

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Sandra Maren Lüttgau
aus Stade
Tag der mündlichen Prüfung:

**Humanisierung
von
Maus-Hybridomantikörpern**

Gutachter: PD Dr. Ralf Bischoff
Prof. Dr. Günter Hämmerling

Die vorliegende Arbeit entstand in den Abteilungen „Molekulare Genomanalyse“ und „Molekulare Immunologie“ des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg in der Zeit vom Oktober 2001 bis Mai 2004.

Ich danke Herrn PD Dr. Frank Breitling und Herrn Dr. Gerhard Moldenhauer für die Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und ihre stete Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Günter Hämmerling, Frau Prof. Dr. Annemarie Poustka und Herrn Prof. Dr. Herwig Ponstingl danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsplätze.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ralf Bischoff, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, die Arbeit vor der Fakultät zu vertreten.

Herzlich danke ich Prof. Dr. Ulrike Kutay an der ETH Zürich für die Einweisung in List und Tücke der Klonierung, Dr. Gerhard Moldenhauer für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie sowie den FACS-Operatoren Klaus Hexel und Manuel Scheuermann für die Sortierung meiner Zellen. Elvira Hallauer und Thorsten Kühlwein danke ich sehr für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Sara Burmester und ihren Kollegen aus der Abteilung „Molekulare Genomanalyse“ des DKFZ danke ich für die zahlreichen Sequenzierungen meiner DNAs.

Besten Dank auch an alle Mitarbeiter der Laboratorien, die angenehme Arbeitsatmosphäre, große Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit waren stets sehr hilfreich.

Meinem Mann Andreas danke ich für die liebevolle Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis während der Dissertationsarbeit.

Abkürzungen/Handelsnamen

ADCC	antigenabhängige Zytotoxizität
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
CD	Differenzierungscluster
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
CH1-3	konstante Domänen 1-3 der schweren Immunglobulinkette
CIP	calf intestine phosphatase
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
CMV	Cytomegalovirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGFP	eukaryontisches, grün fluoreszierendes Protein
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
Fab	antigenbindendes Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fötale Kälberserum
Fc	kristallisierbares Fragment
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fv	variables Fragment
GAM	Ziege anti Maus Antikörper
GAHu	Ziege anti Mensch Antikörper
GCK	Gene Construction Kit (Software)
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
Ig	Immunglobulin
IgA,D,E,G,M	Immunglobulin mit schwerer $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$ Kette
IGHV	Immunglobulingen der variablen Domäne der schweren Kette
IGHD	Immunglobulingen des Diversity Segments der schweren Kette
IGHJ	Immunglobulingen des Joining Segments der schweren Kette
IGHC	Immunglobulingen der konstanten Domäne der schweren Kette

Abkürzungen/Handelsnamen

IGKV	Immunglobulinen der variablen Domäne der Kappa Kette
IGKJ	Immunglobulinen des Joining Segments der Kappa Kette
IGKC	Immunglobulinen der konstanten Domäne der Kappa Kette
IGLV	Immunglobulinen der variablen Domäne der Lambda Kette
IGLJ	Immunglobulinen des Joining Segments der Lambda Kette
IGLC	Immunglobulinen der konstanten Domäne der Lambda Kette
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MG	Molekulargewicht
NPTII	Neomycin Phosphoryl Transferase II
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGK	Phosphoglycerinkinase
PI	isoelektrischer Punkt
PNK	Polynukleotidkinase
RAG	Rearrangement Activating Genes
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
scFv	einzelkettiges variables Fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	2
3	EINLEITUNG	3
3.1	ANTIKÖRPER	4
3.1.1	<i>Antikörperstruktur</i>	4
3.1.2	<i>Antikörperfunktion</i>	7
3.1.3	<i>Antikörperformate</i>	7
3.1.4	<i>Antikörpergenetik</i>	9
3.2	GENERIERUNG VON ANTIKÖRPERN DEFINIERTER SPEZIFITÄTEN	11
3.2.1	<i>Monoklonale Antikörper</i>	11
3.2.2	<i>Humane Antikörper produzierende Mäuse</i>	14
3.2.3	<i>Rekombinante Antikörper</i>	14
3.3	ANTI-KÖRPERBIBLIOTHEKEN.....	16
3.3.1	<i>Bakteriophagen Display</i>	17
3.3.2	<i>Zelloberflächendisplay</i>	18
3.3.3	<i>Bibliotheken aus mRNA-Protein-Komplexen</i>	18
3.3.4	<i>Affinitätsreifung: Mutagenese und Selektion</i>	19
3.4	MONOKLONALE ANTIKÖRPER ALS TUMORTHERAPEUTIKA	20
3.4.1	<i>Das Tumorantigen EpCAM</i>	23
3.4.2	<i>Gegen EpCAM gerichtete Immuntherapie</i>	24
3.4.3	<i>Der monoklonale Antikörper HEA125</i>	25
3.5	ZIELSETZUNG	25
4	MATERIAL UND METHODEN	27
4.1	MATERIAL.....	27
4.1.1	<i>Laborgeräte</i>	27
4.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	28
4.1.3	<i>Chemikalien</i>	28
4.1.4	<i>Puffer und Lösungen</i>	29
4.1.5	<i>Reaktions-Kits</i>	30
4.1.6	<i>Proteine, Antikörper und Färbereagenzien</i>	31
4.1.7	<i>Marker</i>	31
4.1.8	<i>Enzyme</i>	32
4.1.9	<i>Nukleotide</i>	32
4.1.10	<i>Vektoren</i>	34
4.1.11	<i>Medien für Bakterienkulturen</i>	34
4.1.12	<i>Medien für die Zellkultur</i>	34
4.1.13	<i>Transfektionsreagenzien</i>	36
4.1.14	<i>Bakterienstämme</i>	36
4.1.15	<i>Zelllinien</i>	36
4.2	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	36
4.2.1	<i>Lagerung von Bakterien</i>	36
4.2.2	<i>Herstellung elektrokompetenter E. coli Zellen</i>	37
4.2.3	<i>Transformation und Vorkultur</i>	37

4.2.4	Plasmid-DNA Isolierung aus <i>E. coli</i> Kulturen.....	37
4.2.5	Agarosegelelektrophorese zur Analyse und Extraktion von DNA.....	39
4.2.6	Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
4.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	40
4.2.8	DNA-Präzipitation.....	40
4.2.9	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	41
4.2.10	Auffüllen und Entfernen überhängender DNA Enden.....	41
4.2.11	Dephosphorylierung von DNA Enden.....	42
4.2.12	Phosphorylierung von DNA Enden.....	42
4.2.13	Annealing von Oligonukleotiden.....	42
4.2.14	Ligation von DNA Enden.....	43
4.2.15	PCR.....	43
4.2.16	Mutagenese.....	46
4.2.17	Sequenzierung.....	47
4.2.18	Computer-Nukleotidsequenzanalysen.....	47
4.3	ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN.....	48
4.3.1	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien.....	48
4.3.2	Lagerung eukaryontischer Zellen.....	50
4.3.3	Transformation eukaryontischer Zellen.....	50
4.3.4	Austausch von Genkassetten im Zielzellgenom.....	52
4.3.5	Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen.....	55
4.3.6	Isolierung von Zellsubpopulationen über Magnetbeads.....	55
4.4	ALLGEMEINE PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	56
4.4.1	Analyse Antikörperhaltiger Kulturüberstände im ELISA.....	56
4.4.2	Reinigung von Antikörpern.....	57
4.4.3	Biotinylierung von Antikörpern.....	58
4.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	58
4.4.5	Färbung von SDS-Gelen.....	59
4.4.6	Blotten von Proteinen auf eine Nylonmembran.....	59
4.4.7	Immun Blot.....	59
4.5	EXPERIMENTE ZUR ANALYSE DER ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT.....	60
4.5.1	Bindungsexperiment.....	60
4.5.2	Affinitätsvergleich.....	60
5	ERGEBNISSE: CHIMÄRISIERUNG.....	61
5.1	METHODEN ZUM ISOLIEREN HOMOLOG REKOMBINierter ZIELZELLEN.....	62
5.1.1	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	63
5.1.2	Magnetisches Zellsortieren.....	65
5.1.3	FACS.....	66
5.2	ETABLIERUNG DER SUBZELLINIE HEA125-1 MIT HOHER OBERFLÄCHENEXPRESSION.....	67
5.3	OPTIMIERUNG DER TRANSFEKTION FÜR HEA125 ZELLEN.....	68
5.4	CHIMÄRISIERUNG DER LEICHTEN KETTE.....	72
5.4.1	Plasmid-DNA zur IGKC Humanisierung.....	72
5.4.2	Homologe Rekombination.....	73
5.4.3	Identifizierung und Isolierung homolog rekombinierter Zellen.....	74

5.4.4	<i>Produktion und Reinigung der HEA-Huκ Antikörper</i>	76
5.4.5	<i>Der HEA-Huκ Antikörper bindet spezifisch an EpCAM</i>	79
5.4.6	<i>Der HEA-Huκ Antikörper und der HEA125 Antikörper binden EpCAM mit vergleichbarer Affinität</i>	82
5.5	CHIMÄRISIERUNG DER SCHWEREN KETTE	83
5.5.1	<i>Konstruktion der ZielDNA (pHulgG1)</i>	83
5.5.2	<i>Transformation und Isolierung homolog rekombinierter Zielzellen</i>	85
6	ERGEBNISSE: BIBLIOTHEK	87
6.1	FLANKIERUNG DER V _H DOMÄNE MIT LOXP STELLEN.....	87
6.1.1	<i>Positionierung der loxP Stellen im Zielzellgenom</i>	90
6.1.2	<i>Klonierung der pV_H-loxP-NPTII Ziel DNA</i>	92
6.1.3	<i>Transfektion der pV_H-loxP-NPTII Ziel DNA in HEA125 und Selektion homolog rekombinierter Zielzellen</i>	93
6.1.4	<i>Alternative Einführung der loxP Stellen ins Zielzellgenom</i>	97
6.2	KASSETTENAUSTAUSCH DER V _H DOMÄNE MITTELS CRE/LOXP	100
6.2.1	<i>Testplasmide für den Kassettenaustausch von IGHV/D/J</i>	100
6.2.2	<i>Kassettenaustauschplasmide zur Erzeugung der Vielfalt</i>	101
7	DISKUSSION	106
7.1	CHIMÄRISIERUNG DER LEICHTEN KETTE: HOMOLOGE REKOMBINATION OHNE MITEINFÜHRUNG VORSELEKTIONIERBARER MARKER	107
7.2	CHARAKTERISIERUNG DES HEA-Hu κ Antikörpers	110
7.3	CHIMÄRISIERUNG VON HYBRIDOMANTIKÖRPERN AM BEISPIEL VON HEA125	111
7.4	THERAPEUTISCHE VERWENDUNGSMÖGLICHKEIT VON HU-HEA125.....	112
7.5	HUMANISIERUNG VERSUS CHIMÄRISIERUNG	113
7.6	ERSTELLUNG EINER HUMANEN HYBRIDOMANTIKÖRPERBIBLIOTHEK	114
7.6.1	<i>Bereitstellung der Vielfalt von Antikörpergenen</i>	114
7.6.2	<i>Effektive Selektion des richtigen Gens aus der Vielfalt</i>	119
7.6.3	<i>Verbesserung der Affinität und Spezifität eines selektierten Antikörperfragmentes</i>	120
7.7	VERGLEICH DER HUMANEN HYBRIDOMANTIKÖRPERBIBLIOTHEK MIT ANDEREN SYSTEMEN	121
7.8	AUSBLICK	123
8	LITERATURVERZEICHNIS	124

1 Zusammenfassung

Viele murine Hybridome produzieren therapeutisch interessante Antikörper. Dazu zählt auch der monoklonale Maushybridomantikörper HEA125 (IgG1), der mit hoher Affinität an EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) bindet. Da EpCAM auf der Oberfläche fast aller humaner epithelialer Tumore stark überexprimiert ist, eignet sich HEA125 ggf. als Therapeutikum für Karzinome. Murine Antikörper sind aber nicht in der Lage, die Effektorfunktionen des menschlichen Immunsystems zu aktivieren. Außerdem werden sie im menschlichen Organismus durch die HAMA (Human Anti Mouse Antibodies) Antwort meist sehr schnell inaktiviert.

(A) Deshalb wird in dieser Arbeit am Beispiel von HEA125 ein Weg aufgezeigt, durch den die konstanten Domänen von beliebigen Hybridomantikörpern chimärisiert werden können, wodurch die Wirksamkeit der Antikörper verbessert und gleichzeitig die HAMA Bildung verringert wird. Dafür wurde mittels FACS zunächst ein stabiler Subklon HEA125-1 etabliert, dessen Zellen verglichen mit HEA125 ca. 30% mehr Antikörper auf ihrer Oberfläche exprimieren. Damit können sehr einfach per FACS solche Zellen isoliert werden, die veränderte Antikörper produzieren. Der Austausch der konstanten Domänen geschieht dabei mittels homologer Rekombination. Im Fall der leichten Kette konnte 1 von $3 \cdot 10^8$ HEA-Hu κ Zielzellen mittels FACS isoliert werden, deren exprimierte Antikörper statt der ursprünglich murinen nur noch eine humane konstante Kappa Kette aufweisen. An der Chimärisierung der schweren Kette wird noch gearbeitet. Kennzeichen der hier entwickelten Methode ist, dass kein Selektionsmarker benötigt wird, wodurch die Antikörpergene in ihrer ursprünglichen chromosomalen Umgebung erhalten werden. Dies führt zu stabilen und hohen Expressionsraten, wodurch der bisher sehr mühselige Weg zu einem Antikörper Therapeutikum stark verkürzt wird.

(B) Ausgehend von der chimärisierten Zelllinie Hu-HEA125 soll außerdem mittels Kassettenaustausch der variablen Antikörperdomänen eine Bibliothek humaner Hybridomantikörper generiert werden. Dafür ist die Einführung von spezifischen Rekombinationsstellen ins Hu-HEA125-Genom durch zwei weitere homologe Rekombinationsereignisse notwendig. Die Einführung der loxP Stellen mittels eines flankierten NPTII Gens in den aktiven IGHV Genlokus wurde bereits erfolgreich in HEA125 getestet. Die homolog rekombinierten Zielzellen konnten mittels PCR nachgewiesen werden, waren aber nicht stabil. Deshalb ist die Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen direkt mittels veränderter, FACS-selektionierbarer variabler Domänen geplant. Damit können die murinen variablen Domänen je nach Kassettenaustauschfrequenz gegen die Vielfalt humaner variabler Domänen ausgetauscht werden. Hierbei werden an DNA humaner B-Lymphozyten PCR amplifizierte humane schwere und leichte Ketten zufällig miteinander kombiniert. Aus der resultierenden Vielfalt sollen interessante humane Antikörper nahezu beliebiger Spezifität aufgrund der oberflächenexprimierten Antikörper durch Bindung an immobilisiertes Antigen schnell und einfach isoliert werden können.

2 Summary

Numerous mouse hybridomas produce antibodies of therapeutic interest. Among these the murine monoclonal hybridoma antibody HEA125 (IgG1) is a high affinity EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) binder. Since EpCAM is overexpressed on the surface of most human epithelial tumour cells, the HEA125 antibody may evolve as a potential therapeutic agent to be used against carcinomas. Unfortunately, antibodies of murine origin in most instances are not able to activate human effector mechanisms. Further on the development of a HAMA (Human Anti Mouse Antibodies) response by the human organism will rapidly inactivate the therapeutic antibody.

(A) Therefore, taking HEA125 as an example, this work describes a technique to chimerize the constant domains of any hybridoma antibody. Chimerization on the one hand should increase the efficacy of the engineered antibodies and on the other hand decrease HAMA. At first a stable subclone HEA125-1 was established, whose cells compared to HEA125 cells express approximately 30% more antibody molecules on the cell surface. Thus, cells that produce engineered antibodies on the surface membrane can be easily isolated by FACS. The exchange of the constant antibody domains is achieved by homologous recombination. With the chimerization of the heavy chain yet to be done, for the light chain it was possible to isolate 1 targeted HEA-Hu κ cell out of $3 \cdot 10^8$ HEA125-1 cells by FACS. The resulting cell expresses human constant kappa chains, instead of the original murine ones. An important new aspect of this method is the lack of co-introduction of any selection marker. Thereby the antibody genes are being kept in their natural chromosomal surroundings. This leads to stable and high antibody expression levels and shortens the laborious and troublesome methods for the generation of antibody therapeutics.

(B) Starting with the chimerized cell line Hu-HEA125 a library of human hybridoma antibodies will be generated by exchanging the variable domains of the antibodies via cassette exchange. For this, specific recombination sites will be introduced into the Hu-HEA125 genome by two additional homologous recombination events. The introduction of loxP sites into the active IGHV gene locus via a flanked NPTII gene was tested successfully. The homologous recombinated target cells were verified by PCR but they were not stable. To circumvent this drawback future experiments will introduce the specific recombination sites directly via engineered variable domains that are isolated by FACS. By means of the specific recombination sites the murine variable domains will be replaced by the diversity of human variable domains, with the achievable complexity of the antibody library dependent on the frequency of the recombinase mediated cassette exchange. By this, heavy and light chain variable domains generated by PCR using human B-lymphocytes as a template will randomly combine with each other in the hybridoma cells. Due to the surface expression of antibody molecules it should be possible to quickly and effectively isolate antigen specific human antibodies of interest by their binding to immobilized antigen.

3 Einleitung

Über hundert Jahre nach der Entdeckung der Antikörper durch von Behring und Kitasato (1890) sind sie aus der biomedizinischen Forschung nicht mehr weg zu denken. Darüber hinaus haben Antikörper sich als wirkungsvolle Pharmaka zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten wie beispielsweise Autoimmun- und Krebserkrankungen erwiesen.

Der Bedarf an spezifisch bindenden Antikörpern ist groß und nimmt weiter zu. Immense Nachfrage erweckt z.B. das humane Genomprojekt. Um alle gefundenen Genprodukte analysieren zu können, wird pro Gen mindestens ein Antikörper benötigt. Aus diesem Grund bekommen „high-throughput-Methoden“ wie Phagen Display und Hybridombibliotheken zum Auffinden von Antikörpern gesuchter Spezifitäten immer größere Bedeutung.

Darüber hinaus stellen Antikörper ihren Nutzen als Therapeutika mehr und mehr unter Beweis (Riethmüller *et al.* 1993, Green *et al.* 2000, Glennie und Johnson 2000). Die erste Tumorthherapie mit einem monoklonalen Antikörper wurde vor fast 25 Jahren von Nadler und Mitarbeitern am Dana-Farber Cancer Institute in Boston durchgeführt (Nadler *et al.* 1980). Diese ersten Therapieversuche mit murinen monoklonalen Antikörpern waren allerdings nicht sehr erfolgreich. Probleme bestanden in der Identifizierung geeigneter Oberflächenantigene (siehe Abschnitt 3.4) und der unzureichenden Penetration des großen Antikörpermoleküls in wenig vaskularisierte Tumore mit hohem interstitiellen Binnendruck. Außerdem induziert die wiederholte Antikörpergabe im Patienten eine als HAMA (human anti-mouse antibodies) bezeichnete Immunantwort gegen das xenogene Immunglobulin (Jaffers *et al.* 1986, Khazaeli *et al.* 1994). Sie limitiert die Wirksamkeit und kann schwere Nebenwirkungen wie Anaphylaxie und Serumkrankheit verursachen. Der bedeutsamste Grund für die geringe therapeutische Effizienz muriner monoklonaler Antikörper ist jedoch die mangelnde Aktivierung humaner Effektormechanismen durch murine Fc-Teile (siehe Abschnitt 3.1.2).

Die beiden letzten Punkte können durch die Verwendung humaner Antikörper überwunden werden. Die unmittelbare Erzeugung komplett humaner monoklonaler Antikörper ist mangels einer geeigneten Fusionslinie zur Erzeugung stabil kultivierbarer Hybridome (siehe Abschnitt 3.2.1) bisher nicht möglich (James 1994).

Um komplette, voll funktionsfähige humane Antikörper zu erzeugen, sind daher im Wesentlichen 3 Verfahren etabliert worden:

1. Die Chimärisierung bzw. Humanisierung (siehe Abbildung 3-3) von Maus Hybridomantikörpern hat schon zu einer Reihe chimärer und humaner Antikörper geführt (siehe Abschnitt 3.2.1).
2. Alternativ zur Erzeugung von Antikörpern *in vivo* werden rekombinante Antikörper *in vitro* konstruiert (siehe Abschnitt 3.2.3) oder interessante Spezifitäten aus Antikörperbibliotheken (z.B. Phagen-Display) isoliert (siehe Abschnitt 3.3). In prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionssystemen können die humanen Antikörper bzw. Antikörperfragmente dann produziert werden (siehe Abschnitt 3.2.3). Auf diese Weise lassen sich zwar einfach große Vielfalten von Antikörperspezifitäten erzeugen, sie lassen sich aber entweder nur in Form von Antikörperfragmenten oder nur mit sehr geringen Ausbeuten produzieren (Chiswell und McCafferty 1992, Nissim *et al.* 1994).
3. Am Vielversprechendsten ist bisher die Verwendung humane Antikörper produzierender Mäuse (siehe Abschnitt 3.2.2). Sie können, wie zur Erzeugung muriner monoklonaler Antikörper, immunisiert werden. Danach ist die erfolgreiche Herstellung stabiler Hybridome möglich, die humane Antikörper erzeugen. Diese Mäuse sind allerdings von zahlreichen Patenten geschützt, was die Verwendungsmöglichkeiten einschränkt. Weiterhin ist die Herstellung eines gesuchten monoklonalen Antikörpers arbeits- und zeitintensiv (siehe Abschnitt 3.2.1).

In dieser Arbeit soll ein Weg aufgezeigt werden, der die Vorteile von Hybridomzellen zur Produktion monoklonaler Antikörper mit der rekombinanten Erzeugung komplexer, zelloberflächenpräsentierter Antikörperbibliotheken verbindet .

Das Projekt lässt sich in zwei Hauptzielen zusammenfassen. Zunächst sollen monoklonale Maushybridomantikörper derart chimärisiert werden, dass sie anschließend zu therapeutischen Zwecken in großen Mengen relativ einfach produziert werden können. Darüber hinaus soll ausgehend vom chimärisierten HEA125 Antikörper (siehe Abschnitt 3.4.3) später eine Bibliothek komplett humaner monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Aus dieser Hybridomantikörperbibliothek sollten dann für gesuchte Antigene spezifische Antikörper in großer Menge und guter Qualität einfach, verlässlich und schnell aufgefunden werden können.

3.1 Antikörper

3.1.1 Antikörperstruktur

Antikörper kommen entweder als membrangebundene Oberflächenrezeptoren oder als sezernierte Plasmaproteine vor. Strukturell handelt es sich um symmetrische, heterodimere Moleküle (Abbildung 3-1). Sie bestehen aus zwei identischen, glycosy-

lierten schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von 50 – 70 kDa, und zwei identischen, nicht glycosylierten leichten Ketten von 25 kDa. Die schweren Ketten sind untereinander und mit den leichten Ketten durch Disulfidbrücken verbunden.

Die Immunglobuline (Igs) lassen sich in 5 Klassen einteilen, IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. Die Klasse eines Antikörpermoleküls ergibt sich aus den in ihm enthaltenen konstanten Domänen der schweren Ketten μ , δ , γ , ϵ oder α , die speziesspezifisch in verschiedenen Subgruppen vorkommen (Hayashida *et al.* 1984).

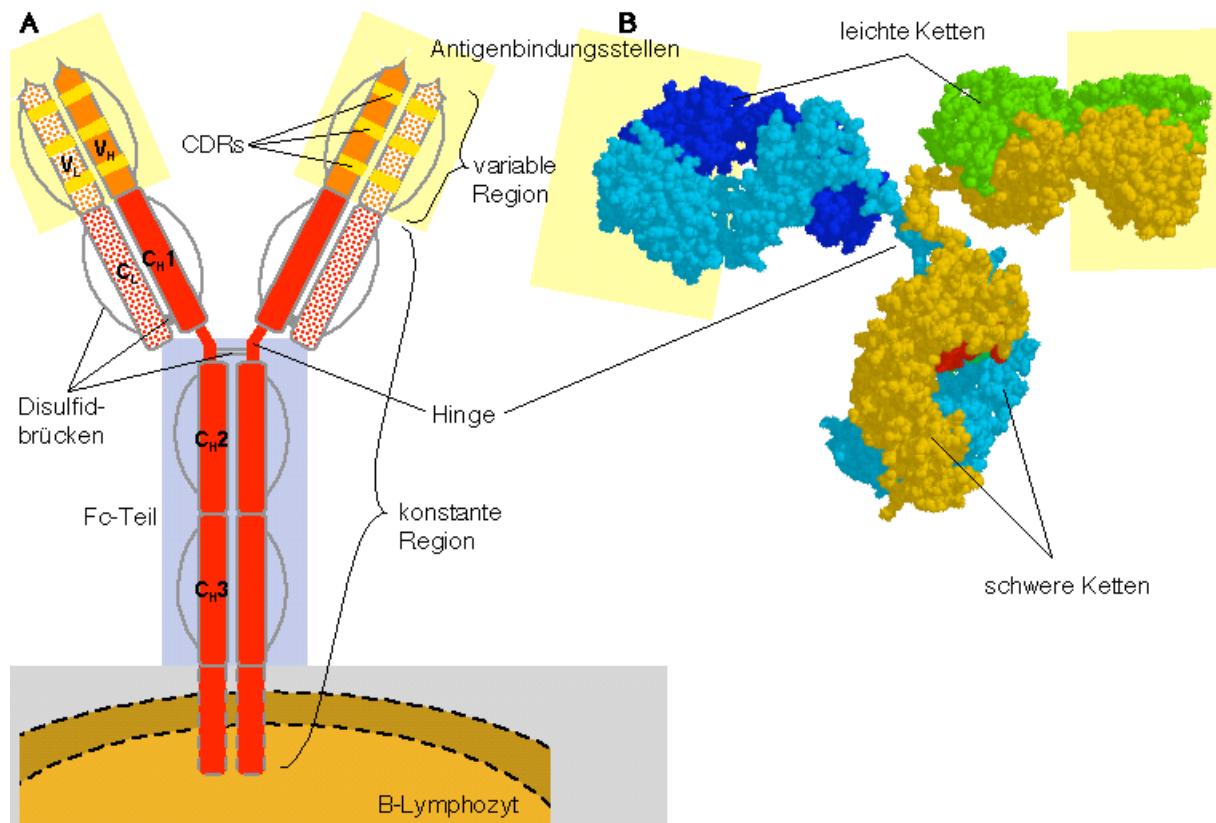


Abbildung 3-1: Struktur eines Antikörpermoleküls. A: Schematische Übersicht eines IgG Moleküls. V_L = Variable Domäne der leichten Kette, V_H = Variable Domäne der schweren Kette, CH_1 bis CH_3 = konstante Regionen 1 – 3 der schweren Kette. Fc = kristallisierbares Fragment (hellblau hinterlegt). Die gestrichelte Verlängerung des CH_3 Exons kommt nur in der membranständigen Form der IgG Moleküle vor. In der sezernierten Form fehlt der grau hinterlegte Teil des Schemas. **B: Räumliche Struktur eines IgG Moleküls (nach M. Clark¹).** Die Antigenbindungsstellen sind jeweils in beige hinterlegt.

Zusätzlich gibt es zwei unterschiedliche leichten Ketten, κ und λ . In Maus und Mensch existiert jeweils nur ein konstantes Kappa (IGCK) Gen. Demgegenüber besitzt die Maus vier funktionelle λ Ketten, der Mensch hat vier funktionelle Gene und zusätzlich zwei Pseudogene (Lai *et al.* 1989). Antikörper beider leichten Ketten werden speziesspezifisch in bestimmten Verhältnissen produziert. So haben in der Maus

¹ <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/igs/migg2a.html>

95% aller Antikörper leichte κ Ketten, während beim Menschen das Verhältnis κ zu λ 60:40 beträgt.

Die schweren und leichten Ketten bestehen aus mehreren 100 bis 110 Aminosäure großen kompakten, globulären Domänen (Abbildung 3-1 B). Diese enthalten große Mengen stabilisierende β -Faltblattstrukturen und werden jeweils durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten der Domänen zusammengehalten.

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der schweren und leichten Ketten variieren stark voneinander und werden daher als variable Domänen (V) bezeichnet. Diese bestimmen die Antigenpezifität des Antikörpers. In jeder variablen Domäne gibt es drei hypervariable Bereiche (Abbildung 3-2 A), die beim gefalteten Ig-Molekül in Schleifen nach außen zeigen und so die Antigenbindungsstelle bilden (Abbildung 3-2 B). Sie werden daher als CDRs (Complementarity Determining Region) bezeichnet. CDR3 zeigt in schweren und leichten Ketten von allen die höchste Variabilität, sowohl bezogen auf die Aminosäuresequenz, als auch bezüglich der Länge, sie variiert von 9 bis 26 Aminosäuren. Zusammengehalten werden die CDRs durch β -Faltblatt-Gerüstregionen.

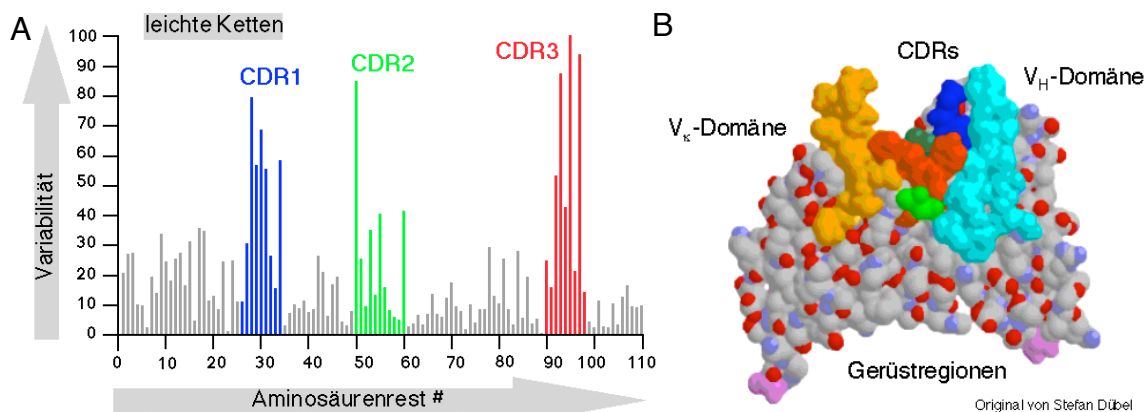


Abbildung 3-2: Variabilität und räumliche Struktur der variablen Antikörperdomänen.
A: Variabilität der Aminosäuren der leichten Immunglobulinketten (nach E.A. Kabat). CDR1, 2 und 3 sind farbig gekennzeichnet. Die sie flankierenden Gerüstregionen sind grau dargestellt.
B: Dreidimensionale Struktur der variablen Antikörperdomänen (nach Stefan Dübel). Die sechs CDRs (farbig) bilden die Antigenbindungsstelle eines variablen Antikörperfragmentes (Fv). Die stabilisierenden Gerüstregionen sind grau dargestellt.

Immunglobuline werden durch alternatives Spleißen in membrangebundener und sezernierter Form produziert. Bis auf das C-terminale Ende sind beide Formen identisch. Membranständige Antikörper sind mit einem hydrophoben C-Terminus in der Oberfläche von B-Zellen verankert (Rogers und Wall 1984). Sie sind dort mit CD79a und CD79b assoziiert (Reth 1992), zwei einzelnen Ig-ähnlichen Domänen, die einen disulfidverbundenen Heterodimer und in Assoziation mit einem Antikörper den B-Zell-

Rezeptor bilden. Sezernierte Immunglobuline haben dagegen einen hydrophilen C-Terminus.

3.1.2 Antikörperfunktion

Antikörper vermitteln die humorale Immunität des Immunsystems. Dabei können sie schon für sich allein ihre Schutzfunktion ausüben, wenn sie bakterielle Toxine neutralisieren oder das Eindringen von Viren in die Wirtszelle verhindern. Seine große Wirksamkeit gewinnt das humorale System jedoch erst durch enge Zusammenarbeit mit dem zellulären Immunsystem. Die variablen Domänen binden spezifisch an körperfremde Moleküle, während die konstanten Domänen andere Komponenten des Immunsystems zur Hilfe rufen.

- Mit Antikörpern dekorierte Bakterien können z.B. einfacher von Phagozyten aufgenommen werden (Opsonisierung).
- Außerdem aktivieren die konstanten Domänen von humanem IgM, IgG1 und IgG3 das Komplementsystem durch Bindung an Komplementfaktor C1q (Komplement-Aktivierung).
- Die konstanten Domänen von IgG1 und IgG3 aktivieren natürliche Killerzellen durch Bindung an deren Fc-Rezeptoren (CD16), worauf diese einen zytotoxischen Angriff auf die antikörpermarkierten Zielzellen starten. Dieser Vorgang wird antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) genannt.
- Neuerdings wurde sogar eine katalytische Aktivität der Antikörper nachgewiesen, die in Zusammenarbeit mit dem zellulären Immunsystem stattfindet. Offensichtlich wandeln Antikörper die in aktivierten Makrophagen entstehenden Sauerstoffradikale in das sehr toxische Ozon um (Wentworth Jr *et al.* 2002).

Für die Interaktionen mit den Effektormolekülen einer Spezies sind die von ihr produzierten Fc Antikörperteile jeweils optimiert. Daher sind chimärisierte bzw. humanisierte Mausantikörper (siehe Abbildung 3-3) besser in der Lage, zu Therapiezwecken die Effektorfunktionen des menschlichen Immunsystems zu aktivieren, als es die einfacher herzustellenden Mausantikörper sind (Liu *et al.* 1987). wie z.B. Zellyse und Phagozytose.

3.1.3 Antikörperformate

Bei einigen Anwendungen kommen Ig-Moleküle in abgewandelter Form zum Einsatz (Abbildung 3-4). Kleine Antikörperfragmente haben zum Beispiel eine bessere Gewebegängigkeit als komplette Moleküle. Sie können durch Proteaseverdauung aus kompletten Antikörpern oder rekombinant hergestellt werden. Die kleinen Fv Frag-

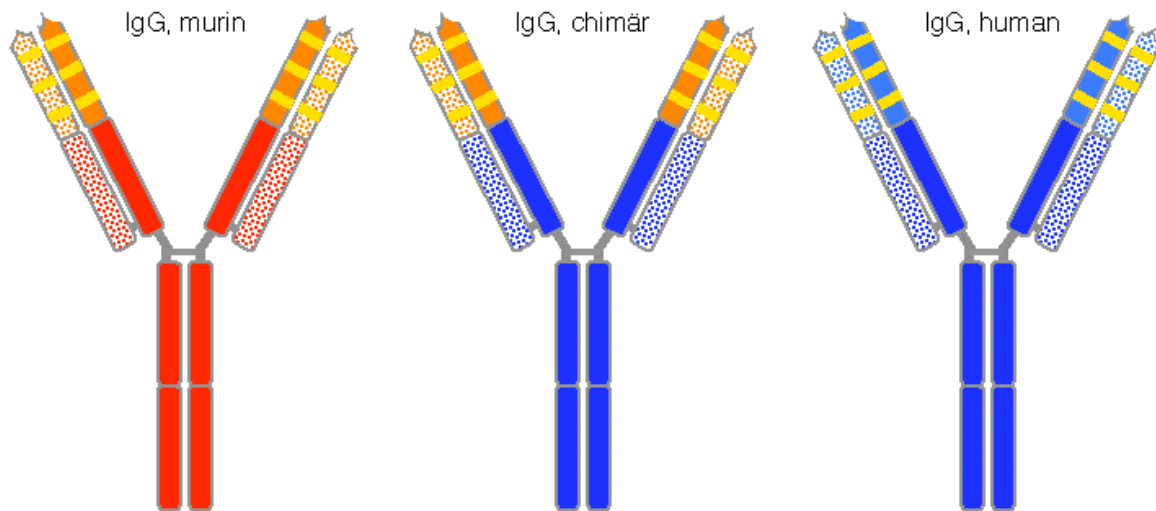


Abbildung 3-3: Humanisierung von Antikörpern. Zunächst werden die von der Maus stammenden konstanten Domänen gegen dieselben des Menschen ausgetauscht, wodurch ein chimärer Antikörper entsteht. Zur kompletten Humanisierung werden zusätzlich die Gerüstregionen der Maus, in welche die CDRs eingebettet sind, durch menschliche Gerüstregionen ersetzt.

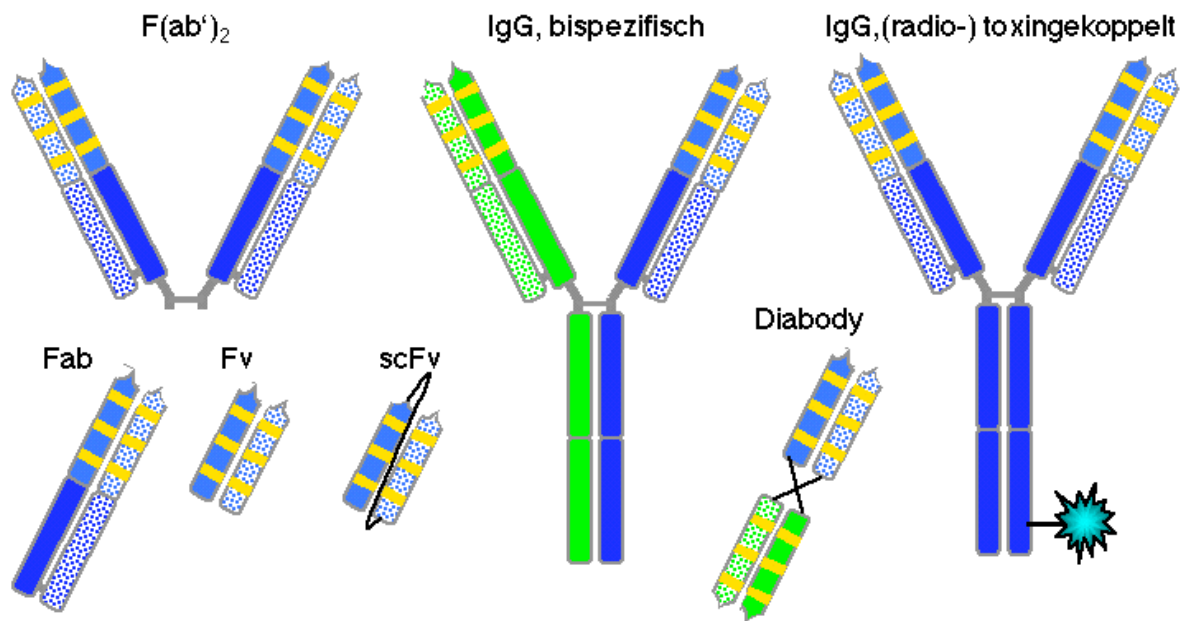


Abbildung 3-4: Graphische Übersicht verschiedener Antikörperformate. Gefüllt = schwere Ketten, gemustert = leichte Ketten. Fab = antigenbindendes Fragment, Fv = variables Fragment, scFv = einzelkettiges Fv.

mente bestehen im Wesentlichen nur aus den antigenbindenden variablen Domänen. Sie werden zur Stabilisierung mit Peptidlinkern verbunden (scFv). Außerdem können Antikörper durch biochemische Modifizierungen auch als ortsspezifische Lieferanten für Radioisotope, Toxine und Zytostatika verwendet werden. Bispezifische Antikörper mit ganz neuen Eigenschaften werden als Produkte von Quadromen (Fu-

sionen aus zwei antikörperproduzierenden Hybridomzellen) oder rekombinant als kleinere Fragmente hergestellt.

3.1.4 Antikörpergenetik

Die Antikörpergene sind im Genom auf drei Cluster verteilt, IGK, IGL und IGH (Lefranc und Lefranc 2001). In der Maus liegt die κ Gruppe auf Chromosom 6, die λ Gruppe auf 16 und die schwere Ketten Gruppe auf Chromosom 12. Beim Menschen liegt IGK auf Chromosom 2, IGL auf 22 und IGH auf Chromosom 14. Die Organisation der Immunglobulingene in der Keimbahn des Menschen ist in Abbildung 3-5 dargestellt.

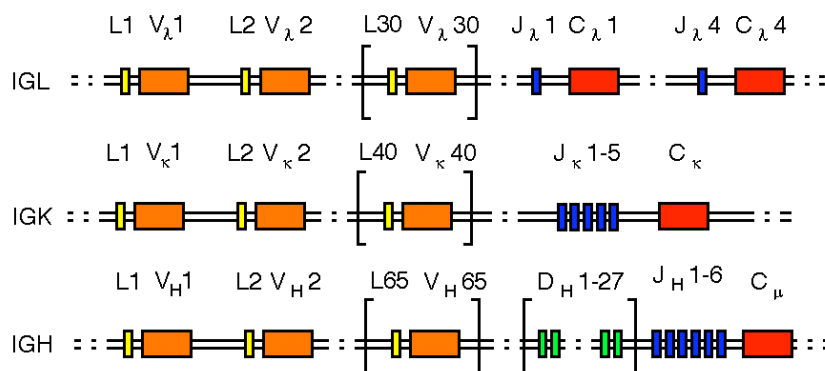


Abbildung 3-5: Genomische Organisation der Loci für die schweren und leichten Ig Ketten in der Keimbahn des Menschen (nach Janeway et al. 2002). IGL = Genlocus der leichten λ Kette, IGK = Genlocus der leichten κ Kette, IGH = Genlocus der schweren Kette. L = Leaderexon, V = variables Exon, J = joining Exon, D = diversity Exon.

Die Synthese der schweren und leichten Immunglobulinketten erfordert während der B-Zell-Entwicklung Umlagerungen der DNA in diesen drei Genorten (Brack *et al.* 1978, Weigert *et al.* 1980, Tonegawa 1983). Die ersten Umlagerungen finden während der Reifung im Knochenmark statt. Sie führen zum Übergang der hematopoietischen Stammzelle in eine reife, IgM und IgD exprimierende B-Zelle und sind antigenunabhängig. Die dann folgenden Differenzierungsschritte werden durch Antigenerkennung und Ko-Stimulation durch eine T-Helfer-Zelle ausgelöst. Die B-Zelle wandert in die Keimzentren peripherer lymphatischer Organe und durchläuft dort somatische Hypermutation und Isotypwechsel. Die terminal differenzierten Plasmazellen sezernieren Antikörper verschiedener Klassen oder Subklassen, die unterschiedliche Affinitäten gegenüber dem stimulierenden Antigen aufweisen.

Kombinatorische Vielfalt

Die Umlagerungen beginnen am IGH Locus. Dieser enthält V (variable), D (diversity) und J (joining) Gene. Zunächst wird ein IGHD mit einem IGHJ Gen verbunden, dann ein IGHV mit dem IGHD-J Gen rekombiniert. Diese Rekombinationen benötigen RS (Rekombinationssignal) Sequenzen, die 3' der V Gene und 5' der J Gene und zu beiden Seiten der D Gene liegen (Sakano *et al.* 1979). Die RS Sequenzen bestehen

aus einer palindromischen, konservierten Heptamer und einer A-T-reichen Nonamer Sequenz, die durch einen nicht konservierten Spacer von 12 oder 23 Nukleotiden voneinander getrennt sind. Rekombinationen erfolgen nach der 12/23-Regel nur zwischen RS Sequenzen mit verschiedenen langen Spacern (Early *et al.* 1980).

Das rearrangierte IGHV-D-J Gen wird zusammen mit dem IGHM Gen transkribiert, weil es von allen IGHC Genen in deren Lokus am weitesten 5' liegt. Wenn auf diese Weise eine μ Kette produktiv umgelagert wurde, werden weitere Umlagerungen des anderen Allels unterdrückt (allelischer Ausschluss). Eine unproduktive Umlagerung führt dagegen zu weiteren Umordnungen am anderen μ Allel. Sind beide Umordnungen unproduktiv, stirbt die Zelle durch Apoptose. Nach einer produktiven Umordnung der Gene der schweren Kette folgt die V-J Umordnung der Gene der leichten Ketten.

Durch die verschiedenen Kombinationen der V-(D)-J Elemente und zweier schwerer und leichter Ketten entsteht theoretisch eine Antikörpervielfalt von $3,5 \cdot 10^6$, einem Vielfachen der im Genom enthaltenen antikörperkodierenden Gene. Die D und J Elemente leisten einen großen Beitrag zur Entstehung der Antikörpervielfalt, weil sie in oder in der Nähe der dritten hypervariablen Region liegen und so zur Spezifität der Antigenbindungsstelle beitragen.

Junktionale Vielfalt

Bei den Kombinationen der V-(D)-J Elemente wird in den B-Lymphozyten-Genen eine zusätzliche Vielfalt erzeugt, durch Entfernung und Hinzufügung von Nukleotiden an den Enden der zusammenzufügenden DNA. Der Mechanismus beim Entfernen der Introns zwischen den zusammenzufügenden Elementen durch RAG Enzymkomplexe („rearrangement activating genes“) führt zur Entstehung von palindromen P-Nukleotiden (Lewis 1994). Anschließend werden beim Aufschneiden der Haarnadelstrukturen, die der RAG Komplex erzeugt hat, durch das Enzym TdT (Terminale Desoxynukleotidyltransferase) bis zu 20 völlig zufällige N-Nukleotide angehängt (Landau *et al.* 1984).

Die entstehende P- und N-Nukleotid-Diversität ist eine der Hauptursachen für die CDR3 Variabilität (Alt und Baltimore 1982).

Somatische Hypermutation

Während der B-Zell Reifung in den Keimzentren der peripheren lymphatischen Organe wird die Antikörpervielfalt durch somatische Hypermutation ein weiteres Mal erhöht (MacLennan 1994). Somatische Hypermutation führt zu einer gegenüber spontanen Mutationen ca. 1 Millionfach erhöhten Mutationsrate (10^{-5} bis 10^{-3} bp/Generation) (Rajewsky *et al.* 1987). Diese Mutationen sind zumeist Punktmutationen. Sie treten überwiegend in Hotspots bestimmter Aminosäuremotive und aus-

schließlich in V-J oder V-D-J Genen während der antigenabhängigen B-Zell Entwicklung auf (Bardwell *et al.* 2004, Rada und Milstein 2001). Dabei ist die Rate von Aminosäureaustausch- zu stillen Mutationen in den CDRs Antikörper exprimierender Gene höher als in den Gerüstregionen. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass Mutationen in den Gerüstregionen eher zu einem Verlust der Affinität zum Antigen führen, weil durch sie die komplette Struktur der variablen Domänen verändert wird (Manser 1990). Mutationen in den CDRs dagegen können bei gleich bleibender Konformation der variablen Region eine veränderte Antigenbindestelle erzeugen (Chothia *et al.* 1989). Derartige Mutationen werden positiv selektioniert, wenn sie die Affinität des Antikörpers erhöhen.

Junktionale Vielfalt und somatische Hypermutation erhöhen das durch kombinatorische Vielfalt entstehende Antikörperrepertoire von $3,5 \cdot 10^6$ auf geschätzte 10^{11} oder mehr verschiedene Antikörpermoleküle.

Isotypwechsel

Eine reife B-Zelle, die noch keinen Antigenkontakt hatte, exprimiert auf ihrer Oberfläche gleichzeitig IgM und IgD mit gleichen variablen Domänen. Ursache hierfür ist die Synthese einer sehr langen IGHV-D-J-C μ -C δ pre-mRNA in den B-Zellen. Aus dieser gehen durch alternatives Spleißen entweder IGHV-D-J-C μ oder IGHV-D-J-C δ mRNAs hervor, die anschließend in IgM oder IgD Membranantikörper translatiert werden.

Nach Antigenkontakt schalten B-Zellen von der IgM und IgD Expression um, und synthetisieren entweder IgG oder IgA oder IgE Moleküle gleicher Spezifität. Das wird dadurch ermöglicht, dass das rearrangierte IGHV-D-J Gen, das bis dahin mit dem C μ Gen assoziiert war, in die Nachbarschaft eines der anderen IGHC Gene gebracht wird. Die hierzu erforderliche Rekombination erfolgt zwischen Switch μ und einer der anderen Switch Regionen, die 5' von jedem IGHC Gen liegen (Esser und Radbruch 1990, Cogne *et al.* 1994, Li *et al.* 2004). Dieser Isotypwechsel passiert in den lymphoiden Follikeln und erfordert die Bindung von T-Zell-CD40-Ligand an CD40 auf der B-Zell Oberfläche (Villa *et al.* 1994, Geha und Rosen 1994, Renshaw *et al.* 1994) sowie die Gegenwart von Interleukinen (Finkelman *et al.* 1990, Coffman *et al.* 1993).

3.2 Generierung von Antikörpern definierter Spezifitäten

3.2.1 Monoklonale Antikörper

Auf der Suche nach Antikörpern einer definierten Spezifität wurden schon früh Myelomproteine auf Antigenbindung gescreent (Potter 1977). Der Durchbruch zur Her-

stellung monoklonaler Antikörper gelang Köhler und Milstein 1975, als sie durch Zellfusion stabile Zelllinien erzeugten, die Antikörper einer vorbestimmten Spezifität produzierten (Köhler und Milstein 1975, 1976). Bei der Zellfusion, die heute im Wesentlichen noch genauso wie damals durchgeführt wird, werden Zellen einer HAT-sensitiven (s.u.) Myelomzelllinie mit Milzzellen einer immunisierten Maus hybridisiert. Normale Milzzellen überleben in Kultur nur einige Tage. Die verwendeten HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) defizienten Myelomzellen sind in Medium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) nicht lebensfähig. Nur Hybridome, in denen die Myelomzelle die Unsterblichkeit und die Milzzelle die fehlende Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase zur HAT Resistenz beisteuert, überleben die chemische Selektion. Nach der Selektion werden durch limitierte Verdünnung Einzelzellklone hergestellt, die auf ihre Antikörperspezifität und Produktion analysiert werden können.

Verändert wurden an Köhler und Milsteins Protokoll bis heute nur die Vermittlung der Fusion durch PEG (Pontecorvo *et al.* 1976, Galfrè and Milstein 1981) statt des initial benutzten Sendai Virus und die Verwendung von weiterentwickelten Myelomzellen. Die ursprüngliche Fusion einer Immunglobulin produzierenden Myelomzelllinie mit den B-Lymphoblasten der immunisierten Maus führte dazu, dass die Hybridomzellen Antikörper mit schweren und leichten Ketten beider parental Zellen in sämtlichen Kombinationen exprimierten. Die heute verwendeten Myelomzellen synthetisieren aufgrund genomischer Mutation im Gegensatz zum von Köhler und Milstein verwendeten MOPC-21 Myelom (von Horibata und Harris 1970, später P3K oder P3 genannt) keine eigenen schweren und leichten Immunglobulinketten mehr. Am weitesten verbreitet ist wegen ihrer hohen Fusionsrate und einfachen Kultivierung die Linie X63-Ag8.653 (Kearney *et al.* 1979).

Für viele Anwendungen wären monoklonale Antikörper menschlichen Ursprungs von großem Nutzen, besonders für die Verabreichung an Menschen z.B. im Rahmen der Tumormimmuntherapie, der Neutralisierung von Toxinen und Viren (siehe Abschnitt 3.1.2) und der Behandlung der Transplantatabstoßung.

Trotz großer Anstrengungen können aber humane monoklonale Antikörper nicht einfach hergestellt werden. Es ist bisher kein therapeutischer Antikörper auf dem Markt, der von einer humanen Hybridomzelllinie produziert wird. Die Probleme bei der Herstellung menschlicher Hybridome sind vielschichtig. Zum Einen fehlt ein geeigneter Fusionspartner. Die meisten der zur Fusion verwendeten menschlichen Myelomzelllinien erwiesen sich als Epstein-Barr Virus transformierte B-lymphoblastoide Linien. Sie haben sehr geringe Immunglobulin Produktionslevel, wachsen in großen Klumpen und sind als Hybride in Langzeitkultur instabil (James

und Bell 1987, Thompson 1988). Es gibt einige Heteromyelome, für welche die Mauslinie X63-Ag8.653 als Fusionspartner verwendet wurde, und die nach zahlreichen Subklonierungen als stabil bezeichnet werden (Thompson 1988). Ein weiteres Problem ist die Quelle der menschlichen B-Zellen. Die einzigen einfach zur Verfügung stehenden Zellen stammen aus dem peripheren Blut. Diese proliferieren aber nicht und sind für die Fusion ungeeignet. Lymphoblasten fusionieren ungleich besser als ruhende B-Zellen. Wenn diese dennoch fusionieren, führen sie meist zu niedrig affinen IgM Antikörpern. Darüber hinaus ist es aus ethischen Gründen nur sehr eingeschränkt möglich, Menschen mit beliebigen Antigenen zu immunisieren. (Eine Ausnahme stellen die notwendigen Schutzimpfungen z.B. gegen Tetanus dar.) Außerdem sind viele therapeutisch relevante Antigene Autoantigene, gegen die im menschlichen Organismus keine Immunantwort erzeugt würde.

Der erfolgreichere Weg um an weniger immunogene Antikörper zu gelangen bedient sich also nicht menschlicher Hybridome, sondern der Chimärisierung eines von einer Maushybridomzelle produzierten Antikörpers. Dafür werden die Mausgene, welche die konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten kodieren, durch ebendiese Gene des Menschen ersetzt (Fell *et al.* 1989; Shulman *et al.* 1990). Das Einschleusen der menschlichen Gene in das Genom der Maushybridomzellen geschieht durch Homologe Rekombination (siehe Abschnitt 4.3.4). Da homologe Rekombination ein sehr seltenes Ereignis ist, wurden dabei immer Resistenzgene wie z.B. das Neomycinphosphoryltransferase II Gen (NPTII) zur anschließenden Positivselektion mit in das Genom eingeführt (Kardinal *et al.* 1995, Sun *et al.* 1994, Mocikat *et al.* 1995). Dies ist problematisch, denn die mit integrierten Resistenzgene verändern die Umgebung des Zielgenortes und führen häufig dazu, dass die Expression des Zielgens drastisch verringert wird (Colledge *et al.* 1995, Meyers *et al.* 1998).

Die weitere komplette Humanisierung von Hybridomantikörpern erfordert das Ersetzen der von der Maus stammenden CDRs durch humane CDRs. Dazu werden die CDRs der variablen Domänen in Expressionsvektoren mit menschlichen Immunglobulingenen verpflanzt (Borrebaeck *et al.* 1992, Mayforth 1993, Winter 1993, Owens und Young 1994), und danach die Antikörper zumeist in COS Zellen (transient) oder CHO Zellen (stabil) produziert (Little *et al.* 2000). Nachteilig ist hier, dass die Antikörper anschließend nicht mehr in den auf Antikörperproduktion im großen Maßstab spezialisierten Hybridomzellen produziert werden können. Außerdem ändert sich auch bei sehr überlegter Auswahl der verpflanzten CDRs die dreidimensionale Struktur des Antikörpers, so dass in den meisten Fällen die Affinität des humanisierten Antikörpers reduziert ist, bis hin zum möglichen Verlust der Antigen-spezifität.

