der Naturstoffanalytik ..	138
4.1.1	Die monoklonalen Antikörper der Zelllinien 6C2, 7A6 und 10F10	139
4.1.2	Die Untersuchung von triterpenhaltigen Arzneipflanzen mit monoklonalen Antikörpern...	142
4.2	Die Konstruktion und Expression von scFv-Antikörperfragmenten gegen das Triterpen Oleanolsäure und das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin	152
4.2.1	Die Konstruktion der scFv-Fragmente	153
4.2.1.1	Auswahl der Oligonukleotide und der Expressionsplasmide	153
4.2.1.2	cDNA-Synthese und Konstruktion der scFv-Fragmente	154
4.2.2	Die Expression, die Charakterisierung und das Phagen-Display der scFv-Fragmente.....	155
4.3	Rearrangement-Analytik des Antikörpergenclusters der κ-leichten Kette	162
5	ZUSAMMENFASSUNG	166
6	VERZEICHNISSE	168
6.1	Literaturverzeichnis	168
6.2	Abbildungsverzeichnis	177
6.3	Tabellenverzeichnis	179
7	ANHANG.....	180
7.1	Abkürzungen.....	180
7.2	Molekulargewichte der eingesetzten Kompetitoren	182
7.2.1	Pentazyklische Triterpene.....	182
7.2.2	Steroide und Phytosterole.....	183
7.2.3	Herzglykoside.....	183
7.2.4	β -Boswelliasäuren.....	183
7.2.5	Sonstige Arzneipflanzenmetabolite.....	183
7.3	Plasmide und Vektoren mit laborinterner Registriernummer.....	184
7.4	Genetischer Code und Aminosäuren	185
7.4.1	Der universelle genetische Code	185
7.4.2	Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren	185
7.5	DNA-Sequenz des Genclusters der murinen κ -Kette	186
8	LEBENS LAUF	188
9	DANKSAGUNG	190

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor eingedrungenen pathogenen Mikroorganismen.

Höhere Vertebraten verfügen über zwei getrennte Funktionseinheiten: das angeborene Immunsystem reagiert unspezifisch gegenüber Pathogenen, z.B. durch Makrophagen-vermittelte Phagozytose. Das adaptive Immunsystem hingegen bekämpft Krankheitserreger spezifisch mit Hilfe spezialisierter Effektorzellen, z.B. den B- und T-Lymphozyten.

Teil des adaptiven Immunsystems sind die Antikörper oder Immunglobuline, die im Rahmen einer Immunantwort von den B-Plasma-Lymphozyten sezerniert werden. Sie bilden zusammen mit dem Komplementsystem den humoralen Zweig des Immunsystems. Antikörper wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Paul Ehrlich, einem der Pioniere der Immunologie, postuliert. Er stellte sie sich als mobilisierbare Rezeptoren („magic bullets“) vor, die nach dem Kontakt mit einem Pathogen von den Zellen des Immunsystems sezerniert werden (Ehrlich, 1904).

1.2 Struktur und Funktion von Antikörpern

1.2.1 Struktur eines IgG-Antikörpers

Antikörper sind aus jeweils zwei identischen leichten und zwei schweren Proteinketten aufgebaut, die miteinander über Disulfidbrücken verbunden sind. Anhand ihrer schweren Ketten lassen sich die Immunglobuline in fünf Hauptklassen (Isotypen) einteilen. Man unterscheidet zwischen IgM-, IgD-, IgG-, IgA- und IgE-Antikörpern. Antikörper des Isotyps IgG stellen den größten Anteil der humanen und murinen Serum-Immunglobuline. Daher soll der Aufbau eines Antikörpers anhand dieses Immunglobulins näher erläutert werden.

Ein IgG-Molekül besitzt eine Gesamtmasse von ca. 150 kD. Dazu tragen die beiden leichten Ketten mit jeweils ca. 25 kD und die beiden schweren Ketten mit jeweils ca. 50 kD bei. Die vier Proteinketten sind räumlich so angeordnet, dass sich eine Y-förmige Molekülstruktur ergibt. Die beiden Schenkel des Y enden in den variablen Domänen, über die die Antigenbindung erfolgt. Das lange Bein des Y ist der Molekülbereich, durch den wichtige Effektorfunktionen vermittelt werden, wie z.B. die Aktivierung des Komplementsystems oder die Interaktion mit speziellen Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche.

Betrachtet man die Struktur von leichter und schwerer Kette etwas genauer, so fällt auf, dass die Proteinketten in einzelne Domänen mit einer Länge von jeweils 110 Aminosäuren unterteilt werden können.

Die leichte Kette besteht aus zwei solcher Domänen, der N-terminalen variablen Domäne VL und der C-terminalen konstanten Domäne CL. Die schwere Kette eines IgG-Antikörpers lässt sich in vier Domänen unterteilen. Auch hier befindet sich N-terminal der variable Bereich VH, gefolgt von den drei konstanten Domänen CH₁, CH₂ und CH₃. Zwischen CH₁ und CH₂ befindet sich die so genannte Hinge-Region, eine kurze, bewegliche Polypeptidkette, die dem Antikörpermolekül die notwendige Flexibilität verleiht.

Der Zusammenhalt der vier Proteinketten erfolgt über Disulfidbrücken: leichte Kette und schwere Kette sind über eine Disulfidbrücke zwischen den Domänen CL und CH₁ verbunden. Die beiden schweren Ketten werden beim IgG-Molekül durch zwei Disulfidbrücken im Bereich der Gelenkregion (Hinge-Region) verbunden. Daneben existieren in den einzelnen Proteindomänen auch intramolekulare Disulfidbindungen, die die Konformation der Domänen determinieren (Janeway et al., 2002).

Während die Aminosäuresequenz im Bereich der konstanten Domänen bei verschiedenen Antikörpern eines Isotyps weitgehend gleich ist, zeigen sich innerhalb der variablen Domänen große Sequenzunterschiede. Die Sequenzvariationen sind aber nicht über die komplette variable Region verteilt, sondern konzentrieren sich auf drei hypervariable Domänen, die *complementarity determining regions* (CDRs). Diese sind zwischen Proteindomänen mit geringerer Sequenzvariabilität, den *framework regions* (FRs) eingebettet. Die *framework regions* besitzen β -Faltblattstruktur und ordnen sich räumlich so an, dass die *complementarity determining regions* im funktionell gefalteten Protein direkt nebeneinander liegen. Über die hypervariablen Bereiche von leichter und schwerer Kette erfolgt die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen (Searle et al., 1995). Abbildung 1.1 zeigt den schematischen Aufbau und das „*ribbon drawing*“ eines IgG-Antikörpers.

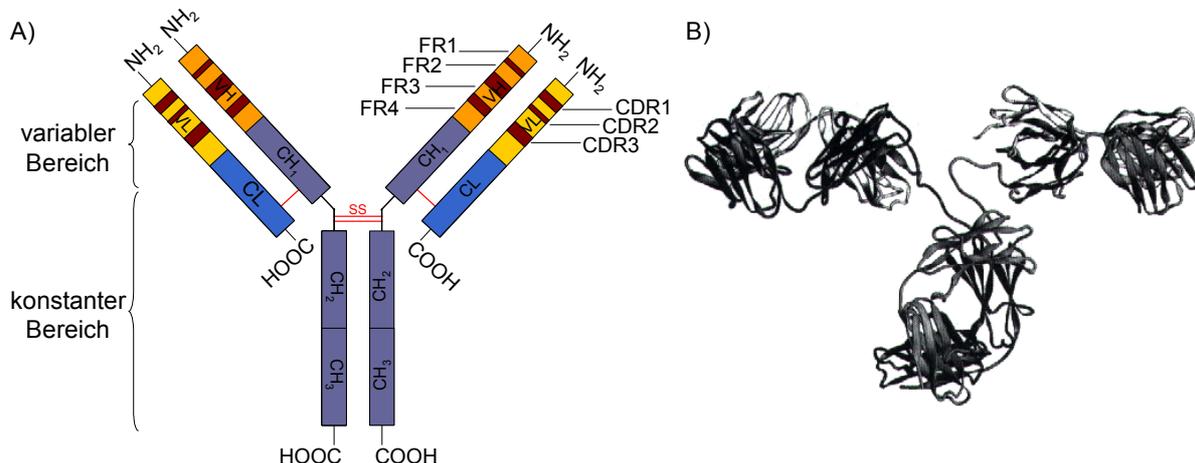


Abb. 1.1 Struktur eines IgG-Antikörpers

A) Schematische Darstellung des Antikörpers. Der IgG-Antikörper ist ein Heterodimer aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die über Disulfidbindungen miteinander verbunden sind.

B) *Ribbon drawing* des ersten kristallisierten Antikörpers (nach Harris et al., 1992). In der Darstellung sind die β -Faltblattstrukturen der unterschiedlichen Proteindomänen gut zu erkennen.

1.2.2 Isotypen von leichter und schwerer Kette

Sowohl für die leichte, als auch für die schwere Antikörperkette existieren verschiedene Isotypen. Bei der leichten Kette unterscheidet man zwischen κ - und λ -Ketten, die allerdings funktionell äquivalent sind. Das Verhältnis von κ - zu λ -Ketten kann von Spezies zu Spezies stark variieren. Beim Mensch beträgt es etwa 2:1, bei der Maus hingegen 20:1.

Für die schwere Kette existieren 5 Isotypen (μ , δ , γ , α , ϵ), nach denen das Antikörperrepertoire in 5 Hauptklassen (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE) eingeteilt wird. Der Isotyp der schweren Kette ist ausschlaggebend für Form und Funktion des Antikörpers (Tabelle 1.1).

Im Laufe des Lebenszyklus einer B-Zelle können unterschiedliche Isotypen der schweren Kette exprimiert werden. Am Ende der B-Zellreifung werden immer IgM- und IgD-Moleküle als membrangebundene B-Zell-Rezeptoren (BCR) exprimiert. Im Rahmen einer primären Immunantwort werden pentamere IgM-Moleküle sezerniert. Im weiteren Verlauf der Immunantwort besteht für den B-Lymphozyt die Möglichkeit, einen anderen Isotyp zu exprimieren. So erfolgt z.B. im Rahmen der sekundären Immunantwort für gewöhnlich eine IgG-Sezernierung. Dieses Umschalten bezeichnet man als Klassen- oder Isotypenwechsel („class switch“).

	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
Struktur	Monomer, Pentamer	Monomer	Monomer	Monomer, Dimer, Trimer	Monomer
Schwere Kette	μ	δ	γ	α	ϵ
Leichte Kette	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ
Molekulargewicht	190 kD oder 950 kD	175 kD	150 kD	160 kD oder 320 kD oder 480 kD	190 kD
Serumkonz.	0,5-2 mg/mL	0-0,4 mg/mL	8-16 mg/mL	1-4 mg/mL	10-400 ng/mL
Funktion	B-Zell-Rezeptor oder primäre Immunantwort	nicht bekannt	sekundäre Immunantwort	Antikörper auf den Schleimhäuten	allergische und anaphylaktische Reaktionen

Tabelle 1.1 Eigenschaften der menschlichen Immunglobulin-Isotypen

1.3 Erzeugung des Antikörperrepertoires

1.3.1 Antikörpervielfalt durch somatische Rekombination

Ein Organismus ist theoretisch in der Lage, gegen jedes nur erdenkliche Antigen einen Antikörper mit passender Spezifität zu generieren. Das Antikörperrepertoire eines Menschen besteht aus mindestens 10^{11} verschiedenen Antikörperspezifitäten. Allerdings wird es dadurch eingeschränkt, dass die Gesamtzahl der Lymphozyten, die sich zu einem beliebigen Zeitpunkt im Blut und den lymphatischen Organen befinden, nur bei ca. 10^9 Zellen liegt. Würde jeder dieser unterschiedlichen Antikörper durch ein eigenes Gen codiert, wie es ursprünglich die so genannte Keimbahntheorie postulierte, dann wäre allein durch die Anzahl der Immunglobulin-gene die Gesamtgröße des humanen Genoms gesprengt.

Antikörpergene werden stattdessen durch den Prozess der somatischen Rekombination aus einer Vielzahl einzelner Gensegmente zusammengesetzt. Der Teil des Antikörpergens, der für die variable Region einer leichten Kette codiert, wird aus einem V-Gensegment und einem J-Gensegment gebildet. Dabei stehen zahlreiche verschiedene V- und J-Segmente zur Verfügung, die beliebig miteinander kombiniert werden können.

Die variable Region einer schweren Kette wird aus drei unterschiedlichen Gensegmenten zusammengesetzt. Neben den V- und J-Segmenten findet man hier noch zusätzliche D-Segmente, die die kombinatorische Vielfalt erhöhen.

Das Prinzip der somatischen Rekombination ermöglicht es dem menschlichen Organismus, mit einer überschaubaren Zahl einzelner Gensegmente ein riesiges Antikörperrepertoire zu bilden (Nossal, 2003).

1.3.2 Die Organisation der humanen Antikörpergencluster

1.3.2.1 Die Gencluster für die leichte Kette

Der Locus des humanen κ -Genclusters befindet sich auf Chromosom 2. Er besteht aus ca. 40 funktionellen V_{κ} -Segmenten, die durch ein großes Intron von den 5 J_{κ} -Segmenten getrennt sind. Kurz hinter dem letzten J-Segment befindet sich ein einzelnes C_{κ} -Gensegment (Abb. 1.2, A). Neben den funktionellen V-Segmenten gibt es auch zahlreiche Pseudogene. Außerdem ist bei ca. der Hälfte aller Menschen der V_{κ} -Gencluster dupliziert. Da die Antikörpermoleküle nach der Translation in die sekretorischen Stoffwechselwege der Zelle eingeschleust werden müssen, befindet sich vor jedem V-Gensegment ein Exon, das für ein kurzes Leader-Peptid codiert.

Der humane λ -Gencluster liegt auf Chromosom 22 und ist anders aufgebaut, als der κ -Gencluster. Auf eine Gruppe von ca. 30 funktionellen V_{λ} -Gensegmenten folgen 4 J_{λ} -Segmente, wobei jedes J-Segment mit einem eigenen C_{λ} -Segment verbunden ist (Abb. 1.2, B).

1.3.2.2 Der Gencluster für die schwere Kette

Der Gencluster für die schwere Antikörperkette erstreckt sich beim Menschen über insgesamt zwei Megabasen auf Chromosom 14 und ähnelt dem Locus für die leichte κ -Kette. Auf ca. 65 funktionelle V_H -Gensegmente folgen 27 D_H - und 6 J_H -Segmente, die nahezu beliebig miteinander kombiniert werden können (Abb. 1.2, C).

Die Gensegmente für die konstante Region einer schweren Kette bilden einen ca. 200 kb großen Gencluster auf der 3'-Seite der J_H -Gensegmente (Abb. 1.2, D). Jedes C_H -Gensegment besteht wiederum aus mehreren Exons, wobei jedes Exon eine eigene Proteindomäne codiert. Das C_{γ} -Segment besteht beispielsweise aus vier Exons, wobei drei davon für die unterschiedlichen C_H -Domänen codieren. Ein Exon codiert für die Hinge-Region.

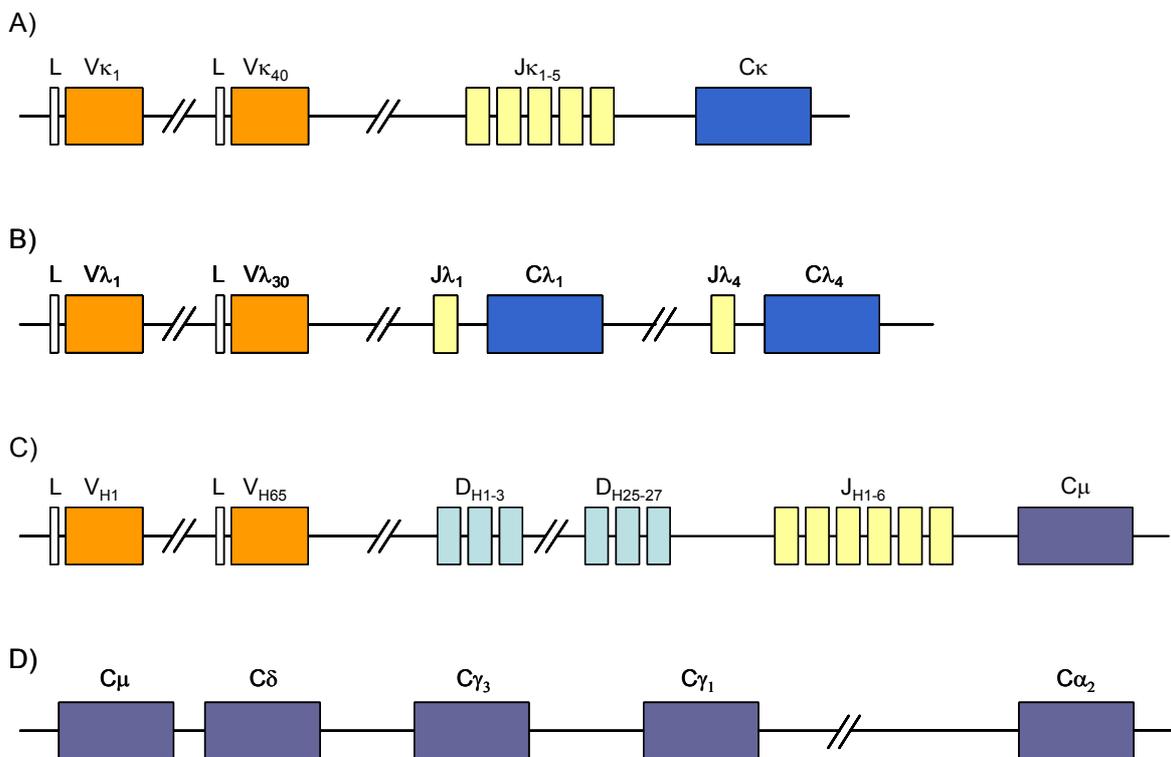


Abb. 1.2 Organisation der humanen Antikörpergencluster

A) Aufbau des κ -Genclusters (Chromosom 2)

B) Aufbau des λ -Genclusters (Chromosom 22)

C) Aufbau des Genclusters für die schwere Kette (Chromosom 14)

D) Organisation der Gensegmente für die konstante Region der schweren Kette (Chromosom 14)

1.3.3 Der Mechanismus der somatischen V(D)J-Rekombination

Den Mechanismus, durch den die verschiedenen Gensegmente zu kompletten Antikörpergenen zusammengesetzt werden, bezeichnet man als Immunglobulin-Rearrangement oder somatische V(D)J-Rekombination. Sie findet ausschließlich in B-Lymphozyten und dort nur zu bestimmten Zeitpunkten während der Zellentwicklung statt und unterliegt strengen Regeln.

Bei der Bildung einer leichten Kette wird auf Keimbahnebene ein beliebiges V-Segment mit einem beliebigen J-Segment verknüpft. Die Gensegmente, die sich zwischen den beiden miteinander kombinierten Segmenten befinden, werden in der Regel deletiert. Anschließend wird die DNA in die primäre RNA transkribiert. Durch die RNA-Prozessierung (Splicen) werden sowohl die Introns, als auch die überzähligen J-Segmente entfernt, bevor das Protein translatiert wird (Abbildung 1.3 und 1.4).

Theoretisch kann jedes V-Segment mit jedem J-Segment kombiniert werden. Für eine κ -Kette mit 40 funktionellen V_{κ} - und fünf J_{κ} -Segmenten ergeben sich daher 200 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, für eine λ -Kette immerhin noch 120. Insgesamt ließen sich also durch die somatische Rekombination 320 verschiedene leichte Ketten erzeugen.

Bei der Rekombination der schweren Kette erfolgt zuerst die Verknüpfung eines D_H - und eines J_H -Gensegments. Anschließend wird das DJ-Segment auf Keimbahnebene mit einem der V_H -Gensegmente kombiniert. Durch die Einbeziehung der D_H -Segmente werden die Kombinationsmöglichkeiten im Vergleich zur leichten Kette deutlich erhöht, so dass letztendlich durch die V(D)J-Rekombination ca. 11000 verschiedene VH -Regionen gebildet werden können. Die kombinatorische Vielfalt wird allerdings dadurch eingeschränkt, dass nicht alle V-Gensegmente mit der gleichen Wahrscheinlichkeit rekombiniert werden. Es wurde beobachtet, dass bestimmte Gensegmente bevorzugt werden, andere dagegen nur selten an Umlagerungen beteiligt sind.

Bei der V(D)J-Rekombination spielen die Enzyme RAG-1 und RAG-2 (*Recombination Activating Gene*) eine entscheidende Rolle. Sie werden ausschließlich in B- und T-Lymphozyten exprimiert. Die Bereiche der DNA, in denen Rekombinationen erfolgen können, sind durch spezielle konservierte DNA-Sequenzen, die Rekombinationssignalsequenzen (RSS), „markiert“. Die RSS besteht aus einem Block von sieben Nukleotiden, dem Heptamer, gefolgt von einem Block aus neun Nukleotiden, dem Nonamer. Heptamer und Nonamer sind durch einen Spacer aus zwölf oder 23 Basen getrennt, wobei die Sequenz des Spacers beliebig, die Länge aber konserviert ist. Auf diese Weise liegen Heptamer und Nonamer immer auf derselben Seite der DNA. Die V(D)J-Rekombination erfolgt nach der 12/23-Regel, d.h. ein Gensegment, das von einer RSS mit einem 12bp-Spacer flankiert wird kann nur mit einem Gensegment verknüpft werden, das durch eine RSS mit einem 23bp-Spacer markiert wird. Dadurch wird ausgeschlossen, dass beim Rearrangement einer schweren Antikörperkette ein V_H -Segment direkt mit einem J_H -Segment verknüpft wird.

Neben RAG-1 und RAG-2, die an die RSS binden und den DNA-Doppelstrang aufspalten, spielen bei der V(D)J-Rekombination auch noch mehrere Enzyme des DNA-Reparaturmechanismus eine wichtige Rolle, z.B. die DNA-Ligase IV, die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) und das mit der DNA-PK assoziierte Protein *Ku* (Bassig et. al., 2002).

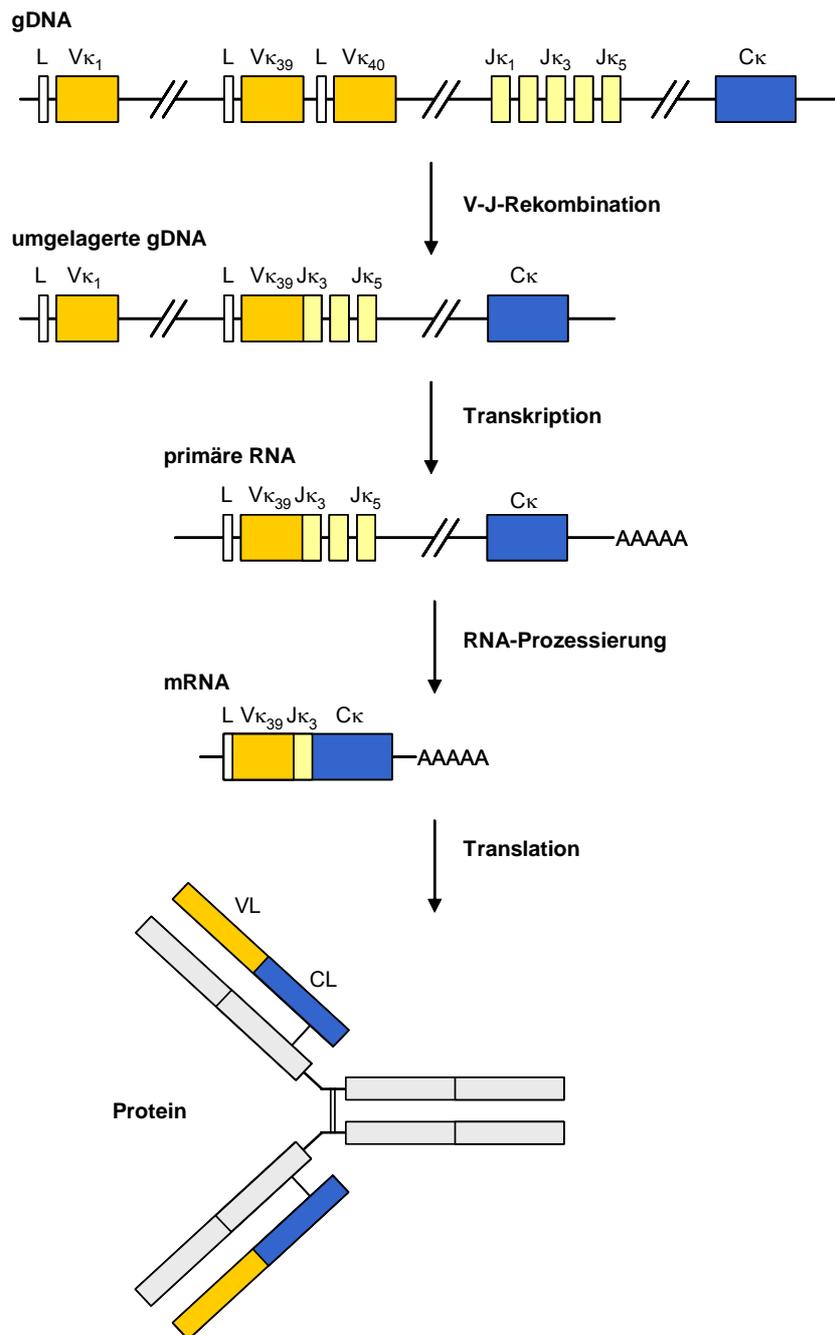


Abb. 1.3 Somatische VJ-Rekombination einer leichten Kette vom κ -Isotyp

Die genomische DNA wird zunächst auf Keimbahnebene umgelagert. Dabei wird ein V-Gensegment mit einem J-Gensegment verknüpft. Die dazwischen liegenden DNA-Bereiche werden deletiert. Durch die Transkription der umgelagerten gDNA entsteht ein primäres RNA-Transkript, bei dem im Rahmen der RNA-Prozessierung die Introns und die nicht an der Umlagerung beteiligten J-Segmente entfernt werden. Die mRNA wird dann im Zytoplasma der Zelle zum Protein translatiert. Da die funktionelle Faltung der Antikörper im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt, befindet sich vor jedem V-Segment eine Signalsequenz (L). Sie sorgt für den Transport des Proteins vom Zytoplasma ins ER.

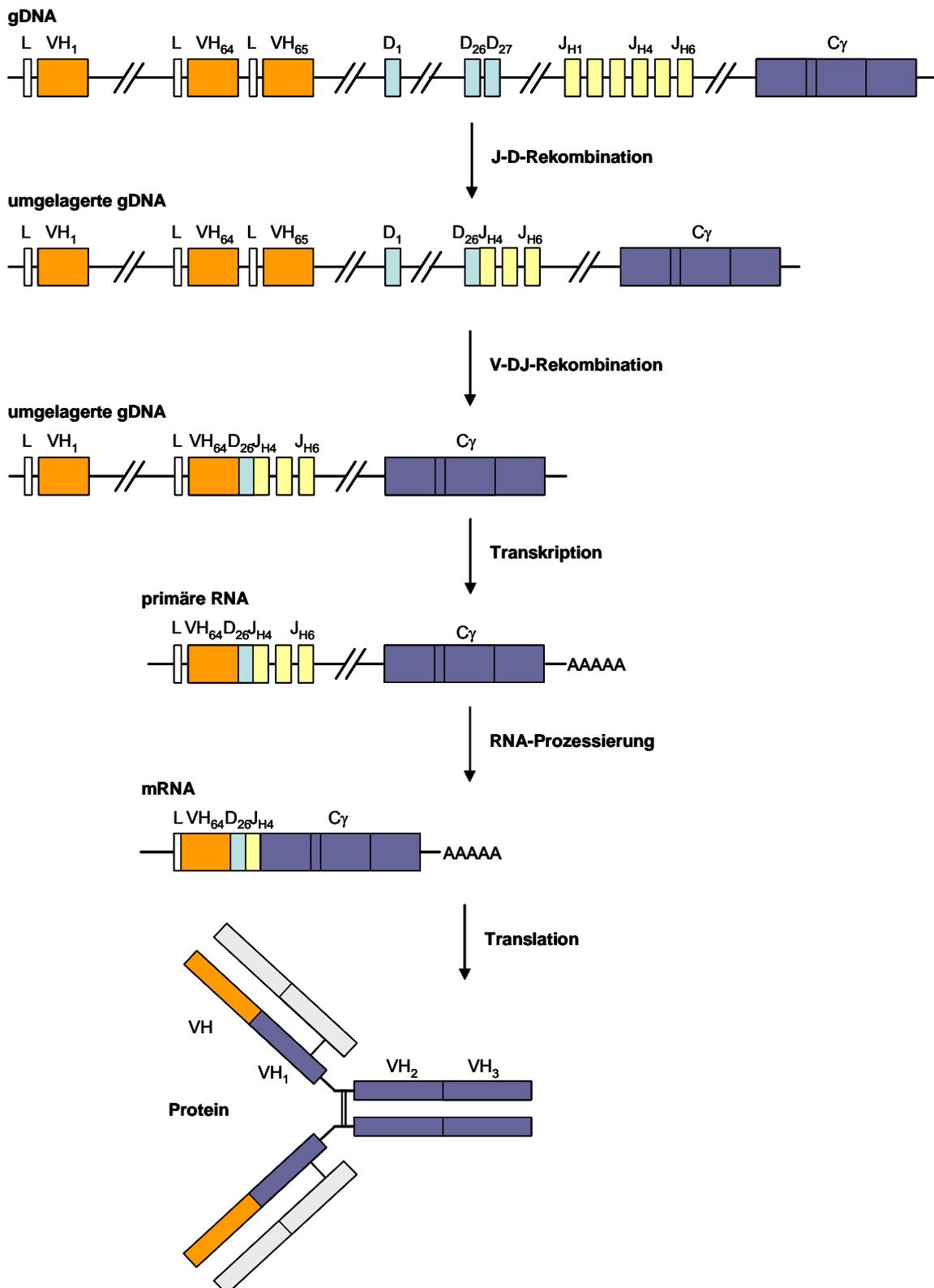


Abb. 1.4 Somatische VDJ-Rekombination einer schweren Kette

Die Rekombination des Genclusters der schweren Kette erfolgt analog zu der des κ -Genclusters. Allerdings findet bei der schweren Kette zunächst die Verknüpfung eines D-Gensegments mit einem J-Gensegment statt. Das DJ-Segment wird dann mit einem V-Gensegment kombiniert.

1.3.4 Weitere Mechanismen zur Erzeugung der Antikörpervielfalt

Neben der somatischen V(D)J-Rekombination existieren noch weitere Mechanismen, um die Antikörpervielfalt zu erhöhen (Tabelle 1.2).

So könnte theoretisch jede der 320 leichten Ketten mit jeder der 11000 schweren Ketten kombiniert werden. Auf diese Weise ließen sich bereits ca. $3,5 \times 10^6$ verschiedene Antikörper generieren. Allerdings gibt es auch hier Einschränkungen, denn nicht jede Kombination zwischen leichter und schwerer Kette führt zu einem stabilen Molekül.

Ein weiterer Mechanismus zur Erzeugung der Antikörpervielfalt ist die Einführung von P- oder N-Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen der umgelagerten Gensegmente (junktionale Vielfalt). Nachdem der DNA-Doppelstrang zu Beginn der V(D)J-Rekombination durch die RAG-Proteine geschnitten wurde, bilden sich an den Schnittstellen Haarnadelstrukturen aus. Diese Haarnadelstrukturen werden im Rahmen der DNA-Reparatur an beliebigen Stellen wieder aufgespalten, wodurch palindromartige P-Nukleotide erzeugt werden. Neben den P-Nukleotiden werden durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) nach dem Zufallsprinzip N-Nukleotide an die einzelsträngigen DNA-Enden angefügt. Durch das V(D)J-Rearrangement und die Einführung von P- und N-Nukleotiden erklärt sich die hohe Sequenzvariabilität im Bereich der CDR3-Region eines Antikörpers.

Im Rahmen einer sekundären Immunantwort tragen noch zwei weitere Mechanismen zur Erhöhung der Antikörpervielfalt und der Affinität gegenüber dem Antigen bei: bei der so genannten Genkonversion werden Teile der bereits rekombinierten V-Gensegmente durch Sequenzen von V-Pseudogenen (ψV) ersetzt. Dadurch ändern sich natürlich auch die Bindungseigenschaften des entsprechenden Antikörpers. Der Prozess der Affinitätsreifung trägt zu einer gesteigerten Antikörperaffinität gegenüber dem Antigen bei. Durch eine stark erhöhte Mutationsrate im Bereich der variablen Regionen (somatische Hypermutation) entstehen Antikörper mit einer deutlich verbesserten Affinität (Papavasiliou et. al., 2002).

Mechanismus	Funktionsprinzip
somatische V(D)J-Rekombination	Antikörpergene werden durch beliebige Kombination von V-, D- und J-Gensegmenten zusammengesetzt.
P-Nukleotid-Addition	Die während der V(D)J-Rekombination intermediär gebildeten Haarnadelstrukturen der DNA werden beliebig aufgespalten, wodurch palindromische P-Nukleotide in die CDR3-Region eingeführt werden.
N-Nukleotid-Addition	Durch die Terminale Desoxynukleotidyltransferase werden nach dem Zufallsprinzip N-Nukleotide in die CDR3-Region eingeführt.
Kombination von leichter und schwerer Kette	Durch eine nahezu beliebige Kombination von leichten und schweren Ketten wird die Antikörpervielfalt erhöht.
Genkonversion	Teile der rekombinierten V-Gensegmente werden durch ψV -Pseudogensequenzen ersetzt.
Affinitätsreifung	Durch eine erhöhte Mutationsrate im Bereich der V-Region wird die Antikörperaffinität gesteigert.

Tabelle 1.2 Mechanismen zur Erzeugung des Antikörperrepertoires

1.4 Monoklonale Antikörper, rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente

1.4.1 Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern

Der große Nutzen von Antikörpern als Diagnostika wurde bereits sehr früh erkannt. So wurde beispielsweise schon Ende der fünfziger Jahre eine Methode entwickelt, um den humanen Plasmainsulinspiegel mit Hilfe eines antikörperhaltigen Tiereserums zu bestimmen (Yalow et al., 1959). Allerdings basierten die frühen immunologischen Tests noch auf der Verwendung von polyklonalen Antikörpern.

1975 veröffentlichten Georges Köhler und César Milstein eine Methode, mit deren Hilfe es möglich ist, einen ganz bestimmten Antikörper in nahezu beliebiger Menge zu produzieren. Durch die Fusion einer antikörperproduzierenden B-Zelle mit einer immortalen Myelomzelle entsteht eine so genannte Hybridomzelle, die dauerhaft monoklonale Antikörper sezerniert (Köhler et al., 1975). 1984 wurden Köhler und Milstein für ihre bahnbrechende Entdeckung mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt.

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen wird einer Maus mehrmals das entsprechende Immunogen injiziert, wodurch das Immunsystem des Tieres zur Antikörperproduktion stimuliert wird. Aus der Milz des sezernierten Tieres werden die B-Lymphozyten selektiv aufgereinigt und mit den Myelomzellen fusioniert. Da die Fusion nicht immer erfolgreich verläuft, muss eine Selektion auf antikörperproduzierende Hybridomzellen erfolgen. Dazu werden die Zellen in einem speziellen Medium kultiviert, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium).

Unter dem Einfluss von Aminopterin ist eine De-novo-Biosynthese von Nukleotiden nicht möglich, da der Wirkstoff die Purin- und Pyrimidin-Biosynthese hemmt. Normale B-Lymphozyten sind in der Lage im HAT-Medium zu wachsen, da sie aus Hypoxanthin und Thymidin die entsprechenden Nukleotide über alternative Stoffwechselwege produzieren können. Die zur Produktion von monoklonalen Antikörpern eingesetzten Myelomzellen können aufgrund eines genetischen Defekts den Aminopterin-Block allerdings nicht umgehen. Sie sterben im HAT-Medium ab, sofern keine Fusion mit einer B-Zelle stattgefunden hat. Nicht fusionierte B-Lymphozyten überleben zwar die HAT-Selektion, haben aber von Natur aus nur eine begrenzte Lebensdauer. Somit können nur die aus der Fusion einer B-Zelle mit einer Myelomzelle entstandenen Hybridomzellen im HAT-Medium kultiviert werden (Dingermann, 1999).

In einem weiteren Selektionsverfahren müssen nun diejenigen Klone ermittelt werden, die den Antikörper mit der gewünschten Spezifität sezernieren. Anschließend werden die positiv getesteten Hybridomklone vereinzelt. Man hat nun einen Zellklon, der einen monoklonalen Antikörper mit einer klar definierten Spezifität sezerniert.

Monoklonale Antikörper sind inzwischen aus der Analytik und der medizinischen Diagnostik nicht mehr wegzudenken. Im Laboralltag finden monoklonale Antikörper unter anderem im Enzymimmunoassay (ELISA), im Radioimmunoassay (RIA), bei der Immunelektrophorese, bei der immunologischen Detektion eines Western Blots, oder bei unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Techniken (z.B. FACS) Verwendung.

Das wohl bekannteste Beispiel für den Einsatz von monoklonalen Antikörpern als Diagnostika sind die apothekenüblichen Schwangerschaftstests, bei denen ein erhöhter Urinspiegel des humanen choriongonadotropen Hormons (HCG) mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert wird (Pindur et al., 1991).

Für den therapeutischen Einsatz sind murine monoklonale Antikörper nur bedingt geeignet, da sie im menschlichen Organismus selbst eine Immunreaktion unter Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) hervorrufen. Dadurch können murine Antikörper in der Regel nur ein einziges Mal am Menschen appliziert werden. Theoretisch ist es zwar möglich, humane monoklonale Antikörper zu erzeugen, z.B. durch die Immortalisierung von humanen B-Lymphozyten mit dem Epstein-Barr-Virus oder durch die Erzeugung transgener Mäuse. Bisher existieren aber keine effektiven Methoden, um den Bedarf an therapeutisch relevanten humanen Antikörpern dauerhaft zu decken. Auch die Etablierung einer humanen Myelomzelllinie zur Generierung humaner Hybridomzellen brachte bisher nicht den gewünschten Erfolg (Karpas et al., 2001).

1.4.2 Chimäre und humanisierte Antikörper

Mit Hilfe gentechnischer Methoden ist es möglich, auf DNA-Ebene große Teile eines murinen Antikörpers durch die entsprechenden humanen Sequenzen zu ersetzen und dadurch die Immunogenität des Moleküls wesentlich zu reduzieren.

Bei einem chimären Antikörper wird die murine konstante Region durch die äquivalenten humanen Antikörperdomänen ersetzt (Boulianne et al., 1984). Dadurch wird die Immunogenität bereits deutlich reduziert, ohne dass die Bindungseigenschaften des Moleküls beeinflusst werden.

Bei der Humanisierung eines Antikörpers werden neben der konstanten Region auch die FR-Domänen der variablen Region gegen humane Sequenzen ausgetauscht, so dass letztendlich nur noch die CDR-Domänen murinen Ursprungs sind (Jones et al., 1986). Der Anteil der murinen Sequenz in einem humanisierten Antikörper beträgt weniger als 10 %.

1.4.3 Antikörperfragmente

1.4.3.1 Proteolytische Spaltung von Immunglobulinen

Durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme kann ein IgG-Antikörper in unterschiedliche Fragmente gespalten werden.

Die Thiolprotease Papain spaltet die schwere Antikörperkette am N-terminalen Ende der Hinge-Region, wodurch das Immunglobulinmolekül in drei Teile zerfällt: ein Fc-Fragment und zwei Fab-Fragmente (Abb. 1.5).

Das Fc-Fragment ist ein Homodimer aus den zwei schweren Teilketten, die über zwei Disulfidbrücken im Bereich der Hinge-Region miteinander verbunden sind. Es besteht ausschließlich aus konstanten Domänen. Der Name Fc-Fragment leitet sich aus der leichten Kristallisierbarkeit des Proteins ab (*fragment crystallizable*). (Goldstein et al., 1968).

Ein Fab-Fragment (*fragment antigen binding*) besteht aus der CH₁- und der VH-Domäne der schweren Kette sowie der vollständigen leichten Kette. Die beiden Ketten sind über eine Disulfidbrücke zwischen CH₁ und CL miteinander verbunden. Ein Fab-Fragment enthält die vollständige antigenbindende Region des ursprünglichen Antikörpers. Es besitzt in der Regel die gleiche Affinität gegenüber dem Antigen, unterscheidet sich aber in der Avidität.

Durch die Carboxypeptidase Pepsin wird das Antikörpermolekül ebenfalls im Bereich der Hinge-Region, in diesem Fall allerdings auf der C-terminalen Seite der Disulfidbindungen gespalten. Dadurch entsteht ein F(ab')₂-Fragment, bei dem die beiden antigenbindenden Arme weiterhin miteinander verbunden sind. Der Fc-Teil des Antikörpers wird proteolytisch in mehrere kleine Stücke gespalten. Ein F(ab')₂-Fragment besitzt die gleichen Bindungseigenschaften wie der ursprüngliche Antikörper. Allerdings sind weder das Fab- noch das F(ab')₂-Fragment in der Lage, die unterschiedlichen Effektorfunktionen zu vermitteln, da dafür der Fc-Teil des Antikörpers verantwortlich ist. Sowohl Fab- als auch F(ab')₂-Fragmente spielen inzwischen vor allem als *in-vivo*-Diagnostika, z.T. aber auch als Therapeutika eine wichtige Rolle.

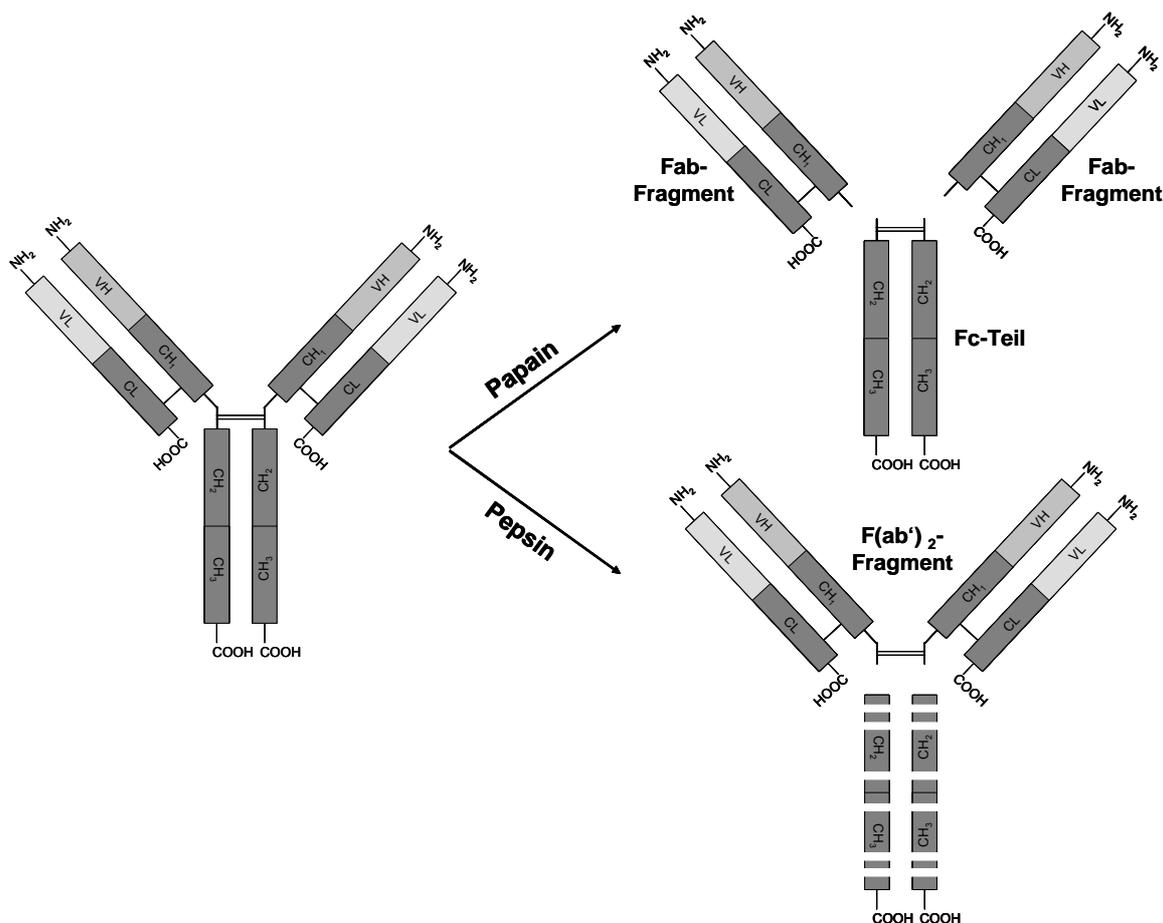


Abb. 1.5 Enzymatische Spaltung eines IgG-Antikörpers

Die Thiolprotease Papain spaltet das IgG-Molekül in zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment (oben). Durch die Carboxypeptidase Pepsin entsteht ein F(ab')₂-Fragment. Der Fc-Teil wird in mehrere kleine Proteinfragmente zerlegt (unten).

1.4.3.2 Rekombinante Antikörperfragmente

Fab-Fragmente können auch mit Hilfe gentechnischer Methoden hergestellt werden. Dabei werden die DNA-Sequenzen, die für die leichte Antikörperkette und das VH-CH₁-Fragment codieren, in einen speziellen Expressionsvektor kloniert. Die Antikörperfragmente können dann beispielsweise in *Escherichia coli*, in Hefe oder in transgenen Pflanzen exprimiert werden.

Neben den Fab-Fragmenten spielen auch die so genannten Fv-Fragmente eine wichtige Rolle. Fv-Fragmente sind die kleinsten funktionsfähigen, antigenbindenden Moleküle. Sie bestehen nur noch aus den variablen Domänen der leichten und der schweren Kette. Da die beiden variablen Domänen nicht kovalent miteinander verbunden sind, besitzen Fv-Fragmente nur eine sehr geringe thermodynamische Stabilität. Es ist daher vorteilhaft, die beiden variablen Domänen über eine artifizielle Disulfidbrücke (dsFv) oder ein Linkerpeptid (scFv) miteinander zu verbinden. Bei der Klonierung von scFv-Fragmenten werden VH und VL durch einen Polypeptidlinker miteinander verknüpft, wobei der Linker die Funktionalität des Antikörperfragments nicht negativ beeinflussen darf. In der Regel verwendet man ein aus 15 bis 25 Glycin- und Serin-Molekülen aufgebautes Polypeptid der allgemeinen Form (Gly₃Ser)_n mit n = 3 - 5. Die exakte Länge des Linkers richtet sich nach der Orientierung der variablen Domänen (VL-VH oder VH-VL). ScFv-Fragmente, deren Linker kürzer als 15 Aminosäuren ist, neigen dazu, Dimere oder Trimere zu bilden. Dabei interagiert die VL-Domäne des einen scFv-Fragments mit der VH-Domäne eines zweiten scFv-Fragments. Die resultierenden „Diabodies“ oder „Triabodies“ können aufgrund ihrer höheren Avidität für bestimmte Fragestellungen von Vorteil sein. Abbildung 1.6 stellt die unterschiedlichen Antikörperfragmente vor.

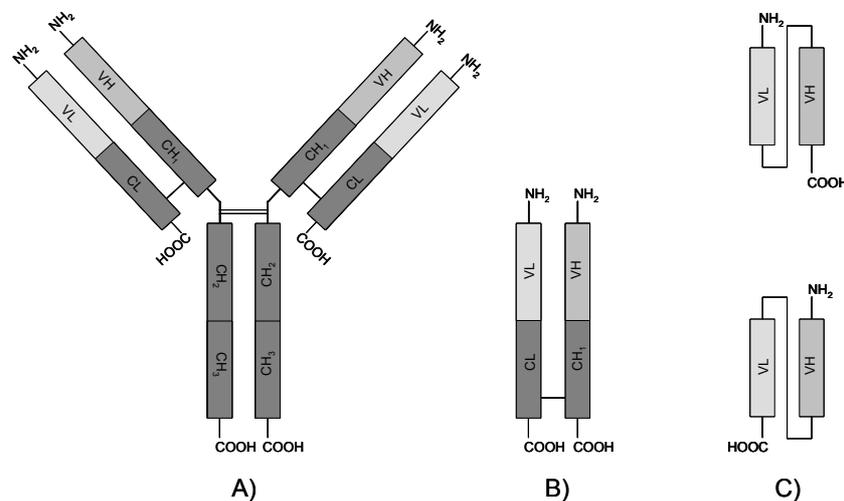


Abb. 1.6 Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpermoleküls und unterschiedlicher rekombinanter Antikörperfragmente

A) Ein IgG-Antikörper ist ein Heterodimer aus zwei leichten und zwei schweren Ketten.

B) Das Fab-Fragment besteht aus den beiden variablen Domänen und je einer konstanten Domäne von leichter und schwerer Kette. Die beiden Proteinketten sind über eine kovalente Disulfidbrücke zwischen CL und CH₁ miteinander verbunden.

C) Ein scFv-Fragment besteht nur noch aus den beiden variablen Domänen VL und VH, die über einen artifiziellen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind. Dabei sind zwei Orientierungen möglich.

1.5 Heterologe Expression von Antikörperfragmenten in *E. coli*

1.5.1 Bakterielle Expression von löslichen scFv- und Fab-Fragmenten

Rekombinante Antikörperfragmente können relativ einfach und kostengünstig in dem Bakterium *Escherichia coli* hergestellt werden (Skerra et al., 1988, Better et al., 1988, Bird et al., 1988, Huston et al., 1988, Plückthun et al., 1989). Die bakterielle Expression von kompletten Antikörpermolekülen ist zwar möglich (Lo et al., 1992), aber nur wenig sinnvoll. Die Effektorfunktionen eines Antikörpermoleküls können nämlich nur dann vermittelt werden, wenn der Fc-Teil des Proteins glykosyliert ist. Dazu ist *E. coli* aber nicht in der Lage.

Ein kritischer Punkt bei der Expression von scFv- und Fab-Fragmenten ist die funktionelle Faltung des Proteins. Innerhalb der variablen Domänen von leichter und schwerer Kette muss sich nämlich jeweils eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cystein-Molekülen der FR1- und der FR4-Domäne ausbilden. Bei Fab-Fragmenten muss zusätzlich noch die Disulfidbrücke zwischen CH₁ und CL gebildet werden. Im reduzierenden Milieu des bakteriellen Cytoplasmas ist dies nicht möglich. Cytoplasmatisch exprimierte Antikörperfragmente müssen daher aus „inclusion bodies“ *in vitro* renaturiert werden. In der Regel ist eine Renaturierung aber äußerst schwierig, zeitaufwendig und wenig effektiv.

Die cytoplasmatische Expression von funktionell gefalteten Antikörperfragmenten ist ausschließlich in Bakterienstämmen möglich, denen das Enzym Thioredoxin-Synthase fehlt (*trxB*-Stämme, z.B. BL21(DE)). Die Thioredoxin-Synthase verschiebt das Redoxgleichgewicht zwischen reduziertem (-SH) und oxidiertem (-SS-) Cystein auf die Seite der reduzierten Form. In Abwesenheit der Thioredoxin-Synthase können sich auch im Cytoplasma die notwendigen Disulfidbindungen innerhalb eines Antikörperfragments ausbilden (Whitlow et al., 1991, Plückthun et al., 1996).

Eine elegantere Methode der funktionellen Expression von scFv- und Fab-Fragmenten ist die Isolierung der Proteine aus dem bakteriellen Periplasma. Als periplasmatischer Raum wird bei gram-negativen Bakterien der Bereich zwischen der inneren und der äußeren Zellmembran bezeichnet. Im Gegensatz zum Cytoplasma existiert im Periplasma ein Enzymsystem (DsbA, DsbB, DsbC und DsbD), das die Bildung von Disulfidbindungen katalysiert (Collet et al., 2002a, Collet et al., 2002b, Kadokura et al., 2003). Inzwischen konnten im Periplasma auch Chaperone identifiziert werden, die die korrekte Faltung der Antikörperfragmente unterstützen (z.B. Skp/OmpH/HlpA (Bothmann et al., 1998)). Damit Antikörperfragmente vom Cytoplasma in den periplasmatischen Raum transportiert werden, müssen die Proteine mit einem speziellen Signalpeptid fusioniert werden (z.B. *pelB* oder *ompA*). Das Signalpeptid sorgt für den Transport durch die innere Zellmembran und wird dabei abgespalten. Aus dem Periplasma können die funktionell gefalteten Antikörperfragmente z.B. durch einen osmotischen Schock isoliert werden.

Neben der funktionellen Faltung bietet die periplasmatische Expression noch weitere Vorteile: in periplasmatischen Extrakten sind deutlich weniger Proteine enthalten, als in Zellysaten, so dass eine aufwendige Aufreinigung der Antikörperfragmente in der Regel nicht erforderlich ist. Außerdem existieren im Periplasma weniger Proteasen als im Cytoplasma, was die Gefahr einer Proteindegradierung deutlich verringert. Abbildung 1.7 zeigt die periplasmatische Expression von scFv-Fragmenten.

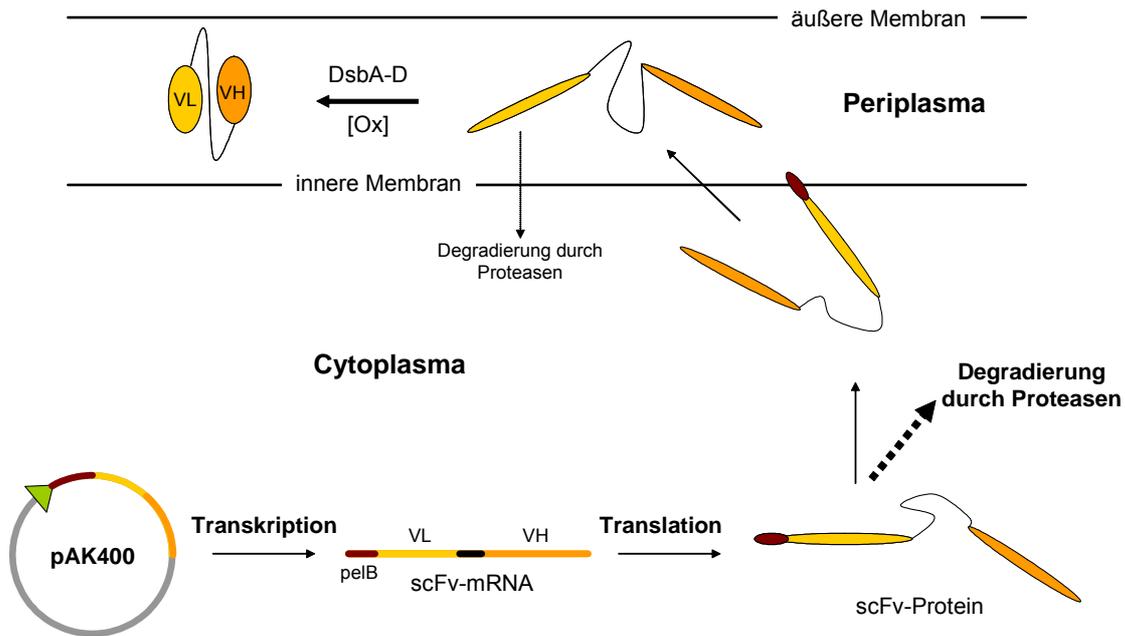


Abb. 1.7 Periplasmatische Expression von scFv-Antikörperfragmenten

Die Transkription und die Translation der scFv-Fragmente erfolgen im Cytoplasma der Bakterienzelle. Durch eine spezielle Signalsequenz (pelB) werden die Antikörperfragmente in das Periplasma transportiert, wo die funktionelle Faltung erfolgt.

1.5.2 Phagen-Display von Antikörperfragmenten

Bei der von George P. Smith entwickelten Methode des Phagen-Displays werden Polypeptide oder Proteine auf der Oberfläche von filamentösen Phagen exprimiert (Smith, 1985). Filamentöse Phagen (z.B. M13, f1 oder fd) bestehen im Wesentlichen aus fünf verschiedenen Proteinen. Am proximalen Ende des Phagen befinden sich drei bis fünf Kopien des Oberflächenproteins gpIII, mit dessen Hilfe der Phage Bakterienzellen über deren F-Pilus infiziert. Beim Phagen-Display wird die DNA, die z.B. für ein Antikörperfragment codiert, in-frame vor das gpIII-Gen kloniert. Bei der Proteinbiosynthese entsteht daraus ein Fusionsprotein, das auf der Virusoberfläche exprimiert wird, ohne dass der Phage seine Infektiosität verliert (McCafferty et al., 1990).

Mit Hilfe der Phagen-Display-Technik können große Antikörperbibliotheken generiert werden, wobei jeder Phage ein anderes Antikörperfragment auf der Oberfläche exprimiert. Mit einem als „Phagen-Panning“ bezeichneten Verfahren kann aus einer solchen Bibliothek ein bestimmtes Antikörperfragment isoliert werden. Dazu wird das entsprechende Antigen an eine Matrix gebunden und mit der Phagen-Suspension inkubiert. Die Phagen, die ein passendes Antikörperfragment präsentieren, interagieren mit dem fixierten Antigen, während die übrigen Phagen durch einen Waschschrift entfernt werden. Die gebundenen Phagen können anschließend eluiert werden. Mit der Elutionslösung werden *E. coli*-Zellen infiziert, in denen sich die selektierten Phagen vermehren können.

Durch mehrere aufeinander folgende Panning-Runden lassen sich so aus der Phagen-Bibliothek einzelne hoch affine Antikörperfragmente isolieren. Die Komplexität dieser Bibliotheken hat sich in den letzten Jahren immer weiter gesteigert. Die größten Bibliotheken bestehen inzwischen aus bis zu 3×10^{11} verschiedenen Phagen, wobei jeder dieser Phagen ein anderes Antikörperfragment präsentiert (Sblattero et al., 2000). Im Prinzip wird durch das Phagen-Display und das Phagen-Panning das natürliche Immunsystem imitiert. Der Phage präsentiert an seinem proximalen Ende ein bestimmtes Antikörperfragment, ähnlich, wie ein B-Lymphozyt einen ganz bestimmten Antikörper als B-Zell-Rezeptor auf seiner Oberfläche exprimiert. Die DNA, die für dieses Antikörperfragment codiert, ist im Phagen-Genom integriert. Bei einer Immunantwort werden genau die B-Lymphozyten selektiert und aktiviert, die einen Antikörper gegen das entsprechende Antigen präsentieren. In Analogie hierzu werden auch beim Phagen-Panning genau die Phagen aus der Phagen-Bibliothek isoliert, deren Antikörperfragment mit dem Antigen interagiert. Nach der Aktivierung eines B-Lymphozyten erfolgt der Klassenwechsel. Anstelle der membranständigen IgM-Moleküle werden letztendlich lösliche IgG-Antikörper sezerniert. Auch dieser Prozess kann beim Phagen-Display durch die Wahl des geeigneten Plasmids und des Bakterienstamms imitiert werden. Manche Bakterienstämme sind nämlich dazu in der Lage, ein Stopp-Codon, das sich zwischen dem Antikörperfragment-Gen und dem Gen für das Oberflächenprotein gpIII befindet, zu überlesen (z.B. TG1 oder XL1-Blue). In solchen Bakterienstämmen werden Antikörperfragment-gpIII-Fusionsproteine exprimiert. In anderen Bakterienstämmen (z.B. JM109) bricht die Translation im Bereich des Stopp-Codons ab und es erfolgt die Expression von löslichen Antikörperfragmenten.

Inzwischen existieren auch humane Antikörperbibliotheken im Phagen-Display-Format. Die entsprechende DNA kann zum Beispiel aus peripheren Lymphozyten isoliert werden. Aus einer solchen Bibliothek mit mehr als 10^{11} verschiedenen Phagen konnte unter anderem ein Antikörper gegen den Tumornekrosefaktor- α isoliert werden, der 2003 unter dem Handelsnamen HUMIRA[®] (Adalimumab) die Zulassung in Deutschland für die Therapie der rheumatoiden Arthritis erhielt (Zündorf et al., 2003).

Ein völlig anderes Konzept bei der Generierung einer humanen Phagen-Display-Bibliothek verfolgte die Münchner Firma MorphoSys. In Zusammenarbeit mit der Universität Zürich wurde eine vollsynthetische, kombinatorische Antikörperbibliothek (HuCAL[®]) aus modular aufgebauten Konsensus-Frameworkregionen und randomisierten CDR-Regionen generiert (Knappik et al., 2000). Diese Phagen-Display-Bibliothek enthält ca. 2×10^9 individuelle Antikörperfragmente, von denen sich inzwischen einige in der präklinischen und klinischen Forschung befinden.

1.6 Antikörper als *In-vivo*-Diagnostika und Therapeutika

Antikörper sind wegen ihrer großen Selektivität schon seit Jahrzehnten als unerlässliche Hilfsmittel in der Grundlagenforschung und der Laboratoriumsdiagnostik etabliert. Seit einigen Jahren spielen monoklonale und rekombinante Antikörper aber auch in der *In-vivo*-Diagnostik und als Therapeutika eine immer größere Rolle (Dingermann et al., 2000, van Dijk et al., 2001, Borrebaeck et al., 2001, Dingermann et al., 2002). Antikörper sind in der Lage, spezifisch an ihre Zielstrukturen (z.B. überexprimierte Proteine auf Tumorzellen) zu binden und diese dadurch zu blockieren oder zu markieren. Darüber hinaus können Sie das Immunsystem mittels ihres Fc-Teils aktivieren, so dass es zu einer Zerstörung der markierten Zellen kommt. Außerdem eignen sich Antikörper für das „*Drug-Targeting*“, bei dem ein Arzneistoff ganz gezielt an den Wirkort transportiert werden soll.

Die Anwendungsmöglichkeiten für therapeutische Antikörper sind sehr breit. Allerdings haben sich inzwischen Krebs- und immunologische Erkrankungen als Hauptindikationen herauskristallisiert.

1986 - elf Jahre nach der Entwicklung der Hybridomatechnik durch Köhler und Milstein - erhielt der erste monoklonale Antikörper von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (FDA) die Zulassung als Therapeutikum. Muromonab-CD3 (Orthoclone[®] OKT3), ein muriner monoklonaler Antikörper, bindet an die ϵ -Kette des CD3-Proteins (T3-Antigen) auf der Oberfläche humaner T-Zellen und inhibiert dadurch die Effektorfunktionen der T-Lymphozyten sowie die T-Zellproliferation. Muromonab-CD3 ist als Immunsuppressivum zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach allogenen Organtransplantationen (Niere, Herz und Leber) zugelassen. Da es sich bei Muromonab-CD3 um ein rein murines Protein handelt, kommt es allerdings häufig zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern, die die Wirkung beeinträchtigen und zu Überempfindlichkeitsreaktionen führen können (humane anti-Maus-Antikörper, HAMA).

1994 wurde in Deutschland der erste Antikörper zur Krebstherapie zugelassen. Bei Edrecolomab (Panorex[®]) handelt es sich ebenfalls um einen murinen monoklonalen Antikörper. Er bindet an das Oberflächenglykoprotein 17-1A, das vor allem von Tumorzellen überexprimiert wird. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Antikörper-abhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) und der Komplement-abhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (CDCC), wodurch die Tumorzelle letztendlich zerstört wird. Trotz anfänglich guter Therapieerfolge ließ sich allerdings ein dauerhafter Therapievorteil von Edrecolomab im Vergleich zur herkömmlichen Chemotherapie nicht nachweisen, weshalb die Herstellerfirma im Jahr 2000 den Vertrieb einstellte.

Wie man am Beispiel von Muromonab-CD3 und Edrecolomab sehen kann, handelte es sich bei den ersten therapeutisch genutzten Antikörpern noch um komplette murine Proteine. Die neueren Präparate sind dagegen chimäre und humanisierte Antikörper, wodurch die Immunogenität der Proteine deutlich reduziert werden konnte. Mit Abciximab (ReoPro[®]) erhielt 1995 erstmals ein chimäres Fab-Fragment die Zulassung. Abciximab blockiert den Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa auf der Oberfläche von Thrombozyten und verhindert dadurch die Thrombozytenaggregation. Bei diesem Wirkprinzip sind die durch den Fc-Teil eines Antikörpers vermittelten Effektorfunktionen nicht erwünscht.

Eine interessante Strategie wurde bei Etanercept (Enbrel®) verfolgt. Es handelt sich hierbei um ein Fusionsprotein aus dem Fc-Teil eines Antikörpers und den extrazellulären Domänen zweier TNF- α -Rezeptoren (TNFR-II). Der Fc-Teil des Antikörpers dient hier nur zur Stabilisierung des Proteins, wohingegen die Wirkung über die TNF- α -Rezeptordomänen vermittelt wird. Da auch hier keine Effektorfunktionen erwünscht sind, wurde die CH₁-Domäne des Fc-Teils deletiert. Etanercept ist zur Therapie der rheumatoiden Arthritis indiziert.

Für die gleiche Indikation erhielt Ende 2003 erstmals auch ein kompletter humaner Antikörper die Zulassung. Der Anti-TNF- α -Antikörper Adalimumab (Humira®) wurde über die Phagen-Display-Technik aus einer humanen Antikörperbibliothek isoliert (vgl. 1.5.2).

Insgesamt waren im April 2004 in Deutschland 13 Antikörper als Therapeutika für die unterschiedlichsten Indikationen zugelassen (Tabelle 1.3).

Wirkstoff	Handelsname	Zulassung	Struktur	Target	Indikation
Abciximab	ReoPro	1995	chimäres Fab-Fragment	Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa	Antithrombotikum nach Myokardinfarkt
Adalimumab	Humira	2003	humaner mAK	TNF- α	rheumatoide Arthritis
Alemtuzumab	MabCampath	2001	humanisierter mAK	CD52	B-Zell-Leukämie (B-CLL)
Basiliximab	Simulect	1998	chimärer mAK	CD25 (IL-2-Rezeptor)	Immunsuppressivum bei Nierentransplantationen
Daclizumab	Zenapax	1999	humanisierter mAK	CD25 (IL-2-Rezeptor)	Immunsuppressivum bei Nierentransplantationen
Edrecolomab	Panorex	1994	muriner mAK	17-1A-Antigen	Kolonkarzinom
Etanercept	Enbrel	2000	Fusionsprotein aus humanem IgG1-Fc und TNFR-II	TNF- α	rheumatoide Arthritis
Ibritumomab-Tiuxetan	Zevalin	2004	muriner mAK, Konj. mit ⁹⁹ Y	CD20	Non-Hodgkin-Lymphom
Infliximab	Remicade	1999	chimärer mAK	TNF- α	Morbus Crohn
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	1986	muriner mAK	CD3 (T3-Antigen)	Immunsuppressivum bei Organtransplantationen
Palivizumab	Synagis	1999	humanisierter mAK	virales F-Protein	passive Immunisierung zum Schutz vor RSV-Infektionen
Rituximab	MabThera / Rituxan	1998	chimärer mAK	CD20	Non-Hodgkin-Lymphom
Trastuzumab	Herceptin	2000	humanisierter mAK	HER2 (c-erbB2)	metastasierendes Mammakarzinom

Tabelle 1.3 In Deutschland als Therapeutika zugelassene Antikörper
(Stand: April 2004, Quelle: Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V.)

Neben den in Tabelle 1.3 aufgeführten Antikörpern sind in Deutschland außerdem zahlreiche Antiseren zugelassen, z.B. als Antidote bei Intoxikationen.

Monoklonale und rekombinante Antikörper spielen nicht nur als Therapeutika, sondern auch in der *In-vivo*-Diagnostik eine große Rolle. Dabei werden die Proteine mit radioaktiven Isotopen, z.B. ^{99m}Tc markiert. In der Regel werden für diagnostische Zwecke allerdings keine kompletten Antikörpermoleküle, sondern Antikörperfragmente eingesetzt, da hier die Fc-vermittelten Effektorfunktionen nicht erwünscht sind. Außerdem können Antikörperfragmente aufgrund ihrer geringeren Molekülgröße besser in das Gewebe eindringen und werden anschließend schneller wieder eliminiert. Es ist aber auch möglich, die Eliminationshalbwertszeit zu verlängern, indem die Antikörperfragmente modifiziert werden (z.B. durch Pegylierung). Die Hauptanwendungsgebiete von diagnostischen Antikörpern sind die Darstellung von Tumoren und die Detektion von Entzündungsherden im Körper (Tabelle 1.4).

Wirkstoff	Handelsname	Zulassung	Struktur	Target	Indikation
Anti-melanoma-Mab-fragments	Tecnemab-K1	1996-2000	murine Fab- und F(ab') ₂ -Fragmente	Epitop auf Myelomzellen	Diagnostik von Melanom-Rezidiven
Arcitumomab	CeaScan	1996	murines Fab-Fragment	CEA (carcinoembryonales Antigen)	Darstellung metastasierender Karzinome
Igovomab	Indimacis	1996	murines F(ab') ₂ -Fragment	CA125-Antigen (oncofetales Protein)	Detektion von Rezidiven ovarieller Tumore
Sulesomab	LeukoScan	1997	murines Fab-Fragment	NCA-90 (Granulozytenoberflächenprotein)	Darstellung von Infektions- & Entzündungsherden (z.B. Osteomyelitis)
Votumumab	HumaSPECT	1998	Humaner mAK	Cytokeratintumorassoziiertes Antigen	Detektion von Rezidiven kolorektaler Tumore

Tabelle 1.4 In Deutschland als *In-vivo*-Diagnostika zugelassene Antikörper
(Stand: April 2004, Quelle: Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe)

Zurzeit befinden sich über 100 therapeutische Antikörper in klinischen Studien. Zahlreiche Therapeutika sind bereits in den USA zugelassen, so dass mit einer baldigen Zulassung in Europa, bzw. in Deutschland zu rechnen ist. Die bei weitem größte Rolle spielen hierbei Antikörper, die in der Krebstherapie eingesetzt werden können. Bei dieser Indikation stellen Antikörper mit knapp 25% den größten Anteil aller Präparate, die sich momentan in der klinischen Forschung befinden (Erpel et al., 2002).

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern werden in der Tumorthherapie völlig neue Wege beschritten. Als Beispiel sei hier der von der Firma Genentech entwickelte Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin™) genannt, der Februar 2004 von der FDA die Zulassung für die USA erhielt. Bevacizumab ist ein humanisierter IgG1-Antikörper, der den Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) inhibiert. VEGF spielt eine wichtige Rolle bei der Tumor-Angiogenese. Durch die Inhibition von VEGF wird die Vaskularisierung des Tumorgewebes unterbunden und dadurch das Tumorstadium gehemmt. Avastin™ ist in Kombination mit 5-Fluorouracil zur Therapie des metastasierenden Kolonkarzinoms indiziert.

Ein weiteres interessantes pharmakologisches Konzept verfolgt man mit Antikörperkonjugaten, bei denen der eigentliche Wirkstoff an das Antikörpermolekül gekoppelt ist und von diesem hochspezifisch an den Wirkort transportiert wird. Der humanisierte Anti-CD33-Antikörper Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg™) ist in den USA bereits zur Therapie von akuten myeloischen Leukämien (AML) zugelassen. Das Antikörpermolekül ist mit dem bakteriellen Toxin Calicheamicin, einem hochpotenten Chemotherapeutikum, gekoppelt.

Im Januar 2004 erhielt der Anti-CD20-Antikörper Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin®) die Zulassung in Deutschland. Es handelt sich dabei um einen murinen monoklonalen Antikörper, der über den Chelator Tiuxetan mit dem Radioisotop ⁹⁰Yttrium gekoppelt ist. Zevalin® ist zur Therapie des follikulären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms indiziert. Die Wirkung wird durch das Radioisotop vermittelt, das durch den Antikörper gezielt an den Wirkort transportiert wird. ⁹⁰Yttrium zerfällt unter Emission energiereicher Betastrahlen, durch die Zellen im Umkreis von ca. 5 mm abgetötet werden.

Mit Tosutumomab (Bexxar™) steht ein zweiter radioaktiver Anti-CD20-Antikörper kurz vor der Zulassung. Bei diesem Wirkstoff fungiert ¹³¹Jod als Strahlenquelle.

Neben der Krebstherapie stehen aber auch andere Indikationsgebiete im Blickpunkt der Antikörperforschung. Im Oktober 2003 wurde in den USA der humanisierte IgG1-Antikörper Efalizumab (Raptiva™) zur Psoriasis-Therapie zugelassen. Efalizumab inhibiert T-Zell-vermittelte inflammatorische Reaktionen durch die Blockade des CD11a-Rezeptors auf der Oberfläche von Leukozyten.

Mit einer baldigen Zulassung in Deutschland kann für den Anti-IgE-Antikörper Omalizumab gerechnet werden. Als Indikationsgebiet sind hier starke allergische Reaktionen vorgesehen, bei denen IgE-Antikörper eine wichtige Rolle spielen. IgE-Immunglobuline sind in zahlreichen Geweben fest mit dem FcεRI-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen assoziiert. Durch die Interaktion der IgE-Moleküle mit Allergenen kommt es zur Quervernetzung der FcεRI-Rezeptoren und dadurch zur Freisetzung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren aus den Mastzellen. Dadurch kann letztendlich eine Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I ausgelöst werden. Der Anti-IgE-Antikörper Omalizumab greift in diesen Pathomechanismus ein, indem er die IgE-Immunglobuline neutralisiert. In den USA ist Omalizumab unter dem Handelsnamen Xolair™ bereits seit Juni 2003 zugelassen.

1.7 Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente in der Naturstoffanalytik

Obwohl monoklonale Antikörper aus der medizinischen Diagnostik, der Molekularbiologie und der Proteinbiochemie als unerlässliche analytische Hilfsmittel nicht mehr wegzudenken sind, kommen sie in der Naturstoffanalytik trotz ihrer hohen Spezifität und Sensitivität bisher kaum zum Einsatz. Dabei gibt es zahlreiche Publikationen, die ihre Nützlichkeit bei der Bearbeitung unterschiedlichster Fragestellungen unter Beweis stellen. So gibt es beispielsweise Studien, die belegen, dass die Analytik mit Hilfe eines Kompetitions-ELISAs in manchen Fällen deutlich sensitiver sein kann, als eine HPLC-Untersuchung (Tanaka et al., 1998).

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern können Naturstoffe direkt im pflanzlichen Gewebe, in pflanzlichen Extrakten oder - bei pharmakologischen Fragestellungen - im tierischen oder humanen Plasma nachgewiesen werden.

Ein bekanntes Beispiel für den Einsatz von Antikörpern, die gegen pflanzliche Naturstoffe gerichtet sind, ist das Digitalis-Antitoxin (Digitalis Antidot[®] BM). Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus proteolytisch hergestellten Fab-Fragmenten gegen Digitalis-Glykoside, die therapeutisch als Antidot bei einer Herzglykosidvergiftung eingesetzt werden (Lechat et al., 1984). Das Digitalis Antidot[®] BM wird intravenös appliziert, um die Herzglykosid-Moleküle im Blutserum zu neutralisieren. Fab- und scFv-Fragmente gegen Digitalis-Glykoside gehörten daher auch zu den ersten Antikörperfragmenten, die rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert wurden (Huston et al., 1988).

Als Ziele von monoklonalen und rekombinanten Antikörpern stehen unterschiedliche Substanzgruppen im Vordergrund. Zum einen sind hier die Opium-Alkaloide Morphin, Codein und Thebain oder andere halluzinogene Substanzen, wie z.B. die Cannabinoide zu nennen. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern ist es möglich, diese Substanzen oder ihre Abbauprodukte in Körperflüssigkeiten zu detektieren oder bei Intoxikationen zu neutralisieren.

Ein weiterer Naturstoff, der im Mittelpunkt der Antikörper-Forschung steht, ist der Mitosehemmstoff Taxol, der in der Krebstherapie eine wichtige Rolle spielt. Taxol wurde ursprünglich aus der Rinde der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* (Familie: Taxaceae) isoliert. Da der natürliche Bestand von *T. brevifolia* den Bedarf an Taxol nicht decken kann, wird die Substanz partialsynthetisch aus strukturell ähnlichen Komponenten wie z.B. Baccatin III oder 10-Deacetylbaccatin III gewonnen. Diese Substanzen können aus den Blättern von *T. baccata* isoliert werden. Es existieren inzwischen aber auch Zellkulturen, aus denen Taxol oder Baccatin III gewonnen werden können, wobei die Ausbeute noch sehr gering ist. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern ist es möglich, den Gehalt an Taxol und seinen Strukturanaloga über einen kompetitiven ELISA semiquantitativ zu bestimmen und dadurch z.B. Zellkulturen mit einem besonders hohen Wirkstoffgehalt zu identifizieren (Grothaus et al., 1995, Guo et al., 1995).

