

Etablierung der Phagen-Display-Methodik zur Herstellung von Einzeldomänen-Antikörpern aus Kameliden

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Abkürzungsverzeichnis.....	5
4	Einleitung	10
4.1	Immunsystem.....	10
4.1.1	Angeborene und erworbene Immunantwort.....	10
4.1.2	Konventionelle Antikörper, Immunglobuline (= Ig).....	16
4.1.3	Schwere-Ketten-Antikörper (= HcAb's) und Nanobodies (= VHH's)	19
4.2	Phagen-Display-Technologie.....	22
4.3	Eigenschaften der verwendeten antigenen Proteine	26
4.3.1	CaVβ 2 + 3	26
4.3.2	Flower/mFl (mouse Flower-like).....	27
4.3.3	CAPS2	27
4.3.4	Unc119	28
4.4	Zielsetzung	29
5	Material.....	31
5.1	Geräte	31
5.2	Software.....	33
5.3	Verbrauchsmaterialien	34
5.4	Chemikalien und Biochemikalien.....	36
5.6	Puffer und Medien	38
5.7	Stocklösungen	45
5.8	Kits	46
5.9	Enzyme.....	46
5.10	Antikörper.....	47
5.11	Plasmide.....	48
5.12	Oligonukleotide	48
5.13	Bakterienstämme	49
5.14	Bakteriophagen	49
6	Methoden.....	50
6.1	Immunologische Methoden.....	50
6.1.1	Kaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	50
6.1.1.1	Immunisierung und Blutentnahme	50
6.1.1.2	Präparation der Seren	52
6.1.2	Lama (<i>Lama Glama</i>)	53

6.1.2.1	Immunisierung und Blutentnahme	53
6.1.2.2	Präparation der Seren	54
6.1.2.3	Isolierung PBL's.....	54
6.1.3	Immunologische Detektion von Proteinen	55
6.1.4	Immunpräzipitation (= Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern)	57
6.2	Proteinbiochemische Methoden	59
6.2.1	Analytische Methoden	59
6.2.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
6.2.1.2	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue	60
6.2.1.3	Western Blot (Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran).....	60
6.2.1.4	Dot Blot (Peptidspot-Array)	61
6.2.1.5	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	62
6.2.1.6	Quantifizierung von Proteinen	63
6.2.1.6.1	Nanodrop	63
6.2.1.6.2	Bradford-Assay.....	63
6.2.2	Präparative Methoden	65
6.2.2.1	Peptidsynthese und Kopplung an Trägerprotein KLH	65
6.2.2.2	Synthese und Isolierung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	66
6.2.2.2.1	Proteinexpression in BL21.....	66
6.2.2.2.2	Periplasma-Präparation aus TG1/wk6	67
6.2.2.3	Aufreinigung von 6-His-Fusionsproteinen über Ni ²⁺ -NTA-Agarose.....	69
6.2.2.4	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über GSH-Sepharose	70
6.2.2.5	Dialyse von Proteinen	71
6.3	Molekularbiologische Methoden	72
6.3.1	Mikrobiologische Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	72
6.3.1.1	Kultivierung und Amplifikation	72
6.3.1.2	Anfertigung von Bakteriendauerkulturen (Glycerolstocks)	73
6.3.1.3	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	73
6.3.1.3.1	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	73
6.3.1.3.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	74
6.3.1.4	Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	74
6.3.1.4.1	Transformation mittels Elektroporation	74
6.3.1.4.2	Chemische Transformation	75
6.3.2	Arbeiten mit RNA	76
6.3.2.1	RNA-Extraktion	76
6.3.2.2	Reverse Transkriptase (RT) - PCR.....	76
6.3.3	Arbeiten mit DNA	77
6.3.3.1	Plasmid Präparation (durch Anionenaustausch-Chromatografie).....	77
6.3.3.1.1	Maxi-Präparation	77
6.3.3.1.2	Mini-Präparation	78
6.3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	78
6.3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	80
6.3.3.4	Elution der DNA aus dem Agarosegel, Aufreinigung von DNA	81
6.3.3.5	Enzymatische Modifikation von Plasmiden	82
6.3.3.5.1	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	82
6.3.3.5.2	Ligation zweier DNA-Fragmente mittels T4-Ligase	83
6.3.3.6	Sequenzierung	83
6.3.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	84
6.4	Phagen-Display-Methodik	85