Außerdem ist das Verfahren langwierig und muss für jeden neuen Antikörper erneut durchgeführt werden.

Erfolgreich humanisierte Antikörper können im menschlichen Organismus trotzdem Immunreaktionen verursachen (HAHA = human anti-humanized antibodies), die aber in der Regel viel schwächer sind als bei nicht humanisierten.

Die Gewinnung monoklonaler Hybridomantikörper und die Chimärisierung bzw. Humanisierung bestehender Maus Hybridomantikörper ist sehr zeit- und arbeitsintensiv und mit verschiedenen technischen Unsicherheiten behaftet. Im Folgenden werden alternative Techniken vorgestellt, durch die humane monoklonale Antikörper gewonnen werden.

3.2.2 Humane Antikörper produzierende Mäuse

Der bisher effizienteste Weg zur Herstellung humaner Antikörper wird durch die Erzeugung transgener Mäuse ermöglicht. In diesen Mäusen wurde das endogene Immunoglobulin Genrepertoire inaktiviert und statt dessen ein Großteil des humanen Antikörper Repertoires in die Keimbahn eingefügt (Green *et al.* 1994, Wagner *et al.* 1994, Jakobovits 1995 und www.medarex.com/development/evolution.htm). Die Immunisierung dieser Mäuse mit einem Antigen führt zur Bildung spezifischer, komplett humaner Antikörper (Mendez *et al.* 1997, Davis *et al.* 1999). Mittels klassischer Hybridomtechnologie (Abschnitt 3.2) können monoklonale Antikörper gewonnen werden. Diese Antikörper sind relativ hoch affin, weil sie in der Maus somatische Hypermutation und Selektion durchlaufen haben (He *et al.* 2002). Mit einer Reihe von Antigenen wurden in solchen Mäusen für therapeutische Zwecke schon erfolgreich humane Antikörper gewonnen, z.B. gegen HIV-1 (Yuxian *et al.* 2002), gegen Interleukin 8 (Yang *et al.* 1999a) und gegen den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) (Yang *et al.* 1999b).

Ein bedeutender Vorteil dieser transgenen Mäuse ist, dass die gebildeten Antikörper nicht aufwendig und nicht unter Gefahr des Verlustes der Spezifität chimärisiert bzw. humanisiert werden müssen.

3.2.3 Rekombinante Antikörper

Rekombinante Antikörper sind gentechnologisch meist in Bakterien *in vitro* hergestellte Antikörperfragmente, die über ihre Antigen-spezifität definiert sind (Skerra und Plückthun 1988, Better *et al.* 1988). Die Spezifität wird entweder durch Abschreiben der variablen Domänen eines bestimmten Hybridoms oder durch Isolierung z.B. aus einer Phagenbibliothek erzeugt.

Die Produktion kompletter funktioneller Antikörpermoleküle wie z.B. IgG in *E.coli* ist aber bisher nicht möglich. Schon Fab Fragmente, die ungefähr doppelt so groß sind wie scFv Fragmente, werden oft mit geringen Ausbeuten produziert (Skerra und Plückthun, 1991). Daher eignen sich für die Produktion in *E.coli* nur Fv oder Fab Fragmente. Aufgrund der nichtkovalenten Verbindung der Ketten von Fv Fragmenten, die löslich in *E.coli* produziert wurden, sind diese Fragmente extrem instabil (Glockshuber *et al.* 1990). Aus diesem Grund wurden scFv Fragmente erzeugt, deren V_H und V_L Domänen mit einem flexiblen Peptidlinker von 15-20 Aminosäuren verbunden sind. Diese scFv Fragmente haben unter physiologischen Bedingungen eine etwas höhere Stabilität (Huston *et al.* 1988, Bird *et al.* 1988). Aufgrund der Flexibilität der Peptidlinkerverbindung sind die variablen Domänen aber gegeneinander beweglich und assoziieren auch mit Ketten anderer scFv-Moleküle. Dadurch bilden sich besonders bei höheren Konzentrationen Aggregate von verbundenen scFv Antikörperfragmenten, die dann ausfallen.

Verglichen mit kompletten Antikörpern haben die kleinen scFv Antikörperfragmente wie auch Fabs den Vorteil, dass sie bei gleicher Bindungsspezifität eine bessere Pharmakokinetik für Gewebegängigkeit aufweisen. Andererseits besitzen sie aufgrund ihrer Monovalenz höhere Dissoziationsraten und geringere Verweilzeit auf dem Antigen (Goel *et al.* 2001, Adams *et al.* 2001). Um diesen Nachteil auszugleichen, werden sie miteinander zu dimeren, trimeren oder tetrameren Konjugaten verbunden (Tomlinson und Holliger 2000, Todorovska *et al.* 2001).

Die Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in *E.coli* bietet analog zu Hybridomzellen und eukaryontischen Expressionssystemen den Vorteil der Unsterblichkeit und der definierten Spezifität für ein Epitop. Bakterienklone sind in Handhabung, Kultur, Analyse und Lagerung einfach und günstig, und es steht für die Modifikation und Analyse der Antikörpergene die ganze Technologie der *E.coli* Genetik zur Verfügung. Antikörperfragmente können so humanisiert oder mit heterologen Genen zu chimären Molekülen mit neuen Funktionen verbunden werden. Problematisch ist allerdings, dass in *E.coli* die Veränderung eines einzigen Codons die Expression der Antikörperfragmente drastisch beeinflussen kann (Duenas *et al.* 1995, Knappik und Plückthun 1995, Ulrich *et al.* 1995). Eine Untersuchung von 512 Mutanten zeigte, dass 10% zufälliger Punktmutationen in den CDRs die Produktion der Antikörper in *E.coli* behinderte (Ito *et al.* 1993). Das bedeutet für die Steigerung der Affinität rekombinanter Antikörper durch abwechselnde Zyklen aus Mutagenese und Selektion (siehe Abschnitt 3.3.4), dass ein höher affiner Antikörper unter Umständen anschließend nicht mehr in *E.coli* produzierbar ist. Andererseits ist natürlich die Produzierbarkeit durch einige Mutationen auch steigerungsfähig.

Für die Expression größerer Antikörperfragmente oder kompletter Immunglobuline stehen verschiedene eukaryontische Expressionssysteme zur Auswahl, so z. B. Hefen, Baculovirus infizierte Insektenzellen und verschiedene Säugerzelllinien (Breitling und Dübel 1997). Diese sind besser als *E. coli* in der Lage, größere Fragmente, welche die CH3 Region oder den Fc Teil von Antikörpern beinhalten, zu exprimieren. Die Expression von kompletten, funktionellen Antikörpermolekülen ergibt aber meist nur sehr geringe Ausbeuten. Ein großer Vorteil der Expression von Antikörpermolekülen in Säugetierzellen ist, dass in ihnen eine vollständige und korrekte Glycosylierung der Proteine stattfindet. Die Art der Glycosylierung ist für die biologische Funktion des Antikörpers wichtig.

3.3 Antikörperbibliotheken

In vitro erzeugte Antikörperdisplay-Bibliotheken mit einem großen Repertoire natürlicher und synthetischer Antikörperspezifitäten (O'Connell *et al.* 2002, Hoogenboom und Chames 2000, Krebs *et al.* 2001) stehen in Konkurrenz zur derzeit klar dominierenden klassischen Hybridomtechnologie. Mit diesen Bibliotheken können spezifische Antikörper samt der sie kodierenden Gene isoliert werden. Die Antikörper werden in den Bibliotheken normalerweise als monovalente Fab oder scFv Fragmente exprimiert und müssen, wenn erforderlich, nach der Isolierung zur Expression intakter Immunglobuline oder multivalenter Varianten in Expressionsvektoren zusammengebaut werden (O'Connell *et al.* 2002, Nagy *et al.* 2002). Die anschließende Produktion großer Antikörpermengen ist dann aber, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, problematisch.

Bei der Erzeugung der Vielfalt in den Antikörperbibliotheken dient das Immunsystem als Vorbild. In Säugetieren wird die Antikörperdiversität durch Kombination verschiedener Ketten, Zusammenspleißen unterschiedlicher Regionen von Antikörpergenen, zufällige Addition von Sequenzen ohne DNA Matrize und somatische Hypermutation erreicht (siehe Abschnitt 0 und Winter und Milstein 1991). Dieses Repertoire kann durch PCR direkt von der cDNA eukaryontischer B-Lymphozyten abgeschrieben werden, wobei es zwei Möglichkeiten für das Design der Primer gibt. Entweder es werden passende Primerpaare zur Amplifikation jeder variablen Subgruppe erstellt (Marks *et al.* 1991a), oder es werden degenerierte Primer entworfen, welche die meisten oder alle variablen Gensubgruppen vervielfältigen (Larrick *et al.* 1989). Eine komplette auf dem natürlichen, naiven Repertoire basierende Bibliothek erfordert die Fähigkeit, alle möglichen in der Keimbahn vorkommenden Antikörpergene zu amplifizieren (Tomlinson *et al.* 1992, Cox *et al.* 1994). Noch weiter erhöht werden können die Komplexitäten der Bibliotheken, indem bei der Amplifizierung der Antikörpergene

an bestimmten Positionen, vornehmlich in den sechs CDRs, Nukleinsäuren nach dem Zufallsprinzip mutiert oder zusätzlich eingefügt werden (Barbas *et al.* 1992, Huse *et al.* 1993)

Das Ziel ist es, große Antikörperbibliotheken zu schaffen, deren Repertoire möglichst viele verschiedene Spezifitäten umfasst. Je größer die Komplexität einer Bibliothek, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass in einem einzigen Selektionsschritt und ohne weitere Modifikation der isolierten variablen Domänen hochaffine Antikörper gegen interessante Antigene gewonnen werden können.

Die erste naive humane Bibliothek war eine Bakteriophagen-Display Bibliothek, die auf IgM scFv Fragmenten basierte. Sie beinhaltete ca. 10^7 Spezifitäten. Mit ihr konnte klar gezeigt werden, dass es möglich ist, auf diese Weise zu Antikörpern zu gelangen (Marks *et al.* 1991b), wenn diese auch von relativ geringer Affinität waren.

3.3.1 Bakteriophagen Display

Phagenbibliotheken sind derzeit die am weitesten verbreitete Methode, um große Repertoires von Antikörperfragmenten darzustellen und auf ihre Affinität zu klinisch relevanten Zielmolekülen hin zu untersuchen (Hoogenboom und Chames 2000, Nagy *et al.* 2002, Huie *et al.* 2001, Liu *et al.* 2002). Hierzu werden Antikörperfragmente mit Hilfe der Fusion an das Phagenhüllprotein pIII auf der Oberfläche filamentöser Phagen verankert. Die direkte Verankerung von scFv Fragmenten auf der Phagenoberfläche hat schwerwiegende Nachteile für die Expression in Bakterien (McCafferty *et al.* 1990). Die Fusionsanteile beeinträchtigen die Replikation des Phagen, wodurch ein negativer Selektionsdruck gegen Antikörperfragmente exprimierende Phagen ausgeübt wird. Diese Probleme werden durch die Verwendung von Phagemidvektoren umgangen (Breitling *et al.* 1991, Barbas *et al.* 1991, Hoogenboom *et al.* 1991). Ein Phagemid ist ein Plasmid, das zusätzlich alle Signale für die Verpackung in Phagenpartikel enthält. Der Einbau geschieht durch Helferphagen, die alle anderen Eigenschaften filamentöser Phagen besitzen. Im Phagemid wird das Fusionsprotein nicht konstitutiv exprimiert, sondern unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Bau und Vervielfältigung der Antikörperbibliothek sind damit unabhängig von der Expression der Antikörperfragmente, was den Selektionsnachteil entscheidend mildert.

Nach Verpackung der Antikörperbibliothek in Phagenpartikel exprimieren diese auf der Oberfläche die Antikörperfragmente. Auch heterodimere Fab Fragmente können auf der Phagenoberfläche derart zusammengesetzt werden, dass sie Antigenaffinität behalten (Hoogenboom *et al.* 1991). Auf diese Weise können auch kombinatorische Bibliotheken auf Phagen exprimiert werden (Zebedee *et al.* 1992, Barbas *et al.* 1991,

Hoogenboom *et al.* 1991, Kang *et al.* 1991a, b). Mit Hilfe von immobilisiertem Antigen können bindende von nicht bindenden Phagen abgetrennt werden. Auch ein differenzielles Screening ist möglich, indem zunächst ungewünschte Spezifitäten entfernt und erst anschließend gewünschte Antigenspezifitäten gesucht werden. Mit den isolierten Phagen können erneut Bakterien infiziert werden, die anschließend Phagenpartikel für die nächste Selektionsrunde produzieren (klonale Selektion).

Die größte Komplexität wird bisher in rekombinierenden Phagenbibliotheken erreicht. Dazu werden mit dem Cre-loxP System Gene der schweren und leichten Ketten rekombiniert (Waterhouse *et al.* 1993). Limitiert durch die Rekombinationseffizienz wurden bisher Komplexitäten von ca. 10^{10} unabhängigen Antikörpergenen erreicht, aus denen vereinzelt auch schon relativ affine Antikörper selektioniert wurden (Griffiths *et al.* 1994, Nissim *et al.* 1994, Zarah *et al.* 1999).

Die Verwendung von Phagen zum Antikörperfragment Display hat gegenüber Bakterien den Vorteil, dass sie sehr einfach zu extrem hohen Titern herangezogen werden können.

3.3.2 Zelloberflächendisplay

Rekombinante Antikörper können auch auf Bakterien-, Hefe- und Hybridomzellen präsentiert werden. Durch die Technologie der Hochgeschwindigkeitsdurchflussszytometrie ist es möglich, mit Hilfe eines fluoreszenzabhängigen Zellseparators derartige Antikörperbibliotheken nach bestimmten Antigenspezifitäten zu durchsuchen. Hierzu werden die antikörperpräsentierenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Antigen gefärbt und anschließend mit Hilfe des FACS (fluorescence activated cell sorter) von den nicht leuchtenden Zellen abgetrennt (Francisco *et al.* 1993, Fuchs *et al.* 1996).

Mittels dieser Methodik wurden schon einige hoch affine Antikörper isoliert (Boder *et al.* 2000, Daugherty *et al.* 2000).

3.3.3 Bibliotheken aus mRNA-Protein-Komplexen

Beim Ribosomendisplay bilden stabilisierte Komplexe aus Antikörper, Ribosom und mRNA die Plattform, auf der die Antikörper exponiert werden (Hanes *et al.* 2000, Wilson *et al.* 2001, Irving *et al.* 2001). Die Ribosomenkomplexe werden komplett *in vitro* gebildet. Dadurch dass keine Zelltransformation notwendig ist, können sehr große Bibliotheken von bis zu 10^{14} Spezifitäten gebildet werden.

Dieses System erfordert eine absolut RNase freie Handhabung. Außerdem ist die korrekte Faltung der synthetisierten Antikörper in dem umgebenden Puffer nur eingeschränkt möglich. Dennoch wurden mit diesem System schon Antikörper mit einer Affinität im pikomolaren Bereich isoliert (Hanes *et al.* 2000, Irving *et al.* 2001). Anschließende Affinitätsreifungszyklen sind in dem *in vitro* System vergleichsweise einfach.

Alternativ zum Ribosomendisplay können Antikörper auch kovalent über Pyromycin stabilisierte mRNA-Protein-Komplexe exponiert werden (Weng *et al.* 2002, Xu *et al.* 2002).

3.3.4 Affinitätsreifung: Mutagenese und Selektion

Da die Mehrzahl der Antikörper, die bisher aus diesen Bibliotheken isoliert wurden, nur relativ geringe Affinitäten zu ihrem Antigen besitzen, wurden Methoden entwickelt, um die Affinität dieser Antikörper zu steigern. Diese Strategien sind an die somatische Hypermutation *in vivo* angelehnt. Ein über die Affinität des kodierten Antikörperfragmentes aus einer Bibliothek isoliertes Gen wird mehreren Runden abwechselnder Mutagenese und Selektion unterzogen, wodurch sich die Affinität des Antikörperfragmentes sukzessive erhöht. Techniken zur Einführung von zufälligen Mutationen in die variablen Domäne sind z.B. Error-Prone PCR (Gram *et al.* 1992, Deng *et al.* 1994), E.coli Mutator Stämme oder mutagene Enzyme wie mRNA reverse Transkriptase und DNA Polymerasen ohne Proofreadingaktivität (Poltoratsky *et al.* 2001). Auch zufällige Mutagenese an bestimmten Zielorten (Hermes *et al.* 1989) und zielgerichtete Mutagenese basierend auf strukturellen Informationen (Hawkins *et al.* 1993, Yamagashi *et al.* 1990) werden verwendet. Durch „chain shuffling“ (Clackson *et al.* 1991, Marks *et al.* 1992, van der Linden *et al.* 2000) werden die Paarungen von schweren und leichten Ketten für eine bestimmte Antigen-spezifität optimiert. Dazu wird immer abwechselnd eine der Ketten fest auf z.B. der Phagenoberfläche exprimiert und eine Vielzahl des anderen Kombinationspartners in Lösung angeboten. Affinere Paarungen werden ausgelesen.

Zielgerichtete Mutagenese, welche die Gerüstregionen ausnimmt, führt seltener zum kompletten Verlust der Antikörperspezifität und ist daher nach somatischer Hypermutation häufiger zu finden (siehe Abschnitt 0). Die Voraussage der Phänotypen, die durch einzelne Aminosäureaustausche verursacht werden steckt aber noch in den Anfängen, so dass bisher zur Verstärkung der Affinität die Zyklen zufälliger Mutation und Selektion effektiver waren als präzise modulierte Veränderungen (Hanes *et al.* 2000, Boder *et al.* 2000). Interessanterweise haben aber gerade Mutationen in den Gerüstregionen auch schon sehr große Steigerungen der Antigenaffinität, Stabilität

und Expression von Antikörpern herbeigeführt (Hanes *et al.* 2000, Boder *et al.* 2000, Irving *et al.* 2001).

3.4 Monoklonale Antikörper als Tumorthapeutika

Die Spezifität von Antikörpern wird in der Onkologie zur zielgerichteten Zytolyse von Tumorzellen genutzt. Verglichen mit der traditionellen zytotoxischen Chemotherapie erzeugt die Immuntherapie erheblich weniger Nebenwirkungen.

Voraussetzung für die therapeutische Wirksamkeit eines Antikörpers ist, dass er spezifisch Tumorzellen bindet und normale Körperzellen möglichst ignoriert. Zielantigene müssen also auf Tumorzellen entweder selektiv oder verglichen mit normalen Zellen stark überexprimiert sein. Sie müssen stabil und zugänglich für den Antikörper auf den Oberflächen der Zellen exponiert werden, damit der Antikörper sie erkennen kann. Weiterhin ist wichtig, dass die tumorspezifischen Antigene möglichst von allen Tumorzellen exprimiert werden, damit bei der Behandlung nicht eine Subpopulation von nicht das Antigen präsentierenden Tumorzellen überlebt, die anschließend wieder zu einem neuen, gegen die Immuntherapie resistenten Tumor heranwächst. Am Besten gewährleistet ist das bei Antigenen, die eine funktionelle Rolle bei der Tumorentwicklung haben, wie z.B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Dadurch wird ausgeschlossen, dass sie bei der Tumorprogression durch akkumulierende Mutationen verloren gehen. Es ist von Vorteil, wenn das Zielantigen von einem möglichst breiten Spektrum verschiedener Tumortypen exprimiert wird, damit der Antikörper am Ende eine breite Anwendbarkeit hat.

Die meisten der klinisch zugelassenen oder in Phase-III Studien befindlichen Antikörper sind gegen Antigene gerichtet, die direkt auf Tumorzellen exprimiert sind. Diese lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen.

Die Mehrheit der therapeutischen Zielantigene sind Zelloberflächenrezeptoren wie z.B. Rezeptortyrosinkinasen (Zwick *et al.* 2002), die für die Zelle und deren malignen Phänotyp essentielle Signalwege vermitteln (Trastuzumab, Bevacizumab und Cetuximab, siehe Tabelle 3-1).

Eine andere große Kategorie von Tumorzelloberflächenantigenen sind leukozytäre Differenzierungsantigene (cluster of differentiation, CD). So sind CD20, CD22, CD33 und CD52 auf der Membran von Leukämien und malignen Lymphomen stark ausgeprägt. Einige Beispiele therapeutischer anti-CD Antikörper sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Weitere Zielantigene für therapeutische Antikörper sind onkofetale Proteine, die normalerweise in embryonalen Geweben transient, in normalem erwachsenen Gewebe nicht, aber in Tumorgewebe wieder exprimiert sind.

Außerdem zielt die Tumormimmuntherapie zusätzlich zu den auf Tumorzellen selbst exprimierten Antigenen auch auf Antigene ab, die nur indirekt mit den Tumorzellen assoziiert sind. Dazu gehören z.B. die tumorversorgenden Blutbahnen, denn Tumorstromawachstum ist abhängig von der Bildung neuer Blutgefäße. Antikörper zur Blockade der Angiogenese haben den Vorteil, dass die erkannten Antigene genetisch stabil auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden, so dass die Gefahr des Antigenverlusts gering ist. Außerdem können diese Antikörper bei zahlreichen verschiedenen Tumortypen Anwendung finden und sind für normale Gewebe nur gering toxisch (Folkman *et al.* 2001). Prototypen solcher Zielstrukturen sind z.B. der VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) Signalweg und Zelladhäsionsmoleküle (Hicklin *et al.* 2001).

Auch Antigene, die bei der Interaktion des Tumors mit seinem Wirt eine Rolle spielen, stellen mögliche Angriffspunkte für die Immuntherapie dar. Dazu gehören Tumorstromazellen, verschiedene lösliche Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine.

Name Handelsname	Antigen	Mechanismus	Antikörperformat	Tumor Indikation	Referenz
Edrecolomab 17-1A (Panorex®)	EpCAM	ADCC und CDC,	IgG2a, murin	kolorektale Karzinome	Riethmüller <i>et al.</i> 1998
Rituximab (Rituxan®/ MabThera®)	CD20	ADCC, CDC, direkte Apoptoseinduktion.	IgG1, chimärisierter Ibritumomab	NHL	Grillo-Lopez <i>et al.</i> 2002
Trastuzumab (Herceptin®)	HER2	Inhibition der HER2-vermittelten Tumorzellproliferation und Migration.	IgG1, humanisiert	Brustkrebs	Leyland-Jones 2002
Alemtuzumab (Campath-1H®)	CD52	ADCC, CDC.	IgG1, humanisiert	CLL	Ferrajoli <i>et al.</i> 2001
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)	CD33	Schleust Calicheamicin in Leukämiezellen ein, was zu DNA Brüchen und Apoptose führt.	IgG4, humanisiert, Calicheamicin gekoppelt	AML	Sievers und Linenberger 2001
Bevacizumab (Avastin™)	VEGF	Hemmt VEGF induzierte Angiogenese.	IgG1, humanisiert	Darm-, Nieren-, Lungen-, Brustkrebs	Willet <i>et al.</i> 2004
Cetuximab (Erbix™)	EGFR (HER1) (c-erbB1)	Inhibiert EGFR-vermittelte Tumorzell Invasion, Proliferation, Metastasierung und Angiogenese.	IgG1, chimär	Pankreas-, Darmkrebs u.a.	Herbst und Langer 2002
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin™)	CD20	Liefert zytotoxische Strahlung, ADCC, CDC, Apoptose.	IgG1, murin, ⁹⁰ Y Konjugat	NHL	Goldenberg 2001
HEA125 X OKT3	EpCAM X CD3	Tumorzellyse. Bindet EpCAM überexprimierende Tumorzellen und aktiviert T-Zellen durch CD3 Bindung.	IgG1, murin	Ovarialkarzinom mit Ascites-bildung	Marmé <i>et al.</i> 2002

Tabelle 3-1: Beispiele für die Verwendung monoklonaler Antikörper in der Tumorthherapie. Antikörperendungen: murin = ‚omab‘, chimär = ‚ximab‘, humanisiert = ‚zumab‘, human = ‚umab‘. AML = akute myeloische Leukämie, CLL = chronische lymphatische Leukämie, NHL = non-Hodgkins Lymphom.

Aus Tabelle 3-1 wird ersichtlich, dass therapeutische Antikörper verschiedene Formate aufweisen. Diese haben verschiedene Vor- und Nachteile. Von der Maus stammende Antikörper erweisen sich in der klinischen Anwendung als stark immunogen. Daher wurden chimäre und humanisierte Antikörper entwickelt bis hin zur

Produktion komplett humaner monoklonaler Antikörper (siehe Abschnitt 3.1.2 und Ezzell 2001).

Ein optimales Antikörperformat gibt es nicht. Wenn ein nicht konjugierter Antikörper allein direkte Antitumorwirkung erzielen kann, wird eine große Bioverfügbarkeit erreicht, wenn ein komplettes IgG Format verwendet wird. Der Antikörper verbleibt im Organismus dann am Längsten in der Zirkulation. Kleinere Antikörperformate wie Fab Fragmente oder rekombinante Konstrukte werden demgegenüber zwar erheblich schneller aus dem Blut filtriert, sie dringen dafür aber schneller in solides Tumorgewebe ein.

Je nach Isotyp unterscheiden sich die Wirkmechanismen der therapeutischen Antikörper. Humane IgG1, IgG3 und murine IgG2a Antikörper induzieren effektiv CDC (komplementabhängige Zytotoxizität) (Houghton *et al.* 1985) und ADCC (antigenabhängige Zytotoxizität) (Steplewski *et al.* 1983), humanes IgG2 nur CDC (Reff und Heard 2001). ADCC scheint eine der wichtigsten Effektorfunktionen zu sein (Clynes *et al.* 2000). Der Fc-Teil der Antikörper bindet dabei an Fc Rezeptoren auf der Oberfläche von natürlichen Killerzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und einigen T-Zellen. Diese Effektorzellen setzen daraufhin perforin- und granzymhaltige zytoplasmatische Granula frei, die zur Zytolyse der Zielzelle führen. Bestimmte Antikörper können eine Zelle in die Apoptose treiben (Trauth *et al.* 1989), Interaktionen von Rezeptoren mit ihren Liganden inhibieren, den Zellzyklus arretieren und Proliferation, Angiogenese und Metastasierung hemmen.

Der Effekt einer Antikörpertherapie kann durch Kombination mit einer Chemotherapie und/oder Immunsystem aktivierenden Pharmaka additiv bis synergistisch verstärkt werden (Klement *et al.* 2002). Wird z.B. der Antikörper Trastuzumab (siehe Tabelle 3-1) als Monotherapie eingesetzt, erzielt er eine Ansprechrate von nur 15%. In Kombination mit einer Chemotherapie kann die Ansprechrate aber auf über 50% gesteigert werden (Leyland-Jones 2002). Andere Möglichkeiten zur Steigerung der Antikörperwirkung sind die Konjugation der Antikörper an Toxine oder Radionuklide, die von den Antikörpern an ihren Zielort gelenkt werden. Auch Fab oder scFv gekoppelte Immunoliposomen dienen dem zielgerichteten Einschleusen zytotoxischer Reagenzien bei verringerten Nebenwirkungen für normale Gewebe. Durch das Design bispezifischer Antikörper, die zwei verschiedene Antigene binden, können Immuneffektorzellen aber auch Radionuklide, Pharmaka und Toxine in die räumliche Nähe des Tumors gebracht und dort festgehalten werden (Segal *et al.* 1999, van Spriel *et al.* 2000). Die Bindung des bispezifischen Antikörpers an einen Trigger-Rezeptor auf der Effektorzelle induziert durch diese die Vernichtung aller in der Nachbarschaft befindlichen Tumorzellen.

Es wird geschätzt, dass bis zum Jahr 2010 über 20 therapeutische Antikörper in die onkologische Therapie Eingang finden werden (Mellstedt 2003). Darüber hinaus werden Antikörperbasierte Medikamente auch bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und in der Transplantationsmedizin eine zentrale Rolle spielen.

3.4.1 Das Tumorantigen EpCAM

Das Antigen EpCAM (= epitheliales Zelladhäsionsmolekül, auch 17-1A, ESA, EGP40, 323/A3, GA733-2) ist ein interessantes Zielantigen für die Tumormimmuntherapie, weil es auf der Oberfläche der meisten Karzinome überexprimiert wird.

EpCAM wird vom *GA733-2* Gen in 9 Exons auf Chromosom 4 kodiert und ist in höheren Vertebraten relativ stark konserviert (Maus/Mensch = 80% Homologie). Das Protein hat eine 242 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne, mit zwei dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF ähnlichen Motiven. Weiter hat es eine 23 Aminosäuren lange transmembrane und eine 26 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne. Es wird als 34 kDa großes Protein synthetisiert, das an bis zu drei Stellen zu einem 40 kDa großen Glycoprotein glycosyliert wird.

Etlche Transmembranmoleküle mit EGF-ähnlichen Domänen sind an der Zelladhäsion oder an Signalwegen der Zelle beteiligt (Davis 1990). Auch für EpCAM wurde gezeigt, dass es Ca^{2+} unabhängige, homotypische Zell-Zell Interaktionen vermitteln kann (Litvinov *et al.* 1994a+b). Daher wird angenommen, dass EpCAM als epitheliales Zelladhäsionsmolekül fungiert, obwohl seine exakte Rolle noch unklar ist.

Immunohistochemische Analysen zeigen, dass EpCAM in humanen Geweben ausschließlich auf epithelialen Geweben exprimiert wird (Momburg *et al.* 1987, Balzar *et al.* 1999). Das Expressionslevel ist dabei in unterschiedlichen Geweben verschieden, aber innerhalb einer Gewebeprobe ist es sehr homogen. Auch zeigen gleiche Gewebe verschiedener Donoren gleich starke Färbungen. Es gibt nur sehr wenige epitheliale Gewebe, die EpCAM negativ sind.

Im Hinblick auf die Tumorthherapie besonders interessant ist, dass die Expression von EpCAM immer in Verbindung mit gesteigerter epithelialer Proliferation steht (Zorzos *et al.* 1995, Litvinov *et al.* 1996, High *et al.* 1996, Schön *et al.* 1994). Sogar im Darmepithel, das von den normalen Geweben die höchsten EpCAM Level exprimiert, korreliert die Entwicklung von Polypen mit noch erheblich stärkerer Expression von EpCAM Molekülen. Parallel wurde beobachtet, dass EpCAM Expression negativ mit der Zelldifferenzierung korreliert (Schiechl *et al.* 1986, Schön *et al.* 1995). Für eine große Zahl epithelialer Gewebe wurde gezeigt, dass aktive Proliferation mit sehr stark erhöhter EpCAM Expression einhergeht. Die meisten Karzinome, aber keine anderen Tumortypen, exprimieren also hohe EpCAM Level (Momburg *et al.* 1987).

Es scheint daher eine Verbindung zwischen EpCAM und Signalkaskaden, die Zellproliferation und Differenzierung regulieren, zu geben. Auf jeden Fall spielt EpCAM eine wesentliche morphoregulatorische Rolle, nicht nur bei der normalen Entwicklung, sondern auch bei Karzinogenese und Tumorprogression epithelialer Gewebe, was dazu führt, dass das Antigen während der malignen Transformation stabil exprimiert wird. Das Molekül bleibt sogar in hochgradig entdifferenzierten Karzinomen erhalten. Zusätzlich wird EpCAM nicht in das Blut der Patienten freigesetzt (Moldenhauer *et al.* 1987, Balzar *et al.* 1999).

Dadurch, dass das EpCAM Expressionslevel mit der Zellproliferation korreliert liegt die Vermutung nahe, dass die Stärke der EpCAM Expression möglicherweise mit einer schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf korreliert. Gastl *et al.* (2000) haben in einer Studie den Zusammenhang zwischen EpCAM Expression und der Überlebensrate von Brustkrebspatientinnen untersucht. Sie fanden, dass die EpCAM Überexpression mit dem Entwicklungsstatus des Tumors und dem histologischen Typ korrelierte. Außerdem bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen starker EpCAM Überexpression und einer verringerten 10 Jahre Überlebensrate. Auch Piyathilake *et al.* (2000) haben in einer Studie über die Expression beim squamöse Lungenkarzinom die Korrelation von hoher EpCAM Überexpression und fortgeschrittenem Tumorstadium beobachtet.

3.4.2 Gegen EpCAM gerichtete Immuntherapie

Die gegen EpCAM gerichtete Karzinomtherapie begann mit der Verwendung niedrig affiner, unkonjugierter monoklonaler anti EpCAM Antikörper (z.B. 17-1A = $2,5 \cdot 10^{-7}$ M, AUA-1) und führte zu anti-Tumor Effekten (Ragnhammar *et al.* 1993, Mellstedt *et al.* 1991, Weiner *et al.* 1993). Diese Antikörper sind nicht wirksam genug, um etablierte solide Tumoren zu vernichten (Lobuglio und Saleh 1992). Bei der Nachbehandlung kurativ entfernter Kolonkarzinome (Dukes C-Stadium) führten sie aber zu 30% Anstieg der 7 Jahre Überlebensrate behandelter Patienten (Riethmüller *et al.* 1998). Ein Nachteil war anfänglich die murine Natur der Antikörper. Aus dem Grund wurde 17-1A chimerisiert (=C46, Fogler *et al.* 1989) und außerdem der komplett humane anti EpCAM Antikörper MT201 entwickelt (Naundorf *et al.* 2002). Dieser war mit $1,4 \cdot 10^{-7}$ M ebenso gering affin wie die vorangegangenen. Diese Antikörper sind weniger immunogen und besser in der Lage, ADCC und CDC auszulösen (Naundorf *et al.* 2002).

Mit höher affinen Antikörpern (z.B. GA733 und 323/A3) werden im Mausmodell bessere Immuntherapieergebnisse erzielt (Velders *et al.* 1995). Allerdings kann die Behandlung mit hoch affinen EpCAM Antikörpern auch zur Schädigung normaler Epithelien führen, die beim Patienten Nebenwirkungen verursacht. Diese sind allerdings

nicht schwerwiegend und nur von kurzer Dauer (Herlyn *et al.* 1991). Um bessere Antitumorwirkung zu erhalten, wurden auch bispezifische anti-EpCAM Antikörper entwickelt. So aktivieren ein rekombinanter anti EpCAM X CD3 scFv Antikörper (Kuffer *et al.* 1997) und der bispezifische anti EpCAM X CD3 Hybridomantikörper HEA125 X OKT3 (Marmé *et al.* 2002) T-Zellen, was zur Tumorzelllyse führt. HEA125 X OKT3 verringert bei lokaler Behandlung von malignem Ascites bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom erheblich bis komplett das gebildete Flüssigkeitsvolumen und führt zu einer Verbesserung der Lebensqualität. Auch mit Peptidvaccinierung konnten *in vitro* und *in vivo* EpCAM spezifische T-Zellen aktiviert werden (Ras *et al.* 19997).

3.4.3 Der monoklonale Antikörper HEA125

HEA125 (human epithelial antigen) ist ein EpCAM spezifischer Maus IgG1 Antikörper, der von der gleichnamigen murinen Hybridomzelllinie HEA125 in großen Mengen produziert wird. Aufgrund der natürlich vorkommenden Spleißvariante von IgG1 (siehe Abschnitt 3.1.1) wird ein Teil dieser Antikörper auf der Zelloberfläche präsentiert, während eine noch größere Zahl der produzierten Antikörper ins umgebende Medium sezerniert wird.

Verglichen mit anderen beschriebenen anti EpCAM Antikörpern (siehe Abschnitt 3.4.2) ist HEA125 mit einer Dissoziationskonstante von $2,2 \cdot 10^{-9}$ M ein sehr hoch affiner EpCAM Binder.

3.5 Zielsetzung

Der monoklonale Antikörper HEA125 ist aufgrund seiner hohen EpCAM Affinität potenziell ein geeignetes Immuntherapeutikum für die Behandlung humaner Karzinome. Um die Immunogenität des Antikörpers zu verringern und gleichzeitig die Aktivierung humaner Effektorfunktionen durch den Fc Teil zu erlauben, soll dieser Antikörper chimersiert werden. Damit anschließend therapeutische Antikörper in großer Menge produziert werden können, soll die Chimärisierung in der hervorragend auf Antikörperproduktion spezialisierten Hybridomzelle vonstatten gehen. Zu diesem Zweck werden im Genom der Hybridomzelle mittels homologer Rekombination die IGHC und IGHK Gene der Maus durch die des Menschen ersetzt. Damit die Produktivität der Hybridomzellen nicht gefährdet wird, soll die Einführung der humanen Gene wenn möglich ohne die Miteinführung eines Resistenzgenes durchgeführt werden.

Das Fernziel dieses Projektes ist, ausgehend von der chimärisierten HEA125 Zelle, die Erzeugung einer komplexen Bibliothek komplett humaner Hybridomantikörper. Diese Bibliothek soll am Ende die Vorteile der rekombinanten Antikörpertechnologie zur einfachen Erzeugung vieler Antikörperspezifitäten, der transgenen Mäuse zur Erzeugung komplett humaner Antikörper, der Hybridomtechnologie zur Produktion großer Mengen kompletter, voll funktionsfähiger Antikörpermoleküle und von Phagenbibliotheken zur einfachen Affinitätsreinigung und Affinitätsreifung oberflächenpräsentierter von Antikörpern vereinen.

Die Komplexität der Bibliothek soll durch Kassettenaustausch der aktiven variablen Antikörperdomänen mittels spezifischer Rekombination erzeugt werden. Um diesen Kassettenaustausch zu ermöglichen, müssen Erkennungsstellen für spezifische Rekombinasen durch homologe Rekombination zielgerichtet an geeigneten Stellen in das Genom der chimären HEA125 Hybridomzelle eingebracht werden. Komplett humane Antikörper entstehen bei der Erzeugung der Vielfalt, wenn beim Kassettenaustausch die variablen Mausantikörperdomänen durch variable Menschantikörperdomänen ersetzt werden. Die humanen Antikörper werden anschließend von den darauf spezialisierten Maushybridomzellen produziert, die einen Teil der Antikörper auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Aufgrund dieser Eigenschaft soll das einfache Auffinden von Antikörpern einer gesuchten Spezifität samt der sie produzierenden Hybridomzelle möglich werden. So selektierte Antikörper können gegebenenfalls durch wiederholte Zyklen von Mutagenese und Selektion durch das Antigen affinitätsgereift werden. Mutagenese kann durch molekulargenetische Manipulationen in den Genen der variablen Domänen oder nach Aufklärung der natürlichen Mechanismen durch Anschalten der somatischen Hypermutationsvorgänge in der Hybridomzelle vonstatten gehen.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass die notwendigen Manipulationen im Antikörpergenlocus der Hybridomzelle ohne miteingeführten Selektionsmarker durchgeführt werden können und die veränderten Zielzellen anschließend allein über die von ihnen produzierten, veränderten Antikörper selektionierbar sind.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Laborgeräte

2-Kanal-Schreiber (LKB, Bromma, Schweden)
Analytische Feinwaage Typ Teldo Pb 602 (Mettler, Gießen)
Biofuge A (Heraeus, Hanau)
Brutschrank 3029 Forma Scientific (Marietta, USA)
CO₂ Inkubatoren Typ BB6220 (Heraeus, Osterode)
Drehvorrichtung für Bioreaktoren (Heraeus, Osterode)
Eagle Eye II zur Bilddokumentation, Typ 230 VAC, (Stratagene, La Jolla, USA)
Eismaschine Wessamat (Rauschenbach GmbH, Bergneustadt)
Elektrophoresekammern, DNA, Easy Cast (MWG Biotech GmbH, Ebersberg)
Elektrophoresekammern, SDS-Gele (CTI, Idstein)
Electrosquare Porator T 820 (BTX Electroporation System, AGS, Heidelberg)
FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)
FACSVantage SE (Becton Dickinson, Heidelberg)
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter (Messer Griesheim, Düsseldorf)
Geltrockner BIO-RAD, Modell 583 (Bio-Rad, München)
Kühl- und Gefrierschränke (Liebherr; Bosch)
Leuchtplatte (Rex, Heidelberg)
Magnetrührer, Heizplatte MR 3002 (Heidolph, Schwabach)
Mikroskop, Diavert (Leitz, Stuttgart)
Minifuge T (Heraeus, Hanau)
miniPERM-Bioreaktoren (Sartorius AG, Göttingen)
Netzanschlußgerät Power Supply Unit 500/100 (DESEGA, Heidelberg)
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 26 (Radiometer, Copenhagen, Dänemark)
Pumpe P-1 (Pharmacia LKB, Freiburg)
Schüttelinkubator, Typ Certomat HK (Braun, Melsungen)
Schüttler, Logic Shaker (neoLab, Heidelberg)
Spektrophotometer, Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech, Freiburg)
Speed Vac Concentrator, Typ SVC 1004 (Bachhofer, Reutlingen)
Sterilwerkbank (Biogard Hood Baker Company Inc., Maine, USA)
Sterilwerkbank (Bachhofer, Stanford, USA)
Thermomixer, Typ 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Titertek Multiscan Plus MKII Photometer (Labsystems, Finnland)
Transfereinheit (Western Blot) (Renner, Darmstadt)
UV-Rekorder 2138 UVICORD S (LKB, Bromma, Schweden)
Vortex, Typ VF2 (Janke und Kunkel, Staufen)
Waagen (Sartorius, Göttingen)
Wasserbad, Typ Consort E 455 cti (Grant, Cambridge, UK)
Zentrifugen: Kühlzentrifuge, Heraeus Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)
Mikrozentrifuge, Typ 5417 (Eppendorf, Hamburg)
Minifuge 2 (Heraeus Christ, Osterode)

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Die Plastikartikel für die Zellkultur und die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Greiner (Frickenhausen), Falcon (Becton Dickinson), Nalgene, Nunc, und Renner (Darmstadt) bezogen.

6, 24 und 96-Loch-Platten (Falcon/BD, Heidelberg)
Celophanfolie (Melitta, Minden)
Dialysemembran Immobilon-P (Millipore, Eschborn)
Dialyseschläuche Visking Typ 20/32 (Roth, Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten Gene Pulser[®], 0,4 cm (BioRad,)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)
Faltenfilter 595 1/2 (Schleicher und Schüll, Dassel)
Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schüll, Dassel)
Kanülen (BD, Fraga, Spanien)
 μ MACS Separation Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Nitrocellulose Protran BA85 (Schleicher und Schüll, Dassel)
Petrischalen (9 cm Durchmesser) (Grainer, Frickenhausen)
Produktionsmodule für miniPERM Bioreaktoren (Sartorius, Göttingen)
Säulen (für Sepharose) Econo Columns (Bio-Rad, München)
Sterilfilter Millex (HA, 0,45 μ m und GV, 0,22 μ m) (Millipore, Eschborn)
Spritzen (2 bis 50 ml) (Terumo, Leuven, Belgien)
Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen, 15 und 15 ml (Renner, Darmstadt)
Zentrifugenröhrchen, 250 ml (Corning, Acton, USA)

4.1.3 Chemikalien

Die nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden bei Merck, Darmstadt in einem möglichst hohen Reinheitsgrad erworben. In Klammern angegebene Namen werden im Folgenden anstelle der vollständigen Namen verwendet.

1,4-Dithiothreitol (DTT) (Sigma, Deisenhofen)
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (Sigma, Deisenhofen)
Acrylamid (Serva, Heidelberg)
Acrylamid/Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
Agarose Ultrapure (USB, Cleveland)
Amino-n-Caprone Säure (Sigma, Deisenhofen)
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Serva, Heidelberg)
 β -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)
Bis-Tris-Propan (Sigma, Deisenhofen)
Biotinyl- ϵ -amino-caproic-acid-N-hydroxy-succinimide-Ester (Calbiochem, Bad Soden)
Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
Eisessig (Sigma, Deisenhofen)
Essigsäure (RdH Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze)
Ethanol (RdH Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze)
Ethidiumbromid (Invitrogen, Groningen, NL)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Gerbu, Gaiberg)
Glutathion (Sigma, Deisenhofen)

Glycerin (Sigma, Deisenhofen)
GTP/GDP (Sigma, Deisenhofen)
Harnstoff (Fluka, Neu Ulm)
H₂O₂, 30%ig, Perhydrol (Merck, Darmstadt)
Isopropylthiogalactosid (IPTG) (Sigma, Deisenhofen)
Isopropanol (Baker, Deventer, Niederlande)
KCl (Fluka, Neu Ulm)
Methanol (RdH Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze)
MgAc (Fluka, Neu Ulm)
MgCl₂ (Fluka, Neu Ulm)
MgSO₄ (Fluka, Neu Ulm)
Milchpulver (Nestlé Deutschland AG, Frankfurt am Main)
MOPS (Biomol, Hamburg)
NaCl (Fluka, Neu Ulm)
Natriumdesoxycholat (Serva, Heidelberg)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)
Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma, Deisenhofen)
Orthophenylendiamin, OPD (Sigma, Deisenhofen)
Peptone (DIFCO Laboratories, Detoit, USA)
Phenol (Roth, Karlsruhe)
Phenol-Chloroform (Roth, Karlsruhe)
Ponceau S (Sigma, Deisenhofen)
Proteaseinhibitoren, EDTA-frei (Roche, Mannheim)
Protein A Sepharose[®] CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Protogel, Rotiphorese[®] Gel30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) (Roth, Karlsruhe)
Protran BA 85 Cellulose Nitrat (Schleicher und Schüll, Dassel)
Rinder-Serumalbumin (BSA) (Boehringer Bioproducts, Ingelheim)
Serva Blue W (Serva, Heidelberg)
Tetrabutylammoniumbromid (TAB) (Sigma, Deisenhofen)
Tetramethylethylendiamid (TEMED) (Sigma, Deisenhofen)
Trichloressigsäure (TCA) (Roth, Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Sigma, Deisenhofen)
Triton X-100 (Serva, Heidelberg)
Tween 20 (Serva, Heidelberg)
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactosid) (Amersham, Braunschweig)

4.1.4 Puffer und Lösungen

In der Regel werden die Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Für die Elektrophoresepuffer genügt einfach deionisiertes Wasser. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt werden, ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, ist die Temperatur in Klammern angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf Gewicht pro Volumeneinheit (w/v).

PBS (10x):	1.4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na ₂ HPO ₄ ; 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2
PCR-Puffer (10x):	500mM Tris pH 9,3; 160 mM (NH ₄)SO ₄ ; 17,5 mM MgCl ₂
dNTPs (10x):	10 mM dATP; 10 mM dTTP; 10 mM dCTP; 10 mM dGTP
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris/HCl, pH 8,0; 950 mM Eisessig; 50 mM EDTA
6 x DNA-Ladepuffer :	0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin
PBS-Tween:	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2, 0,05% (v/v) Tween 20
Gelatinelösung:	0,2% Gelatine in PBS, 0,1% NaN ₃
Carbonatpuffer pH 9,6:	0,05 M Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ , steril
Substratpuffer pH 6,0:	0,1 M KH ₂ PO ₄ , steril
Elektrophoresepuffer:	250 mM Tris/HCl pH 8,3; 1,9 M Glycin, 1% SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS
Blotpuffer I:	0,3 M Tris/HCl pH 10,4; 20% Methanol
Blotpuffer II:	0,025 M Tris pH 10,4; 20% Methanol
Blotpuffer III:	0,025 M Tris pH 9,4; 0,04 M Amino-n-Caprinsäure, 20% Methanol
AP-Waschpuffer:	10 mM Tris pH 9,6; 150 mM NaCl
AP-Puffer:	100 mM Tris pH 9,6; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂
BCIP-Lösung:	5 mg/ml in 100% DMF
NBT-Lösung:	50 mg/ml NBT in 70% DMF/H ₂ O
Bindepuffer:	3 M NaCl; 1,5 M Glycin, pH 8,9
Elutionspuffer:	100 mM Natriumcitrat pH 6
Regenerationspuffer:	100 mM Natriumcitrat pH 3

4.1.5 Reaktions-Kits

Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim)	PCRs über 3 kb oder von genomischer DNA mit geringer Fehlerrate durch proofreading-Aktivität einer beigemengeten Pwo-Polymerase
Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über Säulchen
Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden)	Plasmid Maxi Präparation
Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla)	Ortspezifische Einführung (<i>in vitro</i>) von Mutationen in Plasmid DNA
DNA Labelling and Detection Kit-Nonradioactive (Roche, Mannheim)	Digoxigenin-Markierung von DNA zur Verwendung als Sonde zur Hybridisierung
CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit (DynaL, Oslo, Norway)	Mensch anti Maus IgG beschichtete Magnetbeads zur positiven Selektion oder Entfernung von Zielzellen
MACS Ziege anti Maus IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)	Ziege anti Maus IgG (H+L) F(ab') ₂ (polyklonal, Mensch absorbiert) beschichtete Magnetbeads zur positiven Selektion oder Entfernung von Zielzellen
MACS Ratte anti Maus IgG1 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)	Ratte anti Maus IgG1 (monoklonal) beschichtete Magnetbeads zur positiven Selektion oder Entfernung von Zielzellen

4.1.6 Proteine, Antikörper und Färbereagenzien

Antikörper	aus	Spezifität	Label	Typ	Referenz
HEA125	Maus	EpCAM (Mensch)	-- Biotin FITC	IgG1	Moldenhauer <i>et al.</i> , 1987
HEA-Hu κ	Maus	EpCAM (Mensch)	-- Biotin	IgG1 (hu- mane Kappa Kette)	diese Arbeit
W6/32	Maus	HLA A,B,C	--	IgG2a	Barnstable <i>et al.</i> 1978
OKT3	Maus	CD3	Biotin	IgG2a	Kung <i>et al.</i> 1979
HD37	Maus	CD19	--	IgG1	Pezzutto <i>et al.</i> 1987
HD20	Maus	Mensch Idiotyp	--	IgG1	G. Moldenhauer, nicht publiziert
EpCAM33.2	Maus	EpCAM (Mensch)	--	IgG1	G. Moldenhauer, nicht publiziert
GAHu κ	Ziege	Mensch κ Ketten (absorbiert gegen Maus Ig)	Biotin FITC PE	F(ab') ₂	Southern Biotech, Bir- mingham, USA
GAM κ	Ziege	Maus κ Ketten (ab- sorbiert gegen Maus λ Ketten)	Biotin FITC	polyklonal	Southern Biotech, Bir- mingham, USA
GAMIgG (H+L)	Ziege	Maus γ -Ketten	Biotin FITC	F(ab') ₂	Dianova, Hamburg
GAMIgG+IgM	Ziege	Maus γ + μ -Ketten	AP	polyklonal	Dianova, Hamburg
GAHuIgG	Ziege	Mensch γ -Ketten (absorbiert gegen Maus Ig)	Biotin FITC PE	F(ab') ₂	Southern Biotech, Bir- mingham, USA
GAHu IgG+IgM	Ziege	Mensch γ + μ -Ketten	--	polyklonal	Dianova, Hamburg
GAHuIgG (H+L)	Ziege	Mensch schwere und leichte γ -Ketten (ab- sorbiert gegen Maus Ig)	-- FITC	F(ab') ₂	Dianova, Hamburg
GAMIgG1	Ziege	Maus γ_1 -Ketten (ab- sorbiert gegen Maus IgM, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA und Mensch Ig)	Biotin FITC PE	polyklonal	Southern Biotech, Bir- mingham, USA
GAMIgG Fc	Ziege	Maus Fc _γ Fragment	POX	polyklonal	Dianova, Hamburg
GAHuIgG Fc	Ziege	Mensch Fc _γ Fragment	POX	polyklonal	Dianova, Hamburg

(POX = Peroxidase, AP = alkalische Phosphatase)

Humane leichte Ig Kappa Ketten aus dem Urin eines Myelompatienten wurden bei DPC Biermann (Bad Nauheim) bezogen.

Rekombinantes EpCAM wurde freundlicherweise von Prof. A. Pezzutto (Charité Berlin) zur Verfügung gestellt.

SA-POX, SA-FITC und SA-PE wurden von der Firma Dianova, Hamburg bezogen.

Propidiumiodid (Stock 1,5 mM = 1000x, 4°C) (Sigma, Deisenhofen)

4.1.7 Marker

Agarosegele

Gene Rouler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 2-4 μ l pro Spur

Banden [kb]: 10; 8; 6; 5; 4; 3,5; **3**; 2,5; **2**; 1,5; 1,2; **1,031**; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; **0,5**; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1.

SDS-Gele

Dalton Mark VII-L (Sigma, St. Louis, USA), 10-12 μ l pro Spur
Banden [kDa]: 66; 45; 36; 29; 24, 20; 14,2.

Western-Blot

Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 12 μ l pro Spur
Banden [kDa]: 122; 79; 47; 33; 24; 20.

4.1.8 Enzyme

Restriktionsenzyme	(MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
(New England Biolabs, Bad Schwalbach)	
T4 DNA-Ligase	(New England Biolabs, Bad Schwalbach)
CIP (calf intestine phosphatase)	(Roche Mannheim)
Klenow-Enzym	(Roche Mannheim)
PWO-Polymerase	(Peqlab, Erlangen)
turbo-Pfu-Polymerase	(Stratagene, Heidelberg)
Taq-Polymerase	(Roche Mannheim)
DNase	(Roche Mannheim)
RNaseA	(Invitrogen, Groningen, NL)
ProteinaseK	(Sigma, Deisenhofen)
Reverse Transcriptase	(Invitrogen, Groningen, NL)
Polynukleotidkinase	(New England Biolabs, Bad Schwalbach)

4.1.9 Nukleotide

Die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in aufgeführt. Dort ist weiterhin angegeben, welche Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme bzw. spezifische Rekombinasen oder welche Epitope die Primer einführen. In welcher Klonierung sie jeweils zum Einsatz kamen, geht aus dem Ergebnisteil hervor. Alle Oligonukleotidsequenzen, bis auf den HindIII Linker (New England Biolabs, Bad Schwalbach), wurden im Rahmen der Arbeit designt und von Sigma-ARK (Darmstadt) bzw. später MWG (MWG Biotech GmbH, Ebersberg) synthetisiert und mittels FPLC gereinigt.

Linker DNAs sind kurze, doppelsträngige Oligonukleotide (8 bis 14 Basenpaare). Sie finden Verwendung, wenn für eine Klonierung nur eine Erkennungsstelle für ein Enzym zur Verfügung steht, das stumpfe DNA-Enden erzeugt. Hier kann das Einligieren langer Inserts Probleme bereiten, während die Linker DNA sich aufgrund ihrer sehr geringen Länge wesentlich einfacher ligieren lässt. Oligonukleotidlinker dienen der Einführung einer neuen Schnittstelle für Restriktionsenzyme, hier z.B. für ein Enzym, das beim Öffnen der DNA längere Überhänge produziert, in die sich lange Inserts leichter ligieren lassen.

dNTPs für PCRs wurden von der Firma PeqLab (Erlangen) bezogen, Heringssperma-DNA von Clontech (Heidelberg).