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern lassen sich außerdem auch pflanzenanatomische Untersuchungen durchführen. Die Arbeitsgruppe um Yukihiro Shoyama entwickelte z.B. eine spezielle Blotting-Technik, die so genannte Immunozytlokation, mit deren Hilfe es möglich ist, die Verteilung von Glycyrrhizin oder von Ginsenosiden im entsprechenden Pflanzengewebe darzustellen (Shan et al., 1999, Shoyama et al., 1999).

Tabelle 1.5 auf der nächsten Seite gibt eine Übersicht über einige der unterschiedlichsten Naturstoffe, gegen die Antikörper oder rekombinante Antikörperfragmente generiert wurden.

Stoffgruppe	Target	Art	Literatur
Aflatoxine	Aflatoxin B2a	<i>Aspergillus flavus</i>	Gaur et al., 1991
	Aflatoxin M1	<i>Aspergillus spec.</i>	Holtzapple et al., 1996
Anthranoide	Sennosid A	<i>Rheum ssp</i>	Morinaga et al., 2000
	Sennosid B	<i>Rheum ssp</i>	Morinaga et al., 2001
Cannabinoide	Δ 9-THC	<i>Cannabis sativa</i>	Tanaka et al., 1996
	THC-Säure	<i>Cannabis sativa</i>	Tanaka et al., 1999b
Carotinoide	Crocin	<i>Crocus sativus</i>	Xuan et al., 1999
Herzglykoside	Digoxin	<i>Digitalis lanata</i>	Zalcberg et al., 1983 Lechat et al., 1984 Huston et al., 1988, u.v.a.
Isochinolinalkaloide	Berberin	<i>Berberis vulgaris</i>	Kim et al., 2004
Labdanditerpene	Forskolin	<i>Coleus forskohlii</i>	Sakata et al., 1994 Yanagihara et al., 1996
	Marrubiin	<i>Marrubium vulgare</i>	Brand et al., 2001
Lectine	Mistlelectine	<i>Viscum album</i>	Tonevitsky et al., 2002
Mitosehemmstoffe	Taxol,	<i>Taxus brevifolia</i>	Grothaus et al., 1995
	Taxolanaloga	<i>Taxus baccata</i>	Guo et al., 1995
	Vinblastin	<i>Catharanthus roseus</i>	Pontarotti et al., 1985
	Colchicin	<i>Colchicum autumnale</i>	Edmond Rouan et al., 1989
Monoterpene	Paeoniflorin-Derivate	<i>Paeonia lactiflora</i>	Lu et al., 2003
Opium-Alkaloide	Morphin,	<i>Papaver somniferum</i>	Glasel et al., 1983 Rahbarizadeh et al., 2000
	Codein, Thebain		Shoyama et al., 1996
Pyrrolizidin-Alkaloide	Retrorsin	<i>Senecio spec. u.a.</i>	Zündorf et al., 1998
	Riddelliin		Lee et al., 2001
Triterpene	Ginsenosid Rb1	<i>Panax ginseng</i>	Fukuda et al., 1999 Tanaka et al. 1999a Fukuda et al., 2000a/b
	Ginsenosid Rf	<i>Panax ginseng</i>	Nah et al., 2000
	Ginsenosid Rg1	<i>Panax ginseng</i>	Fukuda et al., 2001
	Glycyrrhizin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Tanaka et al., 1998 Shan et al., 2001
	Glycyrrhetinsäure	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Shan, 1999
	Seikosaponine	<i>Bupleurum spec.</i>	Zhu et al., 2004
	Solamargin	<i>Solanum spec.</i>	Ishiyama et al., 1996 Tanaka et al., 1997 Putalun et al., 1999
	Solasodin		Putalun et al., 2000 Putalun et al., 2003
	Squalen		Maytas et al., 2000
	Veratrum-Alkaloide	Cyclopamin, Jervin	<i>Veratrum californicum</i>

Tabelle 1.5 Ausgewählte Literatur zu Antikörpern gegen Naturstoffe

1.7.1 Antikörper gegen Triterpensaponine

Bei den Saponinen handelt es sich um eine sehr heterogene Stoffgruppe aus glykosidischen Substanzen, die im Wesentlichen durch ihre gemeinsamen physikochemischen Eigenschaften charakterisiert werden. In Wasser gelöst ergeben Saponine - ähnlich wie Seifen - beim Schütteln einen haltbaren Schaum. Von dieser Eigenschaft leitet sich auch der Name der Stoffgruppe ab (sapo = Seife). Saponine wirken auf Öle emulgierend, auf Suspensionen stabilisierend und zeigen eine Komplexbildung mit Cholesterol. Außerdem sind alle Saponine in der Lage, die Hämolyse von Erythrozyten hervorzurufen.

Diese Eigenschaften verdanken die Saponine ihrem amphiphilen Charakter. Sie bestehen aus einem lipophilen Molekülteil, dem Sapogenin oder Aglykon, und aus einem polaren glykosidischen Teil. Je nachdem, ob das Sapogenin mit einem oder zwei Zuckerketten kondensiert ist, spricht man von Mono- oder Bidesmosiden.

Das Sapogenin ist biogenetisch aus einzelnen Isopreneinheiten (C₅) aufgebaut. Durch Reaktion eines „aktivierten Isoprens“ (Isopentenylpyrophosphat, IPP) mit dem strukturisomeren Dimethylallylpyrophosphat (DAPP) entsteht Geranylpyrophosphat (C₁₀), das durch ein weiteres IPP-Molekül zu Farnesylpyrophosphat (C₁₅) umgesetzt wird. Zwei Moleküle Farnesylpyrophosphat kondensieren schließlich zum Squalen (C₃₀), der gemeinsamen Vorstufe aller Saponine (Dewick, 2001).

Die Saponine können je nach Art des Aglykons in drei Gruppen unterteilt werden: die penta- oder tetrazyklischen Triterpensaponine, die Steroidsaponine und die Steroidalkaloidsaponine. Bei den Steroidsaponinen unterscheidet man zwischen dem Spirostanol- und dem Furostanol-Typ (Abbildung 1.8).

Saponine sind im Pflanzenreich sehr weit verbreitet. Man schätzt, dass etwa drei von vier Pflanzen Saponine als Sekundärmetabolite produzieren. Die meisten der natürlich vorkommenden Saponine gehören zum Triterpen-Typ. Man kennt heute mehr als 120 verschiedene Triterpensaponine, die vor allem unter den Dicotyledonen weit verbreitet sind (Hänsel et al., 1999, Wagner, 1993). Das Aglykon der Triterpene besteht aus einem C₃₀-Grundkörper, der in der Regel pentazyklisch, seltener aber auch tetrazyklisch aufgebaut ist. Die pentazyklischen Triterpensaponine leiten sich überwiegend vom Oleanan- bzw. vom Δ^{12} -Oleanentyp, seltener vom Ursan- oder Lupan-Typ ab. Die tetrazyklischen Triterpene haben in der Regel ein Dammaran-Grundgerüst. Die Ringe A/B, B/C und C/D sind *trans*-verknüpft. Bei den pentazyklischen Triterpensaponinen sind die Ringe D/E *cis*-verknüpft (Abbildung 1.9). In ihrer Stereochemie unterscheiden sich die Triterpensaponine somit von den strukturell ähnlichen Herzglykosiden.

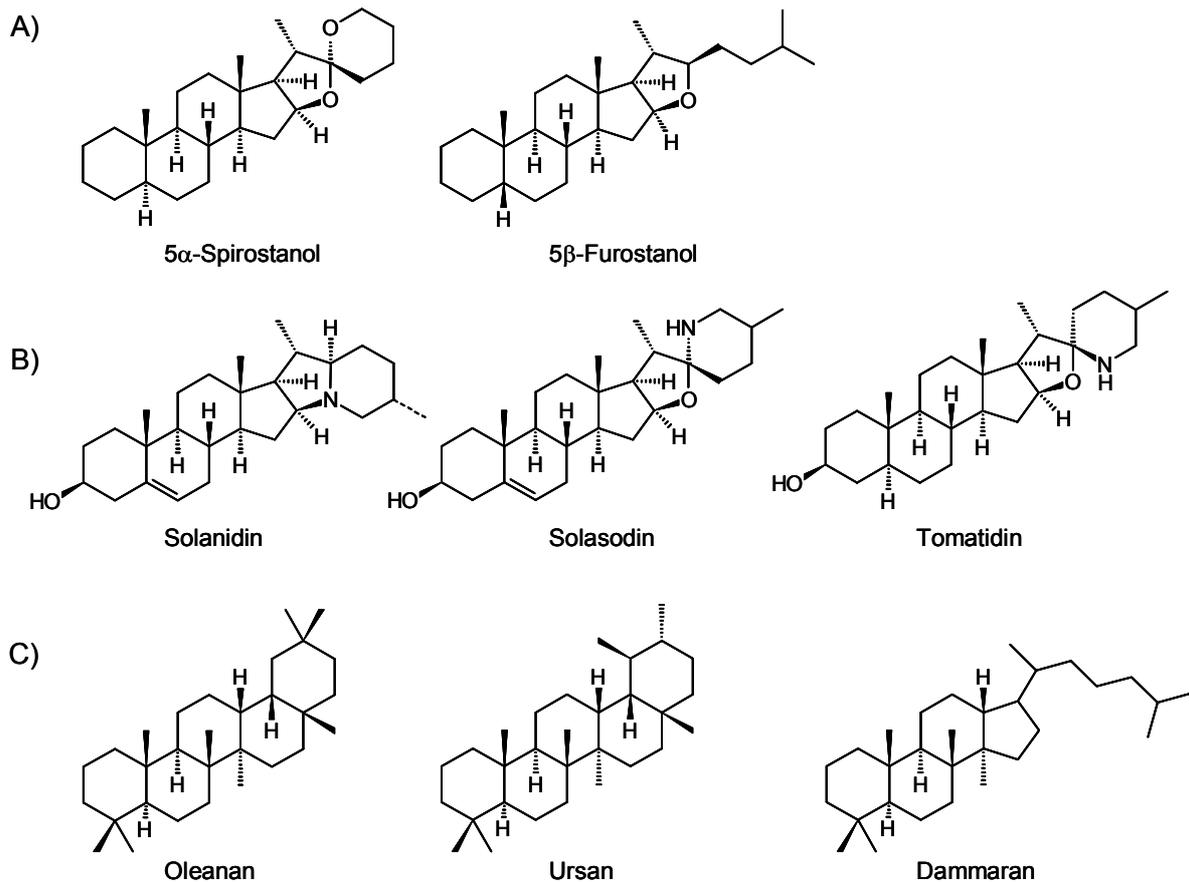


Abb. 1.8 Grundkörper der Saponine

A) Steroidsaponine leiten sich vom Spirostanol- oder Furostanolgerüst ab.

B) Steroidalkaloidglykoside können zu den Alkaloiden und zu den Saponinen gezählt werden. Sie kommen häufig in der Familie der Solanaceae vor.

C) Triterpensaponine können tetrazyklisch oder pentazyklisch aufgebaut sein. Die meisten Triterpensaponine leiten sich vom Oleanan-, vom Ursan- oder vom Dammaran-Typ ab.

Triterpensaponine bzw. triterpensaponinhaltige Arzneidrogen spielen aufgrund ihres breiten Wirkspektrums in der Phytotherapie eine große Rolle. Sie zeichnen sich nachweislich durch venentonisierende, antiödematöse, antiphlogistische, diuretische, expektorierende und broncholytische Eigenschaften aus. Daneben werden antibiotische, antimykotische und antivirale Effekte ebenso diskutiert, wie eine zytotoxische, antitumorale und immunmodulatorische Wirkung (Bader, 1994, Lacaille-Dubois et al., 1996). Die pharmakologischen Effekte der Saponine lassen sich nur teilweise mit ihren physikochemischen Eigenschaften erklären. Gut dokumentiert ist allerdings die expektorierende und sekretolytische Wirkung. Sie wird reflektorisch über den gastropulmonalen Reflex vermittelt. Saponine reizen die Magenschleimhäute, so dass über die sensorischen Fasern des Parasympathikus die seromukösen Drüsen der Bronchien stimuliert werden. Letztendlich kommt es zur Verflüssigung des Bronchialsekrets (Dingermann et al., 2003). Zu den unterschiedlichen Wirkungen der Saponine tragen aber zweifellos auch synergistische Effekte anderer Pflanzeninhaltsstoffe bei.

Tabelle 1.6 gibt eine Übersicht über einige positiv monographierte saponinhaltige Arzneipflanzen.

Droge	Arzneipflanze	Hauptwirkstoffe
Expektoranzien:		
Efeublätter	<i>Hedera helix</i>	5 % Triterpensaponine; Hederacosid B, Hederacosid C, α -Hederin
Schlüsselblumenwurzel	<i>Primula veris</i>	4-10 % Triterpensaponine; Hauptkomponente = Primulasäure
Senegawurzel	<i>Polygala senega</i>	8-10 % Triterpensaponine; mind. 8 verschiedene Senegasaponine
Gemeines Seifenkraut	<i>Saponaria officinalis</i>	2-5 % Triterpensaponine; Grundstruktur = Gypsogenin
Weißes Seifenkraut	<i>Gypsophila paniculata</i>	20 % Triterpensaponine; Hauptsaponin = Gypsosid A
Süßholzwurzel	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	2-5 % Triterpensaponine; Hauptsaponin = Glycyrrhizin
Stiefmütterchenkraut	<i>Viola tricolor</i>	Triterpensaponingemisch
Seifenrinde	<i>Quillaja saponaria</i>	10 % Triterpensaponine; Grundstruktur = Quillajasäure
Ödemprotektiva:		
Roßkastaniensamen	<i>Aesculus hippocastanum</i>	3-5 % Triterpensaponine; Aescin = wirksamkeitsbestimmender Bestandteil
Mäusedornwurzelstock	<i>Ruscus aculeatus</i>	4-6 % Steroidsaponine; Spirostanolaglyka

Tabelle 1.6 Übersicht über saponinhaltige Arzneipflanzen und Drogen

Die Tabelle gibt eine Übersicht über saponinhaltige Arzneipflanzen, die für die Anwendung als Expektoranzien und Ödemprotektiva positiv monographiert wurden.

Da es sich bei den Saponinen um eine sehr heterogene Substanzgruppe handelt, ist ihre Analytik nicht trivial. Mit Hilfe der HPLC ist es in der Regel möglich, den Gehalt einzelner Saponine in einem komplexen Gemisch zu bestimmen. Zur Ermittlung des Gesamtgehaltes eines komplexen Gemisches aus zahlreichen Einzelkomponenten ist die HPLC aber nur bedingt geeignet.

Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes eines Saponingemisches existieren biologische und physikalische Methoden, die auf den physikochemischen Eigenschaften dieser Substanzgruppe basieren. Für die Ermittlung des hämolytischen Indexes macht man sich beispielsweise die hämolytische Wirkung auf Erythrozyten zunutze. Dabei ermittelt man mit Hilfe einer Verdünnungsreihe die Grenzkonzentration eines Drogenauszuges, bei der noch eine totale Hämolyse des als Indikator zugesetzten Blutes erfolgt. Als Referenz dient ein Standardsaponin, für das ein mittlerer hämolytischer Index festgelegt wurde. Dass diese Methode nur äußerst ungenaue Ergebnisse liefert, liegt auf der Hand.

Eine ähnlich unpräzise Methode ist die Bestimmung des Schaumindex. Dabei wird die Höhe des Schaumes gemessen, den ein wässriger Drogenauszug beim Schütteln bildet.

Für rein qualitative Untersuchungen eignet sich in der Regel die Dünnschichtchromatographie. Mit dieser Methode lassen sich aber allenfalls semiquantitative Aussagen über den Gesamtgehalt an Saponinen in einem Drogenextrakt machen.

Da die Analytik von komplexen Saponingemischen schwierig ist, ist es naheliegend, nach einfachen und kostengünstigen Methoden zu suchen. Dabei stellte sich die Frage, ob die Wertbestimmung von Arzneipflanzenextrakten z. B. mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern möglich ist.

Als Zielsubstanz für die Generierung von monoklonalen Antikörpern wurde das Sapogenin Oleanolsäure gewählt (Abbildung 1.9). Oleanolsäure ist als Aglykon in zahlreichen Saponinen vertreten, kommt aber in vielen Pflanzen auch in freier Form vor. Man kann davon ausgehen, dass monoklonale Antikörper, die mit Oleanolsäure interagieren, auch Kreuzreaktivitäten mit strukturell ähnlichen Sapogeninen zeigen. Daher kann man mit diesen Antikörpern ein breites Spektrum an Saponinen analytisch erfassen. Neben der Wertbestimmung von saponinhaltigen Arzneipflanzenextrakten im kompetitiven ELISA ist z.B. auch die Untersuchung von unbekanntem Pflanzen auf Saponine als Inhaltsstoffe denkbar.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Werner Knöss von der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn wurden mehrere monoklonale Antikörper gegen Oleanolsäure entwickelt und zum Teil bereits charakterisiert (Brand, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Charakterisierung dieser Antikörper fortgesetzt und geeignete Methoden zur Analytik von Arzneipflanzenextrakten etabliert werden.

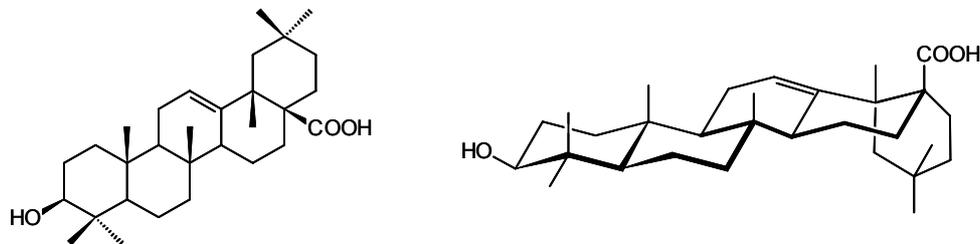


Abb. 1.9 Oleanolsäure

Die Oleanolsäure leitet sich vom Δ^{12} -Oleanen-3 β -ol ab. Es handelt sich um ein saures Sapogenin mit einer Carboxylfunktion an C27. In der stereochemischen Darstellung (rechts) erkennt man die trans-trans-trans-cis Konformation der fünf Ringe.

1.7.2 Rekombinante Antikörperfragmente gegen Pyrrolizidinalkaloide

Bei den Pyrrolizidinalkaloiden handelt es sich um eine Gruppe sekundärer Pflanzenmetabolite, deren gemeinsames Strukturmerkmal die Necin-Base (Retronecin) darstellt (Abbildung 1.10). Bei den meisten Pyrrolizidinalkaloiden sind die beiden Hydroxylfunktionen an C1 und C7 zu makrozyklischen Diestern verestert. Man kennt inzwischen ca. 370 verschiedene Pyrrolizidinalkaloide, die in 350 Pflanzenarten aus 13 Familien gefunden werden, z.B. bei den Fabaceae und den Asteraceae. Ubiquitär findet man die Alkaloide in der Familie der Boraginaceae (Hänsel et al., 1999).

Etwa ein Drittel der bekannten Pyrrolizidinalkaloide sind stark toxisch. Bei einer Intoxikation kann es zu einer erheblichen Schädigung der Lunge, der Nieren, des Pankreas, des Gastrointestinaltraktes und vor allem der Leber kommen. Außerdem liegen Hinweise auf eine karzinogene Wirkung vor. Die Toxizität geht dabei nicht von den genuinen Alkaloiden aus, sondern von Metaboliten, die nach der Resorption in der Leber gebildet werden.

In der Pflanze liegen viele Pyrrolizidinalkaloide als wasserlösliche, ungiftige N-Oxide vor. Nach einer oralen Aufnahme wird das N-Oxid durch die Mikroorganismen der Darmschleimhaut reduziert, so dass die lipophilen Alkaloide resorbiert werden können. In der Leber wird der Pyrrolizidinring der Necin-Base zum Dipyrrolring oxidiert. Die Pyrrolderivate können als stark elektrophile Verbindungen mit Nucleophilen wie z.B. Proteinen oder der DNA kovalente Bindungen eingehen (Liddel, 2000). Da sich der Giftungsmechanismus der Pyrrolizidinalkaloide in der Leber abspielt, wird dieses Organ auch am stärksten geschädigt. Es kommt zu massiven Lebernekrosen und zur Lebervenenverschlusskrankheit (Bodd-Chiari-Syndrom) durch die Schädigung des Gefäßendothels.

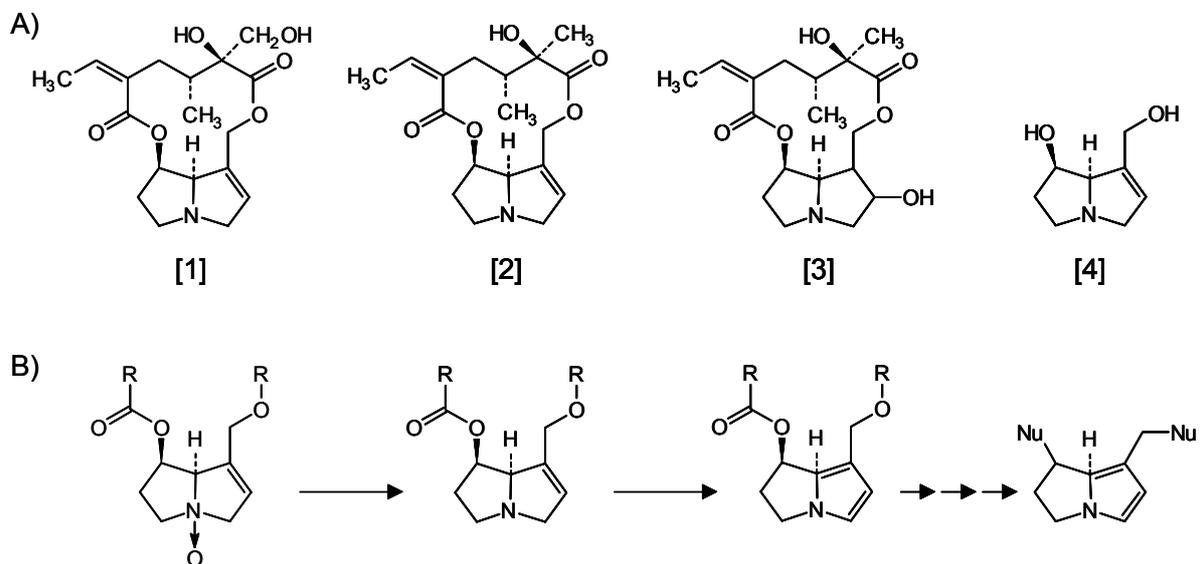


Abb 1.10 Pyrrolizidinalkaloide

A) Die Pyrrolizidinalkaloide Retrorsin [1], Senecionin [2] und Rosmarinin [3] binden an den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 2C3C5. Gemeinsames Strukturmerkmal ist die Necin-Base [4].

B) Giftungsmechanismus der Pyrrolizidinalkaloide. Die ungiftigen N-Oxide werden im Darm reduziert und in der Leber zu toxischen Dipyrrolverbindungen metabolisiert, die mit Nucleophilen, z.B. den DNA-Basen kovalent interagieren können.

Da Pyrrolizidinalkaloide auch in zahlreichen Nutzpflanzen vorkommen, wird immer wieder über Intoxikationen von Mensch und Tier durch diese Sekundärmetabolite berichtet. Außerdem enthalten zahlreiche traditionelle Arzneipflanzen Pyrrolizidinalkaloide, so dass diese Pflanzen negativ monographiert werden mussten und nicht pharmazeutisch genutzt werden können.

In der Arbeitsgruppe Dingermann wurden Antikörper gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin generiert und charakterisiert (Zündorf et al., 1998). Diese Antikörper zeigen Kreuzreaktivitäten zu zahlreichen strukturell ähnlichen Alkaloiden wie z.B. Senecionin oder Rosmarinin. Mit Hilfe der Antikörper ist es möglich, Pyrrolizidinalkaloide in Pflanzenextrakten nachzuweisen und diese Extrakte z.B. durch Affinitätschromatographie über Antikörpersäulen zu reinigen. Auch ein Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden im Blut ist mit Hilfe von Antikörpern möglich (Lee et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollten Antikörper-scFv-Fragmente gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin kloniert werden. Durch Mutationsverfahren kann die DNA, die für diese Fragmente codiert, so mutiert werden, dass scFv-Fragmente mit neuen Bindungseigenschaften entstehen. Theoretisch kann dadurch das Spektrum der Pyrrolizidinalkaloide, die sich mit Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten detektieren und gegebenenfalls isolieren lassen, erweitert werden. Interessant wären dabei vor allem Antikörper, die die N-Oxid-Form der Alkaloide erkennen, da die Sekundärmetabolite in dieser Form in der Pflanze gespeichert werden.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Saponinhaltige Arzneipflanzen spielen aufgrund ihrer unterschiedlichen pharmakologischen Effekte in der Phytotherapie eine wichtige Rolle. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. Werner Knöss von der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn wurden im Arbeitskreis Dingermann verschiedene monoklonale Antikörper gegen das Triterpensapogenin Oleanolsäure generiert. Ziel dieser Arbeit ist es, die unterschiedlichen monoklonalen Antikörper gegen Oleanolsäure eingehend zu charakterisieren. Dabei interessieren vor allem auch die Kreuzreaktivitäten zu strukturell ähnlichen Triterpenen, aber auch zu anderen sekundären Pflanzenmetaboliten. Anschließend soll untersucht werden, in wieweit sich die monoklonalen Antikörper zur Analytik von komplexen Saponinmischungen eignen, wie sie beispielsweise in Arzneipflanzenextrakten vorkommen.

In einem weiteren Projekt sollen, ausgehend von der mRNA unterschiedlicher Hybridomzelllinien, rekombinante Antikörperfragmente gegen das Triterpen Oleanolsäure und gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin konstruiert werden. Die entsprechenden Antikörperfragmente sollen in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert, heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und auf ihre Bindungseigenschaften untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanzen	Hersteller / Lieferant
ABTS	Fa. Roche Diagnostics
Acrylamid	Fa. Roth
6-Amino-n-hexansäure	Fa. Sigma
Ammoniumacetat	Fa. Merck
ATP	Fa. Roche Molecular Biochemicals
[γ - ³² P]-ATP (10 mCi/mL, 3000 Ci/mmol)	Fa. Amersham Buchler
Agar	Fa. Sigma
Agarose	Fa. GibcoBRL
Ampicillin	Fa. Roth
APOD	Fa. Sigma
Bacto Pepton	Fa. Oxoid
Borsäure	Fa. Roth
Bromphenolblau	Fa. Roth
BSA Fraktion V (für Blockierlösung)	Fa. PAA Laboratories
BSA (für Restriktionsverdau)	Fa. New England BioLabs (NEB)
Chloramphenicol	Fa. Merck
Coomassie Brilliant Blue R250	Fa. Roth
CPRG	Fa. Roche Diagnostics
dNTPs	Fa. AbiPrism
DDT	Fa. Biomol
Glukose	Fa. Roth
EDTA x 2 H ₂ O	Fa. Roth
Ethidiumbromid	Fa. Merck
Fetal Bovine Serum	Fa. Sigma
Ficoll Separating Solution (Biocoll)	Fa. Biochrom KG
Formaldehyd	Fa. Roth
Formamid	Fa. Merck
Frema Reform Magermilchpulver	Fa. Neufarm
Glutaraldehyd 25%	Fa. Sigma
Glycerin 86%	Fa. Roth
Glycin	Fa. Merck
HEPES	Fa. Roth
Isoamylalkohol	Fa. Roth
IPTG	Fa. Saxon
Kac	Fa. Merck
KCl	Fa. Merck
KH ₂ PO ₄	Fa. Roth
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Fa. Roth
Leupeptin	Fa. Biomol
MgAc ₂ x 4 H ₂ O	Fa. Merck
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Fa. Merck
β -Mercaptoethanol	Fa. Roth
MES	Fa. Roth

Substanzen	Hersteller / Lieferant
Methylenbisacrylamid	Fa. Roth
MOPS	Fa. Roth
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	Fa. New England BioLabs
NaAc x 3 H ₂ O	Fa. Roth
NaCl	Fa. Roth
NaCO ₃	Fa. Roth
NaHCO ₃	Fa. Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Fa. Roth
NaN ₃	Fa. Roth
Oleanolsäure	Fa. Roth
PEG 1000, 6000, 8000	Fa. Roth
Phenol	Fa. Roth
Poly[dA-dT]	Fa. Sigma
Ponceau S	Fa. Roth
Protein A, Immobilized on Sepharose CL4B	Fa. Sigma
Proteinase K	Fa. Merck
Polyvinylpyrrolidon	Fa. Merck
Saccharose	Fa. Roth
SDS	Fa. Biomol
Sephadex [®] G-25 fine	Fa. Fluka
TEMED	Fa. Serva
Tetracyclin	Fa. Sigma
Trichloressigsäure	Fa. Roth
Tris	Fa. Roth
Triton X 100	Fa. Roth
Trypton	Fa. Oxoid
Tween [®] 20	Fa. Roth
X-Gal	Fa. Roth
Yeast Extract	Fa. Oxoid

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller / Lieferant
Costarplatten Cellstar [®]	Fa. Greiner
Filterpapier 3MM	Fa. Whatman
Dialyseschläuche	Fa. Roth
1,5 mL Reaktionsgefäße	Fa. Greiner
2,0 mL Reaktionsgefäße	Fa. Greiner
Film-Entwickler Roenthogen [®] liquid	Fa. Tenetal
Film-Fixierer Roenthogen [®] Superfix	Fa. Tenetal
Küvetten für die Elektroporation (2mm, 4mm)	Fa. Merck
Microlon Mikrotiterplatten	Fa. Greiner
Nitrozellulose-Membran Protan [®] BA85	Fa. Schleicher & Schuell
Nylon-Membran Hybond [™] -N	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Petrischalen (5 mL, 10 mL)	Fa. Greiner, Fa. Nunc
Pipettenspitzen, unsteril	Fa. Greiner
Pipettenspitzen, steril und gestopft	Fa. Ratiolab
Polaroidfilme Typ 667	Fa. Polaroid
Röntgenfilme X-Omat AR [™]	Fa. Kodak
Sterilfilter 0,2 µm FP 030/3	Fa. Schleicher & Schuell
Tubes (15 mL, 50 mL)	Fa. Greiner

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller / Lieferant
Anti-c-Myc-Antikörper	Fa. Clontech
Anti-Mouse-Immunglobulins-Antibody	Fa. Dako A/S
Anti-Mouse-IgG-Antikörper-POD-Konjugat	Fa. Sigma
Anti-Mouse-IgM-Antikörper-POD-Konjugat	Fa. Sigma
Anti-Rabbit-Antikörper-POD-Konjugat	Fa. Sigma
Penta-His Antibody	Fa. Quiagen

2.1.4 Kits

Kit	Hersteller / Lieferant
AmpliTaq [®] Gold Kit	Fa. Roche Diagnostics GmbH
BigDye [™] Cycle Sequencing Kit	Fa. PE Applied Biosystems
ECL [™] -Kit	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Expand 20 kb ^{Plus} PCR System	Fa. Roche Diagnostics GmbH
pGEM [®] -T Vector System	Fa. Promega
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Fa. Qiagen
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Fa. Qiagen
RNeasy [®] Mini Kit	Fa. Qiagen
Superscript [™] Reverse-Transkriptase Kit	Fa. Qiagen
Taq DNA Polymerase Kit	Fa. Qiagen

2.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller / Lieferant
DNase I (<i>E.coli</i>)	Fa. Roche Diagnostics GmbH
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England BioLabs (NEB)
RNase A	Fa. New England BioLabs (NEB)
T4-DNA-Ligase	Fa. New England BioLabs (NEB)
T4-Polynukleotidkinase	Fa. New England BioLabs (NEB)
Taq-DNA-Polymerase	Fa. Qiagen
Vent-DNA-Polymerase	Fa. New England BioLabs (NEB)

2.1.6 Kompetitoren

Die im Rahmen der Kompetitions-ELISAs eingesetzten Triterpene wurden von PD Dr. Knöss (Universität Bonn) und Prof. Wollenweber (TU Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Die Oleanolsäure wurde von der Firma Sigma erworben.

Die unterschiedlichen β -Boswelliasäuren stammen aus dem Arbeitskreis von Prof. Steinhilber (Universität Frankfurt).

2.1.7 Arbeitsgeräte

Arbeitsgeräte	Hersteller / Lieferant
Analysenmühle A10	Fa. Janke & Kunkel
DNA-Sequencer AbiPrism™ 310	Fa. Perkin Elmer
Elektroblotting Apparatur	Fa. Froebel
Elektroporator Gene Pulser™	Fa. Bio-Rad
ELISA-Reader MR 5000	Fa. Dynatech
Heizblock	Fa. Liebisch
Inkubationsschüttler	Fa. Infors
Kippmischer Rocky	Fa. Froebel
Laminar Airflow SterilGard™ Hood	Fa. Labotect
Lyophilisator ALPHA 1-2	Fa. Christ
PCR-Gerät Omn-E	Fa. Hybaid
PCR-Gerät GeneAmp 9600	Fa. Perkin Elmer
PCR-Gerät GeneAmp 9700	Fa. Perkin Elmer
pH-Meter inoLab	Fa. WTW
Photoapparat (Polaroid) DS-34	Fa. Polaroid
Photometer GeneQuant™ RNA/DNA Calculator	Fa. Pharmacia
Photometer U-2000	Fa. Hitachi
Powersupplies E455, E734	Fa. Consort
Rotationsschüttler HT	Fa. Infors
Rotationsschüttler Rocky 3D	Fa. Froebel
Thermocycler Gene ATAQ Controller	Fa. Pharmacia
Wärmeschrank	Fa. Heraeus
Zentrifuge 5415 C	Fa. Eppendorf
Zentrifuge 5702	Fa. Eppendorf
Zentrifuge Rotixa/P	Fa. Hettich
Zentrifuge J2-HS, J2-HC	Fa. Beckmann
Zentrifuge, Vakuum	Fa. Heraeus

2.1.8 Allgemeine Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung		
Auftragspuffer, nativ	Saccharose	50,0	%
	EDTA (pH 8)	0,1	M
	BPB	0,1	%
Chloroform / Isoamylalkohol	Chloroform	96	%
	Isoamylalkohol	4	%
LowTE (pH 8)	Tris	10	mM
	EDTA	1	mM
Phenol, verflüssigt	Phenol	1	kg
	Wasser	250	mL
Phenol, gesättigt	Phenol, verflüssigt	100	mL
	LowTE 10x	3	mL
PBS 10x (pH 7,2)	Na ₂ HPO ₄	80,0	mM
	KH ₂ PO ₄	15,0	mM
	KCl	25,0	mM
	NaCl	1,4	M
SSC 20x	NaCl	3,0	M
	Natriumcitrat	0,3	M
TBE 10x (pH 8,3)	Tris	1,0	M
	EDTA	20,0	M
	H ₃ BO ₃	0,5	M

Für die Herstellung der meisten Lösungen und Puffer wurde demineralisiertes Wasser eingesetzt. Bei den molekularbiologischen und proteinbiochemischen Reaktionsansätzen wurde spezielles, über eine Millipore-Anlage vollentsalztes Wasser verwendet (MilliQ-H₂O), das zur Verwendung in PCR-Reaktionsansätzen noch zusätzlich autoklaviert wurde (PCR-H₂O).

2.1.9 Nährmedien

2.1.9.1 Flüssige und feste Medien

Medium	Zusammensetzung		
YT-Medium	Bacto-Pepton	10,0	g
	Yeast Extract	5,0	g
	NaCl	5,0	g
	H ₂ O	ad 1,0	L
YT-Agar	Agar	12,0	g
	YT-Medium	ad 1,0	L

Das YT-Medium wird nach dem Ansetzen autoklaviert. Der Agar wird autoklaviert und vor dem Erkalten nach Zugabe des Selektionsmediums in Petrischalen ausgegossen.

2.1.9.2 Antibiotikakonzentrationen für Nährmedien zur Selektion

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	60 µg/mL
Chloramphenicol	20 µg/mL
Kanamycin	25 µg/mL
Tetracyclin	15 µg/mL

Die Stammlösungen von Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin werden unter Verwendung von MilliQ-H₂O hergestellt. Chloramphenicol wird in Ethanol 96% gelöst. Tetracyclinhaltige Medien müssen dunkel gelagert werden.

2.1.10 Mikroorganismen

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>gal</i> , λ(DE3) (Studier et. al., 1986)
DH5α	<i>SupE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , (φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1983)
JM83	F ⁻ , <i>ara</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>rspL</i> , (<i>Str^R</i>), φ80, <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> (Yanish-Perron et. al., 1985)
JM109	F ['] , <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>) (Yanish-Perron et. al., 1985)
TG1	[F ['] , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac^qZ</i> Δ <i>M15</i>], <i>proAB</i> (<i>supE</i> , Δ <i>hsdM-mcrB</i>)5(<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁻ , <i>mcrB</i>), <i>thi</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>) (Sambrook et.al., 1989)
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F ['] , <i>proAB</i> , Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15</i> , Tn10(<i>Tet^R</i>) (Bullock et. al., 1997)

2.1.11 Vektoren und Plasmide

2.1.11.1 Übersicht über die verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Kurzbeschreibung und Referenz
pAK 100	Phagemid Vektor für das Phagen Display bzw. für die Expression von scFv-ΔgpIII-Fusionsproteinen. (Krebber et. al., 1997)
pAK 300	Expressionsplasmid für die Expression von scFv-Fragmenten. Schwache Expressionsrate durch modifizierte Shine-Dalgarno-Sequenz. (Krebber et. al., 1997)
pAK 400	Expressionsplasmid für die Expression von scFv-Fragmenten. Sehr starke Expressionsrate. (Krebber et. al., 1997)
pGEM [®] -T	Linearisierter Klonierungsvektor mit terminalem Überhang einer einzelnen Thymin-Base zur effizienten Ligation von PCR-Produkten (Fa. Promega)

2.1.11.2 Das pAK-Vektor-System

Das von Krebber (Krebber, et. al., 1997) etablierte pAK-Vektor-System umfasst verschiedene Plasmide, die für die Expression und das Phagen Display von scFv-Antikörperfragmenten optimiert wurden.

pAK100

- Das PCR-Amplimer, das für das scFv-Fragment codiert, wird so in den Phagemid-Vektor kloniert, dass das Antikörperfragment als Fusionsprotein mit einer verkürzten Version des viralen Proteins gpIII (Δ gpIII²⁰⁵⁻⁴⁰⁶) auf der Oberfläche des Phagen exprimiert wird.
- Das scFv-Fragment kann über ein N-terminales FLAG-tag bzw. ein C-terminales Myc-tag mit einem geeigneten Antikörper im Western-Blot oder im ELISA nachgewiesen werden.
- Zwischen den Sequenzen, die für das Myc-tag bzw. für das Δ gpIII²⁰⁵⁻⁴⁰⁶ codieren, befindet sich ein amber-Stoppcodon, so dass je nach verwendetem Bakterienstamm entweder lösliche scFv-Fragmente oder scFv- Δ gpIII-Fusionsproteine exprimiert werden können.
- Im Bereich des LacZ-Promotors befindet sich eine artifizielle Shine-Dalgarno-Sequenz, die auch nach der Induktion nur eine moderate Proteintranslation eventuell toxischer scFv-gpIII-Fusionsproteine zulässt.

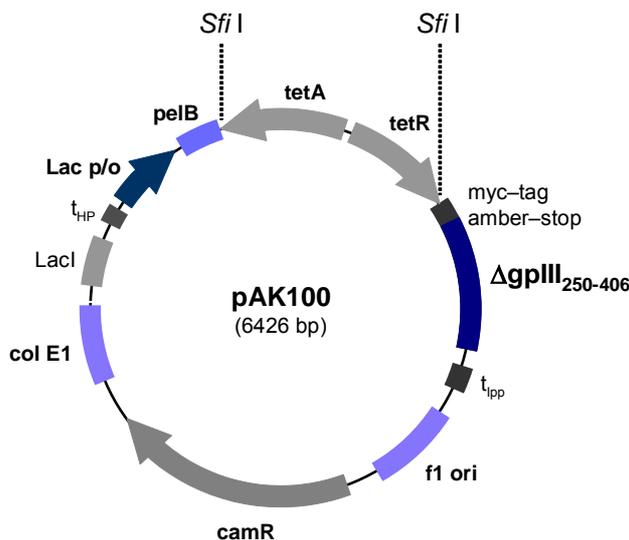


Abb. 2.1 Der Phagemid-Vektor pAK100

Mit dem Phagemid pAK100 ist ein Phagen-Display der scFv-Antikörperfragmente möglich. Dabei wird die scFv-DNA in-frame vor das Gen gpIII kloniert.

pAK300 und pAK400

- Beide Plasmide werden für die Expression von löslichen scFv-Antikörperfragmenten eingesetzt.
- Die Detektion oder Aufreinigung der löslichen scFv-Fragmente ist über ein N-terminales His-tag möglich.
- Der Vektor pAK300 besitzt die bereits beschriebene artifizielle Shine-Dalgarno-Sequenz (SD_{art}), so dass nach der Promotor-Induktion nur eine schwache Proteinexpression erfolgt.
- Mit dem Plasmid pAK400 ist eine starke Proteinexpression möglich. Daher ist der Vektor für die Expression von sehr toxischen Proteinen nicht geeignet.

2.1.12 Synthetische Oligonukleotide

2.1.12.1 Oligonukleotide zur Amplifikation von scFv-Fragmenten

Für die Amplifikation der variablen Antikörperdomänen von leichter und schwerer Kette wurden die Oligonukleotidmischungen V_LBACK und V_LFOR bzw. V_HBACK und V_HFOR eingesetzt. Die variablen Nukleotide sind nach den Regeln der IUPAC-Nomenklatur benannt:

R = A oder G	Y = C oder T	M = A oder C
K = G oder T	S = C oder G	W = A oder T
H = A oder C oder T	B = C oder G oder T	V = A oder C oder G
D = A oder G oder T		

V_LBACK-Primermischung:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
LB1	gccatggcgggactacaaaGAYATCCAGCTGACTCAGCC
LB2	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTTCTCWCCAGTC
LB3	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTGMTMACTCAGTC
LB4	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTGYTRACACAGTC
LB5	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTRATGACMCAGTC
LB6	gccatggcgggactacaaaGAYATTMAGATRAMCCAGTC
LB7	gccatggcgggactacaaaGAYATTCAGATGAYDCAGTC
LB8	gccatggcgggactacaaaGAYATYCAGATGACACAGAC
LB9	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTTCTCAWCCAGTC
LB10	gccatggcgggactacaaaGAYATTGWGCTSACCCAATC
LB11	gccatggcgggactacaaaGAYATTSTRATGACCCARTC
LB12	gccatggcgggactacaaaGAYRTTKTGATGACCCARAC
LB13	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTGATGACBCAGKC
LB14	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTGATAACYCAGGA
LB15	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTGATGACCCAGWT
LB16	gccatggcgggactacaaaGAYATTGTGATGACACAACC
LB17	gccatggcgggactacaaaGAYATTTTGCTGACTCAGTC
LBλ	gccatggcgggactacaaaGATGCTGTTGTGACTCAGGAATC

Die V_LBACK-Primer hybridisieren über das 3'-Ende (Großbuchstaben) mit dem 5'-Ende der FR1-Domäne der variablen Region der leichten Kette. Die Sequenz, die für das FLAG-tag codiert, ist unterstrichen.

V_LFOR-Primermischung:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
LF1	ggagccgcccgcgccc (agaaccaccaccacc) ₂ ACGTTTGGATTTCCAGCTTGG
LF2	ggagccgcccgcgccc (agaaccaccaccacc) ₂ ACGTTTTATTTCCAGCTTGG
LF4	ggagccgcccgcgccc (agaaccaccaccacc) ₂ ACGTTTTATTTCCAACCTTGG
LF5	ggagccgcccgcgccc (agaaccaccaccacc) ₂ ACGTTTCCAGCTCCAGCTTGG
LFλ	ggagccgcccgcgccc (agaaccaccaccacc) ₂ ACCTAGGACAGTCAGTTTGG

Die V_LFOR-Primer hybridisieren über das 3'-Ende (Großbuchstaben) am Übergang von J- und C-Gensegment der leichten Kette. Über die V_LFOR-Primermischung wird bereits ein Teil der Linker-Sequenz an die VL-Domäne angehängt (Kleinbuchstaben). Die Codons für die dritte Gly₄Ser-Wiederholung überlappen mit der V_HBACK-Primermischung. Sie besitzen eine andere Sequenz als die übrige Linker-DNA, damit Fehlpaarungen bei der SOE-PCR vermieden werden.

V_HBACK-Primermischung:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
HB1	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAKGTRMAGCTTCAGGAGTC
HB2	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTBCAGCTBCAGCAGTC
HB3	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTGCAGCTGAAGSASTC
HB4	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTCCARCTGCAACARTC
HB5	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTTCAGCTBCAGCARTC
HB6	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTTCARCTGCAGCAGTC
HB7	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTCCACGTGAAGCAGTC
HB8	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTGAASSTGGTGGAAATC
HB9	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAVGTGAWGYTGGTGGAGTC
HB10	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTGCAGSKGGTGGAGTC
HB11	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAKGTGCAMCTGGTGGAGTC
HB12	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTGAAGCTGATGGARTC
HB13	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTGCARCTTGTGAGTC
HB14	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGARGTRAAGCTTCTCGAGTC
HB15	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAAGTGAARSTTGAGGAGTC
HB16	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccCAGGTACTCTRAAAGWGTSTG
HB17	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccCAGGTCCAACCTVCAGCARCC
HB18	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGATGTGAACTTGGAAAGTGTC
HB19	ggcggcggcggcggcgcggtggtggtggatccGAGGTGAAGGTCATCGAGTC

Die V_HBACK-Primer hybridisieren über das 3'-Ende (Großbuchstaben) mit dem 5'-Ende der FR1-Domäne der variablen Region der schweren Kette. Die Unterstreichung markiert eine *Bam*H I-Schnittstelle. Über die V_HBACK-Primermischung wird ein Teil der Linker-Sequenz an die VH-Domäne angehängt (Kleinbuchstaben). Die letzten 15 Nukleotide hybridisieren bei der SOE-PCR mit einem Teil der V_LFOR-Sequenz.

V_HFOR-Primermischung:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
HF1	ggaattcggcccccgagggcCGAGGAAACGGTGACCGTGGT
HF2	ggaattcggcccccgagggcCGAGGAGACTGTGAGAGTGGT
HF3	ggaattcggcccccgagggcCGCAGAGACAGTGACCAGAGT
HF4	ggaattcggcccccgagggcCGAGGAGACGGTGACTGAGGT

Die V_HFOR-Primer hybridisieren über das 3'-Ende (Großbuchstaben) am Übergang von J- und C-Gensegment der schweren Kette. Die *Sfi* I-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen dargestellt. *Sfi* I erkennt zwei Blöcke aus jeweils 4 pallindromischen Basen, die durch 5 beliebige Nukleotide von einander getrennt sind.

SOE-PCR-Primer:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
sback	ttactcgcggcccagccggccatggcggactacaaaG
sfor	ggaattcggcccccgag

Die SOE-PCR-Primer kommen im Rahmen der „Splicing by overlap extension-PCR“ bei der Verknüpfung von VL und VH zum scFv-Fragment zum Einsatz. Der sback-Primer hybridisiert über sein 3'-Ende mit dem 5'-Ende der V_LBACK-Primer-Mischung. Die *Sfi* I-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen. Der sfor-Primer hybridisiert mit der V_HFOR-Primer-Mischung

2.1.12.2 Oligonukleotide für die Rearrangement-Analyse des κ-Genclusters

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
mJκ1	GTGCCAGAATCTGGTTTCAG
mJκ2	TGCTAAATCCCTGAAATCTCC
mJκ3	CATACAAAGGACACAATGGG
mJκ4	ACAAATTCACACAAGTTACCC
mJκ5	CTGATAATGAGCCCTCTCC
mJκc-short1	GCCGCGCCATGAGAACC
mJκc-long1	GGCGTTCACCCTGCCGCGCCATGAGAACCCCC
mJκc-short2	GAGTTTTGCAATAAAAAGTG
mJκc-long2	GAGTTTTGCAATAAAAAGTGGGATAGCAGAGTTG
mJκ5-long	GTCTAGAAGACCACGCTACCTGCAGTCAGACCC

Die Oligonukleotide mJκc-short1 bzw. mJκc-short2 und mJκc-long1 bzw. mJκc-long2 hybridisieren im Intron zwischen dem Jκ₅-Gensegment und dem Cκ-Gensegment des Genclusters der κ-leichten Kette. Die verschiedenen mJκ-Primer binden jeweils 3' von den entsprechenden Jκ-Gensegmenten.

2.1.12.3 Oligonukleotide für das Screening auf V_κ-Pseudogene

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
V _κ Junk1	GAGGGCCACCATCTCATAC
V _κ Junk2	TTAGGGAGCTTACACGTTCCG

Das Oligonukleotid V_κJunk1 bindet im Bereich der charakteristischen Punktmutation in der FR1-Domäne der V_κ-Pseudogenesequenz. Der Primer V_κJunk2 hybridisiert im Bereich der 4 bp-Deletion in der FR3-Domäne des V_κ-Pseudogens.

2.1.12.4 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Rsp	AACAGCTATGACCATG
Sp3	GTTTTCCCAGTCACGAC
pAK100-myc	GGTCTTCCTCAGAGATCAGC

Der Rsp-Primer hybridisiert mit der Sequenz des LacZ-Promotors. Mit ihm lassen sich sowohl die pAK-Plasmide als auch der Vektor pGEM[®]-T sequenzieren. Das Oligonukleotid Sp3 bindet 3' von der MCS des Plasmids pGEM[®]-T. Der Primer pAK100-myc hybridisiert mit der Sequenz des myc-tags im Plasmid pAK100.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von RNA aus Hybridomzellen

Die Hybridomzellen werden durch 5 minütige Zentrifugation bei 1600 UpM pelletiert und das Zellkulturmedium wird vollständig abgezogen. Die Isolierung der RNA erfolgt mit dem RNeasy[®]-Mini Kit (Fa. Qiagen) nach dem Hersteller-Protokoll (RNeasy[®] Mini Handbook, 06/2001). Am Ende der Isolierung wird die RNA mit 50 µL MilliQ-Wasser (0,2% DEPEC) von der RNeasy[®] Minispinn-Säule eluiert und photometrisch vermessen. Die Lagerung erfolgt bei -80°C

2.2.2 First strand cDNA-Synthese

Reaktionsansatz:	RNA	5 µL
	oligo dT-Primer	1 µL
	DTT (0,1 M)	2 µL
	First strand buffer 5x	4 µL
	dNTPs (2,5 mM each)	4 µL
	Superscript [™] RT	1 µL
	PCR-H ₂ O	3 µL

Die cDNA-Synthese erfolgt mit dem Superscript[™] Reverse-Transkriptase Kit (Fa. GIBCO). Die RNA wird für 5 Minuten auf 65 bis 70°C erhitzt. Anschließend werden die übrigen Reaktionspartner, beginnend mit dem oligo dT-Primer, dazupipettiert. Die cDNA-Synthese erfolgt nach Zugabe der Reversen Transkriptase durch Inkubation bei 42°C. Nach 60 Minuten wird die Reaktion durch kurzes Aufkochen gestoppt. Die cDNA wird photometrisch vermessen und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus Hybridomzellen

RSB-Lösung	Tris / HCl (pH 7,4)	10 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl ₂	3 mM
TENS-Lösung	Tris / HCl (pH 8,0)	100 mM
	EDTA (pH 8,0)	40 mM
	NaCl	200 mM
	SDS	1 %

2 bis 3 Tage vor der Isolierung von genomischer DNA müssen die Hybridomzellen zur Abtrennung von toten und apoptotischen Zellen über einen Ficoll Plaque[™]-Gradienten gereinigt werden (vgl. 2.3.9).

Bei der gDNA-Isolierung werden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in 400 μL RSB-Lösung mit 0,5% Triton X100 vorsichtig resuspendiert und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird 10 Sekunden bei 13200 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit je 400 μL RSB-Lösung gewaschen. Nach dem Waschen werden 4 μL RNase A (10 mg/mL) dazupipettiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an den RNase-Verdau werden 400 μL TENS und 2 μL Proteinase K (20 mg/mL) dazugegeben und die Proteine über Nacht bei 37°C abgebaut. Nach der Zugabe von 200 μL 5M NaCl wird 10 Minuten bei 2500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumenteil Phenol versetzt und 5 Minuten bei 1300 UpM zentrifugiert. Die obere Phase wird abgezogen, mit einem Volumenteil Chloroform / Isoamylalkohol (24+1) versetzt und erneut bei 1300 UpM zentrifugiert. Anschließend wird wiederum die obere Phase in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die genomische DNA wird mit Ethanol gefällt, in MilliQ-H₂O resuspendiert und photometrisch vermessen. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wird photometrisch mit dem Gene Quant RNA/DNA Calculator (Fa. Pharmacia Biotech) über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Sambrook et. al., 1989). Bei einer Schichtdicke von 1 cm gilt:

$$\text{OD}_{260} = 1 \quad \rightarrow \quad \begin{aligned} c &= 50 \mu\text{g} / \text{mL} \text{ für dsDNA} \\ c &= 40 \mu\text{g} / \text{mL} \text{ für ssDNA bzw. RNA} \\ c &= 33 \mu\text{g} / \text{mL} \text{ für Oligonukleotide (Primer)} \end{aligned}$$

Die Reinheit der DNA- / RNA-Lösung ergibt sich aus dem Quotienten $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{240\text{nm}}$, der zwischen 1,6 und 1,8 liegen sollte. Größere Werte lassen auf Salz-, kleinere Werte auf Proteinverunreinigungen schließen

2.2.5 Polymerasekettenreaktion

2.2.5.1 Amplifikation der variablen Antikörperdomänen

Durch die Polymerasekettenreaktion werden die variablen Regionen der schweren und leichten Antikörperkette (V_L und V_H) ausgehend von Hybridoma-cDNA amplifiziert.

Reaktionsansatz:	Taq-Puffer 10x	5 μL
	MgCl ₂ (25 mM)	5 μL
	dNTPs (2,5 mM each)	5 μL
	forward-Primer (20 pmol/ μL)	1 μL
	backward-Primer (20 pmol/ μL)	1 μL
	cDNA-Template	50 ng
	Taq-Polymerase	0,5 μL
	PCR-H ₂ O	ad 50 μL

Die Amplifikation der variablen Antikörperdomänen erfolgt mit den bei Krebber (Krebber et. al., 1997) beschriebenen, degenerierten Primer-Mischungen (V_L FOR und V_L BACK für die leichte Kette, V_H FOR und V_H BACK für die schwere Kette). Über den V_L FOR und den V_H BACK-Primer werden bereits die komplementären Linker-Sequenzen eingeführt, so dass anschließend eine einfache Verknüpfung der beiden Domänen zum scFv-Fragment durch die „Splicing by overlap extension-PCR“ (SOE-PCR) möglich ist.

Die Amplifikation erfolgt nach dem folgenden Temperatur-Zeit-Schema:

Initiale Denaturierung:	3 min, 92°C
7 Zyklen:	1 min, 92°C; 30 sec, 63°C; 50 sec, 58°C, 1 min, 72°C
23 Zyklen:	1 min, 92°C; 30 sec, 63°C, 1 min, 72°C

Die Taq-Polymerase (Fa. Qiagen) wird bereits vor der ersten Denaturierungsphase zugegeben. Nach der Amplifikation werden die variablen Antikörperdomänen über ein Agarosegel aufgetrennt, gemeinsam eluiert und als Template in der SOE-PCR eingesetzt.

2.2.5.2 Splicing by overlap extension-PCR (SOE-PCR)

Die Verknüpfung der beiden variablen Domänen erfolgt durch die „Splicing by overlap extension-PCR“. Das Temperatur-Zeit-Schema und der Reaktionsansatz entsprechen prinzipiell den unter 2.2.5.1 gemachten Angaben, allerdings dient als Template eine Mischung aus den PCR-amplifizierten und aufgereinigten V_L - und V_H -Fragmenten. Die beiden Primer scfor und scback werden erst nach dem zweiten PCR-Zyklus durch kurze Unterbrechung des Programms dazupipettiert. Während der ersten beiden Zyklen sollen sich V_H und V_L über die komplementäre Linker-Sequenz zum scFv-Fragment zusammenlagern (vgl. Abb. 3.35). Durch die beiden Primer werden zwei *Sfi*I-Schnittstellen für die spätere Klonierung in pAK-Vektoren in das Konstrukt eingeführt.

2.2.5.3 Inverse Long Range-PCR (iLR-PCR)

Im Rahmen der V(D)J-Rearrangement-Analyse von Antikörpergenen wird eine inverse Long Range-PCR mit dem Expand 20 kb^{PLUS} PCR System (Fa. Roche Diagnostics) durchgeführt. Vor der PCR muss die genomische DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und anschließend ringförmig religiert werden. Für die Analyse des Genklusters der leichten Kette des κ -Isotyps werden 5 μ g gDNA 4 Stunden lang bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Hind* III hydrolysiert. Anschließend wird 1 μ g der hydrolysierte DNA in einem Volumen von 500 μ L über Nacht bei 16°C mit der T₄-DNA-Ligase religiert. Der Religationsansatz wird gefällt und die DNA in PCR-H₂O gelöst, so dass sich eine Konzentration von 10 - 20 ng/ μ L ergibt.

Reaktionsansatz:	Expand-Puffer 10x	5 μ L
	dNTPs (2,5 mM each)	10 μ L
	Primer 1 (20 pmol/ μ L)	1 μ L
	Primer 2 (20 pmol/ μ L)	1 μ L
	Template	100 ng
	Expand-Polymerase-Mix (5U/ μ L)	1 μ L
	PCR-H ₂ O	ad 50 μ L

Die Amplifikation erfolgt nach dem folgenden Temperatur-Zeit-Schema, wobei die Elongationszeit nach dem 10. Zyklus um 10 Sekunden pro Amplifikationsrunde verlängert wird:

Initiale Denaturierung:	2 min, 92°C
10 Zyklen:	10 sec, 92°C; 30 sec, 62°C; 18 min, 72°C
20 Zyklen:	10 sec, 92°C; 30 sec, 62°C; 18 min, 72°C (+10 sec/Zyklus)
Terminale Elongation:	7 min, 68°C

2.2.5.4 Inverse Hemi Nested-PCR (iHN-PCR)

Im Verlauf der V(D)J-Rearrangement-Analyse wird eine inverse Hemi-Nested-PCR durchgeführt. Als Template dient hierbei die durch die iLR-PCR amplifizierte, nicht aufgereinigte DNA.

Reaktionsansatz:	Taq-Puffer 10x	5 μ L
	MgCl ₂ (25 mM)	3 μ L
	dNTPs (2,5 mM each)	5 μ L
	forward-Primer (20 pmol/ μ L)	1 μ L
	backward-Primer (20 pmol/ μ L)	1 μ L
	Template	20 ng
	Taq-Polymerase	0,5 μ L
	PCR-H ₂ O	ad 50 μ L

Die Amplifikation erfolgt nach dem folgenden Temperatur-Zeit-Schema:

Initiale Denaturierung:	2 min, 94°C
35 Zyklen:	30 sec, 94°C; 1 min, 58°C; 1 min, 72°C
Terminale Elongation:	3 min, 72°C

Nach der Amplifikation werden die einzelnen PCR-Ansätze über ein Agarosegel aufgetrennt, die Banden eluiert und zur Sequenzierung in pGEM[®]-T kloniert.

2.2.6 Agarose Gelelektrophorese

DNA-Fragmente, z.B. aus PCR-Amplifikationen, können über Agarosegele aufgetrennt werden. Die Konzentration des Agarosegels richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (0,7 – 1,5%). Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 120-130 V. Als Größenmarker dient die mit *Pst*I-hydrolysierte λ 590-Phagen-DNA.

DNA-Laufpuffer	TBE-Puffer 10x	100 mL
	H ₂ O	900 mL
	Ethidiumbromid (10 mg/mL)	20 μ L
DNA-Trenngel (1%)	Agarose	1 g
	TBE-Puffer 10x	10 mL
	H ₂ O	90 mL
	Ethidiumbromid (10 mg/mL)	2 μ L

2.2.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente werden über ein Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf dem UV-Schirm ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) nach dem Hersteller-Protokoll (QIAquick™ Spin Handbook, 01/1999).

2.2.8 Ethanolfällung von DNA

DNA kann durch eine ethanolische Niedrigsalzfällung gereinigt oder konzentriert werden. Dazu wird die DNA-Lösung mit 0,1 Volumenteilen 3M Natriumacetat (pH 5) und 2,5 Volumenteilen Ethanol 96% gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 30 Minuten mit 13200 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 300 μ L Ethanol 70% und 15-minütige Zentrifugation wird die DNA entsalzt. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen, das DNA-Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und je nach weiterer Verwendung in 5-50 μ L MilliQ-H₂O oder Low-TE resuspendiert.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

2.2.9.1 Klonierung in pGEM[®]-T

PCR-Fragmente können ohne vorherige Restriktionshydrolyse in den Vektor pGEM[®]-T (Fa. Promega) kloniert werden. Dazu müssen die PCR-Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel eluiert, mit Ethanol gefällt und in 3 µL MilliQ-H₂O resuspendiert werden. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 4°C

Reaktionsansatz:	MilliQ-H ₂ O mit DNA	3 µL
	Rapid Ligation-Puffer 2x	5 µL
	pGEM [®] -T-Vektor	1 µL
	T4-DNA-Ligase (3 U/µL)	1 µL

2.2.9.2 Klonierung in pAK-Vektoren

Sfi I-Restriktionshydrolyse

Für die Klonierung von scFv-Antikörperfragmenten in pAK-Vektoren müssen zunächst das PCR-Amplimer und das Zielplasmid mit dem Restriktionsenzym *Sfi I* geschnitten werden.

Reaktionsansatz:	NEB-Puffer 2 10x	2,0 µL
	BSA 10x	2,0 µL
	<i>Sfi I</i> (20U/µL)	0,5 µL
	MilliQ-H ₂ O mit DNA	15,5 µL

Die Restriktionshydrolyse erfolgt bei 50°C für 3,5 bis 4 Stunden. Anschließend werden die Reaktionsansätze über ein Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden DNA-Fragmente eluiert, mit Ethanol gefällt und in MilliQ-H₂O resuspendiert. Für die nachfolgende Ligation werden DNA-Fragment und Zielplasmid in einem molaren Verhältnis von 2:1 eingesetzt.

Ligation

Reaktionsansatz:	T4-DNA-Ligase-Puffer 10x	2 µL
	ATP (10 mM)	2 µL
	T4-DNA-Ligase (400 NEB U/µL)	1 µL
	MilliQ-H ₂ O mit DNA	14 µL

Die Ligation erfolgt über Nacht bei 16°C.

2.2.10 Transformation von *E. coli*

2.2.10.1 Elektroporation

SOC-Medium	Bacto Trypton	20 g
	Yeast Extract	5 g
	Glucose 20%	5 mL
	H ₂ O	ad 1000 mL
Salz-Lösung	NaCl	1,0 M
	MgCl ₂	0,1 M
	MgSO ₄	0,1 M

Der zu transformierende Ligationsansatz wird mit Ethanol gefällt, entsalzt und in 10 µL MilliQ-Wasser resuspendiert. 5 bis 10 µL dieses Ansatzes werden mit 50 µL einer salzfreien Suspension elektrokompetenter *E. coli*-Zellen gemischt und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgt mit dem Gene Pulser bei einer Kapazität des Plattenkondensators von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Durch die Entladung des Plattenkondensators nehmen die Zellen die DNA auf. Die Zellsuspension wird in 1 mL SOC-Medium aufgenommen und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit 30 µL Salz-Lösung überführt. Nach einer Regenerationszeit von 60 Minuten bei 37°C werden die Zellen auf einer YT-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

Bei der Klonierung in pGEM[®]-T wird zur Überprüfung der Insertion eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu wird die Zellsuspension vor dem Ausplattieren mit 10 µL 0,1M IPTG und 30 µL X-Gal-Lösung versetzt.

2.2.10.2 CaCl₂-Transformation

CaCl ₂ -Transformationspuffer	Tris (pH 7,5)	10 mM
	CaCl ₂	10 mM
	MgCl ₂	10 mM

100-500 ng Plasmid-DNA oder 10 µL eines Ligationsansatzes werden mit 100 µL CaCl₂-Transformationspuffer und 200 µL CaCl₂-kompetenten Zellen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die DNA-Aufnahme in die Zellen erfolgt durch einen raschen Temperaturwechsel zu 37°C für 4 Minuten und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 10 Minuten. Nach der Zugabe von 500 µL YT-Medium wird der Transformationsansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf eine YT-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert. Wie bei der Elektroporation beschrieben, müssen für eine Blau-Weiß-Selektion 10 µL 0,1M IPTG und 30 µL X-Gal-Lösung zugegeben werden.

2.2.11 Anlegen von Bakterien-Gefrierstocks

Zum Anlegen von Bakterien-Gefrierstocks werden 990 μL einer stationär wachsenden Bakterien-Schüttelkultur mit 210 μL Glycerin 86% in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß durch Vortexen gemischt. Die Stocks werden bei -80°C gelagert.

2.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.2.12.1 DNA-Mini-Präparation („Minilytate“)

Resuspensionspuffer (P1)	Tris (pH 8)	25,0 mM
	EDTA	10,0 mM
	Glucose	50,0 mM
Lyse-Puffer (P2)	NaOH	0,2 M
	SDS	1,0 %
Präzipitationspuffer (P3)	Kaliumacetat (pH 4,8)	3,0 M
	Eisessig	2,0 M

Die Bakterienklone werden von der Agarplatte mittels Zahnstocher in 2 mL YT-Medium (inklusive Selektionsantibiotikum) überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen durch Zentrifugation bei 13200 UpM pelletiert und in 100 μL P1 resuspendiert. Anschließend werden 200 μL P2 dazupipettiert, vorsichtig gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur und dann 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 165 μL P3 wird erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert und schließlich 5 Minuten mit 13200 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gereinigt. Die wässrige Phase wird mit 4 μL RNase A (10 mg/mL) versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und in Low-TE resuspendiert.

2.2.12.2 Plasmid-Präparation

Die Isolierung von Plasmiden im präparativem Maßstab erfolgt mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit (Fa. Qiagen) nach den Angaben des Hersteller-Protokolls (QIAGEN® Plasmid Purification Handbook, 01/1999).

2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von klonierten PCR-Fragmenten erfolgt nach dem Cycle-Sequencing-Verfahren unter Verwendung des Cycle Sequencing Kit Big Dye™

Reaktionsansatz:	PCR-H ₂ O	1 µL
	Primer (10 pmol/µL)	1 µL
	DNA	1 µg
	Term. Ready Reaction Mix	2 µL

PCR-Programm: 25 Zyklen: 20 sec, 96°C; 10 sec, 56°C; 4 min, 60°C

Nach dem Cycle-Sequencing wird der Ansatz mit PCR-H₂O auf 50 µL aufgefüllt und die DNA mit unvergälltem Ethanol gefällt. Anschließend wird das Pellet in 12 µL TSR-Reagenz gelöst und die Sequenz mit dem Abi Prism™ 310 DNA-Sequencer (Fa. Perkin Elmer) analysiert. Die Auswertung der DNA-Sequenzen sowie die Übersetzung in die entsprechenden Aminosäuresequenzen erfolgt mit dem Computer-Programm DNA-Strider.

2.2.14 Southern Blot

Denaturierungslösung	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
Neutralisationspuffer	Tris	0,5 M
	NaCl	1,5 M
	EDTA	1,0 M

Beim Southern Blot werden DNA-Proben aus einem Agarosegel auf eine Nylon-Membran übertragen. Dazu wird das Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA für 45 Minuten in der Denaturierungslösung und anschließend für 15 Minuten im Neutralisationspuffer geschwenkt. Der Aufbau des Southern-Blots erfolgt nach Sambrook (Sambrook et. al., 1989) unter Verwendung einer Nylon-Membran (Hybond™-N) und 20x SSC als Transferpuffer. Je nach Größe der DNA-Fragmente und der Konzentration des Agarosegels beträgt die Blot-Dauer 6 bis 16 Stunden. Anschließend wird die Nylon-Membran getrocknet und zur Fixierung der DNA für 2 Stunden bei 80°C im Trockenschrank gebacken.

2.2.15 Kolonien-Fixierung („Colony-lift“)

NaOH-Lösung	NaOH	0,5 %
Neutralisationspuffer	Tris (pH 7,5)	0,50 M
	NaCl	1,50 M
	Natriumcitrat	0,15 M

Die Kolonien-Fixierung dient dazu, Bakterienklone von einer Agar-Masterplatte auf eine Nitrozellulose-Membran zu transferieren, auf der Membran zu lysieren und die DNA zu fixieren. Dabei wird eine Nitrozellulose-Membran (Protran[®] BA 85, Fa. Schleicher & Schuell) 5 bis 10 Minuten auf die Agarplatte gelegt, rasch abgezogen und zur Bakterienlyse für 5 Minuten auf ein mit der NaOH-Lösung getränktes Filterpapier gelegt (3MM, Fa. Schleicher & Schuell). Anschließend wird die Membran getrocknet und 10 Minuten auf einem mit dem Neutralisationspuffer getränktem Filterpapier neutralisiert. Die Nitrozellulose-Membran wird erneut getrocknet, kurz in Ethanol 70% gewaschen und zur Fixierung der DNA 2 Stunden lang bei 80°C im Trockenschrank gebacken.

2.2.16 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Zur radioaktiven 5'-Markierung von Oligonukleotiden wird der folgende Reaktionsansatz 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert:

Reaktionsansatz:	T4-PNK-Puffer 10x	2 µL
	Oligonukleotid (100 pmol/µL)	1 µL
	[γ - ³² P]-ATP (10 mCi/mL)	2 µL
	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µL)	1 µL
	MilliQ-H ₂ O	14 µL

Der Reaktionsansatz wird nach der Inkubation in 20 mL Oligohybridisierungspuffer aufgenommen. Die Hybridisierungslösung wird bei 4°C gelagert.

2.2.17 Hybridisierung von DNA mit radioaktiven Oligonukleotiden

Oligohybridisierungspuffer	SSC	4 x
	Denhardt's	1 x
	SDS	0,1 %
	Natriumpyrophosphat	0,1 %

Die Nylon- bzw. Nitrozellulose-Membran mit der fixierten DNA wird zunächst 30 Minuten lang bei 42°C mit dem Oligohybridisierungspuffer konditioniert und anschließend über Nacht bei 42°C mit der Hybridisierungslösung inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Membran zunächst 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in 4x SSC / 0,1% SDS und anschließend für weitere 10 Minuten bei einer von der Oligonukleotid-Sequenz abhängigen stringenten Temperatur in 4x SSC gewaschen. Die Detektion erfolgt durch Autoradiographie.

Für den zweiten Waschschrift wird in der Regel eine Temperatur T_X gewählt, die um 2°C unterhalb der Schmelztemperatur T_M des radioaktiven Oligonukleotids liegt ($T_X = T_M - 2$). Die Schmelztemperatur T_M errechnet sich nach folgender Formel:

$$T_M [^\circ\text{C}] = 2n_{\text{AT}} + 4n_{\text{GC}} \quad \begin{array}{l} n_{\text{AT}} = \text{Anzahl A und T} \\ n_{\text{GC}} = \text{Anzahl G und C} \end{array}$$

2.2.18 Dehybridisierung von radioaktiv markierter DNA („Stripping“)

Zur Dehybridisierung von DNA, die mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden hybridisiert wurde, wird die Nylon- bzw. Nitrozellulose-Membran 5 Minuten bei 95°C in einer 0,5% SDS-Lösung gekocht. Die dehybridisierte Membran kann anschließend für weitere Hybridisierungen verwendet werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur

2.3.1 Expression von scFv-Antikörperfragmenten in *E.coli*

YT-Repressionsmedium	2xYT-Medium mit 25 µg/mL Chloramphenicol und 1% Glukose
YT-Expressionsmedium	2xYT-Medium mit 25 µg/mL Chloramphenicol und 0,1% Glukose

Bei Plasmiden, die einen LacZ-Promotor besitzen, erfolgt oftmals auch im Ruhezustand eine schwache Expression der Proteine, die von dem Promotor kontrolliert werden. Diese basale Expression kann durch die Zugabe von Glucose zum Medium inhibiert werden (De Bellis et al., 1990). Daher wurde bei der Expression der scFv-Fragmente den entsprechenden Medien 1% bzw. 0,1% Glukose zugesetzt.

2.3.1.1 Expression im analytischen Maßstab

Nach der Klonierung von scFv-Fragmenten in die Expressionsvektoren pAK300 oder pAK400 empfiehlt sich ein Expressions-Screening, da nicht alle Klone ein vollständiges scFv-Protein exprimieren.

Dazu werden 10-12 Klone in jeweils 2 mL YT-Repressionsmedium überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag werden in Reagenzgläsern jeweils 2 mL Expressionsmedium mit 200 µL der Vorkultur beimpft (1:10) und 2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Durch Zugabe von 20 µL 0,1M IPTG (Endkonzentration: 1mM) wird die Proteinexpression gestartet. Nach 4 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation bei 14000 UpM geerntet und durch einen Western-Blot auf die Expression von scFv-Fragmenten getestet.

2.3.1.2 Expression im präparativen Maßstab

Zur präparativen Expression von scFv-Fragmenten werden zunächst 20 mL YT-Repressionsmedium mit einem Bakterien-Klon beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 500 mL YT-Expressionsmedium werden mit 10 mL der Vorkultur beimpft (1:50) und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Expression des Proteins wird durch Zugabe von 250-500 µL 1M IPTG gestartet (Endkonzentration: 0,5-1mM). Die Expressionskultur wird für 4-6 Stunden bei 30°C oder bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 UpM geerntet. Die genauen Expressionsbedingungen müssen für jedes scFv-Fragment individuell ermittelt werden.

2.3.1.3 Periplasmaextraktion

S-Puffer	Tris / HCl (pH 8,0)	100 mM
	Saccharose	0,5 M
	EDTA	1 mM

Bei der präparativen Expression von scFv-Fragmenten mit Hilfe der Plasmide pAK300 oder pAK400 werden die Antikörperfragmente in das Periplasma der Bakterienzellen sezerniert. Eine relativ gute Anreicherung der scFv-Fragmente erhält man nach der Zerstörung der äußeren Zellmembran durch einen osmotischen Schock. Zunächst werden die Zellen von 500 mL Expressionskultur durch 15-minütige Zentrifugation mit 4000 UpM bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wird in 5 mL S-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Sphäroblasten werden anschließend bei 4°C mit 5000 UpM für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand mit der periplasmatischen Zellfraktion wird durch eine weitere 15-minütige Zentrifugation mit 14000 UpM geklärt und gegen PBS dialysiert.

2.3.2 Phagen-Display und Phagen-Panning von scFv-Fragmenten

PEG-Fällungsreagenz	Polyethylenglykol 6000	20 %
	NaCl	2,5 M

2.3.2.1 Phagen-Display

Nach der Klonierung von scFv-Fragmenten in den Phagemid-Vektor pAK100 können die Klone, die ein funktionelles scFv-Fragment exprimieren, über ein Phagen-Panning selektioniert werden (Plückthun, et. al., 1996). Voraussetzung ist die Transformation des Plasmids in einen *E. coli* F⁺-Supressorstamm (z.B. TG1 oder XL1-Blue). Dazu werden zunächst 2 - 3 mL YT-Medium direkt auf die Agarplatte gegeben und die Bakterienklone mit einem Trigalski-Spatel von dem Agar gelöst. 990 µL dieser Bakteriensuspension werden mit 210 µL Glycerin 86 % gemischt und bei -80°C gelagert. Aus diesem Bakterienstock wird eine Vorkultur in YT-Repressionsmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für das Phagen-Panning werden am nächsten Morgen 250 µL dieser Vorkultur in einen Kolben mit 25 mL Repressionsmedium pipettiert (1:100) und bei 30°C mit 180 UpM geschüttelt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wird die Kultur mit 10¹⁰ cfu M13K07-Helferphagen infiziert und 30 Minuten ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach weiteren 30 Minuten bei 180 UpM werden die Bakterienzellen durch 5-minütige Zentrifugation mit 5000 UpM bei 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wird in 25 mL Expressionsmedium resuspendiert. Zur Selektion der Bakterien, bei denen eine erfolgreiche Infektion mit dem Helferphagen stattgefunden hat, wird das Medium mit 25 µg/mL Kanamycin versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C unter Schütteln erfolgt die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 25 µL 1M IPTG (Endkonzentration 1mM). Anschließend werden die einzelnen Ansätze über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Am nächsten Morgen werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 10000 UpM pelletiert. Jeweils 1,6 mL Phagenüberstand werden in einem 2 mL-Reaktionsgefäß mit 400 µL PEG-Fällungsreagenz versetzt, durch Vortexen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird für weitere 30 Minuten bei 4°C mit 13200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Phagen-Pellet in 250 µL PBS (mit 5% Magermilchpulver) resuspendiert.