6.4.1	Konstruktion VHH-Bibliothek aus PBL's	85
6.4.2	Synthese rekombinanter Phagen.....	86
6.4.2.1	<i>Rescue.....</i>	87
6.4.2.2	<i>Test-Infektion.....</i>	88
6.4.3	Selektion spezifischer Phagen	89
6.4.3.1	<i>Festphasen-Panning.....</i>	89
6.4.3.2	<i>Biotin-Panning mit magnetischen Dynabeads</i>	90
6.4.4	Reinfektion und Amplifikation selektierter Phagen	91
6.4.5	Erstellung Master-Platte und Synthese des Periplasma-Extraktes	92
6.4.6	Alignment und Kabat-numbering	92
7	Ergebnisse	94
7.1	Synthese ausgewählter Antigene und Generierung einer humoralen Immunantwort im Tier	94
7.1.1	Peptidsynthese und Immunisierung von <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Kaninchen).....	94
7.1.1.1	<i>CaVβ2 (Peptid #425)</i>	94
7.1.1.2	<i>CaVβ3 (Peptid #828)</i>	94
7.1.1.3	<i>CAPS2 (#Peptid 1403b).....</i>	95
7.1.1.4	<i>VHH (Peptid #1681).....</i>	95
7.1.1.5	<i>Biotinylierte Peptide des Proteins mFl (Peptide #1748 -#1750).....</i>	95
7.1.2	Synthese rekombinanter Proteine und Immunisierung von <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Kaninchen) und <i>Lama glama</i> (Lama)	96
7.1.3	Immunchemische Analysen des Prä- und Post-Immunserums	97
7.1.3.1	Serum Romeo	97
7.1.3.1.1	<i>ELISA.....</i>	97
7.1.3.1.2	<i>Western Blot</i>	99
7.1.3.1.3	<i>Dot Blot</i>	100
7.1.3.2	Serum Kaninchen	102
7.1.3.2.1	<i>Dot Blot (#828)</i>	102
7.1.3.2.2	<i>Western Blot (#1681)</i>	103
7.1.3.2.3	<i>Immunpräzipitation #1681 - 3. Serum</i>	103
7.2	Erstellung einer VHH-Bibliothek aus <i>Lama glama</i>.....	105
7.2.1	Aufreinigung der Lymphozyten und Amplifikation der cDNA	105
7.2.2	Synthese der VHH-Bibliothek mittels PCR.....	105
7.2.3	Klonierung der VHH-DNA in den Zielvektor pMES4	107
7.2.3.1	Enzymatische Modifikation der VHH-DNA	107
7.2.3.2	Enzymatische Modifikation des Zielektors pMES4	107
7.2.3.3	Ligation der VHH-DNA und des Vektors	108
7.2.3.3.1	<i>Test-Transformation und Kolonie-PCR.....</i>	108
7.2.3.4	Konstruktion der Immunbibliothek im präparativen Ansatz	109
7.2.4	Rescue und Amplifikation der rekombinanten Phagen	110
7.2.4.1	<i>Test-Infektion</i>	110
7.2.5	Panning (= Selektion der Immunbibliothek auf die Zielproteine).....	110
7.2.5.1	<i>Panning I.....</i>	111
7.2.5.2	<i>Panning II.....</i>	113
7.2.5.2.1	<i>CaVβ3</i>	113
7.2.5.2.2	<i>mFl.....</i>	114
7.2.5.2.3	<i>CAPS2</i>	116
7.2.5.2.4	<i>CaVβ2</i>	116
7.2.5.2.5	<i>Unc119</i>	117
7.2.5.3	<i>Panning III.....</i>	117

7.2.5.3.1	mFl.....	117
7.2.5.3.2	CaV β 2	118
7.2.5.3.3	Unc119	119
7.3	Charakterisierung der affinitätsgereinigten VHH-Bibliotheken	121
7.3.1	CaVβ2.....	121
7.3.1.1	Alignment und Einteilung von Einzelklonen in Familien	121
7.3.1.2	ELISA	123
7.3.2	CaVβ3.....	125
7.3.2.1	ELISA mit Klonen der Masterplatte	125
7.3.2.2	Alignment und Einteilung von Einzelklonen in Familien	126
7.3.2.3	Transformation in <i>E. coli-wk6</i>	129
7.3.2.3.1	Aufreinigung der Periplasma-Extrakte über Ni-NTA-Agarose	129
7.3.2.3.2	ELISA.....	130
7.3.2.3.3	Western Blot	131
7.3.2.3.4	Dot Blot	134
7.3.3	mFl	136
7.3.3.1	ELISA mit Klonen der Masterplatte	136
7.3.3.2	ELISA mit Klonen nach dem Peptid-Panning	137
7.3.3.3	Alignment und Einteilung von Einzelklonen in Familien	139
7.3.3.3.1	Klone der Masterplatte gegen Protein mFl	139
7.3.3.3.2	Klone nach dem Peptid-Panning gegen mFl #1 und mFl #4	140
7.3.3.4	Transformation in <i>E. coli-wk6</i>	142
7.3.3.4.1	Aufreinigung des Periplasma-Extrakte über Ni-NTA-Agarose	142
7.3.3.4.2	ELISA.....	146
7.3.3.4.3	Western Blot	148
7.3.3.4.4	Dot Blot	150
7.3.3.4.5	Immunzytochemie	153
7.3.4	CAPS2.....	155
7.3.4.1	ELISA mit Klonen der Masterplatte	155
7.3.4.2	Alignment und Einteilung von Einzelklonen in Familien	156
7.3.4.3	Transformation in <i>E. coli-wk6</i>	158
7.3.4.3.1	ELISA	158
7.3.4.3.2	Western Blot	159
7.3.5	Unc119	161
7.3.5.1	Alignment und Einteilung von Einzelklonen in Familien	161
7.3.5.2	Bindungsstudien mittels ELISA und Western Blot.....	163
8	Diskussion	167
9	Abbildungsverzeichnis	178
10	Tabellenverzeichnis.....	181
11	Literaturverzeichnis	182