Name	Motiv	Sequenz
P1-f	Sall	<u>GT</u> CGACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
P2-r	SpeI	GAAGTAACTAGTAAGGGCTCCATTT <u>CAGT</u> GATTATGTG
P3-f	NotI	GGTCCT <u>GCGGCCG</u> CACCACCAGCTCCCCAGCTCCATC
P4-r	EagI	ATGCCACGGCCGACAAAATGGCTTTTT <u>CATTAG</u> TATCCAAAA
P5-f	SpeI	ACACCAACTAGITTTGCTTCTTT <u>CCTCAG</u> GAACTGTGG
P6-r	NotI	GCAGGT <u>GCGGCCG</u> CTTCTCCCTCTAACACTCTCCCCTGT
P7-f	-	CTTCTATCGCCTTCTTGACGAG
P8-r	-	GAACAAAGTCACTGTAAAGACTTCGGGTATTGG
P9-f	-	CTCAAGAAGAATGTTGGGAGTGAAGGCATCC
P10-r	-	GAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATC
P11-f	-	GAATGTTGGGAGTGAAGGCATCCTTCTGCAG
P12-r	-	GTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCG
P13-f	NotI	GCGCGCGCGCGGCCGAGGCCTGGGCTAACACACATGG
P14-r	ApaI	CGGGCGGGCCCTGGGGAAACTAGAACTACTCAAGC
P15-f	loxP AatII	CCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGACGTCATAACT
	loxP511	TCGTATAATGTATACTATACGAAGTTATCC
P16-r	loxP AatII	TAAGGATAACTTCGTATAGTATACATTATACGAAGTTATGACGTCATAACT
	loxP511	TCGTATAGCATACTATACGAAGTTATC
P17-f	AatII	CCGGGGGACGTCATGATTGAACAAGATGGATTGC
P18-r	AatII	GCGCGCGACGTCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
P19-f	AatII	GGGCCCGACGTCGAACCTTGAATCTGAAGCAAAGGGGATCAG
P20-r	AatII	GCGCGCGACGTCGACAGTTTATTTCCCACTTCTCTCAGCCGGCTCCC
P21-f	c-Myc	GATCTGAGGACACAGCCCTTTATTACTGTTCAAGAGAACAAGAGCTG ATCTCAGAAGAAGATCTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCA
P22-r	c-Myc	AGGTTCCCTGACCCCAGTAGTCTAGATCTTCTTCTGAGATCAGCTTT TGTTCTCTTGAACAGTAATAAAGGGCTGTGTCCTCA
P23-f	HincII	<u>GT</u> CGACATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATGGTGAGCAA GGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTG
P24-r	HincII	<u>GT</u> CGACATAACTTCGTATAGTATACATTATACGAAGTTATTTACTTGTACA GCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCC
P25-f	HincII loxP AatII	<u>GT</u> CGACATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGACGTC ^{CCCG} AGATTCTCATTAGTGATCAACAC
P26-r	HincII loxP511 AatII	<u>GT</u> CGACATAACTTCGTATAGTATACATTATACGAAGTTATGACGTC ^{TAAGG} GACAAACATTTAAGATTAGTCTGC
P27-f	FLAG	GATCTGAGGACACAGCCCTTTATTACTGTTCAAGAGATTACAAGGA TGACGACGATAAAGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCA
P28-r	FLAG	AGGTTCCCTGACCCCAGTAGTCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC TCTTGAACAGTAATAAAGGGCTGTGTCCTCA
P29-f	Sall	AACCCAGTCGACAACCACAGAAGAGCAGGAGCTAATTG
P30-r	SpeI	ACAAGAACTAGTATATGTGATTACACTGTCAGACA
P31-f	SpeI	<u>ACTAGI</u> CTTCATCCTTAGTCCCAGAAGTATCATCTG
P32-r	EagI	<u>CGGCCG</u> TCCTTTTTCTTCTGTTGGAGACTCT
P33-f	HindIII	<u>AAGCTT</u> ATGCCATGAGCCCAGACACTGGACG
P34-r	HindIII	<u>AAGCTT</u> CCAGTGTGGGGACAGTGGGACC
Linker	HindIII	CCCAAGCTTGGG

Tabelle 4-1: Oligonukleotidsequenzen. Die Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind nach Bezeichnungen geordnet aufgelistet. Alle Sequenzen sind in 5' -> 3' Richtung abgebildet. Der Bezeichnungen setzen sich zusammen aus P (Primer), einer Zuordnungsnummer und der Kennzeichnung f (vorwärts) oder r (rückwärts), aus der hervorgeht, zu welchem Strang die jeweiligen Oligonukleotide komplementär sind. Durch die Primer eingeführte Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind in den Sequenzen unterstrichen. Erkennungsstellen für die spezifische Rekombinase Cre sind fett gedruckt. Eingeführte Epitope sind als Umriss dargestellt.

4.1.10 Vektoren

pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, NL)

3,9 kb großer Klonierungsvektor aus dem TA Cloning Kit, wird in geöffneter Form bereitgestellt. Der Vektor bringt T-Überhänge mit, zur direkten Einligierung von PCR Produkten ohne vorhergehenden Verdau.

pBS II SK (+) (Stratagene, La Jolla, USA)

3,0 kb großer Klonierungsvektor.

pEGFP-N3 (Clontech, Heidelberg)

4,7 kb großer eukaryontischer Expressionsvektor für EGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Außerdem enthält dieser Vektor das NPTII Gen unter der Kontrolle des PGK Promotors.

4.1.11 Medien für Bakterienkulturen

Medien

LB-Medium(pH 7,5): 10 g Bacto-Tryptone (DIFCO Laboratories, Detoit, USA)
 5 g Bacto-Hefe-Extrakt (DIFCO Laboratories, Detoit, USA)
 10 g NaCl (Fluka, Neu Ulm)
 ad 1 l H₂O

Zusätze

Ampicillin: 100 mg/ml (Stock 1000x) (Sigma, Deisenhofen)

Kanamycin: 25 mg/ml (Stock 1000x) (Sigma, Deisenhofen)

Das LB-Medium für die Bakterienkultur wird mit deionisiertem H₂O angesetzt und der pH auf 7.5 eingestellt. Zum Gießen von Agarplatten werden zusätzlich 1,5% Bacto-Agar (DIFCO Laboratories, Detroit, USA) zugesetzt. Die Medien werden direkt nach dem Ansetzen autoklaviert (25 min, 121°C).

Nach dem Abkühlen auf unter 60 °C werden dem Bakterien-Agar gegebenenfalls Antibiotika zugefügt und das Ganze in 10 cm Petrischalen gefüllt (ca. 20 ml/Schale). Eventuelle Luftblasen können durch kurzes Abflammen mit dem Bunsenbrenner entfernt werden. Die warmen Schalen werden gestapelt (verhindert Kondenswasserbildung) und nach dem Erkalten bis zu drei Monate bei 4°C, durch Plastikverpackung vor dem Austrocknen geschützt, gelagert.

Den Flüssigmedien werden die Antibiotika je nach Bedarf direkt vor Gebrauch zugesetzt. Sie werden als Konzentrate (1000x) in deionisiertem H₂O gelöst. Bei Ampicillin wird 1M NaOH zugegeben, bis es vollständig in Lösung ist. Sterilfiltrierte 1 ml Aliquots werden bei -20°C gelagert.

4.1.12 Medien für die Zellkultur

Zellkultur-Medium

RPMI 1640 (Invitrogen, Groningen, NL)

10% FCS (Biochrom KG, Berlin)

1 mM Na-Pyruvat (Stock 100 mM) (Invitrogen, Groningen, NL)

2 mM L-Glutamin (-20°C) (200 mM, Invitrogen, Groningen, NL)

Rollerflaschen-Medium

RPMI 1640 (Invitrogen, Groningen, NL)
10% FCS (Biochrom KG, Berlin)
1 mM Na-Pyruvat (Stock 100 mM) (Invitrogen, Groningen, NL)
2 mM L-Glutamin (-20°C) (200 mM, Invitrogen, Groningen, NL)
10 mM HEPES (Stock 1 M, pH 7,3, RT, steril) (Merck, Darmstadt)

miniPERM-Medium

RPMI 1640 (Invitrogen, Groningen, NL)
10% FCS (Biochrom KG, Berlin)
0,225% Glucose (Stock 45%) (Applichem, Darmstadt)
1 mM Na-Pyruvat (Stock 100 mM) (Invitrogen, Groningen, NL)
100 U/ml Penicillin G (Invitrogen, Groningen, NL)
100 µg/ml Streptomycin Sulfat (Invitrogen, Groningen, NL)
2 mM L-Glutamin (-20°C) (200 mM, Invitrogen, Groningen, NL)
0,5% (v/v) AmphotericinB (Invitrogen, Groningen, NL)

FACS-Medium

DPBS (Invitrogen, Groningen, NL)
2% FCS (Biochrom KG, Berlin)
0,1% NaN₃ (Stock 20%) (Merck, Darmstadt)

Einfrier-Medium

RPMI 1640 (Invitrogen, Groningen, NL)
20% FCS (-20°C) (Biochrom KG, Berlin)
10 % DMSO (Merck, Darmstadt)
2 mM L-Glutamin (-20°C) (200 mM, Invitrogen, Groningen, NL)

Trypsin/EDTA

0,05% Trypsin
0,53 mM EDTA

Zusätze

Gentamycin: 100 µg/ml (Stock 100x, 4°C) (Biochrom AG, Berlin)
G418: Stock 144 mM (100 mg/ml), -20°C (Invitrogen, Groningen, NL).
Die erforderliche Endkonzentration ist für jede Charge und jede Zelllinie auszutesten (siehe Abschnitt 4.3.1).

Alle Medien und Zusätze werden, soweit nicht anders vermerkt, bei 4°C gelagert. Das FCS wird vor Gebrauch Hitze inaktiviert (1 h 56°C), um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Nach dem Ansetzen werden die Medien zur Sterilkontrolle für 5 Tage bei 37°C inkubiert. L-Glutamin ist instabil und wird angesetztem Medium erst direkt vor dem Verbrauch (nach Zugabe innerhalb von 4 Wochen) zugesetzt. Vor dem Gebrauch werden die Medien auf 37°C temperiert.

4.1.13 Transfektionsreagenzien

Elektroporations-Puffer:

DPBS

0,5 mM MgAc (Stock 100x, -20°C) (Merck, Darmstadt)

0,1 mM CaAc (Stock 100x, -20°C) (Merck, Darmstadt)

Calcium-Phosphat-Transfektionen (Phosphat-Puffer)

50 mM HEPES, pH 7,06

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄

Lipidbasierte Transfektionsreagenzien

DOSPER liposomales Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim)

DOTAP liposomales Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim)

FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim)

4.1.14 Bakterienstämme

Top10F' F'(lacI^q Tn10 (Tet^R) mcrA Δ(mrr -hsdRMS -mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^r) endA1 nupG (Invitrogen, Groningen, NL)

DH5α F' endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE 44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (Φ80dlacZ ΔM15) (Gibco BRL, Eggenstein)

XL1-Blue F' proAB lacI^qlacZ ΔM15 Tn10 (Tet^r) /recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lac⁻ (Statagene, La Jolla, USA)

4.1.15 Zelllinien

HEA125 Maushybridom, produziert den Maus anti EpCAM Antikörper HEA125 (Moldenhauer *et al.* 1987)

X63-Ag-8.653 Maus Myelom Linie (Kearney *et al.* 1979)

Colo205 Menschliche Colonkarzinom-Metastase (Semple *et al.* 1978)

Raji Menschliches B-Zell-Lymphom (Pulvertaft 1964)

Jurkat Menschliche akute T-Zell Leukämie (Weiss *et al.* 1984)

4.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.2.1 Lagerung von Bakterien

Bakterienstämme werden auf (Selektiv-) Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C wachsen gelassen. In dieser Form können sie bei 4°C ein paar Wochen gelagert werden. Zur langfristigen Lagerung werden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür werden 500 µl einer Vorkultur in LB-Medium (OD_{585nm} = 1) mit 500 µl 50% Glycerin versetzt und mindestens eine Stunde auf Eis langsam abgekühlt. Danach werden die Glycerinkulturen in -80°C eingefroren. Aus ihnen können mit einer sterilen Impföse wiederholt Kulturen angeimpft werden. Bei der Entnahme stehen die Glycerinkulturen auf Trockeneis, damit sie nicht auftauen.

4.2.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Drei Liter SOB Medium werden mit einer Einzelkolonie nach Vorkultur angeimpft und die Bakterien bis zu einer OD_{585nm} von genau 0,8 wachsen gelassen. Durch Zentrifugation (1500 x g, 10 min, 4°C) werden die Zellen geerntet und das Pellet auf Eis in 4°C kaltem 1,4% Glycerin in H₂O resuspendiert, ohne dabei Luftblasen zu erzeugen. Das Endvolumen beträgt 100 ml. Nach erneuter Zentrifugation (1500 x g, 7 min, 4°C) wird das Pellet 1 x in 4°C kaltem 1,4% Glycerin in H₂O gewaschen und anschließend im 2- bis 3-fachen Pelletvolumen mit 4°C kaltem 15% Glycerin in H₂O resuspendiert. Mit einem 40 µl Aliquot wird eine Testelektroporation durchgeführt, deren Zeitkonstante zwischen 4,6 und 4,8 liegen sollte, andernfalls muss erneut mit 1,4% Glycerin gewaschen werden. Die Zellen werden möglichst schnell bei 4°C in Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren, sie sind bei -80°C lagerbar.

4.2.3 Transformation und Vorkultur

Zur späteren DNA-Präparation werden Bakterien grundsätzlich per Elektroporation transformiert und die Plasmide in den Zellen vermehrt. Nur wenn in einem gekauften Kit hitzekompetente Bakterien bereitgestellt wurden, wie z.B. beim TA Cloning Kit, wurde die Hitzeschock Methode zur Transformation verwendet.

Transformation elektrokompetenter Zellen

In vorgekühlten Kuvetten werden 40 µl elektrokompetente Zellen nach Zugabe von 1 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl Plasmidvektor DNA (= 1 ng – 1 µg) des jeweiligen Klons elektroporiert. Die Zellen werden in 1 ml LB-Medium mit 2% Glucose aufgenommen und bei 37°C 90 min im Schüttelinkubator (1000 Upm) wachsen gelassen. Anschließend werden die Zellen auf LB-Agar ausplattiert.

Transformation hitzekompetenter Zellen

100 µl hitzekompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA des jeweiligen Klons gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis werden die Zellen 30 s bei 42°C im Wasserbad und anschließend weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium mit 2% Glucose wird die Vorkultur 90 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die Vorkultur auf LB-Agar ausplattiert.

4.2.4 Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli* Kulturen

Mini-Präparation mittels Phenol-Chloroform Extraktion

Zur Analyse von klonierten DNA Konstrukten werden zunächst Mini-Präparationen durchgeführt. Mit einer Bakterienkolonie werden 3 ml LB Medium mit den entspre-

chenden Antibiotika angeimpft und ü.N. zu dichten Kulturen wachsen gelassen. Die Zellen aus 2 ml werden in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert (13000 x g, 5 min, 4°C). Die Lyse der Zellen erfolgt mit den Puffern aus dem Plasmid Purification Kit. Durch Vortexen in 250 µl Prä-Lysepuffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg RNase A) werden die Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer Lyse-puffer P2 (200 mM NaOH; 1% SDS) und Mischen, werden die Zellen 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Es bildet sich ein klarer Schleim. Anschließend wird der Ansatz durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 (Bestandteile nicht angegeben) 5 min auf Eis neutralisiert, wodurch Proteine und genomische DNA vernetzt ausfallen. In der Kühlzentrifuge (13000 x g, 15min, 4°C) werden die Zellmembranen und die anderen unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Um gelöste Proteine zu entfernen, wird der DNA haltige Überstand anschließend mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform für mindestens 30 s gemischt. Zum Entsalzen und Konzentrieren wird die DNA nach Zentrifugation (13000 x g, 2 min, RT) aus der wässrigen Phase durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens 100% Ethanol 30 min bei -20°C gefällt. Die DNA wird abzentrifugiert (13000 x g, 20 min, 4°C) und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen (13000 x g, 5 min, 4°C). Das DNA-Pellet wird nach dem Trocknen für 2-3 min bei 37°C in 20 µl H₂O resuspendiert.

Maxi-Präparation mittels Säulenchromatographie

Von korrekten Plasmiden, die für den häufigeren Gebrauch oder zur Transfektion eukaryontischer Zellen bestimmt sind, werden Präparationen im größeren Maßstab angefertigt. Mit Einzelkolonien werden 3 ml LB mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und zu dichten Kulturen wachsen gelassen. Mit 500 µl dieser Kulturen, werden 500 ml Flüssigkulturen angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von ca. 1,8 wachsen gelassen. Die Präparation der Plasmid DNA aus den Kulturen wird mit dem Plasmid Purification Kit nach dem zugehörigen Protokoll durchgeführt. Die Zusammensetzung der Puffer ist im vorangegangenen Abschnitt angegeben soweit bekannt.

Das Prinzip des Plasmid Purification Kit beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und anschließende Bindung der DNA an eine Anionenaustauschersäule bei niedriger Salzkonzentration im sauren Milieu. Durch Waschen mit etwas höherer Salzkonzentration werden verunreinigende Proteine und RNAs voreluert und danach bei hoher Salzkonzentration die DNA eluiert. Anschließend wird die DNA mit Isopropanol konzentriert und entsalzen.

Die DNA-Pellets von high-copy-Plasmiden werden in 100 µl H₂O resuspendiert, die von low-copy-Plasmiden in 50 µl. Alle präparierten DNAs werden bei -20°C gelagert.

4.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Analyse und Extraktion von DNA

Durch Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente im Bereich von 0,1 bis 20 kb in Abhängigkeit von ihrer Länge aufgetrennt und identifiziert werden. Dafür werden 0,7 bis 2% Agarose in TAE-Puffer aufgekocht bis diese vollständig gelöst ist (keine Schlierenbildung mehr). Nachdem die Agaroselösung wieder etwas abgekühlt ist, wird der mit der DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (1 μ l/40 ml Gelvolumen) zugesetzt und mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kamms ein Gel mit Taschen gegossen. Sobald die Agarose erstarrt ist, gibt man das Gel in eine Elektrophoresekammer, gibt TAE zu, bis das Gel knapp bedeckt ist, pipettiert mit 1/6 DNA-Ladepuffer versetzten DNA Proben in die Taschen und legt eine Spannung an (40 bis 110 V, 7V/cm Gellänge). Der Ladepuffer enthält Referenzfarbstoffe und gewährleistet das Absacken der DNA in die Taschen. Ist die DNA ausreichend weit gelaufen, wird das Gel unter UV-Licht betrachtet. Soll ein DNA Fragment ausgeschnitten werden, wird die Intensität und Dauer der UV-Strahlung möglichst kurz gehalten.

Zum Fotografieren werden die Gele in die Eagle Eye Apparatur eingelegt, mit UV-Licht bei 306 nm die Emission des Ethidiumbromids angeregt. Das von der Videokamera aufgenommene Bild kann direkt gedruckt werden.

Als DNA-Standard wird der Gene Rouler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Pro Tasche werden jeweils 2 μ l aufgetragen (= 1-2 μ g DNA Mix).

4.2.6 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines DNA Fragments wird zunächst die entsprechende DNA Bande aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Die Extraktion der enthaltenen DNA aus dem Gelstück geschieht dann mittels „Qiaquick Gel Extraction Kit“, nach den Angaben des Herstellers. Die gewogene DNA Bande wird in 300 μ l QG pro 100 μ g Gel vollständig aufgelöst (50°C, 10 min Schütteln). Anschließend wird die Probe auf ein Schleudersäulchen (Qiaquick spin columns) in einem 2 ml Abfallröhrchen gegeben und zentrifugiert (13000 Upm, 1 min). Die Säule wird mit 750 μ l PE gewaschen (13000 Upm) und durch eine zweite Zentrifugation getrocknet (13000 Upm/1 min). Das Fragment wird mit 50 μ l H₂O von der Säule gelöst (20 min RT) und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß eluiert (13000 Upm, 1 min). Zur Kontrolle werden 5 μ l des Fragments auf einem Gel analysiert.

4.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren haben in wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das zur Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte verwendet wird. Nach Kalibrierung des Photometers mit Wasser entspricht ein Wert von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm ungefähr 50 µg doppelsträngiger DNA/ml bzw. 40 µg einzelsträngiger DNA/ml. Da nur im Extinktionsbereich zwischen 0.1 und 1.5 die Extinktion und die Nukleinsäurekonzentration proportional zueinander sind, geht der Messung eine entsprechende Verdünnung voraus, deren Faktor am Schluss wieder in die Konzentrationsberechnung einfließt.

Nach der Warburgschen Formel $(1.45 \times OD_{260}) - (0.74 \times OD_{280}) = \text{mg Protein/ml}$ kann auch der Gehalt verunreinigender Proteine in der DNA Lösung bestimmt werden. Die aromatischen Aminosäurereste von Proteinen haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} einer sauberen DNA-Präparation liegt bei 1,8.

Konzentrationsbestimmung im Agarosegel

Durch Vergleich der Leuchtintensität einer DNA Bande im Agarosegel mit der Referenzbande eines Markers mit definiertem DNA-Gehalt kann die DNA Menge in einer Probe mit dem Auge abgeschätzt werden. Als Referenzbande für die Mengenabschätzung dienen Bande definierter DNA Menge aus dem „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ Marker. Wenn 10 µl Marker aufgetragen werden, enthält die 1,031 kb Bande 71 ng DNA, die 2 kb Bande 102 ng und die 3 kb Bande 154 ng DNA. Neben der Markerspür werden dann verschiedene Verdünnungen der Probe aufgetragen. Über die Aufgetragene Menge in der Spur, deren Leuchtintensität im UV-Licht nach Ethidiumbromid-Färbung mit der der Markerbande übereinstimmt, kann die DNA Konzentration in der Probe berechnet werden. Diese Methode zeigt auch den Zustand der DNA und das Vorhandensein von verunreinigenden Nukleinsäuren, aber nicht eventuelle Proteinverunreinigungen.

4.2.8 DNA-Präzipitation

Ethanol-fällung

Zu nukleinsäurehaltigen Lösungen werden 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 6.0) und 2 Vol. Ethanol gegeben. Nach gründlichem Mischen wird für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min). Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen (2 min, RT), erneut abzentrifugiert (13000 Upm, 5 min), getrocknet (Heizblock 37°C, 5 min) und in TE aufgenommen.

Isopropanolfällung

Die Fällung erfolgt im Prinzip wie oben beschrieben. Nach Zugabe von 3 M NaAc (pH 6.0) wird jedoch das 0.7-fache Vol. Isopropanol zugegeben, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Sedimentation, Waschen und Trocknen, der DNA werden wie bei der Ethanolfällung durchgeführt.

4.2.9 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Bei der Auswahl der Restriktionsendonukleasen ist darauf zu achten, dass Enzyme verwendet werden, die unempfindlich gegenüber eukaryontischer bzw. prokaryontischer DNA Methylierung sind, je nachdem aus welchem Organismus die DNA stammt. Zu analytischen Zwecken wird 1 μg Plasmid-DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 μl für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Präparation von DNA Fragmenten werden 10 μg DNA in einem Volumen von 50 μl mit 10 U Restriktionsenzym 3 h bis ü.N. bei 37°C verdaut. Verdau von genomischer DNA werden ü.N. inkubiert. Ihnen wird zur Stabilisierung der Restriktionsendonukleasen zusätzlich 5 mM Spermidin zugesetzt.

Unterschiedliche Enzyme benötigen unterschiedliche Reaktionsbedingungen (Pufferzusammensetzung, Temperatur). Diese sind den Datenblättern der Enzyme zu entnehmen. Die jeweiligen Puffer und eventuell hinzuzufügendes BSA werden beim Kauf der Enzyme mitgeliefert.

4.2.10 Auffüllen und Entfernen überhängender DNA Enden

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen führt an den Schnittstellen zur Entstehung unterschiedlicher Enden. Diese sind nach Verdau mit dem gleichen Enzym oder bei Verwendung von Isoschizomeren miteinander kompatibel. Schnittstellen verschiedener nicht kompatibler Enzyme lassen sich dagegen nur religieren, wenn entweder beide stumpfe Enden erzeugen, oder die entstandenen Überhängenden Enden zu stumpfen Enden aufgefüllt bzw. abgeknabbert wurden.

5'-überhängende Enden

Bei 5' überhängenden Enden werden die auf dem Gegenstrang fehlenden Basen aufgefüllt. Dazu werden im Anschluss an den präparativen Verdau dem Reaktionsansatz dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM/dNTP) und 2-5 U/ μg DNA Klenow-Polymerase hinzugefügt und alles 10 min bei RT inkubiert.

3'-überhängende Enden

Überstehende 3'-Enden werden durch die Exonukleaseaktivität der T4-Polymerase entfernt. Zu diesem Zweck werden im Anschluss an den präparativen Verdau dem Reaktionsansatz dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM/dNTP) und 2-5 U/ μ g DNA T4-Polymerase hinzugefügt und alles 10 min bei RT inkubiert.

4.2.11 Dephosphorylierung von DNA Enden

Selbstligation geöffneter Plasmide führt bei der Vermehrung ligierter DNA-Konstrukte in Bakterien zum Hochwachsen vieler Kolonien, die nur den Leervektor und nicht das gewünschte Produkt enthalten. Damit nach einer Ligation nicht zu viele Klone analysiert werden müssen, wird die Selbstligation durch Entfernung der 5'-Phosphatgruppe an den DNA-Enden verhindert. Dazu werden dem präparativen DNA Verdau am Ende 1-10 U CIP pro μ g DNA zugesetzt. Der Reaktionsansatz wird anschließend für 30 min bei 37°C und für 30 min bei 45°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 mM DTT wird weitere 5 min bei 45°C inkubiert. Die Zugabe des DTT führt zur weitgehenden Zerstörung der alkalischen Phosphatase. Vor der Reinigung der DNA Fragmente aus dem Reaktionsansatz wird die alkalische Phosphatase für 5 min bei 68°C vollständig inaktiviert. Der Erfolg der Dephosphorylierung kann über eine Kontrolligation des Vektorfragments getestet werden. Nach Transfektion in Bakterien dürfen nur wenige Kolonien hochwachsen.

4.2.12 Phosphorylierung von DNA Enden

Vor der Einligation synthetischer Oligonukleotide in geöffnete Plasmide muss auf das 5'OH Ende der Oligonukleotide eine Phosphatgruppe übertragen werden. Dieser Transfer wird durch die Polynukleotidkinase katalysiert. Sie überträgt Phosphatgruppen von ATP auf ds und ssDNA. Als Reaktionsansatz werden 5 μ M Primer mit 500 mM ATP (Stock 10 mM) und 10 U T₄PNK in deren mitgeliefertem Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Polynukleotidkinase für 10 min bei 68°C inaktiviert. Durch Ligation der annealten Oligonukleotide mit sich selbst, für 30 min bei RT, kann der Erfolg der Phosphorylierungsreaktion überprüft werden. Ligation phosphorylierter Oligonukleotide führt zur Bildung einer im Agarosegel sichtbaren Leiter von Fragmenten, die verschiedenen Vielfachen der Ursprungsoligonukleotidgröße entsprechen.

4.2.13 Annealing von Oligonukleotiden

Einzelsträngige Oligonukleotide müssen vor der Einligation in geöffnete Vektoren miteinander zu dsDNA annealt werden. Hierzu werden sie in Anwesenheit von etwas

Salz, z.B. direkt in dem Reaktionsansatz am Ende der Phosphorylierung, für 5 min auf 96°C erhitzt und anschließend in einem Metallblock möglichst langsam abkühlen gelassen.

4.2.14 Ligation von DNA Enden

Zur Vermehrung in Bakterien müssen DNA Fragmente in zirkuläre Klonierungsvektoren ligiert werden. Dabei wird das Insertfragment mit überhängenden Enden in einem 3-fachen molaren Überschuss zum Vektorfragment eingesetzt, bei Ligationen mit stumpfen DNA Enden äquimolar. Der Reaktionsansatz für die Ligation enthält in einem Gesamtvolumen von 10 µl bis zu 1 µg DNA, (1 µl = 5 U) T4 DNA Ligase und deren von den Firmen mitgelieferten Puffer. Die Reaktion erfolgt ü.N. bei 14°C (min. 2 h 18°C und 30 min RT).

Die Klonierung von PCR Produkten erfolgt generell auch durch klassische Ligation nach Restriktionsverdau. Dafür werden an den 5' Enden der PCR Primer Restriktionsstellen und einige darüber hinausgehende Nukleotide mit eingeführt (Scharf et al, 1986). Oft schneiden Restriktionsenzyme an den Enden eines Fragments aber nur schlecht (Kaufman und Evans, 1990). Welche Enzyme an den Enden schneiden und wieviele zusätzlich Nukleotide dafür erforderlich sind, ist dem New England Biolabs (Bad Schwalbach) Katalog zu entnehmen.

In einigen Fällen wurden PCR Produkte mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kit ligiert. Statt einer Ligase wird hier ein geöffneter, mit Vaccinia Topoisomerase I aktivierter pCR2.1 Vektor verwendet, der an seiner Klonierungsstelle T-Überhänge bereitstellt. Die Topoisomerase ist an beide Enden des Vektors über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent gebunden und ligiert PCR Produkte innerhalb von 5 min (Shuman, 1994). Voraussetzung ist, dass das PCR Produkt A-Überhänge mitbringt. PCR Produkte können dann nach Vermehrung des pCR2.1 Vektors in Bakterien aus diesem über vom Plasmid bereitgestellte oder von den PCR Primern mitgebrachte Schnittstellen wieder herausgeschnitten werden. Anschließend ist die Ligation in jedes andere Plasmid effizienter als die direkte Klonierung synthetischer PCR Produkte.

4.2.15 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde zum Einen zum Klonieren von DNA Konstrukten, zum Anderen aber auch zur Analyse von Klonierungen (Kolonie-PCR) und von Rekombinationsereignissen im Genom von HEA125 Zellen eingesetzt. Sie ermöglicht *in vitro* die spezifische Amplifikation einer definierten Region eines DNA Moleküls.

Ein typisches PCR Programm besteht aus drei Schritten, die in 20-40 Zyklen immer wieder durchlaufen werden und dabei mit jedem Zyklus die Anzahl der im Reaktionsansatz vorhandenen DNA Moleküle verdoppeln. Die Zahl der Zyklen wird bei präparativen PCRs möglichst gering gehalten. Bei jedem Zyklus können sich Fehler in die vervielfachte DNA Sequenz einschleichen, die mit jedem darüber hinausgehenden Zyklus mit vermehrt werden. Je weniger Zyklen, desto geringer ist die Mutationswahrscheinlichkeit in den klonierten Produkten. Bei analytischen PCRs kann die Zyklenzahl dagegen zugunsten eines deutlicheren Signals solange erhöht werden, bis unspezifische Produkte einen zu starken Hintergrund bilden.

Im Denaturierungsschritt trennen sich bei 95°C die Stränge der Matrizen DNA. Im Zweiten Schritt wird die Temperatur gesenkt, so dass es zum Annealing der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Matrizen DNA kommt. Die Annealingtemperatur ist abhängig von Primersequenz und Länge. Die hier verwendeten Primer funktionierten zum Großteil mit einer Annealingtemperatur von 65°C. Das ist günstig, weil geringere Annealingtemperaturen zur Bildung unspezifischer PCR Produkte führen. Im dritten Schritt wird für die Elongation die Temperatur auf das Temperaturoptimum der Polymerase erhöht. Hier wird der Primer verlängert, bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt, die der Matrizen-DNA mehr oder weniger exakt gleicht.

Durch dieses Vorgehen wird mit jedem Zyklus die Anzahl der im Reaktionsansatz vorhandenen, abbeschriebenen DNA Moleküle verdoppelt.

PCR Schema für Klonierungen

Zyklen:	2 x	18-23 x	1 x
	1. 2 min 95°C	4. 30 s 95°C	
	2. 1 min 52°C	5. 30 s 65°C	
	3. 1 min 72/68°C	6. 1 min 72/68°C	7. 5 min 72/68°C

PCR Schema für Analysen

Zyklen:	1 x	40 x*
	1. 1 min 95°C	2. 30 s 95°C
		3. 1 min 65°C
		4. 4 (+n·1,66) min 72/68°C
		5. 15 min 72/68°C

* Die Elongationszeit wird hier nach Zyklus 11, 16, 21, 26, 31 und 36 um jeweils 1 min und 40 s verlängert.

Für die PCRs wurden die Polymerasen Taq und PWO verwendet. Taq arbeitet optimal bei 72°C, PWO bei 68°C. Beide Polymerasen unterscheiden sich im Wesentlichen dadurch, dass die Taq keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität besitzt, die eine Korrekturaktivität erlaubt. Die Fehlerrate von Polymerasen mit Korrekturaktivität ist ca. 10fach geringer gegenüber der von Polymerasen ohne (Cline *et al.* 1996). Daher wurde zur Klonierung bevorzugt reine PWO Polymerase verwendet, pure Taq hingegen nur für analytische PCRs. Sehr gute Ergebnisse bei der Amplifikation mit genomischer DNA als Matrize wurden durch eine Mischung von neun Teilen Taq und einem Teil PWO erhalten. Sie erzeugte in vielen Fällen auch dann PCR Produkte, wenn beide Polymerasen allein eingesetzt versagten. Zur Erzeugung besonders langer PCR Produkte wurde das „Expand Long Template PCR System“ verwendet, in dem eine unbekannte Mischung von Proofreading und nicht Proofreading Polymerasen geliefert wird. Das 10:1 Taq/PWO Gemisch erzielt in dem PCR-Puffer, der nach der Rezeptur des „Expand Long Template PCR Systems“ angesetzt wurde, vergleichbare Ergebnisse.

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Bei der Beschreibung der jeweiligen Plasmidkonstrukte im Ergebnisteil ist immer mit aufgeführt, welche Primer verwendet wurden.

PCR Reaktionsansatz

Gesamtvolumen pro Ansatz:	ad 100 μ l	H ₂ O
(je nach Bedarf, min. 10 μ l)	10 μ l	10 x Reaktionspuffer der Polymerase
	175 μ M	dNTPs, Endkonz./Nukleotid
	50 μ M	Primer 1
	50 μ M	Primer 2
	1 μ g	DNA (Matrize)
	5 U	Polymerase

Erzeugung von A Überhängen für die TA Klonierung

In einigen Fällen wurden PCR Produkte mit Hilfe des „TOPO TA Cloning® Kit“ in den geöffneten, aktivierten Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert (Vorteile siehe Abschnitt 4.2.14). Dieser stellt an seiner Klonierungsstelle T-Überhänge bereit. Voraussetzung dafür, dass ein PCR Produkt erfolgreich ligiert werden kann, ist dass es A-Überhänge mitbringt. Diese werden bei der Amplifizierung von DNA mit nicht Proofreading Polymerasen (z.B. Taq) automatisch generiert. Die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der Proofreading Polymerasen (z.B. PWO) verhindert aber die Erzeugung solcher A-Überhänge während der PCR, was dazu führt, dass die PCR Produkte glatte Enden

haben. Solche PCR Produkte werden zur Ligation mittels „TOPO TA Cloning® Kit“ mit Taq Polymerase vorbehandelt, indem dem PCR-Ansatz 5 U Taq-Polymerase/50 μ l Gesamtvolumen und 160 μ M dNTPs zugesetzt werden und der Ansatz weitere 10 min bei 72°C inkubiert wird.

4.2.16 Mutagenese

Durch gezieltes Einführen von Punktmutationen können bei der PCR entstandene, relevante Mutationen, wieder korrigiert werden. Die Mutagenese erfolgt mit Hilfe des „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“. Der Kit enthält bis auf die Medien und Agarplatten alle benötigten Materialien. Es wird strikt nach dem von der Firma bereitgestellten Protokoll vorgegangen, und deshalb hier nur kurz das Prinzip erläutert. Die Einführung der Mutation erfolgt durch Amplifizierung des Ausgangskonstruktes mit der Pfu Turbo DNA Polymerase und langen Primern, die in ihrer Mitte die gegenüber der Normalsequenz ausgetauschten Basen enthalten. Im Unterschied zur PCR liegen hier die antiparallelen Primer nicht in einiger Entfernung voneinander, sondern hybridisieren an gegenüberliegender Position an beiden Strängen des Inserts. Pro Strang wird also nur ein komplementärer Primer in die Reaktion eingesetzt, von dem aus dann vollständig um das Plasmid herum amplifiziert wird.

Mit steigender Anzahl der Amplifizierungszyklen nimmt die Konzentration des mutierten Plasmids relativ zum nicht mutierten Ausgangsplasmid immer mehr zu.

Nach Beendigung der Reaktion wird der komplette Ansatz mit DpnI verdaut. Dieses Restriktionsenzym schneidet methylierte DNA, wodurch das Ausgangskonstrukt, nicht aber die neu amplifizierte DNA, verdaut wird. Die Ligation der doppelsträngigen Amplifikate erfolgt nach Transformation in den auch im Kit enthaltenen *E. coli*-Stamm XL1-Blue (Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac^rZDM15Tn10(Tet^r)*]) durch die Zellen, die vor dem Ausplattieren in NZY⁺-Medium wachsen. Da keine Möglichkeit der Selektion auf Klone mit eingeführter Mutation besteht, muss durch Sequenzierung ein Klon gefunden werden, der zum Einen die eingeführte Mutation enthält, und in dem zum Anderen durch die Amplifikation keine zusätzliche Mutation erzeugt wurde. Nach der hier gemachten Erfahrung tragen über 90% der analysierten Konstrukte die Mutation. Die Fehlerrate der PCR ist zwar nicht geringer, als mit anderen Proofreadingpolymerasen auch, der Vorteil ist aber, dass nur ca. 16 Zyklen gemacht werden müssen, erheblich weniger als für eine normale Ligation. Die Methode rentiert sich, wenn ein Produkt beim Abschreiben von genomischer DNA Probleme bereitet und daher recht hohe Zyklenzahlen erforderlich sind, um überhaupt ein klonierbares Produkt zu erhalten.

4.2.17 Sequenzierung

Die Übereinstimmung der Sequenzen aller verwendeten Konstrukte mit den genomischen Sequenzen und Referenzsequenzen wurde durch Sequenzierung überprüft. Ebenso wurde nach Mutagenese deren Erfolg durch Sequenzierung kontrolliert.

Die Sequenzierungen wurden von Markus Stauch, Sahra Burmester und Ute Ernst (Abt. Molekulare Genomanalyse, DKFZ, Heidelberg) im 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Warrington, England) durchgeführt. Pro Sequenzierungsreaktion wurden 200 bis 300 ng DNA eingesetzt. Mit Sequenzierprimern komplementär zum Vektor auf beiden Seiten der Multiklonierungsstelle und bei Inserts länger als 500 bp weiteren Primern komplementär zum Insert, wurden synthetisierte DNAs jeweils in zwei Richtungen durchsequenziert.

4.2.18 Computer-Nukleotidsequenzanalysen

Die Planung der Konstrukte, deren Darstellung als Vektorkarte sowie Restriktionsanalysen wurden mit dem Programm „Gene Construction Kit“ von Textco BioSoftware, USA vorgenommen.

Die Gene der humanen und murinen Antikörpergenorte finden sich in den online Datenbanken². Die Analyse der Antikörpergene wurde unterstützt durch V-Base³, gepflegt von Ian Tomlinson vom MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge sowie durch die Kabat „Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest“⁴ (Kabat *et al.* 1991).

Alignments zur Analyse von Sequenzierungsergebnissen wurden mit dem Programm SeqMan aus dem DNA★ Paket der Firma DNASTAR, USA erstellt. Zum Vergleich verschiedener Maus und Mensch Antikörpergenorte wurden auf dem HUSAR-Server⁵ (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) des DKFZ, Heidelberg optimale multiple Alignments mit dem Standardalgorithmus CLUSTAL errechnet.

Weitere Genanalysen wurden auf verschiedenen Plattformen durchgeführt, hauptsächlich auf dem HUSAR-Server (s.o.) und auf dem Server des National Center for Biotechnology Information⁶, Bethesda/USA.

Homologien wurden in den Datenbankbanken GENBANK und EMBL gesucht, hauptsächlich mit Programmen aus dem HUSAR Paket, die auf den Suchalgorithmen

² <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> (Mensch und Maus); www.gdb.org/hugo (Mensch); www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink (Mensch und Maus); <http://imgt.cines.fr> (Mensch und Maus)

³ <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imtdoc/public/INTRO.html>

⁴ <http://immuno.bme.nwu.edu/>

⁵ <http://husar.dkfz-heidelberg.de>

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

FASTA (Pearson & Lipman 1988, Pearson 1990) und BLASTA (Altschul *et al.* 1997, Karlin & Altschul 1990, Karlin & Altschul 1993) beruhen.

4.3 Zellbiologische Arbeitstechniken

4.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien werden in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 40 ml Zellkultur-Medium (siehe Abschnitt 4.1.12) kultiviert. Die Kulturen werden im Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf gehalten. Wenn die Zellen dicht gewachsen sind (Konfluenz bei adhärenenten, 1·10⁶ Zellen/ml bei Suspensionszellen), werden sie 1:10 verdünnt. Adhärenente Zellen müssen dazu nach Abnahme des Überstandes mit PBS gewaschen und 5 min bei 37°C mit 5 ml Trypsin/EDTA (4.1.12) inkubiert werden. Anschließend werden die Zellen durch seitliches gegen die Flasche Schlagen abgelöst und die Trypsinierung durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium gestoppt. Nach Überführung der Zellen in ein 15 ml Röhrchen wurden sie 5 min bei 2000 Upm abzentrifugiert (Minifuge GL) und 1/10 verdünnt erneut in Kultur genommen.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Die Färbung mit 0.5%iger Trypanblaulösung ermöglichte dabei die Unterscheidung zwischen toten (blau) und lebenden Zellen.

G418 Selektion

Zur Positivselektion von erfolgreich veränderten Zielzellen nach Miteinführung des NPTII Gens werden die Zellen in Zellkulturmedium abhängig von der Zelllinie und der G418-Charge mit ca. 100 bis 1000 µg/ml G418 kultiviert.

G418 wird als Stocklösung (100 mg/ml in H₂O) angesetzt. Die Wirksamkeit der Charge und die Sensitivität der Zelllinie wird bestimmt, indem in 24-Loch-Platten pro Loch 5·10⁴ Zellen in 1 ml Zellkulturmedium mit ansteigenden G418 Konzentrationen (25 µg Intervalle) zwei Wochen lang kultiviert werden. Die geringste G418 Konzentration, bei der keine überlebende Zellen mehr in der Kultur enthalten ist, wird für die Selektion verwendet.

Herstellung von Einzelzellklonen (limitierte Verdünnung)

Nach Bestimmung der Zellzahl werden pro zu bestückender 96-Loch-Platte je 50 Zellen in 10 ml Zellkulturmedium gleichmäßig verdünnt und davon 100 µl in jedes Loch der Platten überführt. Da Einzelzellen allein in Kultur meist nicht überleben, werden mit ihnen zusammen Maus Feederzellen (5·10⁵ Zellen pro ml) kultiviert. Die-

se versorgen die Zellen bis die Klone groß genug sind mit den nötigen Wachstumsfaktoren. Nach 1 bis 2 Wochen in Kultur sterben die Maus-Milz Feederzellen ab und die Klone expandieren allein weiter.

Gewinnung von Feederzellen

Zur Herstellung von Feederzellen wird die steril entnommene Milz einer BALB/c Maus in eine Petrischale mit DPBS gegeben, mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Sieb gedrückt und in 13 ml DPBS aufgenommen. Nach Überführung in ein 15 ml Röhrchen wird gewartet, bis sich die groben Partikel (Milzkapsel) abgesetzt haben und dann der Überstand mit den restlichen Zellen in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellen werden abzentrifugiert (5 min bei 2000 Upm), nochmals in DPBS gewaschen und in Zellkulturmedium resuspendiert. Eine Milz ergibt 4 bis $7 \cdot 10^7$ Feederzellen.

Antikörperproduktion in Hybridomzellen

Zur effektiveren Produktion von Antikörpern werden Hybridomzellen in größeren Dichten kultiviert, als das in stationären Zellkulturflaschen möglich ist.

Dies wird in Rollerflaschen erreicht, hier wird das Medium (Rollerflaschen-Medium, 4.1.12) mit HEPES gepuffert, weil die Inkubation der Rollerflaschen im Brutraum nicht unter CO_2 Begasung stattfinden kann. Rollerflaschen haben den Nachteil, dass die produzierten, ins Medium sezernierten Antikörper in sehr großen Volumina vorliegen (mehrere Liter), denn die Zellen müssen immer wieder mit frischem Medium versorgt werden.

Dieses Problem besteht bei der Produktion im miniPERM Bioreaktor nicht, denn hier ist das Zellkompartiment, in dem sich auch die produzierten Antikörper anreichern, durch eine semipermeable Membran räumlich von dem versorgenden Medium getrennt. Zur Kultur in diesen Modulen werden $1 \cdot 10^8$ Zellen luftblasenfrei in einem Volumen von 40 ml in das Zellkompartiment überführt. Das Mediumkompartiment wird mit 400 ml vorgewärmtem miniPERM-Medium befüllt und das Modul druckfrei verschlossen. Die Kultivierung findet in der ersten Woche bei 2,5, anschließend bei 5 Upm im Brutschrank auf einer speziellen Rollerapparatur statt. Wenn die Farbe des Mediums im Versorgungskompartiment von fleischfarben nach gelb umgeschlagen ist, wird das Medium gewechselt. Nach drei Wochen erstmals und anschließend in wöchentlichem Abstand können, solange die Zellen gut wachsen und produktiv sind, die Antikörper geerntet werden. Dazu werden 20 ml der Kultur aus dem Zellkompartiment gegen frisches Medium ausgetauscht. Wenn die Produktivität des Hybridoms nachlässt, wird das gesamte Zellkompartiment abgeerntet. Die Suspension aus den geernteten Kulturen wird in 50 ml Röhrchen abzentrifugiert (10 min, 3000 Upm),

der Antikörper reiche Überstand in neuen Röhrchen erneut zentrifugiert (10 min, 5000 Upm) und anschließend sterilfiltriert (0.22 μ m-Filter, Millipore, Bedford, USA). Die so gewonnenen Überstände können direkt für Immunfärbungen verwendet oder aufgereinigt werden.

4.3.2 Lagerung eukaryontischer Zellen

Einfrieren

Zum Einfrieren werden die Zellen in 4°C kaltem Einfriermedium suspendiert und in speziellen Einfrier Röhrchen bei -70°C in einer Styroporbox langsam herunter gekühlt. DMSO diffundiert in die Zellen und verhindert die Kristallbildung beim Einfrieren und somit die Zerstörung der Zellmembran. Zur langfristigen Lagerung (> 1 Jahr) werden die Zellen nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Auftauen

Zum Auftauen werden die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff entnommen, kurz eine halbe Umdrehung weit geöffnet um das mögliche explosionsartige Entweichen eingedrungenen Stickstoffs zu verhindern und zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut. Sobald das Medium flüssig ist, werden die Zellen schnell in 10 ml 37°C warmes Zellkultur-Medium überführt, abzentrifugiert (5 min, 2000 Upm), und je nach Zellzahl so in Medium aufgenommen, dass die Kulturen dicht sind. Zu starkes Verdünnen vertragen die Zellen nach dem Auftauen nicht. Die Flaschen von Suspensionszellen werden 1 Tag stehend im Inkubator kultiviert und dann erst gelegt.

4.3.3 Transformation eukaryontischer Zellen

Zur Einschleusung von DNA in eukaryontische Zellen gibt es verschiedene physikalische, lipidbasierte und chemische Verfahren, die je nach Zelllinie verschiedene Effizienzen erzielen. Alle diese Verfahren müssen speziell für die jeweilige Zelllinie optimiert werden.

Bei Transfektionen, die der transienten Expression der Ziel-Plasmide dienen, wird zirkuläre DNA verwendet. Zum Zweck der homologen Rekombination werden die Plasmide vorher linearisiert.

Die sehr gut aufgereinigten DNA Konstrukte müssen vor der Verwendung in der Zellkultur durch Ethanol-Fällung und anschließendes Trocknen in der Sterilwerkbank sterilisiert werden. Wenn nicht anders erwähnt wird die DNA in sterilem H₂O gelöst.

Durch Miteinführung positiver Selektionsmarker kann nach der Transfektion auf Zellen, welche die Ziel-DNA aufgenommen haben, selektiert werden. Mit der Selektion

wird frühestens 24 h nach der Transfektion begonnen, damit die Zellen Zeit haben, sich zu erholen und die Resistenz vermittelnden Gene zu exprimieren.

Elektroporation (nach Potter et al. 1984, Baum et al. 1994)

Durch einen kurzen elektrischen Impuls wird die Zellmembran kurzfristig permeabilisiert und die DNA kann diese, vermutlich diffusionsgeteuert, passieren.

Ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen pro Ziel-DNA Konstrukt und Küvette (BioRad, München) werden abzentrifugiert (5 min, 2000 Upm). Der Überstand wird als konditioniertes Medium sterilfiltriert (0,45 μm Filter). Die Zellen werden in Elektroporations-Puffer mit Pasteurpipetten sehr vorsichtig resuspendiert und 2x gewaschen (5 min, 2000 Upm). Anschließend werden sie in 400 μl Elektroporations-Puffer pro $1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendiert und je 400 μl weise ($1 \cdot 10^7$ Zellen) in vorgekühlte 4 mm-Küvetten mit jeweils 15 μg Ziel-DNA gegeben. Nach vorsichtigem Mischen werden die Küvetten 10 min auf Eis inkubiert und dann im Elektrosquare Porator T 820 2 ms lang mit einem Puls von 480 V elektroporiert. Hiernach werden die Zellen möglichst schnell in 37°C warmes Medium (5 ml/ $1 \cdot 10^7$ Zellen) bestehend aus konditioniertem Medium und Zellkultur-Medium (1:5) überführt. Die Kulturflaschen werden die ersten 12 h stehend im Inkubator gelagert.

Lipofektion (nach Felgner et al. 1987)

Diese Transfektionsmethode beruht auf der Fusion kationischer Lipide als Ziel-DNA Lieferanten mit den Zellen. Hierzu stehen einer Vielzahl von Transfektionsreagenzien zur Verfügung, von denen DOSPER, DOTAP und FuGENE 6 zur Lipofektion des HEA125 Hybridoms getestet wurden. Bei der experimentellen Durchführung der Transfektion wurde genau nach den Angaben der Hersteller vorgegangen.

Typischerweise werden 10^6 Zellen in einer 10 cm Petrischale mit 10 ml Zellkultur-Medium ausplattiert und für 24-48 h kultiviert. 5 μg Ziel-DNA wird in 5 ml serumfreien Medium verdünnt, 25-50 μl Liposomensuspension zugegeben, gut gevortext und die Mischung für 5-10 min inkubiert. Die Zellen werden einmal mit serumfreiem Medium gewaschen, das Medium entfernt und die Liposomen-DNA-Mischung zugegeben. Nach 3-5 h im Inkubator werden 5 ml serumhaltiges Medium zugegeben und der Ansatz für 16-24 h weiter inkubiert. Danach wird das Transfektionsmedium gegen Zellkultur-Medium ausgetauscht und die Zellen normal weiter kultiviert.

Calcium-Phosphat Transfektionen (nach Chen and Okayama 1988)

Die Zellen werden in 10 cm Petrischalen kultiviert (je 10 ml) und 24 h vor der Transfektion derart verdünnt, dass sie sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml oder 10-15% Konfluenz).

Nach Ethanolfällung der Ziel-DNA (20 µg/Petrischale) wird das getrocknete Pellet 30 min bei RT in 500 µl Phosphat-Puffer/20 µg Ziel-DNA gelöst. Anschließend wird mit einer Pipette sehr langsam das gleiche Volumen 0,25 M CaCl₂-Lösung zugetropft und 30 min bei RT Calciumphosphat-DNA-Präzipitate ausgebildet. Die Suspension wird bei Zugabe zu den Zellen gleichmäßig in den Petrischalen verteilt und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Calciumphosphat-DNA-Kristalle werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. 4 h später erfolgt ein Glycerolschock, indem das Medium durch 5 ml Zellkultur-Medium mit 15% Glycerol ersetzt wird und die Zellen damit 5 min im Brutschrank inkubiert werden. Abschließend werden die Zellen zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen und normal weiter kultiviert.

4.3.4 Austausch von Genkassetten im Zielzellgenom

Homologe Rekombination

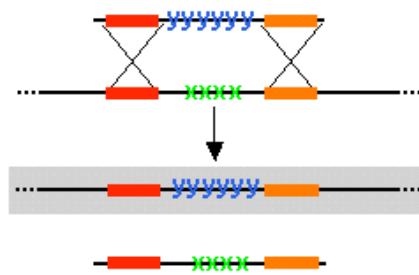
Gentransfer in eukaryontische Genome geschieht nach Einschleusen der Ziel-DNA entweder an einer zufälligen Stelle (unspezifische Integration, 1 von 10² bis 1 von 10⁴ Zellen), oder ortsspezifisch mittels homologer Rekombination (1 von 10⁵ bis 1 von 10⁷ Zellen) (Vasquez *et al.* 2001). Durch homologe Rekombination kann gezielt ein einzelnes Gen verändert oder durch ein anderes ausgetauscht werden. Dieser Austausch findet zwischen homologen doppelsträngigen DNAs statt und wird durch endogene DNA-Reparaturenzyme der Zelle vermittelt. Über die homologen doppelsträngigen DNAs wird der auszutauschende Zielgenort definiert.

Die Rekombinationsfrequenz ist abhängig von der Länge der homologen Sequenzen (Thomas und Capecchi 1987, Shulman *et al.* 1990) und die transkriptionelle Aktivität am Zielgenort (Nickoloff 1992) und von der Beschaffenheit der Ziel-DNA. Linearisierte begünstigt gegenüber zirkulärer Plasmid-DNA das Auftreten von homologer Rekombination (Abbildung 4-1). Zirkuläre DNA hat außerdem den Nachteil, dass vermehrte unspezifische Integrationen auftreten.