2.3.2.2 Phagen-Panning

Für das Phagen-Panning wird eine ELISA-Platte über Nacht bei 4°C mit 0,5–1,0 µg Antigen-Protein-Konjugat gecoatet und für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver in 1% PBS blockiert.

Die Phagensuspension wird durch eine Zentrifugation bei 13200 UpM geklärt, bevor jeweils 200 µL dieser Suspension in eine Vertiefung der ELISA-Platte pipettiert werden. Die Mikrotiterplatte mit der Phagen-Suspension wird 2 Stunden lang mit 100 UpM bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Platte 10 mal mit PBS gewaschen. Die gebundenen Phagen werden durch 10-minütige Inkubation mit 200 µL 0,1M Glycin/HCl (pH 2,2) eluiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Diese Phagensuspension wird durch Zugabe von 12,5 µL 2M Tris neutralisiert und kann anschließend nach Zugabe von 0,02% NaN₃ bei 4°C gelagert oder direkt für eine Neuinfektion von Bakterien verwendet werden.

2.3.2.3 Reinfektion von *E. coli*

25 mL YT-Medium (ohne Selektionsantibiotikum) werden mit Zellen eines *E. coli* F⁺-Supressorstamms (z.B. TG1 oder XL1-Blue) beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 5 mL dieser Bakteriensuspension durch Zugabe von 750 µL Phagen-Suspension infiziert und 30 Minuten bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Bakterien 2 Stunden bei 37°C und 180 UpM propagiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (5', 5000 UpM, 4°C) pelletiert und in 500 µL YT-Medium resuspendiert. Ein Aliquot dieser Suspension wird auf eine YT-Agarplatte mit Chloramphenicol (25 µg/ml) als Selektionsantibiotikum ausplattiert. Mit dem Antibiotikum wird auf die Bakterien selektioniert, die mit einem pAK100-haltigen Phagen infiziert wurden.

Nachdem die Agarplatte über Nacht bei 37°C inkubiert wurde, können die Bakterien - wie unter 2.3.2.1 beschrieben - in 2 mL YT-Medium resuspendiert werden. Diese Suspension kann direkt zum Animpfen des nächsten Phagen-Display-Zyklus eingesetzt werden (1/250).

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer 4x	Tris (pH 8,8)	1,5	M
	SDS	0,4	%
Sammelgelpuffer 4x	Tris (pH 6,8)	0,5	M
	SDS	0,4	%
Acrylamid 30,8%	Acrylamid	30,0	%
	Methylenbisacrylamid	0,8	%
Trenngel 10%	H ₂ O	11,6	mL
	Trenngelpuffer 4x	7,0	mL
	Acrylamid 30,8%	9,3	mL
	TEMED	10,0	μL
	APOD	100,0	μL
Trenngel 12 %	H ₂ O	9,2	mL
	Trenngelpuffer 4x	7,0	mL
	Acrylamid 30,8%	11,7	mL
	TEMED	10,0	μL
	APOD	100,0	μL
Sammelgel	H ₂ O	6,2	mL
	Sammelgelpuffer 4x	2,5	mL
	Acrylamid 30,8%	1,3	mL
	TEMED	10,0	μL
	APOD	30,0	μL
Protein-Auftragspuffer 2x	Tris	125,0	mM
	Glycerin 86%	10,0	%
	SDS	2,0	%
	β-Mercaptoethanol	1,0	%
	EDTA	1,0	mM
	Bromphenolblau	0,005	%
SDS-Laufpuffer 10x	Tris	0,25	M
	Glycin	2,00	M
	SDS	1,0	%

Zur Trennung von Proteinen wird eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Protein-Proben werden mit 2x Protein-Auftragspuffer versetzt, 5 Minuten im Wasserbad bei 95°C aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgt bei 30 mA über eine Laufstrecke von 8-10 cm. Anschließend können die Proteine durch eine Coomassie-Färbung oder einen Western-Blot detektiert werden. Die Polyacrylamid-Konzentration des Gels richtet sich nach der Größe der zu trennenden Proteine. Für komplette Antikörpermoleküle (150 kDa) werden 10% Gele, für die deutlich kleineren Antikörperfragmente (25-30 kDa) 12,5% Gele eingesetzt.

2.3.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R 250	0,1 %
	Isopropanol	25,0 %
	Essigsäure (konz.)	10,0 %
Coomassie-Entfärber	Methanol	10,0 %
	Essigsäure (konz.)	7,0 %

Nach der Auftrennung einer Probe durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können die Proteine durch eine Coomassie-Färbung detektiert werden (Neuhoff et al., 1988). Dazu wird das Gel zunächst 30 Minuten in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Nach einer mehrstündigen Behandlung mit dem Entfärber werden die Proteine als blaue Banden sichtbar. Anschließend wird das Gel auf ein 3MM-Filterpapier gelegt und 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.3.5 Western Blot

Anodenpuffer I	Tris (pH10,4)	300 mM
	Methanol	20 %
Anodenpuffer II	Tris (pH10,4)	25 mM
	Methanol	20 %
Kathodenpuffer	Tris (pH7,5)	25 mM
	6-Amino-n-Hexansäure	40 mM
	Methanol	20 %
TBS 10x	Tris (pH7,5)	0,1 M
	NaCl	1,5 M
TBS-T	TBS 10x	100 mL
	H ₂ O	900 mL
	Tween [®] 20	500 µL
BSA-Blockierlösung	BSA	3 g
	TBS-T	100 mL
	NaN ₃ 10%	500 µL
Milch-Blockierlösung	Frema-Magermilchpulver	5 g
	TBS-T	100 mL
Ponceau-Färbelösung	Ponceau S	0,1 %
	Trichloressigsäure	2,0 %
Stripping-Puffer	Glycin (pH2,8)	0,2 M
	NaCl	0,5 M

Beim Western Blot-Verfahren nach der „Semi-Dry“-Methode werden Proteine, die durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, durch Elektro-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran (Protan[®] BA85) übertragen (Towbin et. al., 1979). Der Blot wird dabei in folgender Reihenfolge von der Anode zur Kathode aufgebaut:

- 6 Lagen 3 MM-Papier, getränkt mit Anodenpuffer I
- 3 Lagen 3 MM-Papier, getränkt mit Anodenpuffer II
- Nitrozellulosemembran, zuvor 60 Minuten in H₂O getränkt
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- 6 Lagen 3MM-Papier, getränkt mit Kathodenpuffer

Beim Blot-Aufbau ist darauf zu achten, dass die einzelnen Lagen luftblasenfrei übereinander geschichtet werden. Der Proteintransfer erfolgt bei 0,8 – 1,2 mA/cm². Die Blot-Dauer richtet sich nach der Molekülgröße der zu transferierenden Proteine und liegt zwischen 45 und 90 Minuten.

Anschließend werden die Proteine auf der Membran zur Kontrolle durch eine kurze Inkubation in Ponceau-Lösung angefärbt. Die eigentliche Detektion erfolgt immunochemisch. Dazu wird die Membran zunächst 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in der BSA-Blockierlösung geschwenkt. Nach dem Blockieren wird über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert, dessen optimale Konzentration experimentell ermittelt werden muss (1:1000 bis 1:10000 in BSA-Blockierlösung). Am nächsten Tag wird der nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS-T entfernt und die Membran mehrmals für je 5 Minuten in der Milch-Blockierlösung geschwenkt. Anschließend erfolgt bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem 2. Antikörper, der mit der Milch-Blockierlösung in einem Verhältnis von 1:10000 verdünnt wurde. Nach 60 Minuten wird erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgt durch Chemolumineszenz (ECL[™]-Kit, FA. Amersham Pharmacia Biotech) auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR[™], Fa. Kodak). Die Expositionsdauer beträgt zwischen 3 und 45 Minuten.

Falls die Membran ein weiteres Mal mit einem Antikörper inkubiert werden soll, können die gebundenen Antikörper durch kurzes Waschen mit dem Stripping-Puffer entfernt werden. Durch tropfenweise Zugabe von 0,1 M NaOH wird die Lösung neutralisiert und die Membran in PBS gewaschen. Danach kann eine zweite immunochemische Detektion erfolgen.

2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bradford-Reagenz	Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
	Ethanol 96%	50 mL
	Phosphorsäure 85%	100 mL
	VE-H ₂ O	ad 1000 mL

Bei der Interaktion zwischen Proteinen und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 265 nm nach 595 nm. Daher ist über die OD₅₉₅ die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen möglich (Bradford, 1976). Ein Aliquot der Proteinlösung wird mit Wasser auf 100 µL verdünnt, mit 1 mL Bradford-Reagenz versetzt, durch vortexen gemischt und nach 5 minütiger Inkubation bei 595 nm photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer mitgeführten BSA-Eichlösung berechnet.

2.3.7 Lyophilisation von Proteinlösungen

Zur Lyophilisation von Proteinen wird die wässrige Proteinlösung mehrere Stunden bei -80°C tiefgekühlt, bei -20°C auf ca. -50°C temperiert und anschließend im Lyophilisator (ALPHA 1-2, Fa. Christ) bei -50°C und 0,07 mbar getrocknet.

2.3.8 Etablierung von Hybridomzelllinien zur Produktion von monoklonalen Antikörpern

Die Infektion von Balb/c-Mäusen mit den entsprechenden Antigenen, die Fusion der Milzzellen mit den Myelomzellen NS-1-X63Ag8 und die anschließenden Zellkulturarbeiten erfolgten durch Frau Dr. Ilse Zündorf. Das für die Immunisierung erforderliche Oleanolsäure-Proteinkonjugat wurde von Frau Dr. Kerstin Brand bereitgestellt (Brand, 2002).

2.3.9 Reinigung von Hybridomzellen über einen Ficoll-Gradienten

Mit Hilfe der Ficoll-Reinigung ist es möglich, gesunde Hybridomzellen von toten und apoptotischen Zellen abzutrennen. Dazu werden die Zellen abzentrifugiert und in 1 mL Medium resuspendiert.

In einem 15 mL Falcon-Tube werden 6 mL Ficoll-Lösung vorgelegt und vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 2500 UpM zeichnen sich die lebenden Zellen als weiße Bande im Ficoll-Plaque™-Gradienten ab. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen, die Zellbande in ein neues Falcon-Tube überführt und mit 10 mL Medium gespült. Nachdem die Zellen erneut durch 5 minütige Zentrifugation bei 1200 UpM pelletiert wurden, können sie in frischem Medium resuspendiert und kultiviert werden.

2.3.10 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern

2.3.10.1 Reinigung von IgG-Antikörpern über eine Sepharose Protein-A-Säule

Antikörper vom Isotyp IgG können durch Affinitätschromatographie über eine Protein-A-Sepharosesäule gereinigt und aufkonzentriert werden. Protein-A ist ein 42 kDa großes immunglobulinbindendes Molekül, das ursprünglich aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* isoliert wurde. Es interagiert mit der CH₂- und der CH₃-Domäne des Fc-Teils von IgG-Immunglobulinen. Dabei kann ein Protein-A-Molekül zwei Antikörpermoleküle binden (Forsgren et al., 1966). Murine IgG-Antikörper lassen sich in vier Unterklassen einteilen, die eine unterschiedliche Affinität zu Protein A besitzen. Je nach Unterklasse erfolgt die Aufreinigung daher entweder nach der Hochsalzmethode (IgG₁) oder nach der Niedrigsalzmethode (IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃) (Ey et al., 1978, Harlow et al., 1988). Da die meisten murinen IgG-Antikörper zum IgG₁-Typ gehören, erfolgte die Antikörperaufreinigung in der Regel zunächst nach der Hochsalzmethode. Vor der Aufreinigung müssen die Hybridomzellen in FCS-freiem Medium kultiviert werden, da die im fetalen Kälberserum enthaltenen Antikörper ebenfalls an Protein A binden können.

Hochsalzmethode:

Waschlösung 1	NaCl	3 M
	Na-Borat (pH 8,9)	50 mM
Waschlösung 2	NaCl	3 M
	Na-Borat (pH8,9)	10 mM
Elutionslösung	Glycin (pH 3)	100 mM

Der durch Zentrifugation geklärte Antikörperüberstand wird mit NaCl bis zu einer Endkonzentration von 3,3 mM versetzt. Nach der Zugabe von 0,1 Volumenteilen 1M Na-Borat-Lösung (pH 8,9) wird der Antikörperüberstand sukzessive auf die Sepharose Protein A-Säule gegeben. (Kapazität der Säule: 5 mg mAK pro mL Protein A-Beads. Zur Konditionierung wird die Säule mit 10 mL 0,1 M Na-Borat-Lösung gespült.)

Die Säule wird danach mit jeweils 10 mL Waschlösung 1 und Waschlösung 2 gewaschen. Anschließend werden die an das Protein-A gebundenen Antikörper mit der Elutionslösung eluiert, wobei man zunächst 1 mL der Lösung in die Matrix einlaufen lässt und 5-10 Minuten inkubiert. Danach werden Fraktionen zu je 500 µL gesammelt und jeweils mit 50 µL 1M Tris / HCl (pH 8) neutralisiert. Die antikörperhaltigen Fraktionen werden im ELISA identifiziert, vereinigt und 24 Stunden gegen PBS dialysiert. Die Säule kann nach der Regeneration mit 10 mL 2 M Harnstoff und 10 mL 1 M LiCl erneut konditioniert und für weitere Antikörperaufreinigungen wiederverwendet werden.

Niedrigsalzmethode:

Waschlösung 1	Tris (pH 8,0)	100 mM
Waschlösung 2	Tris (pH 8,0)	10 mM
Elutionslösung	Glycin (pH 3)	100 mM

Der durch Zentrifugation geklärte Antikörperüberstand wird mit 0,1 Volumenteilen 1 M Tris (pH 8,0) versetzt und sukzessive auf die Protein-A-Säule gegeben. Das weitere Vorgehen entspricht der Hochsalzmethode.

2.3.10.2 Ammoniumsulfatfällung von IgM-Antikörpern

Antikörper vom Subtyp IgM werden von Protein A nicht gebunden und können daher nicht, wie unter 2.3.10.1 beschrieben, aufgereinigt werden. Es ist aber möglich, sie mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung fraktioniert aus dem Hybridoma-Überstand auszufällen, ohne dass eine Denaturierung erfolgt (Würzner et al., 1990). Die Löslichkeit der meisten Proteine wird durch hohe Salzkonzentrationen herabgesetzt. Die Salzkonzentration, bei der ein Protein ausfällt, unterscheidet sich von Protein zu Protein. Daher ist es möglich, einzelne Proteine aus einem komplexen Gemisch durch Aussalzen zu fraktionieren. Antikörper vom IgM-Typ fallen selektiv bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Endkonzentration von 28% aus dem Hybridomaüberstand aus. Auch bei dieser Methode müssen die Hybridomzellen vor der Aufreinigung in FCS-freiem Medium kultiviert werden.

Zur Herstellung des Fällungsreagenzes wird $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ so lange in VE-Wasser eingerührt, bis es sich nicht mehr löst (Sättigungskonzentration: 3,9 Mol/L bei 4°C, pH 4,4). Die für die Fällung der IgM-Antikörper erforderliche Menge an Fällungsreagenz V_x berechnet sich nach folgender Formel:

$$V_x = \frac{c_x - c_0}{1 - c_x} V_0$$

c_x = Endkonzentration der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (hier: 0,28)

c_0 = Anfangskonzentration der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung

V_0 = Volumen der Antikörperlösung

Der Antikörperüberstand wird langsam unter Rühren mit der eiskalten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt und 60 Minuten im Eisbad gerührt. Anschließend werden die ausgefallenen Antikörper durch 20 minütige Zentrifugation mit 20000 g bei 4°C pelletiert und in PBS resuspendiert. Es folgt eine Proteinbestimmung nach Bradford und die Kontrolle der Antikörper im ELISA und durch SDS-PAGE.

2.3.11 Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)

Coating-Puffer 10x (pH 9,6)	Na ₂ CO ₃	15,0 mM
	NaHCO ₃	30,0 mM
PBS 10x (pH 7,2)	Na ₂ HPO ₄	80,0 mM
	KH ₂ PO ₄	15,0 mM
	KCl	25,0 mM
	NaCl	1,4 M
Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,3)	Na ₂ HPO ₄ (1M)	36,45 mL
	NaH ₂ PO ₄ (1M)	13,55 mL
KPB (pH 7,4)	K ₂ HPO ₄ (1M)	416,77 mL
	KH ₂ PO ₄ (1M)	83,33 mL
ELISA-Waschpuffer	KPB (pH 7,4)	250,0 mL
	Tween 20	12,5 mL
	H ₂ O	ad 500,0 mL

2.3.11.1 Indirekter ELISA

Eine ELISA-Mikrotiterplatte wird mit 100 oder 200 µL Coating-Lösung pro Vertiefung über Nacht bei 4°C gecoatet. Bei der Coating-Lösung handelt es sich um ein Hapten-Protein-Konjugat, z.B. Oleanylsuccinat-BSA, das in 1x Coating-Puffer gelöst oder homogen suspendiert wird. Die genaue Konjugat-Menge muss experimentell ermittelt werden (0,4-0,8 µg pro Well).

Am nächsten Tag wird die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte mit 5% Milchpulver in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert (300 µL pro Well). Anschließend wird 5 mal mit Waschpuffer gewaschen und der Hybridoma-Überstand bzw. der daraus aufgereinigte Antikörper in die Vertiefungen pipettiert (100-200 µL pro Well). Dieser Erstantikörper wird mit PBS auf eine zuvor im Rahmen eines Checkerpoint-ELISA (vgl. 2.3.11.2) experimentell ermittelte Konzentration eingestellt. Nach 60 minütiger Inkubation wird erneut 5 mal mit Waschpuffer gewaschen. Der Nachweis des Erstantikörpers erfolgt mit einem Anti-Mouse-Antikörper-Peroxidase-Konjugat, das mit PBS auf eine Konzentration von 1:2500 - 1:5000 verdünnt wird (100-200 µL pro Well). Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird wiederum 5 mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Quantifizierung erfolgt letztendlich durch die Umsetzung des Farbstoffs 2,2'-Azinodiethylbenzothiazolinsulfonsäure (ABTS) durch die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase. Das Enzym katalysiert die Spaltung von Wasserstoffperoxid, wodurch letztendlich das Chromogen ABTS in ein grün gefärbtes Radikalkation umgewandelt wird. Die Intensität dieser Grünfärbung wird nach 30 Minuten im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen. Sie korreliert mit der Menge an gebundenem Zweitantikörper und somit auch mit der Konzentration des gebundenen Erstantikörpers.

2.3.11.2 Checkpoint-ELISA

Mit Hilfe eines Checkpoint-ELISAs wird das optimale Verhältnis zwischen der Antigen- und der Antikörperkonzentration für den indirekten ELISA und den indirekten Kompetitions-ELISA ermittelt. Dabei wird zunächst eine Verdünnungsreihe der Antikörperlösung hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen (z.B. 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, etc...) werden jeweils gegen unterschiedliche Protein-Konjugat-Mengen inkubiert (z.B. 0,25 µg, 0,5 µg, 0,75 µg, etc...). Die Durchführung erfolgt dabei prinzipiell wie unter 2.3.11.1 beschrieben. Die Auswertung erfolgt graphisch durch Auftragen des Extinktionskoeffizienten E/E_0 gegen die Verdünnungsstufe der Antikörperlösung. Bei einer optimalen Konjugatkonzentration ergibt sich eine sigmaoide Titrationskurve mit einer deutlichen, linearen Steigung zwischen den kleinsten Extinktionswerten und der Sättigung. Die optimale Antikörperverdünnung kann man aus dem zentralen Bereich dieser Steigung ableiten.

2.3.11.3 Indirekter Kompetitions-ELISA

Der indirekte Kompetitions-ELISA wurde zur Bestimmung der Spezifität der Oleanolsäure-Antikörper bzw. zur Untersuchung von wässrigen und methanolischen Arzneipflanzenextrakten eingesetzt. Vor dem Kompetitions-ELISA werden die Kompetitoren in 5 mL Glasgefäße eingewogen und mit Methanol gelöst. Die Konzentration dieser Stammlösungen soll 2 µmol/µl betragen.

Die Kompetitoren werden in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM im Kompetitions-ELISA getestet (entsprechend 5 µmol, 10 µmol und 20 µmol pro 100 µL-Ansatz). Da sich das Lösungsmittel auf den ELISA auswirkt, muss darauf geachtet werden, dass in allen Ansätzen, die miteinander verglichen werden sollen, die gleiche Lösungsmittelkonzentration enthalten ist. Die Tabelle zeigt das Pipettierschema für einen typischen Kompetitions-ELISA, wie er für die Bestimmung der Antikörperspezifität durchgeführt wurde.

Konzentration	Antikörper	PBS	Kompetitor	Methanol
0 mM	x µL	ad 100 µL	0 µL	10,0 µL
50 mM	x µL	ad 100 µL	2,5 µL	7,5 µL
100 mM	x µL	ad 100 µL	5,0 µL	5,0 µL
200 mM	x µL	ad 100 µL	10,0 µL	0 µL

Tabelle 2.1 Pipettierschema beim indirekten Kompetitions-ELISA

Da das Lösungsmittel einen großen Einfluss auf das Versuchsergebnis hat, muss beim indirekten Kompetitions-ELISA darauf geachtet werden, dass in allen Ansätzen die gleiche Methanol-Konzentration enthalten ist.

Die ELISA-Mikrotiterplatte wird, wie unter 2.3.11.1 beschrieben, gecoatet, mit Milch blockiert und mit Waschpuffer gewaschen. Der Erstantikörper wird in einem 5 mL-Glasgefäß mit PBS auf eine vorher ermittelte Konzentration verdünnt, mit dem Kompetitor bzw. dem Arzneipflanzenextrakt gemischt und 90 Minuten bei 150 UpM vorinkubiert. Anschließend werden jeweils 100 µL dieser Lösung in die Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert und erneut für 90 Minuten ohne Schütteln inkubiert. Nach dem Waschen wird der gebundene Erstantikörper durch 60-minütige Inkubation mit dem Anti-Mouse-Antikörper-Peroxidase-Konjugat (1:5000) detektiert. Der Nachweis des Zweitantikörpers erfolgt wiederum durch Zugabe von ABTS und photometrischer Vermessung im ELISA-Reader bei 405 nm.

2.3.11.4 Direkter Kompetitions-ELISA

Beim direkten Kompetitions-ELISA wird die ELISA-Mikrotiterplatte mit dem aufgereinigten Erstantikörper über Nacht bei 4°C gecoatet (200 µL pro Well), mit Milch blockiert und 5 mal mit Natriumphosphatpuffer (50mM, pH 7,3) gewaschen. Der Kompetitor wird mit dem Oleanolsäure-β-Galactosidase-Konjugat in einem 5 mL Glasgefäß gemischt. Anschließend werden jeweils 200 µL dieser Mischung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 90 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt der Nachweis des gebundenen Oleanolsäure-β-Galactosidase-Konjugats über Umsetzung des Farbstoffs Chlorphenolrot-β-D-galaktopyranosid (CPRG). Die Auswertung erfolgt nach 30 Minuten durch photometrische Vermessung im ELISA-Reader bei 550 nm. Da der ELISA-Waschpuffer die β-Galactosidase-Aktivität stört, muss bei dieser Methode nach jedem Schritt mit Natriumphosphatpuffer (50mM, pH 7,3) gewaschen werden.

2.3.12 Herstellung von Oleanolsäure-Protein-Konjugaten

2.3.12.1 Kopplung von Oleanolsäure und BSA

Die Kopplung von Oleanolsäure an BSA erfolgt nach dem von Vaughan beschriebenen gemischten Anhydridverfahren (Vaughan et al., 1952). Vor der eigentlichen Protein-Konjugation kann die Oleanolsäure mit Bernsteinsäureanhydrid zum Oleanylsuccinat umgesetzt werden.

Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat

Für die Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat werden 23 mg Oleanolsäure, 12 mg Bernsteinsäureanhydrid und 7 mg 4-Dimethylaminopyridin in 10 mL Dichlormethan gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird überschüssiges Bernsteinsäureanhydrid durch dreimaliges Ausschütteln mit Wasser abgetrennt, die Dichlormethanphase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abrotiert.

Kopplung von Oleanolsäure bzw. Oleanylsuccinat mit BSA

Lösung 1: 7,7 mg BSA werden in 1,1 mL H₂O gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 96 µL 1N NaOH auf 10 eingestellt. Nach der Zugabe von 0,8 mL Dioxan wird die Lösung auf 8°C abgekühlt.

Lösung 2: 6 mg Oleanolsäure bzw. Oleanylsuccinat werden in 1 mL trockenem Dioxan suspendiert und auf 8°C abgekühlt. Anschließend werden unter Rühren 2,7 µL Tri-N-butylamin und 1,5 µL Chlorameisensäurebutylester dazupipettiert. Die Lösung wird 20 Minuten lang bei 8°C inkubiert.

Nach der Herstellung der beiden Reaktionslösungen wird Lösung 2 unter starkem Rühren mit Lösung 1 versetzt. Der durch die schwerlösliche Oleanolsäure trübe Reaktionsansatz wird 4 Stunden lang bei 8°C gerührt. Anschließend wird die Suspension 4 Tage lang gegen Isopropanol und H₂O (2L / 5mL Suspension) dialysiert. Die Oleanolsäure-BSA-Suspension wird lyophilisiert und in PBS resuspendiert. Die Analytik von Zwischen- und Endprodukten erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Außerdem wird eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.3.12.2 Kopplung von Oleanolsäure und β -Galactosidase

100 µg Oleanolsäure, 9,5 mg 1,1'-Carbonyldiimidazol und 7,5 mg N-Hydroxy-succinimid werden in 300 µL Dioxan (80%) gelöst, 12 Stunden bei 37°C inkubiert und mit 5 mL H₂O verdünnt. Dieser Ansatz wird zweimal mit je 5 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit H₂O gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und abfiltriert. Anschließend wird das Lösungsmittel vorsichtig im Vakuum abrotiert. Der Rückstand wird mit 0,5 mg *E.coli* β -Galactosidase gemischt und in 200 µL Natriumphosphatpuffer (50mM, pH 7,3) gelöst. Die Lösung wird über Nacht bei 4°C inkubiert und durch Größenausschlusschromatographie über eine Sephadex-G25-Säule (1,1 x 33 cm) gereinigt. Die Elution erfolgt mit Natriumphosphatpuffer (50mM, pH 7,3), wobei ca. 40 Fraktionen zu je 1,0 mL gesammelt werden. Der Nachweis der aktiven Fraktionen erfolgt durch Umsetzung des Farbreagens CPRG und photometrischer Auswertung bei 550 nm im ELISA-Reader (Yamamoto et. al., 1987). Nach der Vereinigung der aktiven Fraktionen wird die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

2.4 Phytochemische und analytische Methoden

2.4.1 Extraktion von Arzneipflanzen

2.4.1.1 Wässrige Extraktion

Zur Herstellung der Arzneipflanzenextrakte wird das getrocknete Drogenmaterial mit Hilfe einer Analysen-Mühle A10 (Fa. Janke & Kunkel) fein zermahlen. 1 g der zerkleinerten Droge wird in einem Erlenmeyerkolben mit 10 mL demineralisiertem Wasser 5 Minuten lang gekocht. Nach dem Abkühlen der Mischung wird die Droge abfiltriert und der Filtrückstand ausgepresst. Die wässrigen Arzneipflanzenextrakte werden bei 4°C gelagert.

2.4.1.2 Methanolische Extraktion

Die Herstellung der methanolischen Drogenextrakte erfolgt durch Mazeration. Dabei wird 1 g der fein zerkleinerten Droge mit 10 mL Methanol versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert. Anschließend wird die Droge abfiltriert, der Filtrückstand ausgepresst und der Auszug bei 4°C gelagert.

2.4.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Fließmittel 1	Chloroform	95,0 %
	Methanol	5,0 %
Fließmittel 2	Isopropanol	80,0 %
	Wasser	15,0 %
	Ameisensäure	5,0 %
Detektionsreagenz	Anisaldehyd	0,5 mL
	Essigsäure	10,0 mL
	Methanol	85,0 mL
	Schwefelsäure	5,0 mL

Die Untersuchung der triterpensaponinhaltigen Arzneimittelextrakte erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie. Die Auftrennung erfolgt nach der Kammersättigung auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F²⁵⁴ (Fa. Merck) mit Fließmittel 1 oder Fließmittel 2 über eine Laufstrecke von 10 cm. Nach dem Entwickeln werden die DC-Platten getrocknet, mit dem Detektionsreagenz gleichmäßig besprüht und 5 Minuten auf 120°C erhitzt. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen das pentazyklische Triterpensapogenin Oleanolsäure

3.1.1 Etablierung verschiedener Hybridomzelllinien

Die Etablierung der Hybridomzelllinien, die die monoklonalen Antikörper gegen das Triterpensapogenin Oleanolsäure sezernieren, erfolgte durch Frau Dr. Ilse Zündorf. Für die Immunisierung der Mäuse wurden unterschiedliche Oleanolsäure-Thyreoglobulin-Konjugate eingesetzt, die von Frau Dr. Kerstin Brand (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurden (Brand, 2003).

3.1.1.1 Herstellung der Proteinkonjugate für die Immunisierung

Ein in den Säugetierorganismus injiziertes Molekül löst erst ab einer Mindestgröße von 1000 Dalton eine Immunreaktion aus (Erlanger, 1980). Oleanolsäure ist mit einem Molekulargewicht von 456,71 Dalton daher selbst nicht immunogen. Aus diesem Grund war die Verwendung von Proteinkonjugaten für die Immunisierung erforderlich. Durch die Kopplung des Haptens Oleanolsäure an das Trägerprotein Thyreoglobulin entsteht ein Molekül, das groß genug ist, um das Immunsystem der Maus zu aktivieren und die Bildung von Antikörpern auszulösen.

Die Herstellung der Proteinkonjugate erfolgte nach der Methode des gemischten Anhydridverfahrens (Vaughan et al., 1952). Die Oleanolsäure besitzt mit der Hydroxylfunktion an C3 und der Carboxylfunktion an C27 zwei funktionelle Gruppen, über die eine Konjugation mit Thyreoglobulin möglich ist. Die Aktivität der Carboxylfunktion ist für eine direkte Kopplung ausreichend. Die Hydroxylfunktion an C3 muss hingegen zunächst durch eine Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid aktiviert werden. Die Kopplung mit Thyreoglobulin erfolgt dann über die freie Carboxylfunktion der Bernsteinsäure. Die Einführung dieses Succinat-Spacers verbessert außerdem die Spezifität (Lindner et al., 1972) und die Erkennbarkeit des Zielmoleküls (Mould et al., 1977).

Ein Problem bei der Herstellung der Proteinkonjugate war deren schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien. Bei der Immunisierung wurden sowohl lösliche, als auch unlösliche Fraktionen eingesetzt (Tabelle 3.1)

Name	Zielmolekül	Trägerprotein	Fraktion
OL A	Oleanolsäure	Thyreoglobulin	gelöst in PBS
OL B	Oleanolsäure	Thyreoglobulin	unlöslich, suspendiert in PBS
OLSUC A	Oleanylsuccinat	Thyreoglobulin	gelöst in 50% Isopropanol
OLSUC B	Oleanylsuccinat	Thyreoglobulin	unlöslich, suspendiert in PBS

Tab. 3.1 Konjugate für die Immunisierung (nach Brand, 2003)

3.1.1.2 Immunisierung und Screening

Die verschiedenen Proteinkonjugate wurden je einer weiblichen Balb/C-Maus intraperitoneal injiziert. Die Immunisierungen wurden über einen Zeitraum von vier (OL-Konjugate) bzw. fünf Monaten (OLSUC-Konjugate) im Abstand von 15 bis 20 Tagen durchgeführt, bis sich ein stabiler Antikörpertiter eingestellt hatte. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milz präpariert und die B-Lymphozyten durch Auswaschen aus dem Milzgewebe gewonnen. Die isolierten B-Lymphozyten wurden mit frisch kultivierten NS-1/1-Ag4-1-Myelomzellen fusioniert. Nach der HAT-Selektion wurden die Hybridomzellen in Mikrotiterplatten vereinzelt. Insgesamt wurden für jeden Ansatz mehr als 1000 Klone etabliert, deren Kulturüberstände anschließend im ELISA auf eine Bindung gegen Oleanolsäure untersucht wurden. Nach dem Abschluss dieses Screenings hatten sich drei Zellklone herauskristallisiert, bei denen eine nähere Charakterisierung der Antikörper lohnenswert erschien. Die Zelllinie 10F10 wurde unter Verwendung des löslichen Oleanolsäure-Thyreoglobulin-Konjugats (OL A) gewonnen. Bei den beiden Zelllinien 6C2 und 7A6 erfolgte die Immunisierung mit dem unlöslichen Oleanylsuccinat-Thyreoglobulin-Konjugat (OLSUC B)

3.1.2 Synthese von Oleanolsäure-BSA-Konjugaten für die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Für die Herstellung von Oleanolsäure-Konjugaten zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurde BSA als Trägerprotein gewählt. Durch den Wechsel des Trägerproteins von Thyreoglobulin zu BSA konnte ausgeschlossen werden, dass Antikörper charakterisiert werden, die an den Proteinteil des Konjugats binden. Die Kopplung erfolgte, wie im Abschnitt 2.3.12.1 erläutert, nach dem gemischten Anhydridverfahren (Vaughan et al., 1952). Das BSA wurde dabei entweder direkt an die C27-Carboxylgruppe der Oleanolsäure gekoppelt oder es erfolgte zunächst eine Aktivierung der Oleanolsäure an der C3-Hydroxyfunktion, gefolgt von der Kopplung des Proteins an den eingeführten Succinat-Spacer.

3.1.2.1 Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat

Um die C3-Hydroxyfunktion der Oleanolsäure für die Proteinkopplung zu aktivieren, erfolgte eine Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid im wasserfreien Medium (Erlanger, 1973). Als Protonenfänger wurde Dimethylaminopyridin (DMAP) eingesetzt.

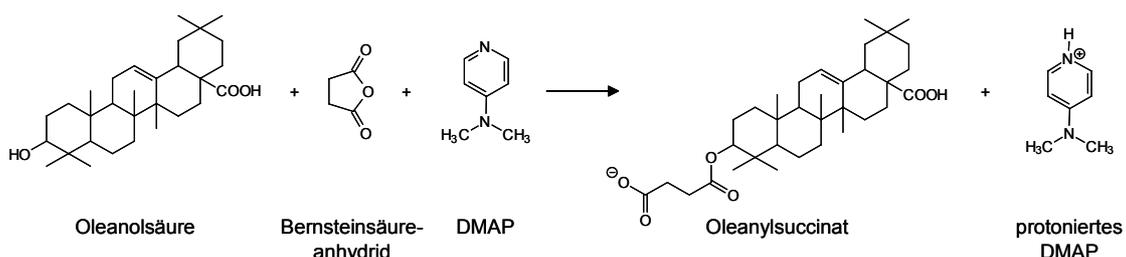


Abb. 3.1 Mechanismus der Veresterung von Oleanolsäure und Bernsteinsäureanhydrid

Die Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat verlief mit einer ca. 50 prozentigen Ausbeute, wie durch dünnschichtchromatographische Analytik semi-quantitativ ermittelt werden konnte. Da bei der Antikörpercharakterisierung eine Mischung von Oleanylsuccinat-BSA und Oleanolsäure-BSA nicht nachteilig ist, wurde auf die aufwendige Trennung des Oleanylsuccinats von der nicht umgesetzten Oleanolsäure verzichtet.

3.1.2.2 Proteinkopplung nach dem gemischten Anhydridverfahren

Oleanolsäure oder Oleanylsuccinat wurden nach einer ursprünglich zur Peptidsynthese entwickelten Methode mit dem Trägerprotein gekoppelt (Vaughan et al., 1952). In der zweistufigen Reaktion wurde zunächst die Carboxylfunktion des Haptens im organischen Milieu durch Chlorameisensäureisobutylester aktiviert. Im zweiten Schritt wurde das Triterpenmolekül nach Zugabe der wässrigen Proteinlösung über eine Peptidbindung mit dem BSA-Molekül kovalent verknüpft.

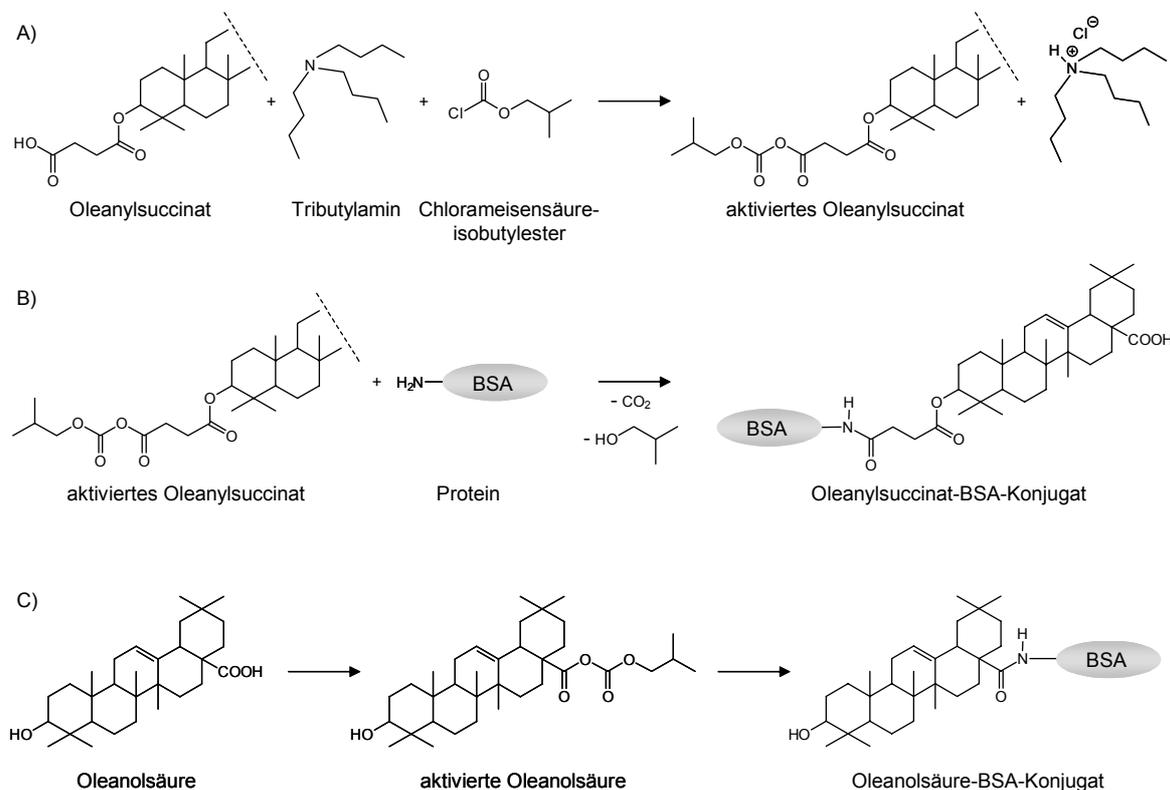


Abb. 3.2 Mechanismus der Proteinkopplung nach dem gemischten Anhydridverfahren

A) Oleanylsuccinat wird in Dichlormethan mit Chlorameisensäureisobutylester und Tributylamin umgesetzt. Dabei wird die Carboxylfunktion des Succinats für die Proteinkopplung aktiviert.

B) Das aktivierte Oleanylsuccinat wird mit BSA unter Ausbildung einer Peptidbindung gekoppelt. Der überschüssige Chlorameisensäureisobutylester wird durch die Wasserzugabe inaktiviert.

C) Oleanolsäure kann auch direkt über die Carboxylfunktion an C27 mit BSA gekoppelt werden. Der Reaktionsmechanismus verläuft dabei analog zu A) und B).

3.1.2.3 Reinigung und Charakterisierung der Proteinkonjugate

Nach der Herstellung der Proteinkonjugate wurden Verunreinigungen und Synthesedukte durch eine mehrtägige Dialyse entfernt. Da sich die nicht umgesetzte Oleanolsäure in Wasser sehr schlecht löst, hat sich eine 24-stündige Dialyse mit 70% Isopropanol, das anschließend durch Wasser ersetzt wurde, als vorteilhaft erwiesen. Da auch das Oleanolsäure- bzw. das Oleanylsuccinat-Konjugat in Wasser nur schwer löslich ist, blieb das Dialysat getrübt. Durch eine dünnschichtchromatographische Analyse wurde überprüft, ob tatsächlich alle Verunreinigungen entfernt wurden.

Nach erfolgreicher Dialyse wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Anschließend wurde das Proteinkonjugat durch Elektrophorese über ein 7% SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. Wie man anhand der Abbildung 3.3 erkennen kann, ist beim Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat im Vergleich zu reinem BSA eine deutliche Größenzunahme von 8 – 10 kDa zu erkennen. Anhand dieser Massendifferenz kann man auf eine Belegungsrate von 14 bis 18 Molekülen Oleanylsuccinat schließen ($M_{w_{OL-SUC}} = 556 \text{ g/mol}$). Die Funktionalität der Proteinkonjugate wurde im ELISA überprüft.

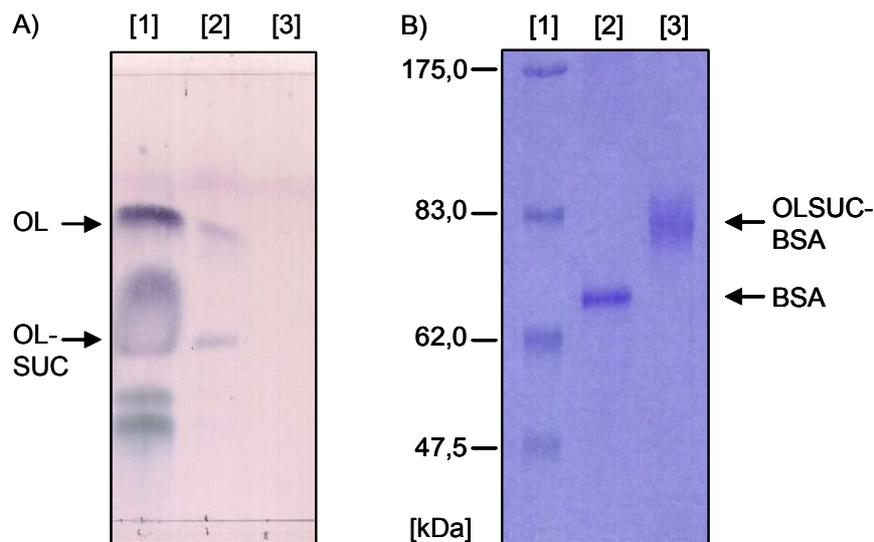


Abb. 3.3 Reinigung und Charakterisierung der Proteinkonjugate

A) Dünnschichtchromatogramm eines Oleanylsuccinat-BSA-Konjugats. [1] Vor der Dialyse enthält der Reaktionsansatz noch zahlreiche Verunreinigungen. [2] Nach 72-stündiger Dialyse gegen Wasser enthält das Dialysat immer noch schwerlösliche Oleanolsäure (OL) und Oleanylsuccinat (OLSUC). [3] Durch 24-stündige Dialyse gegen 70% Isopropanol und 48-stündige Dialyse gegen Wasser lassen sich alle Verunreinigungen entfernen. (Die DC-Analytik wurde entsprechend 2.4.2 in Fließmittel 1 durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils 20 μL .)

B) SDS-PAGE (7%) eines Oleanylsuccinat-BSA-Konjugats. Eine Größenzunahme durch die Kopplung der Oleanolsäure an BSA ist deutlich zu erkennen. BSA hat ein Molekulargewicht von 66,2 kDa. Die Molekülgröße des Oleanylsuccinat-BSA-Konjugats liegt bei ca. 75-80 kDa. Während BSA [2] eine relativ scharfe Bande ergibt, deutet die unscharfe Bande des Proteinkonjugats [3] auf eine Mischung von BSA-Molekülen mit unterschiedlicher Oleanylsuccinat-Belegungsrate hin. ([1] = Größenmarker, Auftragsmenge von [2] und [3]: ca. 1 μg)

3.1.3 Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Antikörper

Für die Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Antikörper wurden zunächst Aliquots der drei Hybridomaüberstände über ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend durch Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte immunochemisch unter Verwendung von isotypspezifischen Antikörpern. Dabei wurde die Membran entweder mit einem Anti-Mouse-IgG-POD-Konjugat oder mit einem Anti-Mouse-IgM-POD-Konjugat inkubiert. Wie man anhand der Abbildung 3.4 erkennen kann, handelt es sich bei den Antikörpern der Zelllinien 6C2 und 7A6 erwartungsgemäß um Immunglobuline des Isotyps IgG. Die Hybridomzelllinie 10F10 sezerniert hingegen wider Erwarten einen Antikörper des Isotyps IgM. Im Rahmen einer sekundären Immunantwort, die durch die wiederholte Immunisierung der Mäuse stimuliert wird, werden in der Regel IgG-Antikörper produziert. Die Bildung von IgM-Antikörpern ist eher die Ausnahme. Zudem wurde das ELISA-Screening der Hybridoma-Klone mit einem Anti-Mouse-IgG-POD-Konjugat durchgeführt, so dass eigentlich nur die Zellklone als positiv getestet werden sollten, die einen IgG-Antikörper sezernieren.

Die Ergebnisse der immunochemischen Isotypenbestimmung konnten im indirekten ELISA bestätigt werden. Dabei wurden jeweils 100 μ L einer 1/10-Verdünnung der Hybridomaüberstände gegen 0,5 μ g Oleanolsäure-BSA-Konjugat eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einer 1/2500-Verdünnung des Anti-Mouse-IgG-POD-Konjugats oder des Anti-Mouse-IgM-POD-Konjugats. Es wurde festgestellt, dass der Anti-Mouse-IgG-Antikörper in der eingesetzten Konzentration eine Kreuzreaktivität mit Antikörpern des Isotyps IgM aufweist. Daher wurde der 10F10-IgM-Antikörper bei dem ELISA-Screening der Hybridoma-Klone auch zunächst als IgG-Antikörper identifiziert.

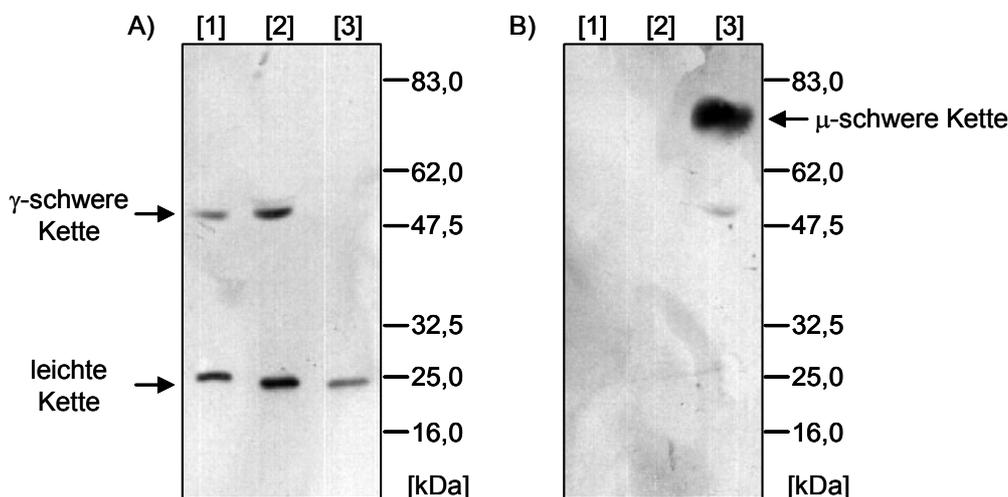


Abb. 3.4 Isotypenbestimmung der monoklonalen Antikörper 6C2, 7A6 und 10F10 (A+B)

A) Inkubation der Western-Blot-Membran mit **Anti-Mouse-IgG-POD-Konjugat** (1/10000). Bei den Antikörpern der Zelllinien 7A6 [1] und 6C2 [2] ist sowohl die leichte Kette (ca. 25 kDa) als auch die γ -schwere Kette (ca. 50 kDa) zu erkennen. Beim Antikörper der Zelllinie 10F10 [3] wird nur die leichte Kette detektiert.

B) Inkubation der Western-Blot-Membran mit **Anti-Mouse-IgM-POD-Konjugat** (1/10000). Mit dem Anti-IgM-Antikörper wird ausschließlich die μ -schwere Kette des Antikörpers der Zelllinie 10F10 [3] detektiert.

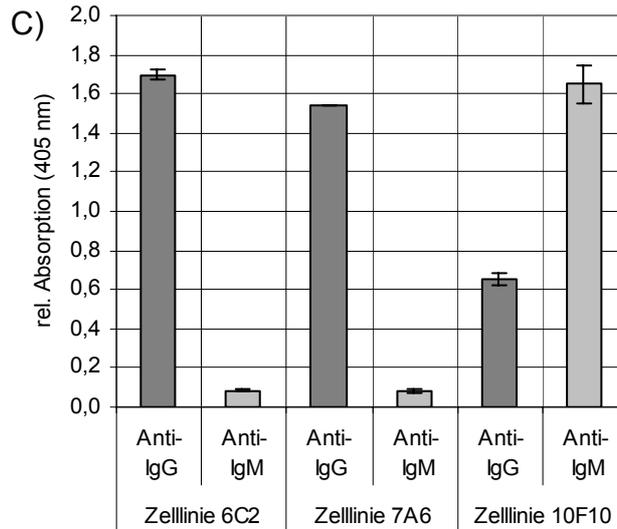


Abb. 3.4 Isotypenbestimmung der monoklonalen Antikörper 6C2, 7A6 und 10F10 (C)

C) Überprüfung der Hybridomaüberstände im **indirekten ELISA**. Die Zellkulturüberstände wurden in einer 1/10 Verdünnung gegen 0,5 µg OLSUC-BSA inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte für jeden Überstand parallel mit Anti-Mouse-IgG- bzw. Anti-Mouse-IgM-POD-Konjugat. Der Anti-IgG-Antikörper zeigt in der eingesetzten Konzentration (1/2500) eine Kreuzreaktivität mit Immunglobulinen des Subtyps IgM.

3.1.4 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper

Für die spätere Charakterisierung mussten die monoklonalen Antikörper zunächst aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt werden. Antikörper vom IgG-Isotyp können durch Affinitätschromatographie über eine Protein-A-Säule gereinigt und aufkonzentriert werden. IgM-Immunglobuline binden nicht an Protein-A, können aber durch eine fraktionierte Proteinfällung aus dem Hybridomaüberstand gewonnen werden.

3.1.4.1 Affinitätschromatographische Reinigung der IgG-Antikörper der Zelllinien 6C2 und 7A6

Die Antikörper der Zelllinien 6C2 und 7A6 wurden affinitätschromatographisch über eine Protein-A-Sepharose-Säule nach der Hochsalzmethode, wie in Abschnitt 2.3.10.1 beschrieben, aufgereinigt (Ey et. al., 1978, Harlow et al., 1988).

Die Kontrolle der aufgereinigten Antikörperlösung erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese über ein 10%-PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung oder immunochemischer Detektion auf einer Western-Blot-Membran.

Abbildung 3.5 zeigt einen direkten Vergleich zwischen dem Hybridomaüberstand vor der Reinigung und dem Säuleneluat nach der Affinitätschromatographie. Im coomassie-gefärbten Gel (A) kann man erkennen, dass durch die Protein-A-Aufreinigung fast alle Verunreinigungen entfernt wurden. Bei immunochemischer Detektion (B) sieht man einen starken Konzentrationseffekt.

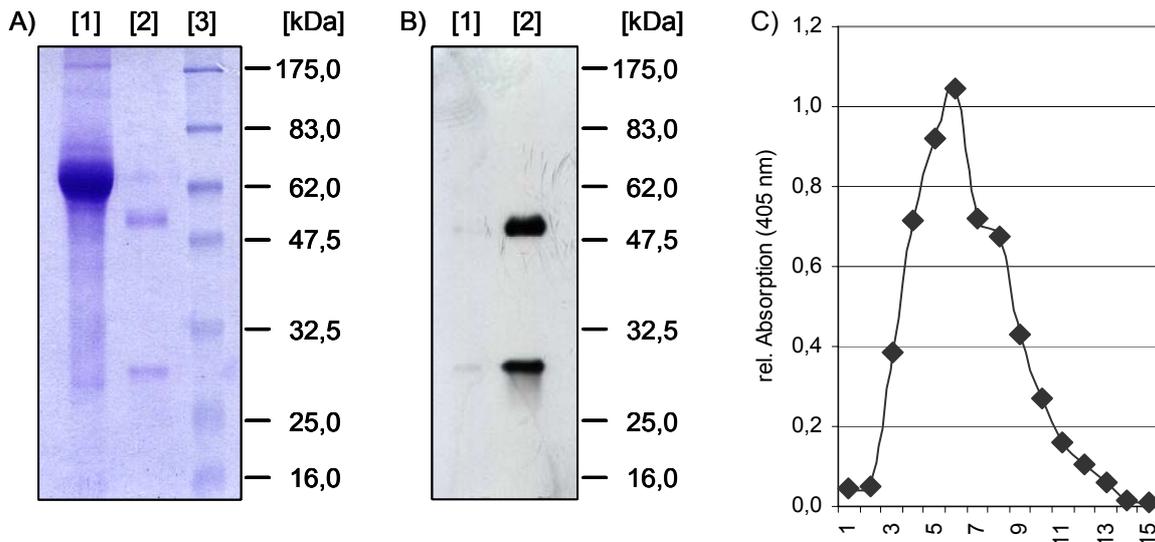


Abb. 3.5 Affinitätschromatographische Reinigung des Antikörpers der Zelllinie 6C2

A) Der Hybridomaüberstand enthält zahlreiche Verunreinigungen, die durch die affinitätschromatographische Aufreinigung über die Protein-A-Säule fast vollständig entfernt werden. [1]: Hybridomaüberstand vor der Aufreinigung; [2]: aufgereinigter Antikörper; [3]: Größenmarker; (10% PAA-Gel; Auftragsmenge: 15 μ L; Coomassie-Färbung;)

B) Durch die affinitätschromatographische Aufreinigung wird die Antikörperlösung gleichzeitig stark konzentriert. [1]: Hybridomaüberstand vor der Aufreinigung; [2]: aufgereinigter Antikörper; (10% PAA-Gel; Auftragsmenge: 15 μ L; immunochemische Detektion mit Anti-Mouse-IgG-POD)

C) Elutionsprofil der affinitätschromatographischen Aufreinigung über eine Protein-A-Säule. Die Fraktionen 3–10 wurden vereinigt und über Nacht gegen PBS dialysiert (ELISA gegen 0,5 μ g Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat).

3.1.4.2 Reinigung der IgM-Antikörper der Zelllinie 10F10 durch Ammoniumsulfatfällung

Antikörper der Klasse IgM haben keine Affinität zu Protein-A und können daher nicht über eine Protein-A-Sepharose-Säule gereinigt werden. Die Anreicherung der Antikörper der Hybridomzelllinie 10F10 und die Abtrennung anderer Proteine erfolgte durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, wie unter 2.3.10.2 beschrieben.

Abbildung 3.6 zeigt das Ergebnis der Antikörperaufreinigung. Im Gegensatz zur Protein-A-Affinitätschromatographie konnten durch die Ammoniumsulfatfällung zwar nicht alle Verunreinigungen aus dem Hybridomaüberstand entfernt, aber doch deutlich reduziert werden. Die gefällte Antikörperlösung enthielt aber neben den beiden Antikörperketten auch noch mehrere andere Proteine. Bei den späteren Checkerpoint-Versuchen zeigte sich allerdings, dass der erzielte Konzentrations-effekt bei der Antikörperfällung deutlich schwächer ausfiel, als bei einer affinitätschromatographischen Aufreinigung.

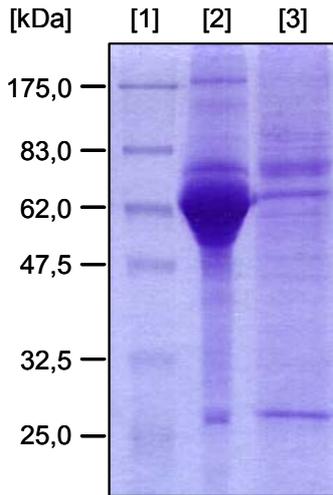


Abb. 3.6 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des Antikörpers der Zelllinie 10F10

Der Zellkulturüberstand enthält zahlreiche Proteinverunreinigungen, die durch die Ammoniumsulfatfällung nicht vollständig entfernt werden können. Dennoch ist ein Reinigungseffekt deutlich zu erkennen. [1]: Größenmarker; [2]: Hybridomaüberstand vor der Fällung; [3]: aufgereinigte Antikörperlösung (10% PAA-Gel; Auftragsmenge: 15 μ L; Coomassie-Färbung)

3.1.5 Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den indirekten ELISA

Die Charakterisierung der drei unterschiedlichen monoklonalen Antikörper erfolgte durch Kompetitions-ELISAs. Bei den eingesetzten Kompetitoren handelte es sich um strukturell ähnliche Triterpene. Die Substanzen waren – genau wie Oleanolsäure – nur sehr schlecht in Wasser löslich. Daher musste zunächst ein organisches Lösungsmittel gefunden werden, in dem sich die Kompetitoren lösen und das gleichzeitig den Kompetitions-ELISA möglichst wenig beeinflusst.

Zur Ermittlung des optimalen Lösungsmittels wurde der aufgereinigte Antikörper der Zelllinie 6C2 in einer Verdünnung von 1/100 mit unterschiedlichen Mengen der einzelnen Lösungsmittel in einem Glasgefäß gemischt, 90 Minuten lang unter Schütteln (100 UpM) vorinkubiert und anschließend in die mit 0,5 μ g Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat beschichteten Mikrotiterplatten-Vertiefungen pipettiert. Nach weiteren 90 Minuten wurde die Menge des gebundenen Antikörpers durch die Inkubation mit dem Anti-Mouse-IgG-POD-Konjugat (1/5000) und die Umsetzung des POD-Substrats ABTS bestimmt.

Die meisten organischen Lösungsmittel erwiesen sich als ungeeignet, da sie den ELISA sehr stark beeinflussten. In der Regel wurde bereits bei einer Lösungsmittelkonzentration von 10% die gemessene Absorption um 50 – 60% reduziert. Lediglich Methanol hatte einen weniger störenden Einfluss auf den ELISA. Im Gegensatz zu den anderen Lösungsmitteln wurde beim Antikörper der Zelllinie 6C2 die Absorption durch steigende Methanolkonzentrationen sogar verstärkt. Da sich die eingesetzten Kompetitoren mit wenigen Ausnahmen gut in Methanol lösen ließen, wurde dieses Lösungsmittel zur Herstellung der Kompetitor-Stammlösungen für die späteren Untersuchungen ausgewählt.

Leider zeigte Methanol nur bei Antikörpern der Klasse IgG einen neutralen oder absorptionssteigernden Effekt. Auf den IgM-Antikörper der Zelllinie 10F10 wirkte sich Methanol – genau wie die übrigen Lösungsmittel – negativ aus. Da aber kein geeigneteres Lösungsmittel zur Verfügung stand, wurden die Kompetitoren für die Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 10F10 ebenfalls in Methanol gelöst.

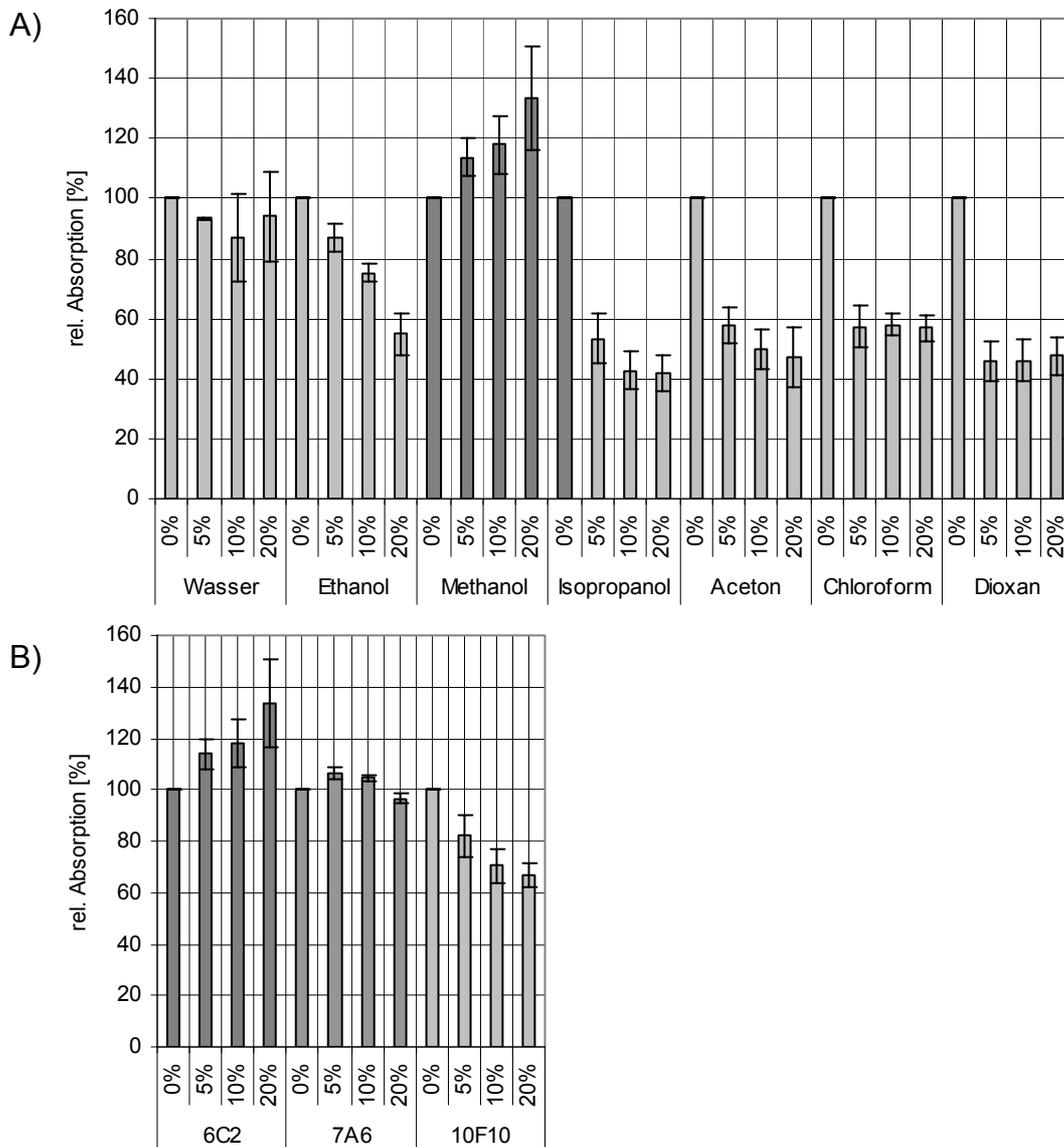


Abb. 3.7 Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den indirekten ELISA

A) Der aufgereinigte monoklonale Antikörper der Zelllinie 6C2 wurde mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln inkubiert. Mit Ausnahme von Methanol (dunkel hervorgehoben) haben alle Lösungsmittel einen negativen Effekt auf den ELISA.

B) Inkubation der unterschiedlichen Antikörper mit steigenden Methanol-Konzentrationen. Auf den IgM-Antikörper der Zelllinie 10F10 hat Methanol einen negativen Einfluss.

3.1.6 Checkpoint-ELISA

Vor der Charakterisierung der unterschiedlichen monoklonalen Antikörper durch Wettbewerbsversuche musste das optimale Verhältnis zwischen der eingesetzten Antikörperkonzentration und der Menge des fixierten Oleanylsuccinat-BSA-Konjugats ermittelt werden. Dazu wurde ein so genannter Checkpoint-ELISA durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen indirekten ELISA, bei dem unterschiedliche Antikörperverdünnungen gegen unterschiedliche Mengen an Hapten-Proteinkonjugat eingesetzt werden. Der Antikörper wurde 90 Minuten lang gegen das Konjugat inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der gebundenen Antikörper durch eine 60 minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper (Anti-Mouse-IgG bzw. Anti-Mouse-IgM-POD-Konjugat) und der anschließenden Umsetzung des POD-Substrates ABTS. Da die bei der späteren Charakterisierung eingesetzten Wettbewerber in Methanol gelöst wurden, wurde auch bei den Checkpoint-ELISAs Methanol (10%) zugesetzt. Das Prinzip und die Durchführung des Checkpoint-ELISA sind unter 2.3.11.2 und 2.3.11.2 detailliert beschrieben.

3.1.6.1 Antikörper der Zelllinie 6C2

Für den Checkpoint-ELISA des monoklonalen Antikörpers der Zelllinie 6C2 wurden unterschiedliche Verdünnungen des monoklonalen Antikörpers gegen steigende Konzentrationen des Oleanylsuccinat-Konjugats getestet.

Abbildung 3.8 zeigt die graphische Auswertung eines repräsentativen Checkpoint-ELISAs. Das Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat wurde in Konzentrationen von 0,25 µg, 0,5 µg, 0,75 µg und 1,0 µg pro Mikrotiterplatten-Vertiefung eingesetzt. Die aufgereinigte Antikörperlösung wurde in gleichmäßigen Schritten bis zu einer Verdünnung von 1/5000 mit PBS verdünnt. In der halblogarithmischen Darstellung ergaben sich Titrationskurven, anhand derer das optimale Verhältnis von Antikörper und Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat bestimmt wurde. Für einen Wettbewerbs-ELISA sollte eine Antikörperkonzentration im Bereich des linearen Kurvenverlaufs gewählt werden. Bei einer Konjugat-Menge von 0,25 µg wurde bereits bei einem Verdünnungsfaktor von 100 die Sättigung erreicht. Außerdem waren die gemessenen Absorptionswerte sehr niedrig.

Bei einer Oleanylsuccinat-BSA-Konzentration von 0,5 µg pro Vertiefung ergab sich im Bereich zwischen 1/500 und 1/100 eine annähernd lineare Steigung. Bei den späteren Wettbewerbs-ELISAs wurde der Antikörper der Zelllinie 6C2 daher in einer Verdünnung von 1/200 gegen 0,5 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat eingesetzt.

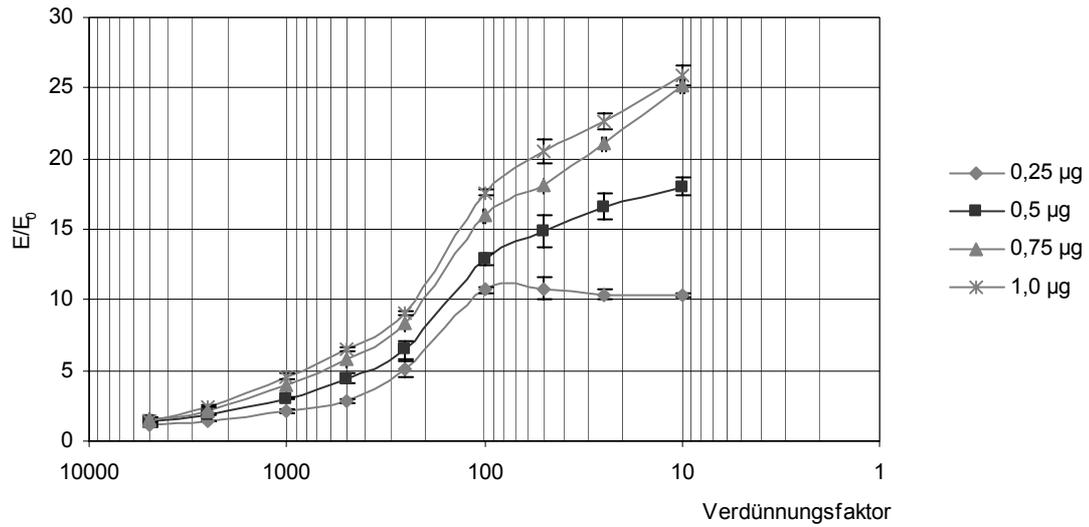


Abb. 3.8 Checkpoint-ELISA für den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 6C2

Halblogarithmische Darstellung der Antikörperverdünnung gegen den Extinktionskoeffizienten E/E_0 . Der Extinktionskoeffizient errechnet sich aus dem Quotienten der gemessenen Absorption und dem Blindwert. Die Titrationskurve mit 0,5 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat ist dunkel hervorgehoben.

3.1.6.2 Antikörper der Zelllinie 7A6

Der Checkpoint-ELISA für die Antikörper der Hybridomzelllinie 7A6 wurde wie unter 3.1.6.1 durchgeführt, wobei in diesem Fall für das Coating aber nur noch eine einzige Oleanylsuccinat-BSA-Konzentration ($0,5 \mu\text{g}$) eingesetzt wurde. Die Verdünnungsreihe bestand aus 9 Verdünnungsstufen zwischen $1/5$ und $1/2000$. In der halblogarithmischen Darstellung ergab sich eine lineare Steigung im Verdünnungsbereich zwischen $1/500$ und $1/50$. Bei der späteren Charakterisierung wurde der monoklonale Antikörper der Zelllinie 7A6 in einer Verdünnung von $1/200$ eingesetzt.

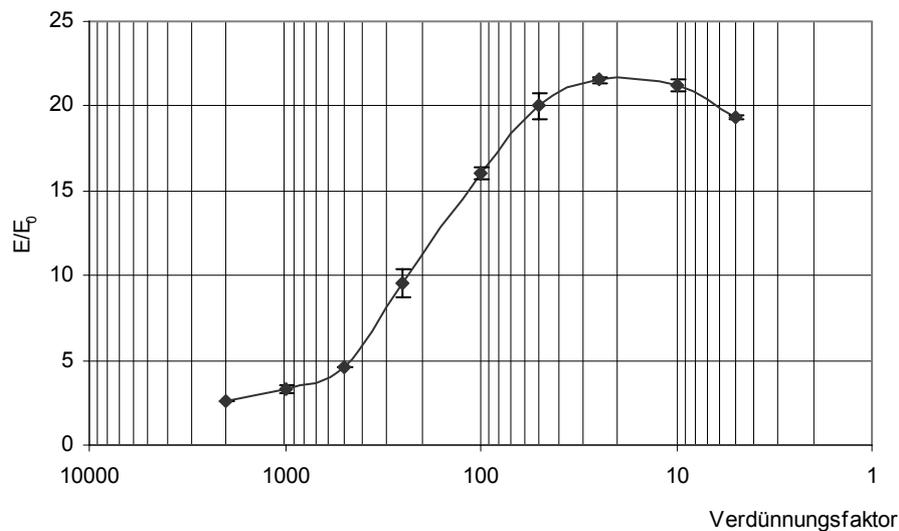


Abb. 3.9 Checkpoint-ELISA für den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 7A6 (Halblogarithmische Darstellung, $0,5 \mu\text{g}$ Oleanylsuccinat-BSA pro Vertiefung)

3.1.6.3 Antikörper der Zelllinie 10F10

Für die Checkpoint-Titration des monoklonalen Antikörpers der Zelllinie 10F10 wurde eine Verdünnungsreihe mit zwölf Verdünnungsstufen zwischen 1/2 und 1/10000 erstellt. Bei der Antikörperaufreinigung durch die Ammoniumsulfatfällung fiel der Konzentrationseffekt deutlich geringer aus. Außerdem hatte Methanol in diesem Fall einen negativen Effekt auf den ELISA. Daher lag der lineare Steigungsverlauf hier erst zwischen 1/100 und 1/5. Bei der späteren Charakterisierung wurde der monoklonale Antikörper der Zelllinie 10F10 in einer Verdünnung von 1/25 eingesetzt.

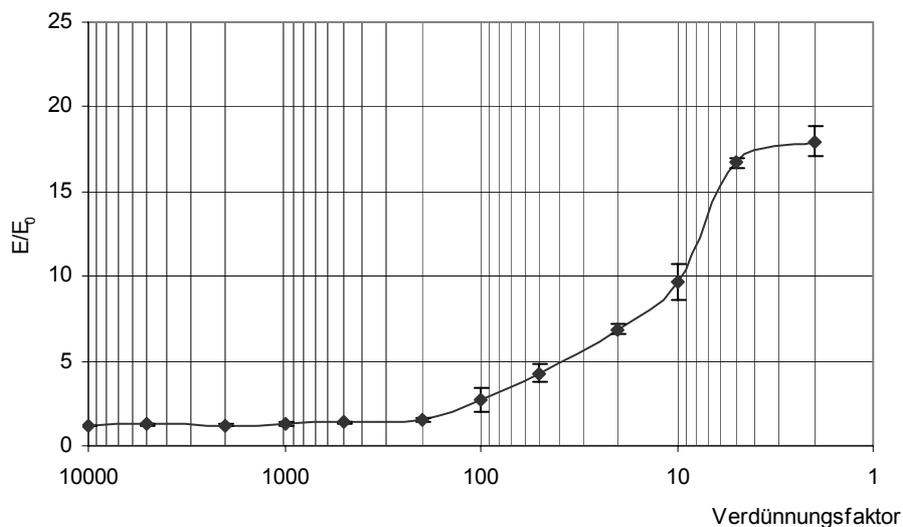


Abb. 3.10 Checkpoint-ELISA für den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 10F10 (Halblogarithmische Darstellung, 0,5 μg Oleanylsuccinat-BSA pro Vertiefung)

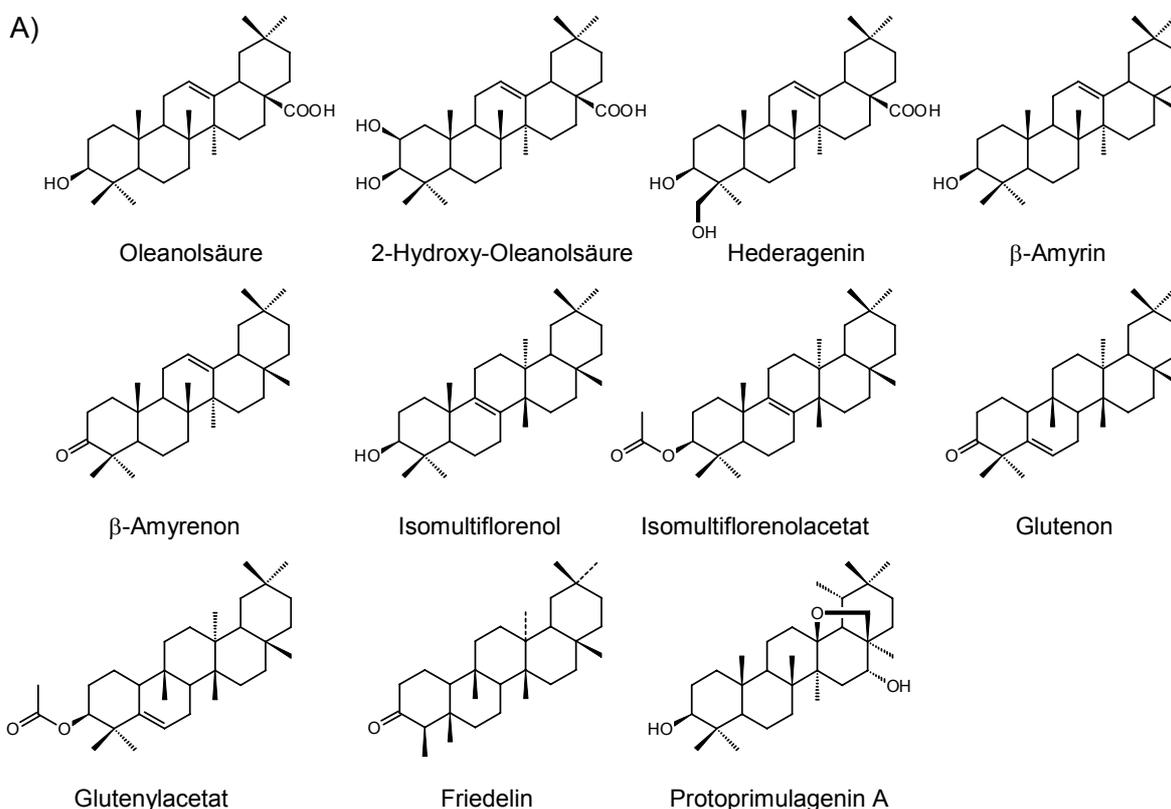
3.1.7 Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 7A6

Die monoklonalen Antikörper der Zelllinien 6C2 und 10F10 wurden bereits eingehend charakterisiert (Brand, 2003). Bei diesen beiden Antikörpern erfolgte daher nur eine experimentelle Überprüfung der bereits vorhandenen Daten, auf die später eingegangen werden soll (vgl. 3.1.8).

Das Epitop, an das der monoklonale Antikörper der Zelllinie 7A6 bindet, konnte hingegen bisher nicht bestimmt werden. Daher war es erforderlich, die Bindungseigenschaften dieses Antikörpers ausführlich zu untersuchen. Die Charakterisierung erfolgte durch einen indirekten kompetitiven ELISA (vgl. 2.3.11.3). Als Kompetitoren wurden unterschiedliche Triterpene eingesetzt, die strukturelle Ähnlichkeiten zur Oleanolsäure aufweisen. Anhand des Wettbewerbsprofils sollte das Molekülepitop ermittelt werden, an das der Antikörper der Zelllinie 7A6 bindet. Die Kompetitoren wurden in 5 mL Glasgefäße eingewogen und in Methanol gelöst. Die Konzentration dieser Stammlösungen betrug 2 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$.

3.1.7.1 Übersicht über die eingesetzten Kompetitoren

Für die Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 7A6 wurden Oleanolsäure und 18 weitere pentazyklische Triterpene vom Olean-, Ursan- und Lupan-Typ eingesetzt. Die Kompetitoren unterscheiden sich in Art und Stellung der Substituenten am pentazyklischen Grundgerüst, in der Form des Ringes E und in der Stellung der Doppelbindung, die sich auf die Konformation des Moleküls auswirkt.



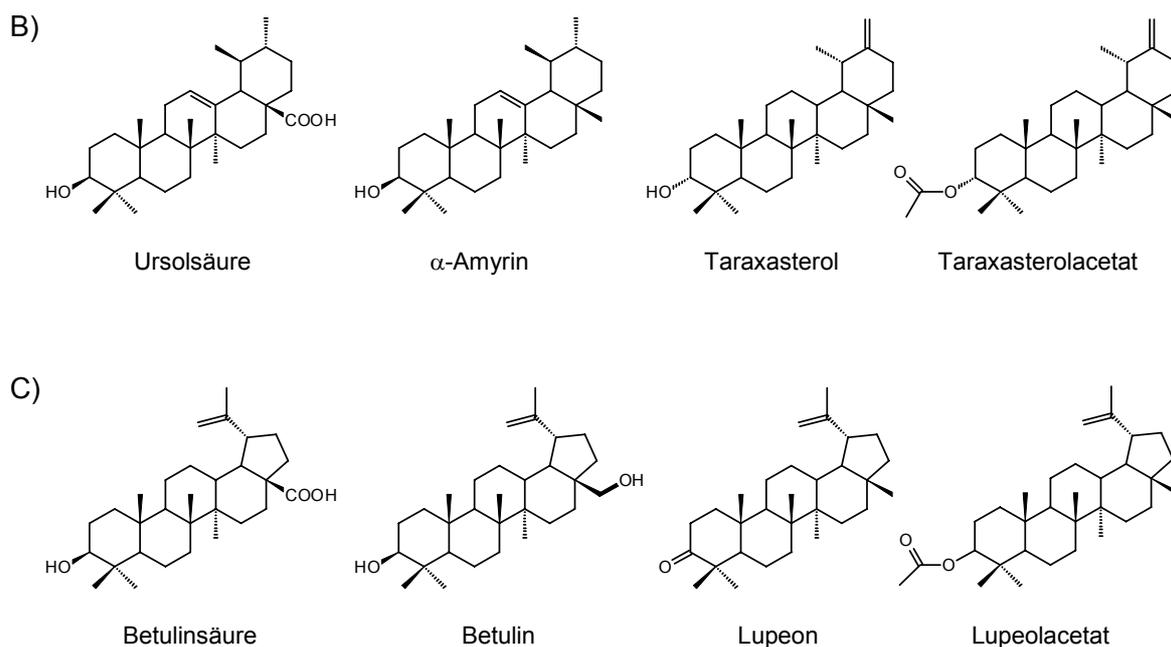


Abb. 3.11 **Übersicht über die als Kompetitoren eingesetzten Triterpene**

Für die Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers der Zelllinie 7A6 wurden neben der Oleanolsäure 18 verschiedene pentazyklische Triterpene vom Oleanan- (A), Ursan- (B)- und Lupan-Typ (C) eingesetzt. Die Kompetitoren wurden in 5 mL Glasgefäße eingewogen und in Methanol gelöst. Die Konzentration dieser Stammlösungen betrug $2 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$. Im kompetitiven ELISA wurden die Triterpene in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM getestet.

3.1.7.2 Indirekter Kompetitions-ELISA

Die Durchführung des indirekten Kompetitions-ELISAs zur Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers der Zelllinie 7A6 erfolgte wie unter 2.3.11.3 beschrieben. Die aufgereinigte Antikörperlösung wurde in einer Verdünnung von 1/200 eingesetzt. Die Kompetitoren wurden in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM getestet. Da Methanol den ELISA beeinflusst, wurde darauf geachtet, dass in jedem Ansatz die gleiche Lösungsmittelkonzentration (10%) enthalten war. Als Vergleich wurde jeweils ein Ansatz ohne Kompetitor mitgeführt. Jeder Kompetitor wurde in mindestens drei separat durchgeführten Versuchen getestet, wobei jeweils drei Einzelwerte bestimmt wurden, aus denen sich Mittelwert und Standardabweichung errechnen ließen. Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis der Wettbewerbsexperimente.

Die Identifizierung des Molekülepitopes, an das der monoklonale Antikörper der Zelllinie 7A6 bindet, erwies sich als äußerst schwierig, da die experimentellen Daten unterschiedliche Schlüsse zuließen.

Veränderungen im Ring A, z.B. durch Einführungen einer Hydroxylfunktion (2-OH-Oleanolsäure, Hederagenin), beeinträchtigten die Antikörperbindung nachweislich. Im Vergleich zur Oleanolsäure erfolgte eine deutlich schwächere Konkurrenz. Die Oxidation der C3-Hydroxylgruppe zur Carbonylfunktion führte sogar zum völligen Verlust der Konkurrenz (vgl. β -Amyrin und β -Amyrenon). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Antikörper im Bereich des Ringes A bindet. Es ergaben sich aber auch Hinweise darauf, dass die Bindung im Ring E erfolgen könnte. So bewirkte eine Änderung der Stellung der Methylsubstituenten (Ursolsäure) ebenso eine Abschwächung der Konkurrenz, wie eine Veränderung der Ringstruktur (Betulinsäure). Auch die Reduktion der Carboxylfunktion an C27 zur Hydroxylfunktion schien die Konkurrenz zu beeinflussen (Betulin).

Es wäre möglich, dass es sich bei der Hybridomzelllinie 7A6 um einen Mischklon handelt, der zwei Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität sezerniert. Einer dieser Antikörper interagiert vermutlich mit einem Epitop im Ring A, der andere Antikörper bindet am Ring E des Oleanolsäure-Moleküls.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden Subklone der Zelllinie 7A6 etabliert und charakterisiert. Außerdem wurden die variablen Domänen des Antikörpers kloniert und sequenziert.

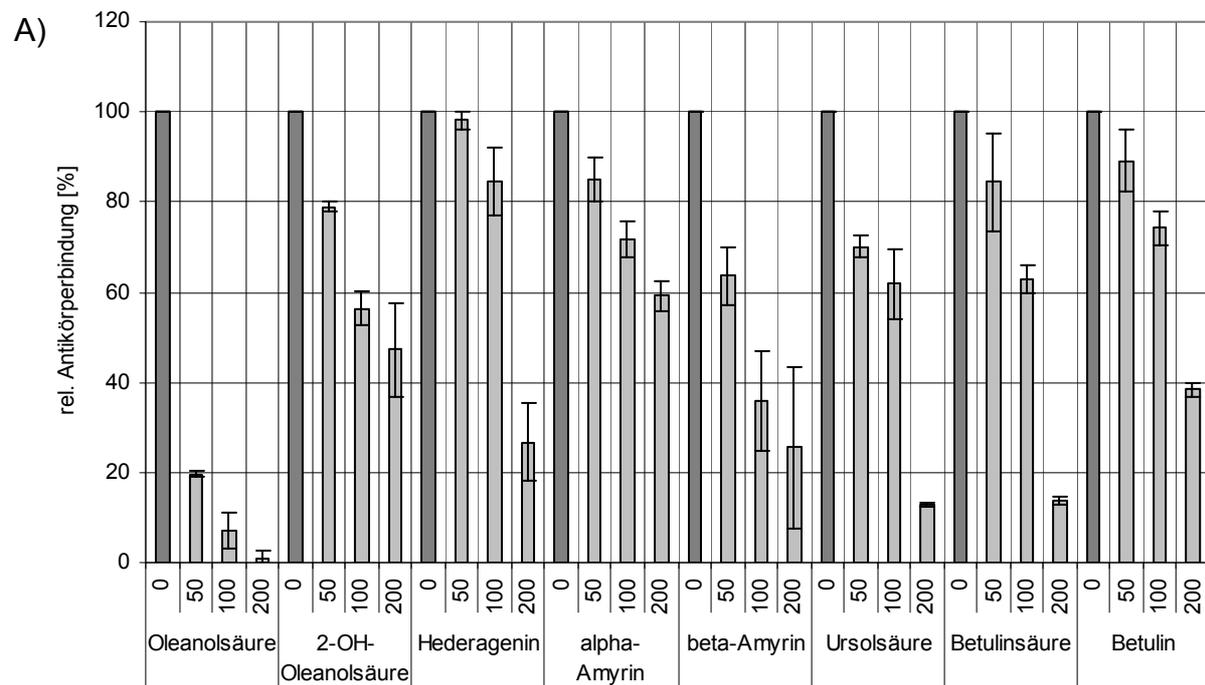


Abb. 3.12 Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 7A6 im Wettbewerbs-ELISA (A)

Insgesamt wurde der 7A6-Antikörper gegen Oleanolsäure und 18 strukturell ähnliche Triterpene getestet. Die Wettbewerber wurden in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM eingesetzt.

A) Übersicht über die Triterpene, mit denen eine konzentrationsabhängige Konkurrenz erfolgte. Sowohl Veränderungen am Ring A, als auch Veränderungen an Ring E beeinträchtigen die Antikörperbindung.

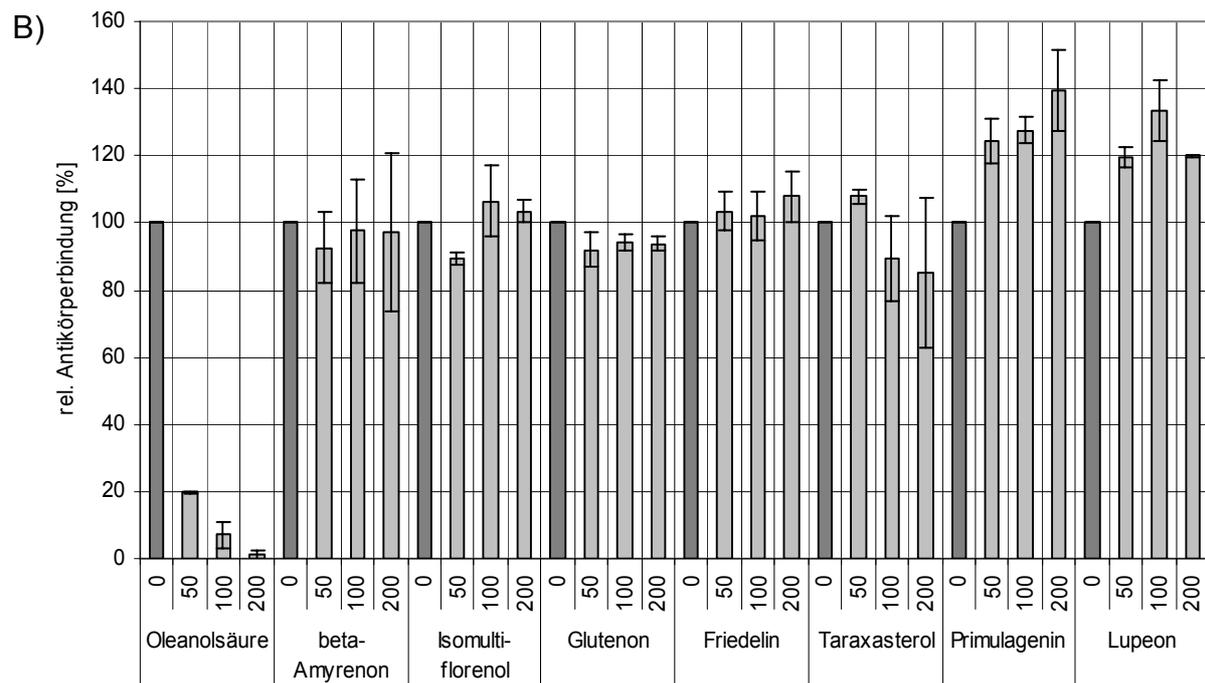


Abb. 3.12 Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 7A6 im Kompetitions-ELISA (B)

B) Übersicht über die Triterpene, bei denen keine Konkurrenz nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Substanzen, bei denen die Stereochemie des Moleküls durch Verschiebung der Doppelbindung verändert wurde. (Die acetylierten Derivate sind nicht aufgeführt.)

3.1.7.3 Etablierung und Screening von Subklonen der Zelllinie 7A6

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Zelllinie 7A6 um einen Mischklon handelt, wurden die Hybridomzellen nochmals vereinzelt und Subklonzelllinien etabliert. Bei 25 dieser Subklonzelllinien wurde die Antikörperspezifität in einem Schnellscreening mit 8 Konkurrenten bestimmt. Dazu erfolgte zunächst eine Checkpoint-Titration der verschiedenen Hybridomaüberstände gegen 0,5 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat. Anschließend wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt, wobei die Konkurrenten diesmal nur in einer einzigen Konzentration (200 mM) eingesetzt wurden. Als Vergleich wurde der aufgereinigte Antikörper des 7A6-Originalklons mitgeführt. In diesem Screening zeigten alle untersuchten Subklone ein anderes Konkurrenzverhalten als der Originalklon. Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis des Screenings für drei der untersuchten Subklone. Man kann erkennen, dass das Konkurrenzverhalten durch Veränderungen am Ring E beeinflusst wird. Vor allem die Carboxylfunktion an C27 scheint für die Antikörperbindung essentiell zu sein. Veränderungen am Ring A hatten hingegen keine Auswirkungen auf das Konkurrenzverhalten. Es konnten allerdings keine Subklone identifiziert werden, deren Antikörper am Ring A binden.

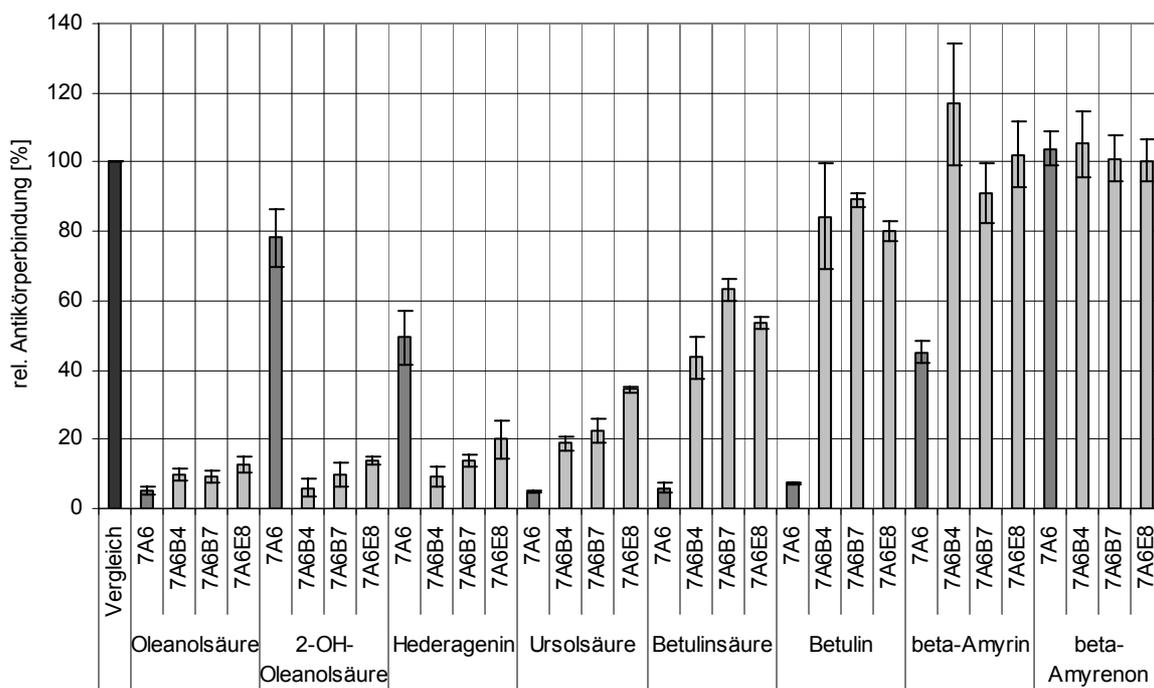


Abb. 3.13 Screening verschiedener 7A6-Subklone im Kompetitions-ELISA

Die Antikörper der Subklone 7A6B4, 7A6B7 und 7A6E8 wurden im kompetitiven ELISA gegen 8 verschiedene Triterpene getestet. Die Konkurrenten wurden in einer Konzentration von 200 mM eingesetzt. Die Subklone zeigen ein anderes Konkurrenzverhalten als der 7A6-Originalklon, der als Vergleich mitgeführt wurde (dunkel hervorgehoben).

3.1.7.4 Reinigung der von den 7A6-Subklonen sezernierten Antikörper

Um die von den Subklonzelllinien sezernierten Antikörper eingehender zu charakterisieren, sollten die Immunglobuline zunächst über eine Protein-A-Säule affinitätschromatographisch aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und konzentriert werden. Die Antikörper ließen sich aber weder nach der Niedersalzs-, noch nach der Hochsalzmethode (Abb. 3.14) aufreinigen. Nähere Untersuchungen ergaben, dass sich ein Großteil der Immunglobuline nach der Affinitätschromatographie im Säulendurchlauf bzw. im 1. Waschpuffer befand.

Auch die Ammoniumsulfatfällung lieferte keine überzeugenden Ergebnisse. Vermutlich handelt es sich bei den Immunglobulinen der 7A6-Subklone um eine Antikörperklasse, die nur eine sehr geringe Affinität zu Protein-A aufweist. Auffällig sind außerdem die schwachen Signale der schweren Kette.

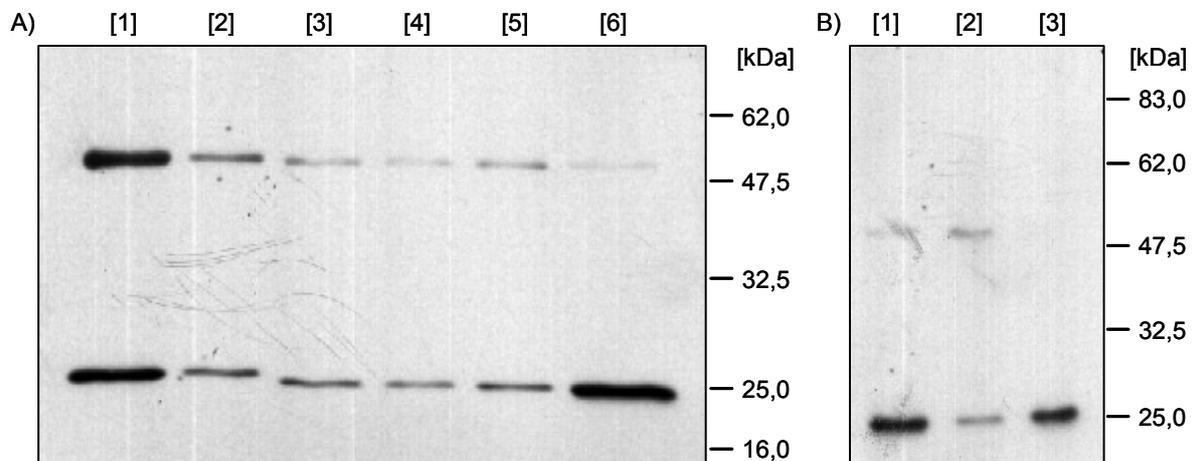


Abb. 3.14 SDS-PAGE und Western Blot der Antikörper verschiedener 7A6-Subklone

A) [1] 7A6 [3] 7A6B4 [5] 7A6E8
[2] 7A6 (1/10) [4] 7A6B7 [6] 7A6E8 (gefällt)

Die Subklone 7A6B4, 7A6B7 und 7A6E8 haben nur eine sehr geringe Affinität zu Protein-A und lassen sich daher über die Protein-A-Sepharose-Säule nicht aufkonzentrieren. Die aufgereinigten Antikörperlösungen sind ca. 10 mal schwächer konzentriert, wie der aufgereinigte Antikörper der Originalzelllinie. Auch eine Ammoniumsulfatfällung bringt nicht den gewünschten Erfolg. Auffällig ist, dass die leichte Kette der Subklon-Antikörper scheinbar kleiner ist, als die der Immunglobuline des Originalklons. Außerdem ergibt die schwere Kette ungewöhnlich schwache Signale.

B) [1] Hybridomaüberstand [2] Säuleneluat [3] Antikörperfällung

Antikörper der Zelllinie 7A6B4: Vergleich zwischen dem Hybridomaüberstand vor der Aufreinigung und der aufgereinigten Antikörperlösung nach der Affinitätschromatographie bzw. nach einer Ammoniumsulfatfällung.

3.1.7.5 Charakterisierung des Antikörpers der Subklonzelllinie 7A6B4

Die durch Protein-A-Affinitätschromatographie aufgereinigte Antikörperlösung der Subklonzelllinie 7A6B4 war nur gering konzentriert und musste gemäß der Checkerpoint-Analyse in einer 1/5-Verdünnung im kompetitiven ELISA eingesetzt werden. Außerdem wirkte sich das Lösungsmittel (Methanol) in diesem Fall negativ auf den ELISA aus.

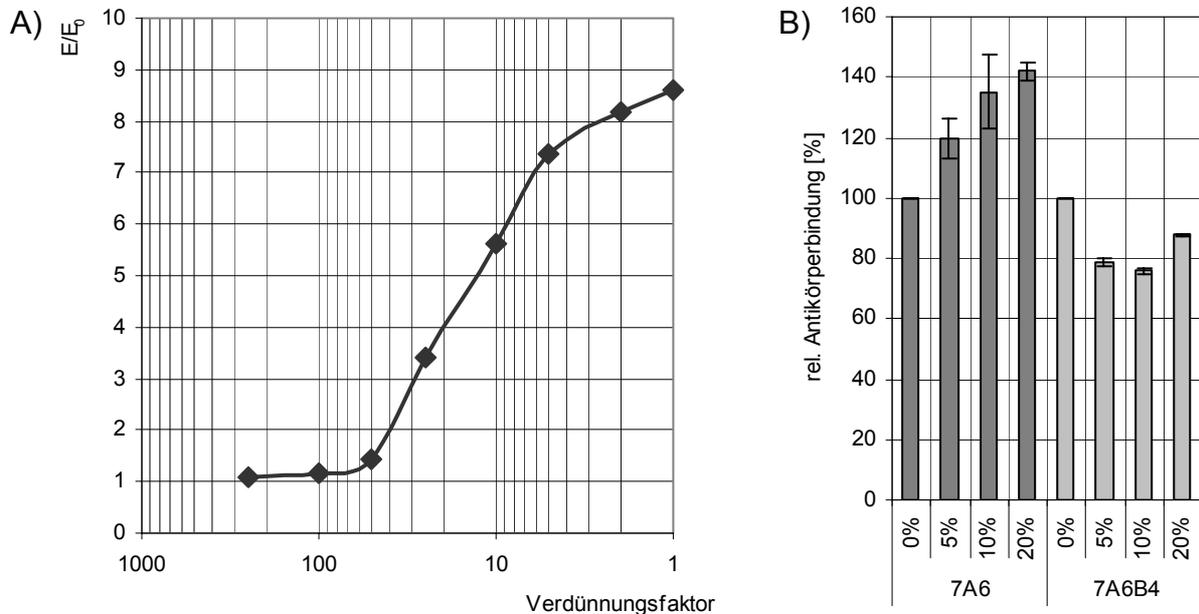


Abb. 3.15 Charakterisierung des Antikörpers der Subklonzelllinie 7A6B4 (1)

A) Checkerpoint-ELISA. Der Antikörper musste im Kompetitions-ELISA in einer 1/5-Verdünnung eingesetzt werden.

B) Die Antikörper des Subklons 7A6B4 und des Originalklons reagieren unterschiedlich auf Methanol.

Der kompetitive ELISA wurde mit den Triterpenen durchgeführt, bei denen sich im Subklonscreening ein unterschiedliches Kompetitionsverhalten im Vergleich zu den Antikörpern des Originalklons gezeigt hatte. Die Kompetitoren wurden in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM getestet. Abbildung 3.16 zeigt eindeutig, dass das Epitop, an das der Antikörper der Subklonzelllinie 7A6B4 bindet, im Ring E des Triterpenmoleküls liegt, wobei die C27-Carboxylfunktion essentiell ist. Die Triterpene Betulin, β -Amyrin und β -Amyrenon, die diese Carboxylgruppe nicht besitzen, zeigten keine Competition. Veränderungen am Ring A wie sie bei den Kompetitoren 2-Hydroxy-Oleanolsäure und Hederagenin vorliegen, beeinflussten die Antikörperbindung hingegen nur unwesentlich.

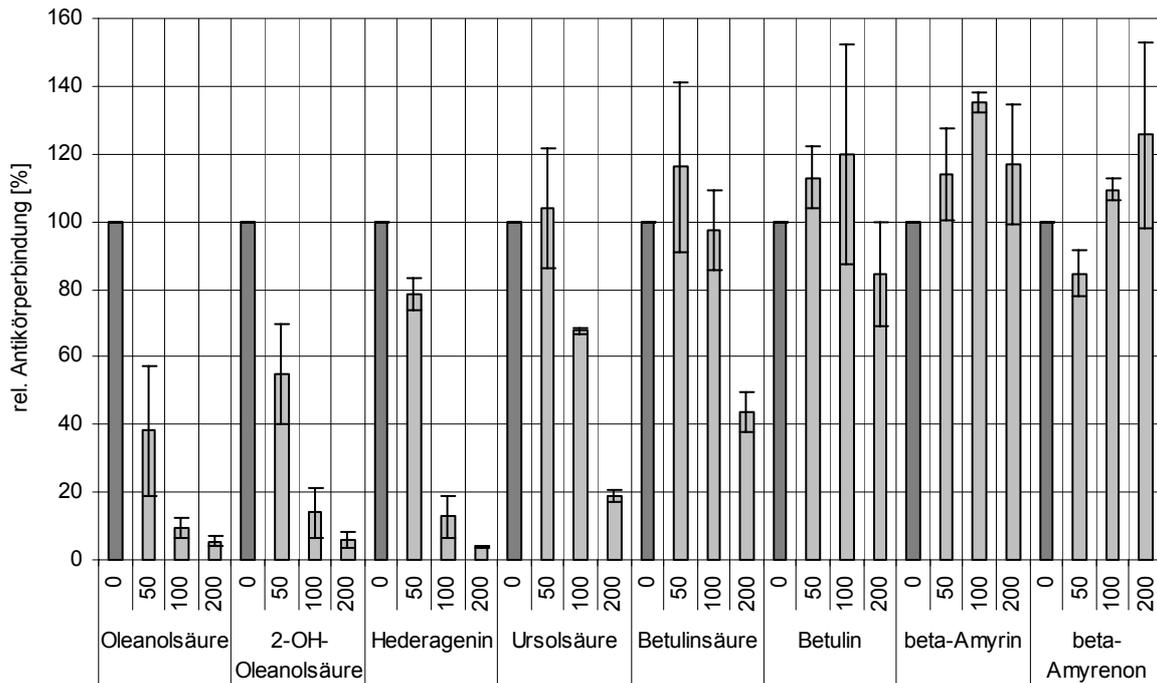


Abb. 3.16 Charakterisierung des Antikörpers der Subklonzelllinie 7A6B4 (2)

Der Antikörper der Subklonzelllinie 7A6B4 wurde im Kompetitions-ELISA gegen 8 verschiedene Triterpene getestet. Die Kompetitoren wurden in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM eingesetzt. Veränderungen im Bereich des Ringes E (Ursolsäure, Betulinsäure, Betulin und β -Amyrin) beeinflussen das Wettbewerbsverhalten stark. Daher liegt das Epitop, an das der Antikörper bindet, im Bereich des Ringes E. Die Carboxylfunktion an C27 ist für die Antikörperbindung essentiell.

3.1.7.6 Klonierung und Sequenzierung der variablen Antikörperdomänen

Das Kompetitions-Screening der verschiedenen Subklonzelllinien und die eingehende Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 7A6B4 schienen die Theorie zu bestätigen, dass es sich bei der Hybridomzelllinie 7A6 um einen Mischklon handelt, der Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität sezerniert. Allerdings zeigten alle untersuchten Subklone die gleichen Bindungseigenschaften. Unter den 25 getesteten Zelllinien befand sich kein einziger Klon, der einen Antikörper produziert, welcher am Ring A der Oleanolsäure bindet.

Um sicherzustellen, dass es sich bei der Zelllinie 7A6 tatsächlich um einen Mischklon handelt, sollten die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kloniert und sequenziert werden. Dazu wurde die RNA aus den Hybridomzellen isoliert und unter Verwendung von oligo-dT-Primern in cDNA revers transkribiert. Anschließend wurden die variablen Antikörperdomänen VL und VH, wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben, amplifiziert (Abbildung 3.17). Als Oligonukleotide wurden die degenerierten Primermischungen V_L BACK und V_L FOR, bzw. V_H BACK und V_H FOR eingesetzt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide lassen sich die meisten variablen Antikörperdomänen amplifizieren.

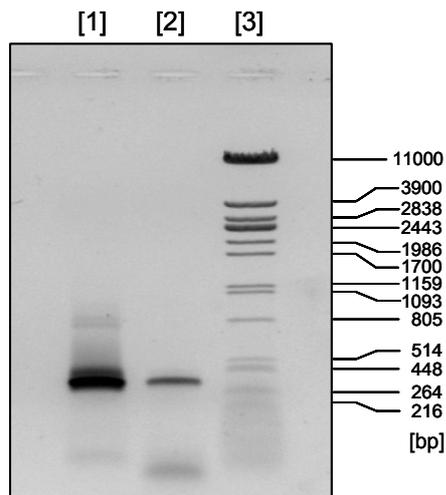


Abb. 3.17 Amplimere der variablen Domänen VL und VH des 7A6-Antikörpers

Die variablen Domänen von leichter und schwerer Kette wurden mit speziellen, degenerierten Primer-Mischungen PCR-amplifiziert. Die Größe der variablen Domänen beträgt ca. 400 bp. (Das DNA-Agarose-Gel ist in Umkehrfarben dargestellt.)

Nach erfolgreicher Amplifikation wurde die DNA über ein Agarosegel (1%) aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und in das Plasmid pGEM[®]-T ligiert. Die Sequenzierung erfolgte mit den Oligonukleotiden Rsp und Sp3. Insgesamt wurden fünf Plasmide mit der leichten Kette (7A6-VL.pGEM-T) und zehn Plasmide mit der schweren Kette (7A6-VH.pGEM-T) sequenziert. Zusätzlich wurde die Sequenz von fünf 7A6-scFv-Fragmenten ausgewertet, die in das Plasmid pAK400 kloniert worden waren. Für die Auswertung wurden die DNA-Sequenzen mit dem Computer-Programm DNA-Strider in die korrespondierenden Aminosäuresequenzen übersetzt.

Für die schwere Kette wurden zwei unterschiedliche DNA- bzw. Aminosäure-Sequenzen gefunden. 14 der 15 untersuchten Plasmide enthielten die Sequenz VH-1, einmal wurde die Sequenz VH-2 gefunden. Das Vorliegen einer zweiten, funktionellen Sequenz ist ein weiterer, wichtiger Hinweis darauf, dass es sich bei der Hybridomzelllinie 7A6 um einen Mischklon handelt. Für die variable Domäne der leichten Kette konnte allerdings nur eine einzige Sequenz ermittelt werden. Zum Vergleich wurden anschließend die variablen Domänen des Subklons 7A6B4 nach dem gleichen Prinzip kloniert und sequenziert. Für die variablen Domänen dieses Klons konnten die Sequenzen VL und VH-1 ermittelt werden.

leichten Kette, Sequenz VL	
MADYKDVLMTQTPLSLPVSLGDQAS ISCRSSQSLVHSNG <u>STYLHWYLQKP</u> <u>GQ</u> SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQ STHVPPTFGAGTKLEIKR	
schweren Kette, Sequenz VH-1	schweren Kette, Sequenz VH-2
...EVQRVESGSPSLVKPSQ <u>TL</u> SLTC SVTGDSITSGYWN <u>IRK</u> FPGNKLEY MGYINYSGRTYYN <u>PS</u> LKSRISITRD TSKNQYYLQLNSV <u>TT</u> EDTATYYCAR -VVISVVA <u>PFAL</u> WGQGT <u>TLT</u>	...EVKLESESGPGLVAPSQSL <u>SITC</u> TVSGFSLTSYGVHWVRPPGKGLEW LVVIWSDGSTTYNSALKSRLSISKD DSKSQVFLKMNSLQTD <u>DD</u> TAMYYCAR EPPTYVAY---WGQGITGR

Tab. 3.2 Übersicht über die Aminosäure-Sequenzen der variablen Domänen VL und VH des Antikörpers der Zelllinie 7A6
(Unterschiede sind rot markiert, die CDR-Regionen sind unterstrichen)

3.1.8 Charakterisierung der Antikörper der Zelllinien 6C2 und 10F10

Das Molekülepitop, an das die monoklonalen Antikörper der Hybridomzelllinien 6C2 und 10F10 binden, konnte bereits identifiziert werden (Brand, 2003). Der IgG-Antikörper der Zelllinie 6C2 bindet im Bereich der Ring D und E, der IgM-Antikörper der Zelllinie 10F10 bindet an den Ring A des Oleanolsäure-Moleküls. Da die Charakterisierung dieser Antikörper allerdings mit nicht aufgereinigtem Zellkulturüberstand erfolgt war und darüber hinaus für den IgM-Antikörper ein Anti-Mouse-IgG-POD-Konjugat als Zweitantikörper verwendet worden war, sollten die Daten nochmals experimentell überprüft werden

3.1.8.1 Indirekter Kompetitions-ELISA mit Antikörpern der Zelllinie 6C2

Die Charakterisierung des IgG-Antikörpers der Zelllinie 6C2 erfolgte aus dem affinitätschromatographisch aufgereinigten Ansatz. Das Antikörpereluat wurde in einer Verdünnung von 1/200 im ELISA eingesetzt. Die Kompetitoren wurden in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM getestet. Im Rahmen der Versuchsreihe konnten die von Frau Dr. Brand erzielten Ergebnisse bestätigt werden. Der Antikörper bindet an ein Epitop im Bereich der Ringe D und E. Die Carboxylfunktion an C27 ist für die Bindung essentiell. Kompetitoren, bei denen die Carboxylfunktion fehlt, wie z.B. Betulin, β -Amyrin oder Taraxasterol, interagieren nicht mit dem 6C2-Antikörper. Die Form des Ringes E (Cyclohexan oder Cyclopentan) beeinflusst die Bindung hingegen nur unwesentlich. Auch Triterpene vom Lupan-Typ, wie z.B. Betulinsäure, zeigen eine konzentrationsabhängige Konkurrenz, sofern sie die C27-Carboxylgruppe besitzen.

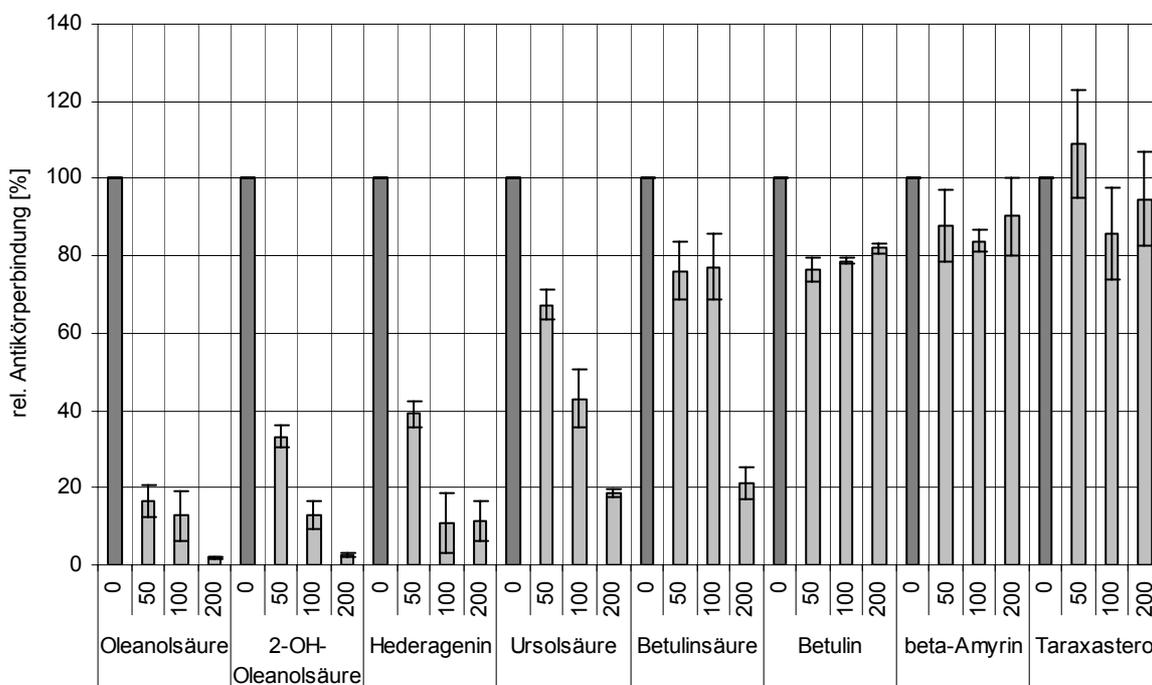


Abb. 3.18 Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 6C2 im Kompetitions-ELISA

Die Abbildung zeigt nur eine Auswahl der eingesetzten Kompetitoren (Konz.: 50 mM, 100 mM, 200 mM). Die Carboxylfunktion an C27 des Triterpenmoleküls ist für die Antikörperbindung essentiell.

3.1.8.2 Indirekter Kompetitions-ELISA mit Antikörpern der Zelllinie 10F10

Für die Charakterisierung des IgM-Immunglobulins der Zelllinie 10F10 wurde die gefällte Antikörperlösung in einer Verdünnung von 1/25 eingesetzt. Auch hier wurden die Kompetitoren in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM getestet. Der Nachweis der am Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat gebundenen Antikörper erfolgte mit einem IgM-isotypenspezifischen Zweitantikörper (Anti-Mouse-IgM-POD-Konjugat) und ABTS als POD-Substrat.

Auch in diesem Fall konnten die bereits vorhandenen Daten bestätigt werden. Der Antikörper der Zelllinie 10F10 bindet an ein Epitop im Bereich von Ring A des Oleanolsäure-Moleküls. Essentiell ist hierbei die Hydroxylfunktion an C3. Sie darf zwar verestert, aber nicht zum Keton oxidiert sein. So erfolgte beispielsweise mit Glutenylacetat eine Konkurrenz, wohingegen Glutenon nicht mit dem Antikörper interagiert. Auch β -Amyrenon reagierte nicht mit dem Antikörper der Zelllinie 10F10, wohingegen β -Amyrin an den Antikörper band. Durch die Oxidation der C3-Hydroxyl-Funktion wird die Konformation des Ringes so stark verändert, dass der Antikörper nicht mehr mit dem Triterpen interagieren kann.

Veränderungen an Ring E beeinflussen das Wettbewerbsverhalten hingegen nicht. Auch Betulin, ein Triterpen vom Lupan-Typ, dem außerdem die C27-Carboxylfunktion fehlt, zeigt eine konzentrationsabhängige Konkurrenz.

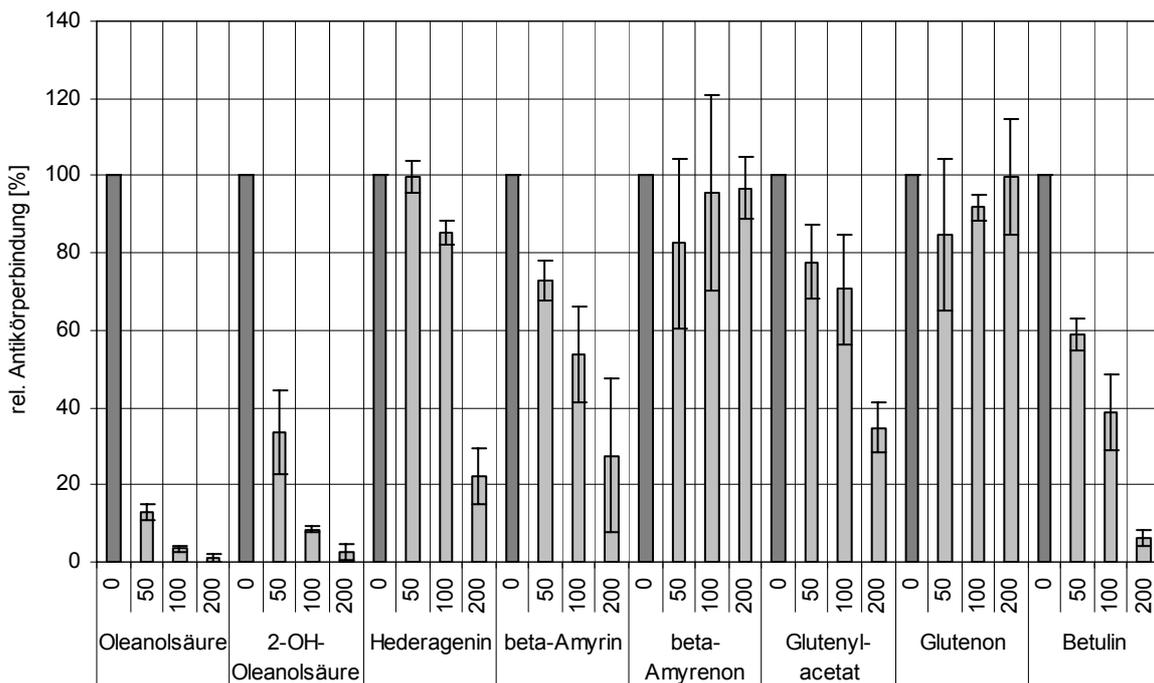


Abb. 3.19 Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 10F10 im Kompetitions-ELISA

Die Abbildung zeigt nur eine Auswahl der eingesetzten Kompetitoren (Konz.: 50 mM, 100 mM, 200 mM). Essentiell für die Antikörperbindung ist die Hydroxylfunktion an C3. Veränderungen an Ring E beeinflussen das Wettbewerbsverhalten nicht.

3.1.9 Kreuzreaktivitäten mit anderen Triterpenen und strukturell nicht verwandten Pflanzeninhaltsstoffen

Auf der Basis der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Anti-Oleanolsäure-Antikörper, sollte ein ELISA-Assay etabliert werden, mit dessen Hilfe Arzneipflanzenextrakte auf das Vorliegen von Triterpensaponinen untersucht werden können. In den vorangegangenen Versuchen hatte sich gezeigt, dass die monoklonalen Antikörper der drei untersuchten Zelllinien neben Oleanolsäure auch andere pentazyklische Triterpensapogenine erkennen können. Diese Kreuzreaktivitäten ermöglichen es, ein breites Spektrum an Triterpensaponinen analytisch zu erfassen. Es stellte sich allerdings die Frage, ob eventuell noch weitere Kreuzreaktivitäten mit anderen Pflanzenmetaboliten vorliegen, die zu falsch positiven Ergebnissen bei der späteren Arzneipflanzenanalytik führen könnten.

Daher wurden zahlreiche strukturell ähnliche Naturstoffe, wie z.B. Steroide, Phytosterole, Boswelliasäuren oder Herzglykoside, in einem ELISA-Screening gegen jeden der drei Antikörper getestet. Daneben wurde aber auch ein breites Spektrum strukturell nicht verwandter, ubiquitär vorkommender Substanzen, wie z.B. Flavonoide, Cumarine oder Pflanzensäuren, im kompetitiven ELISA untersucht.

3.1.9.1 Steroide und Phytosterole

Bei dem ubiquitär vorkommenden Steroid Cholesterol und den davon abgeleiteten Phytosterolen handelt es sich um tetrazyklische Triterpene mit einem C_{27} -Grundgerüst. Sie leiten sich, ebenso wie die pentazyklischen Triterpensapogenine, von Squalen (C_{30}) ab, wobei im Verlauf der Biosynthese drei Methylgruppen oxidativ entfernt werden. Da zwischen den tetrazyklischen und den pentazyklischen Triterpenen große strukturelle Ähnlichkeiten bestehen, sollten unterschiedliche Phytosterole auf eine Kreuzreaktivität mit den verschiedenen Antikörpern untersucht werden. Die Antikörper der Zelllinien 6C2 und 10F10 waren bereits eingehend untersucht worden (Brand, 2003), deshalb wurde der Kompetitions-ELISA hier nur noch mit einer einzigen Kompetitor-Konzentration ($200 \mu\text{M}$) durchgeführt. Kreuzreaktivitäten wurden nicht gefunden. Der Antikörper der Zelllinie 7A6 wurde hingegen ausführlich getestet. Die entsprechenden Steroide wurden in Konzentrationen von 50 mM , 100 mM und 200 mM im kompetitiven ELISA eingesetzt. Als Vergleich wurde eine Versuchsreihe mit Oleanolsäure durchgeführt. Es konnten aber ebenfalls keine Kreuzreaktivitäten festgestellt werden.

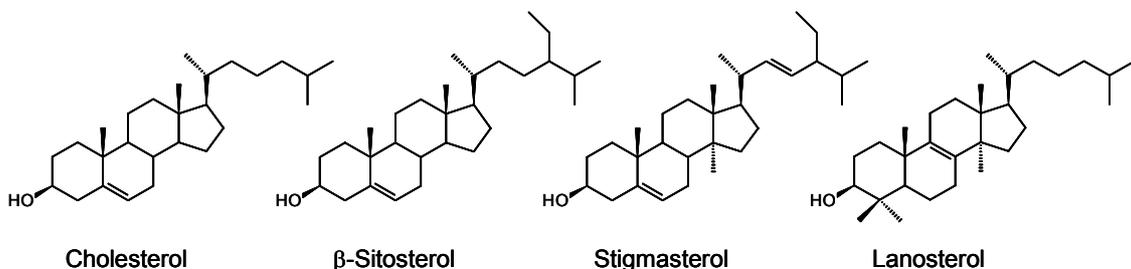


Abb. 3.20 Strukturformeln der getesteten Steroide bzw. Phytosterole

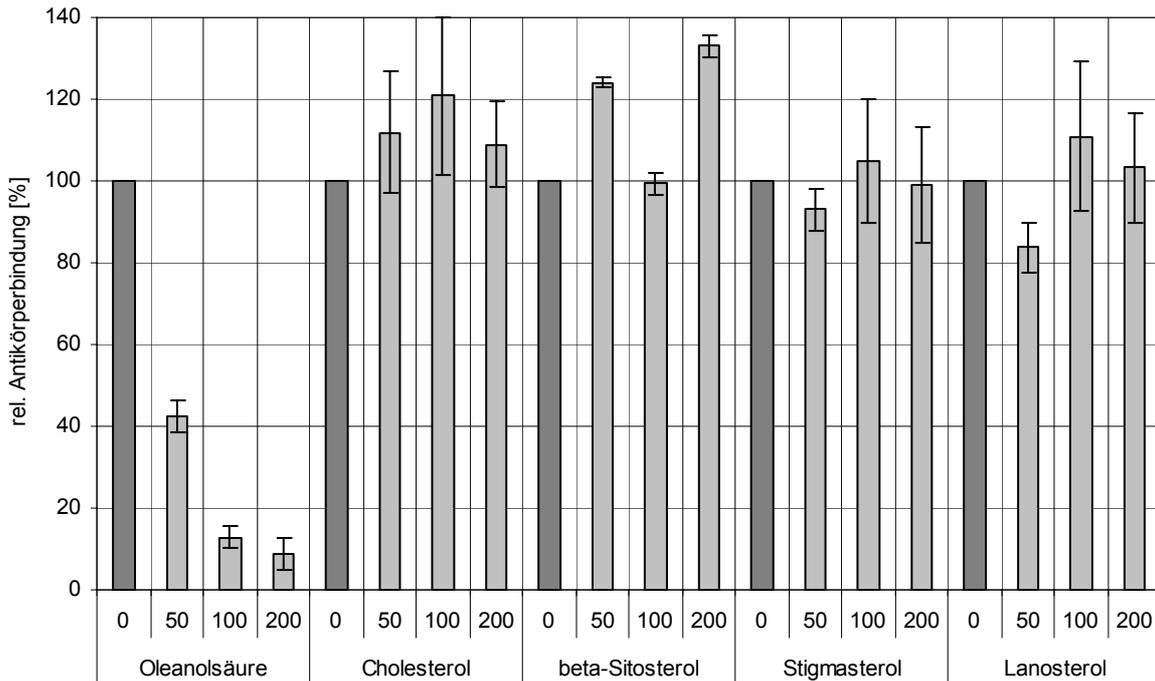


Abb. 3.21 Untersuchung von Steroiden und Phytosterolen im Kompetitions-ELISA gegen den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 7A6 (Konzentrationen der Phytosterole: 50 mM, 100 mM, 200 mM)

3.1.9.2 Herzglykoside

Herzglykoside sind C_{23} - oder C_{24} -Steroide, bei denen die 3-Hydroxylfunktion mit einem Mono- oder Oligosaccharid über eine glykosidische Bindung verknüpft ist. Biogenetisch leiten sich die Herzglykoside vom Cholesterol ab, d.h. sie kommen aus dem gleichen Biosyntheseweg wie die Triterpensapogenine. Sie unterscheiden sich von diesen aber unter anderem in der Stereochemie. Die Ringe A und B sind bei den Herzglykosiden *cis*, bei den Saponinen *trans* verknüpft. Im kompetitiven ELISA wurden die drei Cardenolid-Aglyka Digitoxigenin, Digoxigenin und Gitoxigenin, sowie sieben von diesen Aglyka abgeleitete Glykoside untersucht. Dabei handelte es sich um Digitonin, Digitoxin, α -Acetyl-Digoxin, β -Acetyl-Digoxin, Gitoxin, Lantosid A, Lantosid B und Lantosid C. Die Kompetitoren wurden in einer Konzentration von 200 mM gegen jeden der drei Antikörper getestet. Kreuzreaktivitäten wurden dabei nicht gefunden.

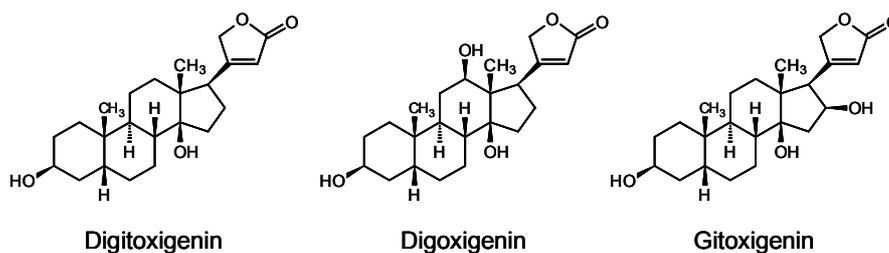


Abb. 3.22 Strukturformeln der Aglyka der getesteten Herzglykoside

3.1.9.3 β -Boswelliasäuren

β -Boswelliasäuren sind C_{30} -Triterpene vom Ursan-Typ, die in verschiedenen *Boswellia*-Arten (Familie: Burseraceae) vorkommen. Wegen ihrer entzündungshemmenden Wirkung sind sie pharmazeutisch sehr interessant und bilden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt einen Forschungsschwerpunkt. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den β -Boswelliasäuren, und den pentazyklischen Triterpensapogeninen wäre eine Kreuzreaktivität mit den Anti-Oleanolsäure-Antikörpern denkbar. Daher wurden vier verschiedene β -Boswelliasäuren im kompetitiven ELISA getestet.

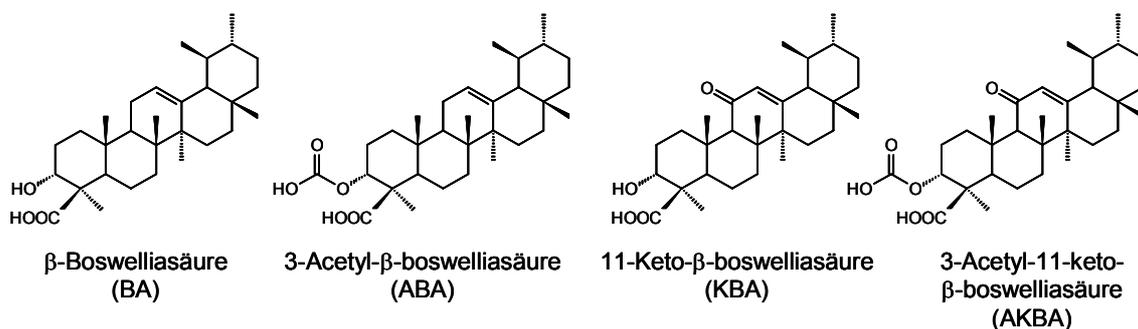


Abb. 3.23 Strukturformeln der getesteten Boswelliasäuren

Kompetitions-ELISA mit den verschiedenen Antikörpern

Die β -Boswelliasäuren wurden in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM gegen die aufgereinigten Antikörper eingesetzt. Wie man in Abbildung 3.24, A) erkennen kann, zeigten die β -Boswelliasäure und die 3-Acetyl- β -Boswelliasäure eine sehr starke Konkurrenz mit dem monoklonalen Antikörper der Zelllinie 10F10. Die voluminöse Carboxylfunktion an Ring A scheint sich dabei nicht negativ auf die Bindung auszuwirken. Auch der Antikörper der Zelllinie 7A6 zeigte eine – wenn auch deutlich schwächere – Konkurrenz mit diesen beiden Substanzen. Der Antikörper der Zelllinie 6C2 reagierte hingegen erwartungsgemäß nicht mit den β -Boswelliasäuren, da diesen die Carboxylfunktion an C27 fehlt.

Auffällig war, dass es unter dem Einfluss der beiden Keto-Boswelliasäuren bei allen drei Antikörpern wiederholt zu einer extremen Verstärkung der ELISA-Absorption kam. Die gemessenen Absorptionswerte waren zum Teil bis zu viermal höher als der Referenzwert. Verantwortlich dafür ist vermutlich die Ketofunktion an Position 11, denn ein ähnlicher Effekt wurde bereits früher bei Glycyrrhetinsäure beobachtet (Brand, 2003). Bei dieser Substanz befindet sich an C11 ebenfalls eine Ketogruppe.

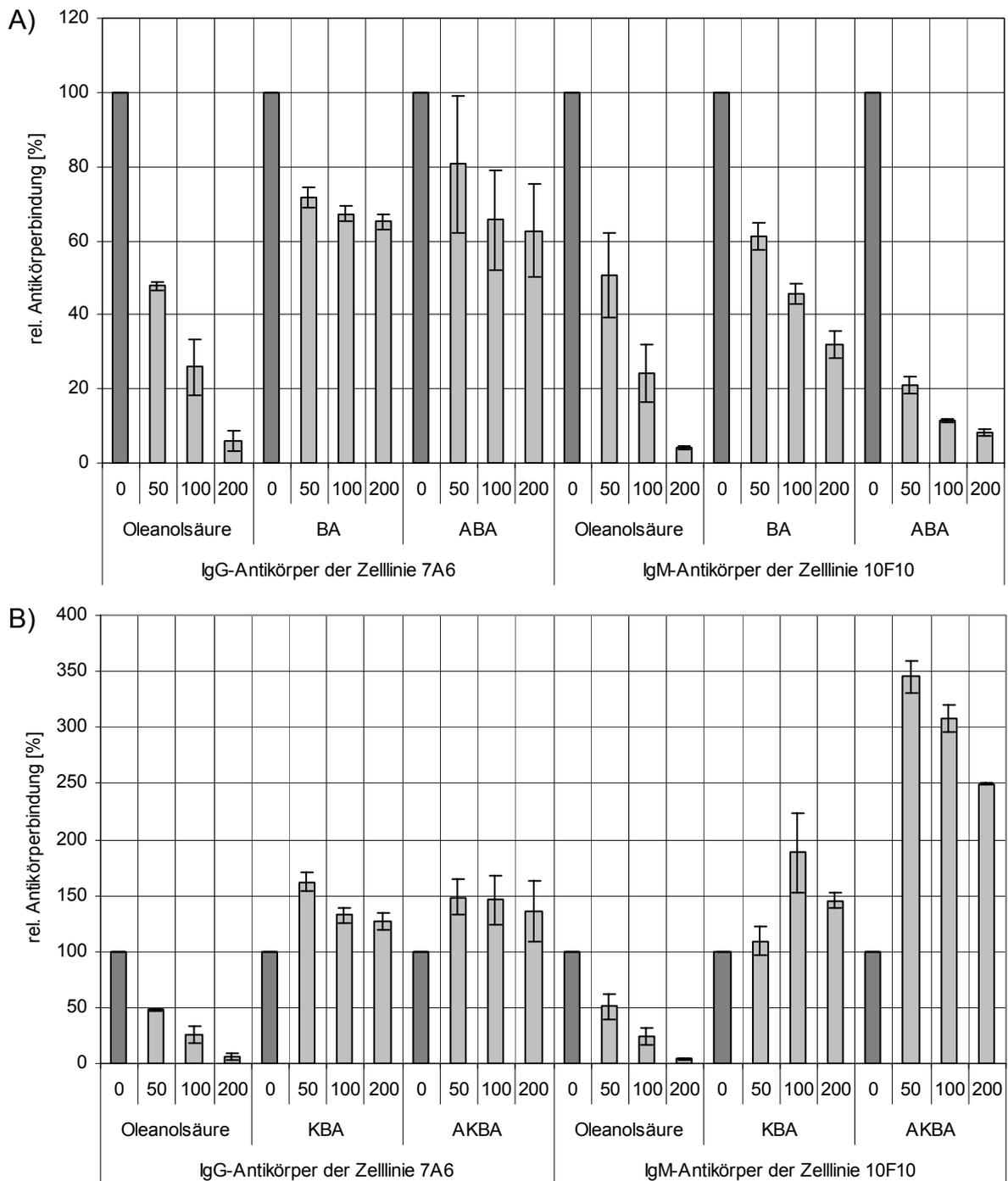


Abb. 3.24 Untersuchung von β -Boswelliasäuren im Kompetitions-ELISA

A) β -Boswelliasäure (BA) und 3-Acetyl- β -boswelliasäure (ABA) zeigten mit dem Antikörper der Zelllinie 7A6 eine schwache, mit dem Antikörper der Zelllinie 10F10 eine starke Konkurrenz. Der Antikörper der Zelllinie 6C2 reagierte erwartungsgemäß nicht mit den Konkurrenten (nicht dargestellt). (Konzentrationen: 50 mM, 100 mM und 200 mM)

B) Beim Einsatz von 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA) und 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA) im Kompetitions-ELISA wurde die gemessene Absorption extrem verstärkt. (Konzentrationen: 50 mM, 100 mM und 200 mM)

Einfluss der Keto-Boswelliasäuren auf die Peroxidase des Zweitantikörpers

Um zu überprüfen, ob die Keto-Boswelliasäuren einen Einfluss auf die Peroxidase-Funktion des Zweitantikörpers hat, und es dadurch zu den stark erhöhten Absorptionswerten im kompetitiven ELISA kommt, wurde das Anti-Mouse-IgM-POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1/10000 für 90 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen an 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Chromogens ABTS. Wie man anhand Abbildung 3.25 erkennen kann, steigt die gemessene Absorption unter dem Einfluss von AKBA tatsächlich an. Das Ausmaß dieses Anstiegs fiel aber deutlich geringer aus, als nach den Ergebnissen der kompetitiven ELISAs zu erwarten war. Eine direkte Inkubation von ABTS mit AKBA hatte hingegen keinen Effekt.

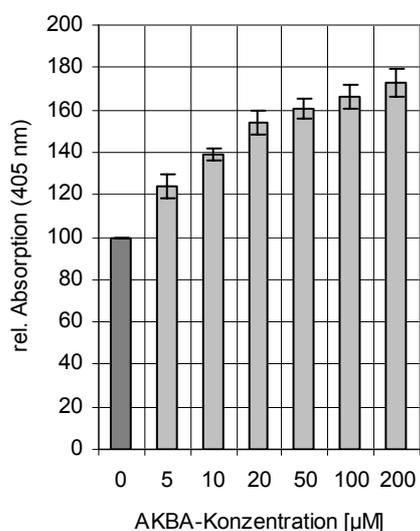


Abb. 3.25 Einfluss von AKBA auf den Zweitantikörper

Eine 1/10000-Verdünnung des Anti-Mouse-IgM-Konjugates wurde mit steigenden Konzentrationen an 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA) inkubiert. 60 Minuten nach der Zugabe von ABTS wurde die Absorption gemessen. Man kann einen deutlichen Anstieg der gemessenen Absorptionswerte erkennen.

3.1.9.4 Strukturell nicht verwandte Pflanzeninhaltsstoffe

Um zu überprüfen, ob die monoklonalen Antikörper der Zelllinien 6C2, 7A6 und 10F10 auch mit Molekülen interagieren, deren Struktur sich nicht vom Triterpengrundgerüst ableitet, wurde ein Spektrum an ubiquitär vorkommenden primären und sekundären Pflanzenmetaboliten im Kompetitions-ELISA untersucht. Die Substanzen wurden dabei in einer Konzentration von 200 μM gegen jeden der drei Antikörper getestet. Es handelte sich um Anthracen-Derivate, Carbonsäuren, Cumarine, Flavonoide, Gerbstoffmonomere, Monoterpene und Saccharide. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die getesteten Substanzen. Die Strukturformeln der wichtigsten Naturstoffe sind in Abbildung 3.28 dargestellt.

Stoffgruppe	Substanzen
Anthrachinone:	Chrysophanol, Frangulaemodin
Carbonsäuren:	Ascorbinsäure, Chinasäure, Chlorogensäure, Citronensäure, Cumarsäure Rosmarinsäure
Cumarine:	Aesculetin, Cumarin
Flavonoide:	Apigenin, Isoquercitrin, Luteolin-7-glucosid, Quercetin, Rutin Vitexin-2''-O-rhamnosid
Gerbstoffmonomere:	Catechin, Epicatechin, Ellagsäure
Monoterpene:	Menthol, Thymol
Saccharide:	Arabinose, Fructose, Glucose, Rhamnose, Saccharose

Tab. 3.3 Übersicht über die im Wettbewerbs-ELISA getesteten Naturstoffe

Das Wettbewerbs-Screening fiel bei den meisten Substanzen negativ aus. Ausnahmen fanden sich allerdings bei den Flavonoiden und den Gerbstoff-Derivaten. Quercetin und Ellagsäure zeigten bei allen drei Antikörpern eine starke Konkurrenz. Beim Flavonoid Quercetin kann davon ausgegangen werden, dass die Anti-Oleanol-säure-Antikörper spezifisch mit der C3-Hydroxylfunktion des Moleküls interagieren. Wird diese Gruppe glykosyliert, wie bei Hyperosid, Isoquercitrin oder Rutin, geht die Antikörperbindung verloren. Auch Flavonoide, denen die C3-Hydroxylgruppe fehlt, wie z.B. Apigenin, Luteolin oder Vitexin-2''-O-rhamnosid, zeigten keine Konkurrenz. Wie die Ellagsäure, ein Isolierungsartefakt der Gallussäure, mit den Antikörpern interagiert, konnte nicht ermittelt werden.

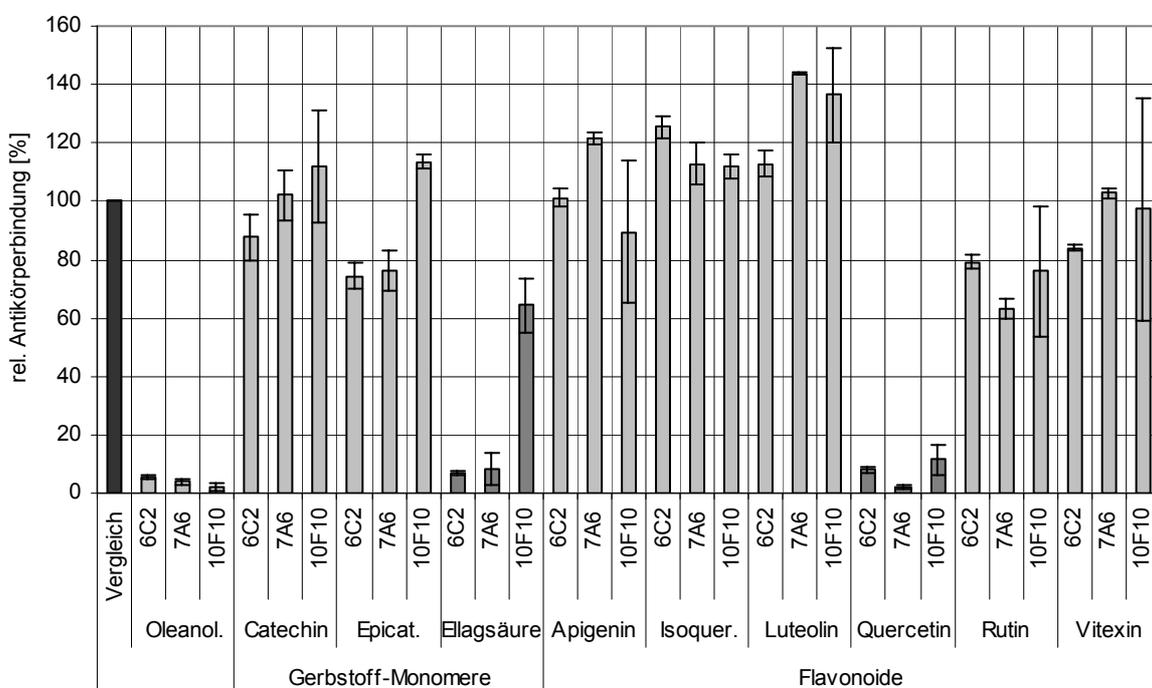


Abb. 3.26 Screening von Pflanzenmetaboliten im Wettbewerbs-ELISA

Die unterschiedlichen Naturstoffe wurden im ELISA in einer Konzentration von 200 mM eingesetzt. Ellagsäure und Quercetin zeigten mit allen drei getesteten Antikörpern eine Konkurrenz.

Ein positives Signal im Kompetitions-ELISA lässt nicht unbedingt auf eine spezifische Interaktion zwischen dem Antikörper und dem entsprechenden Kompetitor schließen. Es könnte sich hierbei auch um eine unspezifische Reaktion handeln, z.B. wenn der Antikörper durch die zugesetzte Substanz denaturiert wird. So sind beispielsweise Gerbstoffe dazu in der Lage, Proteine unspezifisch zu denaturieren.

Um auszuschließen, dass es sich bei der Konkurrenz mit Quercetin und Ellagsäure um eine unspezifische Reaktion handelt, wurden die beiden Substanzen in einem Kompetitions-Assay gegen einen Anti-Arabinogalaktan-Antikörper getestet. Im Gegensatz zum Anti-Oleanolsäure-Antikörper der Zelllinie 6C2 konnte beim Anti-Arabinogalaktan-Antikörper aber keine Konkurrenz festgestellt werden.

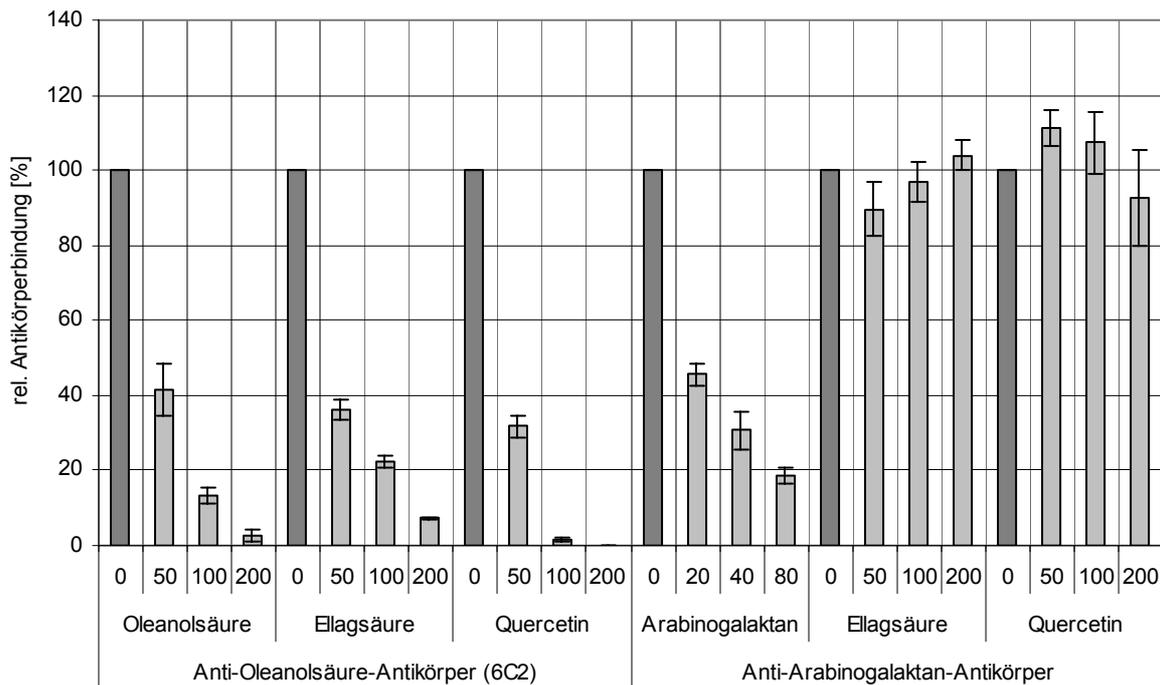


Abb. 3.27 Kompetitions-ELISA mit Ellagsäure und Quercetin

Ellagsäure und Quercetin wurden im kompetitiven ELISA in Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200 mM gegen den Anti-Oleanolsäure-Antikörper der Zelllinie 6C2 und gegen einen Anti-Arabinogalaktan-Antikörper getestet. Eine Konkurrenz erfolgte nur mit dem Anti-Oleanolsäure-Antikörper, was auf eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion hindeutet. Das als Vergleich getestete Arabinogalaktan wurde in Konzentrationen von 20, 40 und 80 µg/mL eingesetzt.

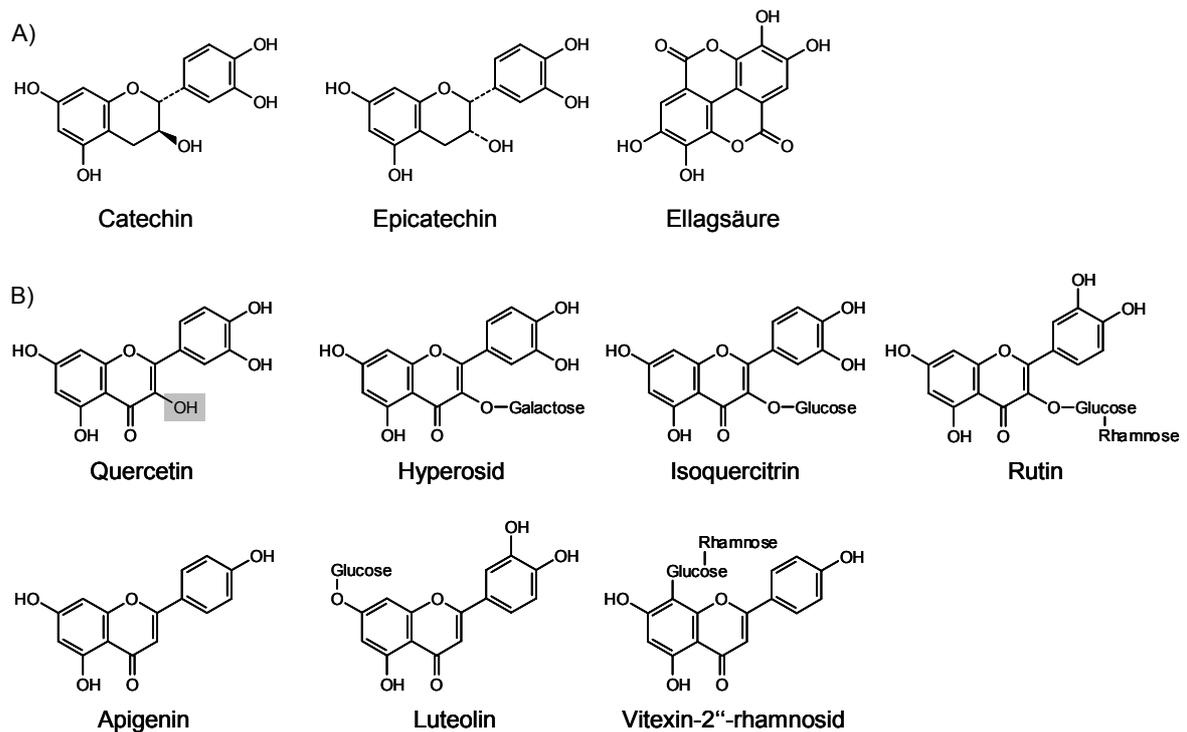


Abb. 3.28 **Übersicht über die getesteten Gerbstoffmonomere und Flavonoide**

A) Gerbstoffmonomere: Ellagsäure zeigte eine konzentrationsabhängige Konkurrenz mit allen drei Anti-Oleanolsäure-Antikörpern. Mit dem Antikörper der Zelllinie 10F10 fiel die Konkurrenz aber deutlich schwächer aus, als mit den Antikörpern der beiden anderen Zelllinien.

B) Flavonoide: ausschließlich Quercetin interagiert mit den untersuchten Antikörpern. Die Bindung erfolgt vermutlich an der C3-Hydroxyfunktion (grau unterlegt).

3.2 Untersuchung von Arzneipflanzenextrakten mit monoklonalen Antikörpern

Bei der Charakterisierung der drei monoklonalen Antikörper hatte sich herausgestellt, dass die Immunglobuline nicht nur mit Oleanolsäure, sondern auch mit einer Anzahl anderer Triterpensapogenine interagieren. Es sollte daher möglich sein, mit Hilfe dieser Antikörper ein breites Spektrum an Triterpensaponinen in Arzneipflanzenextrakten analytisch zu erfassen. Der monoklonale Antikörper der Zelllinie 10F10 war bereits im Kompetitions-ELISA gegen unterschiedliche Extrakte getestet worden (Brand, 2003). Dabei hatte sich herausgestellt, dass mit ihm zwar die freien Aglyka, nicht jedoch die genuinen Saponine erfasst werden können. Der Antikörper der Zelllinie 10F10 bindet am Ring A des Triterpen-Moleküls. Bei den Saponinen kommt es durch die Glykosylierung der C3-Hydroxylfunktion vermutlich zu einer sterischen Blockade der Antikörper-Antigen-Reaktion.

Mit dem Antikörper der Zelllinie 6C2 sollte es hingegen möglich sein, neben den freien Aglyka auch die glykosidischen Verbindungen zu detektieren, da dieser Antikörper am entgegengesetzten Molekülende (Ring E) bindet.

In einem Kompetitions-ELISA wurden verschiedene wässrige Drogenextrakte gegen den Antikörper der Zelllinie 6C2 getestet. Es handelte sich dabei zum einen um Extrakte von klassischen Saponin-Drogen und von Arzneipflanzen, bei denen pentazyklische Triterpene in freier Form vorkommen, zum anderen aber auch um Pflanzenextrakte, in denen nach gängiger Lehrbuchmeinung weder Saponine noch deren Aglyka enthalten sind. In Tabelle 3.4 sind die untersuchten Arzneipflanzen, die eingesetzten Drogen und die darin enthaltenen Inhaltsstoffe aufgelistet. Die für die Interpretation der Ergebnisse erforderlichen Strukturformeln sind in den Abbildungen 4.2 und 4.4 dargestellt (vgl. Abschnitt 4.1.2).