Spezifische Rekombination

Wesentlich effizienter als homologe Rekombination ist der Austausch von Genkassetten durch spezifische Rekombination mittels Cre/loxP oder Flp/FRT System. Im Unterschied zur homologen Rekombination wird hier die auszutauschende Genkassette im Genom und in der Ziel-DNA mit Erkennungsstellen für exogene spezifische Rekombinasen flankiert. Die Erkennungsstellen für die spezifische Rekombinase Cre werden als loxP, die für die Rekombinase Flp als FRT-Stellen bezeichnet. Die Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen ins Genom der Zielzellen erfolgt über homologe Rekombination. Bei der Positionierung der spezifischen Rekombinationsstellen ist zu beachten, dass sich durch das Start-Kodon in der Spacerregion

A: Homologe Rekombination mit linearer DNA



B: Homologe Rekombination mit zirkulärer DNA

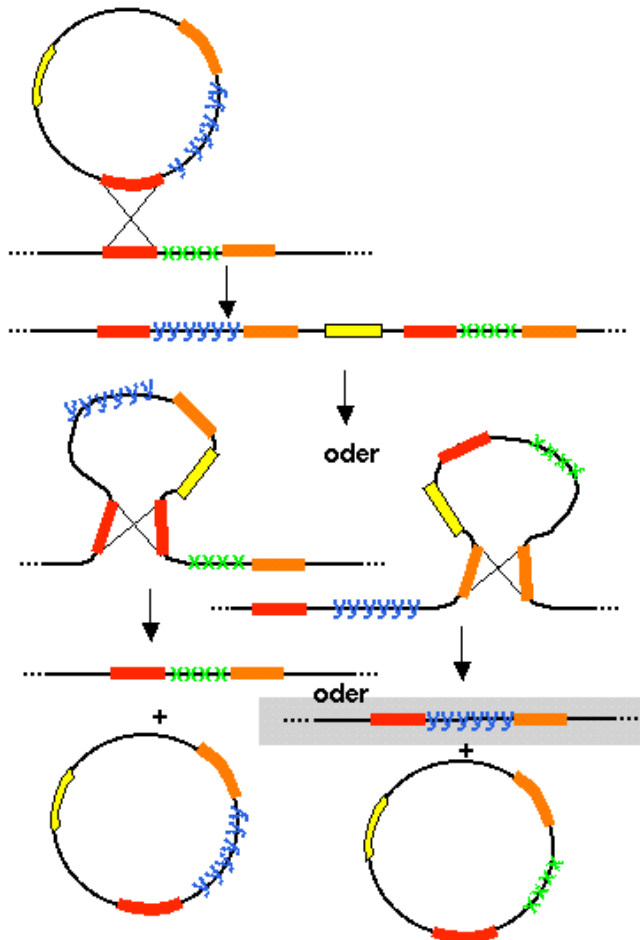


Abbildung 4-1: Schematische Übersicht homologer Rekombination mit linearer und zirkulärer DNA.

(Abbildung 4-2, rot unterlegt) der Sequenzen kein falscher Transkriptionsstart für das Zielgen ergibt. Rekombination erfolgt im Cre/loxP und Flp/FRT System immer zwischen zwei gleichen Rekombinationsstellen. Um zu verhindern, dass die zwischen den Rekombinationsstellen liegende Genkassette einfach nur ausgeschnitten wird, werden im Genom und in der Ziel-DNA gleiche Paare unterschiedlicher, nicht kompatibler, heterospezifischer Erkennungssequenzen verwendet. Diese unterscheiden sich durch Mutationen in den Spacerregionen (Abbildung 4-2).

Die Rekombinasen können als Protein eingebracht oder in Form transienter oder stabiler Expressionsplasmide in die Zielzellen geschleust und ggf. ins Genom integriert werden.



Abbildung 4-2: Erkennungssequenzen für die spezifischen Rekombinasen Cre und Flp. Es gibt weiter, durch andere Mutationen (vornehmlich in der Spacerregion) charakterisierte spezifische Rekombinationsstellen für beide Rekombinasen (siehe Branda und Dymecki 2004), hier sind für jedes Enzym zwei Beispiele dargestellt. Die hellgrünen Pfeile kennzeichnen die invertierten Sequenzbereiche, an die die Rekombinasen binden. Für Flp-vermittelte Rekombination sind nur die beiden rechten Bindestellen notwendig. Der dunkelgrüne Pfeil markiert die Spacerregion. Mutationen, die zur Heterospezifität der Erkennungsstellen führen, sind gelb unterlegt. Rot markiert sind in den loxP Stellen vorhandene Transkriptionsstartkodons.

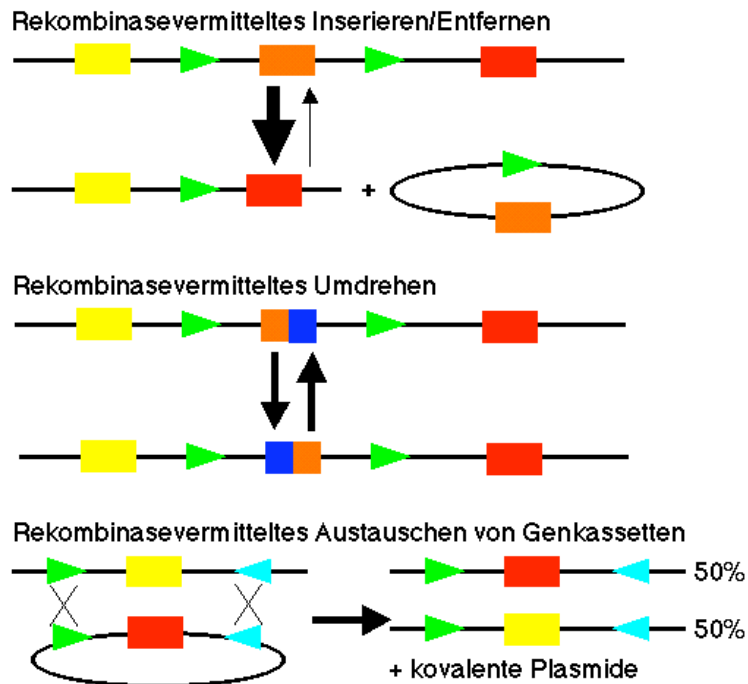


Abbildung 4-3: Rekombinasevermitteltes Inserieren/Entfernen, Umdrehen und Austauschen von Genkassetten (modifiziert nach Branda und Dymecki 2004.)

4.3.5 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen

Mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) können Einzelzellanalysen großer Zellzahlen (ca. 10^8 Zellen/Stunde) durchgeführt und die Zellen nach Oberflächenmerkmalen sortiert werden. Durch Kombination geeigneter Färbereagenzien können gleichzeitig mehrerer Antigene auf der Oberfläche einer Zelle analysiert werden, vorausgesetzt die Farbstoffe unterscheiden sich in ihren Emissionsspektren.

Zum Sortieren von Zellen müssen alle Färbeschritte unter sterilen Bedingungen erfolgen, für Analysen ist dies nicht erforderlich. Die zu testenden Zellen werden abzentrifugiert (5 min, 2000 Upm), der Überstand durch einen $0,45\ \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert (= konditioniertes Medium) und die Zellen mit Pasteurpipetten sehr vorsichtig in FACS-Medium resuspendiert. Auf die gleiche Weise werden die Proben noch zweimal in 10 ml FACS-Medium gewaschen. Anschließend werden die Zellen in FACS-Medium mit den entsprechenden Antikörpern (sterilfiltriert) resuspendiert (FITC-Konjugate werden 1:100, PE-Konjugate 1:250 und Biotin-Konjugate 1:100 eingesetzt).

Nach Inkubation (20-30 min, 4°C , im Dunkeln) werden die Zellen erneut zwei mal gewaschen und ggf. weitere Färbeschritte mit Zweitantikörpern vorgenommen. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Sekundärreagenz (Streptavidin-FITC oder -PE) für mindestens 10 min bei 4°C inkubiert. Nach abschließendem zweimaligem Waschen werden die Zellen in möglichst kleinen Volumina FACS-Medium mit Propidiumiodid (PI) aufgenommen und an einem FACScan Durchflusszytometer analysiert bzw. am FACSvantage Turbosorter sortiert. Propidiumiodid kann die desintegrierte Zellmembran toter Zellen im Gegensatz zur intakten lebendeiger Zellen passieren und färbt sie rot, wodurch die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden können. Die Daten werden anschließend mit Hilfe der Software Cell-Quest Pro (BD, Heidelberg) analysiert. Sortierte Zellen werden in 37°C warmes Medium (1 ml/ $1 \cdot 10^6$ Zellen) bestehend aus konditioniertem Medium und Zellkultur-Medium (1:5) und (1:100 $\mu\text{g/ml}$) Gentamycin überführt und die Zellen in der Probengröße entsprechenden 6-, 24- oder 96-Loch-Platten kultiviert. Flaschen mit Suspensionszellen werden die ersten 12 h stehend im Inkubator gelagert.

4.3.6 Isolierung von Zellsubpopulationen über Magnetbeads

Das magnetische Zellsortieren arbeitet mit submikroskopisch kleinen, superparamagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen, die keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben (Schumm *et al.* 1999). Die magnetischen Kügelchen heften sich an alle Zellen, die das Zielantigen auf der Oberfläche exprimieren. Diese Zellen

werden vom Magneten zurückgehalten und können so isoliert bzw. aus einer Kultur entfernt werden.

Hier wurden zwei verschiedene Systeme verwendet, der CELLection™ Pan Mouse IgG Kit und das MACS-System (Magnetic Activated Cell Sorting). Der Unterschied zwischen beiden ist die Größe der Magnetpartikel und dass mit den CELLection™ Magnetpartikeln (4,5 μm Durchmesser) im Batchverfahren gearbeitet wird (die Reaktionsgefäße werden bei den Waschschrritten in einen Dauermagneten gehängt oder davon entfernt), während das MACS-System (50 nm Partikeldurchmesser) standardisiert unter konstantem Druck arbeitet. Dazu werden mit Magnetpartikeln beladene Zellen im AutoMACS durch eine Säule in einem Magneten geleitet, gewaschen und eluiert nachdem die Säule aus dem Megnetfeld entfernt wurde.

Die Beladung der Zellen mit den Magnetbeads (CELLection™ Pan Mouse IgG Beads, MACS Ziege anti Maus IgG MicroBeads, MACS Ratte anti Maus IgG1 MicroBeads) geschieht nach den Angaben der Hersteller. Die Beads werden am Magnet gebunden von ihrem Puffer befreit und Zellsuspension derart dazugegeben, dass die Bead zu Zielzell Rate 10:1 beträgt und in der Mischung mindestens 10^7 Beads/ml enthalten sind. Nach 15 min Inkubation unter Mischen bei 4°C kann mit dem Isolieren der magnetischen Zellen begonnen werden (s.o.). Anschließend werden die Zellen wieder normal in Kultur genommen. Die CELLection™ Beads sind über einen DNA-Linker an die Antikörper gekoppelt. Sie können vor der Kultivierung der Zellen mittels DNase Verdau weitgehend aus der Zellsuspension entfernt werden.

4.4 Allgemeine proteinchemische Methoden

4.4.1 Analyse Antikörperhaltiger Kulturüberstände im ELISA

Mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) können Antikörper aus den Überständen von Hybridomkulturen charakterisiert werden. Hier diente er hauptsächlich zur Unterscheidung zwischen antikörperproduzierenden und nicht produzierenden Einzelzellklonen und zur Identifizierung von Antikörpern, die gegenüber dem Ausgangsantikörper Veränderungen erfahren haben (humane konstante Domänen und c-Myc in der CDR3).

Zunächst müssen 96-Loch-Platten mit dem ersten Antikörper (z.B. Ziege anti Mensch IgG) beschichtet werden. Dazu werden sie ü.N. bei 4°C mit 100 μl /Loch Antikörper in Carbonatpuffer (1-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Durch wiederholtes Dekantieren der Flüssigkeit und Befüllen mit 200 μl /Loch PBS-Tween werden die Platten zweimal gewaschen und zum Blocken 200 μl /Loch 0,2% Gelatinelösung eingefüllt. Die Platten müssen so mindestens ü.N., können gut verschlossen aber auch mehrere Monate lang bei 4°C inkubiert werden. Vor Auftrag der Proben wird die Blockierungslösung dekantiert. 100

$\mu\text{l}/\text{Loch}$ zu testender antikörperhaltiger Kulturüberstand von Hybridomzellen bzw. gereinigte Antikörper (100 ng/ml) als Positiv- und Negativkontrollen wird in die Löcher pipettiert und inkubiert (1h, RT). Zur Bestimmung des Hintergrundes werden zwei Löcher nur mit PBS-Tween versehen. Nach fünfmaligem Waschen der Platten mit PBS-Tween werden 100 $\mu\text{l}/\text{Loch}$ peroxidasegekoppelte oder biotinylierte, gegen den zu analysierenden Antikörper gerichtete Zweitantikörper (1:5000 in PBS-Tween) zugegeben (z.B. Ziege anti Mensch Kappa zum Nachweis humaner Kappa Ketten) und die Platten wieder inkubiert (1h, RT). Anschließend wird wie oben fünf mal gewaschen. Wenn der Zweitantikörper biotinyliert war, wird der letzte Schritt mit peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (1:10000) wiederholt (20 min, RT). Ansonsten kann gleich mit der Substratreaktion begonnen werden. Hierfür werden 0,1% OPD (Orthophenylendiamin) in Substratpuffer frisch gelöst, 0,1% (v/v) H_2O_2 zugegeben und 100 $\mu\text{l}/\text{Loch}$ auf die Platte verteilt. Die Substratreaktion wird unter Lichtausschluss ausgeführt und je nach Fortschritt nach 1-20 min durch Zugabe von 50 $\mu\text{l}/\text{Loch}$ 2M H_2SO_4 gestoppt. Zur photometrische Auswertung der Fabreaktion wird im Titertek Multiscan Plus MKII Photometer bei 492nm die optische Dichte der Lösungen in den einzelnen Löchern bestimmt.

4.4.2 Reinigung von Antikörpern

Maus und Mensch IgG bindet in physiologischem pH über seinen Fc-Teil an Protein A. Antikörper können daher durch Affinitätschromatographie an Protein A direkt aus Kulturüberständen gereinigt werden. Dafür wird eine Säule (Econo Column) mit Protein A-Sepharose CL-4B gepackt und mittels einer Pumpe (P-1) ü.N. der Antikörperüberstand aufgetragen. Durch Waschen mit Bindepuffer werden anschließend Proteinverunreinigungen von der Säule gewaschen. Die gebundenen Antikörper werden mit Elutionspuffer eluiert, wobei ein 2-Kanal-Schreiber die vom Photometer (2138 UVICORD S) gemessene Extinktion aufzeichnet. Die Peakfraktion wird aufgefangen. Zur Umpufferung und Neutralisation wird das Eluat dialysiert. Hierzu wird die Probe in einen vorher 10-15 min in H_2O ausgekochten Dialyseschlauch (danach Lagerung in PBS mit 0,1% NaN_3) überführt und ü.N. unter Rühren gegen 500-1000 ml PBS dialysiert, das in den ersten Stunden 3-4 mal erneuert wird. Abschließend wird die Antikörperlösung sterilfiltriert (0,22 μm Filter mit geringer Proteinabsorption) und photometrisch durch die Messung der OD bei 280 nm der Proteingehalt bestimmt. Aus dem Wert der OD bei 280nm dividiert durch 1.4 (bei IgG) errechnet sich der Proteingehalt in mg/ml.

Die Säule kann durch Waschen mit Regenerationspuffer regeneriert und anschließend in PBS mit 0,1% NaN_3 gelagert werden.

Die Antikörperlösungen werden bei -20°C langzeit gelagert. Antikörper die für FACS-Analysen häufig gebraucht werden, können mit 0,1% NaN_3 versetzt und dann bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden.

4.4.3 Biotinylierung von Antikörpern

Zur Biotinylierung von Antikörpern wird Biotin-X-NHS (Biotinyl- ϵ -amino-caproic-acid-N-hydroxy-succinimide-Ester) verwendet. X ist dabei ein Spacer von in diesem Fall 6 Aminosäuren, der dafür sorgt, dass das Biotin gut präsentiert werden kann. Die N-Hydroxysuccinimid (NHS) Gruppe dient als Crosslinker zur Kopplung an den Antikörper über eine Lysinbindung.

1-2 mg gereinigte Antikörper (in PBS) werden 20 h bei Raumtemperatur mit 100-200 μg Biotin-X-NHS (1 mg/ml frisch in Dimethylformamid gelöst) rotiert. Nichtgebundenes Biotin wurde durch extensive Dialyse gegen PBS (siehe Reinigung von Antikörpern Abschnitt 4.4.2) entfernt.

4.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gel-Elektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen und der Kontrolle der Sauberkeit gereinigter Proteine. Sie ermöglicht außerdem schnelle Molekulargewichtbestimmungen. Die meisten Proteine binden SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit β -Mercaptoethanol oder DTT, und unterbindet Quartärstrukturen. Abhängig von ihrem Molekulargewicht wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld verschieden weit durch eine poröse Polyacrylamidmatrix zum Pluspol.

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 10% SDS-Gele mit folgender Zusammensetzung verwendet.

Sammelgel, 10 ml (nach Laemmli, 1970 und Thomas und Kornberg, 1975):

16% Protogel; 25% Sammelgelpuffer pH 6,8; 2,8% APS; 0,94% (v/v) TEMED

Trenngel, 32 ml (nach Thomas und Kornberg, 1975):

33% Protogel; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS (Stock 10%); 0,94% APS; 0,94% (v/v) TEMED

Die 0,5 mm dicken Gele haben eine Größe von 16 x 18 cm und laufen im Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 40 V in den ersten 40 min, dann 50 V. Während der gesamten Laufzeit (ca. 3,5 h) werden die Gele mit einem Tischventilator gekühlt. Vor dem Auftragen auf die Gele werden die Proben in mindestens demselben Volumen Roti® load-1 SDS-Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) 5 min lang bei 95°C denatu-

riert. Es werden bei analytischen Gelen 14 μg Antikörper pro Spur aufgetragen, für Western Blots 0,5 μg Protein pro Spur. Zelllysate für Western Blots werden durch aufkochen (5 min) der entsprechenden Zellzahl in SDS-Probenpuffer hergestellt und $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Spur aufgetragen.

4.4.5 Färbung von SDS-Gelen

Vor dem Färben werden die Gele ü.N. in 10% Tri-Chlor-Essigsäure gelegt, die nach den ersten 30 min gegen frische ausgetauscht wird. Nach kurzem Abwaschen in H_2O werden die Gele 15 min in 0,04% Serva Blue W gefärbt und abschließend der Hintergrund für 1-2 h mit H_2O wieder entfärbt.

Zur Dokumentation werden die Gele mit einer Digitalkamera photographiert und anschließend getrocknet. Die Bearbeitung erfolgt mit dem Programm Adobe Photoshop 3 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA).

4.4.6 Blotten von Proteinen auf eine Nylonmembran

Proteine können per Elektrotransfer im Semi-Dry-Verfahren aus ungefärbten SDS-Gelen auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dazu wird eine Transfer Einheit aus folgenden Lagen zusammengesetzt (von unten): Anode, 4-6 Filterpapiere, getränkt in Blotpuffer I, 2-3 Filterpapiere, getränkt in Blotpuffer II, in Blotpuffer II getränkte Nylonmembran, Mit Blotpuffer II befeuchtetes Gel, 2-3 Filterpapiere, getränkt in Blotpuffer III, Dialysemembran, getränkt in Blotpuffer III, Kathode. Der Blot findet mit einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 Nylonmembran bei RT statt.

4.4.7 Immun Blot

Mit dem Immun Blot werden auf eine Nylonmembran geblottete Proteine durch Antikörper nachgewiesen. Die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine werden durch Schütteln der Membran 30 min bei RT in PBS mit 1% Milchpulver geblockt und anschließend die Membran in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Antikörper (reine Antikörper mit einer Konzentration von 1 mg/ml werden 1:200 eingesetzt) erfolgt in PBS-Tween mit 1% BSA. Die Membranen werden damit, abgedeckt auf dem Schüttler, 60 min bei RT inkubiert und hinterher 1x kurz und 2x 5 min in PBS-Tween gewaschen. An die primären Antikörper wird ein sekundärer, konjugiert an alkalische Phosphatase, gebunden. Die alkalischen Phosphatasekonjugate werden 1:20000 in PBS-Tween mit 1% BSA verdünnt und die Membran darin 60 min wie oben inkubiert. Es folgt wieder 3 x Waschen 1x kurz und 3x 5 min in PBS-Tween. Anschließend wird die Membran 2x 5 min in AP-Waschpuffer gewaschen, der den für

die alkalische Phosphatase optimalen pH von 9,6 einstellt. Der Nachweis der zweiten Antikörper erfolgt mit 0,005% BCIP und 0,01% NBT in AP-Puffer. Das Ergebnis ist eine Farbreaktion, die durch bläulich-lila Färbung der Proteinbanden direkt auf der Membran sichtbar wird. Die Farbreaktion wird durch gründliches Waschen der Membranen in H₂O abgestoppt und durch Photographieren der Membranen mit rot-empfindlichem Kleinbildnegativfilm dokumentiert.

4.5 Experimente zur Analyse der Antikörperspezifität

4.5.1 Bindungsexperiment

Um zu überprüfen, ob der HEA125 Antikörper durch eingeführte Veränderungen wie humane konstante Domänen nicht seine Spezifität verloren hat, wird er mit Colo205 Zellen inkubiert, die das Antigen EpCAM auf der Oberfläche präsentieren. Im FACS kann dann analysiert werden, ob der Antikörper unverändert an sein Antigen bindet. Das Vorgehen entspricht einer normalen FACS-Färbung (Abschnitt 4.3.5), als erste Antikörper dienen die zu analysierenden (Ausgang- und veränderter Antikörper, z.B. HEA125 und HEA-Huκ), als Sekundäntikörper solche, welche die beiden Erstantikörper unterscheiden können (z.B. Ziege anti human Kappa und Ziege anti Maus Kappa).

4.5.2 Affinitätsvergleich

Anhand eines kompetitiven Bindungsexperimentes können die Affinitäten zweier Antikörper, die für dasselbe Epitop spezifisch sind, unmittelbar miteinander verglichen werden. Das Vorgehen entspricht wieder einer normalen FACS-Färbung (Abschnitt 4.3.5), mit dem Unterschied, dass hier nur ein Färbeschritt vorgenommen wird. Von den beiden in ihrer Affinität zu vergleichenden Antikörpern (nicht fluoreszierend, hier HEA125 und HEA-Huκ) wird jeweils eine Verdünnungsreihe vorgelegt (je 100 µl). Mit diesen kompetitiven Antikörpern wird der kompetitierende, fluoreszenzmarkierte Antikörper (hier je 50 µl HEA125 Ausgangsantikörper mit konstanter Konzentration) gemischt. Das Zielepitop exprimierende Colo205 Zellen werden in FACS-Medium mit 333 mM humanem IgG zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen resuspendiert, je 50 µl zu den Antikörpermischungen gegeben und alles 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wird 2x gewaschen, wie oben beschrieben FACS-Medium mit PI zugegeben und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen bei den unterschiedlichen Antikörperverdünnungen im FACScan bestimmt.

5 Ergebnisse: Chimärisierung

Der monoklonale Maushybridomantikörper HEA125 bindet mit hoher Affinität an sein Antigen EpCAM. Da dieses auf humanen Karzinomen gegenüber normalem humanem Gewebe überexprimiert wird, ist der Antikörper als Therapeutikum für alle Tumore epithelialer Abstammung von Interesse.

Um die klinische Wirksamkeit zu verbessern und die Immunogenität des Antikörpers zu verringern, soll HEA125 chimierisiert werden. Hierzu werden durch homologe Rekombination die Gene, die in der Maus Hybridomzelle die konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten kodieren, durch ebendiese Gene des Menschen ersetzt. Abbildung 5-1 zeigt eine Übersicht über die Vorgehensweise. Homologe Rekombination findet in einer Häufigkeit von ungefähr einem Ereignis in $1 \cdot 10^7$ Zellen statt, abhängig vom Genort und der Länge der flankierenden homologen Arme. Aus diesem Grund wird normalerweise immer ein Resistenzgen (z.B. das Neomycin Phosphoryltransferase II Gen) zur anschließenden Positivselektion (z.B. mit Neomycin) mit eingeführt, um homolog rekombinierte Zellen identifizieren zu können (Kardinal *et al.* 1995; Sun *et al.* 1994; Mocikat *et al.* 1995). Hier wurde aber auf die Verwendung eines Selektionsmarkers für die homologe Rekombination vollständig verzichtet und die Zielzelle direkt aus der Gesamtzellsuspension isoliert, denn:

- Veränderungen in der Umgebung der Zielgenorte, die durch mit eingeführte Markergene verursacht werden, können zur Fehlregulierung benachbarter Gene führen (Olson *et al.* 1996),
- oft wird die Expressionsrate des Zielgens verringert (Colledge *et al.* 1995; Meyers *et al.* 1998),
- das für die Oberflächenpräsentation verantwortliche differentielle Spleißen könnte gestört werden, weil das Resistenzgen den Abstand zwischen CH3 und Transmembranexon verändert (Abbildung 7-1) und
- die Deletion eines Resistenzgens mit Hilfe von Cre/loxP nach erfolgter homologer Rekombination würde eine loxP Stelle hinterlassen (Sauer 1998), die beim späteren Austausch der variablen Domänen zur Erzeugung der Bibliothek stört.

Die Problemstellung, später eine Zielzelle aus $1 \cdot 10^7$ oder noch mehr Zellen herausfinden zu wollen, erforderte zunächst einen vergleichenden Test der hierfür in Frage kommenden Verfahren.

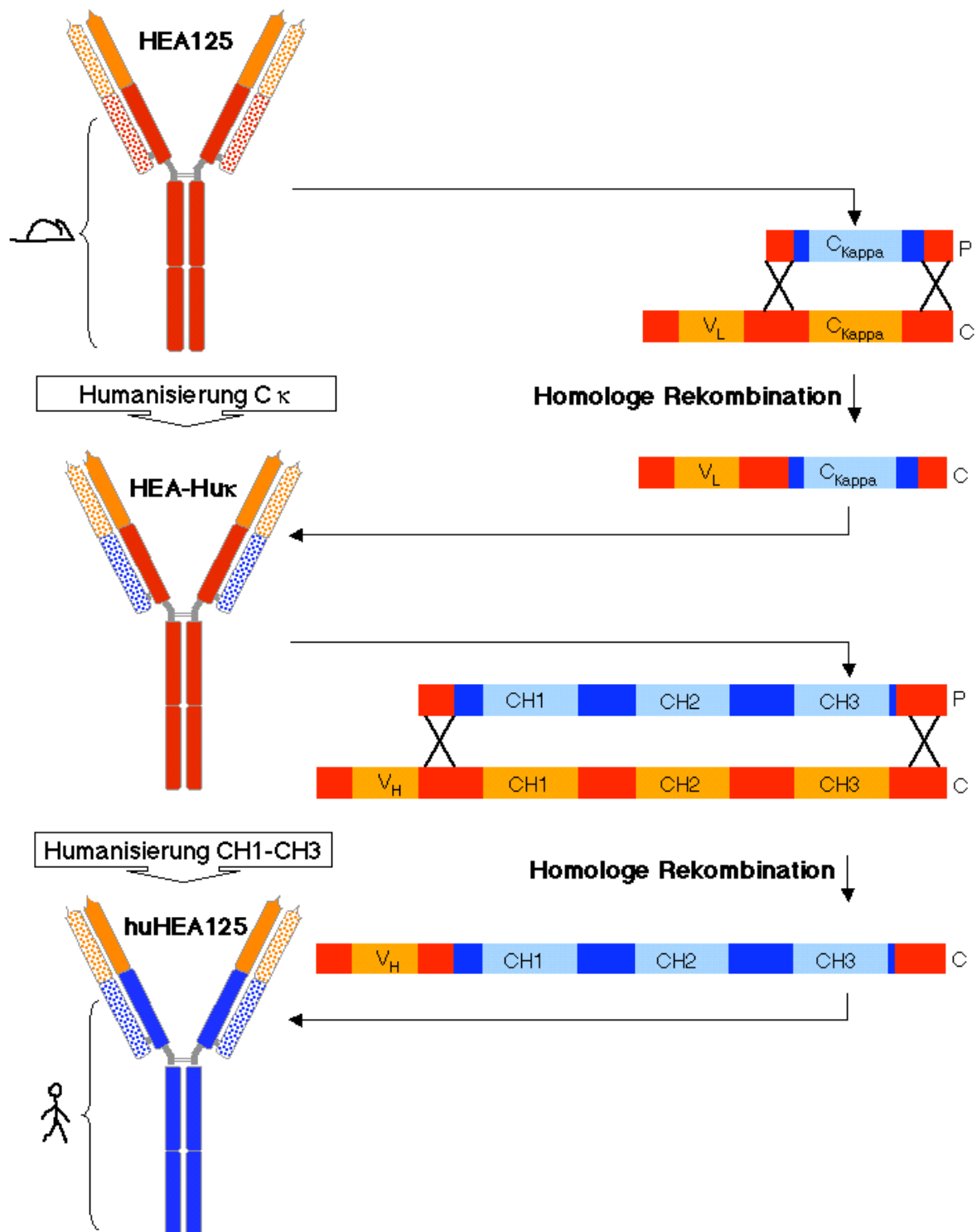


Abbildung 5-1: Verfahren zur Humanisierung von HEA125. Rechts sind die ins Genom einzubringenden Veränderungen auf DNA Ebene dargestellt. Die chromosomalen Mausgene des IGHC und IGKC Locus von HEA125 werden mittels homologer Rekombination durch die homologen Gene des Menschen ersetzt. Links ist die resultierende Veränderung des produzierten Antikörpers gezeigt. P = Plasmidkonstrukt, C = Chromosom, rot = von der Maus stammend, blau = human.

5.1 Methoden zum Isolieren homolog rekombinierter Zielzellen

Die Zelllinie HEA125 produziert einen IgG1 Antikörper. Die Immunglobuline aller Isotypen der schweren Ketten können in membrangebundener und in sekretierter

Form produziert werden. Die Ursache dafür ist das natürliche Vorkommen von jeweils zwei Spleißvarianten (Anand *et al.* 1997; Bensmana and Lefranc 1990; Yamawaki-Kataoka *et al.* 1982). Auch die Zelllinie HEA125 sezerniert einen Großteil der produzierten Antikörper ins umgebende Medium, der Rest wird auf der Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 5-2). Der Nachweis chimärer Antikörpermoleküle nach homologer Rekombination kann also sowohl über die sezernierten, als auch über die membrangebundenen Antikörper geführt werden.

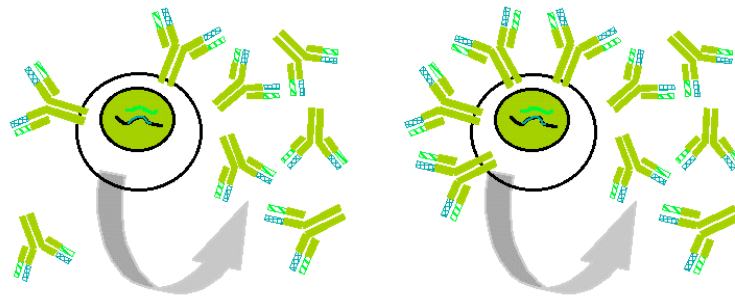


Abbildung 5-2: HEA125 sezerniert in variierenden Verhältnissen einen Teil der produzierten Antikörper ins umgebende Medium, ein anderer Teil wird auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die sezernierten Antikörper lassen sich im ELISA nachweisen. Als mögliche Methoden zur Isolierung von Zielzellen über die membrangebundenen Immunglobuline kommen das magnetische Zellsortieren und das Sortieren der Zellen im Durchflusszytometer in Betracht. Die Wiederfindungsraten eingesetzter Zellen beider Verfahren werden hier verglichen.

5.1.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Um im ELISA eine Zielzelle identifizieren und anreichern zu können, die einen veränderten Antikörper exprimiert, muss die Gesamtpopulation durch limitierte Verdünnung in Subpopulationen auf 96-Loch-Platten verteilt werden. Durch mehrfache Wiederholung der limitierten Verdünnung von Subpopulationen, in denen der veränderte Antikörper nachgewiesen werden konnte, ist anschließend die Isolierung von Einzelzellklonen möglich.

Die Anwendbarkeit dieser Methode für die Isolierung einer Zielzelle aus einer Gesamtpopulation von $1 \cdot 10^7$ oder mehr Zellen hängt davon ab, in wie viele Subpopulationen die Ausgangskultur im ersten Schritt geteilt werden muss. Die maximal mögliche Poolgröße, in der ein veränderter Antikörper nachgewiesen werden kann, ist beschränkt durch die im ELISA minimal nachweisbare Konzentration der produzierten Zielantikörper. Damit möglichst viele Zellen auf den gewünschten Antikörper hin untersucht werden können, wurde bestimmt, in wie vielen Zellen pro Loch ein einzelner Antikörperklon maximal verdünnt werden kann, so dass er gerade noch nachweisbar ist.

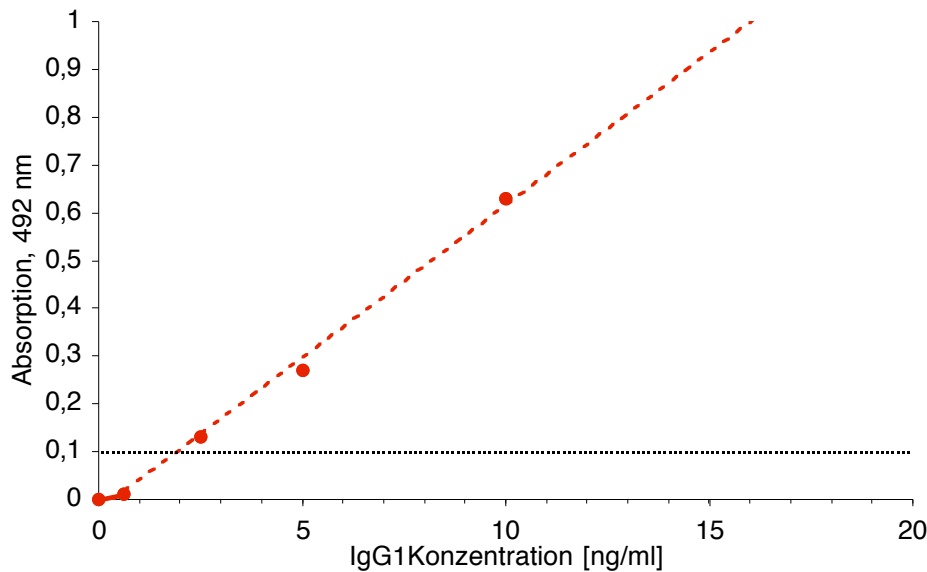


Abbildung 5-3: Bestimmung der Nachweisgrenze im ELISA. Eine 96-Loch-Platte wurde mit Ziege anti Mensch IgG+IgM Antikörpern beschichtet und anschließend mit humanem IgG1 inkubiert. Dieses wurde nach Zugabe des biotinylierten Ziege anti Mensch Kappa Zweitantikörpers für die Substratreaktion mit SA-POX markiert. Dargestellt ist die Absorption ansteigender IgG1 Konzentrationen.

Daher wurde zunächst die Nachweisgrenze humanen IgGs (=Zielantikörper) mit verschiedenen Zweitantikörpern bestimmt. Abbildung 5-3 zeigt den Nachweis von menschlichem IgG1 auf einer mit Ziege anti Mensch IgG+IgM beschichteten Platte und biotinyliertem Ziege anti Mensch Kappa Zweitantikörper. Eine Absorption bei 492 nm von $\geq 0,1$ wird als positiv gewertet. Sie wurde in diesem Setting bei einer Proteinkonzentration von weniger als 2 ng/ml erreicht. Der Test weiterer Antikörper in diesem System hat gezeigt, dass die minimal nachweisbare Konzentration mit den verwendeten Antikörpern etwas variiert. Bei unterschiedlich beschichteten ELISA-Platten, verschiedenen nachzuweisenden Antikörpern und unter Verwendung unterschiedlicher Nachweisantikörper lag sie aber immer im Bereich von 1 bis 5 ng/ml (Daten nicht gezeigt).

Zum Bestimmen der maximal möglichen Poolgröße wurde jeweils eine Antikörper exprimierende HEA125 Zelle in verschieden viele Ag8.653 Zellen gemischt und derart verdünnt, dass rechnerisch jeweils eine HEA125 Zelle pro Loch einer 96-Loch-Platte kultiviert wurde. HEA125 stammt aus der Fusion einer Mausmilzzelle mit einer AG8.653 Zelle (Moldenhauer *et al.* 1987) und hat daher eine ähnliche Generationszeit. Das ist wichtig, damit die Antikörper produzierende Zelle sich nicht im Vergleich zu den anderen Zellen erheblich mehr oder weniger oft teilt. Dann wäre die produzierte Antikörpermenge im Pool nicht mit der durch eine veränderte HEA125 Zelle unter HEA125 Zellen vergleichbar. Fünf Tage nach der limitierten Verdünnung wurde die Hälfte des Mediums ausgetauscht und nach sieben Tagen der Überstand der Kulturen im ELISA auf seinen Maus-IgG Gehalt untersucht.

Eine HEA125 Antikörperkonzentration von ca. 5 ng/ml, die im oben beschriebenen System immer sicher nachweisbar gewesen ist, war in Überständen von Kulturen enthalten, in denen eine HEA125 Zelle in $5 \cdot 10^3$ Ag8.653 Zellen gemischt worden ist. Maximal ist also eine Poolgröße von $5 \cdot 10^3$ Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte möglich, um eine Zelle ausfindig machen zu können, die Antikörper mit einer humanen konstanten Kappa Kette produziert. Diese Daten korrelieren sehr gut mit der Produktionsrate von Hybridomen in Zellkultur. Je nach Hybridom werden von dichten Kulturen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in 72 Stunden 10-50 μg Antikörper/ml produziert (Goding 1996). Übertragen auf die Kultur einer HEA125 Zelle in $5 \cdot 10^3$ Ag8.653 Zellen pro ELISA-Loch, die bis die Kultur dicht ist (4-5 Tage) zu einem Klon von ca. 20 Zellen heranwächst, heißt das, dass gerade ausreichend Antikörper für den ELISA-Nachweis produziert wird (1-5 ng/ml in drei Tagen).

Bei einer homologen Rekombinationsfrequenz von 10^{-7} bedeutet eine anfängliche Kulturgröße von $5 \cdot 10^3$ Zellen bei 96 Kulturen pro Platte, dass rechnerisch 20 Platten getestet werden müssten, um eine einzige Zielzelle finden zu können. Diese Zahl erhöht sich in der Praxis aufgrund der in Abschnitt 5.3 bestimmten Transfektionsrate von 30 bis 40% der überlebenden HEA125 Zellen noch auf 50 Platten. Dabei ist immer vorausgesetzt, dass die in der Literatur angegebene homologe Rekombinationsfrequenz unter den hier bestehenden Bedingungen auch zutrifft. Daher erweist sich der ELISA als Nachweismethode homolog rekombinierter Zellen als sehr aufwendig. Ist es allerdings möglich, die Zielzellen durch positive Selektion vorher anzureichern, stellt der ELISA eine gute Nachweismöglichkeit dar. Auch für die Suche nach Ereignissen die häufiger auftreten als homologe Rekombination, wie z.B. später bei Erzeugung der Bibliothek durch Genkassettenaustausch mittels spezifischer Rekombination, ist der ELISA gut geeignet.

5.1.2 Magnetisches Zellsortieren

Als Alternative zum ELISA können die Zielzellen auch an magnetische Beads gebunden werden, die je nach Bedarf mit anti Maus oder anti Mensch IgG beschichtet sind. Während der Waschschrte werden die Beads mit den daran gebundenen Zellen von einem Magneten gehalten und alle nicht an die Beads bindenden Zellen aus dem Ansatz entfernt.

CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit

HEA125 Zellen wurden im Verhältnis 1/1000 in 10^8 Jurkat Zellen (humane OKT3⁺ T-Zelllinie) gemischt. Durch Bindung an human anti Maus IgG beschichtete Magnetbeads wurden unter Verwendung eines Dauermagneten im Batchverfahren die

HEA125 Zellen isoliert. Anschließend wurden die Anzahl der wieder gefundenen Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und nach Färbung mit Ziege anti Maus IgG-Biotin (HEA125) bzw. OKT3-Biotin (Jurkat) und Streptavidin-FITC im FACS deren Reinheit ermittelt.

Es wurden 4,3% der eingesetzten Zielzellzahl isoliert. Diese lagen in einer Reinheit von 20% HEA125 Zellen vor (Tabelle 5-1). Insgesamt wurden also nur 0,9% der eingesetzten HEA125 Zellen wieder gefunden.

Methode	CELLection™	AutoMACS	FACS-Sort
Mischverhältnis Zielzellen/Gesamtzellen	1/1000	1/1000	1/1000
Isolierte Zellen gesamt [% der eingesetzten Zielzellen]	4%	48%	98%
Davon Zielzellen	20%	80%	94%
Wieder gefundene der eingesetzten Zielzellen	1%	38%	92%

Tabelle 5-1: Vergleich der Effizienzen verschiedener Methoden zum Isolieren von Zielzellen nach homologer Rekombination.

AutoMACS

Dieselbe Mischung wie im CELLection™ Pan Mouse IgG Kit wurde unter Verwendung von MACS Ratte anti Maus IgG MicroBeads im AutoMACS getrennt. Der Unterschied zur oben beschriebenen Methode ist, dass hier nicht im Batch-Verfahren, sondern standardisiert in kleinen Säulen unter konstanten Drücken gearbeitet wird. Mittels AutoMACS wurden 48% der Zielzellzahl isoliert, in einer Reinheit von 80%. Das sind 38% der ursprünglich eingesetzten HEA125 Zellen (Tabelle 5-1).

5.1.3 FACS

Oberflächen gebundene murine und humane Immunglobuline lassen sich durch fluoreszenzmarkierte Antikörper verschiedenfarbig markieren und mittels FACS voneinander trennen.

Raji Zellen (humane B-Zelllinie, die Oberflächenimmunglobulin trägt) wurden im Verhältnis 1/1000 in 10^8 HEA125 Zellen gemischt. Nach Doppelfärbung der Zellen mit biotinyliertem Ziege anti Mensch Kappa Antikörper und FITC gekoppeltem Ziege anti Maus Kappa Antikörper und Zugabe von PE gekoppeltem Streptavidin, wurden mittels FACS Sortierer die Raji Zellen aus der Suspension isoliert. Anschließend wurde die Anzahl der wieder gefundenen Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und im FACS deren Reinheit ermittelt.

Es wurden 98% der eingesetzten Zielzellzahl isoliert. Diese lagen in einer Reinheit von 94% Raji Zellen vor. Insgesamt wurden in diesem Verfahren also 92% der eingesetzten HEA125 Zellen wirklich wieder isoliert (Tabelle 5-1). Das FACS Sortieren ist damit eindeutig die beste Methode zum Isolieren sehr kleiner Zielzellzahlen aus Suspensionen verschiedenfarbig markierter Zellen.

5.2 Etablierung der Subzelllinie HEA125-1 mit hoher Oberflächenexpression

Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Isolierung der homolog rekombinierten Zellen im FACS ist, dass auf der Zelloberfläche möglichst viele Antikörpermoleküle exponiert werden. Je mehr exprimierte Antikörper auf der Oberfläche sind, desto mehr fluoreszierende Zweitantikörper binden an die Zellen und ergeben ein umso stärkeres und somit verlässlicheres Signal im FACS. Durch mehrmonatiges, immer wiederholtes FACS-Isolieren der 10% HEA125 Zellen, die nach Färbung mit Ziege anti Maus IgG-FITC Antikörpern das stärkste Fluoreszenzsignal aufwiesen (Abbildung 5-4), wurde eine HEA125 Subzelllinie etabliert (HEA125-1). Diese Zelllinie zeichnet sich durch einen 30% höheren Anteil auf der Oberfläche exprimierter Antikörper aus. Nach Färbung der Zellen beider Linien mit Ziege anti Maus IgG-FITC Antikörpern haben die HEA125 Zellen im FACS eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von 98, die MFI der HEA125-1 Zellen beträgt 127. Die Autofluoreszenz ungefärbter Zellen hat eine MFI von 4,5.

Nochmaliges Sortieren von HEA125-1 direkt vor der Transfektion bringt kurzfristig eine weitere Steigerung des Anteils oberflächenpräsentierter Antikörper (Abbildung 5-5). Die aussortierten Zellen haben mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) von 105 gegenüber vorher 40 eine 2,6-fach höhere MFI als die Ausgangspopulation. Mit steigender Anzahl von Zellteilungen verringert sich in der Population wieder der Anteil der Zellen, die mehr Antikörper auf der Oberfläche exprimieren. Trotzdem ist nach zwei Tagen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität noch fast doppelt so hoch, wie die der Ausgangszellen (MFI = 73 gegenüber 40), und nach einer Woche ist sie immer noch 1,5 mal höher (MFI = 49 gegenüber 32). Für das Einschleusen von Zielgenen durch homologe Rekombination in den Antikörpergenolokus werden die HEA125-1 Zellen also möglichst kurz nach dem erneuten Sortieren direkt verwendet.

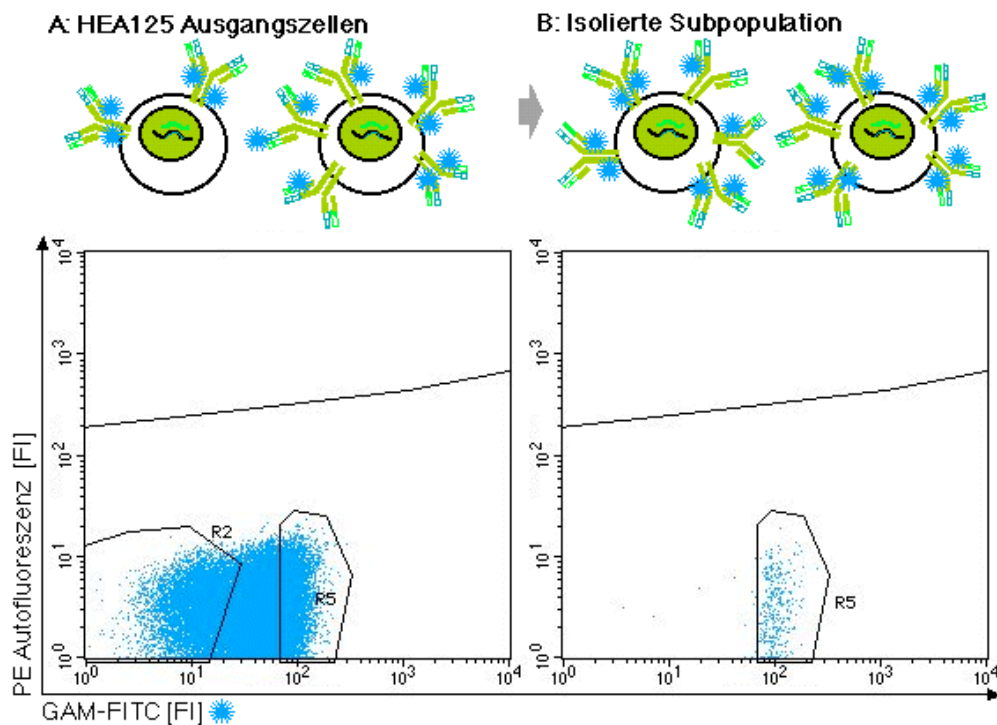


Abbildung 5-4: Sortieren von HEA125 Zellen zur Etablierung einer Zelllinie HEA125-1 mit höherer Oberflächenexpression. Die HEA125 Zellen wurden mit FITC markierten Ziegen anti Maus Antikörpern gefärbt und im FACS die 10% Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität (FI) isoliert. Dieser Schritt wurde nach dem Wiederhochwachsen der Zellen mehrfach wiederholt, bis die resultierende Zelllinie stabil mehr Antikörper auf der Oberfläche exprimierte.

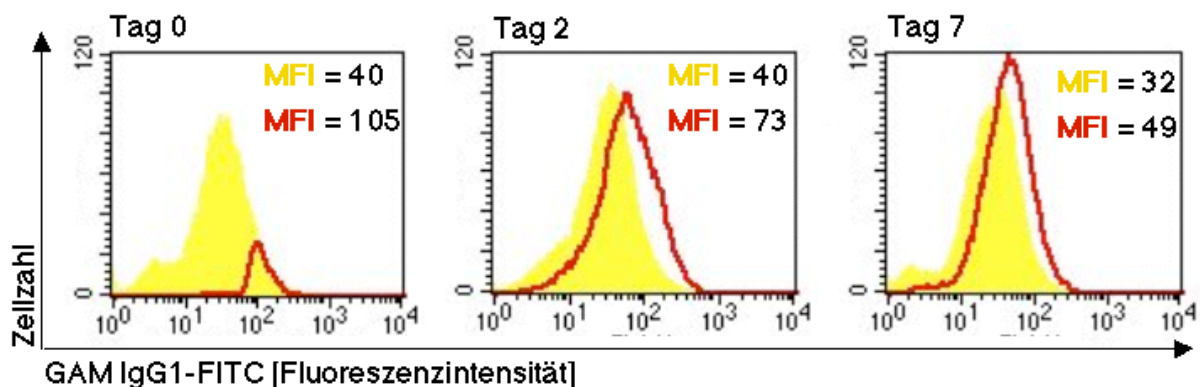


Abbildung 5-5: Sortieren von HEA125-1 auf hohe Oberflächenexpression. HEA125 Zellen wurden mit FITC gekoppelten Ziegen anti Maus IgG Antikörpern gefärbt. Die 10% Zellen mit der höchsten durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) wurden mittels FACS isoliert, sie bilden die Subzelllinie HEA125-1. Die MFI der HEA125-1 Zellen (rot) wurde am Tag 0, 2 und 7 bestimmt und jeweils im Verhältnis zur MFI von HEA125 (gelb) dargestellt.

5.3 Optimierung der Transfektion für HEA125 Zellen

Die erwartete Häufigkeit homologer Rekombination liegt nur bei 1 von 10^7 Zellen, wie bereits beschrieben (Seite 61). Daher muss beim Einschleusen der Ziel-DNA mit großen Zellzahlen gearbeitet werden. $1 \cdot 10^7$ Zellen sind in ungefähr 10 ml dicht gewachsener HEA125 Suspensionskultur enthalten, d.h. bei der Transfektion einer 100 ml Kultur entstünden rein rechnerisch maximal 10 Zielzellen. Bei Einbeziehung der

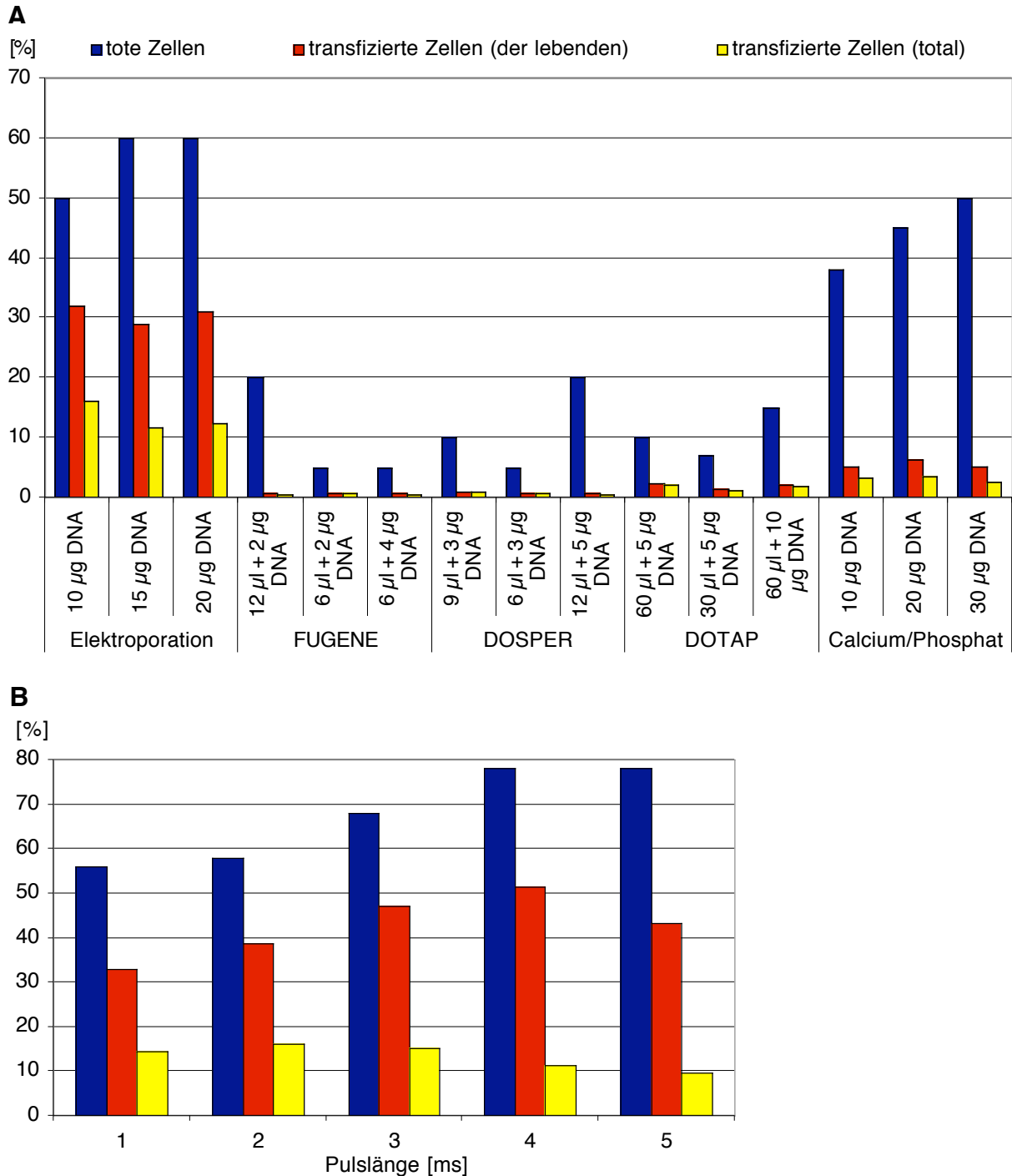
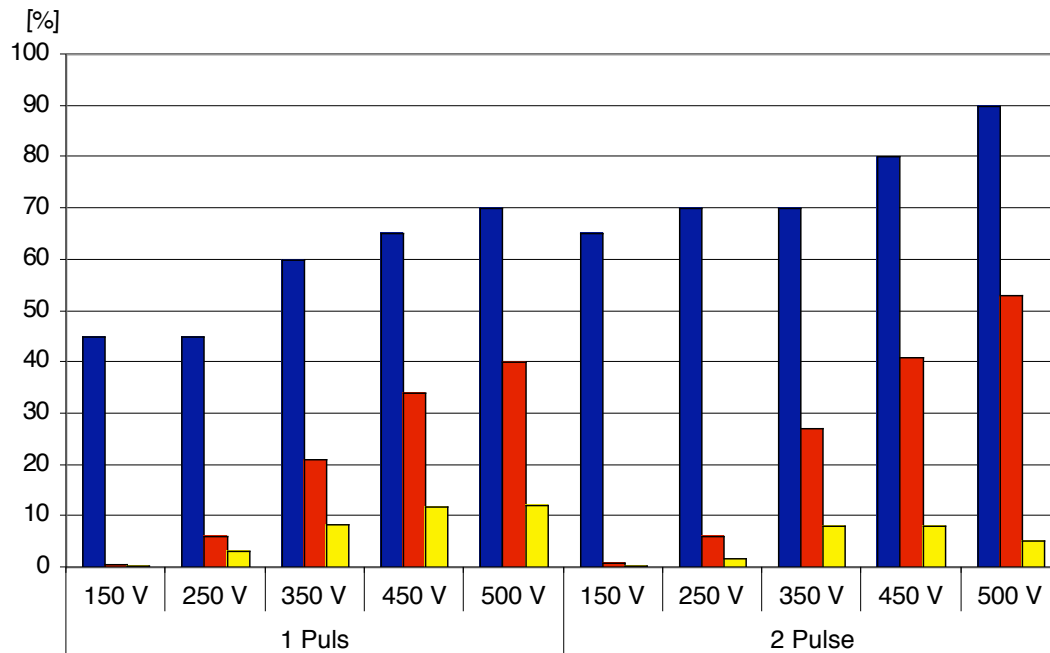
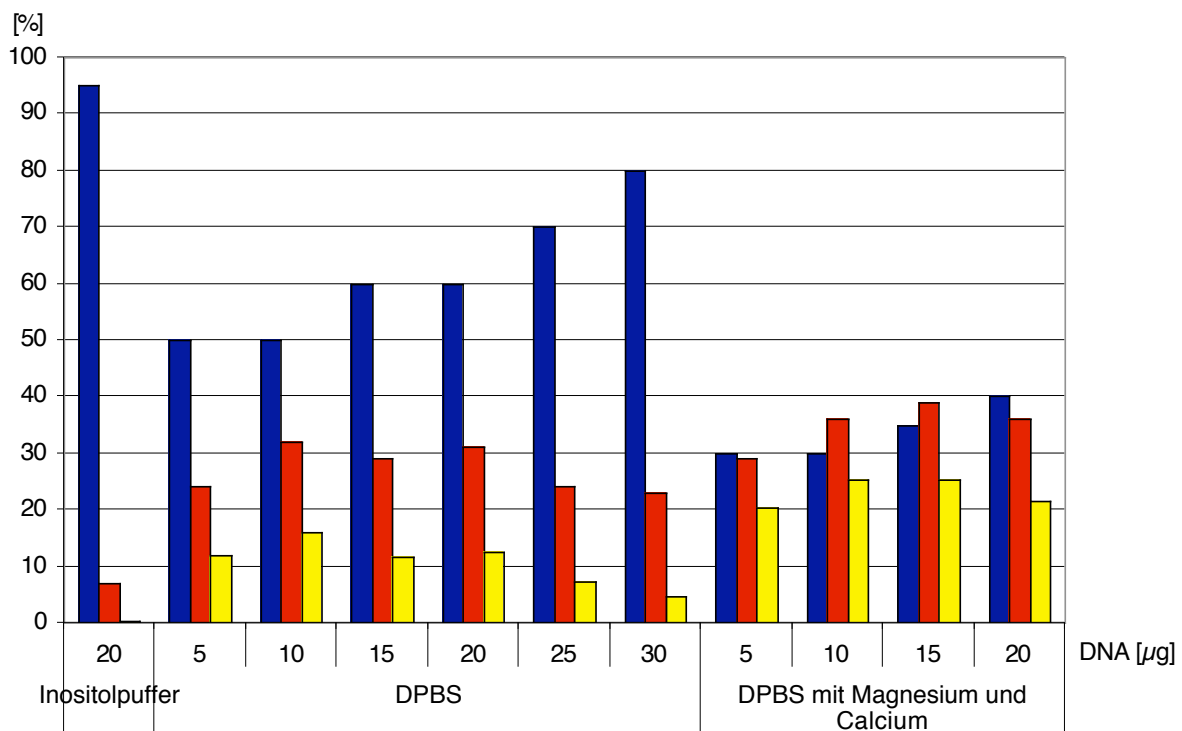


Abbildung 5-6: Optimierung der Transfektion. HEA125 Zellen wurden mit zirkulärer pEGFP-N3 DNA transfiziert. Nach 48 h wurde im Durchflusszytometer die Menge der toten Zellen und der Anteil der von den überlebenden transfizierten Zellen bestimmt. **A: Verglichen werden die Transfektionseffizienzen von physikalischer Elektroporation, lipidbasierten Transfektionsreagenzien (FUGENE, DOSPER, DOTAP) und Chemotransfektion (Calcium/Phosphat).** Die eingesetzte DNA-Menge wurde variiert, im Fall der Transfektionsreagenzien jeweils in einer niedrigen, mittleren und hohen Konzentration, in Relation zur Menge des eingesetzten Reagenz. Elektroporation: 20 µg DNA, $1 \cdot 10^7$ Zellen, 1 Puls, 2 ms, 450 V, 10 min Prä- und Postinkubationszeit in DPBS. Legende: Blau = tote Zellen, rot = transfizierte Zellen (der lebenden), gelb = transfizierte Zellen (total). **B: Verglichen werden verschiedene Pulslängen bei der Elektroporation.** 20 µg DNA, $1 \cdot 10^7$ Zellen, 1 Puls, 1 bis 5 ms, 450 V, 10 min Prä- und Postinkubationszeit in DPBS. Legende siehe A.