Stammpflanze	Droge	Hauptinhaltsstoffe
<i>Aesculus hippocastanum</i> (Hippocastanaceae)	Hippocastani semen	Triterpensaponine (3-6%), Flavonoide, Gerbstoffe
<i>Hypericum perforatum</i> (Hypericaceae)	Hyperici herba	Naphthodianthrone (Hypericin), Phloroglucine (Hyperforin), Flavonoide, Procyanidine, Catechingerbstoffe, Xanthone
<i>Digitalis purpurea</i> (Scrophulariaceae)	Digitalis purpureae folium	Cardenolidglykoside, Steroidsaponine , Flavonoide, Phenolglykoside
<i>Crataegus monogyna</i> (Rosaceae)	Crataegi folium cum flore	Flavonoide, Catechine, Procyanidine, pentazyklische Triterpene , Xanthin-Derivate
<i>Echinacea purpurea</i> (Asteraceae)	Echinaceae radix	Ätherisches Öl, Kaffeesäurederivate
<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Fabaceae)	Liquiritiae radix	Triterpensaponine (4-15%), Flavonoide, Polysaccharide
<i>Marrubium vulgare</i> (Lamiaceae)	Marrubii herba	Labdan-Diterpene, Flavonoide, Phenolcarbonsäuren
<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	Ginseng radix	Triterpensaponine (2-3%), Polysaccharide, Polyacetylene, ätherisches Öl
<i>Primula veris</i> , <i>P. elatior</i> (Primulaceae)	Primulae radix	Triterpensaponine (3-10%), Phenolglykoside, Saccharide

Stammpflanze	Droge	Hauptinhaltsstoffe
<i>Quillaja saponaria</i> (Rosaceae)	Quillajae cortex	Triterpensaponine (8-16%)
<i>Rheum palmatum</i> (Polygonaceae)	Rhei radix	Anthranoide, Tannin-Gerbstoffe, Pro-cyanidine, Flavonoide
<i>Solidago virgaurea</i> (Asteraceae)	Virgaureae herba	Flavonoide, Triterpensaponine (0,2-0,3%), ätherisches Öl, Labdan-Diterpene, Phenolglykoside
<i>Verbascum phlomoides</i> (Scrophulariaceae)	Verbasci flos	Iridoidglykoside, Phenylethanoidglykoside, Triterpensaponine (0,1%), Flavonoide
<i>Viscum album</i> (Loranthaceae)	Visci herba	Lektine, Viscotoxin, Triterpene (Oleanolsäure)

Tab. 3.4 Übersicht über die im Kompetitions-ELISA getesteten Arzneipflanzen

Die wässrigen Arzneipflanzenextrakte wurden in Konzentrationen von 5, 10 und 20 µL / 100µL im kompetitiven ELISA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.11.3 beschrieben. Abbildung 3.29 zeigt das Wettbewerbsverhalten der unterschiedlichen Extrakte. Mit Ausnahme des Wurzelextraktes von *Panax ginseng* zeigten alle typischen Saponin-Drogen eine konzentrationsabhängige Konkurrenz. Die in *Panax ginseng* enthaltenen Triterpensaponine gehören überwiegend zum tetrazyklischen Dammaran-Typ und werden daher vom Antikörper der Zelllinie 6C2 nicht erkannt. Neben den Extrakten der klassischen Saponin-Drogen zeigten auch die Arzneipflanzenextrakte eine Konkurrenz, in denen nicht glykosylierte, pentazyklische Triterpene enthalten sind. So enthält zum Beispiel *Crataegus monogyna* Oleanolsäure, 2-Hydroxy-Oleanolsäure und Ursolsäure. Auch in *Viscum album* ist freie Oleanolsäure enthalten. Der Extrakt von *Digitalis purpurea* zeigte keine Konkurrenz, was darauf hindeutet, dass die darin enthaltenen Steroidsaponine mit dem Antikörper der Zelllinie 6C2 nicht interagieren.

Bei den Extrakten von *Hypericum perforatum* und *Rheum palmatum* kam es ebenfalls zu positiven Ergebnissen. Es konnte eine deutliche Konkurrenz festgestellt werden, obwohl diese Arzneipflanzen weder Saponine noch deren Aglyka als Inhaltsstoffe besitzen. *Hypericum perforatum* enthält allerdings Flavonoide, u.a. auch Quercetin. Quercetin hatte in den Vorversuchen eine deutliche, konzentrationsabhängige Konkurrenz mit dem Antikörper der Zelllinie 6C2 gezeigt.

Rheum palmatum enthält Tanningerbstoffe, die in der Lage sind, unspezifisch Proteine zu denaturieren. Außerdem handelt es sich bei den Tanningerbstoffen um Zuckerester der Gallussäure. Freie Gallussäure kondensiert bei der Aufbereitung der Droge zu Ellagsäure, die in den Vorversuchen ebenfalls ein positives Wettbewerbsverhalten gezeigt hatte. Es ist daher nicht verwunderlich, dass es bei Tanningerbstoff-haltigen Drogen zu positiven Ergebnissen im Wettbewerbs-ELISA kommt, die allerdings keinen Rückschluss auf einen Saponingehalt der Pflanze zulassen.

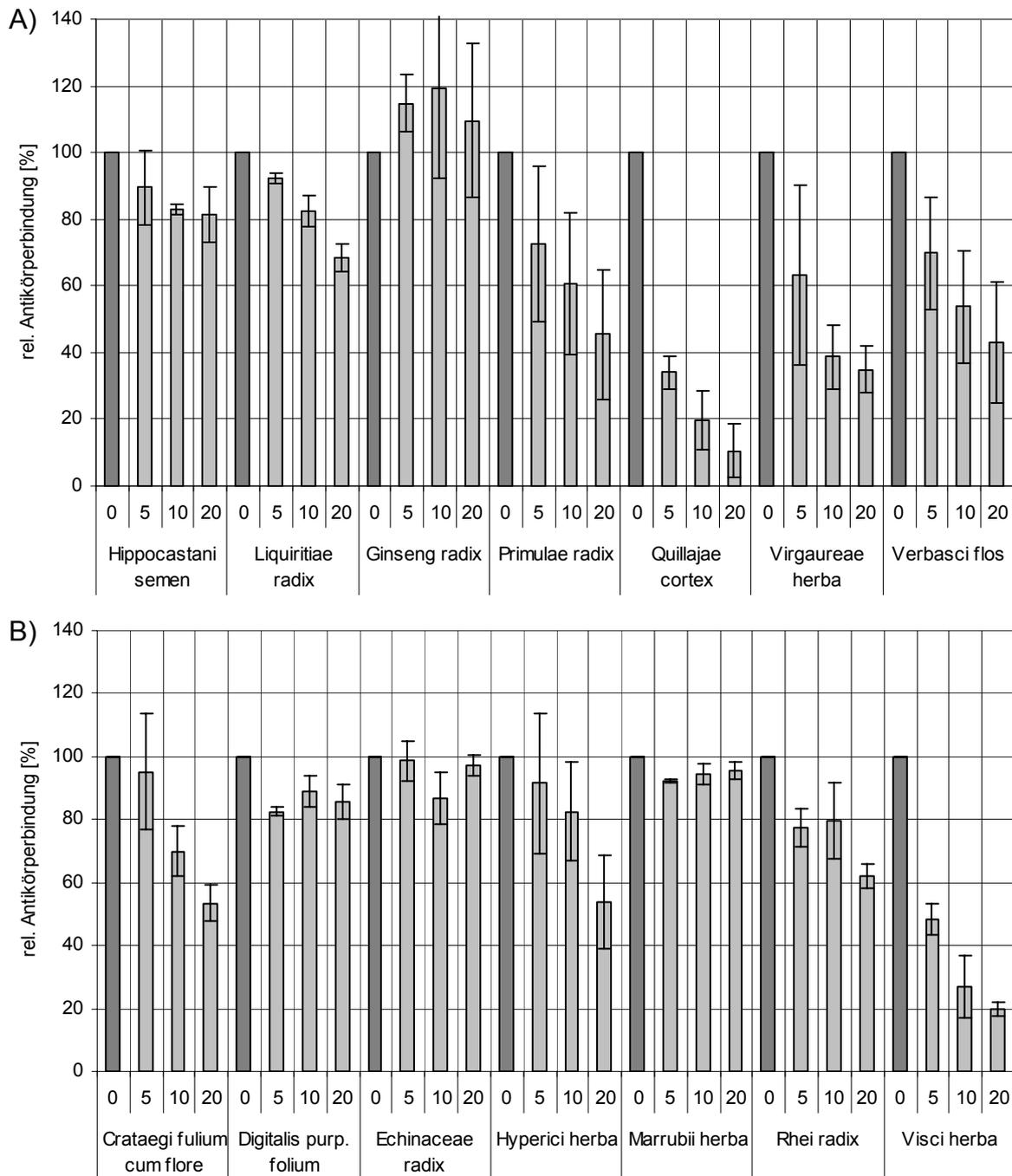


Abb. 3.29 **Kompetitionsverhalten der getesteten Arzneipflanzenextrakte**

A) Extrakte von klassischen Saponindrogen. Mit Ausnahme des Wurzelextraktes von *Panax ginseng* zeigten alle getesteten Extrakte eine konzentrationsabhängige Konkurrenz.

B) Extrakte von Arzneipflanzen, die keine Saponine enthalten. *Crataegus monogyna* und *Viscum album* enthalten freie Oleanolsäure und zeigten daher ein positives Konkurrenzverhalten. Mit den Extrakten von *Hypericum perforatum* (*Hyperici herba*) und *Rheum palmatum* (*Rhei radix*) kam es zu positiven Ergebnissen, obwohl diese Pflanzen keine Saponine enthalten. Das positive ELISA-Signal lässt sich auf den Gehalt an Quercetin bzw. Ellagsäure und Tanningerbstoffen zurückführen.

3.3 Etablierung eines direkten Kompetitions-ELISAs auf der Basis eines Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugats

3.3.1 Prinzip des direkten ELISAs

Die bisher beschriebenen Kompetitionsversuche wurden mit Hilfe eines indirekten ELISAs durchgeführt. Indirekt bedeutet, dass die Anzahl der an das Oleanolsäure-BSA-Konjugat gebundenen Anti-Oleanolsäure-Antikörper mit Hilfe eines enzymmarkierten Zweitantikörpers bestimmt wurde. Um die Kompetitionsversuche einfacher, genauer und sensitiver durchführen zu können, sollte ein direkter ELISA etabliert werden, bei dem auf den Zweitantikörper verzichtet werden kann. Der direkte ELISA basiert auf einem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat. Im Gegensatz zum indirekten Kompetitions-ELISA wird bei dieser Methode nicht das Oleanolsäure-Protein-Konjugat, sondern der aufgereinigte, monoklonale Anti-Oleanolsäure-Antikörper in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte fixiert. Das Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat konkurriert mit dem Kompetitor, z.B. den Saponinen eines Arzneipflanzenextraktes, um die Bindungsstellen der Antikörper. Der Nachweis der gebundenen Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Moleküle erfolgt durch die enzymatische Umsetzung des Farbstoffs Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid (CPRG) von gelb nach rot. Je stärker ein Kompetitor mit den fixierten Antikörpern interagiert, bzw. je mehr Kompetitormoleküle im Versuchsansatz enthalten sind, desto weniger β -Galaktosidase-Konjugat kann gebunden werden und desto weniger CPRG wird umgesetzt. Die genaue Versuchsdurchführung des direkten ELISAs ist unter 2.3.11.4 beschrieben.

3.3.2 Kopplung von Oleanolsäure und *E.coli* β -Galaktosidase

Für die Kopplung der Oleanolsäure mit der bakteriellen β -Galaktosidase wurde die von Yamamoto für eine Prostaglandinkopplung (6-Keto-PGF_{1 α}) etablierte Methode (Yamamoto et al., 1987) modifiziert. Da die Kopplung mit dem in der Originalliteratur zitierten 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbonyldiimid nicht erfolgreich war, wurde 1-1'-Carbonyldiimidazol als Aktivierungsreagenz eingesetzt. Das Carbonyldiimidazol reagiert mit der C27-Carboxylfunktion im organischen Milieu unter Bildung eines instabilen O-Acylisoharnstoff-Derivats, das mit N-Hydroxysuccinimid zu einer aktiven Verbindung weiterreagiert. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels erfolgt die Kopplung der aktivierten Oleanolsäure mit der β -Galaktosidase im wässrigen Medium unter Ausbildung einer Peptidbindung. Da die Aktivierung der Oleanolsäure mit 1-1'-Carbonyldiimidazol unter den vorgeschlagenen Bedingungen (25°C, 3 h, organisches Medium) nur sehr schlecht funktionierte, erfolgte die Umsetzung für 12 Stunden bei 37°C. An den Reaktionsbedingungen der eigentlichen β -Galaktosidase-Kopplung (4°C, 12 h, wässriges Medium) konnte hingegen nichts geändert werden, da sich sowohl eine Temperaturerhöhung, als auch ein Wechsel des Lösungsmittels negativ auf die β -Galaktosidase-Aktivität auswirkten.

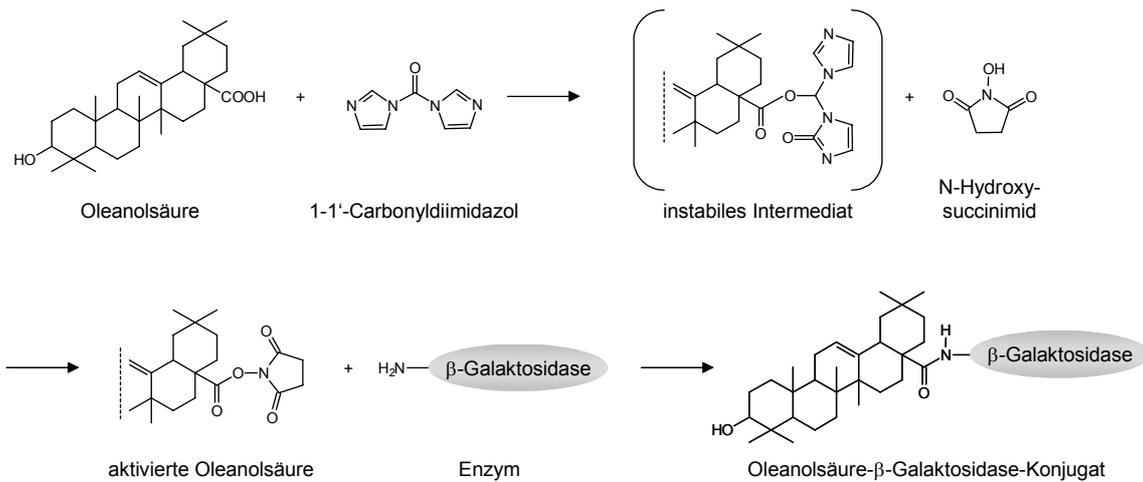


Abb. 3.30 Kopplung von Oleanolsäure und *E.coli* β-Galaktosidase

Die Oleanolsäure wird zunächst im organischen Medium (Acetylaceton) an der C27-Carboxylfunktion durch 1-1'-Carbonyldiimidazol und N-Hydroxysuccinimid aktiviert. Anschließend erfolgt die Kopplung der β-Galaktosidase über eine Peptidbindung im wässrigen Milieu.

3.3.3 Checkpoint-ELISA mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat

Um das richtige Verhältnis zwischen dem monoklonalen Antikörper und dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen des aufgereinigten Antikörpers der Zelllinie 7A6 in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte fixiert und gegen unterschiedliche Mengen an Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat inkubiert. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug 200 μ L pro Vertiefung. Wie man anhand Abbildung 3.31 erkennen kann, war die Aktivität des Oleanolsäure-Konjugats sehr gering. Daher mussten bei den späteren Wettbewerbsversuchen 100 μ L der Antikörperlösung und 80 μ L des Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugats (entsprechend einer 1/2,5-Verdünnung) eingesetzt werden. Trotz intensiver Bemühungen ließ sich die Effizienz der Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Kopplung nicht verbessern.

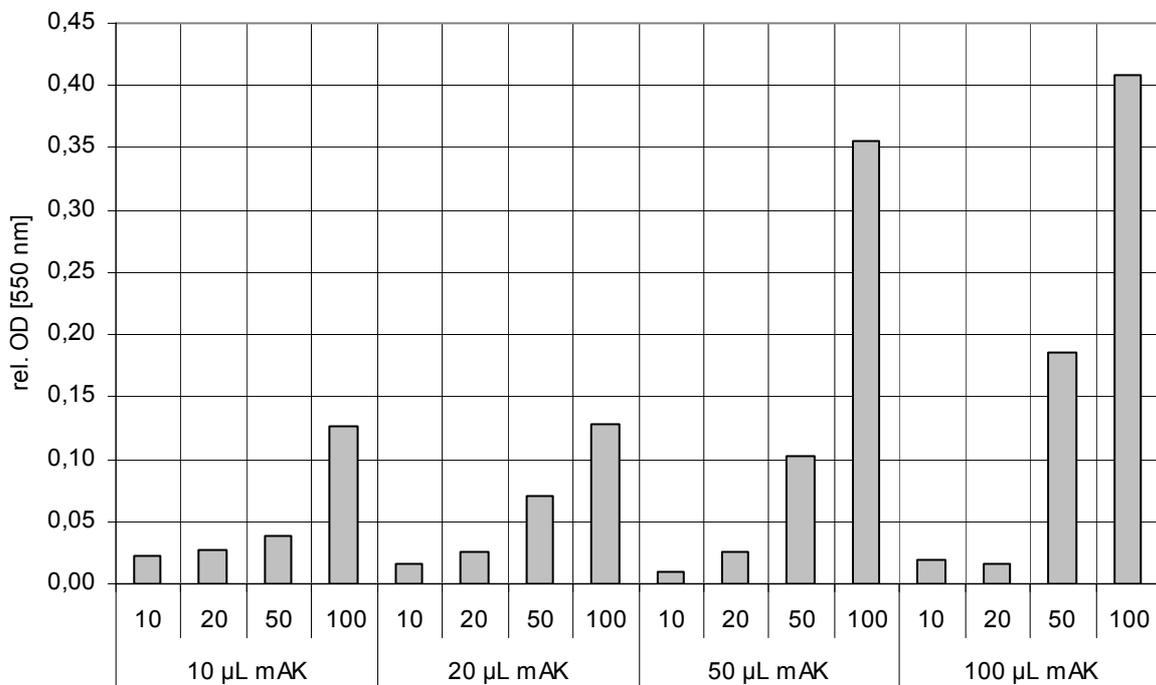


Abb. 3.31 Checkpoint-Titration für den direkten ELISA mit dem monoklonalen Antikörper der Zelllinie 7A6

Unterschiedliche Mengen des aufgereinigten Antikörpers der Zelllinie 7A6 wurden in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte fixiert und mit unterschiedlichen Mengen an Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat inkubiert (10 μ L, 20 μ L, 50 μ L, 100 μ L). Bei den nachfolgenden Wettbewerbsversuchen wurden 80 μ L des Oleanolsäure-Konjugats gegen 100 μ L Antikörperlösung getestet.

3.3.4 Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den direkten ELISA

Wie bereits ausführlich besprochen, besitzt Oleanolsäure im wässrigen Medium nur eine sehr geringe Löslichkeit. Da die Nachweisgrenze des direkten ELISAs durch einen Wettbewerbsversuch mit Oleanolsäure bestimmt werden sollte, musste zunächst der Einfluss des Lösungsmittels auf den ELISA bzw. auf die Aktivität der β -Galaktosidase untersucht werden. Dazu wurde das Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Lösungsmittel vorinkubiert (5%, 10% und 20%) und anschließend im direkten ELISA gegen den aufgereinigten Antikörper der Zelllinie 7A6 untersucht.

Wie man anhand Abbildung 3.32 erkennen kann, wirkten sich alle organischen Lösungsmittel negativ auf die β -Galaktosidase-Aktivität aus. Den geringsten Effekt zeigte Chloroform, so dass bei der späteren Bestimmung der Nachweisgrenze die Oleanolsäure in Chloroform gelöst wurde.

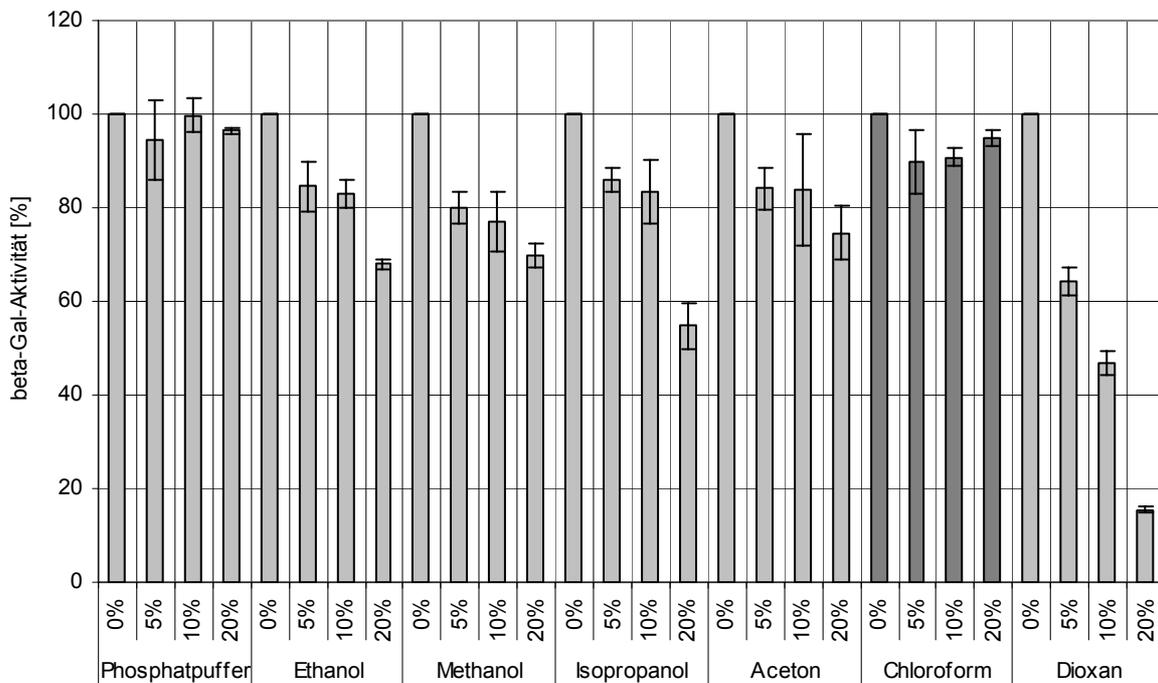


Abb. 3.32 Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den direkten ELISA

Mit Ausnahme von Chloroform (dunkel hervorgehoben) wirken sich alle organischen Lösungsmittel negativ auf den direkten ELISA bzw. auf die Aktivität der β -Galactosidase aus. Daher wurde bei der nachfolgenden Bestimmung der Nachweisgrenze die Oleanolsäure in Chloroform gelöst.

3.3.5 Bestimmung der Nachweisgrenze des direkten ELISA

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze wurde eine Oleanolsäure-Stammlösung (2 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) mit Chloroform als Lösungsmittel angesetzt. Das Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1/2,5 mit unterschiedlichen Mengen dieser Stammlösung gemischt und gegen den in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte fixierten 7A6-Antikörper getestet. Die Nachweisgrenze des direkten ELISAs lag unter den gewählten Bedingungen bei 0,25 – 0,5 mM Oleanolsäure.

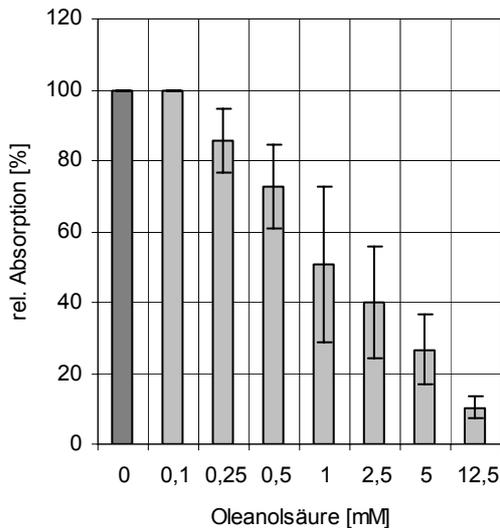


Abb. 3.33 Bestimmung der Nachweisgrenze des direkten ELISAs

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze des direkten ELISAs wurde das Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat mit unterschiedlichen Mengen freier Oleanolsäure gemischt und gegen den Antikörper der Zelllinie 7A6 inkubiert. Die Nachweisgrenze lag bei 0,25 – 0,5 mM.

3.3.6 Direkter Kompetitions-ELISA mit einem wässrigen Extrakt von *Quillaja saponaria*

Um zu überprüfen, ob sich mit dem direkten Kompetitions-ELISA auch Arzneipflanzenextrakte analysieren lassen, wurde ein wässriger Extrakt aus der Rinde von *Quillaja saponaria* (*Quillajae cortex*) als Kompetitor getestet. Wie man in Abbildung 3.34 erkennen kann, zeigte der Arzneipflanzenextrakt eine konzentrationsabhängige Konkurrenz.

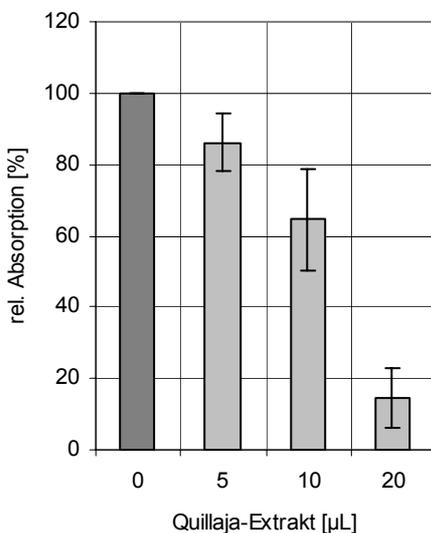


Abb. 3.34 Direkter Kompetitions-ELISA mit dem Extrakt von *Quillaja saponaria*

Unterschiedliche Mengen eines wässrigen Arzneipflanzenextraktes wurden im direkten Kompetitions-ELISA getestet. Der Extrakt zeigte eine konzentrationsabhängige Konkurrenz.

3.4 Konstruktion und Expression von rekombinanten scFv-Antikörperfragmenten gegen Oleanolsäure

3.4.1 Konstruktion der scFv-Fragmente und Ligation in die Plasmide pAK100, pAK300 und pAK400

Für die Konstruktion der scFv-Fragmente gegen das Triterpen Oleanolsäure wurde die RNA der Hybridomzellen der Zelllinien 6C2, 7A6 und 10F10 isoliert und mit Hilfe eines oligo-dT-Primers in cDNA revers transkribiert. Die cDNA diente als Matrize für die PCR-Amplifikation der variablen Domänen der leichten und schweren Kette (VL und VH). Für die Amplifikation wurden die degenerierten Oligonukleotid-Mischungen V_LFOR und V_LBACK bzw. V_HFOR und V_HBACK eingesetzt. Über die Oligonukleotide V_LFOR und V_HBACK wurden an VL und VH bereits komplementäre Linkersequenzen angehängt, über die anschließend die beiden variablen Domänen zum scFv-Fragment verknüpft wurden. Diese Verknüpfung erfolgte durch eine „Splicing by overlap extension-PCR“ (SOE-PCR) mit den Primern scfor und scback.

Über die Oligonukleotide scback und V_HFOR wurden am 5'- und am 3'-Ende der scFv-DNA jeweils eine *Sfi*I-Schnittstelle eingeführt. Vor der Ligation der scFv-Fragment-DNA in die Plasmide pAK100, pAK300 oder pAK400 erfolgte eine Restriktionshydrolyse mit dem Enzym *Sfi*I. Dabei wurde aus dem Vektor die Tetrazyklin-Resistenzkassette entfernt, so dass bei der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese gut zwischen hydrolysiertem und nicht hydrolysiertem Plasmid unterschieden werden konnte.

Abbildung 3.35 gibt das Klonierungsschema wieder. Abbildung 3.36 zeigt die Konstruktion des 10F10-scFv-Fragments. Die variablen Domänen VL und VH haben eine Größe von ca. 400 bp. Das scFv-Fragment ist ca. 800 bp groß.

Neben dem 10F10-scFv-Fragment wurden auch ein 6C2-scFv- und ein 7A6-scFv-Fragment konstruiert. Die Klonierung erfolgte zunächst in das Plasmid pAK400. Nach den im Folgenden besprochenen Screening-Schritten wurde die scFv-DNA zusätzlich in die Plasmide pAK100 und pAK300 umklont. Tabelle 3.5 zeigt eine Übersicht der unterschiedlichen Konstrukte.

Herkunft der RNA	Bezeichnung der Konstrukte	Registriernummer
Hybridomzelllinie 6C2	6C2-scFv.pAK100	1.1748
	6C2-scFv.pAK300	1.1749
	6C2-scFv.pAK400	1.1650
Hybridomzelllinie 7A6	7A6-scFv.pAK100	1.1685
	7A6-scFv.pAK300	1.1684
	7A6-scFv.pAK400	1.1651
Hybridomzelllinie 10F10	10F10-scFv.pAK100	1.1655
	10F10-scFv.pAK400	1.1581

Tab. 3.5 Übersicht über die Expressionsplasmide mit den Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmenten

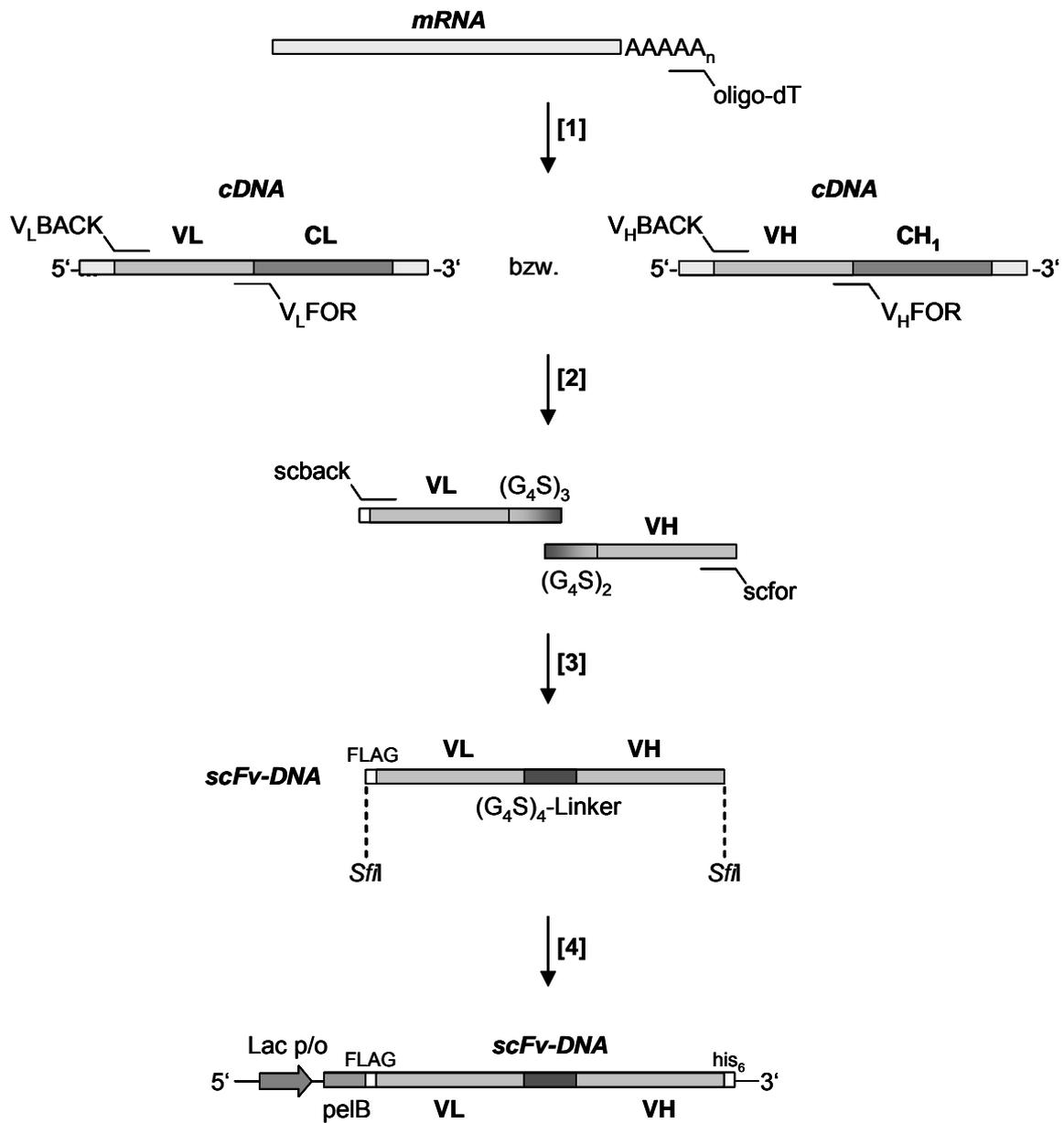


Abb. 3.35 Klonierung eines scFv-Fragments in das Plasmid pAK300 bzw. pAK400

Die aus den Hybridomzellen isolierte mRNA wird mit einem oligo-dT-Primer in cDNA revers transkribiert [1]. Die variablen Domänen von leichter und schwerer Kette (VL und VH) werden anschließend mit Hilfe der degenerierten Oligonukleotid-Mischungen V_LFOR und V_LBACK bzw. V_HFOR und V_HBACK amplifiziert [2]. Durch die „Splicing by overlap extension-PCR“ werden VL und VH über einen (G₄S)₄-Polypeptidlinker zum scFv-Fragment verknüpft [3]. Die scFv-DNA kann nach einer Restriktionshydrolyse mit dem Enzym *Sfi* I in den pAK-Vektor ligiert werden [4]. Das scFv-Protein ist N-terminal durch ein FLAG-tag und C-terminal durch ein His-tag markiert.

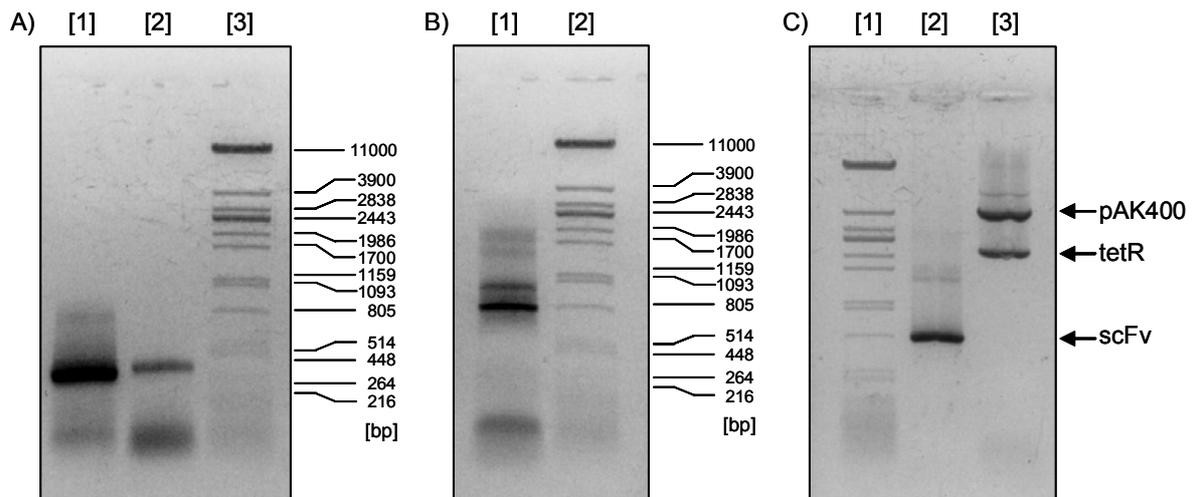


Abb. 3.36 Konstruktion des 10F10-scFv-Fragments und Ligation in das Plasmid pAK400

A) PCR-Amplifikation der variablen Domänen VL [1] und VH [2]. Die variablen Domänen haben eine Größe von ca. 400 bp. Die Auftrennung erfolgte über ein 1%-iges Agarosegel. [3]: Größenmarker

B) Verknüpfung der variablen Domänen VL und VH zum scFv-Fragment [1] durch die „Splicing by overlap extension-PCR“. Die Auftrennung erfolgte über ein 1%-iges Agarosegel. [2]: Größenmarker

C) *Sfi* I-Restriktionshydrolyse des scFv-Fragments [2] und des Plasmid pAK400 [3]. Aus dem Plasmid wird durch das Restriktionsenzym die Tetrazyklin-Resistenzkassette (tetR) entfernt. Dadurch ist eine deutliche Unterscheidung zwischen dem ungeschnittenen und dem hydrolysierten Plasmid möglich. Die Auftrennung erfolgte über ein 0,7%-iges Agarosegel. [1]: Größenmarker (Die Agarosegele sind in Umkehrfarben dargestellt.)

3.4.2 Screening auf V κ -Pseudogensequenzen

Bei der Etablierung von Hybridomzelllinien werden Myelomzellen als Fusionspartner der B-Lymphozyten verwendet. Bei den Myelomzellen handelt es sich um entartete B-Zellen, die genetisch so modifiziert wurden, dass sie selbst keine Antikörper mehr produzieren. In den meisten Myelomzellen wird aber ein Pseudogen der leichten Kette, zum Teil allerdings auch der schweren Kette, transkribiert (Cabilly et al., 1985, Strohal et al., 1987). Eine Translation des Pseudogens zum Protein findet jedoch in der Regel nicht statt. Bei der Konstruktion von Antikörperfragmenten kommt es oftmals zu Schwierigkeiten, da bei der PCR-Amplifikation von VL und VH neben den funktionellen Antikörperdomänen auch die Pseudogensequenzen amplifiziert und kloniert werden.

Die Identifizierung der Bakterienklone, die die DNA für ein funktionelles Antikörperfragment enthalten, ist sehr aufwendig. Die entsprechende DNA-Sequenz ist in der Regel nicht bekannt, so dass eine gezielte Suche nach ihr nicht möglich ist. Es ist daher oftmals einfacher, nach der Transformation der DNA-Konstrukte die Bakterienklone zu identifizieren, die ein Plasmid mit der Pseudogensequenz enthalten.

3.4.2.1 Auswahl der Oligonukleotide für das Pseudogenscreening

Das Pseudogenscreening erfolgte durch eine Kolonien-Hybridisierung oder durch einen Southern Blot unter Einsatz von radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die spezifisch mit der Pseudogensequenz hybridisieren.

Um die Sequenz der Oligonukleotide, die für das Screening eingesetzt werden sollten, zu ermitteln, wurden zunächst die Pseudogensequenzen der verwendeten Myelomzellen amplifiziert und sequenziert.

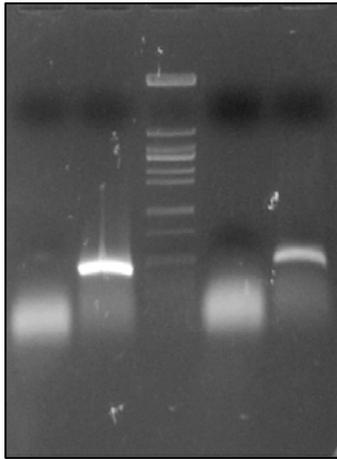
Dazu wurde die mRNA der Myelomzellen isoliert und in cDNA transkribiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation der Pseudogensequenzen mit den Oligonukleotid-Mischungen V_LFOR und V_LBACK bzw. V_HFOR und V_HBACK. Wie man in Abbildung 3.37 erkennt, konnten bei den beiden im Arbeitskreis Dingermann verwendeten Myelomzelllinien V_κ-Pseudogene amplifiziert werden. Diese V_κ-Pseudogensequenzen wurde in das Plasmid pGEM[®]-T ligiert und mit den Oligonukleotiden Rsp und Sp3 sequenziert. Die Sequenz entsprach der in der Literatur veröffentlichten V_κ-Pseudogensequenz (Strohal et al., 1987).

Die V_κ-Pseudogensequenz unterscheidet sich von funktionellen Antikörpersequenzen vor allem durch zwei charakteristische Mutationen: Durch eine Punktmutation im Codon 23 erfolgt ein Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin. Das betroffene Cystein liegt in der FR1-Region der variablen Domäne und bildet normalerweise mit einem zweiten Cystein in der FR3-Domäne eine Disulfidbrücke. Durch den Aminosäureaustausch kann sich diese Disulfidbrücke nicht ausbilden und sich das Antikörperfragment daher nicht funktionell falten.

Neben der Punktmutation in der FR1-Region existiert eine Deletion von vier Basen in der CDR3-Region, die vermutlich durch ein fehlerhaftes Rearrangement zwischen dem V_κ- und dem J_{κ2}-Gensegment entstanden ist. Durch diese Deletion kommt es bei der Translation zu einer Verschiebung des Leserahmens.

Die Oligonukleotide, mit denen das Pseudogenscreening erfolgen sollte, wurden so konstruiert, dass sie im Bereich der Mutationen mit der Pseudogen-DNA hybridisieren. Das Oligonukleotid V_κJunk1 liegt in der FR1-Region und endet am mutierten Codon 23. Das Oligonukleotid V_κJunk2 liegt in der CDR3-Domäne und erstreckt sich über die 4 bp-Deletion. Durch eine Hybridisierung der transformierten DNA-Konstrukte mit einem der beiden radioaktiv markierten Oligonukleotide unter stringenten Bedingungen konnten die Plasmide, in die die Pseudogensequenz ligiert wurde, eindeutig identifiziert werden.

A) [1] [2] [3] [4] [5]



NS-1/1-AG4-1 P3-X63-Ag8

B) Sequenz des V κ -Pseudogens:

ATG	GCG	GAC	TAC	AAA	GAT	ATT	GTG	TTG	ACA
CAG	TCT	CCT	GCT	TCC	TTA	GCT	GTA	TCT	CGT
GGG	CAG	AGG	GCC	ACC	ATC	TCA	<u>TAC</u>	AGG	GCC
AGC	AAA	AGT	GTC	AGT	ACA	TCT	GGC	TAT	AGT
TAT	ATG	CAC	TGG	AAC	CAA	CAG	AAA	CCA	GGA
CAG	CCA	CCC	AGA	CTC	CTC	ATC	TAT	CTT	GTA
TCC	AAC	CTA	GAA	TCT	GGG	GTC	CCT	GCC	AGG
TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC
ACC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT	GTG	GAG	GAG	GAG
GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	TAC	TGT	CAG	CAC	<u>ATT</u>
<u>AGG</u>	<u>GAG</u>	<u>CT</u>	<u>---</u>	<u>TAC</u>	<u>ACG</u>	<u>TTC</u>	<u>GGA</u>	<u>GGG</u>	<u>GGG</u>
ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA				

Abb. 3.37 V κ -Pseudogen in Myelomzellen

A) Die beiden Myelomzelllinien NS-1/1-AG4-1 und P3-X63-Ag8 enthalten ein V κ -Pseudogen, das mit den Primer-Mischungen V κ FOR und V κ BACK amplifiziert werden konnte ([2] und [5]). Mit den Primern für die schwere Kette erfolgte hingegen keine Amplifikation ([1] und [4]). [3]: Größenmarker

B) In der Sequenz des V κ -Pseudogens findet man zwei charakteristische Mutationen (grau unterlegt). Die für das Screening ausgewählten Oligonukleotide V κ Junk1 und V κ Junk2 (unterstrichen) binden im Bereich dieser Mutationen.

3.4.2.2 Screening der Anti-Oleanolsäure-scFv-Konstrukte auf das V κ -Pseudogen

Nach der Klonierung der unterschiedlichen scFv-Fragmente in das Plasmid pAK400 und der Transformation dieses Konstrukts in einen *E.coli*-Bakterienstamm, erfolgte das Pseudogenscreening mit dem radioaktiv markiertem Oligonukleotid V κ Junk1 oder V κ Junk2. Dafür wurden die Bakterienklone von einer Masterplatte auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der Membran lysiert und die fixierte DNA mit der radioaktiven Sonde hybridisiert (vgl. 2.2.15). Wie man in Abbildung 3.38 erkennen kann, lag der Anteil der V κ -Pseudogenesequenz bei ca. 5 bis 50 %, je nachdem, aus welcher Hybridomzelllinie die mRNA für die cDNA-Synthese isoliert wurde. Einige der Klone, die im Pseudogenscreening kein positives Signal gezeigt hatten, wurden im Anschluss auf die Expression von vollständigen scFv-Fragmenten getestet.

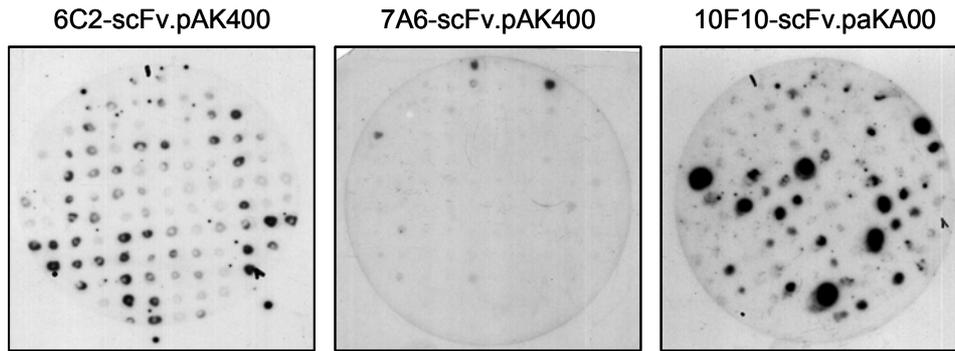


Abb. 3.38 **V κ -Pseudogenescreening für die unterschiedlichen Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente**

Die auf der Nitrozellulosemembran fixierte Plasmid-DNA wurde mit den ^{32}P -markierten Oligonukleotiden V κ Junk1 (7A6-scFv & 10F10-scFv) oder V κ Junk2 (6C2-scFv) hybridisiert.

3.4.3 Auswahl von Bakterienklonen, die ein vollständiges scFv-Fragment exprimieren

Nicht jeder Bakterienklon, für den das Pseudogenescreening negativ ausfällt, exprimiert ein vollständiges Antikörperfragment. So ist es zum Beispiel möglich, dass durch eine Mutation ein Stoppcodon in die DNA eingeführt wurde, so dass nur ein verkürztes Fragment produziert wird. Oder es kann zu einer Verschiebung des Leserahmens kommen, wodurch ein nicht-funktionelles Protein entsteht.

Um die Bakterienklone zu identifizieren, die ein vollständiges scFv-Fragment produzieren, wurde eine Proteinexpression im analytischen Maßstab gemäß Abschnitt 2.3.1.1 durchgeführt. Der Nachweis der scFv-Fragmente erfolgte durch die immunochemische Detektion eines Western-Blots mit einem spezifischen Antikörper. Es wurde entweder ein Antikörper eingesetzt, der die FR-Domänen muriner Antikörper erkennt (Anti-Mouse-Immunglobulin-Antibody, Verdünnung 1:20000) oder ein Antikörper, der an das His-tag am C-terminalen Ende der scFv-Fragmente bindet (Penta-His Antibody, Verdünnung 1:5000). In der Regel produzierten $\frac{2}{3}$ der untersuchten Klone ein vollständiges Antikörperfragment.

3.4.4 Sequenzierung der Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente

Die Sequenzierung der scFv-Fragmente erfolgte in den Plasmiden pAK300 und pAK400 mit den Oligonukleotiden Rsp und scfor. Beim Plasmid pAK100 wurden die Oligonukleotide Rsp und pAK100-myc eingesetzt. Zusätzlich wurden VL und VH getrennt voneinander in den Vektor pGEM[®]-T umklont und mit den Primern Rsp und Sp3 sequenziert. Die Abbildungen 3.39, 3.40 und 3.41 geben die DNA- und die Aminosäuresequenzen der drei Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente wieder.

3.4.4.1 DNA- und Aminosäure-Sequenz des 6C2-scFv-Fragments

pelB-Leader															<i>SfiI</i>				
ATG	AAA	TAC	CTA	TTG	CCT	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA	CTC	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC
M	K	Y	L	L	P	T	A	A	A	G	L	L	L	L	A	A	Q	P	A
FLAG-tag															FR1				
ATG	GCG	GAC	TAC	AAA	GAT	ATT	CAG	ATG	ACA	CAG	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	ATC	CAG	CTT
M	A	D	Y	K	D	I	Q	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	I	S	L
															CDR1				
GGA	GAT	CAA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AGT	AGC	GCA	GTC	AGC	AAC	ATA	TTA	CAC	TTA	TCC	AGC
G	D	Q	A	S	I	S	C	S	S	A	V	S	N	I	L	H	L	S	S
FR2															CDR2				
TGG	TAC	CAA	CAG	AAG	TCA	GAA	ACC	TCC	CCC	TCT	CTC	CTG	ATC	TAC	AAA	ACA	TCC	AAA	CGA
W	Y	Q	Q	K	S	E	T	S	P	S	L	L	I	Y	K	T	S	K	R
FR3																			
GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GTT	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACC	CTC	GAT	TTC	ACT	ACA
A	S	G	V	P	V	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	D	F	T	T
															CDR3				
ATC	AGC	AGA	GTT	GAG	AGT	GAG	GAT	CTG	GCC	ACT	GTT	TAC	TGT	TCT	CAG	TGG	TAC	AGC	CCC
I	S	R	V	Q	S	E	D	L	A	T	V	Y	C	S	Q	W	Y	S	P
FR4															(Gly₄Ser)₄-Linker				
CTC	ACG	TTC	GGT	ACC	GCT	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGT	GGT	GGT
L	T	F	G	T	A	T	K	L	E	I	K	R	G	G	G	G	S	G	G
															FR1				
GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGA	TCC	GAG	GTG	AAG	CTG	GTG	GAG	TCT
G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	E	V	K	L	V	E	S
GGG GTC GAA CTG GTT AGG GGG ACC TCC GTT AAA CTC TCC TGT GCA AAG GCT TCT GGC TAT																			
G	V	E	L	V	R	G	T	S	V	K	L	S	C	A	K	A	S	G	Y
CDR1															FR2				
ATC	TTC	ACT	ATC	ATC	TGG	TAC	ATC	TGG	GTT	AAA	CAG	AGG	CCA	GGA	CAG	AGC	CTT	GAG	TGG
I	F	T	I	I	W	Y	I	W	V	K	Q	R	P	G	Q	S	L	E	W
CDR2															FR3				
ATC	GGA	ATG	CAC	AAT	AGT	GGA	ATT	ACT	ACT	TAC	TAC	GGT	CCA	TGG	TAC	TCC	AAG	GGC	GTT
I	G	M	H	N	S	G	N	T	T	Y	Y	G	P	W	Y	F	K	G	V
GCT ACC CTG ACT GCA GAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAC CTG CAG TTG GAC AGT CTG ATG																			
A	T	L	T	A	N	K	S	S	S	T	A	Y	L	Q	L	D	S	L	M
CDR3																			
TCT	GAG	GAC	TCT	GCA	GTC	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	GTT	GCT	TAC	ATT	GTA	GTA	TAC	GAC	TAC
S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	V	A	Y	I	V	V	Y	D	Y
FR4															<i>SfiI</i>				
TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	ACT	GTC	CCC	GTC	TCC	TCA	GCC	TCG	GGG	GCC	TCG	GGG	GCC	GAT	CAC
W	G	Q	G	T	T	V	P	V	S	S	A	S	G	A	S	G	A	D	H
His-tag																			
CAT	CAT	CAC	CAT	CAT	TAG														
H	H	H	H	H	*														

Abb. 3.39 DNA- und Aminosäuresequenz des 6C2-scFv-Fragments

Die ersten 20 Triplets der dargestellten Sequenz codieren für das pelB-Leader-Peptid (mittelgrau), das für den Transport des Antikörper-Fragments durch die Periplasmamembran verantwortlich ist und dabei abgespalten wird. Das scFv-Fragment beginnt am zweiten ATG-Codon mit dem N-terminalen FLAG-tag, gefolgt von der variablen Region der leichten Kette (hellgrau). Der C-Terminus von VL ist über den (Gly₄Ser)₄-Linker (mittelgrau) mit dem N-Terminus von VH (dunkelgrau) verbunden. Die antigenbindenden CDR-Domänen von VL und VH sind rot hervorgehoben. Der C-Terminus von VH geht in das His-tag (6 Histidin-Reste) über. (Das scFv-Fragment besitzt nur bei der Expression in pAK300 oder pAK400 ein N-terminales His-tag. Bei der Expression in pAK100 befindet sich zwischen dem scFv-Fragment und dem ΔgpIII-Protein ein myc-tag.)

3.4.4.2 DNA- und Aminosäuresequenz des 7A6-scFv-Fragments

pelB-Leader																<i>Sfi</i> I			
ATG	AAA	TAC	CTA	TTG	CCT	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA	CTC	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC
M	K	Y	L	L	P	T	A	A	A	G	L	L	L	L	A	A	Q	P	A
FLAG-tag																FR1			
ATG	GCG	GAC	TAC	AAA	GAC	ATT	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	GTC	AGT	CTT
M	A	D	Y	K	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	S	L
																CDR1			
GAA	GAT	CAA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AGA	TCT	AGT	CAG	AGC	CTT	GTA	CAC	AGT	AAT	GGA	AAC
G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N
																FR2			
ACC	TAT	TTA	CAT	TGG	TAC	CTG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CTC	CTG	ATC	TAC	AAA
T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K
																CDR2			
GTT	TCC	AAC	CGA	TTT	TCT	GGG	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	GAT
V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
																CDR3			
TTC	ACA	CTC	AAG	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA	GTT	TAT	TTC	TGC	TCT	CAA
F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	F	C	S	Q
																FR4			
AGT	ACA	CAT	GTT	CCT	CCT	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGT	GGT	GGT
S	T	H	V	P	P	T	F	G	A	G	T	K	L	E	I	K	R	G	G
(Gly₄Ser)₄-Linker																FR1			
GGT	GGT	TCT	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGA	TCC	GAG	GTG
G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	E	V
																FR2			
AAG	CTG	GTG	GAG	TCA	GAA	CCT	AGC	CTC	GTG	AAA	CCT	TCT	CAG	ACT	CTG	TCC	CTC	ACC	TGT
K	L	V	E	S	G	P	S	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C
																CDR1			
TCT	GTC	ACT	GGC	GAC	TCC	ATC	ACC	AGT	GGT	TAT	TGG	AAC	TGG	ATC	CGG	AAA	TTC	CCA	GGG
S	V	T	G	D	S	I	T	S	G	Y	W	N	W	I	R	K	F	P	G
																CDR2			
AAT	AAA	CTT	GAG	TAC	ATG	GGG	TAC	ATA	AAC	TAC	AGT	GGT	CGC	ACT	TAC	TAC	AAT	CCA	TCT
N	K	L	E	Y	M	G	Y	I	N	Y	S	G	R	T	Y	Y	N	P	S
																FR3			
CTC	AAA	AGT	CGA	ATC	TCC	ATC	ACT	CGA	GAC	ACA	TCC	AAG	AAC	CAG	TAC	TAC	CTG	CAG	TTG
L	K	S	R	I	S	I	T	R	D	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	Q	L
																CDR3			
AAT	TCT	GTG	ACT	ACT	GAG	GAC	ACA	GCC	ACA	GAT	TAC	TGT	GCA	AGG	GTT	GTT	ATT	TCG	GTA
N	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	V	V	I	S	V
																FR4			
GTA	GCC	CCC	TTT	GCT	TTG	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT	CTC	ACA	GTC	TCC	TCG	GCC	TCG	GGG
V	A	P	F	A	L	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	A	S	G
His-tag																<i>Sfi</i> I			
GCC	GAT	CAC	CAT	CAT	CAC	CAT	CAT	TAG											
A	D	H	H	H	H	H	H	*											

Abb. 3.40 DNA- und Aminosäuresequenz des 7A6-scFv-Fragments

Die ersten 20 Triplets der dargestellten Sequenz codieren für das pelB-Leader-Peptid (mittelgrau), das für den Transport des Antikörper-Fragments durch die Periplasmamembran verantwortlich ist und dabei abgespalten wird. Das scFv-Fragment beginnt am zweiten ATG-Codon mit dem N-terminalen FLAG-tag, gefolgt von der variablen Region der leichten Kette (hellgrau). Der C-Terminus von VL ist über den (Gly₄Ser)₄-Linker (mittelgrau) mit dem N-Terminus von VH (dunkelgrau) verbunden. Die antigenbindenden CDR-Domänen von VL und VH sind rot hervorgehoben. Der C-Terminus von VH geht in das His-tag (6 Histidin-Reste) über. (Das scFv-Fragment besitzt nur bei der Expression in pAK300 oder pAK400 ein N-terminales His-tag. Bei der Expression in pAK100 befindet sich zwischen dem scFv-Fragment und dem ΔgpIII-Protein ein myc-tag.)

3.4.4.3 DNA- und Aminosäuresequenz des 10F10-scFv-Fragments

pelB-Leader																		SfiI					
ATG	AAA	TAC	CTA	TTG	CCT	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA	CTC	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC				
M	K	Y	L	L	P	T	A	A	A	G	L	L	L	L	A	A	Q	P	A				
FLAG-tag																		FR1					
ATG	GCG	GAC	TAC	AAA	GAT	ATT	GTG	TTG	ACA	CAG	TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	TCT	GTG	ACT	CCA				
M	A	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	T	P				
CDR1																		FR2					
GGA	GAT	AAC	GTC	AGT	ATC	TCC	TGC	AGG	GCC	AAC	CAA	AGT	ATT	AGC	AAC	AAC	CTA	CAC	TGG				
G	D	N	A	S	I	S	C	R	A	N	Q	S	I	S	N	N	L	H	W				
CDR2																		FR3					
TAT	CAA	CAA	AAA	TAC	CAT	GAG	TCT	CCA	AGG	CTT	CTC	ATC	AAG	CTC	GCT	TCC	CAG	TCC	ATC				
Y	Q	Q	K	Y	H	E	S	P	R	L	L	I	K	L	A	S	Q	S	I				
CDR3																		FR4					
TCC	GGG	ATC	CCC	TCC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	AGT	ATC				
S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	S	I				
CDR3																		(Gly ₄ Ser) ₄ -Linker					
AAC	AGT	GTG	ATC	ACT	GAA	GAT	TTT	GGA	ATG	TAT	TTC	TGT	CAA	CAG	AGT	TAC	AGC	TGG	CCT				
N	S	V	E	T	E	D	F	G	M	Y	F	C	Q	Q	S	Y	S	W	P				
CDR3																		FR1					
CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGT	GGT	GGT				
L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	I	K	R	G	G	G	G	S	G	G				
CDR3																		FR1					
GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGA	TCC	GAG	GTG	AAG	CTG	GTG	GAG	TCT				
G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	E	V	K	L	V	E	S				
CDR1																		FR2					
GGG	GGA	GGC	TTA	GTG	AAG	CTT	GGA	GGG	TCC	CTG	AAA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC				
G	G	G	L	V	K	L	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F				
CDR2																		FR3					
ACT	TTC	AGT	ACT	TAT	TAC	ATG	TCT	TGG	GTT	CGC	CAG	ACT	CCA	GAG	AAG	AGG	CTG	GAG	TTG				
T	F	S	T	Y	Y	M	S	W	V	R	Q	T	P	E	K	R	L	E	L				
CDR2																		FR3					
GTC	GCA	GCC	ATT	AAT	AGT	AAT	GGT	GGT	AGA	ACC	TAC	TAT	CCA	GAC	ACT	GTG	AAG	GGC	CGA				
V	A	A	I	N	S	N	G	G	R	T	Y	Y	P	D	T	V	K	G	R				
CDR3																		FR4					
TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GTC	AAT	GCC	AAG	AAC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGT	CTG	AAG				
F	T	I	S	R	V	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K				
CDR3																		SfiI					
TCT	GAG	GAC	GCA	GCC	TTG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	TAT	GAT	TAC	ATT	ACC	TAT	GCC	ATG	GAC				
S	E	D	A	A	L	Y	Y	C	A	R	Y	D	Y	I	T	Y	A	M	D				
CDR3																		SfiI					
TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	TCA	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCC	TCG	GGG	GCC	TCG	GGG	GCC	GAT				
Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	A	S	G	A	S	G	A	D				
His-tag																							
CAC	CAT	CAT	CAC	CAT	CAT	TAG																	
H	H	H	H	H	H	*																	

Abb. 3.41 DNA- und Aminosäuresequenz des 10F10-scFv-Fragments

Die ersten 20 Triplets der dargestellten Sequenz codieren für das pelB-Leader-Peptid (mittelgrau), das für den Transport des Antikörper-Fragments durch die Periplasmamembran verantwortlich ist und dabei abgespalten wird. Das scFv-Fragment beginnt am zweiten ATG-Codon mit dem N-terminalen FLAG-tag, gefolgt von der variablen Region der leichten Kette (hellgrau). Der C-Terminus von VL ist über den (Gly₄Ser)₄-Linker (mittelgrau) mit dem N-Terminus von VH (dunkelgrau) verbunden. Die antigenbindenden CDR-Domänen von VL und VH sind rot hervorgehoben. Der C-Terminus von VH geht in das His-tag (6 Histidin-Reste) über. (Das scFv-Fragment besitzt nur bei der Expression in pAK300 oder pAK400 ein N-terminales His-tag. Bei der Expression in pAK100 befindet sich zwischen dem scFv-Fragment und dem ΔgpIII-Protein ein myc-tag.)

3.4.4.4 Aminosäuresequenzvergleich der Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente

Abbildung 3.42 zeigt den Aminosäuresequenzvergleich der drei Anti-Oleanolsäure-Antikörperfragmente. Die CDR-Domänen, über die der Kontakt mit dem Antigen erfolgt, sind rot hervorgehoben. Die Bereiche, in denen alle drei Proteine die gleichen Aminosäuren besitzen, sind grau unterlegt. Man kann erkennen, dass vor allem in den FR-Domänen der VL-Region konservierte Aminosäureblöcke auftreten. Die großen Homologien am Anfang der FR1 und am Ende der FR4-Domäne von VL bzw. von VH lassen sich auf die degenerierten Primermischungen zurückführen, mit denen die variablen Domänen aus der cDNA amplifiziert wurden.

Im Bereich der CDR-Domänen gibt es kaum Homologien zwischen den drei Antikörperfragmenten. Lediglich in der CDR2-Domäne von VH finden sich einige konservierte Aminosäuren.

Obwohl die monoklonalen Antikörper der Zelllinien 6C2 und 7A6 am gleichen Molekülteil der Oleanolsäure angreifen, haben die korrespondierenden scFv-Fragmente vor allem im Bereich der CDR-Domänen völlig unterschiedliche Aminosäuresequenzen. Auffällig ist die sehr lange VL-CDR1-Domäne des 7A6-scFv-Fragments.

	FR1		CDR1
6C2-scFv:	M A D Y K D I Q M T Q T P L S L P I S L G D Q A S I S C	S S A V S - - - N I L H L S S	
7A6-scFv:	M A D Y K D I V M T Q S P L S L P V S L G D Q A S I S C	R S S Q S L V H S N G N T Y L H	
10F10-scFv:	M A D Y K D I V M T Q S P A T L S V T P G D N A S I S C	R A N Q S I - - S N - N - - L H	
	FR2	CDR2	FR3
6C2-scFv:	W Y Q Q K S E T S P S L L I Y K T S K R A S G V P V R F S G S G S G T S D F T T - I S R		
7A6-scFv:	W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T - D F T L K I S R		
10F10-scFv:	W Y Q Q K Y H E S P R L L I K - A S Q S I S G I P S R F S G S G S G T - D F T L S I N S		
	CDR3	FR4	(Gly₄Ser)₄-Linker
6C2-scFv:	V Q S E D L A T V Y C S Q W Y S P L - T F G T A T K L E I K R G G G G S G G G G S G G G		
7A6-scFv:	V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P P T F G A G T K L E I K R G G G G S G G G G S G G G		
10F10-scFv:	V E T E D F G M Y F C Q Q S Y S W P L T F G A G T K L E I K R G G G G S G G G S G G G		
	FR1		CDR1
6C2-scFv:	G S G G G G S E V K L V E S G V E L V R G T S V K - L S C A K A S G Y I F T I I W Y I -		
7A6-scFv:	G S G G G G S E V K L V E S G P S L V K P S Q T L S L T C S T G D S - I T S G Y W N W I -		
10F10-scFv:	G S G G G G S E V K L V E S G G G L V K L G G S L K L S C A A S G F T F S T Y Y M S -		
	FR2	CDR2	FR3
6C2-scFv:	W V K Q R P G Q S L E W I G M H N - S G N T T Y Y G P W Y F K G V A T L T A N K S S S T		
7A6-scFv:	R - K - F P G N K L E Y M G Y I N Y S - G R T Y Y N P S - L K S R I S I T R D T S K N Q		
10F10-scFv:	W V R Q T P E K R L E L V A A I N S N G G R T Y Y - P D T V K G R F T I S R V N A K N T		
		CDR3	FR4
6C2-scFv:	A Y L Q L D S L M S E D S A V Y Y C A R V A Y I V V Y D Y - - W G Q G T T V P V S S A S		
7A6-scFv:	Y Y L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A R V V I S V V A P F A L W G Q G T T L T V S S A S		
10F10-scFv:	L Y L Q M S S L K S E D A A L Y Y C A R Y D Y I T Y A M D Y - W G Q G T S V T V S S A S		
6C2-scFv:	G A S G A D H H H H H H		
7A6-scFv:	G A S G A D H H H H H H		
10F10-scFv:	G A S G A D H H H H H H		

Abb. 3.42 Aminosäuresequenzvergleich der Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente

Die Aminosäuren, die bei allen drei scFv-Fragmenten gleich sind, sind hellgrau unterlegt. Der (Gly₄Ser)₄-Polypeptidlinker ist etwas dunkler dargestellt. Die CDR-Domänen von VL und VH sind rot hervorgehoben.

3.4.5 Expression und Charakterisierung von löslichen scFv-Fragmenten

3.4.5.1 Etablierung der Expressionsbedingungen

Ein großes Problem bei der periplasmatischen Expression von Antikörperfragmenten ist die „Individualität“ dieser Proteine. Für jedes Antikörperfragment müssen die Expressionsbedingungen neu optimiert werden. Eine erfolgreiche Expression hängt von den unterschiedlichsten Faktoren ab (Ge et al., 1995, Plückthun et al., 1996). Einen Einfluss auf die Periplasma-Expression von scFv-Fragmenten haben unter anderem:

- die Aminosäuresequenz des Antikörperfragments
- das verwendete Plasmid
- die Expressionstemperatur
- der verwendete Bakterienstamm
- das Expressionsmedium
- der Zeitpunkt der Induktion
- die Expressionsrate (Induktionsstärke)
- die Expressionszeit

Vor der Charakterisierung der unterschiedlichen scFv-Fragmente mussten daher die Expressionsbedingungen optimiert werden. Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht über die Faktoren, die bei den Expressionsversuchen variiert wurden.

Versuchsparameter	getestete Variationen	optimiert
Expressionsplasmid	pAK300, pAK400	pAK400
<i>E.coli</i> -Stamm	DH5 α , JM83, JM109, TG1, Top10, XL1-Blue	JM83 bzw. TG1
Expressionstemperatur	25°C, 30°C, 37°C	30°C
IPTG-Konzentration zur Induktion	0,5 mM, 1 mM	1 mM
Expressionszeit	2 h, 4 h, 6 h, über Nacht	2,5 - 5 h
Expressionsmedium	YT, 2x YT	2x YT

Tab. 3.6 Übersicht über die getesteten Expressionsbedingungen

3.4.5.2 Periplasmatische Expression der scFv-Fragmente

6C2-scFv-Fragment und 10F10-scFv-Fragment

Die Expression der 6C2- und 10F10-scFv-Fragmenten erfolgte im *E.coli*-Stamm JM83 oder TG1 mit dem Plasmid pAK400. Die Zellen wurden bei 30°C in 2x YT-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 kultiviert und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Nach 2,5 Stunden und nach 5 Stunden erfolgte der Periplasmaaufschluss durch einen osmotischen Schock (vgl. 2.3.1.3).

Abbildung 3.43 zeigt die periplasmatische Expression der Konstrukte 6C2-scFv.pAK400 und 10F10-scFv.pAK400. Als Vergleiche für die späteren Bindungs-experimente wurden zum einen der Leervektor (pAK400), zum anderen ein scFv-Fragment gegen den Muskarinrezeptor-Antagonisten Telenzepin (TelD3c-scFv.pAK400) transformiert und induziert.

Man kann erkennen, dass nur ca. die Hälfte der exprimierten Proteine ins Periplasma transportiert wurde. Der Rest verblieb - vermutlich in Form von Einschlusskörpern, sogenannten *inclusion bodies* - im Sphäroblasten. Ferner muss davon ausgegangen werden, dass auch nur ein Teil der ins Periplasma transportierten scFv-Fragmente in funktioneller Faltung vorlag. Im Falle des 10F10-scFv-Fragments war nach 5 Stunden bereits eine deutliche Proteindegradierung zu erkennen. Dennoch konnten die periplasmatischen Extrakte ohne weitere Aufarbeitung für die scFv-Bindungsstudien eingesetzt werden.

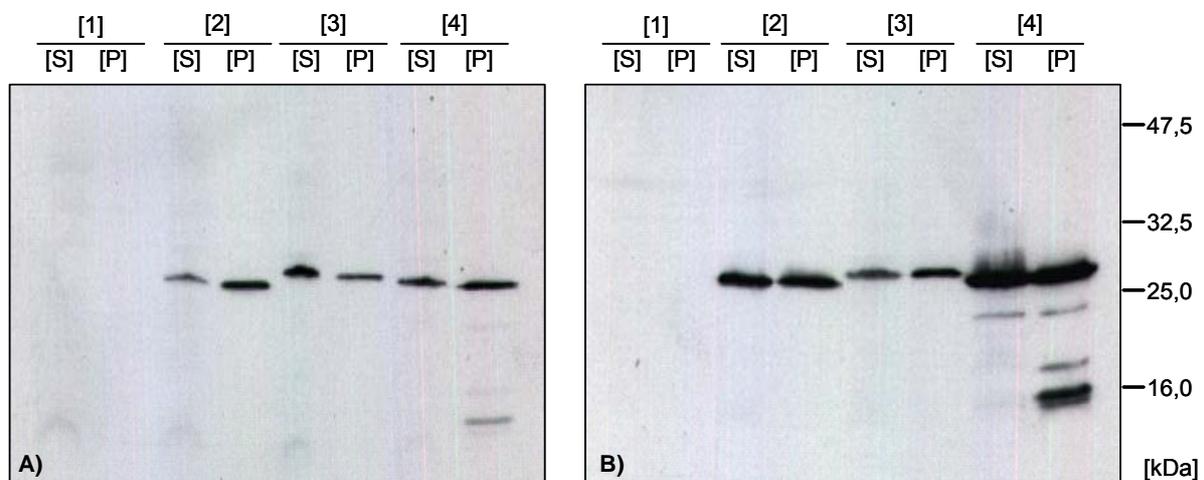


Abb. 3.43 Periplasmatische Expression des 6C2- und des 10F10-scFv-Fragments

Expression der scFv-Fragmente im *E.coli*-Stamm JM83; Plasmid: pAK400; Induktion bei OD₆₀₀=0,6 mit 1 mM IPTG; Inkubation bei 30°C in 2x YT-Medium; Der Periplasmaaufschluss erfolgte nach 2,5 Stunden (A) und 5 Stunden (B).

SDS-PAGE mit 12,5% PAA-Gel; Immunochemische Detektion des Western Blots mit dem Penta-His Antibody (1:5000)

[1] pAK400 (Leervektor)	[3] 6C2-scFv.pAK400	[S] Sphäroblast
[2] TelD3c-scFv.pAK400	[4] 10F10-scFv.pAK400	[P] Periplasma

7A6-scFv-Fragment

Eine erfolgreiche Expression des 7A6-scFv-Fragments war weder mit dem Expressionsvektor pAK300, noch mit dem Plasmid pAK400 möglich. Das Antikörperfragment konnte über den C-terminalen His-tag zwar im Sphäroblasten, nicht jedoch im Periplasma nachgewiesen werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass das 7A6-scFv-Fragment aufgrund seiner Aminosäuresequenz zur Aggregation neigt und daher nicht durch die innere Membran der Bakterienzelle ins Periplasma transportiert wird, sondern als Einschlusskörper im Cytoplasma der Zelle akkumuliert.

Abbildung 3.44 zeigt das Ergebnis einer fünfstündigen Expression bei 25°C in *E.coli* JM83. Man erkennt deutlich die stärkere Expressionsrate bei Verwendung des Plasmids pAk400. Da aber aus dem Periplasma keine Antikörperfragmente gewonnen werden konnten, wurden für das 7A6-scFv-Fragment auch keine Bindungsexperimente durchgeführt.

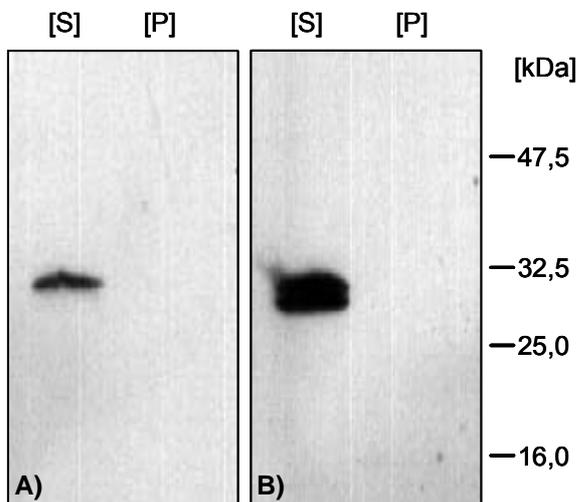


Abb. 3.44 Expression des 7A6-scFv-Fragments

Das 7A6-scFv-Fragment konnte weder mit dem Plasmid pAK300 (A) noch mit pAK400 (B) erfolgreich exprimiert werden.

Das Protein konnte über den His-tag zwar im Sphäroblasten [S] nicht jedoch im Periplasma [P] nachgewiesen werden.

Expressionsbedingungen: *E.coli* JM83, Medium: 2x YT; Induktion bei $OD_{600}=0,5$ mit 1 mM IPTG, $T=25^{\circ}\text{C}$; Periplasmaaufschluss nach 5 Stunden

SDS-PAGE mit 12,5% PAA-Gel

3.4.5.3 Antigen-Bindungsversuche mit den heterolog exprimierten scFv-Antikörperfragmenten

Nachweis der Antikörperbindung im indirekten ELISA

Die heterolog exprimierten scFv-Fragmente sollten in der Lage sein, das Antigen Oleanolsäure spezifisch zu binden. Voraussetzung dafür ist, dass die scFv-Fragmente ins Periplasma der Bakterienzelle transportiert werden, und sich in die richtige Konformation falten. Um zu überprüfen, ob die Anti-Oleanolsäure-Antikörperfragmente mit der Oleanolsäure interagieren, wurden unterschiedliche ELISA-Bindungsexperimente durchgeführt. Da das 7A6-scFv-Fragment nicht im Periplasma nachgewiesen werden konnte, wurden nur das 6C2- und das 10F10-scFv-Fragment näher untersucht.

Weil der periplasmatische Extrakt neben den scFv-Fragmenten auch zahlreiche andere Proteine enthielt, die das Ergebnis der ELISA-Bindungsstudien unter Umständen beeinflussen können, wurde als Referenz der Periplasmaextrakt einer Bakterienkultur mitgeführt, die mit dem pAK400-Leervektor transformiert worden war. Darüber hinaus wurde ein Anti-Telenzepin-scFv-Fragment (TelD3c-scFv) als Negativkontrolle mitgetestet.

Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte zunächst durch einen indirekten ELISA. Als Antigen wurde Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte fixiert. Die Periplasmalösung mit den scFv-Fragmenten wurde anschließend in unterschiedlichen Verdünnungsstufen gegen das fixierte Antigen inkubiert. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über das C-terminale His-tag mit einem spezifischen Antikörper, der wiederum durch das Anti-Mouse-IgG-POD-Konjugat und ABTS als Chromogen detektiert wurde. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Mikrotiterplatten-Vertiefungen mehrmals mit PBS gespült.

In einem ersten Versuch wurde der Periplasmaextrakt 90 Minuten lang gegen 0,5 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat inkubiert. Eine Antigenbindung der scFv-Fragmente konnte in diesem Fall allerdings nicht festgestellt werden. Erst nach einer Übernacht-Inkubation (4°C) gegen 2,5 µg Antigen konnte eine Bindung nachgewiesen werden. Die Periplasmaextrakte mit den TelD3c-scFv-Fragmenten zeigten in diesem Versuch keine Bindung, was auf eine spezifische Interaktion zwischen den Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmenten und dem Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat hinweist. Abbildung 3.45 zeigt das Ergebnis dieses Bindungsversuches (Die Daten beziehen sich auf die Expression, die in Abbildung 3.43 dargestellt ist).