C**D**

C: Verglichen werden verschiedene Spannungen und Pulszahlen bei der Elektroporation. 20 µg DNA, $1 \cdot 10^7$ Zellen, 1 Puls (oder variiert 2 Pulse), 2 ms, 450 V (oder variiert 150 – 500 V), 10 min Prä- und Postinkubationszeit in DPBS. Legende siehe A. **D: Verglichen werden verschiedene DNA Mengen und Transfektionspuffer bei der Elektroporation.** 20 µg DNA (oder variiert 5 – 30 µg), $1 \cdot 10^7$ Zellen, 1 Puls, 2 ms (oder variiert 1 ms), 450 V (oder variiert 150 – 500 V), 10 min Prä- und 0,5 min Postinkubationszeit in DPBS (oder variiert in Inositolpuffer (Steven et al. 1989: 280 mM Inositol, 0,1 mM Calcium Acetat, 0,5 mM Magnesium Acetat, 1 mM Phosphatpuffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 6.5) oder DPBS mit 0,5 mM Magnesium und 0,1 mM Calcium). Legende siehe A.

Transfektionsrate verringert sich diese Zahl erheblich. Daher war es wichtig, zunächst die für HEA125 am Besten geeignete Transfektionsmethode herauszufinden und diese dann möglichst weit zu optimieren.

Zu diesem Zweck wurden die Effizienzen physikalischer (Elektroporation), chemischer (Calcium/Phosphat) und lipidvermittelter (FUGENE, DOSPER und DOTAP) Transfektionsmethoden verglichen (Abbildung 5-6 A). Als Testsystem dienten HEA125 Zellen, die mit dem zirkulären, transient eGFP exprimierenden Plasmid pEGFP-N3 transfiziert wurden. 48 Stunden später wurden die Zellen im FACS analysiert und die Transfektionseffizienz bestimmt.

Gegenüber Chemotransfektion und lipidvermittelter Transfektion ist für die Zelllinie HEA125 die Elektroporation mit Abstand am Besten geeignet, um eine große Menge Zellen zu produzieren, in die erfolgreich die Ziel-DNA eingeschleust wurde.

Bei der Durchführung der Elektroporation gibt es zahlreiche variable Größen (Somari *et al.* 2000). So ist das Verhältnis der verwendeten DNA zur Zellzahl in einer Küvette nur in einem sehr kleinen Bereich optimal (Stopper *et al.* 1987). Außerdem haben die Beschaffenheit des Transfektionspuffers (Martinez und Hollenbeck 2003, Steven *et al.* 1989, Sukhorukov *et al.* 1998), die Einstellungen Pulszahl, Pulslänge und Spannung des Elektroporators und die Inkubationszeiten (Daumler und Zimmermann 1989) Einfluss auf die Transfektionseffizienz.

Die Optimierung aller dieser Variablen erbrachte eine Verdopplung der Transfektionseffizienz von anfänglich 10 bis 15% (Abbildung 5-6 A) auf jetzt 25% (Abbildung 5-6 D). Die Zahl der mit DNA transfizierten überlebenden Zellen hat sich dabei von 30 auf 40% gesteigert. Sie kann durch Erhöhung der Pulslänge, Pulszahl und Spannung noch auf über 50% vergrößert werden, was die Zahl der insgesamt zu screenenden Zellen verringert. Allerdings sinkt mit dieser Steigerung der transformierten Zellen die Überlebensrate auf nur noch 5 – 10%. Die effektiv transfizierte Zellzahl ist dann mit ca. 11% so gering, dass der positive Effekt für das Screenen nicht mehr ins Gewicht fällt, weil sich die Zahl der zu transfizierenden Zellen damit verzehnfachen würde.

Zusammenfassend beträgt für HEA125 die optimale Menge der pro Küvette eingesetzten DNA 10 - 15 μg (Abbildung 5-6 D) und die optimale Zellzahl pro Küvette ist $1 \cdot 10^7$. Die Elektroporation ist am Effizientesten, wenn sie mit 1 Puls (Abbildung 5-6 C), einer Pulslänge von 2 ms (Abbildung 5-6 B) und einer Spannung von 450 V (Abbildung 5-6 C) durchgeführt wird. Die Transfektionsrate ist am Höchsten, wenn die Zellen vor der Elektroporation in der Küvette 10 min mit der Ziel-DNA auf Eis inkubiert werden. Nach der Transfektion müssen die Zellen innerhalb von 30 s in warmes Kulturmedium überführt werden, sonst sinkt die Überlebensrate bei gleich bleibender Transfektionsrate erheblich. Diese Bedingungen wurden in allen weiteren Versuchen als Standard für die Elektroporation von HEA125 verwendet.

5.4 Chimärisierung der leichten Kette

Die Immunglobulin (Ig) leichte Kette des HEA125 Antikörpers ist vom Typ Kappa (κ) (Moldenhauer *et al.* 1987). Im Zuge der Humanisierung der leichten Kette musste die konstante Domäne der Maus Ig κ Kette (IGKC) durch die humane IGKC Domäne ersetzt werden. Dafür wurde durch homologe Rekombination die DNA, die im Genom der Maus Hybridomzelllinie HEA125 die IGKC Domäne kodiert, durch humane IGKC kodierende DNA (= Hu κ Ziel-DNA) ausgetauscht. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 5-1 schematisch dargestellt.

5.4.1 Plasmid-DNA zur IGKC Humanisierung

Die Nukleotidsequenzen der murinen und humanen Antikörpersequenzen sind bekannt (Lefranc und Lefranc 2001 und Onlinedatenbanken⁷). Es gibt in beiden Organismen nur ein funktionelles Gen für die konstante Kappa Domäne. Dieses ist beim Menschen im IGK Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (Malcolm *et al.* 1982; Mc Bride *et al.* 1984) in Bande 2p11.2 kodiert (Emanuel *et al.* 1984).

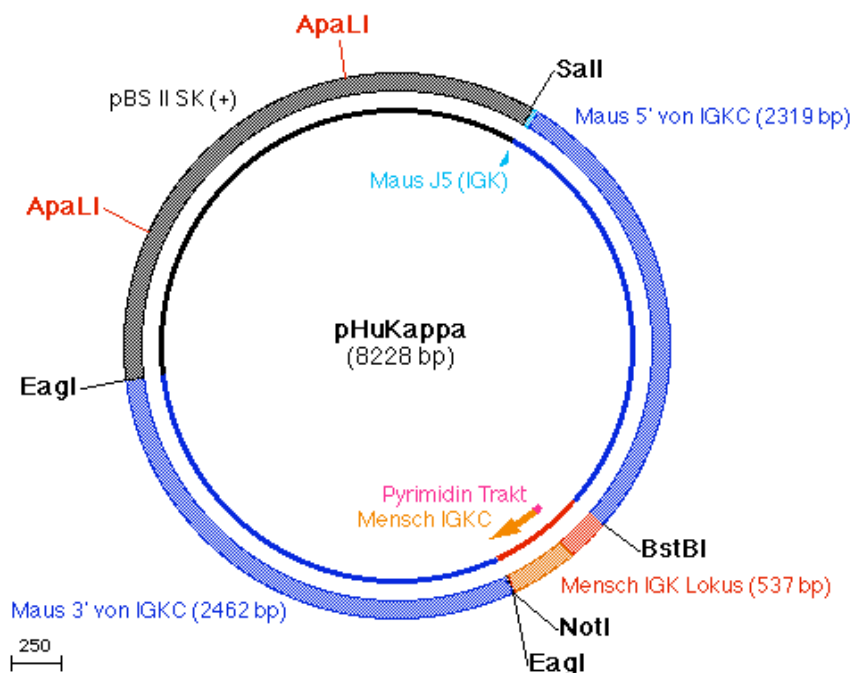


Abbildung 5-7: Schematische Darstellung der pHu κ Ziel DNA. Humane genomische Bereiche sind rot, relevante Exons orange dargestellt. Von der Maus stammende genomische Bereiche sind blau, Exons türkis dargestellt. Das Klonierungsvektorrückgrat ist schwarz markiert. Bei der Klonierung verwendete Restriktionsstellen sind, soweit noch vorhanden, schwarz dargestellt. Die Linearisierungsstellen sind rot markiert. Die Größen der einzelnen Elemente entsprechen den Längen der Sequenzen. Ein Maßstab, der die Länge von 250 bp repräsentiert, ist unten links abgebildet.

⁷ <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> (Mensch und Maus); www.gdb.org/hugo (Mensch); www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink (Mensch und Maus); <http://imgt.cines.fr> (Mensch und Maus)

Bei der Maus liegt der IGK Lokus auf Chromosom 6 (Martinez-Jean *et al.* 2001). Anhand der Datenbanksequenzen für den kodierenden Maus-IGKC Lokus wurde zunächst mit dem Programm BlastN aus HUSAR⁸ die Sequenz L80040 isoliert. Sie enthält den *Mus musculus* IGKC Keimbahnlokus (J1-J5 und C κ) inklusive der flankierenden Bereiche. Anhand dieser Sequenz wurden Primerpaare zur Amplifizierung des 5' flankierenden Bereiches (P1 & P2) und des 3' flankierenden Bereiches (P3 & P4) der Maus IGKC Domäne entworfen (Primersequenzen siehe Tabelle 4-1). An DNA von HEA125 Zellen wurden mit beiden Primerpaaren PCRs durchgeführt und die Produkte nacheinander in den Klonierungsvektor pBS II SK (+) eingesetzt, zuerst der 5' flankierende Bereich und anschließend der 3' flankierende Bereich. Die hierzu benötigten Restriktionsstellen wurden von den jeweiligen Primern mitgebracht. Anschließend wurde mit den Primern P5 & P6 (Tabelle 4-1) an humaner DNA der humane IGKC Lokus amplifiziert und zwischen die 5' und 3' flankierenden Mausbereiche in das Humanisierungsplasmid pHu κ ligiert. In Abbildung 5-7 ist der Aufbau des Plasmides dargestellt.

5.4.2 Homologe Rekombination

Plasmid-DNA kann in zirkulärer und in linearer Form in Zielzellen eingeschleust werden, wobei linearisierte DNA häufiger zu einem Austausch von DNA durch homologe Rekombination führt (Abbildung 4-1). Liegt die Linearisierungsstelle außerhalb der Homologiearme, wird der Anteil der homologen Rekombinationsereignisse gegenüber unspezifischen Integrationen erhöht (Mocikat *et al.* 1997; Kang und Shulman 1991; Hasty *et al.* 1991). Daher wurde die pHu κ DNA vor der Transfektion in die HEA125 Zellen mit dem Restriktionsenzym ApaLI verdaut. ApaLI schneidet das Plasmid pHu κ zweimal im bakteriellen pBS II SK (+) Vektorteil. Die Schnittstellen liegen jeweils über 700 bp entfernt von den Enden der Homologiearme (Abbildung 5-7). Eine Notwendigkeit, die homologen Sequenzen des Vektors mit der Ziel-DNA nach dem Verdau vom übrigen bakteriellen Plasmid zu trennen, besteht nicht (Hasty *et al.* 1991). Daher wurde zugunsten der Ausbeute, und um keine Verunreinigungen (z.B. Agarosegelrückstände) in die Ziel-DNA einzubringen, auf eine Abtrennung des herausgeschnittenen Bakterienvektorstücks verzichtet.

Das Einschleusen der linearisierten, doppelsträngigen Ziel-DNA erfolgte durch Elektroporation. Die für HEA125 optimale Vorgehensweise dabei ist in Abschnitt 5.3 beschrieben. Anfangs wurden pro Durchgang $1 \cdot 10^8$ HEA125 Zellen transfiziert. Das entspricht 100 ml Suspensionskultur in 10 Elektroporationsküvetten. Rein rechnerisch entstünden so bei einer homologen Rekombinationsfrequenz von 10^{-7} Zellen

⁸ Heidelberg Unix Sequences Analysis Resources, DKFZ; <http://husar.dkfz-heidelberg.de>

und einer Transfektionseffizienz von ca. 25 % (Abbildung 5-6 D) nur 4 positive Zellen. Später wurde die Zahl der pro Durchgang transfizierten Zellen verfünffacht (siehe Abschnitt 5.4.3)

5.4.3 Identifizierung und Isolierung homolog rekombinierter Zellen

Frühestens 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit FITC gekoppeltem Ziege anti Maus Kappa und PE gekoppeltem, Maus absorbiertem Ziege anti Mensch Kappa Antikörper gefärbt und mittels FACS die PE positiven Zellen isoliert. Weil es bei mehrfacher Wiederholung mit dieser Vorgehensweise nicht gelang, eine homolog rekombinierte, humane Kappa Ketten exprimierende Zelle zu isolieren, wurde die Zahl der pro Durchgang transfizierten Zellen verfünffacht. Außerdem wurde das gesuchte Signal der humane Kappa Ketten exprimierenden Zellen verstärkt, indem der Ziege anti Mensch Kappa Antikörper nicht PE gekoppelt sondern biotinyliert verwendet und dann mit Streptavidin-PE gefärbt wurde. So binden wesentlich mehr PE Moleküle an die Zielzellen, als bei Verwendung des direkt PE-markierten Antikörpers.

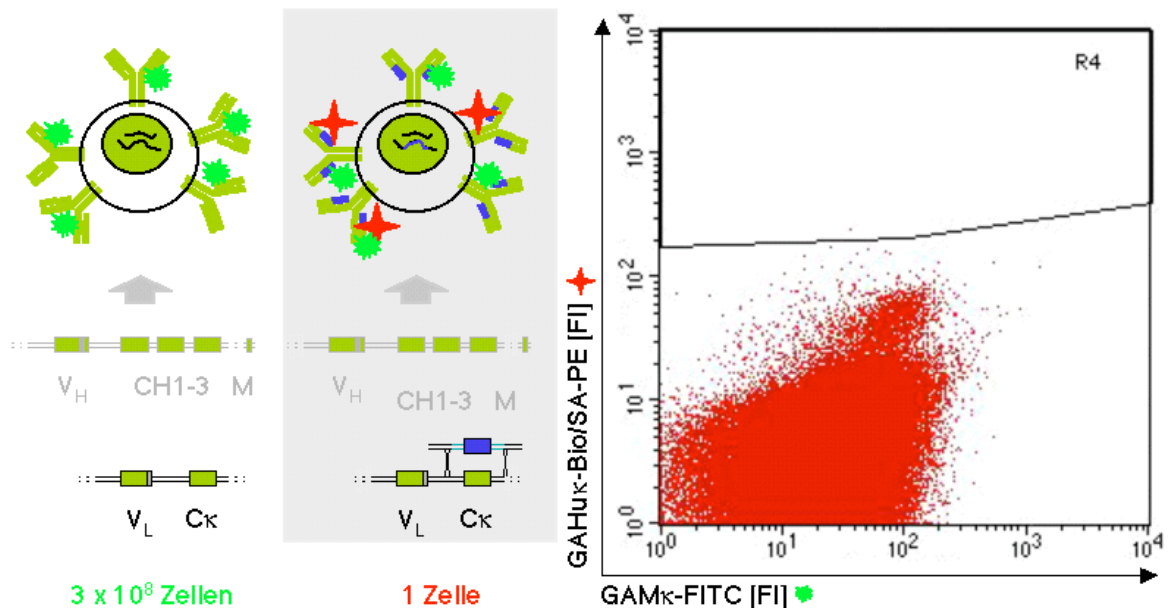


Abbildung 5-8: Isolierung humane Kappa-Ketten exprimierender Zielzellen. Zellen, in denen durch homologe Rekombination im Genom das Exon der murinen (in der schematischen Darstellung grün) durch die humane (blau) konstante Kappa Domäne ausgetauscht wurde, exprimieren auf ihrer Oberfläche gegenüber den Ausgangszellen veränderte Antikörper. Diese haben humane leichte Ketten (blau), die sich durch Zweitantikörper markieren lassen. Dazu wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion mit Ziege anti Maus Kappa-FITC (grün) und Ziege anti Mensch Kappa-Biotin/Streptavidin-PE (rot) Antikörpern gefärbt. Durch Zugabe von PI wurden die toten Zellen ausgeschlossen. Im FACS wurden $3 \cdot 10^8$ Zellen analysiert (rechts) und daraus 400 PE positive Zellen (Region R4) in Pools von je 100 Zellen in eine 96-Loch-Platte sortiert. FI = Fluoreszenzintensität.

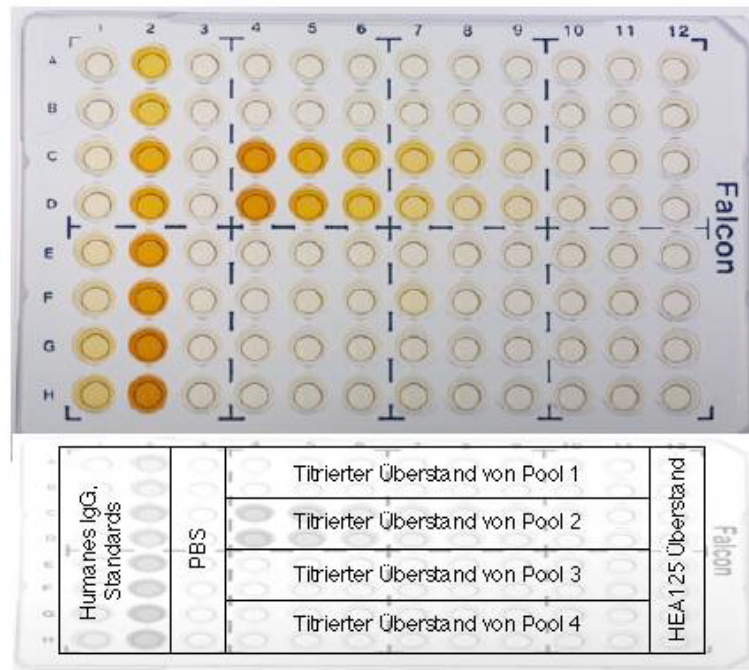


Abbildung 5-9: Identifizierung humane Igκ Ketten exprimierender Zielzellen im ELISA. Mittels FACS wurden 4 Pools von Zellen isoliert, die ein für menschliche konstante Kappa Domänen positives Signal erzeugten (siehe Abbildung 5-8). Überstände dieser Pools wurden im ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern mit humanen Kappa-Ketten getestet. Die Platte war mit Ziege anti Mensch IgG Antikörpern beschichtet. Nach Inkubation mit den Überständen der 4 Pools wurden monoklonaler Biotin gekoppelter Ziege anti Mensch κ Antikörper und Streptavidin-POX hinzugefügt und anschließend die Substratreaktion durchgeführt. Spalte 1+2 enthalten als Positivkontrolle definierte Konzentrationen menschlichen IgGs (0 - 100 ng/ml). Die letzte Spalte enthält als Negativkontrolle den Überstand von wt HEA125 Zellen.

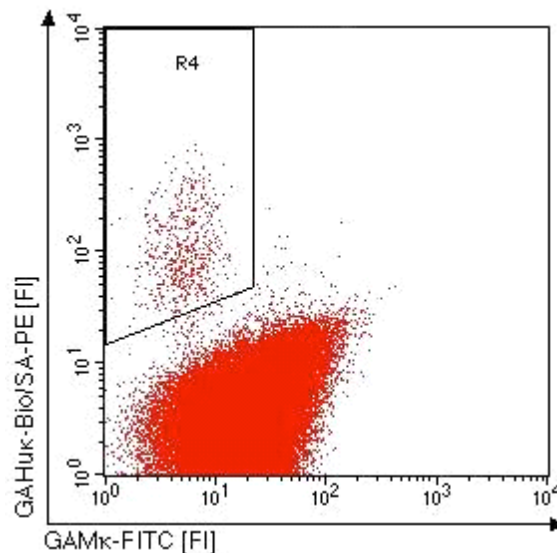


Abbildung 5-10: Anreicherung der humane Igκ Ketten exprimierenden Zielzellen. Die Zellen aus dem im ELISA für humane konstante Kappa Domänen positiven Pool (Abbildung 5-9) wurden mit Ziege anti Maus Kappa-FITC und Ziege anti Mensch Kappa-Biotin/Straptavidin-PE Antikörpern gefärbt. Durch Zugabe von PI wurden die toten Zellen ausgeschlossen. Im FACS wurden die Zellen analysiert und aus dem Pool 0,8% PE positive Zellen isoliert (Region 4), die weiter expandiert wurden. FI = Fluoreszenzintensität.

Unter diesen modifizierten Bedingungen wurden im FACS-Sorter aus der Suspensionskultur der transfizierten Zellen 4 Pools von je 100 PE-positive Zellen isoliert (Abbildung 5-8). Diese Zellen wurden expandiert und die Überstände der dicht gewachsenen Kulturen im ELISA auf das Vorhandensein humaner konstanter Ig κ Ketten getestet. Abbildung 5-9 zeigt, dass drei der isolierten Zellsuspensionen negativ sind, also im FACS nur falsch positive Zellen isoliert wurden. Der Überstand von Zellpool 2 ergab aber bei der Färbung mit anti Mensch κ Antikörpern ein positives Signal.

Die in Pool 2 (Abbildung 5-9) enthaltenen, humane Ig κ Ketten exprimierenden Zellen wurden durch erneutes FACS Sortieren angereichert (Abbildung 5-10), wobei vor der Anreicherung 0,8% der in dem Pool enthaltenen Zellen mit anti Mensch kappa Antikörper gefärbt wurden. Da in jeden Pool ursprünglich 100 Zellen sortiert wurden, war darunter also wahrscheinlich nur eine einzige positive Zelle ($0,8\% \approx 1/100$), wenn davon ausgegangen wird, dass die homolog rekombinierten Zellen gleich schnell wachsen, wie die HEA125 Ausgangszellen. Um ganz sicher Einzelzellklone zu erzeugen, wurden die sortierten Zellen trotzdem anschließend limitiert verdünnt und einzeln auf Maus Feeder-Zellen expandiert. Die resultierende Zelllinie wurde mit der Bezeichnung HEA-H κ versehen.

Es ist also möglich mittels FACS Ereignisse zu sortieren, deren Auftrittswahrscheinlichkeit bei 1 von 10^7 Zellen oder noch weniger liegt. In diesem Fall konnte eine positive Zelle aus $3 \cdot 10^8$ Zellen isoliert werden.

Bei einer Transfektionsrate von 30 bis 40% der überlebenden Zellen (Abbildung 5-6 D) bedeutet das für die Frequenz der homologen Rekombination, dass sie in diesem Versuchsansatz nicht $1/10^7$ sondern nur ungefähr $1/10^8$ beträgt.

Weiterhin wurde hier gezeigt, dass homolog rekombinierte Zellen isolierbar sind, ohne dass ein zusätzliches, selektionierbares Gen in die Umgebung des Zielgenortes mit eingeführt wird.

5.4.4 Produktion und Reinigung der HEA-H κ Antikörper

Um den HEA-H κ Antikörper weiter analysieren zu können, wurden die Zellen in miniPERM Bioreaktoren kultiviert. Hier wachsen die Zellen in einem vom Medium semipermeabel getrennten Kompartiment und unter ständiger Bewegung zu einer zehnfach höheren Dichte, als in normalen Suspensionskulturen. Die dabei ins Medium sezernierten Antikörper akkumulieren im Zellkompartiment, weil sie im Gegensatz zu Nährstoffen und Stoffwechselprodukten der Zellen die Membran (durchlässig bis 12,5 kDa) nicht passieren können. Die so hergestellten Antikörper liegen, verglichen

mit der Produktion in normalen Kultur- und Rollerflaschen, in einer relativ hohen Konzentration vor und lassen sich daher auch einfacher reinigen.

Zum Reinigen wurde der antikörperhaltige Überstand der Kulturen an eine Protein A Sepharose Matrix gebunden, extensiv gewaschen und bei pH 3,2 eluiert. Anschließend folgte eine Dialyse gegen PBS zur Neutralisierung.

Auf diese Weise wurden 34 mg HEA-Hu κ Antikörper produziert. Der gereinigte Antikörper wurde im SDS-Gel analysiert (Abbildung 5-11). Er liegt in sehr sauberer Form vor. Es ist zu sehen, dass die chimäre leichte Kette von HEA-Hu κ im SDS-Gel etwas langsamer als die murine Variante von HEA125 läuft. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Ladungen der konstanten Domänen der Kappa Ketten von Maus (PI = 5,2) und Mensch (PI = 5,7), wie in Abschnitt 7.2 diskutiert. In der Spur von HEA-Hu κ ist kein Signal mehr für die von der Maus stammende Kappa Kette vorhanden. Damit ist hier gezeigt, dass die isolierte Zelllinie nur HEA-Hu κ Antikörper und keine HEA125 Antikörper mehr produziert, also keine wt-HEA125 Zellen mehr enthalten sind. Außerdem kann ausgeschlossen werden, dass die HEA-Hu κ Zellen zusätzlich zu der humanen konstanten Kappa Kette noch murine konstante Kappa Ketten exprimieren.

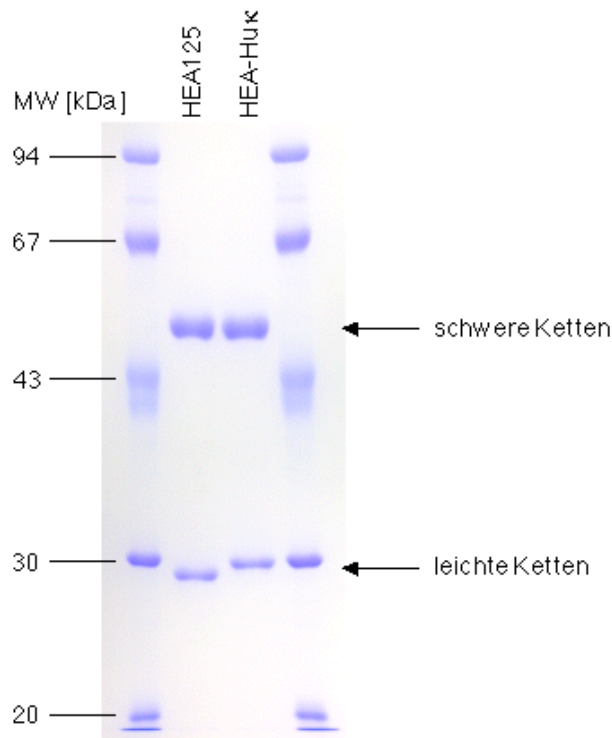


Abbildung 5-11: Analyse des HEA-Hu κ Antikörpers im SDS-Gel. 12 μ g des gereinigten HEA-Hu κ Antikörpers und zum Vergleich 12 μ g HEA125 Antikörper wurden in einem SDS-10% Polyacrylamid-gel aufgetrennt und mit Serva blue gefärbt.

Der HEA-Hu κ Antikörper wurde im Western Blot weiter analysiert (Abbildung 5-12). Aufgetragen wurden zum Vergleich jeweils gereinigte HEA-Hu κ Antikörper, HEA125

Antikörper und menschliche Kappa Ketten aus dem Urin eines Myelom-Patienten. Diese wurden dann mit Ziege anti Mensch bzw. Maus Kappa und Ziege anti IgG1 Antikörpern angefärbt. Auch hier zeigt sich, dass der neu generierte Antikörper eine humane und keine murine konstante Kappa Kette mehr besitzt. Der original HEA125 Antikörper reagiert dagegen erwartungsgemäß deutlich mit dem Ziege anti Maus Kappa Zweitantikörper.

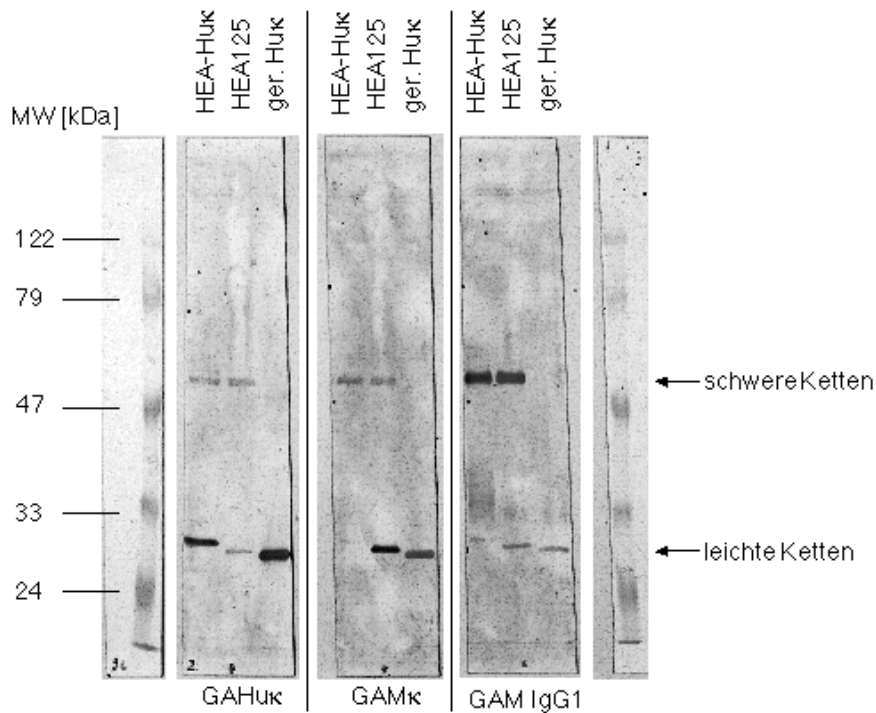


Abbildung 5-12: Analyse des HEA-Hu κ Antikörpers im Western Blot. Vergleichend wurden die gereinigten HEA-Hu κ und HEA125 Antikörper sowie gereinigte menschliche Kappa Ketten im SDS-10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Anschließend wurde die Membran jeweils mit biotinylierten Ziege anti Mensch Kappa, Ziege anti Maus Kappa bzw. Ziege anti Maus IgG1 Antikörpern inkubiert. Nach Zugabe von Streptavidin-AP wurde der Blot mit BCIP/NBT entwickelt.

Beide Antikörper zeigen allerdings eine leichte Kreuzreaktion mit der Kappa Kette der jeweils anderen Spezies. Bei beiden Antikörpern handelt es sich um gepoolte Antisera von Ziegen. Diese wurden mit humanen Myelomproteinen mit leichten Ketten vom Typ Kappa bzw. mit murinen Paraproteinen mit leichten Kappa Ketten immunisiert. Der Ziege anti Maus Kappa Antikörper ist nur gegen Maus Lambda vorabsorbiert, aber nicht gegen Mensch Kappa. Da er aber die leichte Kette aus der Myelomzelllinie wesentlich stärker färbt als die von HEA-Hu κ , scheint die Kreuzreaktion im Wesentlichen von den jeweiligen variablen Domänen abzuhängen. Der Ziege anti Mensch Kappa Antikörper ist gegen Maus Immunglobulin und Mensch Lambda leichte Ketten vorabsorbiert. Dennoch reagiert er mit der von der Maus stammenden Kappa Kette.

Außerdem kreuzreagieren beide Antikörper auch mit den schweren Maus IgG1 Ketten.

Der Ziege anti Maus IgG1 Antikörper weist bei HEA-Hu κ und HEA125 deutlich die schweren Maus IgG1 Ketten nach. Er kreuzreagiert aber auch mit den leichten Ketten der Maus und Mensch Antikörper, obwohl er gegen alle anderen Mausimmunglobulin Isotypen und damit auch leichte kappa Ketten, vorabsorbiert wurde.

5.4.5 Der HEA-Hu κ Antikörper bindet spezifisch an EpCAM

Bei der Humanisierung der konstanten Domänen kann die Spezifität des Antikörpers verloren gehen, wenn sich durch Einführung der humanen Domänen die Konformation des Antikörpermoleküls ändert. Deshalb wurde im Western Blot und im Bindungs-experiment überprüft, ob der HEA-Hu κ Antikörper mit der humanen IGKC Domäne immer noch die Fähigkeit besitzt, sein Antigen EpCAM in nativer und denaturierter Form zu erkennen, wie das beim murinen HEA125 Antikörper der Fall ist.

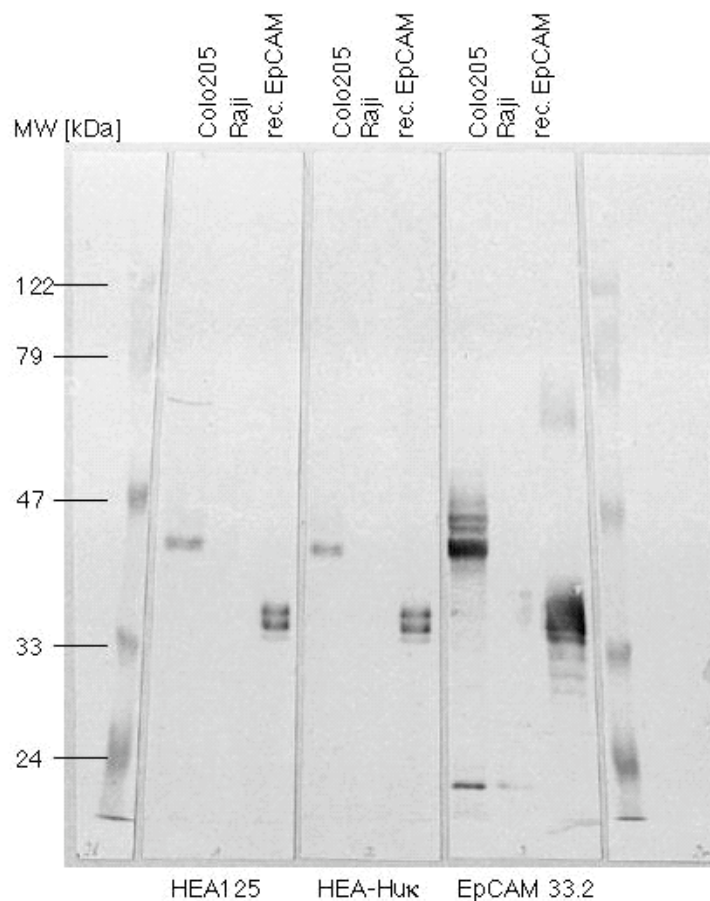


Abbildung 5-13: Überprüfung der HEA-Hu κ Spezifität im Western Blot. Lysate von Colo205 (EpCAM⁺) und Raji (EpCAM⁺) Zellen sowie das rekombinant hergestellte Protein EpCAM wurden im SDS-10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Anschließend wurden die Membranen jeweils mit dem monoklonalen anti EpCAM Antikörper EpCAM 33.2 bzw. gereinigtem HEA125 oder HEA-Hu κ Antikörper inkubiert. Im letzten Schritt wurden die 1. Antikörper mit Alkalische Phosphatase gekoppelten Ziege anti Maus 2. Antikörpern markiert und der Blot mit BCIP/NBT entwickelt.

Im Western Blot erscheint sowohl mit HEA125 als auch mit HEA-Hu κ Antikörpern ein deutliches Signal im Colo-Lysat, während beide Antikörper mit EpCAM negativem Raji-Lysat nicht reagieren (Abbildung 5-13). EpCAM hat unglycosyliert ein Molekulargewicht von 34 kDa, läuft im SDS-Gel aufgrund der Glycosylierungen aber ungefähr bei 38 kDa. Normalerweise wird durch das Versetzen der Proteinproben mit SDS ein größenabhängiger Ladungsausgleich zwischen den Proteinen geschaffen. Dadurch dass die hydrophilen Zucker glycosylierter Proteine aber kein SDS binden, entsteht ein anderes Ladungs-Masse-Verhältnis und die Proteine laufen größer. Es ist beschrieben, dass die meisten Karzinomzelllinien drei verschiedene EpCAM Formen von ungefähr 38, 40 und 42 kDa produzieren (Litvinov *et al.* 1994a).

Beide Antikörper, HEA125 und HEA-Hu κ detektieren auch rekombinantes EpCAM. Bei diesem wurden der cytoplasmatische Teil und die Transmembrandomäne deletiert, daher läuft es bei 34 kDa.

Als Positivkontrolle sind die verschiedenen Proben auch mit dem von G. Moldenhauer generierten monoklonalen Hybridomantikörper EpCAM33.2 (nicht publiziert) inkubiert worden. EpCAM33.2 reagiert spezifisch mit einem anderen Epitop des EpCAM Moleküls als HEA125 und HEA Hu κ und erzeugt im Western Blot ein wesentlich stärkeres Signal. Für therapeutische Zwecke ist der EpCAM33.2 Antikörper aber gegenüber HEA125 ungeeignet, weil er nur denaturiertes EpCAM, aber kein natives Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennt.

Das native EpCAM Protein auf der menschlichen Colonkarzinom-Metastase-Zelllinie Colo205 wurde im Bindungsexperiment von HEA-Hu κ Antikörpern gebunden, ebenso wie erwartungsgemäß von HEA125 Antikörpern (Abbildung 5-14). Die Bindung ist spezifisch, an der EpCAM negativen humanen B-Zelllinie Raji wurde mit beiden Antikörpern kein Signal erhalten.

Der murine Antikörper HD20 ist spezifisch für einen menschlichen Immunglobulin Idiotyp und diente als Negativkontrolle. So wurde gezeigt, dass die Colo205 Zellen nicht schon allein durch die Zweitantikörper gefärbt wurden.

Der murine anti HLA A, B, C Antikörper W6/32 diente als Positivkontrolle, er bindet sowohl Colo205 als auch Raji Zellen. Der Zweitantikörper Ziege anti Mensch Kappa-FITC ist mit W6/32 aber negativ, da W6/32 keine humane Kappa Kette aufweist.

Bei der Färbung von Colo205 gebundenem HEA125 Antikörper mit Ziege anti Maus Kappa-FITC bzw. Ziege anti Mensch Kappa-FITC Antikörpern ist ein positives Signal erwartungsgemäß nur für Maus Kappa zu erkennen. Im Gegensatz zu der im Western Blot beobachteten Kreuzreaktion desselben Ziege anti Mensch Kappa Antikörpers in biotinylierter Form (Abbildung 5-12), kreuzreagiert dieser Antikörper im Bindungsexperiment nicht mit den Maus Kappa Ketten von HEA125.

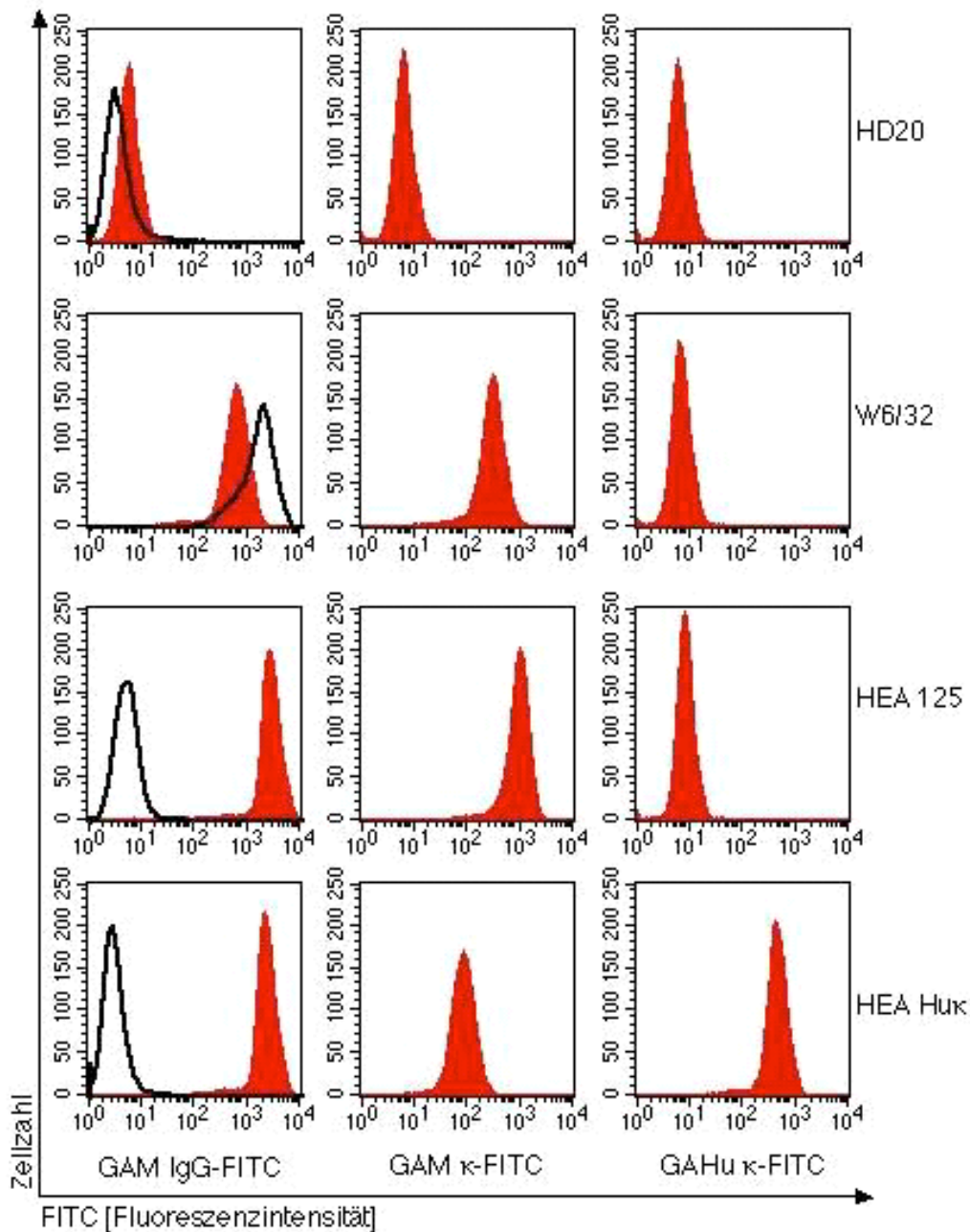


Abbildung 5-14: Durchflusszytometrische Analyse der *in vivo* Reaktivität von HEA-Hu κ . Die Antikörper HD20 (irrelevant), W6/32 (anti HLA A,B,C), HEA125 (anti EpCAM) bzw. HEA-Hu κ wurden mit Colo205 (EpCAM⁺) Zellen (rote Kurven) bzw. Raji (EpCAM⁺) Zellen (schwarze Kurven) inkubiert. Markierte Zellen wurden mit Ziege anti Maus IgG-FITC, Ziege anti Maus Kappa-FITC bzw. Ziege anti Mensch Kappa-FITC identifiziert. Tote Zellen wurden durch PI-Färbung ausgeschlossen.

Der Ziege anti Maus Kappa-FITC Antikörper dagegen kreuzreagiert wie die biotinylierte Variante im Western Blot mit der humanen Kappa Kette von HEA-Hu κ . Diese Kreuzreaktion bewirkt eine ca. 10%ige Verschiebung des negativen Signals in Richtung der mit HEA125 Antikörpern erzeugten, erheblich stärkeren Fluoreszenzintensität der Zellen. Diese Verschiebung ist auf Kreuzreaktion und nicht auf von HEA-Hu κ noch exprimierte Kappa Ketten zurück zu führen, weil bei der Auftrennung von HEA-Hu κ Antikörpern im SDS-Gel keine von der Maus stammenden Kappa Ketten

mehr nachgewiesen wurden (Abbildung 5-11). Es ist denkbar, wie schon für den Ziege anti Maus Kappa-Biotin Antikörper im Western Blot erwähnt, dass der Ziege anti Maus Kappa-FITC Antikörper mit den noch von der Maus stammenden variablen Teilen von HEA-Hu κ reagiert (siehe Abschnitt 5.4.4).

Der Gamma Ketten spezifische Ziege anti Maus IgG-FITC Antikörper erzeugte mit HEA125 und HEA-Hu κ ein positives Signal. Von HEA-Hu κ wurde bisher die konstante Region der leichten Kappa Kette humanisiert, der Antikörper enthält aber noch die komplette murine IgG1 Domäne der schweren Kette. Daher kann er mit dem Ziege anti Maus IgG-FITC Antikörper noch nachgewiesen werden.

Es wurde also gezeigt, dass der HEA-Hu κ Antikörper mit dem gegenüber HEA125 humanisierten IGKC Locus, ebenso wie der HEA125 Ausgangsantikörper, noch in der Lage ist, sowohl das denaturierte als auch das native Antigen EpCAM zu binden.

5.4.6 Der HEA-Hu κ Antikörper und der HEA125 Antikörper binden EpCAM mit vergleichbarer Affinität

Um eine Aussage über die Affinität des HEA-Hu κ Antikörpers treffen zu können, wurde seine Fähigkeit mit der von HEA125 verglichen, die Bindung von FITC-markiertem HEA125 an das Antigen EpCAM zu kompetieren. Colo205 Zellen wurden dafür mit einer konstanten Menge HEA125-FITC und ansteigenden Mengen nicht fluoreszenzmarkiertem HEA125 bzw. HEA-Hu κ Antikörper inkubiert. Anschließend wurde im FACS die Fluoreszenzintensität der Colo205 Zellen bestimmt. In Abbildung 5-15 sind die inhibitorischen Wirkungen des HEA125 und des HEA-Hu κ Antikörpers auf die HEA125-FITC Bindung an Colo205 dargestellt. Im Vergleich mit dem Ausgangsantikörper HEA125 zeigt sich, dass nach der Humanisierung der leichten Kette, die Affinität des HEA-Hu κ Antikörpers zu EpCAM geringfügig verringert ist. Die halbmaximale Bindung des fluoreszierenden HEA125 Antikörpers wird mit 15 nM HEA125 erreicht. Bei HEA-Hu κ dagegen wird sie mit 20 nM Antikörper erreicht.

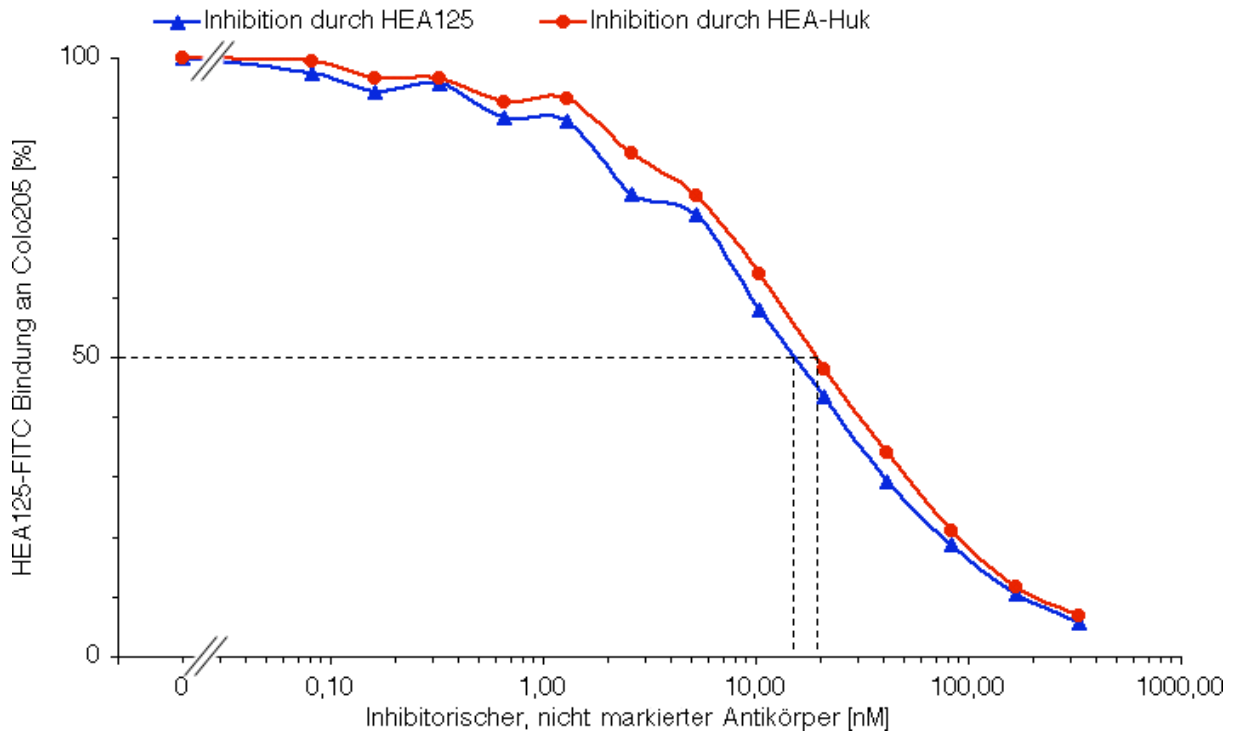


Abbildung 5-15: Vergleich der HEA125 und HEA-Huk Antikörper Affinitäten. Colo205 Zellen wurden in Gegenwart steigender Mengen unmarkierter HEA125 und HEA-Huk Antikörper (0 – 333 nM), mit 25 nM FITC gekoppeltem HEA125 Antikörper inkubiert. Nach 60 min wurde im FACS die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der Colo205 Zellen ermittelt. Die maximale Fluoreszenz (in Abwesenheit von nicht markiertem Antikörper), mit einer MFI von 823, ist als 100 % HEA125-FITC Bindung an Colo205 angegeben. 0 % Bindung entsprechen der Autofluoreszenz der Zellen mit einer MFI von 5.

5.5 Chimärisierung der schweren Kette

Der HEA125 Antikörper hat eine schwere Kette vom Typ IgG1 (Moldenhauer *et al.* 1987). Die Chimärisierung soll nach dem gleichen Prinzip durchgeführt werden, wie oben für die leichte Kette beschrieben (siehe Abschnitt 5.4). Die DNA, welche die konstante Domäne der Maus IgG1 Kette kodiert (IGHG1), soll durch die humane IGHG1 kodierende DNA (=HulgG1 ZieldNA) ersetzt werden. Dies geschieht mittels homologer Rekombination im Genom der Maus Hybridomzelllinie HEA125. Das Vorgehen ist in Abbildung 5-1 schematisch dargestellt.

5.5.1 Konstruktion der ZieldNA (pHulgG1)

Das Plasmid pHulgG1 ist in Abbildung 5-16 schematisch dargestellt. Als Klonierungsvektor wurde, wie für pHu κ , das Plasmid pBS II SK (+) verwendet. Zuerst wurden nacheinander die für die homologe Rekombination benötigten flankierenden, nicht kodierenden Bereiche der Mausequenz in den Klonierungsvektor gesetzt. Die Referenzen für die humanen und murinen genomischen Sequenzen sind auf Seite 72 angegeben. Anhand der Datenbanksequenzen für den kodierenden Maus-IGHG1

Lokus wurde mit dem Programm BlastN aus HUSAR⁹ die Sequenz AB097849 ermittelt. Sie enthält den *Mus musculus* IGHG1 Keimbahnloкус (CH1 –CH3) inklusive mehrerer 1000 bp flankierender Bereiche und die genauen Intron/Exon Grenzen. Anhand dieser Sequenz wurden Primerpaare zur Amplifizierung des 5' flankierenden Bereiches (P29 & P30) der konstanten Maus IgG1 Domäne in einer PCR an DNA von HEA125 Zellen entworfen. Der 3' flankierende Bereich wurde mit den Primern P31 & P32 amplifiziert (Primersequenzen siehe Tabelle 4-1). Die für die Ligation in den Klonierungsvektor benötigten Restriktionsstellen wurden von den jeweiligen Primern mitgebracht.