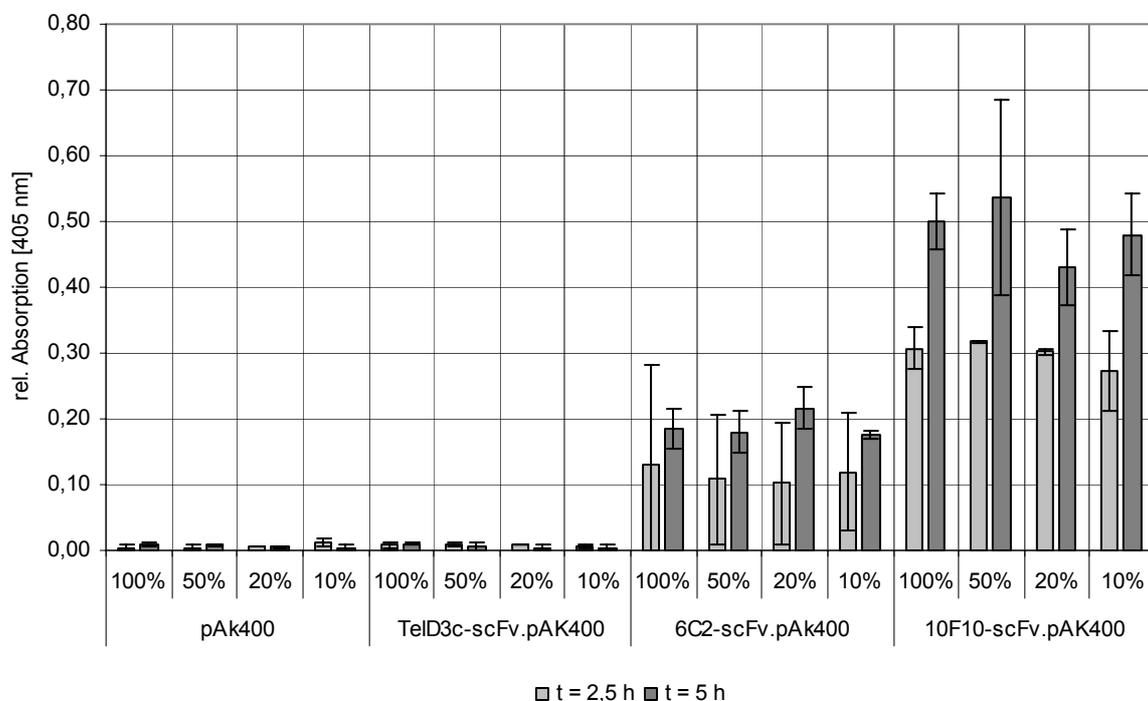


Abb. 3.45 Bindungsexperimente mit den heterolog exprimierten scFv-Fragmenten

Die Periplasmaextrakte mit den Antikörperfragmenten 6C2-scFv und 10F10-scFv wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (100% = unverdünnt) über Nacht gegen 2,5 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat inkubiert.

Nachweis der Spezifität durch einen Kompetitions-ELISA

In einem weiteren Experiment, das unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, wurde Oleanolsäure in einer Konzentration von 10 mM als Kompetitor zugesetzt. Wie man in Abbildung 3.46 erkennen kann, ließen sich das 6C2- und das 10F10-scFv-Fragment durch Oleanolsäure kompetieren, was ebenfalls auf eine spezifische Interaktion mit dem Antigen hindeutet. Der Versuch wurde mit dem nach 2,5 Stunden gewonnenen Periplasmaextrakt durchgeführt, der in einer 50%-igen Verdünnung eingesetzt wurde. Es fällt auf, dass die in diesem Versuch gemessenen Absorptionswerte deutlich unter den in Abbildung 3.45 dargestellten Werten lagen, was auf eine Degradation der scFv-Fragmente während der Lagerung (8°C) hinweist.

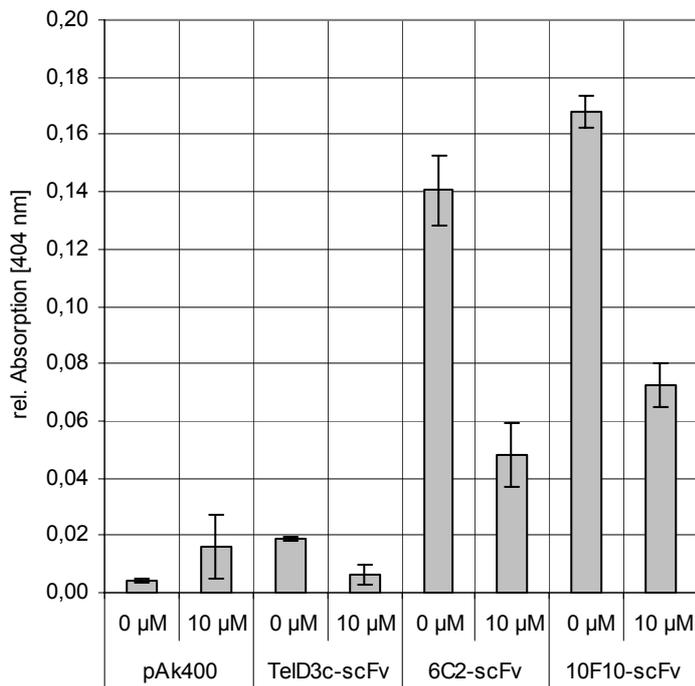


Abb. 3.46 Kompetitionsversuche mit den scFv-Fragmenten

Durch Inkubation der Antikörperfragmente 6C2-scFv und 10F10-scFv mit 10 mM Oleanolsäure lässt sich eine Konkurrenz nachweisen, was auf eine spezifische Interaktion mit dem Antigen schließen lässt.

Interaktion des 10F10-scFv-Fragments mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat

Die Funktionalität des 10F10-scFv-Fragments konnte in einer weiteren Bindungsstudie nachgewiesen werden. Dabei wurde der Anti-Mouse-Immunglobulin-Antikörper in den Vertiefungen der ELISA-Mikrotiterplatte fixiert (1 μ g pro Vertiefung). Dieser Antikörper bindet im Bereich der FR-Domänen von murinen Antikörpern oder Antikörperfragmenten. Anschließend wurde ein frisch hergestellter Periplasmaextrakt gegen den fixierten Antikörper inkubiert (50 μ L/200 μ L-Ansatz bzw. 100 μ L/200 μ L-Ansatz). Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat (100 μ L/200 μ L-Ansatz). Das an die scFv-Fragmente gebundene Konjugat konnte durch die photometrische Vermessung des Chromogens CPRG quantifiziert werden. Als Negativkontrolle fungierte ein Periplasmaextrakt mit dem TelD3c-scFv-Fragment. Als Positivkontrolle wurde eine 1/100-Verdünnung des monoklonalen IgM-Antikörpers der Zelllinie 10F10 mitgeführt.

Abbildung 3.47 zeigt das Ergebnis dieser Bindungsstudie. In den Ansätzen mit dem 10F10-scFv-Fragment wurden signifikant höhere Absorptionswerte gemessen, als in den Ansätzen mit dem TelD3c-scFv-Fragment, was auf eine spezifische Interaktion mit der Oleanolsäure hinweist. Vergleicht man die Werte allerdings mit der Positivkontrolle, so zeigt sich, dass die Bindung der scFv-Fragmente nur sehr schwach ist.

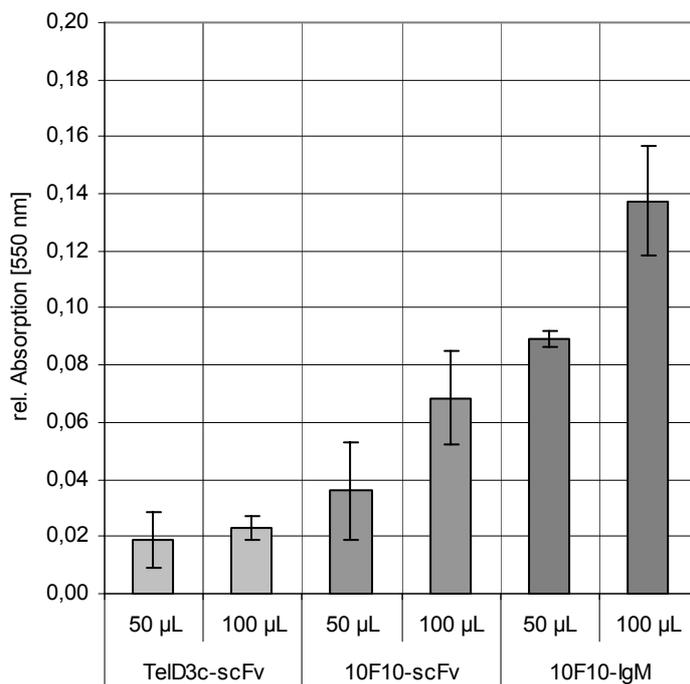


Abb. 3.47 Bindungsstudien der 10F10-scFv-Fragmente mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat

Der Periplasmaextrakt mit den 10F10-scFv-Fragmenten wurde gegen 1 μ g des Anti-Mouse-Immunglobulin-Antikörpers inkubiert. Die Funktionalität der gebundenen scFv-Fragmente konnte mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat nachgewiesen werden.

3.4.6 Phagen-Display und Phagen-Panning der 10F10-scFv-Antikörperfragmente

Eines der größten Probleme bei der Klonierung und Expression von rekombinanten Antikörperfragmenten ist das Auftreten von Pseudogen-Sequenzen, die für nicht funktionsfähige Proteine kodieren. Diese Problematik wurde im Abschnitt 3.4.2 bereits ausführlich erörtert.

Eine Möglichkeit, aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Antikörperfragmente die Proteine zu isolieren, die mit einem ganz bestimmten Antigen interagieren, bietet die von Georg P. Smith entwickelte Phagen-Display-Technik (Smith, 1985). Bei dieser Technik wird ein Protein – in diesem Fall ein scFv-Antikörperfragment – so in einen speziellen Phagemid-Vektor ligiert, dass es als Fusionsprotein auf der Oberfläche von filamentösen Phagen exprimiert werden wird. Über einen als Phagen-Panning bezeichneten Selektionsprozess kann aus einer komplexen Mischung unterschiedlicher Antikörperfragmente ein scFv-Fragment mit einer ganz bestimmten Spezifität isoliert werden. Mit dieser Methode ist es auch möglich sein, zwischen den funktionsfähigen Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmenten und den Fragmenten, die aus dem Pseudogen entstanden sind, zu unterscheiden.

3.4.6.1 Konstruktion eines 10F10-scFv-Fragments und Ligation in den Phagemid-Vektor pAK100

Die Konstruktion der 10F10-scFv-Fragmente erfolgte analog zu der unter 3.4.1 beschriebenen Klonierungsstrategie. Als Template für die cDNA-Synthese diente RNA, die aus Zellen der Hybridomzelllinie 10F10 isoliert wurde.

Die scFv-DNA wurde in das Phagemid pAK100 ligiert und in den *E.coli*-F⁺-Stamm TG1 transformiert. 100 Bakterienklone dieser Transformation wurden für ein Pseudogenscreening auf eine Masterplatte übertragen. Die restlichen Bakterienklone wurden von der Agarplatte abgelöst, in 2 mL YT-Medium suspendiert und als Glycerin-Stock bei -80°C gelagert. Mit diesem Bakterienstock wurde zum einen das Phagen-Panning durchgeführt, zum anderen wurde eine Plasmid-Bibliothek präpariert (10F10-scFv-bib.pAK100).

Abbildung 3.48 zeigt das Prinzip des Phagen Displays. Da das Phagemid pAK100 außer dem gpIII-Gen keine anderen Phagenstrukturgene besitzt, ist beim Phagen-Display die Infektion der Bakterienzelle mit einem Helferphagen, z.B. M13KO7, erforderlich.

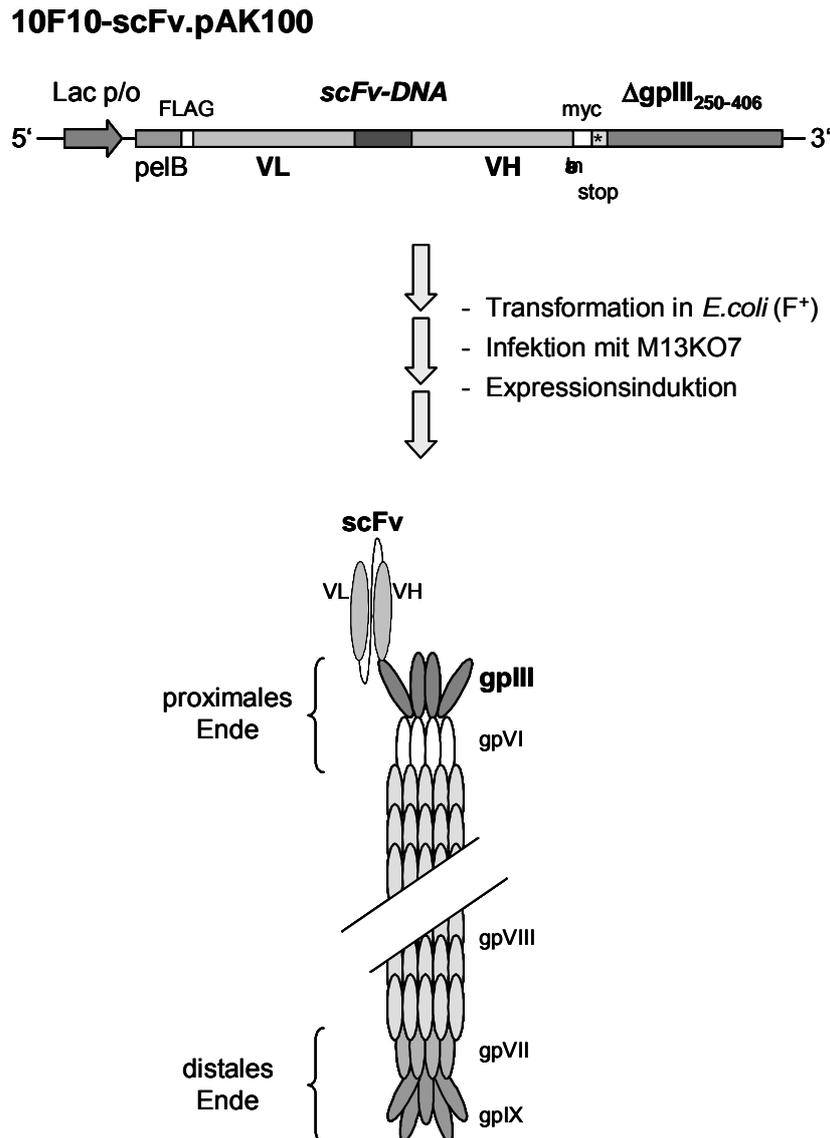


Abb. 3.48 Phagen-Display von scFv-Antikörperfragmenten

Die scFv-DNA wurde in-frame vor das Gen Δ gpIII ligiert, das für ein verkürztes Oberflächenprotein des filamentösen Phagens codiert. Nach der Induktion wird ein scFv-gpIII-Fusionsprotein exprimiert, d.h. das scFv-Fragment wird auf der Oberfläche des Phagens präsentiert. Voraussetzung ist die Infektion mit einem Helferphagen, z.B. M13KO7, der die restlichen Strukturproteine liefert.

3.4.6.2 Phagen-Display und Phagen-Panning

Für das Phagen-Display wurde die Bakterienkultur bei einer OD_{600} von 0,4 mit dem M13KO7-Helferphagen infiziert. Der Helferphage trägt eine Kanamycin-Resistenz, so dass eine Selektion auf die Bakterien, bei denen eine Infektion stattgefunden hatte, möglich war. Nach der Infektion erfolgte die Induktion der Transkription und somit der Proteinbiosynthese mit 1 mM IPTG.

Nach einer über-Nacht Inkubation konnten die Phagen aus dem 2x YT-Medium gefällt, resuspendiert und für das Panning eingesetzt werden. Die Phagen wurden dabei in einer ELISA-Mikrotiterplatte 120 Minuten lang unter Schütteln gegen 5,0 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat inkubiert. Anschließend wurden die Phagen eluiert, die über das an der Oberfläche präsentierte scFv-Fragment an die Oleanolsäure gebunden hatten. Mit dieser Elutionslösung wurde eine frische Bakteriensuspension (*E.coli* TG1, OD₆₀₀ = 0,4 - 0,6) infiziert. Ein Aliquot dieses Ansatzes wurde auf einer Agarplatte (mit Chloramphenicol als Selektionsmarker) ausplattiert. Von dieser Agarplatte wurden wiederum 100 Klone für das Pseudogenscreening auf eine Masterplatte übertragen. Die restlichen Klone wurden in 2 mL YT-Medium resuspendiert und für die nächste Panning-Runde kultiviert.

Insgesamt wurden fünf Panning-Runden durchgeführt. Nach jeder Runde wurden die Bakterienklone von der Masterplatte auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und lysiert. Der Nachweis des V_κ-Pseudogens erfolgte mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid V_κJunk1. Außerdem wurden jeweils von 15 Klonen Minilyate präpariert, um nachzuweisen, dass das Plasmid 10F10-scFv.pAK100 enthalten war.

Abbildung 3.49 zeigt, dass mit Hilfe der Phagen-Display-Technik die funktionellen scFv-Fragmente von den nicht funktionellen Fragmenten getrennt werden können. Vor der ersten Panning-Runde enthielten ca. 30% aller Bakterienklone ein Plasmid mit der V_κ-Pseudogensequenz. Nach der ersten Panning-Runde konnte diese Sequenz nur noch bei einem einzigen Klon detektiert werden, nach der zweiten Runde überhaupt nicht mehr.

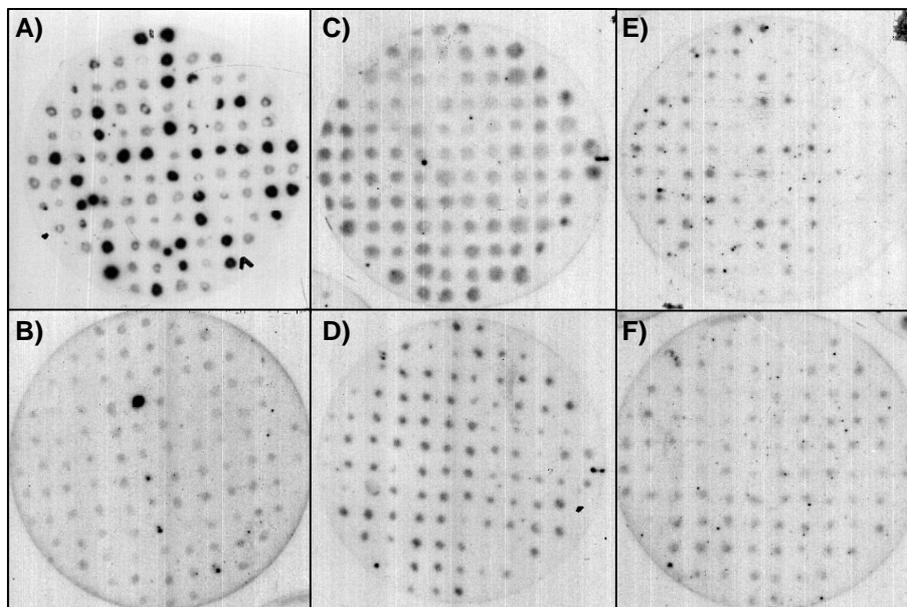


Abb. 3.49 Pseudogenscreening nach den einzelnen Phagen-Panning-Runden

Vor dem Phagen-Panning (A) und nach jeder der fünf Panning-Runden (B-F) wurde eine Kolonien-Hybridisierung mit dem ³²P-markierten Oligonukleotid V_κJunk1 durchgeführt. Man kann erkennen, dass vor der 1. Panning-Runde (A) ca. 30% aller Bakterienklone ein Plasmid mit dem Pseudogen enthielten. Nach der 1. Panning-Runde (B) ergab nur noch ein einziger Klon ein positives Signal. Nach der 2. Runde konnte überhaupt kein Pseudogen mehr nachgewiesen werden.

3.5 Konstruktion und Expression von rekombinanten scFv-Fragmenten gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin

3.5.1 Konstruktion der scFv-Fragmente und Ligation in das Plasmid pAK400

Die für die Konstruktion der scFv-Fragmente erforderliche RNA wurde aus der Hybridomzelllinie 2C3C5 isoliert, die von Frau Dr. Ilse Zündorf im Arbeitskreis Dingermann etabliert und charakterisiert worden war (Zündorf et al., 1997). Diese Hybridomzelllinie sezerniert einen monoklonalen Antikörper gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin.

Die Konstruktion des Anti-Retrorsin-scFv-Fragments wurde wie unter 3.4.1 beschrieben durchgeführt. Die scFv-DNA wurde zunächst in das Plasmid pAK400 ligiert (2C3C5-scFv.pAK400).

Nach der Klonierung des 2C3C5-scFv-Fragments wurde ein Pseudogenscreening durchgeführt. Die negativen Bakterienklone wurden auf die Expression eines vollständigen Antikörperfragments überprüft.

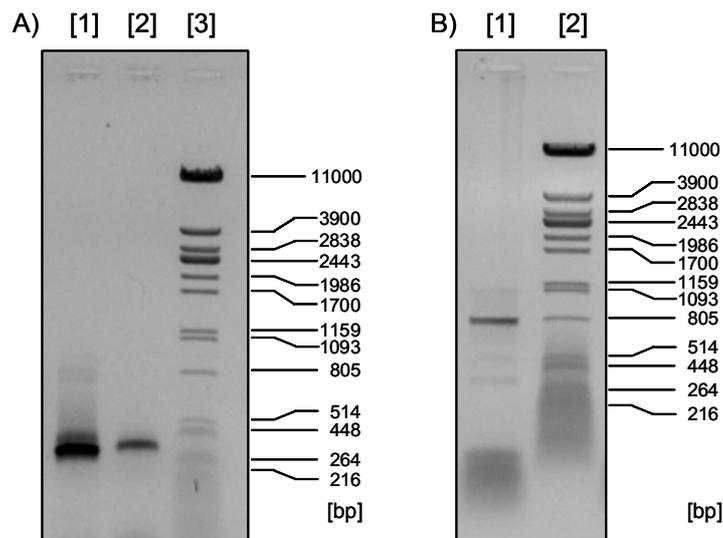


Abb. 3.50 Konstruktion des 2C3C5-scFv-Fragments gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin

A) PCR-Amplifikation der variablen Domänen VL [1] und VH [2]. Die variablen Domänen haben eine Größe von ca. 400 bp. Die Auftrennung erfolgte über ein 1%-iges Agarosegel. [3]: Größenmarker

B) Verknüpfung der variablen Domänen VL und VH zum scFv-Fragment [1] durch die „Splicing by overlap extension-PCR“. Die Auftrennung erfolgte über ein 1%-iges Agarosegel. [2]: Größenmarker (Die DNA-Gele sind in Umkehrfarben dargestellt)

3.5.2 Sequenzierung des Anti-Retrorsin-scFv-Fragments

Die Sequenzierung des 2C3C5-scFv-Fragments erfolgte aus dem Plasmid pAK400 mit den Oligonukleotiden Rsp und scfor. Zusätzlich wurden die variablen Domänen VL und VH getrennt voneinander in das Plasmid pGEM[®]-T ligiert und mit den Oligonukleotiden Rsp und Sp3 sequenziert. Abbildung 3.51 zeigt die DNA- und die Aminosäuresequenz des 2C3C5-scFv-Antikörperfragments.

pelB-Leader														<i>SfiI</i>					
ATG	AAA	TAC	CTA	TTG	CCT	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA	CTC	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC
M	K	Y	L	L	P	T	A	A	A	G	L	L	L	L	A	A	Q	P	A
FLAG-tag										FR1									
ATG	GCG	GAC	TAC	AAA	GAC	ATT	CAG	ATG	ATG	CAG	TCT	GCC	AAA	TCC	ATG	TCC	ATG	TCA	GTA
M	A	D	Y	K	D	I	Q	M	M	Q	S	A	K	S	M	S	M	S	V
										CDR1									
GAA	GAG	AGG	GTC	ACC	TTG	ACC	TGC	AAG	GCC	AGT	GAG	AAT	GTG	GTT	ACT	TAT	GTT	TCC	TGG
G	E	R	V	T	L	T	C	K	A	S	E	N	V	V	T	Y	V	S	W
FR2										CDR2									
TAT	CAA	CAG	AAA	CCA	GAG	CAG	TCT	CCT	AAA	CTG	CTG	ATA	TAC	GGG	GCA	TCC	AAC	CGG	TAC
Y	G	G	K	P	E	Q	S	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	N	R	Y
FR3																			
ACT	GGG	GTC	CCC	GAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	GCA	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC
T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	A	T	D	F	T	L	T	I
										CDR3									
AGC	AGT	GTG	CAG	GCT	GAA	GAC	CTT	GCA	GAT	TAT	CAC	TGT	GGA	CAG	GTT	TAC	AGC	TAT	CCG
S	S	V	Q	A	E	D	L	A	D	Y	H	C	G	Q	G	Y	S	Y	P
FR4										(Gly₄Ser)₄-Linker									
TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGT	GGT	GGT
Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	G	G	G	G	S	G	G
										FR1									
GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGA	TCC	GAA	GTG	AAG	CTG	GTG	GAG	TCT
G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	E	V	K	L	V	E	S
										CDR1									
GGG	GTC	TCA	GTG	CAG	ATA	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGT	TAT	TCT	TTC	ACT	GAC	TAC	ATC	ATG
G	A	S	C	Q	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	I	M
FR2										CDR2									
CTC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGC	CAT	GGA	AAG	AGC	CTT	GAG	TGG	GTT	GGA	AAT	ATT	CAT	CCT	TAC
L	W	V	K	Q	S	H	G	K	S	L	E	W	V	G	N	I	H	P	Y
										FR3									
TAT	GGT	AGT	ACT	AGT	TAC	AAT	CTG	AAG	TCC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTA	GAC	AAA
Y	G	S	T	S	Y	N	L	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K
										FR4									
TCT	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	GAC	AGT	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCA	GTC	TAT
S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	D	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y
CDR3																			
TAC	TGT	ACA	AGA	GGT	GGG	GCT	TAC	TAC	GTG	AGT	AGC	GAG	GGG	GAC	TGG	ACT	ACT	GGG	GGC
Y	C	T	R	G	G	A	Y	Y	G	S	S	E	G	D	W	T	T	G	A
										<i>SfiI</i> His-tag									
AAG	GCA	CCA	ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	TCT	GCG	GCC	TCG	GGG	GCC	GAT	CAC	CAT	CAT	CAC	CAT
K	A	P	T	L	V	T	V	S	A	A	S	G	A	D	H	H	H	H	H
CAT CAT TAG																			
H	H	*																	

Abb. 3.51 DNA- und Aminosäuresequenz des 2C3C5-scFv-Fragments in pAK400

Die ersten 20 Triplets der dargestellten Sequenz codieren für das pelB-Leader-Peptid (mittelgrau), das für den Transport des Antikörper-Fragments durch die Periplasmamembran verantwortlich ist und dabei abgespalten wird. Das scFv-Fragment beginnt am zweiten ATG-Codon mit dem N-terminalen FLAG-tag, gefolgt von der variablen Region der leichten Kette (hellgrau). Der C-Terminus von VL ist über den (Gly₄Ser)₄-Linker (mittelgrau) mit dem N-Terminus von VH (dunkelgrau) verbunden. Die antigenbindenden CDR-Domänen von VL und VH sind rot hervorgehoben. Der C-Terminus von VH geht in das His-tag (6 Histidin-Reste) über.

3.5.3 Expression der Anti-Retroviren-scFv-Fragmente

Die 2C3C5-scFv-Fragmente sollten – wie für die Anti-Oleanolsäure-Antikörperfragmente beschrieben – heterolog in *E.coli* exprimiert und als funktionelle Proteine aus dem Periplasma isoliert werden. Dabei traten allerdings die gleichen Probleme wie beim 7A6-scFv-Fragment auf: die 2C3C5-Antikörperfragmente konnten zwar im Sphäroblasten, nicht jedoch im Periplasma nachgewiesen werden. Weder eine Veränderung der Expressionsbedingungen (Temperatur, Expressionsdauer, etc.), noch die Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme (JM83, JM109, TG1, XL1-Blue, DH5 α) brachte den gewünschten Erfolg.

Ein weiteres Problem war, dass das 2C3C5-scFv-Protein für die Bakterienzellen sehr toxisch war. Unmittelbar nach der Induktion der Expression mit IPTG verlangsamte sich das Bakterienwachstum signifikant.

Aus diesen Gründen konnten mit dem 2C3C5-scFv-Fragment keine Bindungsexperimente durchgeführt werden.

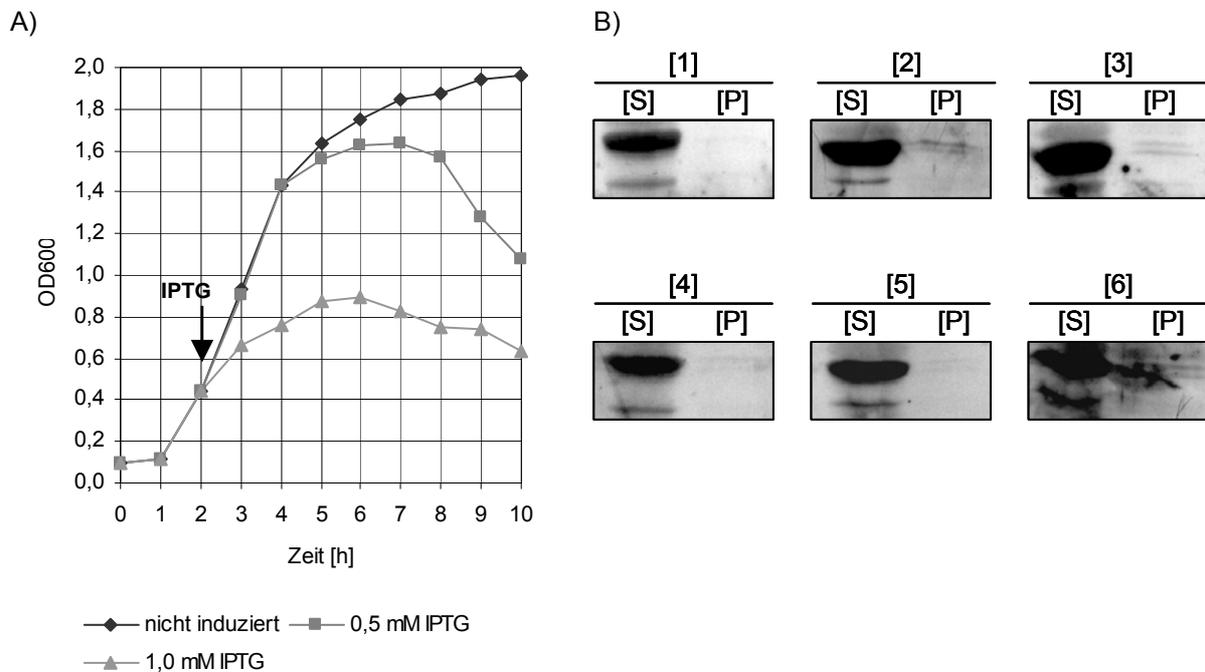


Abb. 3.52 Expression der 2C3C5-scFv-Fragmente in *E.coli* JM83

A) Expressionskinetik; Nach der Induktion mit 0,5 mM bzw. 1,0 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ = 0,4-0,5 verlangsamt sich das Bakterienwachstum. Vermutlich sind die scFv-Fragmente toxisch für die Bakterienzellen.

B) Expressionsversuche bei unterschiedlichen Bedingungen; Die 2C3C5-scFv-Fragmente können zwar im Sphäroblasten [S], nicht jedoch im Periplasma [P] nachgewiesen werden. (Immunochemische Detektion eines Western-Blots mit dem Anti-Mouse-Immunglobulin-Antikörper.)

[1] 1,0 mM IPTG, 4 h, 25°C

[2] 1,0 mM IPTG, 4 h, 30°C

[3] 1,0 mM IPTG, 4 h, 37°C

[4] 0,5 mM IPTG, o/n, 25°C

[5] 0,5 mM IPTG, 4 h, 30°C

[6] 0,5 mM IPTG, o/n, 37°C

3.6 Rearrangement-Analytik der Antikörpergene in Hybridomzelllinien

Bei der Konstruktion der hier beschriebenen scFv-Fragmente trat – wie bereits ausführlich erläutert – immer wieder dasselbe Problem auf: Neben der DNA-Sequenz, die für eine funktionelle VL-Domäne codiert, wurde auch eine V_{κ} -Pseudogenesequenz amplifiziert. Die für die PCR-Amplifikation der variablen Antikörperdomänen eingesetzten Oligonukleotid-Mischungen können nicht zwischen der funktionellen und der nicht-funktionellen Sequenz unterscheiden. Oftmals wird das Pseudogen sogar stärker amplifiziert, als die gewünschte Sequenz. Im Extremfall können bis zu 100 % der Bakterienklone ein Plasmid mit der Pseudogenesequenz enthalten. Es existieren zwar unterschiedliche Methoden, um nach der Klonierung zwischen der funktionellen Sequenz und dem Pseudogen zu unterscheiden (Nicholls et al., 1993, Duan et al., 1994, Ostermeier et al., 1996), diese sind jedoch sehr aufwendig und für ein einfaches und schnelles Screening nur bedingt geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines radioaktiven Oligonukleotids, das spezifisch mit der V_{κ} -Pseudogenesequenz hybridisiert, die Plasmide mit der nicht-funktionellen Sequenz identifiziert und die entsprechenden Bakterienklone aussortiert. Es ist offensichtlich, dass es sinnvoll wäre, mit Hilfe hochspezifischer Oligonukleotide bereits bei der Konstruktion von Antikörperfragmenten ausschließlich die funktionellen Sequenzen zu amplifizieren. Voraussetzung dafür wäre die Sequenzierung der rekombinierten Antikörpergene in den Hybridomzellen. Nur wenn die funktionelle Sequenz bekannt ist, können spezifische Oligonukleotide konstruiert werden. Im Folgenden wird eine Methode beschrieben, mit deren Hilfe eine Rearrangement-Analytik der Antikörpergene auf Genomebene und dadurch die Ermittlung der funktionellen Sequenz möglich ist.

3.6.1 Das Prinzip der Rearrangement-Analytik des κ -Genclusters

Die Ermittlung DNA-Sequenz einer bestimmten Antikörperkette auf Genomebene ist nicht trivial. Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, setzt sich ein Antikörpergen aus mehreren Gensegmenten zusammen. Für die variable Region einer leichten Kette existieren zahlreiche V-Gensegmente, die im Rahmen des Immunglobulin-Rearrangements nahezu beliebig mit den J-Gensegmenten kombiniert werden können.

Der Gencluster der leichten κ -Kette der Maus ist außergewöhnlich groß. Er besteht aus mehr als 1000 V-Gensegmenten, die mit 5 J-Gensegmenten kombiniert werden können (Lewin, 2000). Es ist daher nicht möglich, den kompletten rekombinierten Gencluster zu sequenzieren, um die funktionelle V_{κ} -Sequenz zu ermitteln. Abbildung 3.53 zeigt das Prinzip der Rearrangement-Analytik, mit deren Hilfe die Sequenz einer unbekanntem V_{κ} -Region ermittelt werden sollte.

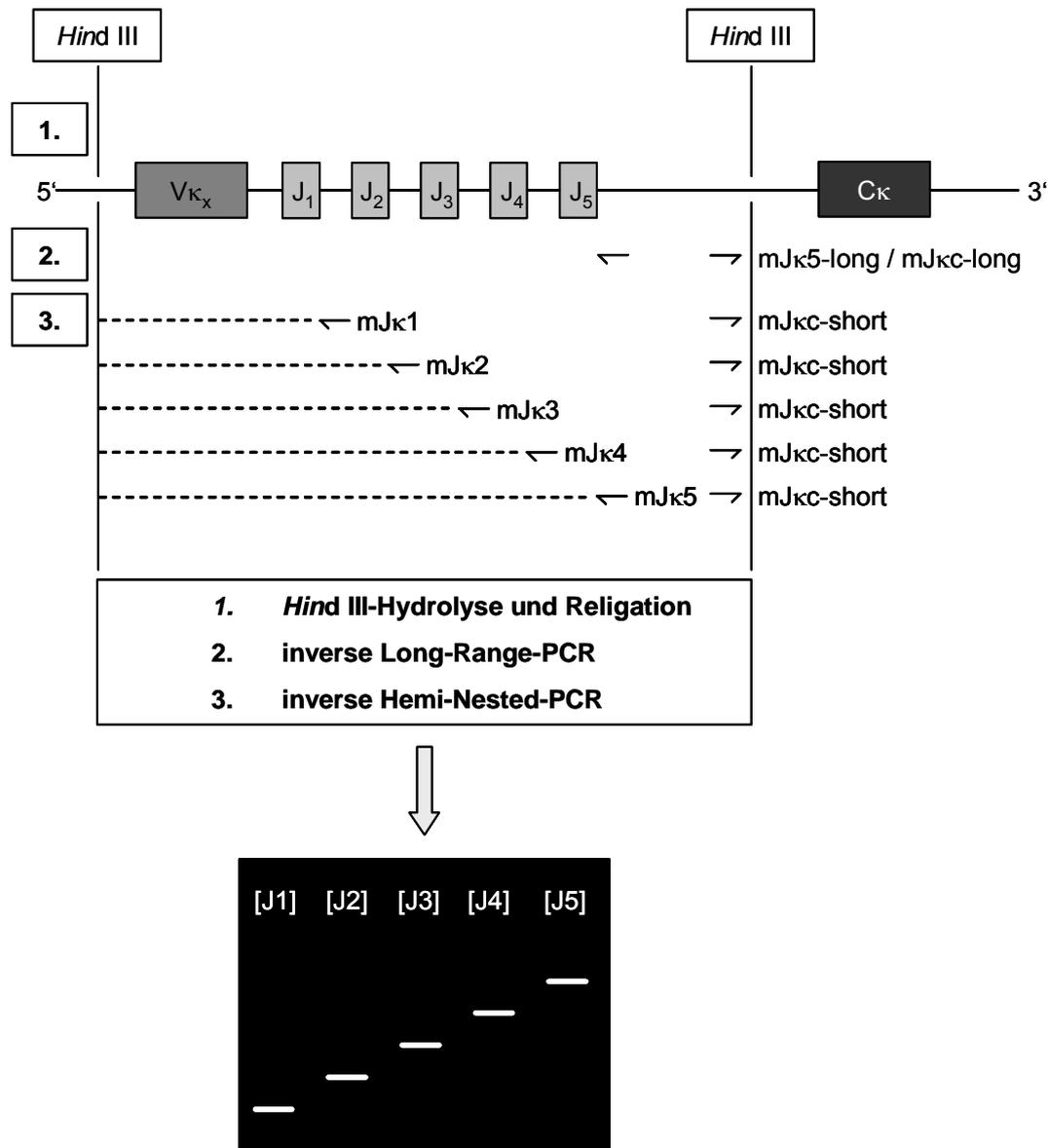


Abb. 3.53 Prinzip der Rearrangement-Analytik des murinen κ -Genclusters

Die isolierte gDNA wird zunächst mit dem Restriktionsenzym *Hind* III hydrolysiert. Anschließend erfolgt eine Religation der DNA-Fragmente. Das Reaktionsvolumen muss dabei so gewählt werden, dass eine Selbstligation der Moleküle favorisiert ist (hier: 500 μ L). Nach der Religation werden die zyklisierten DNA-Fragmente, die den κ -Antikörpergencluster enthalten, durch die inverse Long-Range-PCR amplifiziert. Die eigentliche Rearrangement-Analytik erfolgt dann im letzten Schritt mit der inversen Hemi-Nested-PCR, bei der verschiedene J_{κ} -spezifische Oligonukleotide eingesetzt werden.

Im ersten Schritt der Rearrangement-Analytik wurde die aus den Hybridomzellen isolierte genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind* III hydrolysiert. Anschließend mussten die DNA-Fragmente durch eine Ligase religiert werden, d.h. die ursprünglich linearen gDNA-Fragmente wurden zyklisiert.

Durch eine inverse Long-Range-PCR (iLR-PCR) sollten daraufhin genau die DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert, die $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Gensequenzen enthalten. Dazu wurden spezielle Oligonukleotide eingesetzt ($mJ_{\kappa 5}$ -long & $mJ_{\kappa c}$ -long), die im Intron zwischen dem J_5 -Gensegment und dem C_{κ} -Gensegment hybridisierten. Betrachtet man die lineare gDNA, so lagen beide Oligonukleotide 3' von dem gesuchten V_{κ} -Gensegment. Außerdem befanden sich die beiden Primer in der falschen Orientierung. Nach der *Hind* III-Hydrolyse und der Religation der DNA befanden sich die gesuchte V_{κ} -Sequenz allerdings zwischen den beiden Oligonukleotiden, die nun auch in der richtigen Orientierung vorlagen. Da in der Internet-Datenbank BLAST des amerikanischen National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) für das Intron zwischen $J_{\kappa 5}$ und C_{κ} unterschiedliche Sequenzen existieren, mussten bei der iLR-PCR verschiedene Oligonukleotide getestet werden. Die DNA-Sequenz dieses Bereiches, die für die Konstruktion der Oligonukleotide ausgewertet wurde, ist im Anhang aufgeführt.

Im Anschluss an die iLR-PCR wurde eine inverse Hemi-Nested-PCR (iHN-PCR) durchgeführt. Die hierbei eingesetzten Oligonukleotide hybridisierten im Intron zwischen den einzelnen J_{κ} -Segmenten ($mJ_{\kappa 1}$ - $mJ_{\kappa 5}$) bzw. 3' vom $J_{\kappa 5}$ -Segment ($mJ_{\kappa c}$ -short). Anhand des Ergebnisses der iHN-PCR konnte man erkennen, mit welchem J-Segment das unbekannte V_{κ} -Gensegment rekombiniert hatte. Abbildung 3.51 zeigt ein Beispiel, bei dem das Rearrangement zwischen einem V_{κ} -Gensegment und dem J_1 -Gensegment stattgefunden hat. Wie man dem schematisch dargestellten Agarosegel entnehmen kann, erfolgte bei allen fünf iHN-PCR-Ansätzen eine Amplifikation. Hätte das Rearrangement mit dem J_3 -Segment stattgefunden, könnte man in den Spuren [J1] und [J2] keine Amplimere erkennen. In diesem Fall wären nämlich das J_1 und das J_2 -Gensegment auf Keimbahnebene deletiert worden, so dass eine Hybridisierung der Primer $mJ_{\kappa 1}$ und $mJ_{\kappa 2}$ nicht mehr möglich gewesen wäre. Ausgehend vom entsprechenden J_{κ} -Segment, mit dem das Rearrangement stattgefunden hat, ist letztendlich die Sequenzierung der unbekanntes V_{κ} -DNA möglich.

3.6.2 Methodenetablierung

3.6.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Hybridomzellen

Die Hybridomzellen mussten vor der Isolierung der genomischen DNA z.T. mehrmals über einen Ficoll-Plaque-Gradienten aufgereinigt werden, um tote oder apoptotische Zellen abzutrennen. Im Rahmen der Apoptose wird die DNA im Zellkern durch eine spezielle DNase in Bruchstücke von ca. 200 bp gespalten. Durch diese Bruchstücke wird die Rearrangement-Analytik empfindlich gestört.

Außerdem sollte die Isolierung der genomischen DNA aus den Hybridomzellen äußerst vorsichtig erfolgen, da der κ -Gencluster z.B. durch starke Scherkräfte brechen könnte.

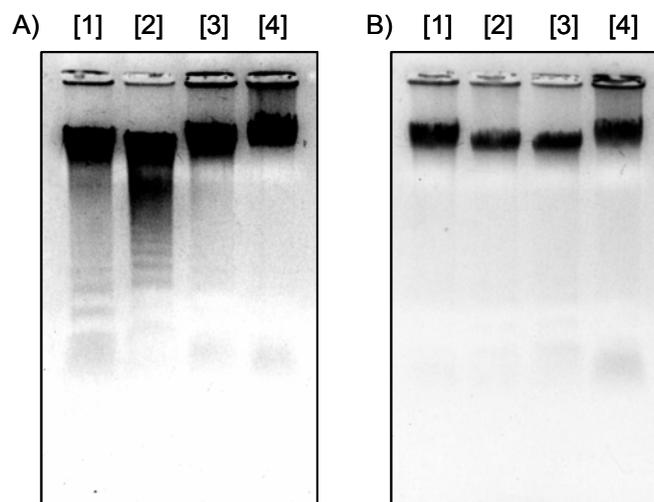


Abb. 3.54 Isolierung von genomischer DNA aus Hybridomzellen

A) ohne Ficoll-Plaque-Aufreinigung: in den Spuren [1] und [2] ist die für apoptotische Zellen charakteristische leiterförmige Auftrennung der DNA zu erkennen („apoptotic ladder“).

B) gDNA nach der Abtrennung der toten und apoptotischen Zellen durch eine Ficoll-Plaque-Aufreinigung. (Die Agarosegele sind in Umkehrfarben dargestellt.)

[1] Zelllinie 6C2

[2] Zelllinie 7A6

[3] Zelllinie 10F10

[4] Zelllinie 2C3C5

3.6.2.2 *Hind* III-Hydrolyse und Religation der gDNA

Im Rahmen der Methodenetablierung wurden die *Hind* III-Hydrolyse der genomischen DNA und die anschließende Religation der DNA-Fragmente unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Für die Restriktionshydrolyse wurden jeweils 5 µg gDNA eingesetzt. 1 µg der hydrolysierten DNA wurde anschließend religiert. Die nachfolgenden PCR-Experimente funktionierten am besten, wenn die gDNA 4 Stunden lang hydrolysiert, und anschließend über Nacht bei 16°C in einem Volumen von 500 µL religiert wurde.

3.6.2.3 Inverse Long-Range-PCR und inverse Hemi-Nested-PCR

Die beiden PCR-Methoden wurden wie unter 2.1.5.3 bzw. 2.1.5.4 beschrieben durchgeführt. Als Template für die iLR-PCR wurden 100 ng der hydrolysierten und religierten gDNA eingesetzt.

Bei der iHN-PCR wurden 20 ng DNA direkt aus einer Verdünnung des iLR-PCR-Ansatzes eingesetzt. Tabelle 3.7 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Versuchsparameter, die im Rahmen der Methodenetablierung optimiert wurden.

Versuchsparameter	getestete Variationen	optimiert
Dauer der <i>Hind</i> III-Hydrolyse	4 h, über Nacht	4 Stunden
Reaktionsvolumen für die Religation	100 µL, 500 µL, 1000 µL	500 µL
Religationstemperatur	4 °C, 16 °C	16 °C
Templatemenge bei der iLR-PCR	20 ng, 50 ng, 100 ng	100 ng
iLR-PCR-Primer	mJkc-long1, mJkc-long2	mJkc-long2
Templatemenge bei der iHN-PCR	20 ng, 50 ng, 100 ng	20 ng
iHN-PCR-Primer	mJkc-short1, mJkc-short2	mJkc-short2

Tab. 3.7 Übersicht über die unterschiedlichen Versuchsparameter, die im Rahmen der Methodenetablierung optimiert wurden

3.6.3 Rearrangement-Analytik des κ -Genclusters der Hybridomzelllinie 10F10

3.6.3.1 *Hind* III-Verdau und Religation der 10F10-gDNA sowie PCR-Amplifikation des unbekannten V_{κ} -Gensegments

Abbildung 3.55 zeigt das Ergebnis der Rearrangement-Analytik für die Hybridomzelllinie 10F10. Die Ergebnisse der iHN-PCR legen die Vermutung nahe, dass das Rearrangement des unbekannten V_{κ} -Gensegments mit dem J_4 -Gensegment stattgefunden hat. Eine Amplifikation hat nur in dem Ansätzen mit dem Oligonukleotid mJ κ 4 bzw. in dem Ansatz mit mJ κ 5 stattgefunden.

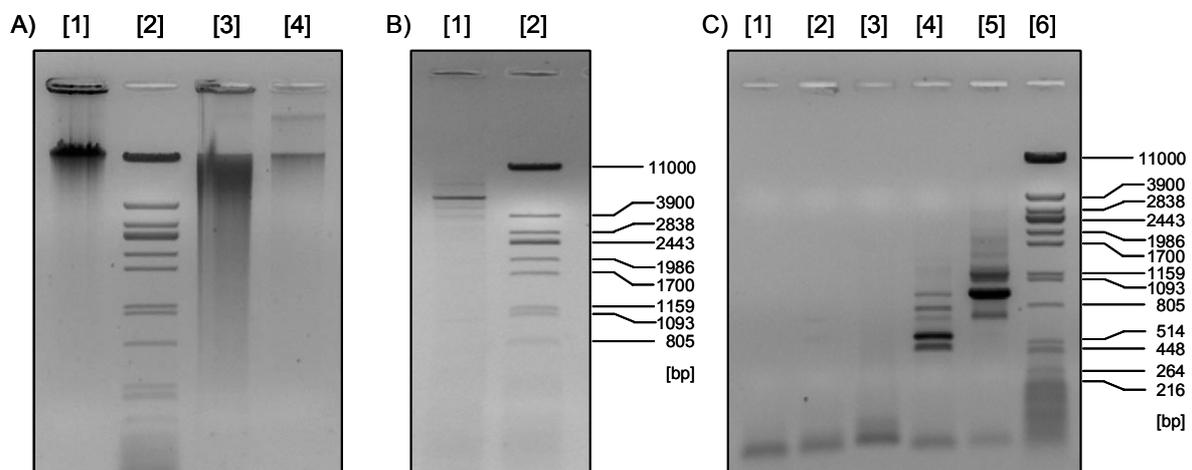


Abb. 3.55 Rearrangement-Analytik des κ -Genclusters der Hybridomzelllinie 10F10

A) Agarosegelelektrophoretische Kontrolle der 10F10-gDNA [1], der *Hind* III-hydrolysierten gDNA [3] und der gefällten Religation [4]. [2]: Größenmarker

B) inverse Long-Range-PCR mit den Oligonukleotiden mJ κ 5-long und mJ κ c-long2 [1]. Man erkennt ein Amplimer bei 4000 – 5000 bp. [2]: Größenmarker

C) inverse Hemi-Nested-PCR. Da nur in den Ansätzen mit den Oligonukleotiden mJ κ 4 und mJ κ 5 eine Amplifikation erfolgte, hat das Rearrangement des gesuchten V_{κ} -Gensegments vermutlich mit dem J_4 -Gensegment stattgefunden. (Die Agarosegele sind in Umkehrfarben dargestellt.)

[1] mJ κ 1 / mJ κ c-short2

[2] mJ κ 2 / mJ κ c-short2

[3] mJ κ 3 / mJ κ c-short2

[4] mJ κ 4 / mJ κ c-short2

[5] mJ κ 5 / mJ κ c-short2

[6] Größenmarker

3.6.3.2 Southern-Blot-Hybridisierungsexperimente

Wie man in Abbildung 5.54, C) erkennen kann, wurden in den Ansätzen [4] und [5] jeweils mehrere Amplimere gebildet, wobei aber in jedem Ansatz ein Hauptamplimer vorliegt. Um zu überprüfen, ob es sich bei den übrigen PCR-Fragmenten um unspezifische Nebenprodukte handelt, wurde die DNA nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mittels Southern-Blot auf eine Nylon-Membran übertragen und nacheinander mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden mJ κ 3, mJ κ 4 und mJ κ 5 hybridisiert. Abbildung 3.56 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Erwartungsgemäß konnte mit dem Oligonukleotid mJ κ 3 keine Hybridisierung nachgewiesen werden, da der DNA-Bereich, an den dieser Primer bindet, bei dem Rearrangement des Antikörpergens deletiert wurde. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Rekombination zwischen dem gesuchten V κ -Gensegment und dem J $_4$ -Gensegment stattgefunden hat.

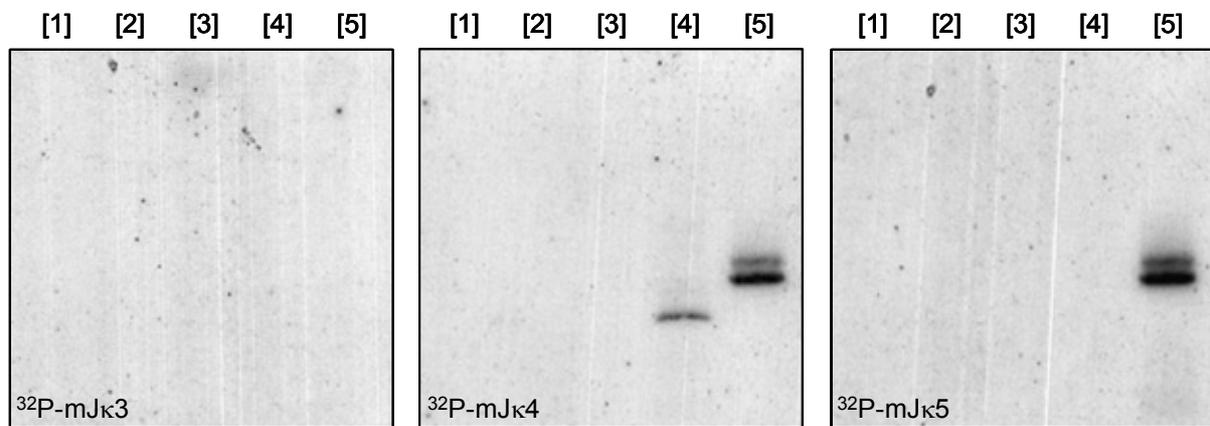


Abb. 3.56 Southern-Blot-Hybridisierung der iHN-PCR-Ansätze

Mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid mJ κ 3 erfolgte keine Hybridisierung, da die entsprechende Zielsequenz beim DNA-Rearrangement deletiert wurde.

[1] mJ κ 1 / mJ κ c-short2
[2] mJ κ 2 / mJ κ c-short2

[3] mJ κ 3 / mJ κ c-short2
[4] mJ κ 4 / mJ κ c-short2

[5] mJ κ 5 / mJ κ c-short2

3.6.3.3 Sequenzierung der DNA-Fragmente

Die drei PCR-Amplimere, die bei der Southern-Blot-Hybridisierung mit dem Oligonukleotid mJ κ 4 ein Signal ergeben hatten (vgl. Abb. 3.56, Mitte), wurden für die Sequenzierung in das Plasmid pGEM[®]-T ligiert. Die Sequenzierung erfolgte mit den Oligonukleotiden Rsp, Sp3 und mJ κ 4. Die Sequenzen wurden durch einen Vergleich mit der Internet-Sequenzdatenbank BLAST ausgewertet. Bei allen drei Sequenzen handelte es sich tatsächlich um einen Bereich des rearrangierten κ -leichte-Kette-Genklusters. Allerdings war in keinem Fall das gesuchte V κ -Gensegment vollständig erhalten, da es vermutlich im Bereich der V κ -J κ -Rekombinationsstelle zu einem Chromosomenbruch gekommen ist. Abbildung 3.57 zeigt einen Teil der Sequenz des Größten der drei untersuchten Amplimere. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass eine Rearrangement-Analytik mit der hier vorgestellten Methode prinzipiell möglich ist.

```

1  GAGTTTTGCA ATAAAAGTGG GATAGCAGAG TTGAGTGAGC CGTAGGCTGA GTTCTCTCTT TTGTCTCCTA AGTTTTTATG 80
81  ACTACAAAAA TCAGTAGTAT GTCCTGAAAT AATCATTAAAG CTGTTTGAAA GTATGACTGC TTGCCATGTA GATACCATGG 160
161 CTTGCTGAAT AATCAGAAGA GGTGTGACTC TATTCTAAAA TTTGTCACAA AATGTCAAAA TGAGAGACTC TGTAGGAACG 240
241 AGTCCTTGAC AGACAGCTCA AGGGGTTTTT TTCCTTTGTC TCATTCTAC ATGAAAGTAA ATTTGAAATG ATCTTTTTTA 320
321 TTATAAGAGT AGAAATACAG TTGGGTTTGA ACTATATGTT TTAATGGCCC GGTATATAGG CTCTGTAGAA CGAGTCTGCC 400
401 AGACAGTCAA GGGTTTTTTC CTTGGCTCA TTCTACATGA AAGTAAATTG AAATGATCTT TTTTATTATA AGAGTAGAAA 480
481 ACAGTGGGTT TGAACATATAT GTTTTAATGG CCACGGTTTT GTAAGACATT TGGTCCMTG TTTTCCCAGT TACTACTCGA 560
561 TTGTAATTTT ATATCGCCAG CAATGGACTG AAACGGTCCG CAACCTCTTC TTTACAACTG GGGACAAAGT TGGAAATAAA 640
641 ACGTAAGTAG GCTTTTGCTC ATTTACTTGT GACGTTTTGG TTCTGTTTGG GTAACTTTTG TGAATTTT 709

```

GAG mJ κ c-short-Primer

CTG J κ 4-Sequenz

TCA Intron zwischen J κ 5 und C μ

TGA Intron zwischen J κ 4 und J κ 5

GSC mJ κ 4-Primer

Abb. 3.57 DNA-Sequenz eines iHN-PCR-Amplimers

Bei der Sequenz handelt es sich um einen Teil des κ -Genklusters. Allerdings hat am Übergang vom J κ -Gensegment zum V κ -Gensegment ein Bruch stattgefunden, so dass die gesuchte V κ -Sequenz nicht ermittelt werden konnte. Der rote Pfeil gibt die Lage des Bruchpunktes an.

4 Diskussion

4.1 Monoklonale Antikörper gegen Triterpene und ihr Einsatz in der Naturstoffanalytik

Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente bilden seit Jahren einen Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe Dingermann. Dabei stehen vor allem zwei Substanzklassen im Vordergrund. Es handelt sich hier zum einen um pharmakologisch interessante Moleküle, wie den Muscarinrezeptor-Antagonisten Telenzepin oder die Eikosanoide Prostaglandin E₂, 6-Keto-F_{1α} und F_{2α}. Gegen diese vier Substanzen wurden monoklonale Antikörper etabliert und rekombinante Fab-, Fv- und scFv-Antikörperfragmente exprimiert und charakterisiert (Zündorf et al., 1993, Losekamm, 1997, Kohl, 2002).

Zum anderen liegt das Interesse bei Antikörpern und Antikörperfragmenten, die gegen pharmazeutisch relevante sekundäre Pflanzenmetabolite gerichtet sind. Hier sind beispielsweise die toxischen Pyrrolizidinalkaloide oder die medizinisch bedeutsamen Triterpensaponine zu nennen, mit denen sich auch die vorliegende Arbeit befasst (Zündorf et al., 1998, Brand et al., 2002).

Bereits kurz nach der Entwicklung der Hybridoma-Technologie durch George Köhler und César Milstein im Jahre 1975 traten die monoklonalen Antikörper ihren Siegeszug durch die biochemischen und molekularbiologischen Laboratorien an (Köhler et al., 1975). Heute sind sie aus der Grundlagenforschung ebensowenig wegzudenken, wie aus der angewandten medizinischen Diagnostik. Auch bei der Therapie zahlreicher Erkrankungen spielen monoklonale und rekombinante Antikörper bzw. Antikörperfragmente eine immer wichtigere Rolle.

Umso erstaunlicher ist es, dass sich monoklonale Antikörper als Hilfsmittel im Bereich der Naturstoffanalytik bisher nicht durchsetzen konnten. Nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Frage, inwieweit man Antikörper bei der Analytik pharmazeutisch interessanter Pflanzenmetabolite einsetzen kann. Auf einige Publikationen aus diesem Vorschungsbereich wurde in der Einleitung bereits eingegangen (vgl. Abschnitt 1.7 und Tabelle 1.5). Einige dieser Veröffentlichungen beschäftigen sich auch mit monoklonalen Antikörpern gegen pharmazeutisch wichtige Triterpene bzw. Triterpensaponine. Dabei handelt es sich allerdings hauptsächlich um Inhaltsstoffe aus asiatischen Arzneipflanzen, die im Rahmen der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) eine wichtige Rolle spielen. Zu nennen sind hier unter anderem die Ginsenoside oder die Seikosaponine (Fukuda et al., 1999, 2000a, 2000b und 2001, Putalun et al., 1999, Tanaka et al., 1999a, Nah et al., 2000, Zhu et al., 2004). In diesen Publikationen zeichneten sich die Antikörper durch eine besonders hohe Spezifität gegenüber dem Antigen aus. Daher stand in der Regel die Detektion oder die Aufreinigung einer Einzelsubstanz im Mittelpunkt dieser Arbeiten. Unsere bisherigen Erfahrungen mit Antikörpern gegen Naturstoffe zeigen jedoch, dass sehr häufig Kreuzreaktivitäten mit strukturell ähnlichen Substanzen bestehen. Daher sollte neben der Erkennung einer bestimmten Einzelsubstanz auch ein breiter angelegtes Arzneipflanzenscreening auf eine Naturstoffklasse mithilfe der Antikörper möglich sein.

4.1.1 Die monoklonalen Antikörper der Zelllinien 6C2, 7A6 und 10F10

Als Antigen für die Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen Triterpensaponine wurde die Oleanolsäure gewählt. Oleanolsäure ist ein pentazyklisches Triterpen, das in vielen verschiedenen Saponinen als Aglykon enthalten ist. Zahlreiche weitere Saponine besitzen Aglyka, die große strukturelle Ähnlichkeiten zur Oleanolsäure besitzen, wie z.B. Ursolsäure, Hederagenin oder α - bzw. β -Amyrin. Es war daher zu erwarten, dass Antikörper, die an Oleanolsäure binden, auch mit anderen pentazyklischen Triterpenen interagieren.

Die Etablierung der Hybridomzelllinien, die monoklonale Antikörper gegen Oleanolsäure sezernieren, erfolgte durch Frau Dr. Ilse Zündorf aus dem Arbeitskreis von Prof. Dingermann in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kerstin Brand aus dem Arbeitskreis von PD Dr. Knöss (Universität Bonn).

Da Oleanolsäure für eine direkte Immunisierung der Mäuse zu klein ist, war eine Kopplung an ein Trägerprotein erforderlich. Für die Immunisierungen wurden zwei unterschiedliche Oleanolsäure-Thyreoglobulin-Konjugate eingesetzt. Im einen Fall war das Thyreoglobulin über einen Succinat-Spacer an der C3-Hydroxyfunktion der Oleanolsäure gebunden, im anderen Fall erfolgte die Kopplung direkt über die C27-Carboxylgruppe. Abbildung 4.1 stellt die beiden Oleanolsäure-Konjugate nochmals gegenüber.

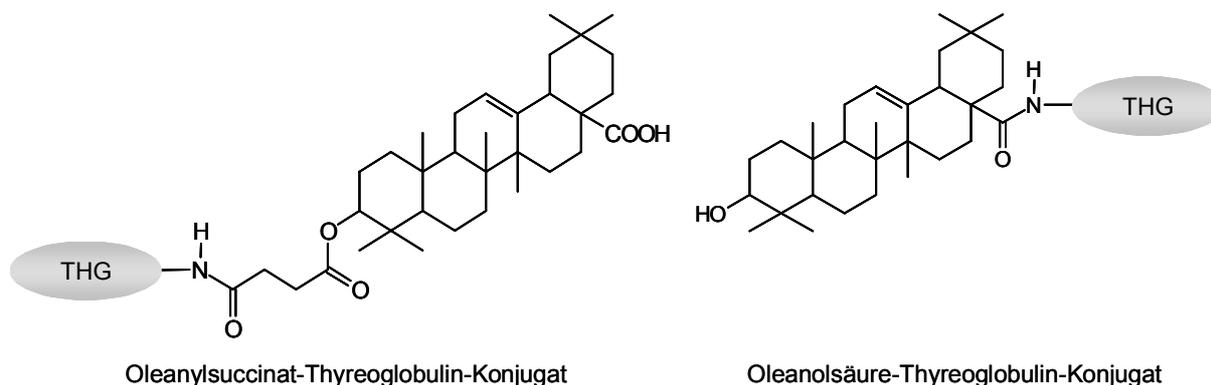


Abb. 4.1 Oleanolsäure-Thyreoglobulin-Konjugate für die Immunisierung

Bei der Immunisierung einer Maus mit einem Hapten-Protein-Konjugat wird der Molekülbereich, der am weitesten von der Kopplungsstelle entfernt liegt, dem Immunsystem präsentiert, wobei der Kopplungsbereich des Haptens quasi abgeschirmt wird. Die gebildeten Antikörper reagieren daher in der Regel mit dem Molekülbereich, der nicht durch das Protein blockiert wird (Enzan et al., 1987). Dadurch ist die Antikörperspezifität in einem gewissen Rahmen durch die Wahl der Konjugationsposition steuerbar (Chappey et al., 1992). Beim Oleanylsuccinat-Thyreoglobulin-Konjugat ist das Trägerprotein am Ring A der Oleanolsäure gebunden. Dadurch wird dieser Bereich blockiert und der entgegengesetzte Molekülteil - vor allem der Ring E - dem Immunsystem präsentiert. Beim Oleanolsäure-Thyreoglobulin-Konjugat verhält es sich genau umgekehrt. Das Thyreoglobulin-Molekül schirmt die Ringe D und E ab, wohingegen der Ring A präsentiert wird.

Im Idealfall sollten daher bei der Verwendung dieser beiden Proteinkonjugate unterschiedliche Hybridomzelllinien etabliert werden können, deren Antikörper an verschiedenen Stellen des Triterpenmoleküls angreifen. Sofern diese Antikörper Kreuzreaktivitäten zu anderen Triterpenen zeigen, sollte es mit ihnen möglich sein, ein breites Spektrum an pharmazeutisch interessanten Triterpensaponinen analytisch zu erfassen. Im Rahmen des Hybridoma-Screenings konnten drei Zelllinien identifiziert werden, bei denen eine eingehende Untersuchung der Antikörperspezifität lohnenswert erschien. Zwei dieser Zelllinien wurden durch die Immunisierung mit dem Oleanylsuccinat-Konjugat gewonnen (6C2 und 7A6), eine Zelllinie durch die Immunisierung mit dem Oleanolsäure-Konjugat (10F10). Im Fall der monoklonalen Antikörper der Zelllinien 6C2 und 10F10 bestätigte sich auch tatsächlich die Theorie, dass sich die Antikörperspezifität durch die Wahl des Hapten-Proteinkonjugats steuern lässt.

Die Antikörper der Zelllinie 10F10 binden am Ring A des Oleanolsäure-Moleküls, wobei die Hydroxylfunktion an C3 für die Interaktion essentiell ist. Eine Veresterung dieser Gruppe beeinflusst die Antikörperbindung nicht, wohingegen die Oxidation der Hydroxyl- zur Carbonylfunktion mit einem Verlust der Bindung einhergeht. Durch eine solche Oxidation wird die Konformation des Ringes so stark verändert, dass der Antikörper sein Epitop nicht mehr erkennen kann. Substitutionen an anderen Positionen des Ringes, z.B. eine Hydroxylfunktion an C2, beeinflussen die Antikörperbindung nur unwesentlich. Neben der Hydroxylfunktion spielen die beiden Methylsubstituenten am Ring A eine wichtige Rolle. Fehlen diese völlig, wie z.B. bei den getesteten Phytosterolen, so erfolgt keine Interaktion mit dem Antikörper. Eine Modifikation der Methylsubstituenten wirkt sich hingegen nur unwesentlich auf die Antikörperbindung aus. Substanzen, bei denen eine der Methylgruppen zur Hydroxyl- (Hederagenin) oder zur Carboxylfunktion (β -Boswelliasäure) oxidiert ist, zeigten ein ähnliches Wettbewerbsverhalten wie Oleanolsäure.

Erstaunlich ist, dass es sich bei den Antikörpern der Zelllinie 10F10 um Immunglobuline vom Isotyp IgM handelt. IgM-Immunglobuline sind die charakteristischen Antikörper einer primären Immunantwort (Janeway, 2002). Sie werden unmittelbar nach der ersten Aktivierung der B-Lymphozyten durch den Kontakt mit dem Antigen sezerniert. Da sie als Pentamere vorliegen, besitzen sie eine relativ hohe Avidität. Dadurch wird der Nachteil ihrer geringen Affinität gegenüber dem Antigen kompensiert. Im Rahmen einer sekundären Immunantwort erfolgen normalerweise der so genannte Klassenwechsel und die Affinitätsreifung. Von den B-Zellen werden jetzt hochaffine IgG-Antikörper sezerniert. Durch die wiederholten Antigen-Injektionen im Rahmen der Immunisierung der Maus sollte eigentlich eine sekundäre Immunantwort und damit die Produktion von IgG-Immunglobulinen stimuliert werden. Dies ist in diesem Fall jedoch scheinbar nicht geschehen.

Der für das Screening der Hybridomklone eingesetzte Anti-Mouse-IgG-Zweitantikörper der Firma Sigma zeigte jedoch eine Kreuzreaktivität zu murinen IgM-Antikörpern, so dass die Antikörper der Zelllinie 10F10 ursprünglich als IgG-Immunglobuline identifiziert und charakterisiert wurden. Daher war eine Überprüfung der von Frau Dr. Kerstin Brand erhobenen Daten erforderlich (Brand, 2002). Die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Versuche bestätigten aber die vorhandenen Daten.

Bei der Etablierung der Hybridomzelllinie 6C2 wurde die BALB/C-Maus nicht mit dem Oleanolsäure-Thyreoglobulin-Konjugat, sondern mit dem Oleanylsuccinat-Thyreoglobulin-Konjugat immunisiert. Es war daher zu erwarten, dass die entsprechenden Antikörper an ein Epitop im Bereich der Ringe D oder E des Oleanolsäure-Moleküls binden, was sich auch tatsächlich experimentell bestätigen ließ. Essentiell für eine Antikörperbindung ist die C27-Carboxylfunktion. Bereits eine Reduktion zur Hydroxylfunktion geht mit einem nahezu völligen Verlust der Antikörperbindung einher. Obwohl der Antikörper der Zelllinie 6C2 im Bereich der Ringe D und E bindet, ist die Form des Rings E (Cyclopentan oder Cyclohexan) scheinbar nicht unbedingt entscheidend. Auch Triterpene vom Lupan-Typ wie z.B. Betulinsäure interagieren mit dem Antikörper, sofern sie die C27-Carboxylgruppe besitzen. Bei Triterpenen vom Lupan-Typ handelt es sich beim Ring E um einen Cyclopentan-Ring, wohingegen die Triterpene vom Olean- und Ursan-Typ an dieser Position einen Cyclohexan-Ring besitzen.

Da die Hybridomzelllinie 7A6 ebenfalls unter Verwendung des Oleanylsuccinat-Thyreoglobulin-Konjugats etabliert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Antikörper dieser Zelllinie in einem ähnlichen Bereich des Oleanolsäure-Moleküls binden, wie die Antikörper der Zelllinie 6C2. Diese Vermutung ließ sich allerdings experimentell nicht bestätigen. Vielmehr ergaben sich bei den Wettbewerbsversuchen widersprüchliche Ergebnisse. Sowohl Modifikationen am Ring A der Triterpenstruktur, als auch Veränderungen im Bereich der Ringe D oder E wirkten sich zum Teil gravierend auf die Antikörperbindung aus. Eine nahe liegende Erklärung hierfür wäre, dass es sich bei der Hybridomzelllinie 7A6 um einen Mischklon handelt, der Antikörper unterschiedlicher Spezifität sezerniert. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die variablen Domänen VL und VH des 7A6-Antikörpers mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Dabei konnten tatsächlich zwei unterschiedliche funktionelle Sequenzen für die schwere Kette ermittelt werden. Außerdem wurden mehrere Subklonzelllinien etabliert und deren Antikörper im kompetitiven ELISA gegen verschiedene Triterpene getestet. Die von den Subklonen sezernierten Antikörper zeigten ein deutlich anderes Wettbewerbsverhalten, als die Antikörper der Originalzelllinie. Die Bindungseigenschaften der von der Subklonzelllinie 7A6B4 sezernierten Immunglobuline wurden eingehend untersucht. Das Epitop, das von ihnen erkannt wird, konnte eindeutig im Bereich der Ringe D und E des Oleanolsäure-Moleküls identifiziert werden, wobei auch in diesem Fall die C27-Carboxylfunktion eine entscheidende Rolle spielt. Mit dem Antikörper der Subklonzelllinie 7A6B4 steht somit neben dem Antikörper der Zelllinie 6C2 ein weiteres Immunglobulin zur Verfügung, das im Bereich der Ringe D und E des Triterpenmoleküls bindet. Auch dieser Antikörper zeigt Kreuzreaktivitäten zu zahlreichen anderen pentacyklischen Triterpenen und kann daher zur Analytik von saponinhaltigen Arzneipflanzenextrakten eingesetzt werden.

Obwohl die Antikörper der beiden Zelllinien 6C2 und 7A6B4 an ähnlichen Epitopen binden, besitzen die variablen Regionen dieser Immunglobuline eine völlig unterschiedliche Aminosäuresequenz. Dies konnte durch die Sequenzierung der analogen svFv-Fragmente belegt werden. Zwar befinden sich im Bereich der FR-Domänen der variablen Regionen zahlreiche konservierte Aminosäuren, die antigenbindenden CDR-Domänen zeigten aber keine auffälligen Sequenzhomologien.

4.1.2 Die Untersuchung von triterpenhaltigen Arzneipflanzen mit monoklonalen Antikörpern

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die sich mit der Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen Triterpene beschäftigen. Vor allem in den Arbeitsgruppen von Seun-Yeol Nah und Yukihiro Shoyama aus Südkorea bzw. Japan wird auf diesem Gebiet intensiv geforscht. Dabei stehen Antikörper gegen Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen im Vordergrund, die in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) eine große Rolle spielen. Als Zielstrukturen wurden unter anderem verschiedene Ginsenoside (Fukuda et al., 1999, 2000a, 2000b und 2001, Tanaka et al., 1999a, Nah et al., 2000), Glycyrrhetinsäure bzw. Glycyrrhizin (Tanaka et al., 1998, Shan et al., 1999 und 2001), Steroidalkaloidglykoside vom Solasodin-Typ (Putalun et al., 2000) oder Saikosaponine (Zhu et al., 2004) gewählt.

Abbildung 4.2 zeigt die wichtigsten Triterpene, gegen die Antikörper etabliert wurden.

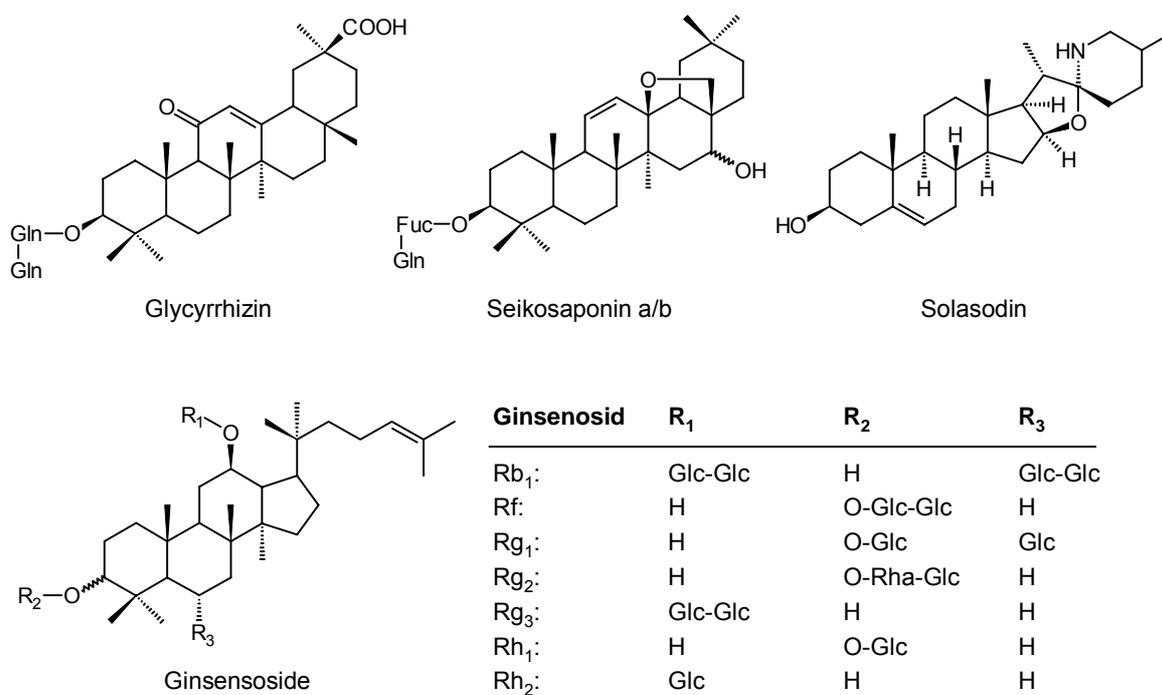


Abb. 4.2 Übersicht über die unterschiedlichen Triterpene, gegen die in den Arbeitsgruppen Nah und Shoyama monoklonale Antikörper generiert wurden

Fuc = Fucose Glc = Glucose Gln = Glucuronsäure Rha = Rhamnose

Die Autoren beschäftigten sich im Rahmen ihrer Arbeit mit den unterschiedlichsten Fragestellungen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Steroidalkaloidglykosid Solasodin, das für die Partialsynthese von steroidal Hormonen benötigt wird, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern über Immunaффinitäts-säulen aus verschiedenen *Solanum*-Arten isoliert und aufgereinigt werden kann (Putalun et al., 1999).

Monoklonale Antikörper können aber auch im Rahmen von pharmakokinetischen Untersuchungen eingesetzt werden. Beispielsweise konnte die orale Bioverfügbarkeit von Ginsenosid Rf mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers im Tierversuch nachgewiesen werden (Nah et al., 2000).

Mit monoklonalen Antikörpern lassen sich sogar histologische Untersuchungen an Arzneipflanzen durchführen. Shao-jie Shan et al. entwickelten eine Methode – von den Autoren inzwischen als „Eastern Blotting“ bezeichnet – mit deren Hilfe es möglich ist, die Verteilung eines Sekundärmetaboliten innerhalb der Pflanze zu bestimmen (Shan et al., 1999, Shan et al., 2001). Abbildung 4.3 zeigt das Ergebnis einer solchen Immunocytolokalisationsstudie. Dabei wurden die wasserlöslichen Inhaltsstoffe aus der Wurzel von *Glycyrrhiza inflata* auf eine PVDF-Membran übertragen, fixiert und mit einem Anti-Glycyrrhizin-Antikörper inkubiert. Man kann erkennen, dass sich das Glycyrrhizin hauptsächlich im Phloem, d.h. in der Rinde der Pflanze befindet.

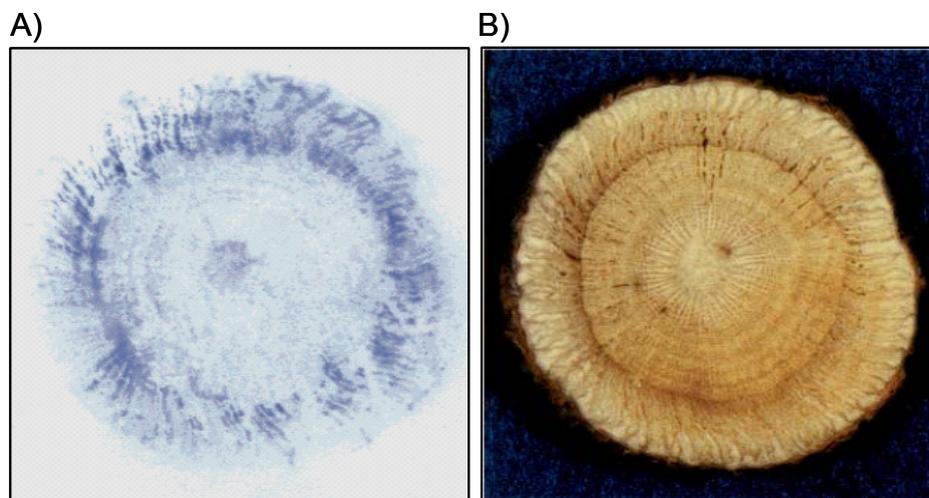


Abb. 4.3 Immunocytolokalisation von Glycyrrhizin in *Glycyrrhiza inflata*

A) Immunochemischer Nachweis von Glycyrrhizin. Die löslichen Inhaltsstoffe der Wurzel wurden auf eine Membran übertragen und mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Man erkennt, dass sich Glycyrrhizin hauptsächlich in der Rinde befindet.

B) Wurzelquerschnitt von *Glycyrrhiza inflata*, der über die von den Autoren als „Eastern Blotting“ bezeichnete Methode auf eine PVDF-Membran geblottet wurde.

Bei den meisten der hier vorgestellten Arbeiten kam es den Autoren darauf an, hoch spezifische Antikörper zu etablieren, die möglichst wenig Kreuzreaktivitäten zu anderen Substanzen zeigen. Diese Antikörper wurden zur gezielten Detektion jeweils eines einzelnen Sekundärmetaboliten eingesetzt. Nah et al. berichteten zum Beispiel über Antikörper gegen Ginsenoside, die so spezifisch sind, dass sie keinerlei Kreuzreaktivitäten zu anderen strukturell sehr ähnlichen Ginsenosiden zeigen. Beispielsweise diskriminiert ein Antikörper, der gegen das Ginsenosid Rf hergestellt worden war, eindeutig zwischen dieser Substanz und den Ginsenosiden Rg₂ und Rh₂, obwohl sich letztere nur in den Zuckerresten, über die die Proteinkopplung erfolgte, von dem Immunogen (Rf) unterscheiden (Nah et al., 2000).

Obwohl das Epitop, mit dem diese Anti-Ginsenosid-Antikörper interagieren, nicht exakt bestimmt wurde, deuten die veröffentlichten Daten darauf hin, dass die Antigenbindung dieser Immunglobuline genau in dem Molekülbereich stattfindet, an dem zuvor auch die Proteinkopplung erfolgt war. Diese Ergebnisse widersprechen ganz klar unseren Erfahrungen, die mit den Anti-Oleanolsäure-Antikörpern gewonnen wurden. Durch die Kompetitionsversuche, die im Rahmen dieser Arbeit und in früheren Studien nicht nur mit Triterpenen, sondern auch mit Pyrrolizidinalkaloiden durchgeführt wurden, konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Antikörper an dem Molekülteil des Haptens binden, der am weitesten von der Protein-Kopplungsstelle entfernt liegt (Brand, 2002, Zündorf et al., 1997). Außerdem stellte sich bei unseren Untersuchungen heraus, dass Antikörper, die gegen niedermolekulare Haptene gerichtet sind, in der Regel nicht nur das eigentliche Immunogen, sondern auch zahlreiche strukturell ähnliche Substanzen mit unterschiedlicher Affinität binden.

Die von uns gemachten Beobachtungen scheinen der Aussage zu widersprechen, dass es sich bei monoklonalen Antikörpern immer um Proteine handelt, die sehr spezifisch mit einem bestimmten Antigen interagieren.

Die Spezifität von Immunglobulinen kann zwar tatsächlich soweit gehen, dass aus einem racemischen Gemisch zweier chiraler Substanzen die beiden Enantiomere mit enantioselektiven Antikörpern von einander getrennt werden können (Sawutz et al., 1985, Wang et al., 1986, Knox et al., 1986, Got et al., 1997). Dennoch findet man gerade bei monoklonalen Antikörpern, die gegen niedermolekulare Haptene generiert wurden, immer wieder Kreuzreaktivitäten mit anderen Substanzen, die eine ähnliche Struktur wie das ursprüngliche Immunogen besitzen. Man spricht in diesem Fall von einer kontrollierten Polyspezifität (Chappey et al., 1992). Eine solche Polyspezifität kann durchaus von Vorteil sein. So wurde beispielsweise gegen das Immunsuppressivum Cyclosporin ein monoklonaler Antikörper generiert, der auch mit den wichtigsten humanen Cyclosporin-Metaboliten interagiert. Mit diesem Antikörper ist im Rahmen des therapeutischen Monitorings die Bestimmung der Serumkonzentration von Cyclosporin und seiner Metabolite möglich (Quesniaux et al., 1987a, Quesniaux et al., 1987b).

Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Antikörper sind polyspezifisch. Sie interagieren nicht nur mit Oleanolsäure selbst, sondern auch mit zahlreichen anderen strukturell ähnlichen Triterpenen. Die Polyspezifität der Anti-Oleanolsäure-Antikörper war in diesem Fall sogar erwünscht. Die Etablierung und Charakterisierung der Immunglobuline erfolgte letztendlich mit dem Ziel, unterschiedliche Saponingemische – wie sie zum Beispiel in verschiedenen Arzneipflanzen vorliegen – mit Hilfe von ELISA-Methoden zu detektieren. Für eine solche Anwendung wären hochspezifische Antikörper, die nur ein ganz bestimmtes Molekül erkennen, wenig geeignet. Durch die Polyspezifität der Anti-Oleanolsäure-Antikörper kann ein relativ breites Spektrum an pentazyklischen Triterpensaponinen analytisch erfasst werden. Damit unterscheidet sich die vorliegende Arbeit aber auch ganz erheblich von der zitierten Literatur, in der es den Autoren in der Regel darum ging, eine ganz bestimmte Einzelsubstanz zu detektieren.

In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine Detektion von Triterpenen in wässrigen Arzneipflanzenextrakten mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers der Zelllinie 10F10 prinzipiell möglich ist (Brand, 2002). Als nachteilig erwies sich dabei jedoch, dass mit diesem Antikörper nur die freien Aglyka der Saponine, nicht aber die glykosylierten Verbindungen erfasst werden können. Der Antikörper der Zelllinie 10F10 bindet am Ring A des Oleanolsäure-Moleküls, wobei die Hydroxylfunktion an C3 eine essentielle Rolle spielt. Bei Saponinen ist diese funktionelle Gruppe mit einem Oligosaccharid verestert. Durch den voluminösen Zuckerrest kommt es vermutlich zu einer sterischen Behinderung der Antikörper-Hapten-Interaktion.

Mit dem monoklonalen Antikörper der Zelllinie 6C2 können neben den freien Aglyka auch die glykosylierten Verbindungen detektiert werden, da der Antikörper am entgegengesetzten Molekülende (Ring D und E) bindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Arzneipflanzenextrakte in einem kompetitiven ELISA mit dem Antikörper der Zelllinie 6C2 untersucht. Die Triterpensaponin-haltigen Drogenextrakte von *Aesculus hippocastanum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Primula veris*, *Quillaja saponaria*, *Solidago virgaurea* und *Verbascum phlomoides* zeigten dabei erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Konkurrenz. Unter den klassischen Saponindrogen zeigte nur der Wurzelextrakt von *Panax ginseng* keine Konkurrenz, da die darin enthaltenen Saponine ein Dammaran-Grundgerüst besitzen und daher nicht mit dem Antikörper kreuzreagieren (vgl. Abb. 4.2).

Neben den Extrakten der Saponindrogen ergaben auch die Arzneipflanzenextrakte ein positives ELISA-Signal, die nicht-glykosylierte, pentazyklische Triterpene enthalten, wie zum Beispiel der Herba-Extrakt von *Viscum album*. Die Stärke der Konkurrenz korrelierte jedoch nicht in allen Fällen mit dem tatsächlichen Saponingehalt der Pflanze. So zeigte beispielsweise der Extrakt von *Primulae radix* (*Primula veris*) eine schwächere Konkurrenz als der Extrakt von *Solidaginis herba* (*Solidago virgaurea*), obwohl *Primula veris* den höheren Saponingehalt der beiden Pflanzen besitzt. Allerdings leiten sich die Hauptsaponine von *Primula veris* von Protoprimulagenin ab, das bei den im Rahmen der Antikörpercharakterisierung durchgeführten Konkurrenzversuchen keine Interaktion mit dem 6C2-Antikörper gezeigt hatte. Die in *Solidago virgaurea* enthaltenen Saponine besitzen als Hauptaglyka Polygalasäure und Bayogenin. Diese beiden Substanzen wurden im Rahmen der Konkurrenzversuche zwar nicht getestet, ihre Struktur ähnelt aber im Bereich der Ringe D und E sehr stark der Oleanolsäure, so dass eine Konkurrenz mit dem Antikörper der Zelllinie 6C2 als sehr wahrscheinlich erscheint.

Auch die Extrakte von *Hippocastani semen* (*Aesculus hippocastanum*) und *Liquiritiae radix* (*Glycyrrhiza glabra*) zeigten im kompetitiven ELISA nur ein relativ schwaches Signal. Die Hauptsaponine von *Aesculus hippocastanum* leiten sich von Protoaescigenin und Barringtogenol C ab. Wie man anhand der Abbildung 4.4 erkennen kann, erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass diese beiden Substanzen mit dem Antikörper der Zelllinie 6C2 interagieren. Die Ringe D und E dieser Aglyka zeigen keine strukturellen Ähnlichkeiten zu Oleanolsäure. Die Hauptsaponine von *Glycyrrhiza glabra* leiten sich von Glycyrrhetinsäure ab. Glycyrrhetinsäure besitzt an C27 einen Methylsubstituenten (vgl. Abb. 4.2). Wie bereits ausführlich diskutiert, bindet der Antikörper der Zelllinie 6C2 nur an Triterpene, die an dieser Position eine Carboxylfunktion besitzen.

In anderen Fällen war allerdings eine deutliche Korrelation zwischen der Stärke des ELISA-Signals und der tatsächlichen Saponinkonzentration der Droge zu erkennen. Die Rinde von *Quillaja saponaria* hatte beispielsweise mit 9 – 10 % den höchsten Saponingehalt der untersuchten Drogen. Dementsprechend zeigte der Extrakt auch die stärkste Konkurrenz im ELISA.

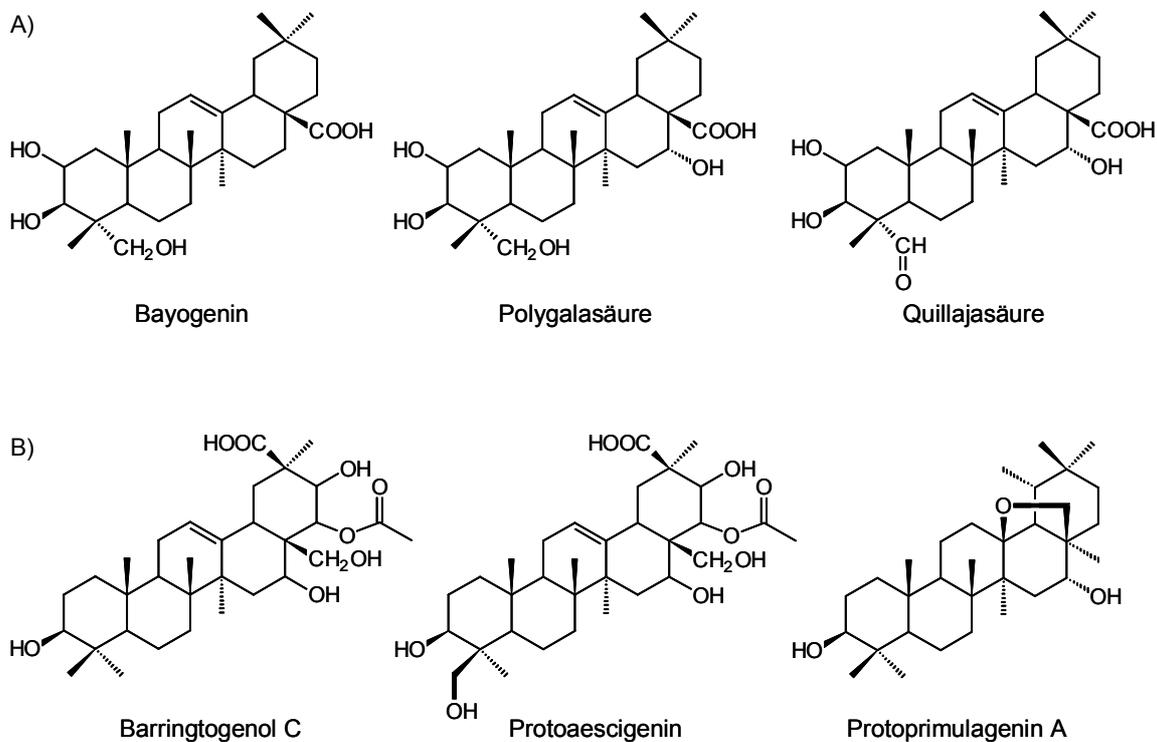


Abb. 4.4 Übersicht über einige Saponin-Aglyka

A) Die Saponine in *Solidago virgaurea* leiten sich von Bayogenin und Polygalasäure ab. Beide Sapogenine haben große strukturelle Gemeinsamkeiten mit Oleanolsäure. Genauso verhält es sich mit Quillajasäure, dem Aglykon, von dem sich die meisten Saponine von *Quillaja saponaria* ableiten.

B) Die Triterpensaponine von *Aesculus hippocastanum* leiten sich von Barringtogenol C und Protoaescigenin ab. Die Saponine von *Primula veris* besitzen hauptsächlich Protoprimulagenin als Aglykon. Alle drei Triterpene unterscheiden sich hauptsächlich in Ring E von der Oleanolsäure. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Drogenextrakte dieser Pflanzen nur eine schwache Konkurrenz zeigten.

Bei den durchgeführten Wettbewerbsversuchen kam es in zwei Fällen zu „falsch“ positiven Ergebnissen: sowohl der Herba-Extrakt von *Hypericum perforatum*, als auch der Radix-Extrakt von *Rheum palmatum* zeigten eine deutliche Konkurrenz mit dem Antikörper der Zelllinie 6C2, obwohl in diesen Pflanzen nach gängiger Lehrbuchmeinung keine Triterpene enthalten sind.

Diese Ergebnisse lassen sich auf eine so genannte „unvorhersehbare“ Polyspezifität (Chappey et al., 1992) der Anti-Oleanolsäure-Antikörper zurückführen. Im Rahmen der Antikörpercharakterisierung konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Immunglobuline nicht nur mit den unterschiedlichen Triterpenen, sondern auch mit zwei anderen Naturstoffen interagieren, die keinerlei strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Oleanolsäure-Molekül besitzen:

die beiden phenolischen Verbindungen Quercetin und Ellagsäure zeigten im ELISA eine konzentrationsabhängige Konkurrenz. Quercetin gehört in die große Gruppe der Flavonoide, wohingegen es sich bei Ellagsäure um ein Isolierungsartefakt handelt, das aus dem Gerbstoffmonomer Hexahydroxydiphensäure entsteht. Das Konkurrenzprofil dieser beiden Stoffe mit den Antikörpern der Zelllinie 6C2 und 7A6 ähnelte dabei sogar dem der Oleanolsäure, d.h. die Substanzen haben eine ähnliche Affinität zu diesen Antikörpern, wie die Oleanolsäure selbst. Mit den Antikörpern der Zelllinie 10F10 zeigten die beiden Naturstoffe eine deutlich schwächere Konkurrenz. Zumindest bei Quercetin handelt es sich um eine spezifische Interaktion mit den Anti-Oleanolsäure-Antikörpern, wobei die C3-Hydroxylfunktion des Quercetin-Moleküls essentiell ist.

Hyperici herba besitzt einen Flavonoidgehalt von 2 - 4%. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Quercetin und Quercetin-Glykoside. Es ist daher nicht verwunderlich, dass mit dem entsprechenden Drogenextrakt eine Konkurrenz festgestellt werden konnte. Auch die Wurzel von *Rheum palmatum* enthält zu einem geringen Teil Flavonoide. Daneben besitzt die Droge zusätzlich einen sehr hohen Gehalt an Tanningerbstoffen. Gerbstoffe sind in der Lage, Proteine unspezifisch zu denaturieren, wovon natürlich auch die Antikörpermoleküle im kompetitiven ELISA betroffen sind. Außerdem leiten sich Tanningerbstoffe von der Gallussäure ab, die bei der Isolierung über Hexahydroxydiphensäure zu Ellagsäure kondensieren kann.

Bei den „falsch“ positiven Konkurrenz-Ergebnissen handelt es sich also um unspezifische Denaturierungseffekte durch Gerbstoffe, oder um spezifische Interaktionen des 6C2-Antikörpers mit Quercetin und Ellagsäure. Solche unvorhersehbaren Polyspezifitäten kommen vor allem bei monoklonalen Antikörpern, die gegen niedermolekulare Haptene gerichtet sind, immer wieder vor. So wurde beispielsweise ein Antikörper gegen das Psychostimulans Metamphetamin generiert, der auch den H₂-Rezeptorantagonisten Ranitidin mit einer ähnlich hohen Affinität bindet (Kelly, 1990) (vgl. Abb. 4.5). Diese beiden Substanzen binden an völlig unterschiedliche Paratope des gleichen Antikörpers.

Eine besondere pharmakologische Relevanz besitzt eine solche unvorhersehbare Polyspezifität bei den Anti-Digoxin-Antikörpern, die im Rahmen des therapeutischen Drug-Monitorings bei Herzglykosid-Patienten zum Einsatz kommen. Diese Antikörper zeigen häufig Kreuzreaktivitäten zu endogenen Substanzen, den so genannten „digoxin-like immunoreactive factors“ (DLIF), wodurch das Monitoring-Ergebnis negativ beeinflusst wird (Graves et al., 1986, Jortani et al., 1997).

Die Ursache einer unvorhersehbaren Polyspezifität liegt in der Natur der Antikörper-Antigen-Interaktion. Die Antigen-Bindungstasche des Antikörpers wird durch die sechs hypervariablen CDR-Domänen von leichter und schwerer Kette gebildet. In der Regel erfolgt die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung aber nicht über die komplette Oberfläche, die von den CDRs geformt wird. Es sind vielmehr nur einige wenige Aminosäuren an der eigentlichen Antigenbindung beteiligt. Vor allem niedermolekulare Haptene können daher an unterschiedliche Paratope der gleichen Bindungstasche binden (Richards et al., 1975). Inzwischen konnte durch röntgenkristallographische Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die CDR-Domänen eines polyspezifischen Antikörpers unterschiedliche Konformationen annehmen können, je nachdem, mit welchem Antigen sie interagieren (James et al., 2003). Die Theorie, dass sich die Konformation der Bindungstasche dem Antigen anpassen kann, war bereits 1940 von Linus Pauling postuliert worden (Pauling, 1940).

Die Polyspezifität von Antikörpern hat auch eine evolutionsbiologische Bedeutung, da auf diese Weise mit Hilfe eines definierten Antikörperrepertoires ein weitaus größeres Spektrum an Antigenen erfasst werden kann, als wenn jeder Antikörper nur eine einzige Spezifität besäße (Richards et al., 1975).

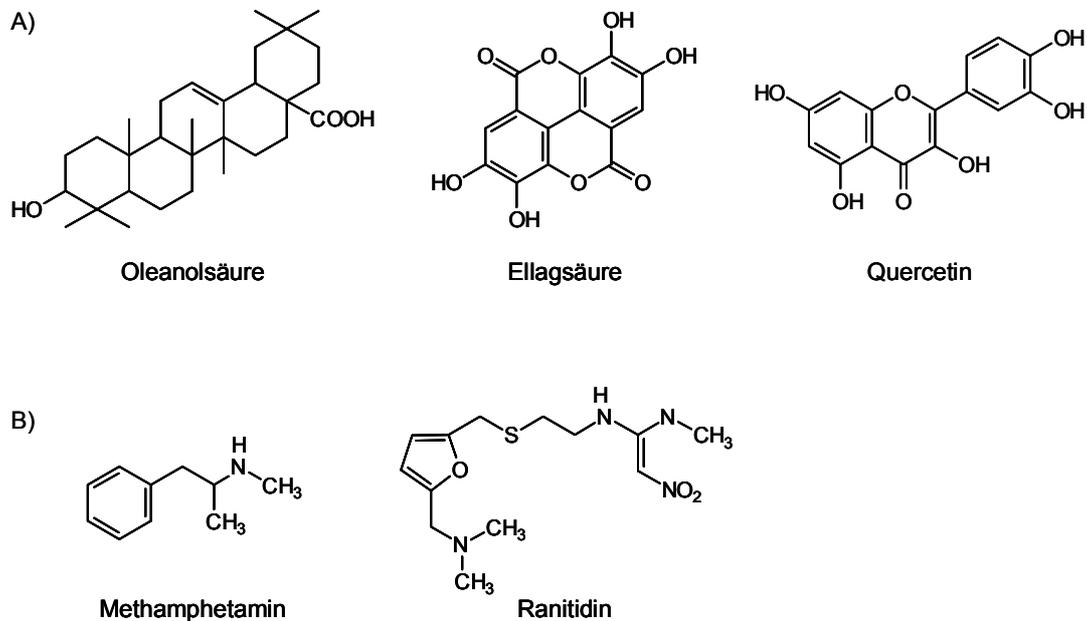


Abb. 4.5 Polyspezifität von monoklonalen Antikörpern gegen niedermolekulare Haptene

A) Die untersuchten Anti-Oleanolsäure-Antikörper zeigten Kreuzreaktivitäten zu den mit der Oleanolsäure strukturell nicht verwandten Sekundärmetaboliten Ellagsäure und Quercetin.

B) In der Literatur existieren zahlreiche Beispiele für unvorhersehbare Polyspezifitäten. So hat beispielsweise ein monoklonaler Antikörper, der gegen das Psychostimulans Methamphetamin generiert wurde, auch eine hohe Affinität zum H₂-Antagonisten Ranitidin (Kelly, 1990).

Für den Einsatz der monoklonalen Anti-Oleanolsäure-Antikörper in der Naturstoffanalytik hat ihre unvorhersehbare Polyspezifität weitreichende Konsequenzen. Quercetin ist ein im Pflanzenreich weit verbreiteter Sekundärmetabolit und auch Gerbstoffe sind in zahlreichen Arzneipflanzen enthalten. Bei der Arzneipflanzenanalyse mit den Anti-Oleanolsäure-Antikörpern ist es daher wichtig, eine Voruntersuchung auf diese beiden Störfaktoren durchzuführen. Dazu bieten sich verschiedene, einfach durchzuführende Farbreaktionen an. Flavonoide bilden unter anderem mit Aluminiumsalzen charakteristische gelb gefärbte Chelatkomplexe. Diese Aluminiumchelate werden beispielsweise auch zur quantitativen photometrischen Bestimmung von Flavonen und Flavonolen in Arzneidrogen herangezogen. Auch für Catechin- oder Tanningerbstoffe existieren zahlreiche Identifikationsmethoden. Es wäre aber generell sinnvoll, eventuell vorhandene Gerbstoffe völlig aus den Extrakten zu entfernen, bevor diese im Kompetitions-ELISA untersucht werden. Dazu bieten sich unterschiedliche Fällungsreaktionen an, mit denen die Gerbstoffe präzipitiert werden können.

Es kann zum jetzigen Zeitpunkt auch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass für die Anti-Oleanolsäure-Antikörper noch weitere Kreuzreaktivitäten existieren. Es wurden Antikörper beschrieben, die vier bis acht strukturell völlig verschiedene Haptene mit ähnlichen Affinitäten binden können (Poljak et al., 1974, James et al., 2003). Arzneipflanzenextrakte beinhalten ein sehr breites Spektrum der unterschiedlichsten Inhaltsstoffe. Es ist daher möglich, dass bei dem Versuch, Triterpensaponine in einem pflanzlichen Extrakt analytisch zu erfassen, auch andere Pflanzeninhaltsstoffe mit den Antikörpern interagieren.

Auf diese Problematik wird in der Literatur allerdings in den seltensten Fällen eingegangen. Die meisten monoklonalen Antikörper, die gegen Pflanzeninhaltsstoffe etabliert wurden, wurden allenfalls auf ihre Kreuzreaktivitäten mit strukturell ähnlichen Substanzen untersucht. Ein Screening auf unvorhersehbare Interaktionen mit strukturell nicht verwandten Naturstoffen fand in der Regel nicht statt.

Dennoch haben die im Rahmen dieser Arbeit und die von Frau Dr. Brand durchgeführten Wettbewerbsversuche gezeigt, dass eine Untersuchung von Arzneipflanzenextrakten mit monoklonalen Antikörpern prinzipiell möglich ist. Im Gegensatz zu vielen anderen analytischen Methoden ist bei dieser Methode keine aufwendige Probenvorbereitung erforderlich. Auch der apparative Aufwand hält sich in Grenzen. Mit Hilfe des hier vorgestellten kompetitiven ELISAs lassen sich Arzneipflanzenextrakte einfach, schnell und kostengünstig untersuchen.

Für die exakte Bestimmung des Saponingehalts einer Arzneipflanze ist diese Methode allerdings nur bedingt geeignet. Bei den Saponinen handelt es sich um eine sehr heterogene Stoffklasse mit den unterschiedlichsten Grundstrukturen. Wie im Rahmen der zahlreichen Wettbewerbs-ELISAs gezeigt werden konnte, interagieren nicht alle Triterpensapogenine gleich gut mit den monoklonalen Antikörpern. Manche Strukturen binden überhaupt nicht an die Antikörper, mit vielen anderen Triterpenen erfolgt nur eine schwache Interaktion. Bei einer schwachen Wettbewerbs eines Arzneipflanzenextraktes kann daher nicht unbedingt darauf geschlossen werden, dass es sich um eine Pflanze mit geringem Saponingehalt handelt. Demgegenüber kann eine starke Wettbewerbs aber auch durch eine geringe Saponinmenge mit hoher Affinität erreicht werden.

Theoretisch wäre der Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur Wertbestimmung von Arzneipflanzen bzw. deren Zubereitung denkbar. Lu et al. untersuchten beispielsweise verschiedene chinesische Arzneipflanzen und deren traditionelle Zubereitungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Monoterpen Paeoniflorin und dessen Derivate. Sie ermittelten die Konzentrationen der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe parallel im kompetitiven ELISA und durch eine HPLC-Analyse und erzielten dabei eine sehr gute Korrelation (Lu et al., 2003). Eine exakte Wertbestimmung von Arzneipflanzenextrakten wäre nur mittels eines Referenzextraktes möglich, der in jeder Versuchsreihe mitgetestet wird und auf den die Wettbewerbsergebnisse bezogen werden können.

Die Erfahrungen, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden konnten, zeigten, dass die Standardisierung und Validierung der hier vorgestellten Methode, wie sie beispielsweise für einen industriellen Einsatz erforderlich wäre, überaus schwierig ist. Bei der Durchführung eines kompetitiven ELISAs wirken sich viele unterschiedliche Faktoren auf das Versuchsergebnis aus. An erster Stelle steht die Qualität des eingesetzten Antikörpers und des Oleanolsäure-Protein-Konjugats. Vor allem die Qualität des Konjugats kann dabei starken Schwankungen unterliegen.

Neben diesen beiden Faktoren spielt zusätzlich die Versuchsdurchführung eine entscheidende Rolle. Ein ELISA ist eine hoch sensible Methode, bei der sich bereits kleine Fehler in der Handhabung gravierend auf das Ergebnis auswirken können. Vor allem die Einhaltung der exakten Inkubationszeiten ist sehr wichtig. Sofern man unterschiedliche Kompetitionsversuche miteinander vergleichen will, ist es daher erforderlich, eine Referenz mitzuführen, z.B. eine Oleanolsäure-Eichgerade oder – bei der Wertbestimmung von Arzneipflanzenextrakten – einen entsprechenden Referenzextrakt.

Es ist sehr gut vorstellbar, dass die Anti-Oleanolsäure-Antikörper im Rahmen eines Screening-Prozesses von Arzneipflanzenextrakten auf die entsprechenden Zielstrukturen Verwendung finden. Dabei wäre es sinnvoll, die unterschiedlichen Antikörper miteinander zu kombinieren. Die beiden Antikörper der Zelllinien 6C2 und 10F10 zeigen ein völlig unterschiedliches Kompetitionsverhalten, da sie an den entgegengesetzten Enden des Oleanolsäure-Moleküls angreifen. Damit ergänzen sich die beiden Antikörper gegenseitig. Bei einem gemeinsamen oder einem parallelen Einsatz im Kompetitions-ELISA ließe sich ein noch breiteres Spektrum unterschiedlicher Triterpene analytisch erfassen. Mit dem Antikörper der Subklonzelllinie 7A6B4 steht darüber hinaus noch ein weiterer gut charakterisierter Antikörper für die Untersuchung von Arzneipflanzenextrakten zur Verfügung.

Die Kombination mehrerer Antikörper, die an unterschiedliche Epitope desselben Moleküls binden, verbessert außerdem die Sensitivität der Analysenmethode und senkt dadurch die Nachweisgrenze erheblich. Bereits durch die Kombination von zwei Antikörpern kann die Sensitivität des Testsystems um das zehnfache gesteigert werden (Moyle et al., 1983). Die Nachweisgrenze des indirekten Kompetitions-ELISAs mit den verschiedenen Anti-Oleanolsäure-Antikörpern lag bei einer Oleanolsäure-Konzentration von 1 – 2 mM, entsprechend 100 – 200 nmol pro 100 μ L-Ansatz. Der direkte Kompetitions-ELISA mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat erwies sich mit einer Nachweisgrenze von 0,25 – 0,5 mM als etwas sensitiver. Außerdem ist der direkte ELISA in der Durchführung einfacher, da keine Vorinkubation der Proben und kein Zweitantikörper erforderlich sind. Er würde sich daher zur Untersuchung von Arzneipflanzenextrakten anbieten, sofern sich die Kopplungseffizienz zwischen Oleanolsäure und der β -Galaktosidase noch weiter steigern ließe.

Darüber hinaus wäre es sinnvoll, weitere monoklonale Antikörper zu etablieren, so dass auch die pentazyklischen Triterpene analytisch erfasst werden können, mit denen die hier vorgestellten Antikörper nicht oder nur schwach interagieren. Außerdem könnten sich neue, spezifischere Antikörper als nützlich erweisen, mit denen bestimmte Substanzen ganz gezielt detektiert werden können. Mit einer „Toolbox“ aus zahlreichen verschiedenen Antikörpern wäre eine fundierte Arzneipflanzenanalytik möglich. Die unspezifischeren Immunglobuline könnten hierbei im Rahmen von schnellen Voruntersuchungen eingesetzt werden, wohingegen die spezifischeren Antikörper anschließend für die exakte Detektion bestimmter Substanzen genutzt werden könnten.

Eine Möglichkeit, die Spezifität von Antikörpern zu verändern und dadurch Moleküle mit neuen Eigenschaften zu gewinnen, liegt in der Konstruktion und Expression von rekombinanten Antikörperfragmenten und in der Phagen-Display-Technik, auf die im weiteren Verlauf dieser Diskussion eingegangen wird.

Ein besonders interessantes Einsatzgebiet des Anti-Oleanolsäure-Antikörpers der Zelllinie 10F10 ergibt sich aus der Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit β -Boswelliasäure und 3-Acetyl- β -Boswelliasäure. Boswelliasäuren können aus dem Harz verschiedener *Boswellia*-Arten isoliert werden. Salai-Gugagal, das Gummiharz von *Boswellia serrata* wird in der ayurvedischen Medizin traditionell gegen entzündliche Erkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis eingesetzt. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass die darin enthaltenen β -Boswelliasäuren das Enzym 5-Lipoxygenase hemmen und dadurch die Synthese der entzündungsfördernden Leukotriene inhibieren (Ammon, 1997). Eine erhöhte Leukotrienproduktion wird bei den unterschiedlichsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Asthma bronchiale und rheumatoider Arthritis beobachtet. Daher scheinen Boswelliasäuren vielversprechende Arzneistoffe für die Therapie dieser Erkrankungen zu sein. Die Wirkung der Boswelliasäuren auf die 5-Lipoxygenase wird im Arbeitskreis von Prof. Dieter Steinhilber am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt intensiv erforscht. Der monoklonale Antikörper der Zelllinie 10F10 könnte bei dieser Forschung hilfreich sein. Er soll unter anderem für eine Immobilisierung der Boswelliasäure eingesetzt werden.

4.2 Die Konstruktion und Expression von scFv-Antikörperfragmenten gegen das Triterpen Oleanolsäure und das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin

Gerade bei Antikörpern gegen Naturstoffe wäre oftmals eine nachträgliche Änderung der Spezifität interessant. So könnten durch die DNA-Rekombinationstechnik beispielsweise Antikörperfragmente gegen Substanzen generiert werden, die aufgrund ihrer Toxizität nicht für die herkömmliche Immunisierung von Mäusen in Frage kommen. Ausgangspunkt für die Konstruktion von Antikörperfragmenten kann dabei unter anderem eine bereits etablierte Hybridomzelllinie sein.

Die Antikörperfragmente, die aus der mRNA einer solchen Hybridomzelllinie konstruiert werden, besitzen zunächst die gleiche Spezifität wie der monoklonale Antikörper, der von der Zelllinie sezerniert wird. Diese Spezifität kann dann aber so verändert werden, dass Moleküle mit neuen Bindungseigenschaften entstehen.

Vor der Konstruktion von Antikörperfragmenten stellt sich die Frage, welcher Fragmenttyp gewählt werden soll. Im Arbeitskreis von Prof. Dingermann lagen bereits Erfahrungen mit Fv-Fragmenten, scFv-Fragmenten und Fab-Fragmenten vor. Für dieses Projekt wurde das scFv-Format gewählt. ScFv-Fragmente sind deutlich stabiler als Fv-Fragmente, weil bei letzteren die beiden variablen Domänen VL und VH nicht über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft sind. Gegenüber Fab-Fragmenten besitzen scFv-Fragmente den Vorteil, dass bei der Proteinfaltung nur zwei, anstatt der bei Fab-Fragmenten erforderlichen fünf Disulfidbrücken geknüpft werden müssen. Die Proteinfaltung ist einer der kritischsten Schritte bei der Expression von Antikörperfragmenten. In der Regel ist die funktionelle Faltung von scFv-Fragmenten daher effektiver als die Faltung von Fab-Fragmenten (Plückthun et al., 1996). Abbildung 4.6 zeigt die Struktur eines Fv-Antikörperfragments. Es besteht nur noch aus den antigenbindenden Domänen VL und VH des ursprünglichen Antikörpers. Ein scFv-Fragment besitzt prinzipiell die gleiche 3D-Struktur, wobei hier die variablen Domänen über den Polypeptidlinker miteinander verbunden sind.

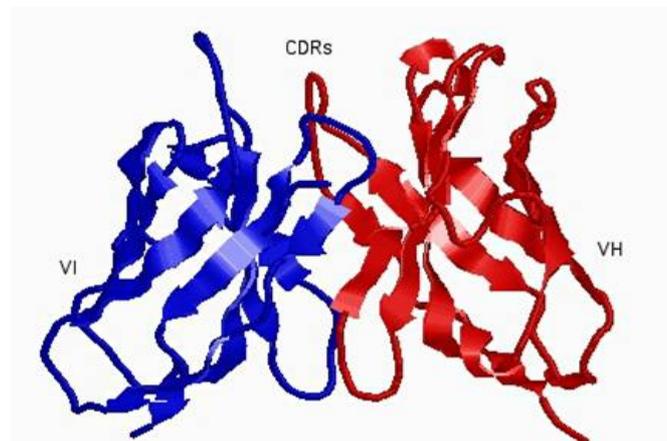


Abb. 4.6 3D-Proteinstruktur eines Anti-His-Fv-Antikörperfragments

Die unterschiedlichen FR-Domänen besitzen β -Faltblattstruktur. Die hypervariablen CDR-Domänen formen die Bindungstasche des Antikörperfragments, über die die Interaktion mit dem Antigen erfolgt. (Quelle: Homepage Prof. S. Dübel, TU Braunschweig; http://rzv054.rz.tu-bs.de/Biotech/BT_deut/Navigation-Home.htm)

4.2.1 Die Konstruktion der scFv-Fragmente

4.2.1.1 Auswahl der Oligonukleotide und der Expressionsplasmide

Bei der Konstruktion von scFv-Antikörperfragmenten müssen zunächst die variablen Domänen von leichter und schwerer Kette (VL und VH) aus der cDNA durch eine PCR amplifiziert werden. Da die DNA-Sequenz dieser Domänen in der Regel nicht bekannt ist, stellt sich zunächst die Frage, welche Oligonukleotide für die Amplifikation eingesetzt werden können. Durch einen Sequenzvergleich zahlreicher bekannter Antikörpersequenzen ist es im Laufe der Zeit gelungen, Konsensussequenzen abzuleiten und daraus degenerierte Oligonukleotidmischungen zu entwerfen, mit Hilfe derer VL und VH amplifiziert werden können (Orlandi et al., 1989, Kettleborough et al., 1993, Ørum et al., 1993, Zhou et al., 1994, Welschhof et al., 1995). Für die Konstruktion und Ligation der hier besprochenen scFv-Fragmente wurde eine von Anke Krebber etablierte Klonierungsstrategie gewählt (Krebber et al., 1997). Sowohl die Oligonukleotidmischungen, als auch die eingesetzten Plasmide der pAK-Vektor-Serie wurden von Krebber et al. für die Konstruktion und Expression von scFv-Fragmenten optimiert. Das System bietet gegenüber zahlreichen anderen Ansätzen eine Reihe von entscheidenden Vorteilen:

- Für die Amplifikation der variablen Antikörperdomänen wurde eine degenerierte Primermischung entworfen, mit deren Hilfe es möglich ist, alle in der Kabat-Datenbank aufgeführten Antikörpersequenzen (VH, V κ und V λ) zu amplifizieren (Kabat et al., 1970, Wu et al., 1970). Diese Oligonukleotidmischung ist weit komplexer als alle zuvor etablierten Mischungen.
- Durch die Primermischungen V_LFOR und V_HBACK wird bereits bei der Amplifikation von VL und VH die Sequenz des Polypeptidlinkers an die Amplimere angehängt, so dass bei der nachfolgenden „Splicing by overlap extension-PCR“ (SOE-PCR) nur zwei, anstelle der sonst üblichen drei DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden müssen. Da die verschiedenen Gly₄Ser-Wiederholungen durch unterschiedliche Codons codiert werden, kommt es bei der Assemblierung von VL und VH nur äußerst selten zu Fehlpaarungen.
- Bei der Länge des Polypeptidlinkers sollte auf die Orientierung von VL und VH geachtet werden (VL-Linker-VH oder VH-Linker-VL). Die Entfernung zwischen dem C-Terminus von VL und dem N-Terminus von VH beträgt nämlich ca. 39 – 42 Å, wohingegen bei einer umgekehrten Orientierung der variablen Domänen die Entfernung zwischen dem C-Terminus von VH und dem N-Terminus von VL nur ca. 32 – 34 Å beträgt (Plückthun et al., 1996). Die meisten Polypeptidlinker bestehen aus 15 Aminosäuren, unabhängig von der Orientierung der variablen Domänen. Der hier verwendete Linker besteht hingegen aus 20 Aminosäuren und trägt damit der größeren Entfernung bei der Orientierung VL-Linker-VH Rechnung. Dadurch wird die Gefahr einer Dimerisierung von scFv-Fragmenten, die bei zu kurz gewählten Polypeptidlinkern auftreten kann, minimiert.

- Für die Klonierung wird *Sfi*I als einziges Restriktionsenzym verwendet. *Sfi*I erkennt ein Palindrom aus acht Nukleotiden mit der Sequenz 5'-GGCCNNNNNGGCC-3'. Bei den mit N bezeichneten Nukleotiden handelt es sich um fünf beliebige Basen, die die eigentliche Erkennungssequenz unterbrechen. Bei den von Krebber etablierten pAK-Plasmiden sind diese Basen so gewählt, dass eine gerichtete Klonierung der scFv-Fragmente mit einem einzigen Restriktionsenzym möglich ist. Außerdem treten *Sfi*I-Sequenzen nur sehr selten auf, so dass die Gefahr einer Schnittstelle innerhalb der Antikörperdomänen sehr gering ist.

4.2.1.2 cDNA-Synthese und Konstruktion der scFv-Fragmente

Der erste Schritt bei der Konstruktion von Antikörperfragmenten ist die Isolierung der RNA aus den Hybridomzellen und die reverse Transkription in cDNA. Dabei können unterschiedliche Strategien verfolgt werden. In der Regel erfolgt die cDNA-Synthese unter Einsatz eines oligo-dT-Primers oder von sogenannten random-hexamer Oligonukleotiden. Es gibt aber auch spezielle Primermischungen, die spezifisch nur mit Antikörper-mRNA-Sequenzen hybridisieren. Diese Oligonukleotide besitzen eine Konsensussequenz, die durch einen Sequenzvergleich mit den in der Kabat-Datenbank aufgelisteten Antikörpersequenzen abgeleitet wurde. Allerdings treten immer wieder Antikörpersequenzen auf, die sich mit diesen Oligonukleotidmischungen nicht revers transkribieren lassen. Um möglichst alle Antikörpersequenzen zu erfassen, muss außerdem unter suboptimalen, nicht stringenten Reaktionsbedingungen gearbeitet werden, wodurch die Gefahr einer Fehlhybridisierung und somit einer Artefaktbildung gefördert wird. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet, bereits bei der cDNA-Synthese auf die Antikörpersequenzen zu selektionieren. Die cDNA-Synthese erfolgte vielmehr mit einem oligo-dT-Primer und dem Superscript™ Reverse Transkriptase Kit der Firma Qiagen.

Ausgehend von der cDNA wurden die variablen Domänen der leichten und schweren Kette mit den von Krebber et al. optimierten Oligonukleotidmischungen amplifiziert und durch die „Splicing by overlap extension-PCR“ zum scFv-Fragment verknüpft. Bei der PCR-Amplifikation von VL und VH fiel auf, dass sich die variable Domäne der schweren Kette in der Regel deutlich schlechter amplifizieren ließ als die variable Domäne der leichten Kette. Die Amplifikation von VH ließ sich zwar durch eine Optimierung der Mg^{2+} -Konzentration verbessern, verlief aber auch unter optimalen Bedingungen schlechter als die Amplifikation der leichten Kette. Es wäre denkbar, dass sich die mRNA der schweren Kette aufgrund ihrer Sekundärstruktur nur schwer revers transkribieren ließ, so dass für die VH-Amplifikation weniger Template zur Verfügung stand als für die VL-Amplifikation. Dennoch ließen sich aus der mRNA bzw. der cDNA aller Hybridomzelllinien erfolgreich scFv-Fragmente konstruieren. Es wurden drei Anti-Oleanolsäure-Antikörperfragmente (6C2-scFv, 7A6-scFv, 10F10-scFv) sowie ein Anti-Retrorsin-Antikörperfragment (2C3C5-scFv) konstruiert. Die Ligation der scFv-Fragmente erfolgte zunächst in den Vektor pAK400, da dieses Plasmid die höchste Expressionsrate hat. Durch ein Pseudogenscreening und ein Expressionsscreening konnten die scFv-Fragmente mit einer vollständigen, funktionellen DNA- bzw. Proteinsequenz identifiziert werden. Das Screening auf nicht-funktionelle V_{κ} -Pseudogensequenzen mit den radioaktiv markierten

Oligonukleotiden V κ Junk1 oder V κ Junk2 zeigte, dass die Pseudogensequenz in den vier Hybridomzelllinien unterschiedlich stark transkribiert wird.

Die DNA- und die Aminosäuresequenz der verschiedenen scFv-Fragmente wurde mit den in der Internet-Datenbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) aufgeführten Antikörpersequenzen verglichen. Alle scFv-Sequenzen zeigten dabei vor allem im Bereich der FR-Domänen eine große Homologie zu den verfügbaren Antikörper-Konsensussequenzen. Vor allem in der FR1-Domäne der VL-Region besaßen alle vier scFv-Fragmente eine ähnliche Aminosäuresequenz – unabhängig davon, ob das entsprechende Protein gegen Oleanolsäure oder gegen Retrorsin gerichtet ist. Der Grund dafür ist, dass ein Großteil der VL-FR1-Domäne durch die bei der Amplifikation von VL eingesetzte Oligonukleotidmischung V κ BACK determiniert wird. Erwartungsgemäß unterschieden sich aber alle vier scFv-Fragmente in den antigenbindenden CDR-Domänen. Selbst die beiden Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente 6C2-scFv und 7A6-scFv, bei denen die korrespondierenden Antikörper an ein ähnliches Epitop am Oleanolsäuremolekül binden, zeigten keine auffälligen Sequenzhomologien im Bereich der hypervariablen Domänen.

4.2.2 Die Expression, die Charakterisierung und das Phagen-Display der scFv-Fragmente

Rekombinante Antikörperfragmente können in unterschiedlichen Zellsystemen heterolog exprimiert werden. Neben der bakteriellen Expression in *E. coli* ist auch eine Expression in Säugerzellen, in Insektenzellen, in Hefe oder in Pflanzen möglich. Einen guten Überblick über die verschiedenen Expressionsmöglichkeiten geben die Übersichtsartikel von Martha Hayden bzw. von Jennifer Maynard (Hayden et al., 1997, Maynard et al., 2000). Die bakterielle Expression ist Mittel der Wahl, sofern eine Glykosylierung der Antikörperfragmente nicht erforderlich ist. *E. coli* ist im Labor einfach zu kultivieren und leicht mit den Expressionsplasmiden zu transformieren. Außerdem ist die Molekularbiologie dieses Bakteriums sehr gut erforscht, so dass die entsprechenden Expressionsvektoren optimal auf den Organismus angepasst werden können.

Bei der bakteriellen Expression von scFv-Fragmenten können unterschiedliche Strategien verfolgt werden, die in Abschnitt 1.5.1 bereits ausführlich diskutiert wurden. Die eleganteste Methode ist sicherlich die periplasmatische Expression. Diese Strategie wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Dabei werden die im Cytoplasma der Zelle translatierten Antikörperfragmente durch eine Signalsequenz (pelB) ins Periplasma transportiert, wo sie durch bakterielle, Disulfidbrücken-bildende Enzyme und Chaperone funktionell gefaltet werden. Im Gegensatz zu einer cytoplasmatischen Expression ist bei dieser Methode daher keine aufwendige in-vitro Renaturierung der Proteine notwendig.

Bei der funktionellen, periplasmatischen Expression kommt es allerdings immer wieder zu Problemen, weil viele Antikörperfragmente zur Bildung von unlöslichen Aggregaten („inclusion bodies“) neigen und daher nicht ins Periplasma transportiert werden, oder weil die heterolog exprimierten Proteine toxisch für die Bakterienzellen sind. Beide Probleme wurden auch bei den im Rahmen dieser Arbeit exprimierten scFv-Antikörperfragmenten beobachtet.

Man hat festgestellt, dass die unterschiedlichsten Faktoren eine Auswirkung auf die Expression der Antikörperfragmente, den Transport der Proteine vom Cytoplasma ins Periplasma und die anschließende funktionelle Faltung haben. Eine wichtige Rolle spielen die Expressionsbedingungen, die für jedes Antikörperfragment individuell optimiert werden müssen.

So ist beispielsweise die Expressionstemperatur ein ganz entscheidender Faktor bei der periplasmatischen Expression von Antikörperfragmenten. ScFv-Fragmente neigen umso stärker zur Aggregation, je höher die Expressionstemperatur ist (Glockshuber et al., 1990). Vor allem Antikörperfragmente, deren Faltung problematisch ist, sollten daher bei niedrigeren Temperaturen (25°C – 28°C) exprimiert werden. Es gibt aber auch zahlreiche Beispiele dafür, dass sich Antikörperfragmente in großen Mengen bei 37°C periplasmatisch exprimieren lassen, ohne dass es zur Aggregation der Proteine kommt (Carter et al., 1992). Neben der Expressionstemperatur spielen auch die Expressionsrate und die Expressionszeit eine wichtige Rolle. Vor allem bei Proteinen, die sehr toxisch sind, die sehr stark zur Aggregation neigen oder bei denen der Periplasmtransport nur mit geringer Effizienz verläuft, ist eine hohe Expressionsrate nicht sinnvoll. In einem solchen Fall sollte die Expression nur schwach induziert werden (Wülfing et al., 1993). Die beiden Anti-Oleanolsäure-Antikörperfragmente 6C2-scFv und 10F10-scFv wurden nach einer moderaten Induktion mit 0,5 mM IPTG bei 30°C exprimiert. Bei höheren Temperaturen war zwar die Gesamtmenge an scFv-Protein höher, es gelangte aber deutlich weniger Protein ins Periplasma.

Auch der verwendete Bakterienstamm hat einen Einfluss auf die Expressionseffizienz. Nicht alle scFv-Fragmente lassen sich in jedem *E.coli*-Stamm gleich gut exprimieren. Vor allem bei der Expression von toxischen scFv-Fragmenten und beim Phagen-Display ist die Wahl des richtigen Expressionsstamms wichtig. Zavala et al. konstruierten zum Beispiel ein scFv-Fragment gegen das in der DNA von Melanomzellen vorliegende Thymidin-(6-4)-thymidin-Dimer. Nach der Ligation der scFv-DNA in den Phagemid-Vektor pCANTAB5E untersuchten die Autoren die Expression der scFv-gpIII-Fusionsproteine in unterschiedlichen Bakterienstämmen. Das entsprechende Protein ließ sich nicht in allen Stämmen mit der gleichen Effizienz exprimieren. In manchen Bakterienstämmen, wie z.B. SURE, XL1 Blue oder DH5 α , war eine problemlose Expression möglich, für andere Bakterien, z.B. für JM109 oder NM522, erwiesen sich die scFv-Fragmente hingegen als hochgradig toxisch (Zavala et al., 2000).

Letztendlich wirken sich sogar das verwendete Kulturmedium auf das Ergebnis der scFv-Expression aus. Oftmals wird die äußere Zellmembran der Bakterienzelle durch die periplasmatische Expression von Antikörperfragmenten geschädigt. Die Membran wird löchrig und das scFv-Fragment diffundiert aus der Zelle. Dieser Prozess kann durch die Wahl des Expressionsmediums positiv beeinflusst werden (Plückthun et al., 1989, Pack et al., 1993), ohne dass man allerdings weiß, welchen Einfluss der Zusatz bestimmter Additive zum Medium tatsächlich hat.

Obwohl man inzwischen weiß, welche Faktoren sich auf die Expression, den Periplasmtransport und die funktionelle Faltung der Antikörperfragmente auswirken, sind die genauen Mechanismen bisher noch weitgehend unverstanden. Daher müssen auch bei jedem neuen Projekt die Expressionsbedingungen für das entsprechende scFv-Fragment neu optimiert werden. Dennoch kommt es immer wieder vor, dass sich Antikörperfragmente überhaupt nicht funktionell exprimieren lassen, sei es, weil sie im Cytoplasma aggregieren und daher nicht ins Periplasma transportiert werden, oder weil sie für die Bakterienzellen so toxisch sind, dass keine zufriedenstellende Proteinmenge produziert werden kann.

Auch bei der Expression der Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente und des Anti-Retrorsin-scFv-Fragments kam es zu solchen Problemen. Nur die beiden Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente 6C2-scFv und 10F10-scFv ließen sich funktionell in *E. coli* exprimieren. Die Expression dieser beiden Proteine erfolgte dabei mit dem Plasmid pAK400 bei einer Temperatur von 30°C. Beide Antikörperfragmente waren für die Bakterienzelle nicht toxisch. Allerdings gelangte nur ca. die Hälfte des exprimierten Proteins in das Periplasma. Der Rest verblieb, wahrscheinlich in Form von *inclusion bodies*, im Cytoplasma der Zelle. Bei der Expression des 10F10-scFv-Fragments konnten bei der SDS-PAGE-Analytik im Periplasma neben einer Hauptbande bei ca. 32 kDa auch mehrere kleinere Banden detektiert werden. Es handelt sich dabei vermutlich um proteolytische Abbauprodukte des Antikörperfragments. Da von den bakteriellen Proteasen bevorzugt unlösliche Proteinaggregate abgebaut werden, kann dies als Hinweis darauf gewertet werden, dass ein Teil der 10F10-scFv-Fragmente im Periplasma als unlösliche *inclusion bodies* vorliegt. Auffällig ist hierbei allerdings, dass im Sphäroblasten deutlich weniger Abbauprodukte detektiert werden konnten, als im Periplasmaextrakt, obwohl sich die meisten Proteasen im Cytoplasma der Bakterienzelle befinden.

Die Funktionalität der beiden erfolgreich periplasmatisch exprimierten Anti-Oleanolsäure-Antikörperfragmente konnte mit Hilfe von Antigen-Bindungsstudien nachgewiesen werden. Für solche Studien stehen unterschiedliche Methoden zur Auswahl. Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen können beispielsweise mit der *Atomic Force Microscopie* (AFM), der *Quartz Crystal Microbalance* (QCM), oder der von der Fa. Biacore entwickelten *Surface Plasmon Resonance Technology* (SPR-Technologie) untersucht werden. Neben diesen apparativ sehr aufwendigen und teuren Methoden können Antigenbindungsstudien auch mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) unter Verwendung von radioaktiv markierten Antigenen, oder durch unterschiedliche ELISA-Techniken durchgeführt werden.

Der Nachweis der Funktionalität des 6C2-scFv-Fragments und des 10F10-scFv-Fragments erfolgte zunächst durch einen indirekten ELISA. Dabei wurden die an die Oleanolsäure gebundenen scFv-Fragmente über ihr C-terminales His-tag mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. Im Rahmen der Untersuchungen konnte eine schwache Antigen-Antikörper-Interaktion nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine spezifische Bindung der scFv-Fragmente an die Oleanolsäure handelt: ein scFv-Fragment, das gegen den Muskarinrezeptorantagonisten Telenzepin konstruiert worden war, zeigte unter den gleichen Versuchsbedingungen keine Interaktion mit der fixierten Oleanolsäure. Außerdem ließen sich die Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente durch den Zusatz von Oleanolsäure kompetieren. Die Funktionalität des 10F10-scFv-Fragments konnte zusätzlich in einem direkten ELISA mit dem Oleanolsäure- β -Galaktosidase-Konjugat bewiesen werden.

Da sich bei den durchgeführten Experimenten nur eine sehr schwache Bindung nachweisen ließ, muss davon ausgegangen werden, dass nur ein geringer Teil der ins Periplasma transportierten Antikörperfragmente funktionell gefaltet wurden. Außerdem enthält der Periplasmaextrakt noch zahlreiche andere Proteine, die einen störenden Einfluss auf die Bindungsexperimente haben könnten.

Ein generelles Problem bei der bakteriellen Expression der Antikörperfragmente und den sich anschließenden Bindungsexperimenten lag darin, dass die Menge der im Periplasmaextrakt enthaltenen scFv-Fragmente starken Schwankungen unterworfen war. Außerdem verloren die scFv-Fragmente im Periplasmaextrakt während der Lagerung sehr schnell ihre Aktivität.

Das 7A6-Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragment (7A6-scFv) und das 2C3C5-Anti-Retrorsin-scFv-Fragment (2C3C5-scFv) ließen sich weder mit Hilfe des Plasmids pAK300, noch mit pAK400 funktionell exprimieren. Die gebildeten Proteine wurden weder bei 30°C, noch bei 25°C ins Periplasma transportiert, sondern aggregierten als unlösliche Einschlusskörper im Cytoplasma der Zellen. Das 2C3C5-scFv-Fragment erwies sich darüber hinaus für die Bakterien als hochgradig toxisch. Bereits unmittelbar nach der Induktion der Proteinexpression setzte eine Lyse der Bakterienzellen ein.

Ein ganz entscheidender Faktor, der sich sowohl auf die Neigung der scFv-Fragmente zur Aggregation, als auch auf den Periplasmtransport auswirkt, ist die Aminosäuresequenz des Proteins. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass Antikörperfragmente, die in-vivo zur Denaturierung und zur Bildung von *inclusion bodies* neigen, auch in-vitro nur sehr schwer renaturiert werden können. Die Aminosäuresequenz eines scFv-Fragments bestimmt darüber hinaus die Toxizität des Proteins für die Bakterienzelle.

Die zugrunde liegenden Gesetzmäßigkeiten sind noch weitgehend unbekannt. Es ist bisher lediglich nachgewiesen worden, dass vor allem solche Proteine nicht effektiv durch die innere Membran der Bakterienzelle transportiert werden, bei denen auf das Leader-Peptid mehrere basische und damit positiv geladene Aminosäuren folgen (Plückthun et al, 1996). Vergleicht man allerdings die Aminosäuresequenz des 7A6-scFv- und des 2C3C5-scFv-Fragments mit der Sequenz des 6C2-scFv- und der des 10F10-scFv-Fragments, so fallen keine Besonderheiten auf. Alle vier scFv-Fragmente besitzen in der VL-FR1-Domäne, die unmittelbar auf das Leader-Peptid folgt, eine fast identische Aminosäuresequenz, da dieser Bereich durch die bei der DNA-Amplifikation eingesetzte Oligonukleotidmischung determiniert wird. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass das 7A6- und das 2C3C5-scFv-Fragment aufgrund der Aminosäuresequenz der anderen Proteindomänen sehr stark zur Aggregation neigen und sich daher nicht funktionell exprimieren lassen. Eine wichtige Rolle könnte dabei zum Beispiel die außergewöhnlich lange VL-CDR1-Domäne des 7A6-scFv-Fragments spielen, die sich eventuell nur schwer falten lässt. Die entsprechende CDR1-Domäne des 2C3C5-scFv-Fragments zeigt allerdings keine Auffälligkeiten.

Der Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Expression und Faltung von Antikörperfragmenten ist unumstritten. Bereits Anfang der sechziger Jahre hat man bei der Untersuchung von humanen Antikörpern festgestellt, dass vor allem die leichte Kette sehr stark zur Aggregation neigt. So handelt es sich beispielsweise bei den so genannten Bence-Jones-Proteinen um unlösliche Dimere der leichten Antikörperkette (Edelman et al., 1962). Bence-Jones-Proteine werden bei der Diagnostik von multiplen Myelomen genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass die CDR3-Domäne der VL-Region bei der Aggregation der leichten Kette eine wichtige Rolle spielt. Bereits der Austausch einzelner Aminosäuren dieser hypervariablen Domäne führte zu einer signifikanten Änderung der Affinität der VL-Domänen zueinander (Stevens et al., 1980).

Inzwischen beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen intensiv mit der Fragestellung, wie sich die Aminosäuresequenz von rekombinanten Antikörperfragmenten auf deren bakterielle Expression und den Periplasmtransport auswirkt, und inwieweit man die Sequenz gezielt verändern kann, um die Proteinfaltung zu optimieren. Führend ist hierbei die Arbeitsgruppe von Professor Andreas Plückthun an der Universität Zürich.

Bei einigen schwer exprimierbaren Antikörperfragmenten ist es tatsächlich gelungen, durch Aminosäuresubstitutionen in den FR-Domänen die Löslichkeit der Proteine stark zu verbessern und ihre Toxizität zu reduzieren. (Duenas et al., 1995, Forsberg et al., 1997). Solche Substitutionen können nach dem Zufallsprinzip erfolgen, man konnte inzwischen aber auch bestimmte Positionen in der Primärsequenz der Antikörperfragmente identifizieren, die bei der Ausbildung der räumlichen Konformation eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

Wall et al. konnten zeigen, dass bei der funktionellen Faltung besonders die VH-Framework-Positionen H40, H60 und H61 von Bedeutung sind (Nummerierung nach Kabat, 1970). Die Autoren ersetzten bei einem schwer exprimierbaren scFv-Fragment die entsprechenden Aminosäuren durch andere Aminosäuren (P40A, S60A, A61D) und konnten dadurch die Expression des Proteins erheblich verbessern (Wall et al., 1999). Eventuell ließe sich die Expression des 7A6-scFv-Fragments und des 2C3C5-scFv-Fragments ebenfalls verbessern, wenn die Aminosäuren an den besagten Positionen gegen Alanin- bzw. Asparaginsäuremoleküle ausgetauscht würden. Allerdings besitzen auch die gut exprimierbaren Anti-Oleanolsäure-scFvs an diesen Stellen nicht die „optimalen“ Aminosäuren.

Andere Autoren erachten die Positionen H6, H7 und H9 als besonders wichtig, da sich in den meisten natürlich vorkommenden Immunglobulinen an diesen Positionen konservierte Aminosäuren befinden (Honegger et al., 2001). Durch den Einsatz von degenerierten Primermischungen bei der DNA-Amplifikation von VH und durch die Verknüpfung von VL und VH über ein Linkerpeptid besitzen scFv-Fragmente aber gerade im N-terminalen Bereich der FR1-Domäne von VH häufig eine artifizielle Aminosäuresequenz. Dies könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, dass sich die 7A6-scFv-Fragmente und die 2C3C5-scFv-Fragmente nicht exprimieren lassen. Allerdings besitzen weder die schlecht, noch die gut exprimierbaren scFv-Fragmente an diesen Positionen die konservierten Aminosäuren.

Zum Teil können bereits minimale Veränderungen der Aminosäuresequenz dramatische Effekte auf die funktionelle Faltung haben. Es gibt Berichte darüber, dass durch den Austausch einer einzigen Aminosäure der Anteil an funktionellen scFv-Fragmenten um den Faktor 25 – 30 gesteigert werden konnte (Nieba et al., 1997, Kipriyanov et al., 1997). Allerdings hatten die gleichen Mutationen auf andere schwer exprimierbare Antikörperfragmente keinerlei positive Effekte. Daher lassen sich auch keine Gesetzmäßigkeiten für eine gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz ableiten. Darüber hinaus haben neben den FR-Domänen auch die CDR-Domänen einen Einfluss auf die Proteinfaltung. Veränderungen im Bereich der CDR-Domänen sind nur bedingt möglich, da sie sich direkt auf die Bindungseigenschaften des Antikörperfragments auswirken.

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit, die Expression von Antikörperfragmenten zu verbessern, wird als *CDR-grafting* bezeichnet. Dabei werden die CDR-Domänen eines schlecht exprimierbaren Antikörperfragments mit den FR-Domänen eines zweiten, problemlos zu exprimierenden Antikörperfragments kombiniert (Jung et al., 1997, Wörn et al., 1999).

Wenn ein scFv-Antikörperfragment den Übergang vom Cytoplasma in das Periplasma geschafft hat, erfolgt die Ausbildung der beiden intramolekularen Disulfidbindungen, die für die richtige Konformation unerlässlich sind. Im reduzierenden Milieu des bakteriellen Cytoplasmas ist dieser Prozess nicht möglich. Im Periplasma befindet sich ein spezielles Enzymsystem (dsbA – dsbD), das die Ausbildung der Disulfidbrücken katalysiert. Hinzu kommen periplasmatische Chaperone (Skp/OmpH/HlpA), die die Faltung unterstützen. Durch die Koexpression bakterieller oder humaner Chaperone ließ sich der Anteil an funktionell gefalteten Antikörperfragmenten signifikant erhöhen (Bothman et al., 1998).

Inzwischen ist es auch gelungen, thermodynamisch stabile scFv-Antikörperfragmente ohne intramolekulare Disulfidbrücken zu generieren. Ausgangspunkt dieses Ansatzes war ein natürlich vorkommender Antikörper, der keine intramolekulare Disulfidbrücke in der VH-Domäne besitzt (Proba et al., 1997). Bei den entsprechenden Antikörperfragmenten wurden die vier konservierten Cysteine (L23/L88 bzw. H22/H92) durch andere Aminosäuren ersetzt. Als besonders erfolgreich hat sich die Substitution durch ein Valin-Alanin-Paar erwiesen. Die resultierenden scFv-Fragmente ließen sich funktionell aus dem Cytoplasma der Bakterienzelle isolieren. (Probe et al., 1998, Wörn et al., 1998). Allerdings führten die gleichen Modifikationen bei anderen Antikörperfragmenten zum völligen Verlust der Funktionalität.

Die hier vorgestellten Methoden zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, die Aminosäuresequenz eines Antikörperfragments gezielt zu verändern, um die Ausbeute an funktionellem Protein bei der bakteriellen Expression zu verbessern. Allerdings handelt es sich bei keiner dieser Methoden um ein „Patentrezept“, das eine erfolgreiche Expression von schlecht exprimierbaren Antikörperfragmenten garantiert. Außerdem ist eine gezielte Aminosäuresubstitution relativ aufwendig. Der einfachste Weg, die Aminosäuresequenz eines Antikörperfragments zu optimieren, besteht daher immer noch darin, zufällige Mutationen in die entsprechende DNA einzubringen und mit Hilfe der von G.P. Smith entwickelten Phagen-Display-Methode (Smith, 1985) auf gut exprimierbare, funktionelle scFv-Fragmente zu selektionieren. Der große Vorteil der Phagen-Display-Technik ist die physische Verknüpfung eines Antikörperfragments und der DNA, die für dieses Fragment codiert. Das scFv-Antikörperfragment wird auf der Oberfläche des filamentösen Phagen exprimiert, während die entsprechende scFv-DNA im Phagen genom integriert ist (Breitling et al., 1997). Die Phagen-Display-Technik ist neben dem sogenannten Ribosomen-Display die Methode der Wahl, um große Antikörperbibliotheken auf Antikörperfragmente einer bestimmten Spezifität zu screenen. Sobald man ein bestimmtes scFv-Fragment über das Phagen-Panning selektioniert hat, besitzt man automatisch auch die dafür codierende DNA.

Bei einer zufälligen Mutagenese von scFv-Fragmenten entsteht eine Antikörperbibliothek, in der durch Panning nach funktionellen Antikörperfragmenten gesucht werden kann. Mit Hilfe des Phagen-Displays ist es also möglich, nach funktionell exprimierbaren Anti-Oleanolsäure- oder Anti-Retrorsin-scFv-Fragmenten mit optimierter Aminosäuresequenz zu suchen. Außerdem können mit dieser Methode Antikörperfragmente mit völlig neuen Bindungseigenschaften gewonnen werden. Ausgehend von den Anti-Oleanolsäure-scFvs könnten neue Antikörperfragmente generiert werden, die sehr spezifisch mit ganz bestimmten Triterpenen interagieren, ohne dabei Kreuzreaktivitäten zu strukturell ähnlichen Substanzen zu zeigen. Solche Antikörperfragmente wären für die Arzneipflanzenanalytik äußerst interessant.

Basierend auf dem Anti-Retrorsin-scFv-Fragment (2C3C5-scFv) könnten modifizierte Proteine konstruiert werden, die beispielsweise die verschiedenen Pyrrolizidin-N-Oxide erkennen können. Bei den wasserlöslichen N-Oxiden handelt es sich um die Speicherform der Pyrrolizidinalkaloide. Antikörper, die mit diesen Metaboliten interagieren, konnten im Arbeitskreis Dingermann durch die konventionelle Hybridomatechnologie bisher nicht etabliert werden, wären aber im Rahmen der Arzneipflanzenanalytik und für Affinitätschromatographische Reinigungsprozesse von sehr großem Nutzen.

Dass es mit Hilfe der Phagen-Display-Technik möglich ist, zwischen funktionellen und nicht-funktionellen Antikörperfragmenten zu unterscheiden, konnte im Rahmen dieser Arbeit für das 10F10-scFv-Fragment gezeigt werden.

Bei der von Hybridomzelllinien ausgehenden Konstruktion von Antikörperfragmenten werden neben den funktionellen Antikörpersequenzen auch Pseudogensequenzen amplifiziert, die für nicht-funktionelle variable Domänen codieren (Köhler et al., 1976, Strohal et al., 1987). Die Pseudogensequenzen stammen aus der Myelomzelllinie, die als Fusionspartner bei der Etablierung der Hybridomzelllinie eingesetzt wurde. Neben diesen Myelom-Sequenzen können noch weitere nicht-funktionsfähige Sequenzen amplifiziert werden, die beispielsweise durch ein fehlerhaftes V(D)J-Rearrangement entstanden sind. Eines der größten Probleme bei der Konstruktion und Expression von Antikörperfragmenten liegt darin, zwischen den funktionellen und den nicht funktionellen Sequenzen zu unterscheiden.

Durch das Phagen-Panning war es allerdings nahezu problemlos möglich, die funktionellen 10F10-scFv-Fragmenten von den nicht funktionellen Fragmenten zu trennen. Bereits nach der zweiten Panning-Runde konnte die V_{κ} -Pseudogensequenz nicht mehr detektiert werden. Die untersuchten Phagemide besaßen alle die funktionelle 10F10-scFv-Sequenz. Die Erkenntnisse, die beim Phagen-Display des 10F10-scFv-Fragments gewonnen wurden, können bei der Suche nach besser exprimierbaren Anti-Oleanolsäure- bzw. Anti-Retrorsin-Antikörperfragmenten, oder bei der Etablierung von scFv-Fragmenten mit neuen Bindungseigenschaften genutzt werden.

4.3 Rearrangement-Analytik des Antikörpergenclusters der κ -leichten Kette

Die Konstruktion von rekombinanten Antikörperfragmenten erfolgt oftmals ausgehend von mRNA, die aus einer Hybridomzelllinie isoliert wurde. Die Hybridomzelllinie sezerniert normalerweise nur Antikörper einer einzigen, klar definierten Spezifität. Daher sollte man eigentlich davon ausgehen können, dass auch die entsprechenden rekombinanten Antikörperfragmente nur eine einzige DNA- bzw. Aminosäuresequenz besitzen können. Trotzdem findet man häufig neben der gesuchten Antikörpersequenz auch unterschiedliche nicht funktionelle Sequenzen. Bei diesen nicht funktionellen Sequenzen handelt es sich – wie bereits besprochen – zum einen um Pseudogensequenzen, die aus den Myelomzellen stammen, die bei der Etablierung der Hybridomzelllinie als Fusionspartner eingesetzt wurden (Köhler et al., 1976, Strohal et al., 1987). Zum anderen werden aber auch nicht-funktionelle Sequenzen amplifiziert, die aus der B-Zelle stammen. So kann es während der B-Zell-Entwicklung beispielsweise zu einer nicht-funktionellen V(D)J-Rekombination kommen. Normalerweise wird in einer B-Zelle nur das erfolgreich umgelagerte Allel transkribiert. Die Transkription des fehlerhaft umgelagerten Allels wird hingegen blockiert. Die Transkriptionskontrolle erfolgt dabei über die DNA-Methylierung. Das erfolgreich rekombinierte Allel ist demethyliert, wohingegen das fehlerhaft umgelagerte, nicht-funktionelle Allel hypermethyliert ist. In Hybridomzelllinien wurde beobachtet, dass sich das Methylierungsmuster der DNA stark verändert. Beide Antikörperallele von leichter und schwerer Kette sind hier demethyliert und werden konstitutiv transkribiert. Durch die Änderung des Methylierungsmusters kann es in Hybridomzellen zu einem nachträglichen Rearrangement des nicht-umgelagerten Allels kommen (Mostoslavsky et al., 1997). Bei normalen B-Lymphozyten wird dies durch einen als „Allelausschluss“ bezeichneten Prozess verhindert.

Eine der größten Schwierigkeiten bei der Konstruktion und Expression von Antikörperfragmenten liegt in der Unterscheidung zwischen den funktionellen und den nicht-funktionellen Proteinen, bzw. ihren DNA-Sequenzen. Besonders die aus der Myelomzelllinie stammende V_{κ} -Pseudogensequenz liegt oftmals in einer sehr großen Kopienzahl vor. Die bei der Amplifikation von VL und VH eingesetzten Oligonukleotidmischungen können nicht zwischen der funktionellen Sequenz und der Pseudogensequenz unterscheiden.

Es wurden inzwischen mehrere Methoden beschrieben, um die V_{κ} -Pseudogensequenz bereits vor der Konstruktion der Antikörperfragmente zu eliminieren. Die dabei eingesetzten Techniken sind aber äußerst aufwendig und oftmals wenig effektiv. Duan und Pommeranz konstruierten beispielsweise ein spezielles Ribozym, das die mRNA-Sequenz des V_{κ} -Pseudogens erkennen und hydrolysieren kann. Vor der RNA-Isolierung wurde die Hybridomzelllinie mit einem Vektor transfiziert, der für das entsprechende Ribozym codiert. Dadurch sollte die Menge an PseudogenmRNA reduziert werden, was aber nur bedingt gelang (Duan et al., 1994). Nicht ganz so kompliziert ist die von Ostermeier und Michel vorgeschlagene Methode. Die Autoren entwarfen ein Oligonukleotid, das mit der V_{κ} -Pseudogen-mRNA hybridisiert. Vor der cDNA-Synthese wurde die Hybridoma-RNA mit dem besagten Oligonukleotid und RNaseH inkubiert. Die RNase hydrolysierte die Pseudogen-RNA/Oligonukleotid-DNA-Hybride (Ostermeier et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach den verschiedenen PCR-, Ligations- und Transformationsschritten die Bakterienklone, die die V_{κ} -Pseudogenesequenz beinhalten, mit Hilfe eines radioaktiv markierten Oligonukleotids identifiziert. Es wäre allerdings wünschenswert, bereits bei der Konstruktion der Antikörperfragmente ausschließlich die funktionelle VL- bzw. VH-Sequenz zu amplifizieren. Da diese Sequenz aber in der Regel nicht bekannt ist, können keine spezifischen Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation konstruiert werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Rearrangement-Analytik des κ -Genclusters entwickelt werden. Mit Hilfe dieser Methode sollte das funktionelle, rearrangierte V_{κ} -Gensegment ermittelt und sequenziert werden. Wenn die Sequenz des entsprechenden Gens bekannt wäre, wäre das Design von spezifischen Oligonukleotiden für die scFv-Konstruktion möglich.

Die Rearrangement-Analytik wurde exemplarisch an der genomischen DNA der Zelllinie 10F10 durchgeführt. Im Rahmen der Methodenetablierung mussten unterschiedliche, direkt aufeinander folgende Abläufe optimiert werden. Ein sehr kritischer Punkt war die Qualität der genomischen DNA. Oftmals befand sich ein Teil der Hybridomzellen in Apoptose, so dass die daraus isolierte gDNA bereits deutlich degradiert war. Hybridomzellen neigen vermehrt zur Apoptose, weil es sich um hochgradig artifizielle, polyploide Zellen handelt (Al-Rubeai et al., 1998, Simpson et al., 1998). Da es bei der Rearrangement-Analytik äußerst wichtig ist, dass die gDNA möglichst intakt vorliegt, war z.T. eine mehrmalige Reinigung der Hybridomzellen über einen Ficoll-Gradienten notwendig. Dadurch wurden tote und apoptotische Zellen abgetrennt.