Im nächsten Schritt wurde das humane IGHG1 Gen hergestellt, welches das Maus IGHG1 Gen ersetzen soll. Es ist kodiert im IGH Lokus auf Chromosom 14 (Croce *et al.* 1979) in Bande 14q32.33 am telomeren Ende des langen Arms (Kirsch *et al.* 1982; Mac Bride *et al.* 1982). Die Nukleotidsequenz der humanen konstanten Domäne der schweren IgG1 Kette findet sich unter J00228 (Takahashi *et al.* 1982; Lefrank und Lefrank 2001). Das IGHG1 Gen enthält drei Hauptexons, welche die CH1, CH2 und CH3 Domänen codieren, ein separates Hinge Exon zwischen CH1 und CH2 und zwei Transmembranexons M1 und M2 downstream von CH3 (Lefrank und Lefrank 2001). Humanisiert werden nur die Exons CH1 bis CH3 inklusive der Verlängerung SC (=secretion coding) am 3' Ende von CH3, die durch alternatives Spleißen ausschließlich in der sezernierten Form von IgG1 enthalten ist. M1 und M2 werden nicht humanisiert, da sie die Transmembrandomänen und den cytoplasmatischen Schwanz der Transmembranform kodieren und in der therapeutisch relevanten sekretierten Form nicht exprimiert sind.

Die Amplifikation des beschriebenen Bereiches wurde mittels PCR mit den Primern P33 & P34 an humaner genomischer DNA durchgeführt (Primersequenzen siehe Tabelle 4-1). Bei der Sequenzierung verschiedener klonierter PCR-Produkte zeigte sich, dass die Primer auch die kodierenden Bereiche anderer Antikörper-Isotypen vervielfältigen. Ein Klon mit der korrekten konstanten Region der humanen IGHG1 Domäne wurde isoliert und in den Klonierungsvektor ligiert. Dieser wurde dazu zwischen den beiden flankierenden Maus DNA Bereichen mit MscI und EcoRV geöffnet, wodurch der mitamplifizierte kodierende Maus IGHG1 Bereich herausgeschnitten wurde und auch die beiden Schnittstellen verloren gingen. Da sich das humane PCR Produkt nicht mit stumpfen Enden ligieren ließ, wurde ein Stück kurze HindIII Linker-DNA eingefügt. Beim Schneiden der DNA mit HindIII wurden überhängende Enden produziert und damit die Ligation erleichtert. Die Primer P33 & P34 brachten die

⁹ Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, <http://husar.dkfz-heidelberg.de>

entsprechenden HindIII Schnittstellen mit, über welche die amplifizierte humane DNA abschließend in den Linker ligiert wurde.

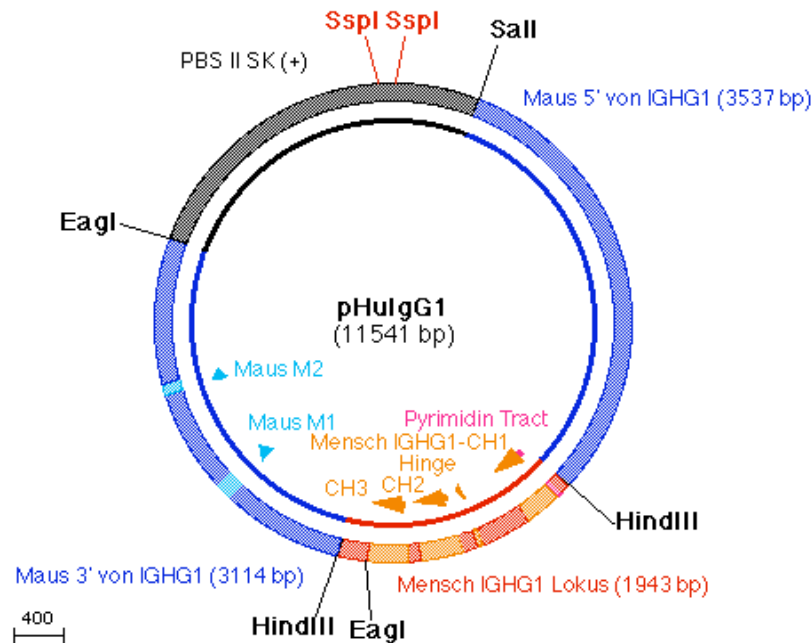


Abbildung 5-16: Schematische Darstellung der pHuIgG1 Ziel DNA. Humane genomische Bereiche sind rot, relevante Exons orange dargestellt. Von der Maus stammende genomische Bereiche sind blau, Exons türkis dargestellt. Das Klonierungsvektorrückgrat ist schwarz markiert. Bei der Klonierung verwendete Restriktionsstellen sind, soweit noch vorhanden, schwarz dargestellt. Die Linearisierungsstellen sind rot markiert. Die Größen der einzelnen Elemente entsprechen den Längen der Sequenzen. Ein Maßstab, der die Länge von 400 bp repräsentiert, ist unten links abgebildet.

5.5.2 Transformation und Isolierung homolog rekombinierter Zielzellen

Die pHuIgG1 Plasmid DNA (Abbildung 5-16) wurde mit dem Restriktionsenzym SspI linearisiert und anschließend, wie in Abschnitt 5.4.2 für die Chimerisierung der leichten Kette beschrieben, per Elektroporation in $5 \cdot 10^8$ HEA-HuK Zellen eingeschleust.

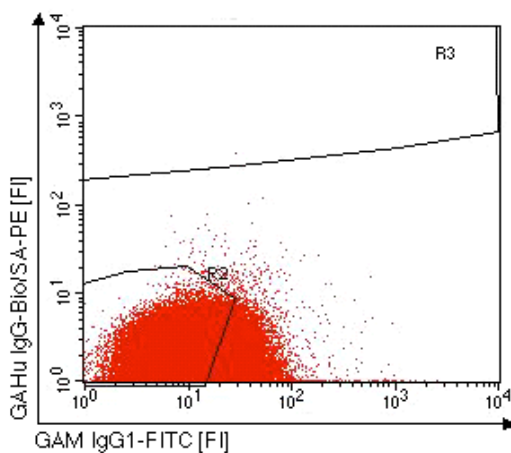


Abbildung 5-17: Isolierung humane IgG1-Ketten exprimierender Zielzellen. 3 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit Ziege anti Maus IgG1-FITC und Ziege anti Mensch IgG-Biotin/Straptavidin-PE Antikörpern gefärbt. Durch Zugabe von PI wurden die toten Zellen markiert. Im FACS wurden $5 \cdot 10^8$ Zellen analysiert und daraus 15000 PE positive Zellen (Region 3) in Pools von je 100 Zellen in 96-Loch-Platten sortiert. FI = Fluoreszenzintensität.

Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit FITC gekoppeltem Ziege anti Maus IgG1 und Maus absorbiertem, biotinyliertem Ziege anti Mensch IgG1 Antikörper gefärbt. Nach Zugabe von Streptavidin-PE wurden mittels FACS die PE positiven

Zellen aus Region 3 in 150 Pools mit je 100 Zellen isoliert. Während des Sortierens zeigte sich im FACS bei der Anzeige von $1 \cdot 10^8$ Zellen eine Subpopulation von ca. 8 Zellen, die im PE positiven Bereich mit einer MFI von ca. $2 \cdot 10^3$ in einem sehr engen Fluoreszenzfenster beieinander lagen. Es sah also so aus, als gäbe es in der Suspensionskultur der transfizierten Zellen eine Subpopulation, die humanes IgG1 produziert. Noch am selben Tag zeigte sich allerdings, dass der Sorter zwar 100 sortierte Signale pro Zellpool angezeigt hatte, in den Kulturen aber durchschnittlich nur ca. 3-5 Zellen enthalten waren. Diese wurden in 96-Loch-Platten drei Wochen kultiviert, bis die Böden der Kulturen zum Großteil mit Zellen bedeckt waren. Anschließend wurden die produzierten Antikörper aus den Kulturüberständen im ELISA analysiert. Zu dem Zweck wurden die ELISA Platten mit Ziege anti Mensch IgG (schwere und leichte Kette) Antikörpern beschichtet. Diese Platten wurden mit den antikörperhaltigen Überständen der Zellpools bzw. HEA-Hu κ Kulturüberstand als Negativkontrolle und menschlichem IgG1 (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Menschliche CH2 bis CH3 γ -Immunglobulin Domänen wurden mittels Peroxidase gekoppeltem Ziege anti Mensch IgG Fc Antikörper und anschließender Farbreaktion nachgewiesen.

In keinem der isolierten Zellpools waren Zellen enthalten, die Antikörper mit humanen konstanten IgG-Ketten produzierten. Die Negativkontrolle mit HEA-Hu κ Kulturüberstand zeigt in diesem Nachweisverfahren keinerlei Reaktion. Humanes Immunglobulin hingegen erzeugte ein sehr stark positives Signal.

6 Ergebnisse: Bibliothek

Ausgehend von dem komplett chimersierten Antikörper Hu-HEA125 soll eine Bibliothek humaner Hybridomantikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten erzeugt werden. Das Verfahren zur Bibliotheksherstellung beruht auf dem Austausch der aktiven variablen Antikörperdomänen mittels spezifischer Rekombination (Abbildung 6-1). Im Fall der schweren Kette kommt das Cre/loxP, bei der leichten Kette das FLP/frt System zum Einsatz. So werden die Gene, die in der Maus Hybridomzelle Hu-HEA125 die variablen Domänen der schweren und leichten Ketten kodieren, durch alle möglichen menschlichen V_{λ}/J , V_{κ}/J und $V_H/D/J$ Kombinationen ersetzt. Abbildung 6-1 zeigt eine Übersicht über diese Vorgehensweise.

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf das Vorgehen zur Flankierung der aktiven HEA125 V_H Domäne mit loxP Stellen und den anschließenden Kassettenaustausch dieser Domäne. Wenn das Prinzip für V_H gezeigt ist, kann der Weg für V_L ganz analog und relativ schnell gegangen werden.

6.1 Flankierung der V_H Domäne mit loxP Stellen

Voraussetzung für den Austausch der Hu-HEA125 variablen Antikörperdomänen durch spezifische Rekombination ist das Vorhandensein von Erkennungssequenzen für die Rekombinasen, wie z.B. Cre und FLP. Soll ein Gen per Cre/loxP oder FRT/flp Kassettenaustausch durch ein anderes ersetzt werden können, müssen beide von den gleichen Paaren spezifischer Rekombinationsstellen flankiert werden (siehe Abbildung 6-1). Im Falle der variablen Domäne der schweren Kette soll der Kassettenaustausch durch das Cre/loxP System vermittelt werden. Als Erkennungssequenzen dienen die heterospezifischen Erkennungsstellen loxP und loxP511 (Abbildung 4-2). Sie unterscheiden sich durch eine Mutation in der Spacerregion und sind daher miteinander nur wenig kompatibel, so dass die dazwischenliegende Kasette überwiegend gegen eine andere ausgetauscht, als nur ausgeschnitten wird.

Die Einführung der Erkennungsstellen muss final in den komplett chimersierten Hu-HEA125 Antikörper passieren. Weil dieser noch nicht zur Verfügung stand, wurde im Folgenden zunächst mit dem von der Maus stammenden Wildtyp-HEA125 Antikörper und später mit HEA-H μ κ gearbeitet.

Hat die Einführung der Erkennungsstellen einmal funktioniert, lässt sie sich mit den dann vorhandenen Plasmiden verhältnismäßig schnell auch in den Zellen wiederholen, die komplett chimäre Antikörper produzieren.

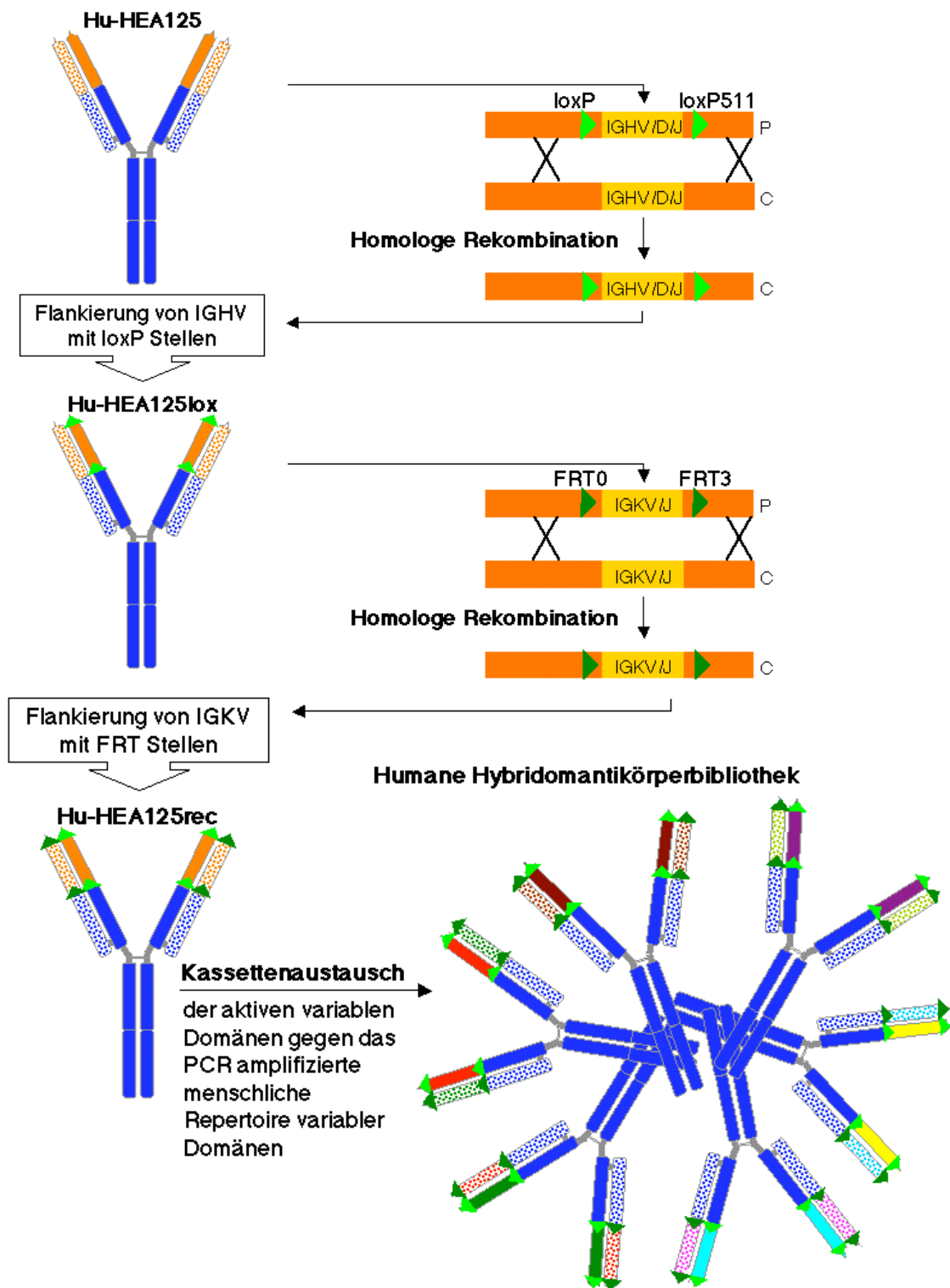


Abbildung 6-1: Verfahren zur Herstellung einer humanen Hybridomantikörperbibliothek ausgehend von Hu-HEA125. Dargestellt sind die Homologen Rekombinationen, mittels derer die loxP bzw. FRT Stellen ins Genom der Hu-HEA125 Zellen eingebracht werden (rechts). Die resultierende Veränderung des produzierten Antikörpers ist jeweils mit dargestellt (links). Mittels rekombinasevermitteltem Kassettenaustausch an den spezifischen Rekombinationsstellen werden die in HEA125 aktiven variablen Domänen der schweren und leichten Kette ausgetauscht, gegen zufällige Kombinationen PCR amplifizierter humaner schwerer und leichter Ketten (unten). Es resultiert eine Bibliothek aus Hybridomzellen, die auf ihrer Oberfläche Antikörper zahlreicher verschiedener Spezifitäten exprimieren. P = Plasmidkonstrukt, C = Chromosom, orange = in HEA125 aktive variable Domänen, bunt = PCR amplifizierte humane variable Domänen.

B

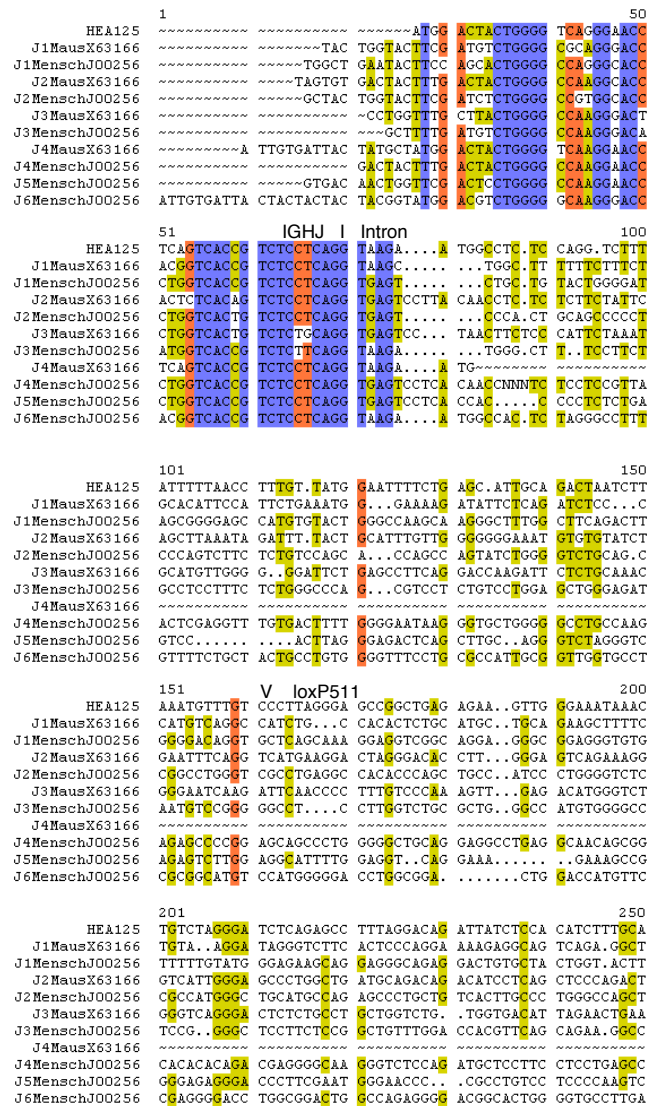


Abbildung 6-2: Konservierte Regionen in der Umgebung von IGHV/D/J. Mit dem Programm Clustal aus HUSAR wurden Alignments aus Maus und Mensch Keimbahnsequenzen erstellt. In diesen sind konservierte Sequenzbereiche ihrem Homologiegrad entsprechend farbig gekennzeichnet. Blau entspricht 100%, rot $\geq 75\%$ und gelb $\geq 50\%$ Konservierung. Intron/Exon Grenzen sind oberhalb der Sequenzen markiert. Die Insertionsstelle für die loxP bzw. loxP511 Stelle sind oberhalb der Sequenz mit Pfeilspitzen (V) markiert. **A: Übergang 5'-flankierendes Intron/IGHV.** Die genomische Sequenz von HEA125 wird mit Vertretern verschiedener Subgruppen von Maus und Mensch IGHV-Keimbahnsequenzen verglichen. **B: Übergang IGHJ/3'-flankierendes Intron.** Alle funktionellen Maus und Mensch IGHJ Keimbahnngenorte werden mit der genomischen Sequenz von HEA125 verglichen.

6.1.1 Positionierung der loxP Stellen im Zielzellgenom

Die Einführung der spezifischen Rekombinationssequenzen für den Kassettenaustausch der V_H Domäne in das Genom der Hybridomzelle geschieht durch homologe Rekombination. Zunächst mussten Positionen gefunden werden, in denen die loxP Stellen möglichst störungsfrei in das HEA125 Genom inseriert werden können. Ziel war es dabei, diejenigen auszutauschenden DNA-Bereiche möglichst kurz zu halten, die über das exprimierte IGHV-Exon der variablen Domäne hinausgehen. Mit steigender Länge der zu inserierenden DNA sinkt die Frequenz der homologen Rekombination.

mination und vor allem des folgenden Kassettenaustausches. Dies wäre bei der Generierung der Bibliothek von Nachteil. Die loxP Stellen sollten also möglichst nah am 5'- und 3'-Ende des in HEA125 aktiven V_H -Exons positioniert werden. In direkter Umgebung der Gene liegen aber in den Intronbereichen viele funktionell oder regulatorisch wichtige Elemente, wie Spleißstellen, Promotoren und Enhancersequenzen. Solche Elemente sind unter den variablen Domänen einer Spezies, wie auch zwischen unterschiedlichen Spezies, relativ stark konserviert. Deshalb wurden die Übergänge zwischen 5'-flankierendem Intron und IGHV (Abbildung 6-2 A) und IGHJ und 3'-flankierendem Intron (Abbildung 6-2 B) verschiedener funktioneller Maus und Mensch Keimbahnsequenzen miteinander verglichen. In den Alignments werden konservierte Bereiche durch farbige Kennzeichnung offensichtlich. Es zeigt sich, dass 26 bp 5' vom Leader-Exon die noch verhältnismäßig höher konservierten Bereiche enden. In dem Bereich 43 bp 5' vom Leader-Exon liegt eine wenig konservierte Region. Hier wurde die loxP-Stelle in die zu transfizierende Plasmid-DNA inseriert. Am 3'-Ende des V_H Exons sind nur die ersten sechs Nukleotide des angrenzenden Introns stark konserviert, aber 92 Positionen downstream enden die letzten stark konservierten Nukleotide. Hier wurde die loxP511-Stelle in die zu transfizierende Plasmid-DNA inseriert.

Im Gegensatz zu den homologen Rekombinationen für die Chimerisierung erschien es hier möglich, die Einführung der loxP Stellen in das Genom der Zielzellen mittels homologer Rekombination mit einem positiv selektionierbaren Resistenzgen zu vereinfachen. Das Resistenzgen hätte nämlich, bei Miteinführung des Gens zwischen den loxP Stellen, beim späteren Kassettenaustausch wieder aus dem Genom der Zielzellen entfernt werden können. So wäre die Expression der Antikörpergene später durch das Resistenzgen nicht weiter beeinflusst worden. Außerdem stören die dabei zurückgelassenen loxP-Stellen an dieser Stelle nicht, sondern sind im Gegenteil das erwünschte Zwischenziel dieser Versuche.

Über das miteingeführte Resistenzgen sollten homolog rekombinierte Zielzellen angereichert werden. Als Resistenzvermittler wurde das Gen der Neomycin-Phosphoryltransferase II (NPTII) verwendet. In eukaryotischen Zellen exprimiert, vermittelt NPTII diesen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin bzw. dessen chemisches Derivat G418. Um die Selektion noch stringenter zu halten, wurde das NPTII Gen ohne einen zusätzlichen Promotor in die Ziel DNA kloniert. Auf diese Weise wurde die Zahl der G418 resistenten Transfektanten etwa um Faktor 100 reduziert, bei denen die Ziel DNA unspezifisch ins Genom integriert wurde. Nur weniger als 1% aller unspezifischen Integrationen liegen zufällig im Wirkungsbereich

eines endogenen Promotors und führen so zu resistenten Zellen (Finger *et al.* 1988). In homolog rekombinierten Zellen sollte das NPTII Gen hingegen exprimiert werden, denn es steht dort unter dem Einfluss des sehr starken V_H Promotors (Lefranc und Lefranc, 2001). Es war im Gegenteil hier zu befürchten, dass eine zu starke NPTII-Expression möglicherweise toxisch für die Zellen sein könnte. Daher wurden die loxP Stellen derart eingeführt, dass die in der Region zwischen den inversen Wiederholungen liegenden Startkodons 5' vom NPTII Gen in Leserichtung, aber nicht im Leseraster inseriert wurden. Das Vorhandensein zweier falscher alternativer Transkriptionsstarts sollte die Expression des NPTII Gens verringern.

6.1.2 Klonierung der pV_H -loxP-NPTII Ziel DNA

Die Sequenz der aktiven variablen Domäne von HEA125 wurde mittels cDNA Sequenzierung bereits von F. Breitling und T. Kühlwein bestimmt (Breitling *et al.* 2001). In einer PCR mit den Primern P13 & P14 (siehe Tabelle 4-1) an genomischer DNA von HEA125 Zellen wurde zunächst der Bereich der in HEA125 aktiven V_H Domäne amplifiziert. Das Produkt dieser PCR beinhaltet auch die 5' und 3'-flankierenden Bereiche von IGHV/D/J, die zur Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen durch homologe Rekombination benötigt werden. Über die von den Primern mitgebrachten Restriktionsstellen wurde die hergestellte DNA in den Klonierungsvektor pBSII SK (+) ligiert.

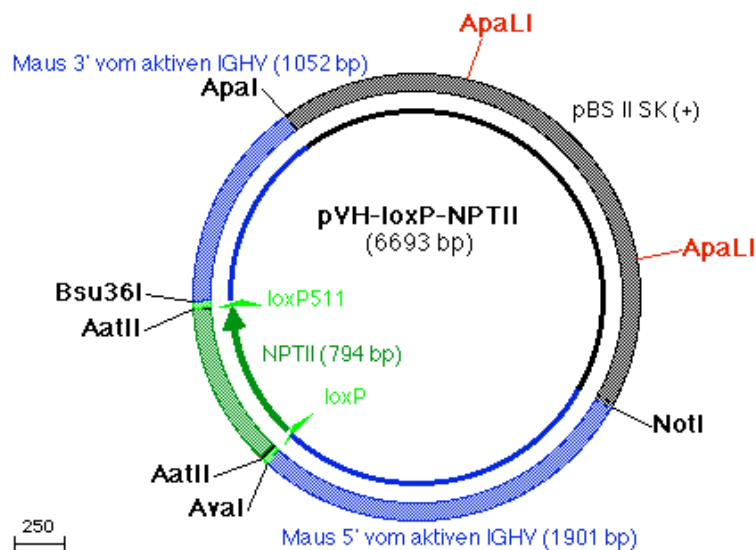


Abbildung 6-3: Schematische Darstellung der pV_H -loxP-NPTII Ziel DNA. Das G_{418} -Resistenz vermittelnde NPTII Gen (grün), flankiert von loxP und loxP511 Stellen (hellgrün), wurde zwischen die V_H flankierenden Intronsequenzen aus dem Mausgenom (blau) und in den Klonierungsvektor pBS II SK (+) (schwarz) ligiert. Bei der Klonierung verwendete Restriktionsstellen sind, soweit noch vorhanden, schwarz dargestellt. Die Linearisierungsstellen sind rot markiert. Die Größen der einzelnen Elemente entsprechen den Längen der Sequenzen. Ein Maßstab, der die Länge von 250 bp repräsentiert, ist unten links abgebildet.

In den gering konservierten Bereichen, die zur Einführung der loxP Stellen ausgewählt wurden (siehe Abschnitt 6.1.1), lagen die jeweils einmaligen Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *Ava*I und *Bsu*36I. Mit diesen wurde der Klonierungsvektor geöffnet und ein Stück synthetische, doppelsträngige DNA eingefügt, deren Enden mit denen des geöffneten Vektors kompatibel waren. Diese gepaarten Oligonukleotide (P15 & P16) enthielten die beiden durch eine *Aat*II Schnittstelle getrennten loxP und loxP511 Stellen und ersetzten das Leader- und das V_H Exon in dem Plasmid. Über die eingeführte einmalige *Aat*II Schnittstelle konnte der Klonierungsvektor erneut geöffnet und das NPTII-Gen eingebracht werden. Das NPTII Gen wurde in einer PCR mit den Primern P17 & P18 von pEGFP-N3 DNA abgeschrieben. Eine schematische Darstellung des Plasmids ist in Abbildung 6-3 gezeigt.

6.1.3 Transfektion der pV_H-loxP-NPTII Ziel DNA in HEA125 und Selektion homolog rekombinierter Zielzellen

HEA125 Zellen wurden mit der pV_H-loxP-NPTII Ziel DNA transfiziert, die vorher mit *Apa*I im Vektorrückgrat geöffnet wurde (siehe Abbildung 6-3). Anschließend wurde 10 Tage lang mit G418 auf NPTII exprimierende Zellen selektiert. Die optimalen Bedingungen für diese Selektion waren in vorangegangenen Tests für HEA125 und die verwendete Charge G418 ermittelt worden (siehe Abschnitt 4.3.1). Nach der Selektion waren aus der Ausgangssuspension nur noch diejenigen Zellen vorhanden, die im Genom hinter einem aktiven Promotor integriert die Ziel DNA enthielten.

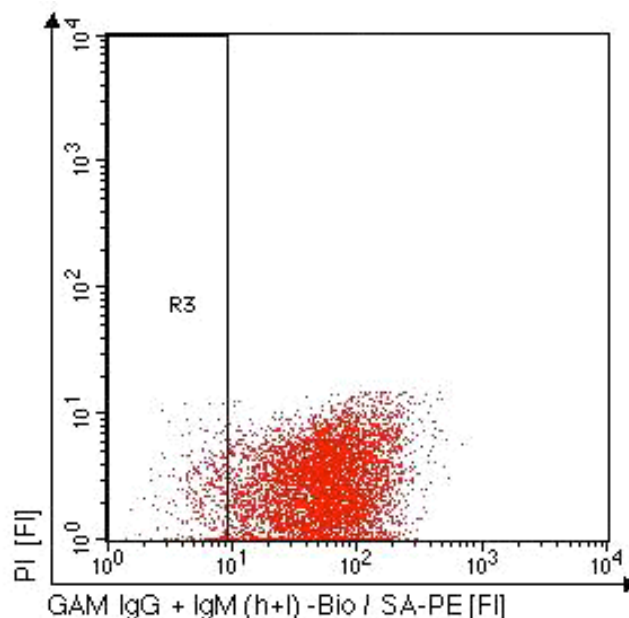


Abbildung 6-4: Anreicherung homolog rekombinierter Zielzellen im FACS. Mit pV_H-loxP-NPTII Ziel DNA transfizierte HEA125 Zellen wurden nach 14 tägiger G418 Selektion mit biotinylierten GAM IgG + IgM Antikörpern und Streptavidin-PE gefärbt und im FACS auf die Abwesenheit von Maus IgG sortiert (R3, 5% Zellen mit der geringsten Fluoreszenzintensität).

Im Genom der homolog rekombinierten Zielzellen wurde die variable Antikörperdomäne durch das NPTII Gen ersetzt. Ohne variable Domäne ist aber kein Antikörper mehr auf der Oberfläche der Zielzellen zu erwarten. Deshalb wurden, um die gewünschten Zielzellen noch weiter anzureichern, aus diesen G418-resistenten Zellen mittels FACS die Zellen isoliert, die keine Antikörper mehr auf der Oberfläche präsentieren. Auf diese Weise wurde die Zahl der weiter zu analysierenden Zellen um 95% verringert (Abbildung 6-4).

Neben den homolog rekombinierten HEA125 Zellen exprimiert auch von den Wildtyp HEA125-Hybridomzellen immer ein gewisser Anteil keinen Antikörper mehr auf der Oberfläche. Von diesen Zellen unterscheiden sich die homolog rekombinierten in keinem weiteren selektionierbaren Merkmal. Daher wurden abschließend die nun noch in der Suspensionskultur enthaltenen Zellen per PCR auf das Vorhandensein der durch homologe Rekombination entstandenen Übergänge zwischen NPTII Gen und flankierenden Maus-Introns gescreent (Abbildung 6-5 A).

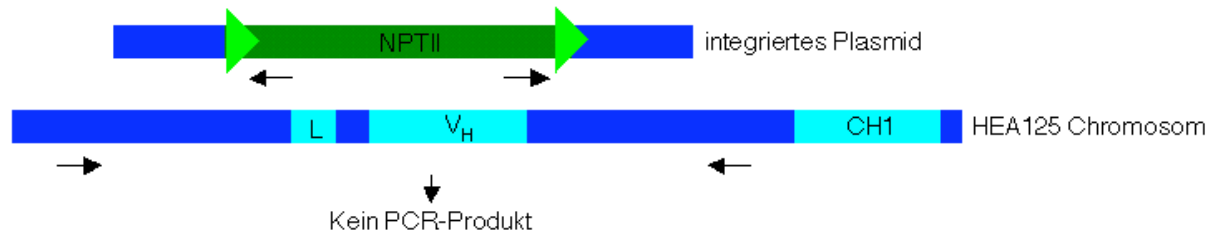
Um verschiedene Primerpaare an beiden Übergängen testen zu können, wurde zunächst eine Positivkontrolle zur Auswahl geeigneter Primerpaare kloniert. Sie besteht aus der pV_H -loxP-NPTII Ziel DNA, in die am 5' Ende weitere 80 bp und am 3' Ende 507 bp der flankierenden Maus DNA Bereiche ligiert wurden (Abbildung 6-5 B). Nach Transfektion von HEA125-Zellen mit dem linearisierten Positivkontrollplasmid und G418 Selektion wurde die DNA dieser Zellen als Positivkontrolle für die PCRs verwendet. Unspezifische Integration dieses Kontrollplasmides führt zur Entstehung derselben Genorte, wie sie nach homologer Rekombination des Plasmides pV_H -loxP-NPTII ins HEA125 Genom entstehen, nicht aber nach dessen unspezifischer Integration.

Für den Nachweis des Übergangs nach homologer Rekombination am 3' Ende wurden in 16 PCRs 4 verschiedene forward und 4 verschiedene reverse Primer in allen Kombinationen getestet. Das deutlichste Ergebnis wurde mit den Primern P7 & P8 erzielt (1209 bp). Auch am 5' Ende wurden 4 mal 4 Primer getestet, aber keine Kombination gefunden, die ein eindeutiges Signal lieferte. Mit den Primern P9 & P10 und P11 & P12 wurden schwache Banden von 2018 bzw. 2046 bp erzielt (Primersequenzen siehe Tabelle 4-1). Es stellte sich heraus, dass alle drei Primerpaare auch noch in PCRs mit einem Templateverhältnis von einer Positivkontrollzelle zu 100 HEA125 Zellen im Agarosegel sichtbare Produkte liefern.

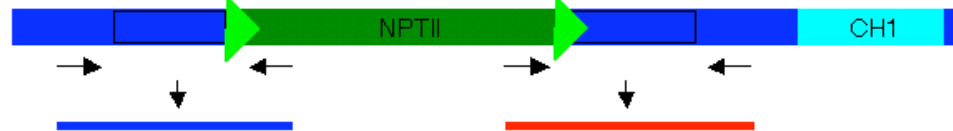
Dadurch konnte die Menge der zu screenenden Proben noch reduziert werden, indem durch limitierte Verdünnung nicht Einzelzellklone, sondern 20er Pools hergestellt und deren Lysate in PCRs getestet wurden. Im ersten Durchgang wurden 20er Pools von vier 96-Loch-Platten mit den Primern P7 & P8 auf einen korrekten Übergang am 5'-Ende getestet. Abbildung 6-5 C zeigt das Ergebnis des Screens von

A

Genomische Sequenzen nach unspezifischer Integration:



Genomische Sequenz nach homologer Rekombination:

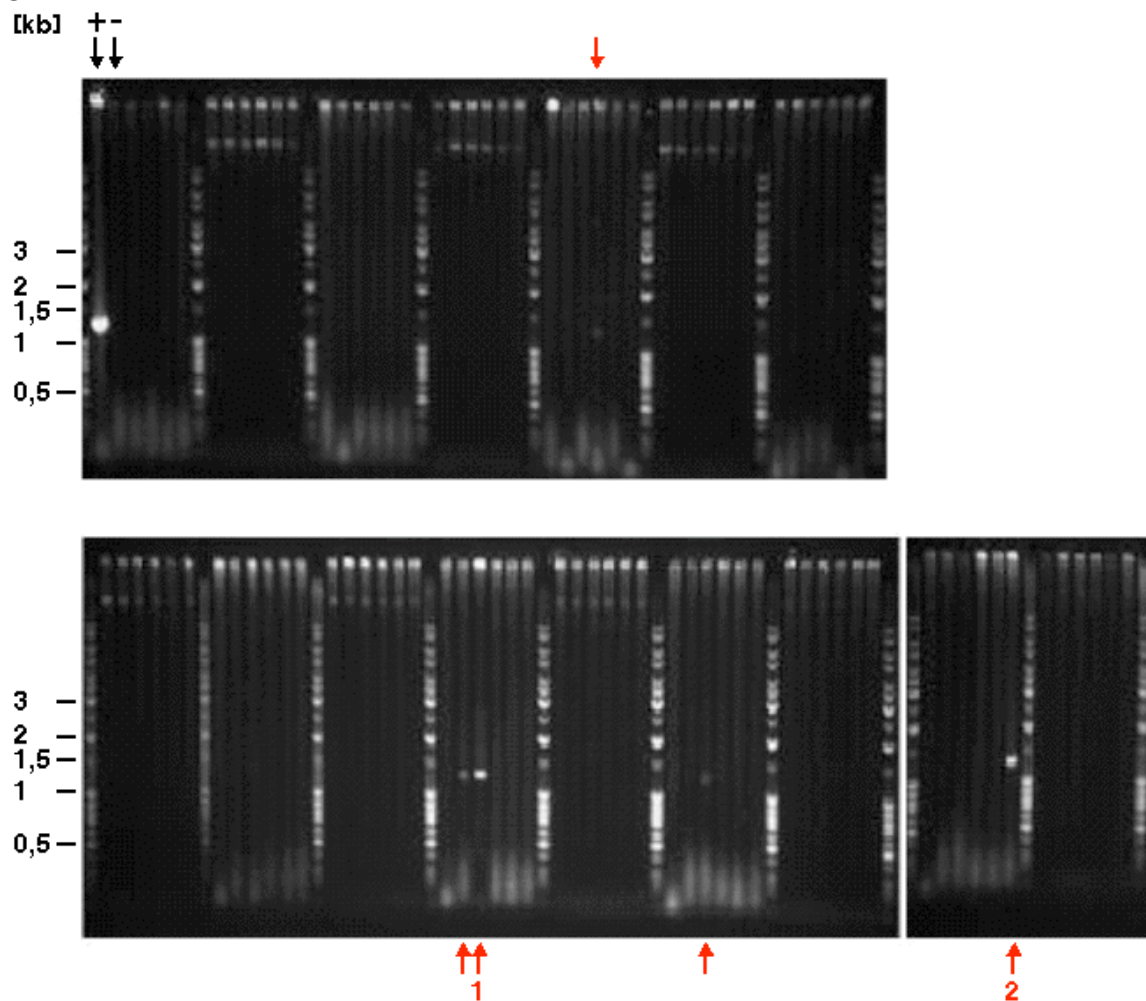


B

Genomische Sequenz nach unspezifischer Integration der Positivkontrolle:



C



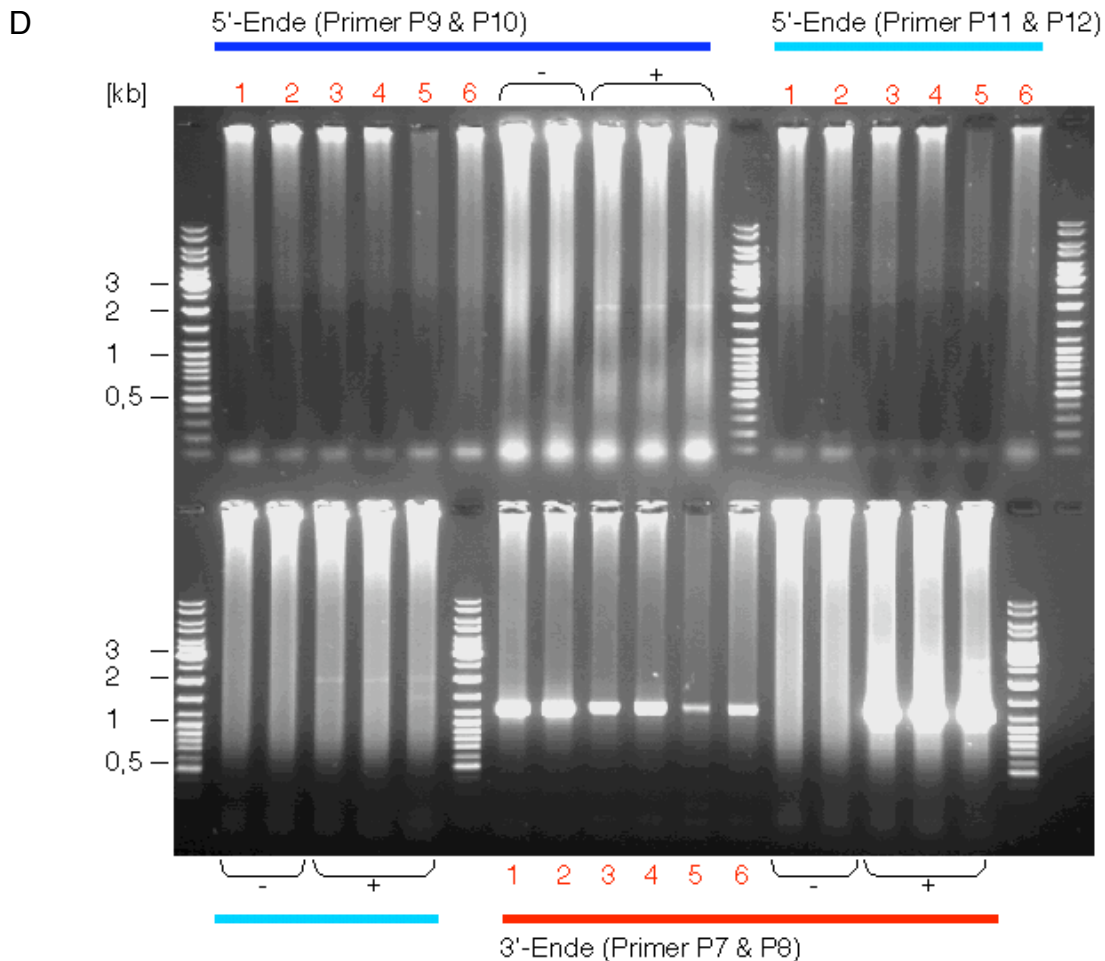


Abbildung 6-5: PCR-Screen auf homolog integrierte pV_H -loxP-NPTII Ziel DNA im HEA125 Genom. A: Lage der Primer für den PCR-Screen. Dargestellt sind die genomischen Sequenzen nach unspezifischer Integration und nach homologer Rekombination. Die Lagen der PCR-Primer sind als schwarze Pfeile markiert. Blau: genomische HEA125 DNA. Grün: einzubringende loxP-NPTII-loxP511 DNA. Die PCR-Produkte vom 5' Übergang sind als blaue Linie markiert, die vom 3' Übergang als rote. **B: Genomische DNA Sequenz nach Integration des Positivkontrollplasmids.** Legende: siehe A. **C: Screen auf homologe Rekombination am 3' Ende.** Jede Spur des Gels entspricht einer Suspensionskultur (20-Zell-Pool) pro Loch einer 96-Loch-Platte. Die DNAs der Suspensionskulturen wurden in PCRs mit den Primern P7 & P8 getestet. 4 Platten wurden gescreent, das Ergebnis von einer ist hier gezeigt. Mit roten Pfeilen sind Spuren markiert, die positive Signale (1309 bp) für durch homologe Rekombination entstandene 3' Übergänge zeigen. Ausgewählt wurden davon insgesamt 6 mit relativ starken Signalen, zwei dieser ausgewählten Klone sind in rot beziffert. Spur +: positiv Kontrolle (HEA125 DNA mit integriertem Positivkontrollplasmid (siehe B), gegenüber den 20er Pools 20-fach konzentriert). Spur -: Negativkontrolle (HEA125 DNA). **D: Überprüfung des 5' und 3' Endes der in C ausgewählten Klone.** Die korrekten Übergänge am 3' Ende in den 6 ausgewählten Kulturen wurden noch einmal verifiziert. Das 5' Ende wurde mit zwei verschiedenen Primerpaaren (P9 & P10 und P11 & P12) auf homologe Rekombination getestet. Klon 1 bis 4 zeigten im Gel auch hier positive Signale (2018 bzw. 2046 bp). Spur +: Positivkontrolle (Doppelwerte). Spur -: Negativkontrolle (Dreifachwerte). Primersequenzen siehe Tabelle 4-1.

einer Platte. Die sechs positiven Pools, die in der PCR die stärkste Bande erzeugt haben, wurden dann mit den Primern P9 & P10 und P11 & P12 auch auf das Vorhandensein des korrekten 3'-Übergangs getestet (Abbildung 6-5 D). In den Pools 1 bis 4 war auch für diesen Übergang im Gel deutlich das korrekte Signal zu sehen. Es waren in diesen 20er Pools also Zellen enthalten, die an der gewollten Stelle die

homolog integrierten spezifischen Rekombinationsstellen und das NPTII Gen enthielten. Bekräftigt wurde dieses Ergebnis durch Sequenzierung der am 3' Ende erzeugten PCR-Bande. Sie enthielt exakt die nach homologer Rekombination zu erwartende Sequenz des 3' Übergangs. Die schwache Bande am 5' Ende ließ sich nicht in einen Plasmidvektor ligieren und konnte daher nicht sequenziert werden.

Von den Zellen der vier positiven 20er Pools wurden durch limitierte Verdünnung Einzelzellklone erzeugt, die, nachdem sie wieder hochgewachsen waren, erneut getestet wurden. Die PCRs an genomischer DNA von 92 dieser Einzelzellklone mit dem Primerpaar P7 & P8 ergaben in keinem Fall erneut ein positives Signal.

Da es hierfür keine Erklärung gab und die vorangegangenen Ergebnisse so vielversprechend waren, wurde das komplette Verfahren von der Transfektion bis zur Einzelzellklonierung noch zwei weitere Male wiederholt. Es gelang jedes Mal Klone zu isolieren, die positive Signale für korrekte Übergänge auf beiden Seiten der ins Genom rekombinierten Ziel DNA erzeugten. Beim Test derselben Zellpools an darauf folgenden Tagen war aber zu beobachten, dass das positive Signal schwächer wurde bzw. verschwand. Nach dem Hochwachsen der Einzelzellklone war es nie mehr nachweisbar.

6.1.4 Alternative Einführung der loxP Stellen ins Zielzellgenom

Mögliche Erklärungen für das in Abschnitt 6.1.3 beobachtete Verschwinden der Übergänge, die nach Integration der pV_H-loxP-NPTII Ziel DNA im Genom der HEA125 Zellen entstanden sind, wird in Abschnitt 7.6.1 diskutiert. Führt die starke NPTII Expression unter der Kontrolle des endogenen V_H Promotors wirklich zu Nachteilen der Zellen mit homolog integrierten Konstrukten, müsste damit gerechnet werden, dass andere zwischen den loxP Stellen eingeführte Selektionsgene die gleiche Wirkung haben.

Mittlerweile wurde durch die Humanisierung der leichten Kette gezeigt, dass die Isolierung homolog rekombinierter Zellen auch mittels FACS direkt über die veränderten Antikörpermoleküle auf der Zelloberfläche möglich ist (Abschnitt 5.4.3). Das Problem der überexprimierten Selektionsgene kann also umgangen werden, indem die loxP Stellen mit einem Marker zusammen eingeführt werden, der nur die von den Zellen ohnehin exprimierten Antikörpermoleküle verändert. Diese Veränderung müsste zwischen den loxP Stellen in die kodierende DNA für die variable Domäne der schweren Kette des Antikörpers eingebracht werden. Um später im FACS auf die Veränderung selektieren zu können, muss sie für die Färbung mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper zugänglich sein. Das bedeutet, sie muss möglichst an der Außenseite des Antikörpermoleküls präsentiert werden. Dieser Zweck wird durch die

Klonierung in eine der drei CDRs von IGHV/D/J erfüllt, denn diese liegen im Antikörpermolekül als drei Schleifen nach außen exponiert, wo sie die Antigenbindungsstelle bilden (Edmundson *et al.* 1975). Ausgewählt wurde die CDR3, weil diese im Vergleich verschiedener funktioneller variabler Domänen die variabelste Sequenz und vor allem die variabelste Länge hat (siehe Einleitung Abschnitt 3.1.1). Daher war bei der CDR3 am Wahrscheinlichsten davon auszugehen, dass die Einführung eines relativ kurzen exogenen Epitops die korrekte Faltung und Oberflächenpräsentation des veränderten Antikörpermoleküls nicht stört.

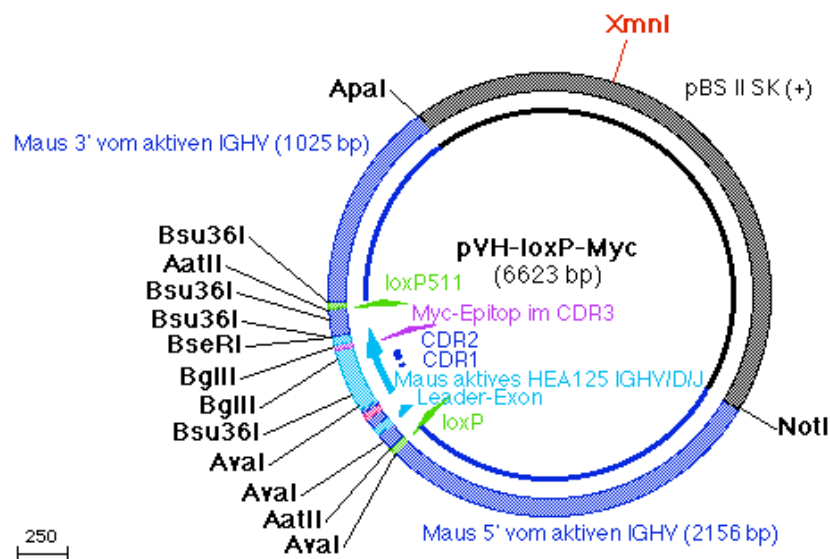


Abbildung 6-6: Schematische Darstellung der pV_H -loxP-Myc Ziel DNA. Das aktive HEA125 IGHV/D/J Gen mit C-Myc (im Leseraster) in CDR3 wurde zwischen die flankierenden Intronsequenzen aus dem Mausgenom (blau) und die loxP Stellen (grün) in den Klonierungsvektor pBS II SK (+) (schwarz) ligiert. Die Größe der Kassetten zwischen den loxP Stellen beträgt 736 bp. Bei der Klonierung verwendete Restriktionsstellen sind, soweit noch vorhanden, schwarz dargestellt. Die XmnI Linearisierungsstelle ist rot markiert. Die Größen der einzelnen Elemente entsprechen den Längen der Sequenzen. Ein Maßstab, der die Länge von 250 bp repräsentiert, ist unten links abgebildet.

Als Marker, die in der CDR3 präsentiert und anschließend mit Zweitantikörpern selektiert werden könnten, kamen zum Beispiel das c-Myc oder das FLAG-Epitop in Betracht. Zur Einführung der loxP Stellen über das c-Myc-Epitop wurde das vorher klonierte Plasmid zur Einführung der loxP Stellen mittels G418 Resistenz (pV_H -loxP-NPTII, Abbildung 6-6) modifiziert. Zunächst wurden der zwischen den loxP Stellen liegende, in HEA125 aktive IGHV/D/J Bereich amplifiziert, der mit pV_H -loxP-NPTII durch das NPTII Gen ersetzt werden sollte. Das Produkt der PCR mit den Primern P19 & P20 an genomischer HEA125 DNA ersetzte über die von den Primern mitgebrachten AatII Schnittstellen das NPTII Gen in pV_H -loxP-NPTII (Primersequenzen siehe Tabelle 4-1). Die nächsten, die CDR3 umgebenden, singulären Restriktionsstellen waren BseRI und BglII. Über sie wurde das Plasmid geöffnet und die anneal-

ten, synthetischen Oligonukleotide P21 & P22 hinein ligiert. Diese kodierten das zwischen den Schnittstellen herausgeschnittene Stück DNA, in das in der CDR3 im Leseraster das c-Myc-Epitop eingefügt wurde. Die Ziel DNA pV_H-loxP-Myc ist in Abbildung 6-6 dargestellt. Für jedes andere Epitop funktioniert die Klonierung analog.

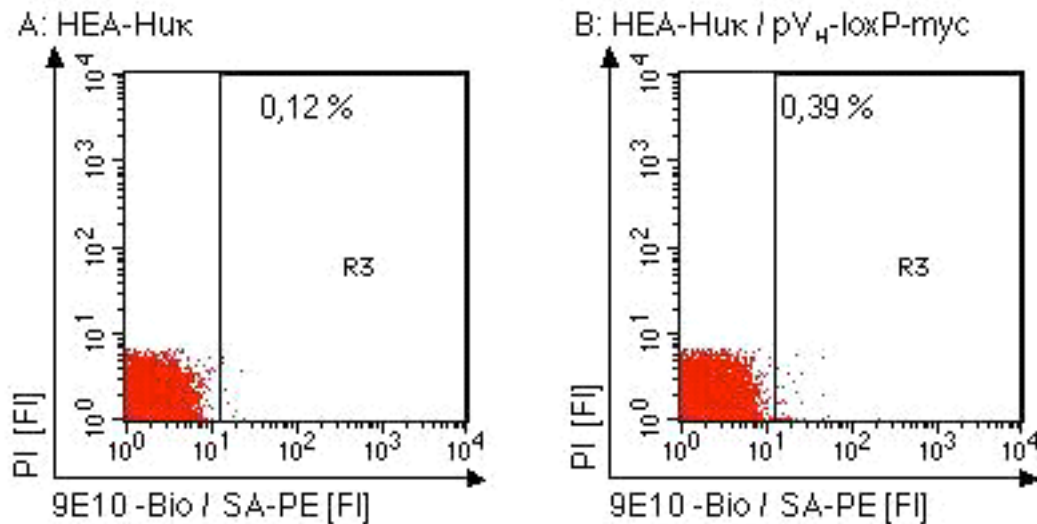


Abbildung 6-7: Isolierung der Myc-positiven Zielzellen mittels FACS. A: Durchflusszytometrische Analyse 9E10-Bio/SA-PE markierter HEA-HuK Zellen. Nicht transfizierte HEA-HuK Zellen wurden mit dem mAb 9E10-Biotin markiert, mit Streptavidin-PE gefärbt und im FACS unter Ausschluss der PI gefärbten, toten Zellen analysiert. **B: Isolierung der PE-positiven Zielzellen nach Transfektion von HEA-HuK Zellen mit pV_H-loxP-Myc Ziel DNA.** Die Zellen wurden wie in A gefärbt und mittels FACS 1% der in R3 liegenden Zellen, mit der allerhöchsten Fluoreszenzintensität, in sieben Pools von jeweils ca. 1000 Zielzellen isoliert.

HEA-HuK Zellen wurden mit der linearisierten pV_H-loxP-Myc Ziel DNA transfiziert und 72 Stunden zur Regeneration kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem biotinylierten Antikörper 9E10 markiert und mit Streptavidin-PE gefärbt. 9E10 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen das c-Myc Epitop gerichtet ist (Evan *et al.* 1985). Bei der Markierung von Zellen mit diesem Antikörper wurde festgestellt, dass der Antikörper 0,12% der HEA-HuK Ausgangszellen markiert (Abbildung 6-7 A). Aus der Suspensionskultur der mit pV_H-loxP-Myc Ziel DNA transfizierten Zellen wurden die PE-positiven Zellen mittels FACS isoliert (Abbildung 6-7 B). In der Sortierregion R3 für homolog rekombinierte, PE-positive Zellen lagen 0,39% der transfizierten Zellen. Nach Abzug des Hintergrunds von 0,12% PE-positiven Zellen in den HEA-HuK Ausgangszellen wäre das eine homologe Rekombinationsrate von 0,27% gewesen. Das erschien, nachdem hier keine Vorselektion durchgeführt wurde, unwahrscheinlich und wäre sogar für die Rate nicht-homologer Integration (1/10⁴) drei mal höher gewesen, als zu erwarten. Hinzu kam, dass hier nur die Integrationen nachgewiesen werden konnten, deren Produkte auch auf der Oberfläche der Zellen präsentiert wurden.

$2,5 \cdot 10^8$ Zellen wurden im FACS analysiert (Abbildung 6-7 B). Von allen in R3 liegenden Zellen wurde 1% mit der allerhöchsten Fluoreszenzintensität in sieben Pools von jeweils ca. $1 \cdot 10^3$ Zellen sortiert. Sieben Tage später wurden die antikörperhaltigen Überstände dieser isolierten Zielzellpools im ELISA analysiert. Diese Analyse wies in keinem der Überstände Zielantikörper nach, die das c-Myc-Epitop präsentierten.

6.2 Kassettenaustausch der V_H Domäne mittels Cre/loxP

Sobald eine HEA-Hu κ -VMyc Zelllinie isoliert worden ist, deren aktiver IGHV/D/J Locus mit loxP und loxP511 Stellen flankiert ist (siehe Abschnitt 6.1.4), können an dieser die Bedingungen für den Cre/loxP vermittelten Kassettenaustausch optimiert und dessen Frequenz ermittelt werden.

6.2.1 Testplasmide für den Kassettenaustausch von IGHV/D/J

Zum Testen des Kassettenaustausches wurde ursprünglich ein Plasmid ploxP-EGFP kloniert, in dem statt der aktiven HEA125-IGHV/D/J Domäne das Gen EGFP von den loxP Stellen flankiert wird (Abbildung 6-8). Mit den Primern P23 & P24, welche die loxP Stellen mitbrachten, wurde in einer PCR an pEGFP-N3 DNA das EGFP-Gen ohne den in dem Plasmid vorgeschalteten Promotor amplifiziert. Das Produkt der PCR wurde in das Plasmid pCR2.1 ligiert.

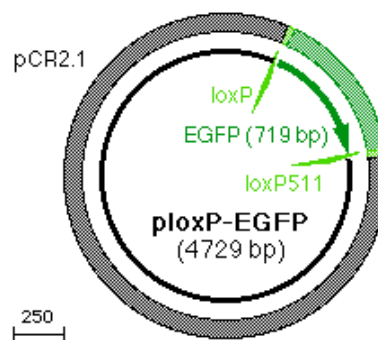


Abbildung 6-8: Schematische Darstellung der ploxP-EGFP Kassettenaustausch DNA. Das EGFP Gen (grün) wurde ohne Promotor zwischen die flankierenden loxP Stellen (hellgrün) in den Klonierungsvektor pCR2.1 (schwarz) ligiert. Die Größe der Kasette zwischen den loxP Stellen beträgt 719 bp. Für den Kassettenaustausch wird die Plasmid DNA nicht linearisiert. Die Größen der einzelnen Elemente entsprechen den Längen der Sequenzen. Ein Maßstab, der die Länge von 250 bp repräsentiert, ist unten links abgebildet.

Nach Transfektion von HEA-Hu κ -VMyc Zellen mit ploxP-EGFP und einem eukaryontischen Cre-Expressionsplasmid sollten dann alle Zellen, die Kassettenaustausch durchlaufen haben, durch GFP Expression grün sein. Außerdem sollten sie, weil sie keine aktive IGHV/D/J Domäne mehr haben, keinen Antikörper mehr produzieren. Allerdings wurde mittlerweile die Beobachtung gemacht, dass die Zellen ein Ersetzen der aktiven IGHV/D/J Domäne durch das NPTII Gen nicht vertragen (Abschnitt

6.1.3). Es könnte also sein, dass auch zu viel EGFP-Expression durch den endogenen V_H Promotor den Zellen schaden würde. Um das zu vermeiden, wurde alternativ das Plasmid ploxP-FLAG konstruiert (Abbildung 6-9). Mit ihm kann durch Kassettenaustausch in HEA-Hu κ -VMyc Zellen eine variable Domäne erzeugt werden, die sich durch das FLAG Epitop im FACS von der mit dem c-Myc Epitop unterscheiden lässt.

Das Plasmid ploxP-FLAG enthält denselben, von den loxP und loxP511 Stellen flankierten, kodierenden IGHV/D/J Bereich wie p V_H -loxP-Myc, aber nicht die zur homologen Rekombination benötigten 5' und 3'-flankierenden Bereiche. Im Unterschied zu p V_H -loxP-Myc enthält die CDR3 Schleife von ploxP- V_H FLAG nicht das c-Myc sondern das FLAG-Epitop. Es kann einfach kloniert werden, indem das Produkt einer PCR mit den Primern P25 & P26 an dem Plasmid p V_H -loxP-Myc in den Vektor pCR2.1 ligiert wird (Primersequenzen siehe Tabelle Tabelle 4-1). Es kodiert den von den loxP Stellen flankierten aktiven IGHV/D/J Lokus. Das resultierende Plasmid kann dann über die BseRI und BglII Schnittstellen geöffnet und die annealten synthetischen Oligonukleotide P27 & P28 einligiert werden. Diese kodieren das zwischen den Schnittstellen herausgeschnittene Stück DNA, das zusätzlich in der CDR3 Schleife im Leseraster das FLAG-Epitop enthält.

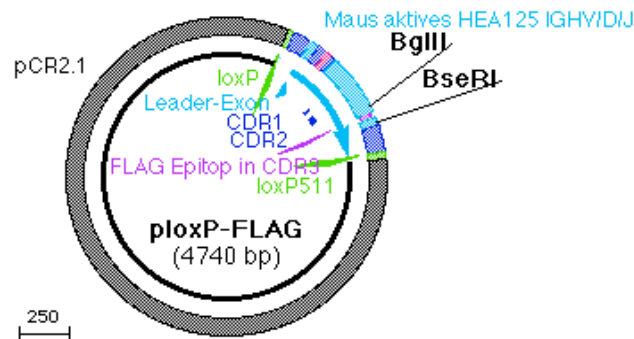


Abbildung 6-9: Schematische Darstellung der ploxP-FLAG Kassettenaustausch DNA. Der selbe Bereich des in HEA125 aktiven IGHV/D/J Lokus wie in p V_H -loxP-Myc wird zwischen die flankierenden loxP Stellen (hellgrün) in den Klonierungsvektor pCR2.1 (schwarz) ligiert. In die CDR3 Region des von den loxP und loxP511 Stellen flankierten V_H Exons wird im Leseraster die für das FLAG Epitop kodierende Nukleotidsequenz eingefügt. Die Größe der Kasse zwischen den loxP Stellen beträgt 730 bp. Für den Kassettenaustausch muss die Plasmid DNA vor der Transfektion in die Zielzellen nicht linearisiert werden. Die Größen der einzelnen Elemente entsprechen den Längen der Sequenzen. Ein Maßstab, der die Länge von 250 bp repräsentiert, ist unten links abgebildet.

6.2.2 Kassettenaustauschplasmide zur Erzeugung der Vielfalt

Zur Erzeugung einer komplexen Bibliothek komplett humaner Hybridomantikörper müssen die V_H und V_L Domänen von Hu-HEA125 ausgetauscht werden, gegen alle möglichen Sequenzkombinationen von menschlichen V_H und V_L Domänen (siehe Abbildung 6-1).

Die Sequenzen der funktionellen menschlichen variablen Domänen (Lefranc und Lefranc 2001) finden sich in den Onlinedatenbanken¹⁰. Mit einer limitierten Anzahl PCRs an cDNA menschlicher peripherer B-Lymphozyten als Matrize lassen sich sämtliche im Genom vorhandenen V_{λ}/J , V_{κ}/J und $V_H/D/J$ Genkombinationen synthetisieren (s.u.). Gegen diese sollen anschließend per spezifische Rekombinase vermittelten Kassettenaustausch (siehe Abschnitt 4.3.4) die variablen Domänen der schweren und leichten Ketten von Hu-HEA125 ausgetauscht werden. Hierbei werden die PCR synthetisierten variablen Regionen der schweren und leichten Ketten zufällig miteinander kombiniert, so dass eine große Vielfalt verschiedener, auf der Zelloberfläche präsentierter Antikörperspezifitäten entsteht.

Voraussetzung für den zufälligen Austausch der PCR Produkte ist, dass die PCR Produkte und die in Hu-HEA125 aktiven variablen Domänen mit Erkennungsstellen für spezifische Rekombinasen flankiert werden. Die noch zu erzeugende Zelllinie, in der im Genom die Genloci mit loxP (schwere Kette) bzw. FRT Stellen (leichte Kette) flankiert sind, wird im Folgenden als Hu-HEA125rec bezeichnet.

In Abbildung 6-10 ist die Vorgehensweise für den Austausch der variablen Domäne der schweren Kette dargestellt. Mit 65 Vorwärtsprimern 5' von IGHV und 6 Rückwärtsprimern 3' von IGHJ können in 390 PCRs alle 10530 menschlichen V_H Domänen plus deren Sequenzvarianten hergestellt werden (65 IGHV-Sequenzen x 27 IGHD-Sequenzen x 6 IGHJ-Sequenzen = 10530 V_H -Gene). Die Sequenzen der 71 dafür benötigten Primer sind von der Lage der loxP Stellen im Genom der Hu-HEA125rec Zellen abhängig. Da sich noch nicht herausgestellt hat, ob mit den in Abschnitt 6.1.1 gewählten Positionen von den Zellen noch Antikörper exprimiert werden, wurden die Primersequenzen noch nicht festgelegt. Die Länge der zu jeweils einer der verschiedenen genomischen IGHV bzw. IGHJ DNAs komplementären Sequenzen der Primer wird 26-30 Nukleotide betragen. Mit diesen Oligonukleotiden werden in einer ersten PCR Runde die variablen Domänen von genomischer DNA vervielfältigt (Abbildung 6-10). In einer zweiten PCR Runde bringen Primer mit den gleichen komplementären Sequenzen zusätzlich die Sequenzen der loxP bzw. loxP511 Stellen mit. Die Produkte dieser PCRs werden zirkularisiert. Unter Zugabe der spezifischen Rekombinase Cre können die zirkularisierten PCR Produkte anschließend in den Akzeptorvektor (Abbildung 6-10) rekombiniert werden. Mit der

¹⁰ z.B. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>; www.gdb.org/hugo; www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink; <http://imgt.cines.fr>

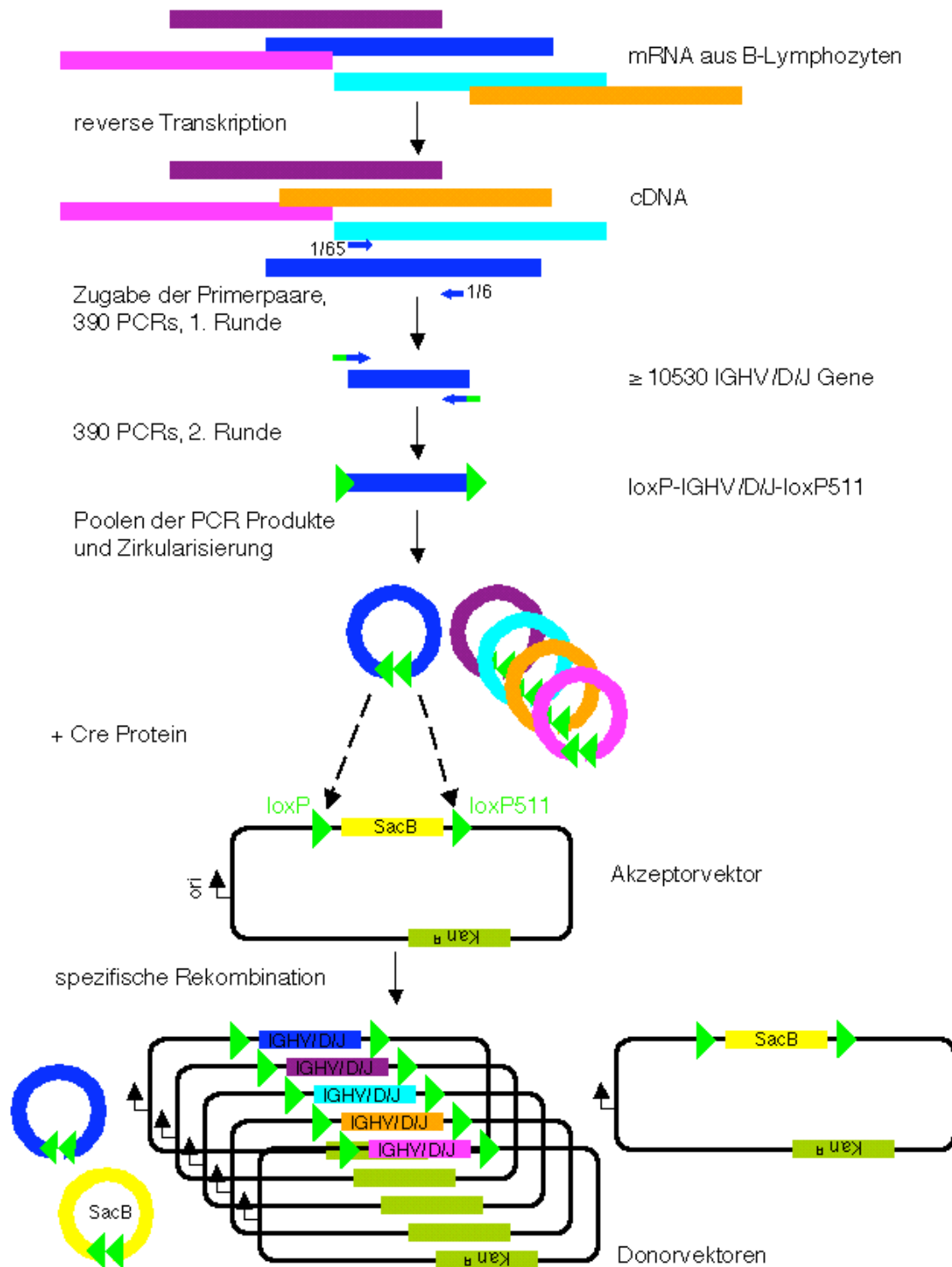


Abbildung 6-10: Herstellung der Plasmide für den Kassettenaustausch der V_H Domäne. Sämtliche menschlichen IGHV/D/J Domänen werden mit 390 Primerpaaren an cDNA humaner peripherer B-Lymphozyten amplifiziert und über angehängte loxP Stellen in den Akzeptorvektor rekombiniert. Nach Transfektion aller spezifischen Rekombinationsprodukte in Bakterien werden bei Saccharoseselektion nur Plasmide vermehrt, in die eine der amplifizierten IGHV/D/J Domänen rekombiniert wurde. Diese dienen als Donorvektoren für den Kassettenaustausch der aktiven IGHV/D/J Domäne im HEA125 Genom.

resultierenden Mischung aus zirkulären variablen Domänen und SacB DNAs, nicht rekombiniertem Akzeptorvektor und Akzeptorvektoren mit integrierten variablen Domänen werden Bakterien transformiert. Die zirkulären variablen Domänen und SacB DNAs haben keinen Replikationsursprung und werden daher bei der Kultivierung der Bakterien verloren gehen. Durch Kultivierung der Transformanten in saccharosehaltigem Medium werden auch die nicht rekombinierten Akzeptorvektoren aus der Kultur entfernt. Die Saccharoseselektion beruht darauf, dass bei spezifischer Rekombination das Sucrase Gen SacB des Akzeptorvektors durch die verschiedenen variablen Domänen ersetzt wird. Geschieht dies nicht, so können die Sucrase exprimierenden Bakterien in Anwesenheit von Saccharose nicht wachsen. Jede hochgewachsene Bakterie vermehrt also Plasmid DNA, die eine von loxP und loxP511 Stellen flankierte V_H Domäne kodiert. Diese Plasmide können aus den Bakterien isoliert werden und fungieren dann als Donorvektoren für den Kassettenaustausch der V_H Domänen. Dafür werden sie zusammen mit einem eukaryontischen Cre-Expressionsplasmid in die Hu-HEA125rec Zellen transfiziert.

Der Austausch der variablen Domänen der leichten Ketten funktioniert analog dazu, nur kommen dort statt loxP Stellen mit Cre zwei nicht miteinander kompatible FRT Stellen mit der Rekombinase FLP zur Verwendung. Für die Amplifizierung sämtlicher variabler Kappa Ketten werden in 200 PCRs 40 IGKV und 5 IGKJ Primer (40 IGKV-Sequenzen x 5 IGKJ-Sequenzen = 200 V_κ -Gene), für die Lambda Ketten in 120 PCRs 30 IGLV und 4 IGLJ Primer (30 IGLV-Sequenzen x 4 IGLJ-Sequenzen = 120 V_λ -Gene) benötigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Weg geebnet ist für die Chimärisierung des HEA125 Hybridomantikörpers ohne die Mitintegration von Markergenen und für die Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen. Die konstante Domäne der leichten Kette von HEA125 wurde durch homologe Rekombination im Genom der Hybridomzelle erfolgreich humanisiert, ohne dass zusätzliche Veränderungen in den Zielgenort eingeführt wurden. Der resultierende HEA-Hu κ Antikörper weist auf Proteinebene eine menschliche leichte Kappa Kette, aber keine von der Maus stammende mehr auf und wird von den Hybridomzellen stabil und in großer Menge produziert. Anhand der Chimärisierung der leichten Kette wurde bewiesen, dass die ortsspezifische Einführung von Zielgenen ohne die Mitintegration von Selektionsmarkern durchgeführt werden kann. Dies ist möglich, weil die Zielzellen ihre Veränderungen auf der Oberfläche präsentieren und somit ihrer Veränderung direkt mittels FACSSorter ohne Vorselektion isoliert werden können. Alle weiteren homologen Rekombinationen können analog durchgeführt werden. Für die Herstellung des

chimären Hu-HEA125 Antikörpers wird eine weitere homologe Rekombination zur Chimärisierung der schweren Kette benötigt. Die hier hergestellten Maus-Mensch-Maus Chimärisierungsplasmide können anschließend für die Chimärisierung jedes anderen IgG1 Hybridomantikörpers verwendet werden, ganz gleich welcher Spezifität. Chimärisierungsplasmide für andere Isotypen können analog konstruiert werden. Vor der Etablierung der Hybridombibliothek sind noch zwei weitere homologe Rekombinationsereignisse zur Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen notwendig.

7 Diskussion

Trotz ihres enormen Potentials als Therapeutika haben monoklonale Antikörper nichthumanen Ursprungs in klinischen Studien bisher eher geringe Wirkungen erzielt. Die Gründe dafür liegen in ihrer starken Immunogenität (Shawler *et al.* 1985, Miller *et al.* 1983), ihren ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften (Hakimi *et al.* 1991, Stephens *et al.* 1995) und der ineffizienten Aktivierung der Effektorfunktionen des Immunsystems (Riechmann *et al.* 1988, Junghans *et al.* 1990). Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Strategien entwickelt, mit denen humane Antikörper erzeugt werden können (Vaughan *et al.* 1998).

Die existierenden prokaryontischen Antikörper Bibliotheken haben den Nachteil, dass die daraus isolierten Antikörper nur eingeschränkt produzierbar sind. Dies liegt daran, dass im bakteriellen System nur Antikörperfragmente hergestellt werden können. Dabei gilt: je größer das Fragment ist, desto geringer ist die Ausbeute. Komplette Antikörpermoleküle werden im bakteriellen System nicht gebildet. Die leichter produzierbaren Antikörperfragmente beinhalten hingegen nicht die volle Antikörperfunktion und sind außerdem nur in Ausnahmefällen stabil genug, um für therapeutische Anwendungen brauchbar zu sein.

Die direkte Herstellung von humanen Hybridomen oder Maus-Mensch Heteromyelomen zur Produktion komplett menschlicher Antikörper lieferte bis jetzt keine Zellen, die so stabil gewesen wären, dass sie langfristig in Kultur größere Mengen Antikörper produziert hätten.

Humane Antikörper produzierende Mäuse wiederum stehen unter Patentschutz. Außerdem müssen sie zur Gewinnung einer bestimmten Antigenpezifität erst immunisiert und anschließend Hybridome hergestellt werden.

In eukaryontischen Expressionssystemen lassen sich stabile und voll funktionsfähige Antikörper herstellen, aber auch hier ist meist eine langwierige Optimierung der Kulturbedingungen nötig, bis Antikörper in großer Ausbeute produzierbar sind. Dadurch gestaltet sich die Humanisierung bereits existierender Antikörper sehr aufwendig, da sie für jeden einzelnen Antikörper durchgeführt werden muss.

Hybridomzellen sind per se darauf spezialisiert, Antikörper in großen Mengen zu produzieren. Aus diesem Grund hat Fell *et al.* (1989) in einer Maushybridomzelle mittels homologer Rekombination die Gene für die konstanten Regionen der schweren und leichten Ketten durch dieselben Gene des Menschen ersetzt (Fell *et al.* 1989, Shulman *et al.* 1990).

Ähnliche Gründe gaben auch den Anlass für die vorliegende Arbeit. Dabei soll eine Hybridombibliothek hergestellt werden, aus der einzelne Antikörperspezifitäten ähnlich leicht wie bei den oben erwähnten prokaryontischen Systemen aufgefunden

werden können, ohne dass dies durch Nachteile in der Antikörperproduktion erkauft werden muss.

7.1 Chimärisierung der leichten Kette: Homologe Rekombination ohne Miteinführung vorselektionierbarer Marker

Die Frequenz der homologen Rekombination ist mit einem Ereignis in ungefähr $1 \cdot 10^7$ eingesetzten Zellen gering. Um anschließend die erfolgreich isolierten Zielzellen aus der Vielzahl nicht homolog rekombinierter Zellen isolieren zu können, wird normalerweise ein positiv vorselektionierbarer Marker, wie z.B. ein Resistenzgen, mit in die Umgebung des Zielgenortes integriert. Solche miteingeführten Gene integrieren in der direkten Umgebung des Zielgens in das Genom der Zielzelle. Dies führt meist zur Verringerung der Expression des Zielgens (Colledge *et al.* 1995, Meyers *et al.* 1998), was im Fall der antikörperproduzierenden Hybridomzelle nicht erwünscht ist. Weiterhin ändern sich durch das integrierte, miteingeführte Gen die Abstände zwischen den Exons im Antikörpergenlokus. Bei Einführung des Selektionsgens am 5' Ende der IGKC und IGHC Exons würde jeweils das Zusammenspleißen mit den IGKV/J und IGHV/D/J Exons gestört, was zur Folge hätte, dass kein Antikörper mehr produziert würde. Bei Einführung des Selektionsgens am 3' Ende des IGKC Exons wäre wahrscheinlich nur eine Verringerung der Expression durch Beeinträchtigung dort lokalisierter regulatorischer Elemente (z.B. des 3'k Enhancers, der eine Rolle bei der Expression der Kappa Kette spielt, Judde und Max 1992) zu befürchten. Am 3' Ende des IGHC Exons jedoch würde das Zusammenspleißen von IGHC und dem Transmembranexon gestört, was dazu führte, dass nur noch die sezernierte Form des Antikörpers produziert würde (Abbildung 7-1). In diesem Fall wäre später keine Selektion unterschiedliche Antikörperspezifitäten produzierender Hybridomzellen mehr möglich, denn diese funktioniert nur über oberflächenexprimierte Antikörper. Hierauf beruht aber die geplante Erzeugung der humanen Hybridomantikörperbibliothek (siehe Abschnitt 7.6.2).



Abbildung 7-1: Genomische Organisation des Maus IGHG1 Lokus. Der Bereich 3' von CH3 bis zum 3' Ende von M2 ist 2423 bp lang, CH1 bis CH3 einschließlich erstrecken sich über 1546 bp. Verlängerung des Abstands zwischen CH3 und M1 führen zu einer Verringerung des Anteils membranexprimierter Antikörper auf der Hybridomzelloberfläche (Peterson und Perry 1986). Ein positiv selektionierbares Resistenzgen zur Vereinfachung der Isolierung homolog rekombinierter Zellen könnte also nur 3' von M2 mit eingeführt werden, wodurch die Länge des zu ersetzenden Genbereiches mehr als verdoppelt würde. L = Leader Exon, M1,2 = Transmembranexons. Der Größenstandard unten links zeigt die Länge von 350 bp. Der nicht kodierende Bereich zwischen dem ungeordneten V/D/J und dem CH1 Exon ist verkürzt.

Aus diesen Gründen soll hier die Chimärisierung einer Hybridomzelle durchgeführt werden, ohne dass anschließend ein mit eingeführtes Resistenzgen im Genom der Zielzelle zurückbleibt. Zu diesem Zweck könnte ein Resistenzgen auch zwischen zwei spezifischen Rekombinationsstellen mit ins Zielzellgenom integriert und anschließend durch spezifische Rekombination wieder entfernt werden. Dann bliebe allerdings eine intakte spezifische Rekombinationsstelle zurück. Da beim Austausch der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten des Antikörpers zur Erzeugung der Bibliothek später schon zwei möglichst effiziente Rekombinationssysteme benötigt werden, wurde hier zur Vermeidung von Interferenzen auf die Einführung zusätzlicher Rekombinationssignale verzichtet. Außerdem wurden so die Modifikationen in der Umgebung der Antikörpergene möglichst gering gehalten, um Störungen der Genexpression oder beim Spleißen der Transkripte auszuschließen.

Dass die Durchführung homologer Rekombination auch ohne die Miteinführung eines Resistenzgens möglich ist, wurde anhand der konstanten Region der Kappa Kette von HEA125 gezeigt (siehe Abschnitt 5.4). Zielzellen, in deren produzierten Antikörpern die Maus Kappa Kette durch die menschliche Kappa Kette ersetzt ist, konnten mittels FACS direkt anhand des veränderten Phänotyps selektioniert werden (= HEA-Huκ). Auf Proteinebene wurde gezeigt, dass die isolierte Zielzelle humane konstante Kappa Ketten exprimiert (Abbildung 5-9). Außerdem exprimieren die Zellen keine murinen Kappa Ketten mehr (siehe Abbildung 5-11).

Es muss noch überprüft werden, ob tatsächlich beide Seiten der Ziel-DNA durch homologe Rekombination in die Ziel-DNA integriert sind. Am 3' Ende wäre es auch möglich, dass die in die Zellen eingeschleuste menschliche Ziel-DNA einfach integriert ist. In diesem Fall wäre im Genom downstream noch die DNA der murinen Kappa Kette enthalten. Weiterhin ist es möglich, dass in die Zellen eine zusätzliche Kopie der eingebrachten Ziel-DNA an anderer Stelle ins Genom integriert ist. Um die Veränderungen auf genomischer Ebene weiter zu analysieren und diese Fragen zu beantworten ist ein genomischer Southern Blot geplant. Das Ergebnis hat aber keinen Einfluss auf das weitere Vorgehen. Weder die Chimärisierung der schweren Kette von HEA125 noch die Erzeugung der humanen Antikörperbibliothek würde durch zusätzliche Ziel-DNA Kopien im Genom gestört, denn diese haben keinen Einfluss auf die nachfolgenden homologen und spezifischen Rekombinationseignisse. Da das Wachstum der Zellen normal ist, und sie große Mengen Antikörper produzieren, kann ausgeschlossen werden, dass regulatorische Elemente in der Umgebung des Zielgenortes oder andere für die Hybridomzelle wichtige Funktionen beeinträchtigt sind. Relevanz hätte eine nur einseitig stattgefundene homologe Rekombination nur insofern, als dann für die Chimärisierung der schweren Kette eine noch geringere Rate für das Auffinden positiver Klone zu erwarten wäre. Hier würde

nämlich die unspezifische Integration des 3' Endes und der resultierende Verbleib des murinen IGHC Gens im Genom dazu führen, dass keine membranexprimierten Antikörper mehr gebildet werden und solche Klone nicht aufzufinden sind.

Bei der Chimärisierung der leichten Kette ist statt der normalerweise angenommenen Transfektionseffizienz von ungefähr $1/10^7$ Zellen eine Frequenz von nur $1/10^8$ Zellen beobachtet worden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum Einen unterscheidet sich die Frequenz homologer Rekombination an verschiedenen Genorten abhängig von der Chromatinstruktur. Zum Anderen gehen wahrscheinlich beim FACS Sortieren noch Zellen verloren, die entweder nicht korrekt aussortiert werden, oder die nach der Färbe- und Sortierprozedur absterben anstatt sich zu teilen. Die HEA125 Hybridomzellen sind ohnehin relativ empfindlich, sie müssen während der Färbe- und Waschschriffe sehr vorsichtig gehandhabt werden. Nach vier Stunden in FACS Medium auf Eis (2 h Färben, 2 h Sortieren, was der Analyse von ca. $2 \cdot 10^8$ Zellen entspricht) leben nur noch etwa 10% der Zellen in den Proben.

Die Isolierung der positiven Zellen nach erfolgter homologer Rekombination ist der kritischste Schritt in der ganzen Prozedur. FACS Sortieren ist hierfür mit Abstand die effektivste Methode. Die Wiederfindungsrate beträgt 92%, bei einem Mischungsverhältnis von 1/1000 (siehe Abschnitt 5.1.3). Bei selteneren Ereignissen sind allerdings etwas geringere Wiederfindungsraten zu erwarten. Um für das Finden der Zielzellen möglichst optimale Voraussetzungen zu schaffen, wurde die Zelllinie HEA125-1 mit gegenüber HEA125 erhöhter Oberflächenexpression etabliert. Außerdem wird bei der Zielzellmarkierung durch Zwischenschaltung des Verstärkers Biotin-Streptavidin das Signal zusätzlich erhöht.

Um größere Chancen zu haben, eine positive Zielzelle zu erhalten, kann die Zahl der eingesetzten Zellen, die transfiziert werden, erhöht werden. Da das FACS Sortieren mit diesen Anforderungen aber schon an der Grenze seiner Leistungsfähigkeit ist, wäre es besser, wenn auch die Frequenz der positiven Zielzellen erhöht werden könnte. Einen erheblichen Einfluss auf die Rate der positiven Zellen in der Gesamtpopulation hat die Transfektionsrate. Die Elektroporation hat sich für HEA125 gegenüber chemischen und lipidbasierten Transfektionsreagenzien als die beste Methode erwiesen, und ihre Effizienz wurde durch Optimierung für HEA125 gegenüber Standardeinstellungen verdoppelt (siehe Abschnitt 5.3). Höhere Transfektionsraten für HEA125 könnten eventuell noch durch retrovirale Transfektion erreicht werden. Die Methode ist aber zum Zweck der ausschließlich ortsspezifischen homologen Integration der Ziel-DNA nicht geeignet, weil in die Zellen transfizierte DNA nach retroviraler Transfektion immer ortsunspezifisch ins Genom integriert, was hier vermieden werden soll. Vielleicht kann auch die Effizienz der homologen Rekombination in Zukunft noch gesteigert werden. Der Mechanismus der homologen Rekombination mit allen

beteiligten Enzymen ist noch nicht komplett verstanden, aber ihre Frequenz kann z.B. durch längere homologe Arme gesteigert werden (Thomas und Capecchi 1987, Shulman *et al.* 1990). Darüber hinaus ist bekannt, dass ortsspezifisch eingeführte DNA-Schäden an den Zielgenorten die Rate der homologen Rekombination erhöhen (Smih *et al.* 1995). Mittels triplexbildender Oligonukleotide (TFOs, Triplex-Forming Oligonucleotides) können DNA schädigende Reagenzien zu einem Zielort im Genom gelenkt werden und dort ortsspezifische DNA-Schäden verursachen. In CHO Zellen (chinese hamster ovary) konnte die Rate homologer Rekombination mit Hilfe der TFOs um das 3-5 fache gesteigert werden (Vasquez 1996). Den selben Effekt hat die Überexpression von Genen, deren Proteine an der homologen Rekombination beteiligt sind. Zum Beispiel stimuliert *RAD52* Überexpression in Affenzellen homologe Rekombination 3-5 fach (Park 1995), *RAD51* Überexpression 2-4 fach (Huang *et al.* 1999).

7.2 Charakterisierung des HEA-Hu κ Antikörpers

Durch Chimärisierung der leichten Kette wurde aus der Hybridomzelllinie HEA125 die Zelllinie HEA-Hu κ generiert (s.o.). Mittels SDS-PAGE wurde gezeigt, dass HEA-Hu κ wirklich eine andere leichte Kette exprimiert als HEA125, weil die leichten Ketten beider Antikörper unterschiedliche Migrationseigenschaften zeigen (Abbildung 5-11). Die leichte Kette von HEA125 wird von HEA-Hu κ nicht mehr produziert.

Die unterschiedlichen Migrationseigenschaften der leichten Ketten sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Ladungen der konstanten Domänen der Kappa Ketten von Maus und Mensch zurückzuführen. Die isoelektrischen Punkte (PI) betragen von $IGKC_{(Maus)} = 5,2$, von $IGKC_{(Mensch)} = 5,7$. Die murine Kappa Kette hat also mehr negative Ladungen als die humane, was mit ihrem schnelleren Laufverhalten bei der SDS-PAGE korreliert. Andere Faktoren, die Unterschiede im Migrationsverhalten von Proteinen verursachen können, sind unterschiedliche Molekülgrößen oder verschieden viele Glycosylierungsstellen. Dies ist hier auszuschließen, weil die IGKC-Gene von Maus und Mensch mit jeweils 107 Aminosäuren genau gleich groß sind und die konstanten Domänen der leichten Ketten von Antikörpern nicht glycosyliert werden (Lefranc und Lefranc 2001). Der Unterschied im Laufverhalten zwischen den beiden humanen leichten Ketten (Abbildung 5-12) ist auf die unterschiedlichen variablen Domänen von HEA-Hu κ und der gereinigten leichten Kette des humanen Myeloms zurückzuführen.

Die Analyse der Antikörper im Western Blot und im Bindungsexperiment an EpCAM exprimierenden Colo205 Zellen mit anti Maus Kappa und anti Mensch Kappa Antikörpern zeigt, dass die veränderte leichte Kette humane Anteile hat (Abbildung 5-12). Der Ziege anti Mensch Kappa Antikörper kreuzreagiert trotz Vorabsorption an Maus

Immunglobulin mit der denaturierten Maus Kappa Kette und der schweren Kette (Western Blot Abbildung 5-12), aber nicht erkennbar mit der nativen (Bindungsexperiment Abbildung 5-14). Der Ziege anti Maus Kappa Antikörper kreuzreagiert im Western Blot stärker mit der schweren Kette (Abbildung 5-12), was sich auch im Bindungsexperiment (Abbildung 5-14) bemerkbar macht. Es sieht dadurch so aus, als könne auch murine Kappa Kette an HEA-Hu κ markierten Colo205 Zellen nachgewiesen werden, weil das Signal gegenüber einem negativen in seiner Fluoreszenzintensität um 10% verstärkt ist. Dass diese Verschiebung auf Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen ist, zeigt das SDS-Gel (Abbildung 5-11), in dessen HEA-Hu κ Spur eindeutig keine murinen leichten Ketten mehr zu sehen sind. HEA125 und HEA-Hu κ haben erwartungsgemäß noch die gleichen schweren Ketten.

Der Antikörper hat bei der Chimärisierung seine Spezifität für das Antigen EpCAM behalten. HEA-Hu κ bindet wie HEA125 an das durch Proteolyse und Glycosylierung 32 bis 42 kDa große Protein aus Colo205 (EpCAM⁺) Lysaten (Abbildung 5-13), nicht aber an Raji (EpCAM⁻) Lysat. Dasselbe Bild ergibt sich für das native Antigen auf der Oberfläche der Zellen (Abbildung 5-14). Durch die Chimärisierung der leichten Kette hat HEA-Hu κ gegenüber HEA125 geringfügig von seiner Affinität zu EpCAM eingebüßt (Abbildung 5-15). Diese Verringerung könnte durch eine andere Konformation der humanen Domäne der konstanten leichten Ketten gegenüber der murinen verursacht werden.

Auffällig beim Vergleich der Affinitäten des HEA125 und des HEA-Hu κ Antikörpers ist, dass die halbmaximale Bindung des fluoreszierenden 25 nM HEA125-FITC Antikörpers mit 15 nM HEA125 erreicht wird. Dieser Unterschied lässt darauf schließen, dass der HEA125-FITC Antikörper durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff in seiner Affinität zu EpCAM gegenüber dem nicht markierten Antikörper verringert ist. Die Verringerung der Affinität durch die Chimärisierung der leichten Kette ist geringer als die durch die Konjugation des Antikörpers mit FITC Molekülen, denn schon 20 nM HEA-Hu κ Antikörper führen zur halbmaximalen Bindung von 25 nM HEA125-FITC Antikörper.

7.3 Chimärisierung von Hybridomantikörpern am Beispiel von HEA125

Die Chimärisierung der schweren Kette von HEA125 wurde erst einmal versucht. Technische Probleme beim Sortieren führten dabei dazu, dass sich nach dem FACS Sortieren statt der angezeigten jeweils 100 bzw. 300 Zellen nur durchschnittlich fünf Zellen in den Isolaten befanden. Antikörper mit humanen konstanten Domänen der schweren Kette waren nicht darunter. Die Chimärisierung der leichten Kette hat aber

gezeigt, dass bei gut laufender Sortierung die Durchführung homologer Rekombination ohne die Mitintegration vorselektionierbarer Marker möglich ist. Daher wird das Experiment bei hoffentlich besseren Sortierergebnissen wiederholt werden. Sollte dann kein Hu-HEA125 Antikörper isoliert werden können, müsste das pHulgG1 Plasmidkonstrukt (Abbildung 5-16) verändert werden, indem die Maus/Mensch und Mensch/Maus Übergänge in der Ziel-DNA verschoben werden, für den Fall dass sie zufällig unbekannte regulatorische DNA-Signalsequenzen stören.

Die Konstrukte zu Chimärisierung der leichten und schweren Kette stehen für weitere Chimärisierungen zur Verfügung. Mit den Konstrukten pHulgG1 und pHuK kann im Prinzip jeder therapeutisch interessante IgG1 Maushybridomantikörper mit leichten Kappa Ketten relativ einfach und schnell chimärisiert werden. Konstrukte für die Chimärisierung anderer Isotypen können analog konstruiert werden. Das Risiko, die Antikörperexpression der Hybridomzellen durch die Chimärisierung zu verringern, ist dabei geringer als bei der konventionellen Chimärisierungsmethode, weil hier kein zusätzliches Gen in die Umgebung des Zielgenortes eingeführt wird.

7.4 Therapeutische Verwendungsmöglichkeit von Hu-HEA125

Das Antigen EpCAM ist als Zielantigen für die Tumorummuntherapie von besonderem Interesse. Verglichen mit normalem Gewebe wird EpCAM in allen bisher untersuchten Adenokarzinomen überexprimiert (Moldenhauer *et al.* 1987). Darüber hinaus ist EpCAM innerhalb der einzelnen Tumore relativ homogen verteilt. Ein Antikörper gegen EpCAM kann daher potenziell für die Behandlung aller menschlichen Karzinome eingesetzt werden (Brust, Magen-Darm-Trakt, Lunge, Ovar und Prostata). Der ganz große Vorteil von EpCAM gegenüber anderen Antigenen ist aber seine konstitutive Expression in Tumorzellen. EpCAM ist offensichtlich ein essentieller Bestandteil für die Proliferation der Zelle, und geht daher bei zunehmender Entartung der Zellen während der Tumorentwicklung nicht verloren. Dagegen verlieren Tumorzellen viele andere Antigene im Laufe der Tumordifferenzierung (Edwards 1985).

Auch aus diesen Gründen wurde HEA125 als Ausgangsantikörper für die humane Antikörperbibliothek ausgewählt, denn der chimäre Antikörper an sich kann, sobald er fertig gestellt ist, in präklinische und klinische Studien zur Karzinomtherapie einbezogen werden. HEA125 ist mit einer Dissoziationskonstante von $2,2 \cdot 10^{-9}$ M ein erheblich höher affiner EpCAM Binder als die bisher in der Klinik getesteten gegen EpCAM gerichteten Antikörper 17-1A (murin), C46 (human) und MT201 (human), deren Affinitäten im Bereich von $1,4$ bis $5 \cdot 10^{-7}$ M liegen. Die Chimärisierung der leichten Kette hat die Affinität bisher nur wenig verringert, wie das Inhibitionsexperiment der EpCAM Bindung auf Colo205 Zellen gezeigt hat (Abbildung 5-15). Sollte

sich die Affinität des HEA125 Antikörpers auch bei der Chimärisierung der schweren Kette nicht mehr drastisch verringern, so hat dieser Antikörper das Potenzial zu einem wirksamen Therapeutikum, denn der HEA125 Antikörper ist sogar knapp 4x affiner als der chimärisierte IgG1 Antikörper Rituximab ($8 \cdot 10^{-9}$ M). Dieser Antikörper wird schon als „first-line“ Therapeutikum erfolgreich in der Therapie von Non-Hodgkin Lymphomen eingesetzt.

7.5 Humanisierung versus Chimärisierung

Rituximab ist nicht das einzige Beispiel für erfolgreich in der Therapie verwendete chimäre Antikörper, die mit den variablen Domänen noch einen relativ großen Anteil von der Maus stammender Sequenzen aufweisen. Übersichten über Antikörper in fortgeschrittenen klinischen Studien zeigen, dass ungefähr gleich viele humane wie chimäre Antikörper vertreten sind (Tabelle 3-1 und Carter 2001). Schon allein dies ist ein Hinweis darauf, dass die Immunogenität muriner variabler Domänen häufig zu hoch bewertet wird. Zudem sind die Gerüstregionen der variablen Domänen zwischen verschiedenen Spezies relativ konserviert. Außerdem unterscheiden sich die CDRs aktiver Antikörpergene durch Ansammlung somatischer Mutationen sowieso gegenüber den Keimbahnsequenzen. Ein IGHV Gen kann bis zu fünf Aminosäureaustausche enthalten (Tomlinson *et al.* 1992), Antikörper von Myelomzellen sogar 43 (Yasui *et al.* 1989). Die murinen IGHV Domänen von drei Beispielantikörpern (Campath-IG, Anti-Tac und OKT3) sind zu 68, 75 und 72% homolog zu humanen IGHV Keimbahn Sequenzen (Clark 2000). Ein Vergleich der HAMA-Reaktionen von Patienten, die mit dem murinen bzw. chimärisierten anti EpCAM Antikörper 17-1A therapiert wurden zeigt, dass zumindest in diesem Fall die Chimärisierung ausreichend war, um die Immunogenität des Antikörpers fast auf null zu reduzieren. Von 24 mit dem murinen 17-1A Antikörper behandelten Patienten entwickelten alle anti 17-1A Antikörper (Frödin *et al.* 1992), von 10 mit dem chimärisierten Antikörper behandelten dagegen nur einer. Auch die in Abbildung 5-12 gezeigte Färbung mit Ziege anti Maus Kappa und Ziege anti Maus IgG1 Antikörpern zeigt eine nur schwache Anfärbung der chimärisierten leichten Kette von HEA H_uK, trotz der V_L Domäne komplett murinen Ursprungs.

Im Fall von HEA125 soll von der kompletten Humanisierung zunächst abgesehen werden, weil die Humanisierung häufig zu einem starken Affinitätsverlust der betreffenden Antikörper führt (Riechmann *et al.* 1988). Teile der Gerüstregionen können mitverantwortlich sein für die Antigenspezifität, und die Gerüstregionen stabilisieren sich häufig gegenseitig, was nach dem Austausch nicht mehr unbedingt gewährleistet ist (Riechmann *et al.* 1988, Jones *et al.* 1986). Durch Wiedereinführung wichtiger

Mausaminosäurereste kann zwar die Affinität humanisierter Antikörper häufig wieder gesteigert werden (Queen *et al.* 1989), aber der Nutzen einer Humanisierung steht meistens in keinem Verhältnis zum Aufwand.

7.6 Erstellung einer humanen Hybridomantikörperbibliothek

Der Bedarf an monoklonalen Antikörpern in Grundlagenforschung, Diagnostik und Therapie ist groß. Besonders in der Tumorthherapie und der Transplantationsmedizin werden mit monoklonalen Antikörpern vielversprechende Erfolge erzielt. Für die klinische Applikation von Antikörpern sind im Allgemeinen komplett humane monoklonale Antikörper das erstrebenswerteste Format, weil sie am Effektivsten wirken können und die geringste intrinsische Toxizität und Immunogenität besitzen.

Die hier diskutierte Strategie zur Erzeugung einer Bibliothek soll es ermöglichen, humane monoklonale Hybridomantikörper gegen nahezu jedes zur Verfügung stehende Antigen schnell und effizient direkt aus dem Pool der sie produzierenden Hybridomzellen isolieren zu können.

Vorbild zur Erzeugung der Vielfalt in der Bibliothek ist das seit Jahrtausenden erfolgreiche menschliche Immunsystem. Dieses schafft es, jedem möglichen körperfremden Antigen einen passenden Antikörper entgegen zu halten. Dazu bedient es sich der drei grundlegenden Prinzipien genetische Vielfalt, klonale Selektion und somatische Hypermutation, die hier in experimentell handhabbaren Systemen synthetisch imitiert werden sollen.

7.6.1 Bereitstellung der Vielfalt von Antikörpergenen

Die Vielfalt der menschlichen Antikörpergene entsteht durch zufällige Kombination von Genfragmenten (siehe Abschnitt 3.1.4). Diese Vielfalt kann mittels PCR an cDNA, die aus mRNA von B-Lymphozyten gewonnen wird, von der Natur abgeschrieben werden (Breitling und Dübel 1997). Die Einführung der PCR-synthetisierten variablen Domänen in den aktiven Genlokus der Hybridomzellen zur Erzeugung der Vielfalt von Hybridomantikörperspezifitäten wird dann mittels spezifischer Rekombination ermöglicht (Abbildung 6-1 und Abbildung 6-10).

Flankierung der variablen Domänen mit Rekombinationsstellen

Voraussetzung dafür ist, dass die Flankierung der aktiven Gene für die variable Domäne der schweren und leichten Kette mit Erkennungsstellen für spezifische Rekombinasen wie Cre oder FLP gelingt. Sie sollte ursprünglich erreicht werden, indem das in HEA125 aktive IGHV/D/J Gen mittels homologer Rekombination durch ein von loxP und loxP511 Stellen flankiertes NPTII Gen ersetzt wird (Abschnitt 6.1.3). Das Enzym NPTII inaktiviert Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung. Auf diese

Weise konnten mehrfach Zellen erzeugt werden, die G418 resistent waren und keinen Antikörper mehr produzierten. In PCRs brachten sie Signale für die nach homologer Rekombination im Genom entstandenen Übergänge zwischen Maus/Mensch und Mensch/Maus DNA Sequenzen, die zumindest für den 3' Übergang auch durch Sequenzierung verifiziert werden konnten (Abbildung 6-5). Diese Signale wurden an darauf folgenden Tagen aber immer schwächer bzw. verschwanden ganz. Nach dem Hochwachsen der Einzelzellklone waren sie nie nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass die gewünschte homologe Rekombination zwar stattgefunden hat, aber das Produkt nicht stabil war. Die starke NPTII Expression unter der Kontrolle des endogenen Immunglobulinpromotors scheint für die Hybridomzellen nachteilig zu sein. Entweder die Zellen mit dem NPTII Gen im richtigen Zielgenort haben durch die Produktion des vielen NPTII einen enormen Wachstumsnachteil gegenüber solchen, in denen das Gen hinter schwächeren Promotoren integriert ist, oder die abnorm hohe NPTII Expression wirkt toxisch. Hybridomzellen produzieren normalerweise zwar sehr, sehr viele Antikörpermoleküle, diese werden aber ins umgebende Medium sezerniert bzw. auf der Zelloberfläche präsentiert. Möglicherweise „ersticken“ die Zellen geradezu an den gleichen Mengen eines anderen Proteins, zumal wenn es intrazellulär produziert wird. Als Folge würden die Zellen nach der Transfektion vielleicht eine Weile überleben und dann absterben. Nach dieser Beobachtung haben wir die Strategie zu Einführung der homologen Rekombinationsstellen geändert. Anstelle eines Resistenzgens soll eine veränderte variable Domäne des Antikörpers mit den Rekombinationsstellen flankiert und direkt und ohne Resistenzmarker selektioniert werden. Zu diesem Zweck wurde das Konstrukt pVH-loxP-Myc erzeugt. In diesem ist in der CDR3 der aktiven variablen Domäne das c-Myc Epitop exprimiert. Dies ist ein kleines Epitop aus 10 Aminosäuren [Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu]. Es wurde die CDR3 kloniert, wodurch es an der Oberfläche des Antikörpermoleküls von außen erkennbar exprimiert werden sollte. Außerdem ist anzunehmen, dass das eingeführte Epitop in der CDR3 die richtige Faltung des Immunglobulinmoleküls nicht stört (Abschnitt 3.1.1). Bisher ist es nicht gelungen, die Zielzellen anschließend ohne Vorselektion im FACS zu isolieren. Dies könnte an dem unerklärlich hohen Aufkommen an Zellen liegen, die durch den anti Myc Antikörper 9E10 gefärbt werden. Diese Färbung tritt auch bei den nicht transfizierten Zellen auf und ist daher nicht spezifisch für homologe Rekombination (Abbildung 6-7). Deshalb wird jetzt für die Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen nach anderen kleinen Epitopen (wie z.B. 6xHis oder FLAG) gesucht, deren Nachweisantikörper keine Färbung der Hybridomzellen erzeugen. Problematisch ist, dass es für die zu selektierenden Ereignisse mit allen diesen Epitopen keine Positivkontrolle gibt. Da die CDR3 aber bei allen bekannten Antikörpern eine schön zugängliche Schleife formt und das

c-Myc und FLAG Epitop schon in unzähligen Konstrukten erfolgreich als lineare Epitop-Flaggen verwendet wurden, sollte der Nachweis der veränderten Antikörper über die Epitope auch hier möglich sein.

Sollten nach der Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen mit anderen Epitopen auch keine veränderten Antikörper isoliert werden können, stören möglicherweise die Rekombinationsstellen in ihrem genomischen Zielgenort. Dieses Risiko wurde weitgehend minimiert, indem anhand von Sequenzvergleichen die stark homologen, evolutionär konservierten Bereiche identifiziert und wenig konservierte Bereiche für die Lage der loxP und loxP511 Stellen ausgewählt wurden (Abschnitt 6.1.1). Zugunsten der Frequenz des Kassettenaustausches wurde dabei der Abstand zwischen den loxP Stellen möglichst gering gehalten. Falls nötig könnte die Lage der Rekombinationsstellen im Genom aber noch weiter von den konservierten und kodierenden IGHV/D/J Sequenzbereichen weg verschoben werden.

Einführung der Vielfalt mittels spezifischer Rekombination

Die Erzeugung der Vielfalt an Hybridomantikörperspezifitäten wird wahrscheinlich der kritischste Punkt bei der Erzeugung der humanen Hybridomantikörperbibliothek sein. Durch spezifische Rekombination sollen die PCR amplifizierten schweren und leichten Ketten im Genom der Hybridomzellen zufällig kombiniert werden. Allein die Kombination der 10530 in den PCRs synthetisierten V_H Gene mit den 200 V_K bzw. 120 V_λ leichte Kette Genen erzeugt eine Vielfalt von $3,4 \cdot 10^6$ verschiedenen Antikörperspezifitäten. In Wirklichkeit wird aber eine um ein Vielfaches größere Komplexität erzeugt werden. Bei jeder der beschriebenen PCRs (Abschnitt 6.2.2) werden neben Produkten mit korrekten V/D/J bzw. V/J Übergängen auch solche Matrizen abgeschrieben, in denen bei der Umlagerung zwischen den Gensegmenten während der somatischen Rekombination unterschiedlich viele Nukleotide eingefügt oder entfernt worden sind. Auch das Spektrum somatisch hypermutierter peripherer B-Lymphozyten steht als DNA Matrize zur Verfügung. Das komplette Antikörperrepertoire im menschlichen Organismus umfasst schätzungsweise 10^8 verschiedene Antikörpermoleküle, wenn nicht mehr. Zusätzliche Vielfalt kann eingeführt werden, indem bei der Durchführung der PCRs die Mutationsrate gezielt erhöht wird, z.B. durch error-prone PCR (Gram *et al.* 1992), oder indem sogar komplett synthetische Gene mit zufälligen CDRs erzeugt werden.

Die Bereitstellung der Gene für variable Domänen zur Erzeugung der Vielfalt der humanen Hybridombibliothek sollte also möglich sein. Die wirklich erreichbare Komplexität der Bibliothek ist dann aber dadurch limitiert, wie effizient diese genetische Vielfalt in den aktiven Genlokus der Hu-HEA125 Ausgangszelllinie eingebracht werden kann. Dies ist abhängig von zwei Faktoren. Der erste ist die Effizienz, mit der die

Donorplasmide für den Kassettenaustausch in die Akzeptorzellen transfiziert werden können. Die Transfektionseffizienz für HEA125 wurde bereits für die homologe Rekombination bestimmt (siehe Abschnitt 4.5.2), die Rate beträgt 30 bis 40% aller Zellen, welche die Transfektion überlebt haben. Der zweite, und weil es sich hier um viel größere Dimensionen handelt bedeutendere Faktor, ist die Frequenz des Kassettenaustausches. Zu Beginn dieser Arbeit wurden vor allem zwei ortspezifische Rekombinasen verwendet, um Veränderungen in das Mausgenom durch Kassettenaustausch einzuführen (siehe 4.3.4), Cre vom P1 Phagen (Lakso *et al.* 1992, Orban *et al.* 1992) und Flp aus Hefe (Dymeck 1996, Rodriguez *et al.* 2000). Mittlerweile hat sich aber mit der Integrase vom Phagen ϕ C31 eine für unsere Zwecke sehr interessante Alternative ergeben, die in Mauszellen einen vergleichsweise sehr effizienten Kassettenaustausch vermitteln kann (Belteki *et al.* 2003). Durch ϕ C31 vermittelte Rekombination zwischen zwei heterospezifischen Rekombinationsstellen (*attB* und *attP*) entstehen nämlich zwei von den Ausgangsstellen verschiedene Stellen (*attL* und *attR*), die von der Integrase nicht mehr als Substrate erkannt werden (Thorpe *et al.* 2000). Dadurch ist der Kassettenaustausch in diesem System irreversibel, was den Vorteil gegenüber dem Cre/loxP und dem Flp/FRT System hat, dass erfolgreich rekombinierte DNA nicht wieder zurückrekombinieren kann. Beim Cre/loxP und dem Flp/FRT System bleiben beim Austausch die Erkennungsstellen in voller Funktionalität erhalten. Hieraus ergibt sich die verbesserte Rekombinationsfrequenz mit der ϕ C31 Integrase. Gleichzeitig hat die Irreversibilität dieses Systems den Nachteil, dass nach dem Austausch der variablen Domänen zur Erzeugung der Vielfalt ein erneuter Austausch derselben Domäne nicht mehr möglich ist. Dies wäre nach der *ex vivo* Mutagenese (synthetisch nachempfundene somatische Hypermutation) zur Erhöhung der Antikörperaffinität erforderlich (Abschnitt 7.6.3). Gelingt es aber, die somatische Hypermutation in den Hybridomzellen zu aktivieren, müssten die variablen Domänen nach Erzeugung der Vielfalt nicht mehr *ex vivo* verändert und dann rückeingeführt werden. Somit böte sich der Kassettenaustausch mittels der ϕ C31 Integrase als das effizientere System an.