Auch die weiteren Schritte – die *Hind* III-Restriktionshydrolyse, die Religation der hydrolysierten DNA, die inverse Long-Range-PCR und die inverse Hemi-Nested-PCR – mussten optimiert werden. Vor allem die Etablierung der Long-Range-PCR mit Hilfe des Expand 20 kb^{Plus}PCR-Systems der Fa. Roche Diagnostics erwies sich als äußerst schwierig, da sich die Ergebnisse einer bestimmten PCR-Amplifikation nur bedingt reproduzieren ließen.

Die Hemi-Nested-PCR zeigte letztendlich, dass in den Hybridomzellen der Zelllinie 10F10 das Rearrangement des gesuchten V_{κ} -Gensegments mit dem $J_{\kappa 4}$ -Gensegment stattgefunden hat. Ausgehend vom $J_{\kappa 4}$ -Segment sollte nun die Sequenz der V_{κ} -Domäne ermittelt werden. Anhand dieser Sequenz sollten anschließend spezifische Oligonukleotide für die Konstruktion eines 10F10-scFv-Fragments entworfen werden. Dies war allerdings nicht möglich, da die V_{κ} -Sequenz in den sequenzierten PCR-Amplimeren nicht vollständig enthalten war. Die analysierten Sequenzen wiesen vielmehr einen Bruch zwischen dem $J_{\kappa 4}$ -Segment und dem V_{κ} -Gensegment auf. Obwohl die Rearrangement-Analytik des V_{κ} -Genclusters der Zelllinie 10F10 mehrmals von Anfang an durchgeführt wurde, konnte die gesuchte V_{κ} -Sequenz nicht ermittelt werden. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

Es wäre möglich, dass die aus den Hybridomzellen isolierte DNA bereits teilweise degradiert war. Auf das Problem der apoptotischen Zellen wurde bereits hingewiesen. Obwohl die Hybridomzellen vor der Isolierung jeweils über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt wurden, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein Teil der isolierten gDNA zuvor durch DNasen hydrolysiert worden war.

Außerdem könnte es während der DNA-Isolierung durch Scherkräfte zu einem Chromosomenbruch gekommen sein, durch den der κ -Gencluster zerstört wurde. Auch eine teilweise Degradierung der DNA während der Lagerung wäre denkbar. Darüber hinaus wäre es möglich, dass sich eine *Hind* III-Schnittstelle innerhalb der gesuchten V_{κ} -Gensequenz befunden hat, so dass die entsprechende Sequenz während der Restriktionshydrolyse zerstört wurde. Letztendlich wäre es aber auch möglich, dass nicht der funktionell umgelagerte κ -Gencluster analysiert wurde, sondern ein im Rahmen der B-Zellentwicklung fehlerhaft umgelagertes Allel.

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Experimente zeigten jedoch, dass mithilfe der Rearrangement-Analytik die Sequenzierung eines unbekanntes V_{κ} -Gens und die Konstruktion von spezifischen Oligonukleotiden prinzipiell möglich sein sollte. Die Weiterführung eines solchen Projektes scheint daher lohnenswert. Sicherlich müssten dabei die unterschiedlichen Einzelschritte noch weiter optimiert werden. Optimierungsbedarf besteht beispielsweise bei der inversen Long-Range-PCR, die im Rahmen dieser Arbeit mit dem Expand 20 kb^{Plus}PCR-Systems der Fa. Roche Diagnostics durchgeführt wurde. Bei dieser Methode kam es wiederholt zu Problemen, so dass eventuell über einen Wechsel des PCR-Systems nachgedacht werden sollte. Ein vergleichbarer PCR-Kit der Fa. Qiagen erwies sich bei einer ähnlichen Fragestellung dem Expand-PCR-System als überlegen (persönliche Mitteilung von Claus Maier, AK Prof. Marschalek, Universität Frankfurt).

Ein prinzipielles Problem bei der Rearrangement-Analytik, so wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, lag darin, dass der Reaktionsverlauf nur sehr schwer kontrolliert werden konnte. Mit der DNA-Isolierung, der *Hind* III-Hydrolyse, der Religation und den beiden PCR-Amplifikationen folgten fünf relativ komplexe und fehleranfällige Arbeitsschritte direkt aufeinander. Es wäre daher wichtig, „In-Prozess-Kontrollen“ einzuführen, mit deren Hilfe möglichst nach jedem Schritt eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Reaktion erfolgreich war. Man könnte z.B. durch eine zwischengeschaltete PCR-Analyse kontrollieren, ob die *Hind* III-Hydrolyse und die anschließende Religation erfolgreich waren. Man bräuchte dafür lediglich ein „Referenzgen“, in dem sich zwei bekannte *Hind* III-Schnittstellen befinden. Auf beiden Seiten dieser Schnittstellen müssten Oligonukleotide, so wie in Abbildung 4.7 dargestellt, positioniert werden. Bei der Kontroll-PCR müssen vier Reaktionsansätze mit den in der Abbildung angegebenen Primer-Kombinationen eingesetzt werden. Je nachdem ob, und wenn ja, mit welcher Primer-Kombination eine Amplifikation erfolgt, kann man eine Aussage darüber treffen, ob *Hind* III-Hydrolyse und Religation erfolgreich waren. Wenn dies für das Kontrollgen der Fall ist, so ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch der V_{κ} -Gencluster ordnungsgemäß hydrolysiert und religiert wurde. Abbildung 4.7 stellt den Ablauf einer solchen „In-Prozess-Kontrolle“ nochmals schematisch dar.

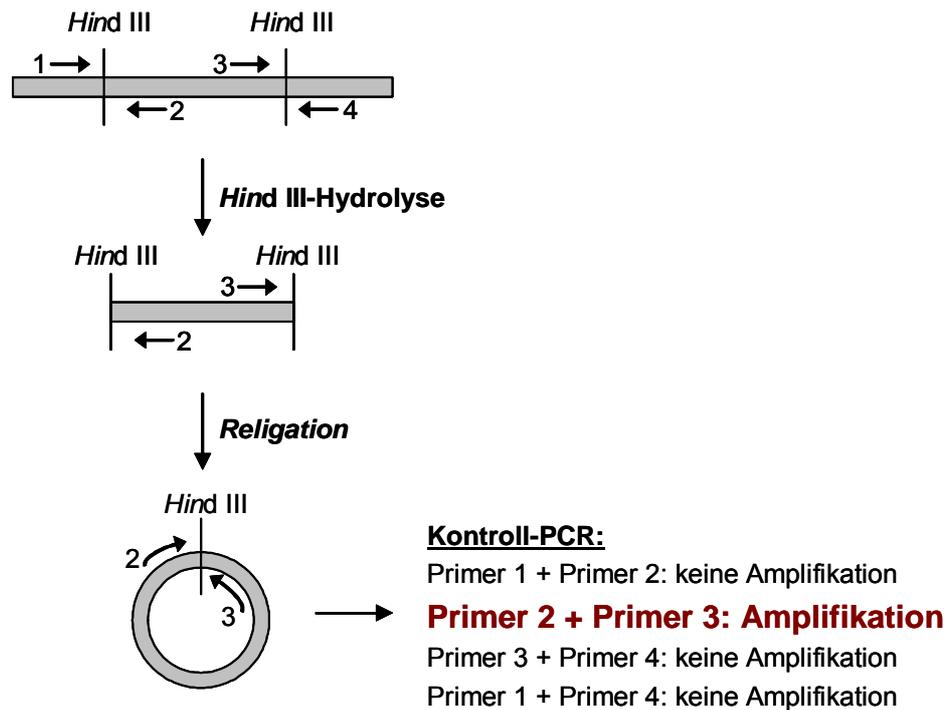


Abb 4.7 Vorschlag für eine „In-Prozess-Kontrolle“ bei der Rearrangement-Analytik des V_{κ} - Genclusters

Die Abbildung zeigt ein Kontrollgen mit zwei bekannten *Hind* III-Schnittstellen. Auf der 5'- und der 3'-Seite der beiden Schnittstellen können im linearen, nicht-hydrolysierten Zustand spezifische Oligonukleotide hybridisieren. Nach der *Hind* III-Hydrolyse und der Religation wird eine Kontroll-PCR durchgeführt, wobei die Oligonukleotide nach dem obigen Schema kombiniert werden. Bei einer erfolgreichen Versuchsdurchführung erfolgt ausschließlich mit der Kombination aus Primer 2 und Primer 3 eine Amplifikation. Wenn mit den anderen Primerkombinationen eine Amplifikation erfolgt, so deutet dies darauf hin, dass die gDNA nicht vollständig hydrolysiert wurde. Erfolgt überhaupt keine Amplifikation, dann war die Religation der hydrolysierten DNA nicht erfolgreich.

5 Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper sind seit vielen Jahren aus den biochemischen und molekularbiologischen Laboratorien nicht mehr wegzudenken. Sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der angewandten medizinischen Diagnostik und der Therapie spielen sie eine immer wichtigere Rolle. Dennoch konnten sich monoklonale Antikörper als Hilfsmittel im Bereich der Naturstoffanalytik bisher noch nicht durchsetzen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand daher die Frage, inwieweit sich monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente für die Analytik komplexer Naturstoffgemische eignen.

Eine der Zielstrukturen, gegen die monoklonale Antikörper generiert werden sollten, ist das pentazyklische Triterpen Oleanolsäure. Oleanolsäure ist als Aglykon in zahlreichen verschiedenen Triterpensaponinen enthalten. Triterpensaponine bzw. Triterpensaponin-haltige Arzneipflanzen spielen aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums in der Phytotherapie eine wichtige Rolle. Sie zeichnen sich nachweislich durch venentonisierende, antiödematöse, antiphlogistische, diuretische, expektorierende und broncholytische Eigenschaften aus. Da es sich bei den Triterpensaponinen um eine sehr heterogene Stoffgruppe handelt, ist ihre Analytik sehr aufwendig. Monoklonale Antikörper könnten daher bei der Analytik von komplexen Saponingemischen sehr nützlich sein.

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kerstin Brand aus dem Arbeitskreis von PD Dr. Werner Knöss (Universität Bonn) konnten verschiedene monoklonale Antikörper gegen Oleanolsäure etabliert werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Bindungseigenschaften dieser Antikörper eingehend charakterisiert. In kompetitiven ELISAs konnten die Molekülepitope, an die die verschiedenen Antikörper binden, bestimmt werden. Außerdem wurden die Immunglobuline auf Kreuzreaktivitäten gegenüber 72 unterschiedlichen sekundären Arzneipflanzenmetaboliten untersucht. Die monoklonalen Antikörper zeigten dabei keine Interaktion mit Steroiden, Phytosterolen und Herzglykosiden – Substanzen die zwar in die Gruppe der Triterpene eingeordnet werden können, sich aber in ihrer Struktur und Stereochemie deutlich von der Oleanolsäure unterscheiden.

Gegenüber zahlreichen pentazyklischen Triterpenen, die strukturelle Ähnlichkeiten mit der Oleanolsäure besitzen, zeigten hingegen alle untersuchten Immunglobuline eine ausgeprägte Kreuzreaktivität. Daher eignen sie sich für die Analytik von komplex zusammengesetzten Triterpengemischen, z.B. von Arzneipflanzenextrakten. Dies konnte durch verschiedene direkte und indirekte Wettbewerbsversuche mit unterschiedlichen Arzneipflanzenextrakten im Rahmen dieser Arbeit und der Dissertation von Frau Dr. Kerstin Brand gezeigt werden. Mit Hilfe eines kompetitiven ELISAs ist z.B. ein Screening von unbekanntem Arzneipflanzen auf Triterpensaponine möglich. Auch eine Wertbestimmung von Arzneipflanzen oder Arzneipflanzenextrakten mit Hilfe der monoklonalen Antikörper ist denkbar, sofern eine Referenz zur Verfügung steht, auf den die Wettbewerbsergebnisse bezogen werden können.

Der Einsatz der hier vorgestellten Antikörper wird allerdings dadurch eingeschränkt, dass die Immunglobuline eine unvorhersehbare Polyspezifität gegenüber den polyphenolischen Sekundärmetaboliten Quercetin und Ellagsäure zeigten. Bei einem Einsatz der Antikörper im Rahmen der Naturstoffanalytik sind daher Vorversuche erforderlich, um diese Substanzen zu identifizieren und wenn möglich zu entfernen.

Einer der untersuchten monoklonalen Antikörper, der Antikörper der Zelllinie 10F10, zeigte eine Kreuzreaktivität gegenüber verschiedenen β -Boswelliasäuren. Boswelliasäuren sind in der Lage, das Enzym 5-Lipoxygenase zu hemmen und dadurch die Synthese von entzündungsfördernden Leukotrienen zu inhibieren. Daher scheinen Boswelliasäuren viel versprechende Arzneistoffe bei der Therapie der unterschiedlichsten inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Asthma bronchiale oder rheumatoider Arthritis zu sein. Der Antikörper der Zelllinie 10F10 soll im Arbeitskreis von Prof. Dieter Steinhilber am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt unter anderem für eine Immobilisierung der Boswelliasäuren an Immunaффinitätssäulen eingesetzt werden. In diesem Arbeitskreis wird der Einfluss von β -Boswelliasäuren auf die 5-Lipoxygenase intensiv erforscht.

In einem zweiten Projekt wurden rekombinante scFv-Antikörperfragmente gegen das Triterpen Oleanolsäure und gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin generiert. Pyrrolizidinalkaloide sind hepatotoxische Sekundärmetabolite, die in zahlreichen Nutzpflanzen und traditionellen Arzneipflanzen enthalten sind. Insgesamt wurden vier verschiedene scFv-Fragmente konstruiert. Zwei Anti-Oleanolsäure-Antikörperfragmente konnten in *E. coli* erfolgreich periplasmatisch exprimiert und ihre Funktionalität in verschiedenen Antigenbindungsstudien nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde eine Phagen-Display- und Phagen-Panning-Methode etabliert, mit deren Hilfe es möglich ist, gezielt nach funktionellen Antikörperfragmenten zu suchen. Mit dieser Methode sollte es möglich sein, nach erfolgter Mutation der verschiedenen scFv-Fragmente, Proteine mit neuen Bindungseigenschaften zu identifizieren. Interessant wären dabei z.B. scFv-Fragmente, die mit Pyrrolizidin-N-oxiden interagieren. Gegen diese Substanzen konnten im Arbeitskreis Dingermann mit Hilfe der konventionellen Hybridoma-Technologie bisher noch keine monoklonalen Antikörper generiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei monoklonalen Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten um interessante Hilfsstoffe für die Naturstoffanalytik handelt, deren Bedeutung für dieses Anwendungsgebiet aber bisher noch deutlich unterbewertet ist.

Es wäre daher sehr interessant, die hier vorgestellten Projekte fortzuführen und die Arbeitsmethoden weiter zu optimieren. Mit den im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Anti-Oleanolsäure-Antikörpern stehen bereits drei Immunglobuline für die Arzneipflanzenanalytik zur Verfügung. Von allen drei Antikörpern liegen inzwischen auch scFv-Fragmente vor. Diese Fragmente könnten modifiziert und mit Hilfe der hier vorgestellten Phagen-Display-Methode nach Proteinen mit modifizierten Bindungseigenschaften gesucht werden. Letztendlich wäre auf diese Weise die Generierung eines großen Sortiments von Antikörpern und Antikörperfragmenten für die Analytik der unterschiedlichsten Substanzklassen möglich.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Al-Rubeai, M., Singh, R. P.** (1998). "Apoptosis in cell culture". Curr. Opin. Biotechnol. **9**: 152-156
- Ammon, H. T. P.** (1997). „Boswelliasäuren“. Dtsch. Apoth. Ztg. **137**: 139-140
- Bader, G.** (1994). „Pharmakologische und biopharmazeutische Bewertung von Triterpensaponinen“. Pharmazie **49**: 391-400
- Bassing, C. H., Swat, W., Alt, F. W.** (2002). "The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination". Cell **109** (Suppl): S45-S55
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., Horwitz, A. H.** (1988). "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment". Science **240**: 1041-1043
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., Whitlow, M.** (1988). "Single-chain antigen-binding proteins". Science **242**: 423-426
- Borrebaeck, C. A., Carlsson, R.** (2001). "Human therapeutic antibodies". Curr. Opin. Pharmacol. **1**: 404-408
- Bothmann, H., Plückthun, A.** (1998). "Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression". Nat. Biotechnol. **16**: 376-380
- Boulianne, G. L., Hozumi, N., Shulman, M. J.** (1984). "Production of functional chimaeric mouse/human antibody". Nature **312**: 643-646
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal. Biochem. **72**: 248-254
- Brand, K.** (2002). „Entwicklung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von Furanolabdanditerpenen und Triterpenen vom Oleanol-Typ“. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Institut für Pharmazeutische Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn
- Brand, K., Zündorf, I., Dingermann, T., Knöss, W.** (2001). "Monoclonal antibodies: tools in isoprenoid research". Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. **334 S2**: 30
- Breitling, F., Dübel, S.** (1997). „Rekombinante Antikörper“. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin
- Cabilly, S., Riggs, A. D.** (1985). "Immunoglobulin transcripts and molecular history of a hybridoma that produces antibody to carcinoembryonic antigen". Gene **40**: 157-161
- Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M. D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C. E., Carver, M. E. et al.,** (1992) "High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment". Biotechnology **10**: 163-167
- Chappey, O. N., Sandouk, P., Scherrmann, J. M.** (1992). "Monoclonal antibodies in hapten immunoassays". Pharm. Res. **9**: 1375-1379
- Collet, J. F., Bardwell, J. C.** (2002a). "Oxidative protein folding in bacteria". Mol. Microbiol. **44**: 1-8

- Collet, J. F., Riemer, J., Bader, M. W., Bardwell, J. C.** (2002b). "Reconstitution of a disulfide isomerization system". *J. Biol. Chem.* **277**: 26886-26892
- De Bellis, D., Schwartz, I.** (1990). "Regulated expression of foreign genes fused to lac: control by glucose levels in growth medium". *Nucleic Acids Res.* **18**: 1311
- Dewick, P. M.** (2001). "Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach". John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England
- Dingermann, T.** (1999). "Gentechnik, Biotechnik". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Dingermann, T., Hänsel, R., Zündorf, I.** (2002). "Pharmazeutische Biologie – Molekulare Grundlagen und klinische Anwendung". Springer Verlag, Berlin
- Dingermann, T., Löw, D.** (2003). "Phytopharmakologie – Experimentelle und klinische Pharmakologie pflanzlicher Arzneimittel". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Dingermann, T., Morck, H.** (2000). "Monoklonale Antikörper – Gezielte Therapie mit Hightech-Arzneimittel". *Pharm. Ztg.* **145**: 4187-4190
- Duan, L., Pomerantz, R. J.** (1994). "Elimination of endogenous aberrant kappa chain transcripts from sp2/0-derived hybridoma cells by specific ribozyme cleavage: utility in genetic therapy of HIV-1 infections". *Nucleic Acids Res.* **22**: 5433-5438
- Duenas, M., Ayala, M., Vazquez, J., Ohlin, M., Soderlind, E., Borrebaeck, C. A., Gavilondo, J. V.** (1995). "A point mutation in a murine immunoglobulin V-region strongly influences the antibody yield in *Escherichia coli*". *Gene* **158**: 61-66
- Edelman, G. M., Gally, J. A.** (1962). "The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins". *J. Exp. Med.* **116**: 207-227
- Edmond Rouan, S. K., Otterness, I. G., Cunningham, A. C., Rhodes, C. T.** (1989). "Specific, high affinity colchicine binding monoclonal antibodies: development and characterization of the antibodies". *Hybridoma* **8**: 435-448
- Ehrlich, P.** (1904). "Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung". Hirschwald Verlag, Berlin
- Enzan, E., Mamas, C., Rougeot, C., Ray, D.** (1987). "Strategies for developing specific and sensitive hapten radioimmunoassays". In: "Handbook of Experimental Pharmacology". Springer Verlag, – Heidelberg – New York
- Erlanger, B. F.** (1973). "Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies". *Pharmacol. Rev.* **25**: 271-280
- Erlanger, B. F.** (1980). "The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey". *Methods Enzymol.* **70**: 85-104
- Erpel, T., König, B., Schäfer, M. A.** (2002). "Therapeutische Antikörper – Der Start einer neuen Ära". *McKinsey Health* **2**: 54-65
- Ey, P. L., Prowse, S. J., Jenkin, C. R.** (1978). "Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose". *Immunochemistry* **15**: 429-436
- Forsberg, G., Forsgren, M., Jaki, M., Norin, M., Sterky, C., Enhorning, A., Larsson, K., Ericsson, M., Bjork, P.** (1997). "Identification of framework residues in a secreted recombinant antibody fragment that control production level and localization in *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.* **272**: 12430-12436
- Forsgren, A., Sjoquist, J.** (1966). "'Protein A' from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin". *J. Immunol.* **97**: 822-827

- Fukuda, N., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (1999). "Western blotting for ginseng saponins, ginsenosides using anti-ginsenoside Rb1 monoclonal antibody". Biol. Pharm. Bull. **22**: 219-220
- Fukuda, N., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2000a). "Applications of ELISA, western blotting and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in crude drugs of Panax species and traditional Chinese herbal medicines". Analyst **125**: 1425-1429
- Fukuda, N., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2000a). "Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography". J. Nat. Prod. **63**: 283-385
- Fukuda, N., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2001). "Double staining of ginsenosides by Western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies". Biol. Pharm. Bull. **24**: 1157-1160
- Gaur, P. K., Lau, H. P., Pestka, J. J., Chu, F. S.** (1981). "Production and characterization of aflatoxin B2a antiserum". Appl. Environ. Microbiol. **41**: 478-482
- Ge, L., Knappik, A., Pack, P., Freund, C., Plückthun, A.** (1995). "Expressing Antibodies in *Escherichia coli*".
In: **Borrebaeck, C. A.** "Antibody Engineering". Oxford University Press Inc., New York
- Glaser, J. A., Bradbury, W. M., Venn, R. F.** (1983). "Properties of murine anti-morphine antibodies". Mol. Immunol. **20**: 1419-1422
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., Plückthun, A.** (1990). "A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments". Biochemistry **29**: 1362-1367
- Goldstein, D. J., Humphrey, R. L., Poljak, R. J.** (1968). "Human Fc fragment: crystallographic evidence for two equivalent subunits". J. Mol. Biol. **35**: 247-249
- Got, P. A., Scherrmann, J. M.** (1997). "Stereoselectivity of antibodies for the bioanalysis of chiral drugs". Pharm. Res. **14**: 1516-1523
- Graves, S. W.** (1986). "Endogenous digitalis-like factors". Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **23**: 177-200
- Grothaus, P. G., Bignami, G. S., O'Malley, S., Harada, K. E., Byrnes, J. B., Waller, D. F., Raybould, T. J., McGuire, M. T., Alvarado, B.** (1995). "Taxane-specific monoclonal antibodies: measurement of taxol, baccatin III, and "total taxanes" in *Taxus brevifolia* extracts by enzyme immunoassay". J. Nat. Prod. **58**: 1003-1014
- Guo, Y., Vanhaelen-Fastre, R., Diallo, B., Vanhaelen, M., Jaziri, M., Homes, J., Ottinger, R.** (1995). "Immunoenzymatic methods applied to the search for bioactive taxoids from *Taxus baccata*". J. Nat. Prod. **58**: 1015-1023
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". J. Mol. Biol. **166**: 557-580
- Hänsel, R., Sticher, O., Steinegger, E.** (1999). „Pharmakognosie – Phytopharmazie“. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York
- Harlow, E., Lane, D.** (1988). "Antibodies – A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., Day, J., Greenwood, A., McPherson, A.** (1992). "The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma". Nature **360**: 369-372
- Hayden, M. S., Gilliland, L. K., Ledbetter, J. A.** (1997). "Antibody engineering". Curr. Opin. Immunol. **9**: 201-212

- Holtzapple, C. K., Carlin, R. J., Rose, B. G., Kubena, L. F., Stanker, L. H.** (1996). "Characterization of monoclonal antibodies to aflatoxin M1 and molecular modeling studies of related aflatoxins". Mol. Immunol. **33**: 11-12
- Honegger, A., Plückthun, A.** (2001). "The influence of the buried glutamine residue in position 6 on the structure of immunoglobulin variable domains". J. Mol. Biol. **309**: 687-699
- Huston, J. S., George, A. J., Tai, M-S., McCartney, J. E., Jin, D., Segal, D. M., Keck, P., Oppermann, H.** (1995). "Single-Chain Fv Design and Production by Preparative Folding". In: **Borrebaeck, C. A.** "Antibody Engineering". Oxford University Press Inc., New York
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Bruccoleri, R. E., Haber, E., Crea, R. et al.,** (1986). "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 5879-5883
- James, L. C., Tawfik, D. S.** (2003). "The specificity of cross-reactivity: promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness" Protein Sci. **12**: 2183-2193
- Janeway, C. A., Travers P., Walport, M., Shlomchik, M.** (2002). "Immunologie". Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., Winter, G.** (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse". Nature **321**: 522-525
- Jortani, S. A., Valdes, R., Jr.** (1997). "Digoxin and its related endogenous factors". Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **34**: 225-274
- Jung, S., Plückthun, A.** (1997). "Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting". Protein Eng. **10**: 959-966
- Kabat, E. A.** (1970). "Heterogeneity and structure of antibody-combining sites". Ann. N.Y. Acad. Sci. **169**: 43-54
- Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J.** (2003). "Protein disulfide bond formation in prokaryotes". Annu. Rev. Biochem. **72**: 111-35
- Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J.** (2003). "Protein disulfide bond formation in prokaryotes". Annu. Rev. Biochem. **72**: 111-135
- Karpas, A., Dremucueva, A., Czepulkowski, B. H.** (2001). "A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 1799-1804
- Kelly, K. L.** (1990). "Ranitidine cross-reactivity in the EMIT[®] d.a.u.[™] monoclonal amphetamine/methamphetamine assay". Clin. Chem. **36**: 1391-1392
- Kettleborough, C. A., Saldanha, J., Ansell, K. H., Bendig, M. M.** (1993). "Optimization of primers for cloning libraries of mouse immunoglobulin genes using the polymerase chain reaction". Eur. J. Immunol. **23**: 206-211
- Kim, J. S., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2004). "Immunoquantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines". Analyst **129**: 87-91
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Martin, A. C., Kupriyanova, O. A., Little, M.** (1997). "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity". Protein Eng. **10**: 445-453
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Höss, A., Wolle, J., Plückthun, A., Virnekas, B.** (2000). "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides". J. Mol. Biol. **296**: 57-86

- Knappik, A., Plückthun, A.** (1995). "Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding". Protein Eng. **8**: 81-89
- Knox, J. P., Galfre, G.** (1986). "Use of monoclonal antibodies to separate the enantiomers of abscisic acid". Anal. Biochem. **155**: 92-94
- Kohl, T.** (2002). „Klonierung und Expression von Antikörperfragmenten gegen Prostaglandin E₂“. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Köhler, G., Howe, S. C., Milstein, C.** (1976). "Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines". Eur. J. Immunol. **6**: 292-295
- Köhler, G., Milstein, C.** (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". Nature **256**: 495-497
- Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H. R., Plückthun, A.** (1997). "Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system". J. Immunol. Methods **201**: 35-55
- Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H.** (1996). "A review of the biological and pharmaceutical activities of saponins". Phytomedicine **2**: 363-386
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature **227**: 680-685
- Lechat, P., Mudgett-Hunter, M., Margolies, M. N., Haber, E., Smith, T. W.** (1984). "Reversal of lethal digoxin toxicity in guinea pigs using monoclonal antibodies and Fab fragments". J. Pharmacol. Exp. Ther. **229**: 210-213
- Lee, S. T., Schoch, T. K., Stegelmeier, B. L., Gardner, D. R., Than, K. A., Molyneux, R. J.** (2001). "Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the hepatotoxic alkaloids riddelliine and riddelliine N-oxide". J. Agric. Food Chem. **49**: 4144-51
- Lewin, B.** (2000). „Genes VII“. Oxford University Press Inc., New York
- Liddell, J. R.** (2002). "Pyrrolizidine alkaloids". Nat. Prod. Rep. **17**: 455-462
- Lindner, H. R., Perel, E., Friedlander, A., Zeitlin, A.** (1972). "Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the steroid hapten to the peptide carrier". Steroids **19**: 357-375
- Lo, K. M., Roy, A., Foley, S. F., Coll, J. T., Gillies, S. D.** (1992). "Expression and secretion of an assembled tetrameric CH2-deleted antibody in E. coli". Hum. Antibodies Hybridomas **3**: 123-128
- Losekamm, A.** (1997). „Herstellung und Klonierung monoklonaler Antikörper gegen Liganden von Muscarin- und Prostaglandinrezeptoren“. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Lu, Z., Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2003). "A quantitative ELISA using monoclonal antibody to survey paeoniflorin and albiflorin in crude drugs and traditional Chinese herbal medicines". Biol. Pharm. Bull. **26**: 862-866
- Maynard, J., Georgiou, G.** (2000). "Antibody engineering". Annu. Rev. Biomed. Eng. **2**: 339-367
- Maytas, G.R., Wassef, N.M., Rao, M., Alving, C.R.** (2000). "Induction and detection of antibodies to squalene". J. Immunol. Methods **245**: 1-14
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., Chiswell, D. J.** (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains". Nature **348**: 552-554

- Morinaga, O., Nakajima, S., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2001). "Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA". Analyst **126**: 1372-1376
- Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2000). "Production of monoclonal antibody against a major purgative componen, sennoside A, its characterization and ELISA". Analyst **125**: 1109-1113
- Mostoslavsky, R., Bergman, Y.** (1997). "DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system". Biochim. Biophys. Acta **1333**: F29-F50
- Mould, G. P., Aherne, G. W., Morris, B. A., Taele, J. D., Marks, V.** (1977). "Radioimmunoassay of drugs and its clinical application". Eur. J. Metab. Pharmacol. **2**: 171-176
- Mould, G. P., Stout, G., Aherne, G. W., Marks, V.** (1978). "Radioimmunoassay of amitriptyline and nortriptyline in body fluids". Ann. Clin. Biochem. **15**: 221-225
- Moyle, W. R., Lin, C., Corson, R. L., Ehrlich, P. H.** (1983). "Quantitative explanation for increased affinity shown by mixtures of monoclonal antibodies: importance of a circular complex". Mol. Immunol. **20**: 439-452
- Nah, J. J., Song, J. Y., Choi, S., Kim, S. C., Rhim, H. W., Oh, T. H., Lee, S. M., Nah, S. Y.** (2000). "Preparation of monoclonal antibody against ginsenoside Rf and its enzyme immunoassay". Biol. Pharm. Bull. **23**: 523-526
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.** (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250". Electrophoresis **9**: 255-262
- Nicholls, P. J., Johnson, V. G., Blanford, M. D., Andrew, S. M.** (1993). "An improved method for generating single-chain antibodies from hybridomas". J. Immunol. Methods **165**: 81-91
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., Plückthun, A.** (1997). "Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment". Protein Eng. **10**: 435-444
- Nossal, G. J.** (2003). "The double helix and immunology". Nature **421**: 440-444
- Orlandi, R., Gussow, D. H., Jones, P. T., Winter, G.** (1989). "Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 3833-3837
- Ørum, H., Andersen, P. S., Oster, A., Johansen, L. K., Riise, E., Bjornvad, M., Svendsen, I., Engberg, J.** (1993). "Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage". Nucleic Acids Res. **21**: 4491-4498
- Ostermeier, C., Michel, H.** (1996). "Improved cloning of antibody variable regions from hybridomas by an antisense-directed RNase H digestion of the P3-X63-Ag8.653 derived pseudogene mRNA". Nucleic Acids Res. **24**: 1979-1980
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knupfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D., Plückthun, A.** (1993). "Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*". Biotechnology **11**: 1271-1277
- Papavasiliou, F. N., Schatz, D. G.** (2002). "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity". Cell, **109** (Suppl): S35-S44
- Pindur, G., Pindur, U.** (1991). „Klinische Chemie und serologische Laboratoriumsdiagnostik“. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Plückthun, A., Krebber, A., Krebber, C., Horn, U., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Nieba, L., Proba, K., Riesenberger, D. (1996). "Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation". In: **McCafferty, J., Hoogenboom, H. R., Chiswell, D. J.** "Antinody Engineering: a practical approach". IRL Press Limited, Oxford University Press Inc., New York

Plückthun, A., Skerra, A. (1989). "Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*". Methods. Enzymol. **178**: 497-515

Poljak, R. J., Amzel, L. M., Chen, B. L., Phizackerley, R. P., Saul, F. (1974). "The three-dimensional structure of the fab' fragment of a human myeloma immunoglobulin at 2.0-angstrom resolution". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**: 3440-3444

Pontarotti, P. A., Rahmani, R., Martin, M., Barbet, J. (1985). "Monoclonal antibodies to antitumor Vinca alkaloids: thermodynamics and kinetics". Mol. Immunol. **22**: 277-284

Proba, K., Honegger, A., Plückthun, A. (1997). "A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding". J. Mol. Biol. **265**: 161-172

Proba, K., Wörn, A., Honegger, A., Plückthun, A. (1998). "Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution". J. Mol. Biol. **275**: 245-253

Putalun, W., Tanaka H., Shoyama, Y. (1999). "Rapid separation of solasodine glycosides by an immunoaffinity column using anti-solamargine monoclonal antibody". Cytotechnology **31**: 151-156

Putalun, W., Tanaka, H., Yahara, S., Lhieochaiphon, S., Soyama, Y. (2000). "Survey of solasodine-type glycoalkaloids by western blotting and ELISA using anti-solamargine monoclonal antibody". Biol. Pharm. Bull. **23**: 72-75

Putalun, W., Taura, F., Qing, W., Matsushita, H., Tanaka, H., Shoyama, Y. (2003). "Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants". Plant Cell Rep. **22**: 344-349

Quesniaux, V. F., Tees, R., Schreier, M. H., Wenger, R. M., Van Regenmortel, M. H. (1987). "Fine specificity and cross-reactivity of monoclonal antibodies to cyclosporine". Mol. Immunol. **24**: 1159-1168

Quesniaux, V., Tees, R., Schreier, M. H., Maurer, G., van Regenmortel, M. H. (1987). "Potential of monoclonal antibodies to improve therapeutic monitoring of cyclosporine". Clin. Chem. **33**: 32-37

Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Madani, R., Rahbarizadeh, M. H., Omidfar, K. (2000). "Preparation and characterization of specific and high-affinity monoclonal antibodies against morphine". Hybridoma **19**: 413-417

Richards, F. F., Konigsberg, W. H., Rosenstein, R. W., Varga, J. M. (1975). "On the specificity of antibodies". Science **187**: 130-137

Sakata, R., Shoyama, Y., Murakami, H. (1994). "Production of monoclonal antibodies and enzyme immunoassay for typical adenylate cyclase activator, Forskolin". Cytotechnology **16**: 101-108

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sawutz, D. G., Sylvestre, D., Homcy, C. J. (1985). "Characterization of monoclonal antibodies to the beta-adrenergic antagonist alprenolol as models of the receptor binding site". J. Immunol. **135**: 2713-2718

Sblattero, D., Bradbury, A. (2000). "Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries". Nat. Biotech. **18**: 75-80

Searle, S. J., Pedersen, J. T., Henry, A. H., Webster, D. M., Rees, A. R. (1995). "Antibody structure and function". In: **Borrebaeck, C. A.** "Antibody Engineering". Oxford University Press Inc., New York

Shan, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. (1999). "Western blotting method for the immunostaining detection of glucuronides of glycyrrhetic acid using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody". Biol. Pharm. Bull. **22**: 221-223

Shan, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. (2001). "Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid". Anal. Chem. **73**: 5784-5790

Shoyama, Y., Tanaka, H., Fukuda, N. (1996). "Production of monoclonal antibodies and ELISA for thebaine and codeine". Cytotechnology **19**, 55-61

Shoyama, Y., Tanaka, H., Fukuda, N. (1999). "Monoclonal Antibodies against naturally occurring bioactive compounds". Cytotechnology **31**: 9-27

Simpson, N. H., Singh, R. P., Perani, A., Goldenzon, C., Al-Rubeai, M. (1998). "In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the bcl-2 gene". Biotechnol. Bioeng. **59**: 90-98

Skerra, A., Plückthun, A. (1988). "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*". Science **240**: 1038-1041

Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". Science **228**: 1315-1317

Stevens, F. J., Westholm, F. A., Solomon, A., Schiffer, M. (1980). "Self-association of human immunoglobulin kappa I light chains: role of the third hypervariable region". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 1144-1148

Strohal, R., Kroemer, G., Wick, G., Kofler, R. (1987). "Complete variable region sequence of a nonfunctionally rearranged kappa light chain transcribed in the nonsecretor P3-X63-Ag8.653 myeloma cell line". Nucleic Acids Res. **15**: 2771

Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes". J. Mol. Biol. **189**: 113-130

Tanaka, H., Fukuda, N., Shoyama, Y. (1999a). "Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rb1 and its characterization". Cytotechnology **29**: 115-120

Tanaka, H., Goto, Y., Shoyama, Y. (1996). "Monoclonal antibody based enzyme immunoassay for marijuana (cannabinoid) compounds". J. Immunoassay **17**: 321-342

Tanaka, H., Putalun, W., Tsuzaki, C., Shoyama, Y. (1997). "A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin-layer chromatography immunostaining using monoclonal antibody against solamargine". FEBS Lett. **404**: 279-282

Tanaka, H., Shoyama, Y. (1998). "Formation of a monoclonal antibody against glycyrrhizin and development of an ELISA". Biol. Pharm. Bull. **21**: 1391-1393

Tanaka, H., Shoyama, Y. (1999b). "Monoclonal antibody against tetrahydrocannabinolic acid distinguishes *Cannabis sativa* samples from different plant species". Forensic Sci. Int. **106**: 135-146

Tonevitsky, A. G., Marx, U., Agapov, I., Moisenovich, M. (2002). "Detection of isolated mistletoe lectin chains in plant extracts". Arzneimittelforschung **52**: 67-71

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354

- van Dijk, M. A., van de Winkel, J. G.** (2001) "Human antibodies as next generation therapeutics". Curr. Opin. Chem. Biol. **5**: 368-374
- Vaughan, J., Osato, J., Osato, R.** (1952). "The preparation of peptides using mixed carbonic-carboxylic acid anhydrides". J. Am. Chem. Soc. **74**: 676-678
- Wagner, G.** (1993). „Pharmazeutische Biologie – Drogen und ihre Inhaltsstoffe“. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New York
- Wall, J. G., Plückthun, A.** (1999). "The hierarchy of mutations influencing the folding of antibody domains in *Escherichia coli*". Protein Eng. **12**: 605-611
- Wang, L., Chorev, M., Feingers, J., Levitzki, A., Inbar, M.** (1986). "Stereospecific antibodies to propranolol". FEBS Lett. **199**: 173-178
- Welschof, M., Terness, P., Kolbinger, F., Zewe, M., Dübel, S., Dörsam, H., Hain, C., Finger, M., Jung, M., Moldenhauer, G., Hayashi, N., Little, M., Opelz, G.** (1995). "Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes". J. Immunol. Methods **179**: 203-214
- Wörn, A., Plückthun, A.** (1998). "An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly". FEBS Lett. **427**: 357-361
- Wörn, A., Plückthun, A.** (1999). "Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering". Biochemistry **38**: 8739-8750
- Wu, T. T., Kabat, E. A.** (1970). "An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity". J. Exp. Med. **132**: 211-250
- Wülfing, C., Plückthun, A.** (1993). "A versatile and highly repressible *Escherichia coli* expression system based on invertible promoters: expression of a gene encoding a toxic product". Gene **136**: 199-203
- Würzner, R., Schulze, M.** (1990). „Ammoniumsulfatfällung monoklonaler IgG-Antikörper aus Hybridomaaszites“. In: **Peters, J. H., Baumgarten, H.** „Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung“. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York
- Xuan, L.-J., Tanaka, H., Xu, Y., Shoyama, Y.** (1999). "Preparation of monoclonal antibody against cracin and its characterization". Cytotechnology **29**: 65-70
- Yalow, R. S., Berson, S. A.** (1959). "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods". Nature **184** (Suppl 21): 1648-1649
- Yamamoto, S., Yokota, K., Tonaki, T., Shono, F., Hayashi, Y.** (1987). "Enzyme immunoassay". In: **Bendetto, C., McDonald-Gibson, R. G., Nigam, N., Slater, T. F.** "Prostaglandines and related substances: a practical approach". IRL Press Limited, Oxford University Press Inc., New York
- Yanagihara, H., Sakata, R., Shoyama, Y., Murakami, H.** (1996). "Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies". Planta Med. **62**: 169-172
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J.** (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors". Gene **33**: 103-119
- Zalcborg, J. R., Healey, K., Hurrell, J. G., McKenzie, I. F.** (1983). "Monoclonal antibodies to drugs - digoxin". Int. J. Immunopharmacol. **5**: 397-402
- Zavala, A. G., Lancaster, T., Groopman, J. D., Strickland, P. T., Chandrasegaran, S.** (2000). "Phage display of scFv peptides recognizing the thymidine(6-4)thymidine photoproduct". Nucleic Acids Res. **28**: e24

- Zhou, H., Fisher, R. J., Papas, T. S.** (1993). "Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction". Nucleic Acids Res. **22**: 888-889
- Zhu, S., Shimokawa, S., Tanaka, H., Shoyama, Y.** (2004). "Development of an assay system for saikosaponin a using antisaiosaponin a monoclonal antibodies". Biol.Pharm.Bull. **27**: 66-71
- Zündorf, I.** (1999). „Gentechnik – Von authentischen Proteinen zu Muteinen und Chimären“. Pharm. Ztg. **144**: 1763-1769
- Zündorf, I., Dingermann, T.** (2003). „Kineret, Enbrel, Remicade und Co. Rekombinante Wirkstoffe bei Rheumatoider Arthritis“. PharmUZ **32**: 376-383
- Zündorf, I., Reinke, M., Dingermann, T.** (1993). "Expression of antibody fragments directed against prostaglandine E₂ on the surface of filamentous phage". Pharm. Pharmacol. Lett. **3**: 32-35
- Zündorf, I., Wiedenfeld, H., Roder, E., Dingermann, T.** (1998). "Generation and characterization of monoclonal antibodies against the pyrrolizidine alkaloid retrorsine". Planta Med. **64**: 259-263

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Struktur eines IgG-Antikörpers	2
Abb. 1.2	Organisation der humanen Antikörpergencluster	5
Abb. 1.3	Somatische VJ-Rekombination einer leichten Kette vom κ -Isotyp	7
Abb. 1.4	Somatische VDJ-Rekombination einer schweren Kette	8
Abb. 1.5	Enzymatische Spaltung eines IgG-Antikörpers	12
Abb. 1.6	Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpermoleküls und unterschiedlicher rekombinanter Antikörperfragmente	13
Abb. 1.7	Periplasmatische Expression von scFv-Antikörperfragmenten	15
Abb. 1.8	Grundkörper der Sapogenine	24
Abb. 1.9	Oleanolsäure	26
Abb. 1.10	Pyrrolizidinalkaloide	27
Abb. 2.1	Der Phagemid-Vektor pAK100	37
Abb. 3.1	Mechanismus der Veresterung von Oleanolsäure und Bernsteinsäureanhydrid	69
Abb. 3.2	Mechanismus der Proteinkopplung nach dem gemischten Anhydridverfahren	70
Abb. 3.3	Reinigung und Charakterisierung der Proteinkonjugate	71
Abb. 3.4	Isotypenbestimmung der monoklonalen Antikörper 6C2, 7A6 und 10F10	72-73
Abb. 3.5	Affinitätschromatographische Reinigung des Antikörpers der Zelllinie 6C2	74
Abb. 3.6	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des Antikörpers der Zelllinie 10F10	75
Abb. 3.7	Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den indirekten ELISA	76
Abb. 3.8	Checkpoint-ELISA für den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 6C2	78
Abb. 3.9	Checkpoint-ELISA für den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 7A6	79
Abb. 3.10	Checkpoint-ELISA für den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 10F10	80
Abb. 3.11	Übersicht über die als Kompetitoren eingesetzten Triterpene	81-82
Abb. 3.12	Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 7A6 im Kompetitions-ELISA	83-84
Abb. 3.13	Screening verschiedener 7A6-Subklone im Kompetitions-ELISA	85
Abb. 3.14	SDS-PAGE und Western Blot der Antikörper verschiedener 7A6-Subklone	86
Abb. 3.15	Charakterisierung des Antikörpers der Subklonzelllinie 7A6B4 (1)	87
Abb. 3.16	Charakterisierung des Antikörpers der Subklonzelllinie 7A6B4 (2)	88
Abb. 3.17	Amplimere der variablen Domänen VL und VH des 7A6-Antikörpers	89
Abb. 3.18	Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 6C2 im Kompetitions-ELISA	90
Abb. 3.19	Charakterisierung des Antikörpers der Zelllinie 10F10 im Kompetitions-ELISA	91
Abb. 3.20	Strukturformeln der getesteten Steroide bzw. Phytosterole	92

Abb. 3.21	Untersuchung von Steroiden und Phytosterolen im Kompetitions-ELISA gegen den monoklonalen Antikörper der Zelllinie 7A6	93
Abb. 3.22	Strukturformeln der Aglyka der getesteten Herzglykoside	93
Abb. 3.23	Strukturformeln der getesteten Boswelliasäuren	94
Abb. 3.24	Untersuchung von β -Boswelliasäuren im Kompetitions-ELISA	95
Abb. 3.25	Einfluss von AKBA auf den Zweitantikörper	96
Abb. 3.26	Screening von Pflanzenmetaboliten im Kompetitions-ELISA	97
Abb. 3.27	Kompetitions-ELISA mit Ellagsäure und Quercetin	98
Abb. 3.28	Übersicht über die getesteten Gerbstoffmonomere und Flavonoide	99
Abb. 3.29	Kompetitionsverhalten der getesteten Arzneipflanzenextrakte	102
Abb. 3.30	Kopplung von Oleanolsäure und <i>E.coli</i> β -Galaktosidase	104
Abb. 3.31	Checkerpoint-Titration für den direkten ELISA mit dem monoklonalen Antikörper der Zelllinie 7A6	105
Abb. 3.32	Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf den direkten ELISA	106
Abb. 3.33	Bestimmung der Nachweisgrenze des direkten ELISAs	107
Abb. 3.34	Direkter Kompetitions-ELISA mit dem Extrakt von <i>Quillaja saponaria</i>	107
Abb. 3.35	Klonierung eines scFv-Fragments in das Plasmid pAK300 bzw. pAK400	109
Abb. 3.36	Konstruktion des 10F10-scFv-Fragments und Ligation in das Plasmid pAK400	110
Abb. 3.37	V κ -Pseudogen in Myelomzellen	112
Abb. 3.38	V κ -Pseudogenscreening für die unterschiedlichen Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente	113
Abb. 3.39	DNA- und Aminosäuresequenz des 6C2-scFv-Fragments	114
Abb. 3.40	DNA- und Aminosäuresequenz des 7A6-scFv-Fragments	115
Abb. 3.41	DNA- und Aminosäuresequenz des 10F10-scFv-Fragments	116
Abb. 3.42	Aminosäuresequenzvergleich der Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmente	117
Abb. 3.43	Periplasmatische Expression des 6C2- und des 10F10-scFv-Fragments	119
Abb. 3.44	Expression des 7A6-scFv-Fragments	120
Abb. 3.45	Bindungsexperimente mit den heterolog exprimierten scFv-Fragmenten	121
Abb. 3.46	Kompetitionsversuche mit den scFv-Fragmenten	122
Abb. 3.47	Bindungsstudien der 10F10-scFv-Fragmente mit dem Anti-Oleanolsäure- β -Galaktosidasekonjugat	123
Abb. 3.48	Phagen-Display von scFv-Antikörperfragmenten	125
Abb. 3.49	Pseudogenscreening nach den einzelnen Phagen-Panning-Runden	126
Abb. 3.50	Konstruktion des 2C3C5-scFv-Fragments gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin	127
Abb. 3.51	DNA- und Aminosäuresequenz des 2C3C5-scFv-Fragments in pAK400	128
Abb. 3.52	Expression der 2C3C5-scFv-Fragmente in <i>E.coli</i> JM83	129
Abb. 3.53	Prinzip der Rearrangement-Analytik des murinen κ -Genclusters	131
Abb. 3.54	Isolierung von genomischer DNA aus Hybridomzellen	133
Abb. 3.55	Rearrangement-Analytik des κ -Genclusters der Hybridomzelllinie 10F10	135
Abb. 3.56	Southern-Blot-Hybridisierung der iHN-PCR-Ansätze	136
Abb. 3.57	DNA-Sequenz eines iHN-Amplimers	137
Abb. 4.1	Oleanolsäure-Thyreoglobulin-Konjugate für die Immunisierung	139
Abb. 4.2	Übersicht über die unterschiedlichen Triterpene, gegen die in den Arbeitsgruppen Nah und Shoyama monoklonale Antikörper generiert wurden	142
Abb. 4.3	Immunocytolokalisation von Glycyrrhizin in <i>Glycyrrhiza inflata</i>	143
Abb. 4.4	Übersicht über einige Saponin-Aglyka	146
Abb. 4.5	Polyspezifität von monoklonalen Antikörpern gegen niedermolekulare Haptene	148
Abb. 4.6	3D-Proteinstruktur eines Anti-His-Fv-Antikörperfragments	152
Abb. 4.7	Vorschlag für eine „In-Process-Kontrolle“ bei der Rearrangement-Analytik der V κ -Genclusters	165

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Eigenschaften der menschlichen Immunglobulin-Isotypen	3
Tab. 1.2	Mechanismen zur Erzeugung des Antikörperrepertoires	9
Tab. 1.3	In Deutschland als Therapeutika zugelassene Antikörper	18
Tab. 1.4	In Deutschland als <i>In-vivo</i> -Diagnostika zugelassene Antikörper	19
Tab. 1.5	Ausgewählte Literatur zu Antikörpern gegen Naturstoffe	22
Tab. 1.6	Übersicht über saponinhaltige Arzneipflanzen und Drogen	24-25
Tab. 2.1	Pipettierschema beim indirekten Kompetitions-ELISA	64
Tab. 3.1	Konjugate für die Immunisierung (nach Brand, 2003)	68
Tab. 3.2	Übersicht über die Aminosäure-Sequenzen der variablen Domänen VL und VH des Antikörpers der Zelllinie 7A6	89
Tab. 3.3	Übersicht über die im Kompetitions-ELISA getesteten Naturstoffe	97
Tab. 3.4	Übersicht über die im Kompetitions-ELISA getesteten Arzneipflanzen	100-101
Tab. 3.5	Übersicht über die Expressionsplasmide mit den Anti-Oleanolsäure-scFv-Fragmenten	108
Tab. 3.6	Übersicht über die getesteten Expressionsbedingungen	118
Tab. 3.7	Übersicht über die unterschiedlichen Versuchsparameter, die im Rahmen der Methodenetablierung optimiert wurden	134

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
β-Gal	β-Galaktosidase
β-ME	β-Mercaptoethanol
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di-(3-ethyl)-benzothiazolin-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
APOD	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cam	Chloramphenicol
cDNA	complementary Desoxynucleic Acid
CDR	Complementary Determing Region (hypervariable Region)
cfu	colony forming unit
CHCl ₃	Chloroform
cpm	counts per minute
CPRG	Chlorphenolrot-β-D-galaktopyranosid
Da	Dalton
DC	Dünnschicht Chromatographie
DCM	Dichlormethan
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynucleic Acid / Desoxynukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (A, T, G,C)
dsDNA	double stranded Desoxynucleic Acid (doppelsträngige DNA)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immonosorband Assay
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
Fab	Fragment antigen binding
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	Fragment crystalizable
FR	Framework Region (Gerüstregion)
Fuc	Fukose
Fv	Fragment variable
Glc	Glukose
Gln	Gucuronsäure
h	Stunde

Abkürzung	Bedeutung
H ₂ O	Wasser
HAT	Hypoxanthin / Aminopterin / Thymidin
i.p.	intra peritoneal
iHN-PCR	inverse Hemi-Nested-PCR
iLR-PCR	inverse Long-Range-PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Lox	Lipoxigenase
Lsg.	Lösung
M	Mol
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Cloning Site
MeOH	Methanol
MES	Morpholinethansulfonsäure
MgAC ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NEB	New England Biolabs
OD	Optische Dichte
OL	Oleanolsäure
OLSUC	Oleanylsuccinat
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
Pos.	Position
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonucleic Acid / Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
scFv	single chain Fragment variable
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde

Abkürzung	Bedeutung
SOE-PCR	Splicing by Overlap Extension-PCR
ssDNA	single stranded Desoxynucleic Acid (einzelsträngige DNA)
Tab.	Tabelle
TCA	Tricloressigsäure
TEMED	N'N'N'N'-Tetramethylenethylendiamin
Tet	Tetracyclin
THG	Thyreoglobulin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra Violett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid

7.2 Molekulargewichte der eingesetzten Kompetitoren

Die unten aufgeführten Naturstoffe wurden bei der Charakterisierung der Anti-Oleanolsäure-Antikörper als Kompetitoren eingesetzt. Dabei wurden in der Regel zwischen 2 und 5 mg der Substanz in ein Glasgefäß eingewogen und mit Methanol oder Wasser gelöst. Die Konzentration dieser Stammlösungen wurde auf 2 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ eingestellt

7.2.1 Pentazyklische Triterpene

Kompetitor	Mw [g/Mol]	Kompetitor	Mw [g/Mol]
α -Amyrin	426,70	Isomultiflorenol	425,73
β -Amyrin	426,70	Isomultiflorenolacetat	467,73
β -Amyrenon	424,71	Lupeolacetat	468,73
Betulin	442,70	Lupeon	424,70
Betulinsäure	456,71	Oleanolsäure	456,71
Friedelin	426,70	2-OH-Oleanolsäure	472,71
Glutenon	410,73	Taraxasterol	426,73
Glutenylacetat	454,73	Taraxasterolacetat	468,73
Hederagenin	472,71	Ursolsäure	456,68

7.2.2 Steroide und Phytosterole

Kompetitor	Mw [g/Mol]	Kompetitor	Mw [g/Mol]
Cholesterol	386,64	β -Sitosterol	414,69
Lanosterol	426,70	Stigmasterol	412,67

7.2.3 Herzglykoside

Kompetitor	Mw [g/Mol]	Kompetitor	Mw [g/Mol]
α -Acetyl-Digoxin	822,99	Gitoxigenin	390,53
β -Acetyl-Digoxin	822,99	Gitoxin	764,90
Digitonin	1229,34	Lantosid A	969,10
Digitoxigenin	374,52	Lantosid B	985,25
Digitoxin	764,90	Lantosid C	985,14
Digoxigenin	390,52		

7.2.4 β -Boswelliasäuren

Kompetitor	Mw [g/Mol]	Kompetitor	Mw [g/Mol]
BA	456,68	KBA	470,68
ABA	498,71	AKBA	512,70

7.2.5 Sonstige Arzneipflanzenmetabolite

Kompetitor	Mw [g/Mol]	Kompetitor	Mw [g/Mol]
Aesculetin	161,12	Frangulaemodin	270,23
Apigenin	270,23	Fructose	180,16
Arabinose	150,13	Glucose	180,16
Ascorbinsäure	167,12	Isoquercitrin	464,38
Catechin	146,15	Luteolin-7-glucosid	448,39
Chinasäure	192,17	Menthol	156,26
Chlorogensäure	354,30	Quercetin	338,27
Chrysophanol	254,23	Rhamnose	164,16
Citronensäure	192,12	Rosmarinsäure	360,31
Cumarin	146,14	Rutin	664,58
Cumarsäure	164,16	Saccharose	342,30
Ellagsäure	302,18	Thymol	150,12
Epicatechin	290,29	Vitexin-2''-O-rhamnosid	578,53

7.3 Plasmide und Vektoren mit laborinterner Registriernummer

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Nummer
2C3C5-scFv.pAK100	scFv-Fragment gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin im Phagen-Display-Vektor pAK100	1.1296
2C3C5-scFv.pAK300	scFv-Fragment gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin im Plasmid pAK300, schwache Proteinexpression	1.1750
2C3C5-scFv.pAK400	scFv-Fragment gegen das Pyrrolizidinalkaloid Retrorsin im Plasmid pAK400, starke Proteinexpression	1.1301
6C2-scFv.pAK100	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Phagen-Display-Vektor pAK100	1.1748
6C2-scFv.pAK300	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Plasmid pAK300, schwache Proteinexpression	1.1749
6C2-scFv.pAK400	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Plasmid pAK400, starke Proteinexpression	1.1650
7A6-scFv.pAK100	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Phagen-Display-Vektor pAK100	1.1685
7A6-scFv.pAK300	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Plasmid pAK300, schwache Proteinexpression	1.1684
7A6-scFv.pAK400	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Plasmid pAK400, starke Proteinexpression	1.1651
10F10-scFv.pAK100	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Phagen-Display-Vektor pAK100	1.1655
10F10-scFv.pAK400	scFv-Fragment gegen das Triterpen Oleanolsäure im Plasmid pAK400, starke Proteinexpression	1.1581
10F10-scFv.pAK100-Bib	Phagen-Display-Bibliothek von scFv-Fragmenten gegen das Triterpen Oleanolsäure	1.1732
TelD3c-scFv.pAK100	scFv-Fragment gegen den Muskarinrezeptor-Antagonisten Telenzepin im Phagen-Display-Vektor pAK100	1.1555
TelD3c-scFv.pAK300	scFv-Fragment gegen den Muskarinrezeptor-Antagonisten Telenzepin im Plasmid pAK300, schwache Expression	1.1554
TelD3c-scFv.pAK400	scFv-Fragment gegen den Muskarinrezeptor-Antagonisten Telenzepin im Plasmid pAK400, starke Expression	1.1516
TelD3c-Fab.pFAB5c.His	Fab-Fragment gegen den Muskarinrezeptor-Antagonisten Telenzepin im Phagen-Display-Vektor pFAB5c.His	1.1517
pFAB5c.His≠gpIII	Modifikation des Phagen-Display-Vektors pFAB5c.His: Entfernung der gpIII-Kassette zur Expression löslicher Fab-Fragmente	1.1524
TelD3c-Fab.pFAB5c.His≠gpIII	Fab-Fragment gegen den Muskarinrezeptor-Antagonisten Telenzepin im modifizierten Plasmid pFAB5c.His≠gpIII	1.1517

7.4 Genetischer Code und Aminosäuren

7.4.1 Der universelle genetische Code

1. Base	2. Base				3. Base
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stopp	Stopp	A
	Leu	Ser	Stopp	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
A	Leu	Pro	Gln	Arg	G
	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
G	Met*	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

* Als Startcodon codiert das Triplet AUG für formyl-Methionin (fMet)

7.4.2 Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophyn	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

7.5 DNA-Sequenz des Genclusters der murinen κ -Kette

Die DNA-Sequenz zeigt einen Teil des murinen Immunglobulin-Genclusters einer leichten Kette vom κ -Isotyp. Dargestellt sind die fünf J-Gensegmente (grau hinterlegt) und der Übergang zum ersten C-Gensegment. Anhand dieser DNA-Sequenz wurden die verschiedenen Oligonukleotide für die Rearrangement-Analytik konstruiert. Die mJ κ -Oligonukleotide liegen in den Introns zwischen den einzelnen J-Gensegmenten. Der mJ κ c-long-Primer liegt im Intron zwischen dem J5- und dem C μ -Gensegment. 3' vom mJ κ c-long-Primer befindet sich die *Hind* III-Schnittstelle.

Quelle: Internet-Datenbank des amerikanischen National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), Referenz-Nr.: V00777

```

1 cttatctttc tcctttatta acggttgctg ttgtatccat aactcaattc caaaggatat
61 aaaccttaac atatagatat aatthttgtgt accttctatg aaacagcatt aaagcaaaga
121 agttcaaata gaaagactgg cttagttatt attaactaag agatgctagt gagttctaaa
181 ttaataccat ttaaaattta taatthtgca aattaccacc accaccacca ctgagcccag
241 gaaaagttac aaagaactgg ctgtaccatt tgtthgttht cctcctthtt agagttctth
301 tathttatgtg tgagtgaatg ccatgtactt gtggatgcag aggctgtcag atthccttgca
361 gctggagtaa cagacagttg tgagctactt atagtactag aactaagatc ctatggaaga
421 gcagcgagtg ccactaactg ctgagccacc tctccagccc atthctthtatt thttcaatga
481 acaataata agcagtccta tgtgacatgc ttctaagca aaagataata thtttagtat
541 tatatacatt aataataaaa tacattatct tctaagaatt gaagtctcaa ctatgaaaat
601 cagcagttct ctgtcagaga agcccaagcg cttccacgca tgcttgagaga gggggttaag
661 cthtgccta cccactgctc tgttctctt cagtgaggag ggtthttgta cagccagaca
721 gtggagtact accactgtgg tggagcttgc gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta J1
781 agtagaatcc aaagtctctt tcttccgttg tctatgtctg tggcttctat gtctaaaaat
841 gatgtataaa atcttactct gaaaccagat tctggcac tccaaggcaa agatacagag mJk1
901 taactccgta agcaaagctg ggaataggct agacatgttc tctggagaat gaatgccagt
961 gtaataatta acacaagtga tagtttcaga aatgctcaa gaagcagggg agcctgccct
1021 agacaaacct ttactcggg ctcagaccat gctcagthtt tgtagggggg ttgagtgaag
1081 ggacaccagt gtgtgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa acgtaagtag J2
1141 tcttctcaac tcttgthcac taagtctaac cthgttaagt tgttctthgt tgtgtgthtt
1201 tcttaaggag atthcagggg tttagcaaat tccattctca gatcaggtgt taaggaggga mJk2
1261 aaactgtccc acaagaggth ggaatgattt tcaggctaaa thttaggctt tctaaaccaa
1321 agtaactaaa ctaggggaag agggataatt gtctacctag ggagggttht gtggaggtaa
1381 agthaaaata aatcactgta aatcacattc agtgatggga ccagactgga aataaaacct J3
1441 aagtacattt ttgctcaact gcttgtgaag thttggtccc atthgtctct ttgtatgagt mJk3
1501 ttgtgggtgta cttagataaa atgaactatt ccttgaacc caaaacttaa atagaagaga
1561 accaaaaatc tagtactgtg acaagctgag caaacagact gacctcatgt cagatttggtg
1621 ggagaaatga gaaaggaaca gththtctct gaacttagcc tatctaaactg gatcgcctca
1681 ggcaggttht tgtaaagggg ggcgcagtga tatgaatcac tgtgatthcac gthcggctcg J4
1741 gggacaaaagt tggaaataaa acgtaagtag actthtgcct atthacttgt gacgtthttg
1801 thctgthttg gtaactthtg tgaathttg acathttggc taaatgagcc atthctggca mJk4
1861 acctgtgcat caatagaaga tccccagaa aagagtcagt gtgaaagctg agcgaaaaac
1921 tcgtcttagg cthctgagac cagthttgta aggggaatgt agaagaaaga gctgggctth
1981 tctctgaaat thggccatc tagthtgact ggcttcacag gcaggtthtt gtagagaggg
2041 gcatgtcata gtcctcactg tggctcacgt tgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaad J5
2101 gtaagtagac thttctcatc thththttatg tgaagacac aggtthttcat gthtaggagth
2161 aaagtcagth cagaaaatct tgagaaaatg gagagggctc atthacagth gacgtggcat mJk5
2221 acagtgctag atthttctgtt tatcaagcta gtgagattag gggcaaaaag aggtthtagt
2281 tgagaggaaa gtaattaata ctatggtcac catccaagag atthgatcgg agaataagca
2341 tgagtagtta ttgagatctg ggtctgactg caggtagcgt ggtctcttag acgtthtaagt mJk5-I
2401 gggagathtt gaggggatga ggaatgaagg aacttcagga tagaaaagg ctgaagtcaa
2461 gthcagctcc taaaatggat gtgggagcaa actthtgaaga taaactgaa gaccagagg
2521 atgaaacagc gcagatcaaa gagggcccta gactctgag aagagaagg gactcatccg
2581 tgttgagtht ccacaagtac tgtcttgagt thtgcaataa aagtgggata gcagagthga
2641 gtgttagccg tanagtatac tctctthttg ctctaaagat thttatgact acaaaaatca

```

2701 gtagtatgtc ctgaaataat cattaagctg tttgaaagta tgactgcttg ccatgtagat
 2761 accatggctt gctgaatgat cagaagaggt gtgactctta ttctaaaatt tgtcacaaaa
 2821 tgtcaaaatg agagactctg taggaacgag tcccttgaca gacagctgca aggggttttt
 2881 ttcctttgtc tcattttctac atgaaagtaa atttgaaatg atcntttttt attataagag
 2941 tagaaataca gttgggtttg aactatatgt tttaatnggc cncacggttt tgtaagacat
 3001 ttggtccttt gttttcccag ttattactcg attgtaattt tataatcgcca gcantggctt
 3061 gaaacggtnn nnnncgcaac ctcttcgttt actaactggg tgaccttcgg ctgtgccagc
 3121 **catttggcgt tcaccctgcc gcnggccnat gagaaccccc** gcggtagnnc ccttgctccg **mJkC-l.**
 3181 cgggaaccac tttcctgagg acacagtgat aggaacagag ccaactaatct gaagagaaca
 3241 gagatgtgac agactacact aatgtgagaa aaacaaggaa aggggtgactt attcggattt
 3301 tcagaaataa aatgcattta ttattatatt ccttatttta atttctattg ggaattagaa
 3361 agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaa**aagctt** aatgtatata atcttttaga **Hind III**
 3421 ggtaaaatct acagccagca aaagtcattg taaatattct ttgactgaac tctcactaaa
 3481 ctctctctaaa ttatatgtca tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt gacatgacct
 3541 taactggtta ggtaggatat ttttcttcat gcaaaaaat gactaataat aatttagcac
 3601 aaaaatattt cccaataact taattctgtg atagaaaaat gtttaactca gctactataa
 3661 tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgtttg acccttcctt gccaaaggca
 3721 actatttaag gaccctttaa aactcttgaa actactttag agtcattaag ttatttaacc
 3781 acttttaatt actttaaaat gatgtcaatt cctttttaac tattaattta ttttaagggg
 3841 ggaaaggctg ctcataatc tattgttttt cttggtaaag aactctcagt ttctgtttta
 3901 ctacctctgt cacccaagag ttggcatctc aacagagggg actttccgag agccatctgg
 3961 cagttgctta agatcagaag tgaagtctgc cagttcctcc taggcagggtg gccagatta
 4021 cagttgacct gttctgggtg ggctaaaaat tgtcccatgt ggttacaaac ctaggacca
 4081 gggctctgat aattgctcag aatatttctg gacacccaaa tacagaccct ggcttaaggc
 4141 ctgtccatac agtaggttta gcttggttac accaaaggaa gccatacaga ggctaataatc
 4201 agagtattct tggaagagac aggagaaaa gaaagccagt ttctgtcttt accttatgtg
 4261 cttgtgttca gactcccaaa catcaggagt gtcagtaaac tggctgaat ctctgtctga
 4321 agcatggaac tgaaaagaat gtagtttcag ggaagaaagg caatagaagg aagcctgaga
 4381 atatcttcaa agggtcagac tcnnaatatt actttctaaa gaagtagcta ggaactaggg
 4441 aataacttag aaacaacaag attgtatata tgtgcacctt ggcccattgt tcttatctg
 4501 tagggataag cgtgcttttt tgtgtgttgt atataacata actgtttaca cataatacac
 4561 tgaaatggag cccttccttg ttaactcata ccactcctctg tgettccttc ctcagggGCT
 4621 GATGCTGCAC CAACTGTATC CATCTTCCCA CCATCCAGTG AGCAGTTAAC ATCTGGAGGT **konst.**
 4681 GCCTCAGTCG TGTGCTTCTT GAACAAC TTC TACCCCAAAG ACATCAATGT CAAGTGGAAG **Region**
 4741 ATTGATGGCA GTGAACGACA AAATGGCGTC CTGAACAGTT GGACTGATCA GGACAGCAA
 4801 GACAGCACCT ACAGCATGAG CAGCACCTC ACGTTGACCA AGGACGAGTA TGAACGACAT
 4861 AACAGCTATA CCTGTGAGGC CACTCACAAG ACATCAACTT CACCCATTGT CAAGAGCTTC
 4921 AACAGGAATG AGTGTTAGAG ACAAAGGTCC TGAGACGCCA CCACCAGCTC CCCAGCTCCA
 4981 TCCTATCTTC CCTTCTAAGG TCTTGAGGC TTCCCAACAA GCGACCTACC ACTGTTGCGG
 5041 TGCTCCAAAC CTCCTCCCA CCTCCTTCTC CTCCTCCTCC CTTTCCTTGC CTTTATCAT
 5101 GCTAATATTT GCAGAAAATA TTCAATAAAG TGAGTCTTTG CACTTGAGAT CTCTGTCTTT
 5161 CTTACTAAAT GGTAGTAATC AGTTGTTTTT CCAGTTACCT GGGTTTCTCT TCTAAAGAAG
 5221 TTNAATGTTT AGTTGCCCTG AAATCCACCA CACTTAAAGG ATAAATAAAA CCTCCTACTT
 5281 GCCCTGGTTG GCTGTCCACT ACATGGCAGT CCTTCTAAG GTTCACGAGT ACTATTCATG
 5341 GCTTATTTCT CTGGCCATGG TAGGTTTGAG GAGGCATACC TCCTAGTTT CTTCCTTAA
 5401 GTCGTCAAAG TCCTGAAGGG GGACAGTCTT TACAAGCACA TGTTCTGNNC TGATTCACC
 5461 TACCCAGTAA ACTTGGCGAA GCAGTAGCAT CATTA

mJk5-l. = mJk5-long

mJkC-l. = mJkC-long

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Klein
 Geburtstag: 15. Oktober 1973
 Geburtsort: Neustadt an der Weinstraße

Schulbildung

1980 - 1984 Grundschole in Neustadt - Haardt
 1984 - 1993 Staatl. Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium in Neustadt
 1993 Allgemeine Hochschulreife

Freiwillige soziale Tätigkeit

10/1993 - 03/1994 Katholischer Kindergarten in Neustadt - Diedesfeld

Studium

04/1994 - 04/1999 Studium der Pharmazie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
 03/1997 1. Staatsexamen
 04/1999 2. Staatsexamen

Praktische Ausbildung

05/1999 - 10/1999 Trajan-Apotheke in Mainz
 11/1999 - 04/2000 Boehringer Ingelheim Pharma KG in Ingelheim am Rhein
 06/2000 3. Staatsexamen und Approbation als Apotheker

Promotion

07/2000 - 02/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt / Main unter der Leitung von Prof. Dr. Theodor Dingermann

Derzeitige Tätigkeit

seit 03/2004 Mitarbeiter der Aventis Pharma Deutschland GmbH, Abteilung Quality Operations - Drug Product

Akademische Lehrer

Prof. Dr. G. Dannhardt, Prof. Dr. Th. Dingermann, Prof. Dr. B. Epe, Prof. Dr. P. Langguth, Prof. Dr. F. Moll, Prof. Dr. U. Pindur, Prof. Dr. J. Stöckigt

Konferenzteilnahmen und Tagungsbeiträge

- 02/2001 Teilnahme am 3th European Graduate Student Meeting in Frankfurt / Main
- 02/2002 *“Expression of recombinant antibody fragments to haptens of pharmaceutical interest”*
Poster auf dem 4th European Graduate Student Meeting in Frankfurt / Main
- 10/2002 *„Antibodies and recombinant antibody fragments to secondary plant metabolites of pharmaceutical interest”*
Poster auf der DPhG-Jahrestagung in Berlin
- 09/2003 *„Monoclonal antibodies to triterpene saponins for the analysis of medicinal plant extracts“*
Poster auf der GA-Jahrestagung in Kiel

Publikationen

Brand, K.M.G., Klein, C., Zündorf, I., Dingermann, T., Knöss, W. (2004). *„Generation and characterisation of monoclonal antibodies to oleanolic acid“*. Planta Medica, *in press*

9 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

Prof. Dr. Theodor Dingermann für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas und für seine Unterstützung und Anregungen bei meinen Vorträgen im Rahmen des Arbeitsseminars.

Dr. Ilse Zündorf für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Tipps, Tricks und Ratschläge im Laboralltag, die schnelle und gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit und die Pflege meiner Pflanzen während der Urlaubszeit.

Prof. Dr. Rolf Marschalek und HD Dr. Thomas Winckler für ihre große Hilfsbereitschaft, für ihre interessanten Diskussionsbeiträge zu meinen Arbeitsseminaren und für die vielen Tipps und Ratschläge zur Lösung methodischer Probleme, die sie mir bei unseren zahlreichen Gesprächen während des Mittagessens, im Kaffeeraum oder einfach mal im Vorbeigehen gaben. Herrn Thomas Winckler danke ich außerdem für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ein großes DANKESCHÖN allen Kolleginnen und Kollegen, die dafür gesorgt haben, dass ich mich an die meisten der 1369 Tage, die ich am Institut für Pharmazeutische Biologie verbracht habe, gerne zurückerinnern werde – vor allem natürlich an die 10-Uhr-Kaffepausen, das Freitagabendbier, die Grill- und Volleyballabende und die unvergesslichen Stunden im „WM-Studio 2002“.

Ich danke ...

... den Kollegen aus Labor 326 – Anke Friese, Anke Rohmann, Ilse Zündorf und Ute Steiner –, die auf engstem Raum mit mir zusammenarbeiten mussten und dennoch jeden Tag aufs neue wohlgenut zur Arbeit erschienen sind. Meine Hochachtung!

... unseren Super-TAs Chrissi Tschepke, Christin Uttner, Martina Berg, Melanie Seidel, Julia Boße und Jens Rabenstein für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre tolle Unterstützung.

... Peter Beck dafür, dass er mir durch seine wunderbaren Arbeitsseminare die liebenswerte Welt der Schleimpilze näher gebracht hat.

... Ingo Jennes, Oli Siol und Sebastian Scharf dafür, dass sie jederzeit und mit viel Geduld zur Stelle waren, wenn ich wieder einmal an der Computertechnik verzweifelt bin. Ohne Euch wüsste ich nicht, was ein Dongel ist und wie ein Wankelmotor funktioniert.

... Monika Baik, Heidi Bursen und Thanh Chung dafür, dass sie unzählige Male am Wochenende für mich da waren, wenn es darum ging, eine Agarplatte aus dem Brutschrank zu nehmen, oder ein paar Minis auf den Schüttler zu stellen.

... Jürgen Zech dafür, dass er mich in den Jahren 2002 und 2003 pünktlich am Montag nach dem letzten Bundesligaspieltag darauf hingewiesen hat, dass Mainz 05 den Aufstieg in die 1. Liga wieder einmal nur ganz knapp verpasst hat. Danke, Jürgen – aber am Ende wird ja bekanntlich alles gut!

... Claus Meyer für die netten Gespräche (leider zu selten!) und die hilfreichen Tipps und Tricks zu den Tücken der „Long-Range-PCR“.

... Jens Rabenstein für die tägliche Zubereitung seines hervorragenden Kaffees.

... Sven „Bischler-Napieralski“ Moritz für die gemeinsamen Studien- und Promotionsjahre und dafür, dass er mich bei der Arzneipflanzenexkursion in den Vogesen durch seinen selbstlosen Einsatz vor einer tollwütigen Kuh gerettet hat.

... Anna Yli-Fossi dafür, dass ich mein Bier jetzt auf Finnisch bestellen kann.

... Kristina Ruf für die 6 gemeinsamen Monate am Institut und die jahrelange Freundschaft, die sich daraus entwickelt hat.

... Jan-Henning Keller für die gemeinsame Zeit im N220-Exil-Labor, die gemeinsamen Stunden in denen wir auf Tagungen „Poster an Poster“ standen, die Heimfahrten von den Weihnachtsfeiern, bei denen er immer noch ein Bier für unterwegs im Mantel hatte und vor allem dafür, dass er mich, trotz seiner völlig unkoordinierten Art Fußball zu spielen, nie ernsthaft verletzt hat.

... Anne Gaußmann für die netten „Bierchen-Abende“ während Bio I (aber nicht nur!), für die zahlreichen anregenden Diskussionen und dafür, dass sie diese Arbeit von der ersten bis zur (fast) letzten Seite gelesen und korrigiert hat. Ich danke Dir für alle Verbesserungsvorschläge!

Mein größter Dank gilt aber meinen Eltern, für ihren Rückhalt und die jahrelange Unterstützung und meiner Frau Isabel für ihre Geduld und ihr Verständnis. Beides habe ich vor allem während des Zusammenschreibens durch meine dissertations-induzierten Psychosen auf eine harte Probe gestellt. Ohne Euch wäre diese Arbeit wohl nie entstanden!