Zuerst würde dann mittels Cre/loxP die mit 320 Genkombinationen vergleichsweise kleine Vielfalt der leichten Kette generiert. Cre/loxP oder Flp/FRT sollten zur Erzeugung der Vielfalt in der leichten Kette ausreichen. Sie bieten zusätzlich noch die Möglichkeit zum späteren „light-chain-shuffling“. Hierbei wird die Affinität aller möglichen rekombinierten leichten Ketten in Kombination mit einer gegebenen schweren Kette getestet und Antikörper mit gesteigerter Affinität selektiert.

Die effektivere Rekombinase ϕ C31 würde dann anschließend für die Erzeugung der Vielfalt der schweren Kette eingesetzt, denn die 390 PCR's am IGHV Locus erzeugen

schon bei alleiniger Berücksichtigung der kombinatorischen Vielfalt ca. 11000 verschiedene Produkte. Um diese in den Hu-HEA125 variablen Genlokus zu rekombinieren sind mehr erfolgreiche Rekombinationsereignisse nötig, als für die leichte Kette.

Mit allen drei möglichen Rekombinasen (Cre, Flp, ϕ C31) wird die Effizienz des Kassettenaustausches letztlich maßgeblich davon abhängen, wie effizient sie in die Zellen eingeschleust werden können. Expressionsplasmide haben den Nachteil, dass sie zusammen mit der Ziel-DNA in die Zellen eingeschleust werden müssen. Da die Menge der in einem Transfektionsansatz einsetzbaren DNA limitiert ist (siehe Abschnitt 5.3), bedeutet dies eine Verringerung der Menge an einsetzbaren Kassettenaustauschplasmiden. Außerdem dauert es einige Zeit, bis nach der Transfektion die Rekombinasen in den Zielzellen exprimiert worden sind und es ist ungewiss, was bis dahin mit der DNA geschieht. Eine alternative Methode zur Transfektion mit Expressionsplasmiden ist das direkte Einschleusen der Enzyme in Proteinform in die Zielzellen. K. Tauber (2004) hat in unserer Abteilung gezeigt, dass Cre-Protein, gekoppelt an die Translokalisationsdomäne „tat“ von HIV, sehr effizient in eukaryontische Zellen eingeschleust wird. Nahezu 100% der Zielzellen (CV1-5B, Nierenfibroblasten, Meerkatze) werden transfiziert, was durch Rekombinaseaktivität in den Zielzellen nachgewiesen wird, die ein Reportergen aktiviert. Mit dieser Methode kann wahrscheinlich verglichen mit Elektroporation auch ein viel gleichmäßigerer Level an Cre in den verschiedenen Zellen aufgebaut werden, da die Aufnahme von Cre Protein pro Zelle nur von der Cre Konzentration, der Membranoberfläche und der Temperatur abhängen sollte, was allerdings noch zu zeigen ist. Wenn das stimmt, ließe sich mit dem direkt eingeschleusten Cre Protein besser die für den Kassettenaustausch optimale Cre Menge einstellen. Eine weitere Möglichkeit, die oben genannten Probleme transienter Rekombinase Expression zu umgehen, ist die Erzeugung einer Hu-HEA125 Linie, die stabil die Rekombinase unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Hierfür bietet sich z.B. das Tet-System von Gossen und Bujard (1992 und Gossen *et al.* 1995) an, mit dem doxycyclinabhängig die Expression eines Gens sehr spezifisch angeschaltet werden und dann ein hohes Expressionsniveau des Zielgens erzeugt werden kann.

Auswahl der Matrizen DNA zur PCR-Amplifikation einer möglichst großen Vielfalt

Diversität und Naivität waren bisher die wünschenswertesten Qualitäten von Antikörperbibliotheken, die der Erzeugung humaner Antikörper dienen. Mit dem steigenden Bedarf an therapeutischen Antikörpern erhöht sich auch der Bedarf an Bibliotheken, mit einem hohen Anteil anti Selbst spezifischer Antikörper. Raum *et al.* (2001) be-

schreiben aus dem Grund die Auswahl des natürlich exprimierten IgD VH-Repertoires, aus dem stark immunogene Idiotypen eliminiert sein sollten, als Ausgangspunkt für eine Phagendisplay Bibliothek. Dieses Repertoire wird ausschließlich auf der Oberfläche reifer $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ B-Lymphozyten und $\text{IgM}^- \text{IgD}^+$ B-Zellen exprimiert. Die Mehrheit der $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ B-Lymphozyten ist noch ungeprimt (Klein *et al.* 1989, Maurer *et al.* 1992), was den Vorteil hat, dass nicht die DNAs weniger, stark proliferierter B-Lymphozyten den Pool der PCR-Matrizen dominieren. $\text{IgM}^- \text{IgD}^+$ B-Zellen sind im Organismus persistierende selbst-reaktive B-Zellen, die durch Selbst Antigen anergisch gemacht werden (Nossal und Pike 1980, Goodnow *et al.* 1989).

7.6.2 Effektive Selektion des richtigen Gens aus der Vielfalt.

Durch spezifische Rekombination der PCR-amplifizierten variablen Antikörperdomänen in den aktiven Genlocus von Hu-HEA125 soll eine große Vielfalt verschiedener Antikörperspezifitäten entstehen. Das Immunsystem bedient sich der klonalen Selektion, um aus dieser Vielfalt brauchbare Antikörper gegen bestimmte Antigene in großen Mengen zur Verfügung stellen zu können. Es stimuliert spezifisch bindende B-Zellen über das IgM, das sie auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dieses Prinzip lässt

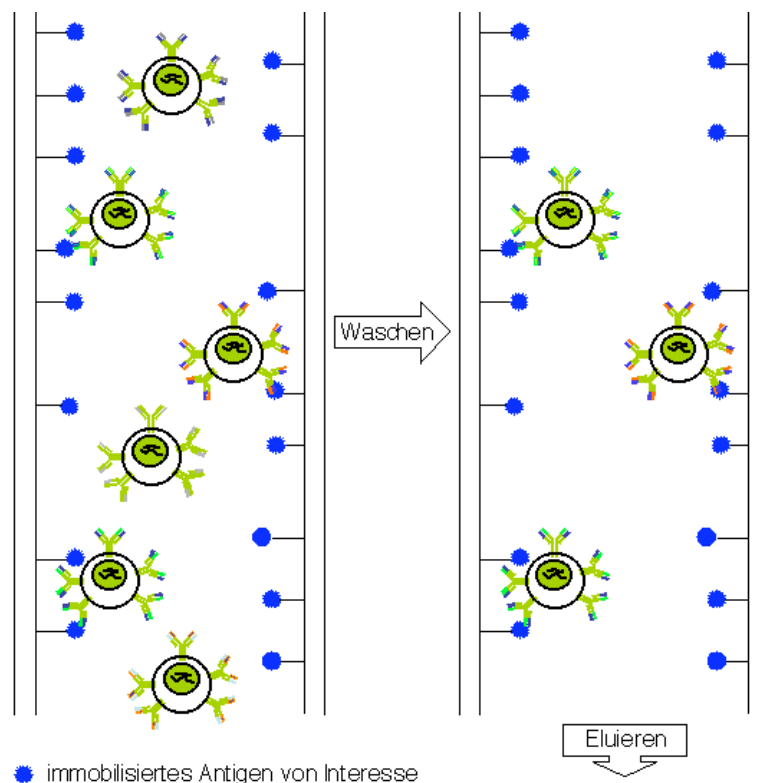


Abbildung 7-2: Selektion von spezifischen Antikörpern aus der humanen Hybridomzellbibliothek. Die Antikörper einer gesuchten Spezifität, exprimiert auf der Oberfläche der sie produzierenden Hybridomzelle, binden an immobilisiertes Antigen. Waschen entfernt ungebundenen Hybridomzellen. Zellen, die verschiedene Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen produzieren, können eluiert und kloniert werden.

sich deshalb auf die humane Hybridomantikörperbibliothek übertragen, weil auch die Hybridomzellen einen Teil der von ihnen produzierten Antikörper auf der Oberfläche exprimieren (siehe Abbildung 5-2). Gefragte Antigenspezifitäten können durch Bindung an Antigen aus der Gesamtpopulation an Hybridomzellen gereinigt werden (Abbildung 7-2). Auf diese Weise isolierte Zellen exprimieren Antikörper mit verschiedener Affinität zu ihrem Antigen. Hochaffine Hybridomzellen können im FACS durch einen Online-Affinitätsvergleich identifiziert und isoliert werden. Hierfür werden die Zellen durch Bindung an fluoreszmarkiertes Antigen gefärbt und die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen durch einen zweiten, anders fluoreszierenden anti human IgG1 Antikörper oder Protein G gegen die Zahl der oberflächenpräsentierten Antikörper normalisiert (Abbildung 7-3). Hochaffine Antikörper exprimierende Zellen sollten im Verhältnis zur Anzahl der von ihnen präsentierten Antikörper intensiver leuchten, als gering affine.

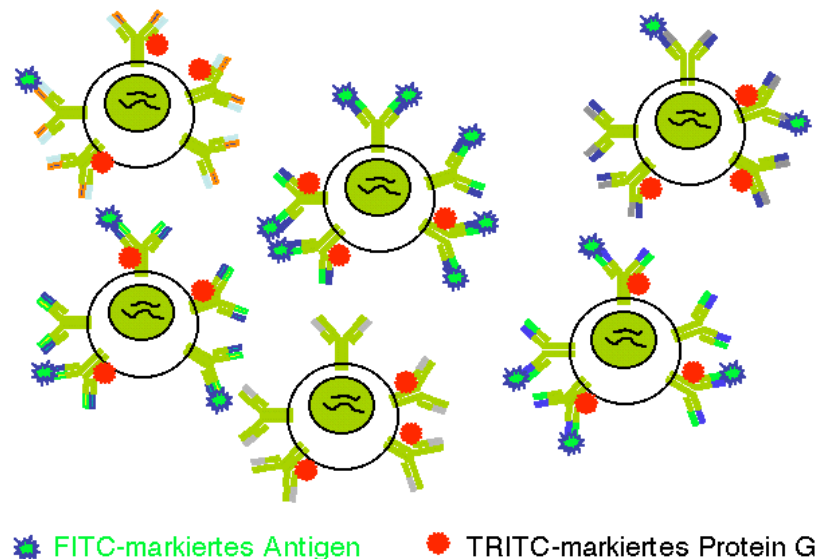


Abbildung 7-3: Online-Affinitätsvergleich von Hybridomzellen im FACS. Hybridomzellen, die besonders hoch affine Antikörper exprimieren, leuchten nach Doppelfärbung im Verhältnis zur Anzahl der von ihnen präsentierten Antikörper intensiver, als gering affine.

7.6.3 Verbesserung der Affinität und Spezifität eines selektierten Antikörperfragmentes

Die frühen Ereignisse einer Immunantwort führen dazu, dass spezifische Antikörper überhaupt erst einmal gebildet werden. In einer späteren Phase der Immunantwort entstehen dann affinere Antikörper, die bei erneutem Antigenkontakt eine effektivere Immunantwort erzeugen. Die Bildung hoch affiner Antikörper geschieht in den Keimzentren durch somatische Hypermutation der variablen B-Zell Gene. Dabei entstehen sehr viele mutierte B-Zellen, aus denen solche ausgewählt werden, die höher affine Antikörper präsentieren. Somit sollten ganz analog auch mit dem von uns geplanten experimentellen System, durch wiederholte Zyklen von Mutagenese der variablen

Domänen und Affinitätsvergleich der resultierenden Hybridomantikörper, höher affine Antikörper herstellbar sein (siehe Abbildung 7-3). Die Mutagenese der variablen Domänen muss nach dem derzeitigen Stand der Technik noch außerhalb der Hybridomzellen geschehen. D.h. die aktiven variablen Domänen der Hybridomzellen werden per PCR abgeschrieben. *In vitro* können sie dann verändert werden, entweder durch zufällige Mutagenese, z. B. mittels PCRs in denen die Mutationsrate gezielt erhöht wird (error-prone-PCR, Gram *et al.* 1992), oder durch gezielte Mutagenese nach Computer gestütztem Moleküldesign. Die veränderten variablen Domänen müssen dann mittels spezifischer Rekombination wieder in die Hybridomzelle eingeführt werden.

Viel einfacher wäre die Mutagenese der variablen Domänen, wenn man sich den in den Hybridomzellen vorhandenen endogenen somatischen Hypermutationsapparat zunutze machen könnte. In BL2 Zellen ist es schon möglich, in der Zellkultur durch Co-Kultur mit aktivierten Helfer T-Zellen und Zugabe von IgM einen 5-10 fachen Anstieg der Mutationen in der variablen Domäne aber nicht in der konstanten Region zu induzieren (Denepoux *et al.* 1997, Poltoratsky *et al.* 2001, Woo *et al.* 2003).

7.7 Vergleich der humanen Hybridomantikörperbibliothek mit anderen Systemen

Die erreichbare Komplexität der hier beschriebenen Bibliothek wird maßgeblich davon abhängen, wie effektiv der Kassettenaustausch der variablen Antikörperdomänen funktioniert (siehe Abschnitt 7.6.1). Im Prinzip sollten sich aber hoch affine humane Antikörper herstellen lassen. Unser Ansatz hat den großen Vorteil, dass die Antikörperproduktion komplett in der Hybridomzelle belassen wird. Interessante Antikörperspezifitäten können gegenüber Phagenantikörpern viel schneller und effizienter produziert werden, denn die einfach kultivierbaren Hybridomzellen sind wahre Antikörperfabriken, die darauf spezialisiert sind, funktionelle Antikörper in großen Mengen herzustellen. Die Produktion von Antikörpern, die aus Phagenbibliotheken isoliert wurden, scheitert oft am Finden des richtigen Produktionssystems. Die Antikörper können in eukaryontischen Zellen nach zeitaufwendiger Klonierung und Suche nach dem geeignetsten System trotzdem meist nur in geringer Ausbeute produziert werden, in Bakterien können nur Antikörperfragmente und keine kompletten funktionellen Antikörper produziert werden. Unser System stellt auch für die aus Phagenbibliotheken isolierten Antikörperspezifitäten ein universelles Expressionssystem kompletter Antikörper dar. Antikörperfragmente haben neben dem Fehlen des Fc Teils, der für die Aktivierung von Effektorfunktionen verantwortlich ist, verglichen mit kompletten eine wesentlich geringere Stabilität im Organismus. Hinzu kommt, dass bakteriell exprimierten Antikörpern die Glycosylierung fehlt. Ein Nachteil

der hier beschriebenen Bibliothek ist, dass die Hybridomzellen murinen Ursprungs sind, wodurch sich ihre Glycosylierung von der humaner Antikörper immer unterscheidet. Mangels Alternativen fällt dieser Punkt aber nicht ins Gewicht, zumal Antikörper chimärisierter Hybridomzellen oder mittels Mäusen mit humanen Antikörpergenen hergestellte Hybridomantikörper bereits erfolgreich in der Therapie eingesetzt werden (Abschnitt 3.4). Sollte irgendwann ein Fusionspartner gefunden werden, mit dem sich stabile humane Hybridomzelllinien herstellen lassen, kann das ganze System in diese übertragen werden. Mäuse mit humanen Antikörpergenen und humanisierte Hybridomzellen sind bisher die einzige Möglichkeit, chimäre bzw. humane Antikörper in größeren Mengen her zu stellen. Gegenüber diesen beiden Methoden ist von der hier beschriebenen zu erwarten, dass Antikörper aus der Bibliothek direkt isoliert werden können, ohne dass die Immunisierung einer Maus vorausgehen muss und fusionierte Zellen erst auf Antikörperproduktion und Stabilität durchsucht werden müssen. Die wegfallende Immunisierung bringt einen weiteren Vorteil mit sich. Aus Antikörperbibliotheken können nämlich auch Antikörper gegen sehr toxische Antigene oder gegen Selbstantigene isoliert werden, mit denen eine Immunisierung nicht möglich wäre.

Die Hybridomzelllinie Hu-HEA125 wird vollständige, chimäre IgG1 Antikörper mit humanen konstanten Domänen produzieren. In Experimenten bei denen verschiedene Antikörper benutzt wurden, die für dasselbe Antigen spezifisch waren, zeigte sich, dass die zytotoxische Potenz von der Antikörperklasse und Subklasse abhing (Dyer *et al.* 1989). IgG1 und IgG3 haben gegenüber anderen Isotypen oder gar Antikörperfragmenten den Vorteil, dass sie in der Lage sind, effektiv CDC und ADCC zu aktivieren (siehe Abschnitt 3.4). Es wurde gezeigt, dass ADCC bei der Bekämpfung von Tumorzellen eine der wichtigsten Effektorfunktionen ist (Clynes *et al.* 2000) und IgG1 Antikörper diese am Besten vermitteln (Boulianne *et al.* 1984, Morrison *et al.* 1984, Riechmann *et al.* 1988, Hale *et al.* 1988, Clark 1997). Daher wollen wir einen chimärisierten IgG1 Antikörper herstellen. Zukünftig sollte es mit der in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Methode der homologen Rekombination ohne Resistenzgen aber auch relativ einfach möglich sein, ein IgG1 produzierendes Hybridom in eines umzuwandeln, das einen anderen Isotyp wie z.B. IgA produziert. IgA aktiviert zusätzlich zu IgG auch effektorzellvermittelte Lyse von Lymphomzellen und soliden Tumoren (Valerius *et al.* 1997, Huls *et al.* 1999). IgA bindet dazu an CD89 (Fc α RI), der Phagozytose, Cytokinausschüttung, Antigenpräsentation und ADCC vermittelt (van Egmond *et al.* 2001).

Weil die Antikörpervielfalt dieser Bibliothek im Original-Antikörpergenlocus der Hybridomzellen erzeugt wird, kann verglichen mit allen anderen Systemen eine sehr einfache Affinitätsverbesserung der Antikörper vorgenommen werden. Voraussetzung dafür ist, dass es möglich wird, Hybridomzellen in Zellkultur dazu zu bringen, ihren somatischen Hypermutationsapparat anzuschalten. Die Gene der aktiven variablen Domänen interessanter Antikörper müssten dann nicht erst aus der Zelle isoliert, mutiert und dann wieder in den richtigen Genlocus hineingeschleust werden, sondern sie könnten direkt vor Ort mutiert und Zellen mit verbesserter Affinität im Online-Vergleich identifiziert und isoliert werden.

7.8 Ausblick

Mit der chimärisierten leichten Kette zeigt diese Arbeit, dass die Humanisierung muriner Hybridomantikörper direkt in der Hybridomzelle ohne die Miteinführung von Resistenzgenen möglich ist. Damit sollte analog auch die homologe Rekombination zur Chimärisierung der schweren Kette des Hu-HEA125 Antikörpers möglich sein, der danach hinsichtlich seiner Wirksamkeit in der Behandlung epithelialer Tumore evaluiert werden kann. Über dieses konkrete Beispiel hinaus, sollten mit unserem Ansatz aber auch andere interessante Maushybridome vergleichsweise einfach verändert werden können. Mit einer Schar von wenigen DNA-Konstrukten können Mausantikörper durch homologe Rekombination chimärisiert, in ihrem Subtyp verändert oder gar mit neuen Funktionen versehen werden, z.B. zu bispezifischen oder bifunktionellen Antikörpern.

Ein weiteres Ziel wird die Herstellung einer humanen Antikörperbibliothek sein, wobei derzeit die größte Unsicherheit in der erreichbaren Effizienz des Kassettenaustausches der aktiven IGHV und IGKV Gene der variablen Antikörperdomänen liegt. Von der erreichbaren Komplexität der Hybridomantikörperbibliothek hängt später ab, mit welcher Wahrscheinlichkeit in einer ersten Selektionsrunde antigenspezifische Antikörper aus der Bibliothek isoliert werden können, die dann in nachgeschalteten Mutagenese- und Selektionszyklen in ihrer Affinität verbessert werden müssen. Dabei streben wir eine Bibliothek von $1 \cdot 10^6$ oder mehr verschiedenen Antikörperspezifitäten an, aus der sehr schnell und effizient humane Antikörper nahezu beliebiger Spezifität isolierbar sein sollten. Dies käme sehr dem großen, immer weiter wachsenden Bedarf an monoklonalen Antikörpern in Forschung, Diagnostik und Therapie entgegen. Als Beispiel sei hier das humane Genomprojekt genannt, im Zuge dessen das komplette menschliche Genom durchsequenziert wurde. Die Charakterisierung der zahllosen, nach und nach identifizierten Gene würde durch schnelles Bereitstellen spezifischer Antikörper ganz erheblich erleichtert werden.

8 Literaturverzeichnis

- Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM. (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.*;61(12):4750-5.
- Alt FW, Baltimore D. (1982) Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;79(13):4118-22
- Anand S, Batista FD, Tkach T, Efremov DG, Burrone OR (1997). Multiple transcripts of the murine immunoglobulin epsilon membrane locus are generated by alternative splicing and differential usage of two polyadenylation sites. *Mol Immunol.*;34:175-83.
- Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. (1999) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med.*;77(10):699-712. Review.
- Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;88(18):7978-82.
- Barbas CF 3rd, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89(10):4457-61.
- Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens - new tools for genetic analysis. *Cell.*;14(1):9-20.
- Baum C, Forster P, Hegewisch-Becker S, Harbers K. (1994) An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques.*;17(6):1058-62.
- Belteki G, Gertsenstein M, Ow DW, Nagy A. (2003) Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase. *Nat Biotechnol.*; 21(3):321-4.
- Bensmana M, Lefranc MP (1990). Gene segments encoding membrane domains of the human immunoglobulin gamma 3 and alpha chains. *Immunogenetics*, 32:321-30.
- Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science.*;240(4855):1041-3.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science.*; 242(4877):423-6. Erratum in: *Science* (1989);244(4903):409.
- Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD. (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 97(20):10701-5.
- Borrebaeck CAK (1992) *Antibody Engineering – A Practical Guide*. W. H. Freeman, San Francisco
- Boss MA, Kenten JH, Wood CR, Emtage JS. (1984) Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*;12(9):3791-806.
- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature.*;312(5995):643-6.
- Brack C, Hiram M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. (1978) A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell.*;15(1):1-14.

- Branda CS, Dymecki SM. (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell.*;6(1):7-28. Review.
- Chen CA, Okayama H. (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques.*;6(7):632-8.
- Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. (1991) A surface expression vector for antibody screening. *Gene.*;104(2):147-53.
- Breitling F, Moldenhauer G, Lüttgau S, Kühlwein T und Poustka A. (2001) Verfahren zur Herstellung von Protein-Bibliotheken und zur Selektion von Proteinen daraus. Patent applications EP1298207A1, WO2003029458A2.
- Breitling F und Dübel S (1997) *Rekombinante Antikörper*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.
- Cabilly S, Riggs AD, Pande H, Shively JE, Holmes WE, Rey M, Perry LJ, Wetzel R, Heyneker HL. (1984) Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;81(11):3273-7.
- Carter P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.*;1(2):118-29. Review.
- Chiswell DJ, McCafferty J. (1992) Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.*;10(3):80-4. Review.
- Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR, *et al.* (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature.*;342(6252):877-83. Review.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.*;352(6336):624-8.
- Clark M. (2000) Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? *Immunol Today.*;21(8):397-402. Review.
- Clark MR. (1997) IgG effector mechanisms. *Chem Immunol.*;65:88-110. Review.
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*;24(18):3546-51.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.*;6(4):443-6.
- Coffman RL, Leberman DA, Rothman P. (1993) Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol.*;54:229-70. Review.
- Cogne M, Lansford R, Bottaro A, Zhang J, Gorman J, Young F, Cheng HL, Alt FW. (1994) A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell.*;77(5):737-47.
- Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Ratcliff R, Jiang C, Cheng SH, MacVinish LJ, Anderson JR, Cuthbert AW, Evans MJ (1995). Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nat Genet*, 10:445-52.
- Cox JP, Tomlinson IM, Winter G. (1994) A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage. *Eur J Immunol.*;24(4):827-36.
- Daugherty PS, Iverson BL, Georgiou G. (2000) Flow cytometric screening of cell-based libraries. *J Immunol Methods.*;243(1-2):211-27. Review.

- Daumler R, Zimmermann U. (1989) High yields of stable transformants by hypo-osmolar plasmid electroinjection. *J Immunol Methods.*;122(2):203-10.
- Davis CG. (1990) The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol.*;2(5):410-9. Review.
- Denepoux S, Razanajaona D, Blanchard D, Meffre G, Capra JD, Banchereau J, Lebecque S. (1997) Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity.*;6(1):35-46.
- Deng SJ, MacKenzie CR, Sadowska J, Michniewicz J, Young NM, Bundle DR, Narang SA. (1994) Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J Biol Chem.*;269(13):9533-8.
- Duenas M, Ayala M, Vazquez J, Ohlin M, Soderlind E, Borrebaeck CA, Gavilondo JV. (1995) A point mutation in a murine immunoglobulin V-region strongly influences the antibody yield in *Escherichia coli*. *Gene.*;158(1):61-6.
- Dyer MJ, Hale G, Hayhoe FG, Waldmann H. (1989) Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood.*;73(6):1431-9.
- Dymecki SM. (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;93(12):6191-6.
- Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. (1980) An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell.*;19(4):981-92.
- Edmundson AB, Ely K, Abola EE, Schiffer M, Panagiotopoulos N. (1975) Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains. *Biochemistry* 14, 3953-3961.
- Edwards PA. (1985) Heterogeneous expression of cell-surface antigens in normal epithelia and their tumours, revealed by monoclonal antibodies. *Br J Cancer.*;51(2):149-60. Review.
- Esser C, Radbruch A. (1990) Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu Rev Immunol.*;8:717-35. Review.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G. and Bishop, M.: (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610-3616
- Ezzell C. (2001) Magic bullets fly again. *Sci Am.*;285(4):34-41.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.*;84(21):7413-7.
- Fell HP, Yarnold S, Hellström I, Hellström KE, Folger KR (1989). Homologous recombination in hybridoma cells: heavy chain chimeric antibody produced by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:8507-11.
- Ferrajoli A, O'Brien S, Keating MJ. (2001) Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody. *Expert Opin Biol Ther.*;1(6):1059-65. Review.
- Finger S, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Kuehn MR, Dunnett SB. (1988) Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *J Neurol Sci.*;86(2-3):203-13.
- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF Jr, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE. (1990) Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol.*;8:303-33. Review.

- Fogler WE, Sun LK, Klinger MR, Ghrayeb J, Daddona PE. (1989) Biological characterization of a chimeric mouse-human IgM antibody directed against the 17-1A antigen. *Cancer Immunol Immunother.*;30(1):43-50.
- Folkman J, Browder T, Palmblad J. (2001) Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost.*;86(1):23-33. Review.
- Francisco JA, Campbell R, Iverson BL, Georgiou G. (1993) Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;90(22):10444-8.
- Frodin JE, Lefvert AK, Mellstedt H. (1992) The clinical significance of HAMA in patients treated with mouse monoclonal antibodies. *Cell Biophys.*;21(1-3):153-65.
- Fuchs P, Weichel W, Dubel S, Breitling F, Little M. (1996) Separation of *E. coli* expressing functional cell-wall bound antibody fragments by FACS. *Immunotechnology.*;2(2):97-102.
- Galfre G, Milstein C. (1981) Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.*;73(Pt B):3-46.
- Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dunser M, Mikuz G. (2000) Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet.*;356(9246):1981-2.
- Geha RS, Rosen FS. (1994) The genetic basis of immunoglobulin-class switching. *N Engl J Med.*;330(14):1008-9.
- Glennie MJ, Johnson PW. (2000) Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today.*;21(8):403-10. Review.
- Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Pluckthun A. (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry.*;29(6):1362-7.
- Goel A, Baranowska-Kortylewicz J, Hinrichs SH, Wisecarver J, Pavlinkova G, Augustine S, Colcher D, Booth BJ, Batra SK. (2001) 99mTc-labeled divalent and tetravalent CC49 single-chain Fv's: novel imaging agents for rapid in vivo localization of human colon carcinoma. *J Nucl Med.*;42(10):1519-27.
- Goding JW (1996). *Monoclonal Antibodies: principles and practice*. Third Edition, Academic Press, London
- Goldenberg DM. (2001) The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol.*;39(1-2):195-201. Review.
- Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A. (1989) Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature.*;342(6248):385-91.
- Gossen M, Bujard H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89(12):5547-51.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.*;268(5218):1766-9.
- Gram H, Marconi LA, Barbas CF 3rd, Collet TA, Lerner RA, Kang AS. (1992) In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89(8):3576-80.

- Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, *et al.* (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet.*;7(1):13-21.
- Green MC, Murray JL, Hortobagyi GN. (2000) Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat Rev.*;26(4):269-86. Review.
- Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, *et al.* (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.*;13(14):3245-60.
- Grillo-Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M, Benyunes M. Rituximab (2002) ongoing and future clinical development. *Semin Oncol.*;29(1 Suppl 2):105-12. Review.
- Hakimi J, Chizzonite R, Luke DR, Familletti PC, Bailon P, Kondas JA, Pilson RS, Lin P, Weber DV, Spence C, *et al.* (1991) Reduced immunogenicity and improved pharmacokinetics of humanized anti-Tac in cynomolgus monkeys. *J Immunol.*;147(4):1352-9.
- Hale G, Dyer MJ, Clark MR, Phillips JM, Marcus R, Riechmann L, Winter G, Waldmann H. (1988) Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet.*;2(8625):1394-9.
- Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A, Pluckthun A. (2000) Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol.*; 18(12):1287-92.
- Hasty P, Rivera-Perez J, Chang C, Bradley A. (1991) Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.*;11(9):4509-17.
- Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol.*;226(3):889-96.
- Hayashida H, Miyata T, Yamawaki-Kataoka Y, Honjo T, Wels J, Blattner F. (1984) Concerted evolution of the mouse immunoglobulin gamma chain genes. *EMBO J.*;3(9):2047-53.
- He Y, Honnen WJ, Krachmarov CP, Burkhart M, Kayman SC, Corvalan J, Pinter A. (2002) Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *J Immunol.*;169(1):595-605.
- Herbst RS, Langer CJ. (2002) Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol.*;29(1 Suppl 4):27-36. Review.
- Herlyn D, Sears HF, Ernst CS, Iliopoulos D, Steplewski Z, Koprowski H. (1991) Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma. *Am J Clin Oncol.*;14(5):371-8.
- Hermes JD, Parekh SM, Blacklow SC, Koster H, Knowles JR. (1989) A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers. *Gene.*;84(1):143-51.
- Hicklin DJ, Witte L, Zhu Z, Liao F, Wu Y, Li Y, Bohlen P. (2001) Monoclonal antibody strategies to block angiogenesis. *Drug Discov Today.*;6(10):517-528.
- High AS, Robinson PA, Klein CE. (1996) Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias. *J Oral Pathol Med.*;25(1):10-3.

- Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.*;19(15):4133-7.
- Hoogenboom HR, Chames P. 2000 Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today.*;21(8):371-8. Review.
- Horibata K, Harris AW. (1970) Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp Cell Res.*;60(1):61-77.
- Hortobagyi GN. (2001) Overview of treatment results with trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer. *Semin Oncol.*;28(6 Suppl 18):43-7. Review.
- Houghton AN, Mintzer D, Cordon-Cardo C, Welt S, Fliegel B, Vadhan S, Carswell E, Melamed MR, Oettgen HF, Old LJ. (1985) Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;82(4):1242-6.
- Huang Y, Nakada S, Ishiko T, Utsugisawa T, Datta R, Kharbanda S, Yoshida K, Talanian RV, Weichselbaum R, Kufe D, Yuan ZM. (1999) Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol Cell Biol.*;19(4):2986-97.
- Huie MA, Cheung MC, Muench MO, Becerril B, Kan YW, Marks JD. (2001) Antibodies to human fetal erythroid cells from a nonimmune phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;98(5):2682-7.
- Huls G, Heijnen IA, Cuomo E, van der Linden J, Boel E, van de Winkel JG, Logtenberg T. (1999) Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Res.*;59(22):5778-84.
- Huse WD, Yelton DE, Glaser SM. (1993) Increased antibody affinity and specificity by codon-based mutagenesis. *Int Rev Immunol.*;10(2-3):129-37. Review.
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, *et al.* (1988) 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 U S A.*;85(16):5879-83.
- Irving RA, Coia G, Roberts A, Nuttall SD, Hudson PJ. (2001) Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J Immunol Methods.*;248(1-2):31-45. Review.
- Ito W, Iba Y, Kurosawa Y. (1993) Effects of substitutions of closely related amino acids at the contact surface in an antigen-antibody complex on thermodynamic parameters. *J Biol Chem.*;268(22):16639-47.
- Jaffers GJ, Fuller TC, Cosimi AB, Russell PS, Winn HJ, Colvin RB. (1986) Monoclonal antibody therapy. Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intense immunosuppression. *Transplantation.*;41(5):572-8.
- Jakobovits A. (1995) Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol.*;6(5):561-6. Review.
- James K, Bell GT. (1987) Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. *J Immunol Methods.*;100(1-2):5-40. Review.
- James K. (1994) Human monoclonal antibody technology. In M. Rosemberg and G.P. Moore (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 113, The Pharmacology of Monoclonal ANtibodies, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Seite 3-22.

- Janeway, CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. (2002) Immunologie 5. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg
- Jerne NK. (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*.;125C(1-2):373-89.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*.;321(6069):522-5.
- Judde JG, Max EE. (1992) Characterization of the human immunoglobulin kappa gene 3' enhancer: functional importance of three motifs that demonstrate B-cell-specific in vivo footprints. *Mol Cell Biol*.;12(11):5206-16.
- Junghans RP, Waldmann TA, Landolfi NF, Avdalovic NM, Schneider WP, Queen C. (1990) Anti-Tac-H, a humanized antibody to the interleukin 2 receptor with new features for immunotherapy in malignant and immune disorders. *Cancer Res*.;50(5):1495-502.
- Kang AS, Barbas CF, Janda KD, Benkovic SJ, Lerner RA. (1991) Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 15;88(10):4363-6.
- Kang AS, Jones TM, Burton DR. (1991) Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;88(24):11120-3.
- Kang Y, Shulman MJ. (1991) Effects of vector cutting on its recombination with the chromosomal immunoglobulin gene in hybridoma cells. *Somat Cell Mol Genet*.;17(6):525-36.
- Kardinal C, Hooijberg E, Lang P, Zeidler R, Mocikat R (1995). Integration vectors for antibody chimerization by homologous recombination in hybridoma cells. *Eur J Immunol*, 25:792-7.
- Kaufman DL, Evans GA. (1990) Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques*.;9(3):304, 306. Erratum in: *Biotechniques*;9(6):720.
- Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol*.;123(4):1548-50.
- Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF. (1994) Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother*.;15(1):42-52. Review.
- Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. (1998) Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*.;188(9):1679-89.
- Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P, Hicklin D, Kerbel RS. (2002) Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res*.;8(1):221-32.
- Knappik A, Pluckthun A. (1995) Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng*.;8(1):81-9.
- Ko EC, Wang X, Ferrone S. (2003) Immunotherapy of malignant diseases. Challenges and strategies. *Int Arch Allergy Immunol*.;132(4):294-309. Review.
- Kohler G, Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. Aug 7;256(5517):495-7.

- Kohler G, Milstein C. (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol.*;6(7):511-9.
- Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A, Inge L, Knappik A, Marget M, Pack P, Meng XQ, Schier R, Sohlmann P, Winter J, Wolle J, Kretzschmar T. (2001) High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods*;254(1-2):67-84.
- Kufer P, Mack M, Gruber R, Lutterbuse R, Zettl F, Riethmuller G. (1997) Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.*;45(3-4):193-7.
- Kung P, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science.*;206(4416):347-9.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*;227(259):680-5.
- Lai E, Wilson RK, Hood LE. (1989) Physical maps of the mouse and human immunoglobulin-like loci. *Adv Immunol.*;46:1-59. Review.
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89(14):6232-6.
- Landau NR, St John TP, Weissman IL, Wolf SC, Silverstone AE, Baltimore D. (1984) Cloning of terminal transferase cDNA by antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;81(18):5836-40.
- Larrick JW, Danielsson L, Brenner CA, Abrahamson M, Fry KE, Borrebaeck CA. (1989) Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun.*;160(3):1250-6.
- Lefranc, MP and Lefranc, G (2001). *The Immunoglobulin FactsBook*, Academic Press, London, ISBN 0-12-441351-X.
- Lewis SM. (1994) P nucleotide insertions and the resolution of hairpin DNA structures in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;91(4):1332-6.
- Leyland-Jones B. (2002) Trastuzumab: hopes and realities. *Lancet Oncol.*;3(3):137-44. Review.
- Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD. (2004) The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev.*;18(1):1-11. Review.
- Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. (2000) Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today.*;21(8):364-70. Review.
- Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO. (1994) Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun.*;2(5):417-28.
- Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO. (1994) Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun.*;2(5):417-28.
- Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO. (1996) Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol.*;148(3):865-75.

- Liu AY, Robinson RR, Hellstrom KE, Murray ED Jr, Chang CP, Hellstrom I. (1987) Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;84(10):3439-43.
- Liu B, Huang L, Sihlbom C, Burlingame A, Marks JD. (2002) Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display. *J Mol Biol*.;315(5):1063-73.
- LoBuglio AF, Wheeler RH, Trang J, Haynes A, Rogers K, Harvey EB, Sun L, Ghayeb J, Khazaeli MB. (1989) Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;86(11):4220-4.
- LoBuglio AF, Saleh MN. (1992) Advances in monoclonal antibody therapy of cancer. *Am J Med Sci*.;304(3):214-24. Review.
- MacLennan IC. (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*.;12:117-39. Review.
- Manser T. (1990) The efficiency of antibody affinity maturation: can the rate of B-cell division be limiting? *Immunol Today*.;11(9):305-8. Review.
- Marks JD, Tristem M, Karpas A, Winter G. (1991) Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur J Immunol*.;21(4):985-91.
- Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. (1991) γ -passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. Dec 5;222(3):581-97.
- Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM, Winter G. (1992) By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y)*.;10(7):779-83.
- Martinez CY, Hollenbeck PJ. (2003) Transfection of primary central and peripheral nervous system neurons by electroporation. *Methods Cell Biol*.;71:339-51. PMID: 12884698 [PubMed - in process]
- Maurer D, Fischer GF, Fae I, Majdic O, Stuhlmeier K, Von Jeney N, Holter W, Knapp W. (1992) IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol*.;148(12):3700-5.
- Mayforth, RD (1993) *Designing Antibodies*. Academic Press, San Diego
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*.;348(6301):552-4.
- McLaughlin P, White CA, Grillo-Lopez AJ, Maloney DG. (1998) Clinical status and optimal use of rituximab for B-cell lymphomas. *Oncology (Huntingt)*.;12(12):1763-77. Review.
- Mellstedt H, Frodin JE, Masucci G, Ragnhammar P, Fagerberg J, Hjelm AL, Shetye J, Wersall P, Osterborg A. (1991) The therapeutic use of monoclonal antibodies in colorectal carcinoma. *Semin Oncol*. Oct;18(5):462-77. Review.
- Mellstedt H. (2003) Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc)*.;39 Suppl C:1-16. Review.
- Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A. (1997) Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet*.;15(2):146-56. Erratum in: *Nat Genet*;16(4):410.

- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet*, 18:136-41.
- Miller RA, Oseroff AR, Stratte PT, Levy R. (1983) Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma. *Blood*;62(5):988-95.
- Mocikat R, Kardinal C, Lang P, Zeidler R, Thierfelder S (1995). Unaltered immunoglobulin expression in hybridoma cells modified by targeting of the heavy chain locus with an integration vector. *Immunology*, 84:159-63.
- Mocikat R, Kardinal C, Selmayr M. (1997) Genetic stability of gene-targeted immunoglobulin loci. II. Influence of the cell line and the vector linearization site. *Mol Gen Genet*.;256(5):499-508.
- Moldenhauer G, Momburg F, Moller P, Schwartz R, Hammerling GJ. (1987) Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer*.;56(6):714-21.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;81(21):6851-5.
- Nadler LM, Stashenko P, Hardy R, Kaplan WD, Button LN, Kufe DW, Antman KH, Schlossman SF. (1980) Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res*.;40(9):3147-54.
- Nagy ZA, Hubner B, Lohning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. (2002) Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med*.;8(8):801-7..
- Naundorf S, Preithner S, Mayer P, Lippold S, Wolf A, Hanakam F, Fichtner I, Kufer P, Raum T, Riethmuller G, Baeuerle PA, Dreier T. (2002) In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment. *Int J Cancer*.;100(1):101-10.
- Nickoloff JA. (1992) Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol*.;12(12):5311-8.
- Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G. (1994) Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J*. ;13(3):692-8.
- Nossal GJ, Pike BL. (1980) Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA*.;77(3):1602-6.
- O'Connell MJ, Chen ZJ, Yang H, Yamada M, Massaro M, Mittelman A, Ferrone S. (1989) Active specific immunotherapy with antiidiotypic antibodies in patients with solid tumors. *Semin Surg Oncol*.;5(6):441-7. Review.
- O'Connell D, Becerril B, Roy-Burman A, Daws M, Marks JD. (2002) Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. *J Mol Biol*.;321(1):49-56.
- Olson EN, Arnold HH, Rigby PW, Wold BJ (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell*, 85:1-4.
- Orban PC, Chui D, Marth JD. (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;89(15):6861-5.

- Owens RJ, Young RJ. (1994) The genetic engineering of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*.;168(2):149-65. Review.
- Park MS. (1995) Expression of human RAD52 confers resistance to ionizing radiation in mammalian cells. *J Biol Chem*.;270(26):15467-70.
- Peterson ML, Perry RP. (1986) Regulated production of mu m and mu s mRNA requires linkage of the poly(A) addition sites and is dependent on the length of the mu s-mu m intron. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;83(23):8883-7.
- Pezzutto A, Dorken B, Rabinovitch PS, Ledbetter JA, Moldenhauer G, Clark EA. (1987) CD19 monoclonal antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. *J Immunol*.;138(9):2793-9.
- Piyathilake CJ, Frost AR, Weiss H, Manne U, Heimburger DC, Grizzle WE. (2000) The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung. *Hum Pathol*.;31(4):482-7.
- Poltoratsky V, Woo CJ, Tippin B, Martin A, Goodman MF, Scharff MD. (2001) Expression of error-prone polymerases in BL2 cells activated for Ig somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;98(14):7976-81
- Pontecorvo G. (1976) Polyethylene glycol (PEG) in the production of mammalian somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet*.;16(1-5):399-400.
- Potter H, Weir L, Leder P. (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;81(22):7161-5.
- Potter M. (1977) Antigen-binding myeloma proteins of mice. *Adv Immunol*.;25:141-211. Review.
- Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA. (1989) A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;86(24):10029-33.
- Rada C, Milstein C. (2001) The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J*.;20(16):4570-6.
- Ragnhammar P, Fagerberg J, Frodin JE, Hjelm AL, Lindemalm C, Magnusson I, Masucci G, Mellstedt H. (1993) Effect of monoclonal antibody 17-1A and GM-CSF in patients with advanced colorectal carcinoma--long-lasting, complete remissions can be induced. *Int J Cancer*. ;53(5):751-8.
- Rajewsky K, Forster I, Cumano A. (1987) Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science*.;238(4830):1088-94. Review.
- Ras E, van der Burg SH, Zegveld ST, Brandt RM, Kuppen PJ, Offringa R, Warnarr SO, van de Velde CJ, Melief CJ. (1997) Identification of potential HLA-A *0201 restricted CTL epitopes derived from the epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) and the carcinoembryonic antigen (CEA). *Hum Immunol*.;53(1):81-9.
- Reff ME, Heard C. (2001) A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications. *Crit Rev Oncol Hematol*.;40(1):25-35. Review.
- Renshaw BR, Fanslow WC 3rd, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, Davison BL, Maliszewski CR. (1994) Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med*.;180(5):1889-900.
- Reth M. (1992) Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol*.;10:97-121. Review.

- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*.;332(6162):323-7.
- Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Johnson JP. (1993) Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*.;5(5):732-9. Review.
- Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R. (1998) Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*.;16(5):1788-94.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet*.;25(2):139-40.
- Rogers J, Wall R. (1984) Immunoglobulin RNA rearrangements in B lymphocyte differentiation. *Adv Immunol*.;35:39-59. Review.
- Sakano H, Huppi K, Heinrich G, Tonegawa S. (1979) Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature*.;280(5720):288-94.
- Sauer B. (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*.;14(4):381-92. Review.
- Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*.;233(4768):1076-8.
- Schiechl H, Dohr G, Eherer A. (1986) Immunohistochemical localization and characterization of a protein from the basolateral membrane of rat small intestine epithelium using monoclonal antibody GZ-1. *J Histochem Cytochem*.;34(12):1659-65.
- Schon MP, Schon M, Klein CE, Blume U, Bisson S, Orfanos CE. (1994) Carcinoma-associated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *J Invest Dermatol*.;102(6):987-91.
- Schon MP, Schon M, Klein CE, Kaufmann R, Herzberg F, Schmidt R, Orfanos CE. (1995) Properties of the carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4 in normal and transformed human keratinocytes: regulation of synthesis, molecular cross-linking and ultrastructural localization. *Br J Dermatol*.;133(2):176-85.
- Schultes BC, Baum RP, Niesen A, Noujaim AA, Madiyalakan R. (1998) Anti-idiotypic induction therapy: anti-CA125 antibodies (Ab3) mediated tumor killing in patients treated with Ovarex mAb B43.13 (Ab1). *Cancer Immunol Immunother*.;46(4):201-12.
- Schumm M, Lang P, Taylor G, Kuci S, Klingebiel T, Buhning HJ, Geiselhart A, Niethammer D, Handgretinger R. (1999) Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother*.;8(2):209-18.
- Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. (1999) Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*.;11(5):558-62. Review.
- Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO. (1985) Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol*.;135(2):1530-5.
- Shulman MJ, Nissen L, Collins C (1990). Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length. *Mol Cell Biol*, 10:4466-72.
- Shuman S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*.;269(51):32678-84.

- Sievers EL, Linenberger M. (2001) Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. *Curr Opin Oncol.*;13(6):522-7. Review.
- Skerra A, Pluckthun A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science.*;240(4855):1038-41.
- Skerra A, Pluckthun A. (1991) Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Eng.*;4(8):971-9.
- Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, Jasin M. (1995) Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*;23(24):5012-9.
- Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, Malone RW. (2000) Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther.*;2(3):178-87. Review.
- Stephens S, Emtage S, Vetterlein O, Chaplin L, Bebbington C, Nesbitt A, Sopwith M, Athwal D, Novak C, Bodmer M. (1995) Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses. *Immunology.*;85(4):668-74.
- Steplewski Z, Lubeck MD, Koprowski H. (1983) Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells. *Science.* ;221(4613):865-7.
- Steven KH, Fong SK, Perkins S. (1989) Electric field-induced cell fusion and human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.*;116(1):117-22
- Stopper H, Jones H, Zimmermann U. (1987) Large scale transfection of mouse L-cells by electropor-meabilization. *Biochim Biophys Acta.*;900(1):38-44
- Sukhorukov VL, Mussauer H, Zimmermann U. (1998) The effect of electrical deformation forces on the electropor-meabilization of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media. *J Membr Biol.*;163(3):235-45.
- Sun W, Xiong J, Shulman MJ (1994). Production of mouse V/human C chimeric kappa genes by homologous recombination in hybridoma cells. Analysis of vector design and recombinant gene expression. *J Immunol*, 152:695-704.
- Takahashi,N., Ueda,S., Obata,M., Nikaido,T., Nakai,S. and Honjo,T. (1982) Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family *JOURNAL Cell* 29 (2), 671-679
- Tauber K. (2004) Dissertation: Herstellung eines autoktonen, induzierbaren Tumormodells & Entwicklung eines PTDCre Induktionssystems, Universität Heidelberg
- Thampoe IJ, Ng JS, Lloyd KO. (1988) Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing. *Arch Biochem Biophys.* ;267(1):342-52.
- Thomas JO, Kornberg RD. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA.*;72(7):2626-30.
- Thomas KR, Capecchi MR. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.*;51(3):503-12.
- Thompson KM. (1988) Human monoclonal antibodies. *Immunol Today.*;9(4):113-7. Review.
- Thorpe HM, Wilson SE, Smith MC. (2000) Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Mol Microbiol.*;38(2):232-41.

- Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. (2001) Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods*.;248(1-2):47-66. Review.
- Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G. (1992) The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol*.;227(3):776-98.
- Tomlinson I, Holliger P. (2000) Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol*.;326:461-79.
- Tonegawa S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*.;302(5909):575-81. Review.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*.;245(4915):301-5.
- Trikha M, Yan L, Nakada MT. (2002) Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology. *Curr Opin Biotechnol*.;13(6):609-14. Review.
- Ulrich HD, Patten PA, Yang PL, Romesberg FE, Schultz PG. (1995) Expression studies of catalytic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;92(25):11907-11.
- Valerius T, Stockmeyer B, van Spriël AB, Graziano RF, van den Herik-Oudijk IE, Repp R, Deo YM, Lund J, Kalden JR, Gramatzki M, van de Winkel JG. (1997) Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood*.;90(11):4485-92.
- van der Linden RH, de Geus B, Frenken GJ, Peters H, Verrips CT. (2000) Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution. *J Biotechnol*.;80(3):261-70.
- van Egmond M, Damen CA, van Spriël AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JG. (2001) IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol*.;22(4):205-11. Review.
- van Spriël AB, van Ojik HH, van De Winkel JG. (2000) Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. *Immunol Today*.;21(8):391-7. Review.
- Vasquez KM. (1996) Ph.D. Thesis (Baylor Colledge of Medicine, Houston).
- Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. (2001) Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*.;98(15):8403-10. Review.
- Vaughan TJ, Osbourn JK, Tempest PR. (1998) Human antibodies by design. *Nat Biotechnol*.;16(6):535-9. Review.
- Velders MP, van Rhijn CM, Briaire IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. (1995) Immunotherapy with low and high affinity monoclonal antibodies 17-1A and 323/A3 in a nude mouse xenograft carcinoma model. *Cancer Res*.;55(19):4398-403.
- von Mehren M, Adams GP, Weiner LM. (2003) Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med*.;54:343-69. Epub (2001). Review.
- Villa A, Notarangelo LD, Di Santo JP, Macchi PP, Strina D, Frattini A, Lucchini F, Patrosso CM, Giliani S, Mantuano E, *et al.* (1994) Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;91(6):2110-4.

- Wagner SD, Williams GT, Larson T, Neuberger MS, Kitamura D, Rajewsky K, Xian J, Bruggemann M. (1994) Antibodies generated from human immunoglobulin miniloci in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.*;22(8):1389-93.
- Waterhouse P, Griffiths AD, Johnson KS, Winter G. (1993) Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res.*;21(9):2265-6.
- Weigert M, Perry R, Kelley D, Hunkapiller T, Schilling J, Hood L. (1980) The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature.*;283(5746):497-9.
- Weiner LM, Harvey E, Padavic-Shaller K, Willson JK, Walsh C, LaCreta F, Khazaeli MB, Kirkwood JM, Haller DG. (1993) Phase II multicenter evaluation of prolonged murine monoclonal antibody 17-1A therapy in pancreatic carcinoma. *J Immunother.*;13(2):110-6.
- Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. (1984) The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol.*;133(1):123-8.
- Weng S, Gu K, Hammond PW, Lohse P, Rise C, Wagner RW, Wright MC, Kuimelis RG. (2002) Generating addressable protein microarrays with PROfusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics.*;2(1):48-57.
- Wentworth P Jr, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Janda KD, Babiorek BM, Eschenmoser A, Lerner RA. (2002) Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science.*;298(5601):2195-9.
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med.*;10(2):145-7. Epub (2004).
- Wilson DS, Keefe AD, Szostak JW. (2001) The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;98(7):3750-5. Epub (2001).
- Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature.* (1991);349(6307):293-9. Review.
- Winter G. Immunological techniques. *Curr Opin Immunol.* (1993) ;5(2):253-5.
- Woo CJ, Martin A, Scharff MD. (2003) Induction of somatic hypermutation is associated with modifications in immunoglobulin variable region chromatin. *Immunity.*;19(4):479-89.
- Xu L, Aha P, Gu K, Kuimelis RG, Kurz M, Lam T, Lim AC, Liu H, Lohse PA, Sun L, Weng S, Wagner RW, Lipovsek D. (2002) Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem Biol.*;9(8):933-42.
- Yamagishi J, Kawashima H, Matsuo N, Ohue M, Yamayoshi M, Fukui T, Kotani H, Furuta R, Nakano K, Yamada M. (1990) Mutational analysis of structure--activity relationships in human tumor necrosis factor-alpha. *Protein Eng.*;3(8):713-9.
- Yamawaki-Kataoka Y, Nakai S, Miyata T, Honjo T (1982). Nucleotide sequences of gene segments encoding membrane domains of immunoglobulin gamma chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:2623-7.
- Yang XD, Corvalan JR, Wang P, Roy CM, Davis CG. (1999) Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. *J Leukoc Biol.*;66(3):401-10.

-
- Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG, Jakobovits A. (1999) Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res.*;59(6):1236-43.
- Yasui H, Akahori Y, Hirano M, Yamada K, Kurosawa Y. (1989) Class switch from mu to delta is mediated by homologous recombination between sigma mu and sigma mu sequences in human immunoglobulin gene loci. *Eur J Immunol.*;19(8):1399-403
- Zahra DG, Vancov T, Dunn JM, Hawkins NJ, Ward RL. (1999) Selectable in-vivo recombination to increase antibody library size--an improved phage display vector system. *Gene.* ;227(1):49-54.
- Zebedee SL, Barbas CF 3rd, Hom YL, Caothien RH, Graff R, DeGraw J, Pyati J, LaPolla R, Burton DR, Lerner RA, *et al.* (1992) Human combinatorial antibody libraries to hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89(8):3175-9.
- Zorzos J, Zizi A, Bakiras A, Pectasidis D, Skarlos DV, Zorzos H, Elemenoglou J, Likourinas M. (1995) Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur Urol.*;28(3):251-4.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A. (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med.*;8(1):17-23. Review.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, im Mai 2004