

Aus der Fachrichtung 2.4
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Herstellung und Anwendung rekombinanter Antikörper-Fragmente
zum Nachweis und zur funktionellen Beeinflussung von TRP-
Ionenkanälen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Verena Carola Obmann,
geboren am 09.05.1986 in Roth

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNG DER AMINOSÄUREN	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XI
1. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2. EINLEITUNG	5
2.1 TRP-Kanäle.....	5
2.2 Aufbau und Herstellung von Antikörpern	10
2.2.1 Aufbau und Diversität von Antikörpermolekülen (Immunglobuline)	10
2.2.2 Herstellung polyklonaler Antikörper	14
2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper	15
2.2.4 Rekombinante Antikörper	15
2.3 Ziele dieser Arbeit.....	20
3. MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1. Molekularbiologische Experimente.....	23
3.1.1 Bakterienstämme	23
3.1.2 pCES-1-Vektor (Dyax)	24
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	29
3.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
3.1.6 Schneiden von DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukle-asen	30

3.1.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	31
3.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
3.1.9	Transformation von DNA in kompetente Bakterien.....	32
3.1.10	Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA.....	32
3.1.11	Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA	34
3.1.12	DNA-Sequenzierung.....	35
3.1.13	Klonierung einer Biotin-Akzeptor-Domäne in den pCES-Vektor für die Biotinylierung von Peptiden	36
3.2.	Gewinnung der Fab-Antikörper.....	39
3.2.1	Phagen-Display.....	39
3.2.2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43
3.2.3	Fingerprint-PCR	44
3.2.4	Anlage Glycerolkultur	45
3.2.5	Expression der Fabs in Bakterien	45
3.2.6	Aufreinigung der Fabs.....	46
3.2.7	Proteinbestimmung der Fab-Lösungen	48
3.2.8	Sequenzierung der Fabs.....	49
3.2.9	Aufbewahrung der Fabs.....	49
3.3	Angewandte proteinbiochemische Methodik	49
3.3.1	Proteinexpression und Proteinaufreinigung	49
3.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	50
3.3.3	Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen.....	51
3.3.4	Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)	51
3.3.5	Wiederverwendung von Western-Blots.....	52
3.3.6	Immunpräzipitation.....	53
3.4	Zellkultur und Transfektion.....	54
3.4.1	Zellkultur	54
3.4.2	Transiente Transfektion.....	55

3.5	Angewandte Zellfärbungsmethoden	56
3.5.1	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	56
3.5.2	Immunzytochemie	57
3.6	Zusammensetzung verwendeter Puffer und Medien	58
3.6.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	58
3.6.2	Puffer und Lösungen für die Fab-Gewinnung	59
3.6.3	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	60
3.7	Chemikalien	63
3.8	Computersoftware	63
4.	ERGEBNISSE	65
4.1	Auswahl der Peptide	65
4.1.1	Inhibierung von TRP-Kanälen	66
4.1.2	Konstitutive Aktivierung von TRP-Kanälen	67
4.2	Herstellung biotinylierter Peptide	68
4.3	Fabs: Gewinnung und Eigenschaften	75
4.3.1	Testung der Phagenüberstände auf Spezifität und Sensitivität für TRP-Proteine mittels ELISA	75
4.3.2	PCR	76
4.3.3	Sequenzierung der Fabs	78
4.3.4	Testung der Fabs auf Spezifität und Sensitivität gegenüber TRP-Proteinen mittels ELISA	82
4.3.5	Aufreinigung der Antikörperfragmente	83
4.4	Bindungsverhalten der Fabs an Vollängen-TRP-Proteine	85
4.4.1	Western-Blot	85
4.4.2	Durchflusszytometrie	96
4.4.3	Immunzytochemie	100
4.5	Anhang	104
4.5.1	Detaillierte ELISA-Ergebnisse	104

4.5.2	Details der Fab-Sequenzierungen	110
4.5.3	Ergebnisse der weiteren Peptid-Spot-Analysen	117
4.5.4	Ergebnis der Immunpräzipitation von TRPC4	118
5.	DISKUSSION	119
5.1	Expression der biotinylierten Proteine	119
5.1.1	Divergenzen im Molekulargewicht der TRP-Proteine.....	119
5.1.2	Menge der synthetisierten TRP-Proteine.....	120
5.1.3	Isolierung der TRP-Proteine	121
5.2	Auswahl der antigenen Peptidsequenzen	121
5.3	Sequenzanalyse der erhaltenen Fabs	122
5.4	TRP-Spezifität der selektionierten Fab-Antikörper	124
5.4.1	ELISA.....	125
5.4.2	Western-Blot	125
5.5	Schlussfolgerung	130
6.	LITERATURVERZEICHNIS	133
7.	PUBLIKATIONEN/DANKSAGUNG	149
7.1	Publikationen.....	149
7.2	Danksagung	150
8.	LEBENS LAUF.....	151

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Ampicillin-Glukose
AK	Antikörper
amb	anti-mouse-biotin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
arb	anti-rabbit-biotin
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BAD	Biotin Akzeptor Domäne
BCA	Bicinchoninsäure
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDR	Complementarity Determining Region
cfu	colony forming units (pro ml)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E3-Schleife	3. Extrazellulärschleife der TRP-Kanäle, die die Transmembrandomänen 5 und 6 verbindet
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii/et aliae/et alia
Fa.	Firma
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
g	g-Beschleunigung (als Vielfaches der Erdbeschleunigung)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)

H ₂ O	Wasser
HCl	<i>hier</i> : Hydrochlorid
HEK	human embryonic kidney
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
His	Histidin
HPLC	High Purity Liquid Chromatography
HRP	horseradish-peroxidase
Ig(G)	Immunglobulin (G)
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kap.	Kapitel
kDA	Kilodalton
M	molar
mab(s)	monoclonal antibody/antibodies
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
MPBS	Magermilchpulver in PBS gelöst
ms	Millisekunde
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
P1, P2, ..., P6	Peptid 1, Peptid 2, ..., Peptid 6
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
pFA	Paraformaldehyd
pfu	plaque forming units (pro ml)
POX	Peroxidase
RIPA-Puffer	Radio Immuno Precipitation Assay Puffer
RNA	ribonucleic acid

rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS-Page	Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sog.	sogenannt/e/er/es
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	TBS mit 0,1% Tween 20
TEA	Triethylamin
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TS-Puffer	Tris-Saccharose-Puffer
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WB	Western-Blot
z.B.	zum Beispiel

Abkürzung der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Unterfamilien der TRP-Proteine und Anzahl ihrer Gene in verschiedenen Organismen (Fliege (<i>Drosophila melanogaster</i>), Wurm (<i>Caenorhabditis elegans</i>), Fisch (<i>Fugu rubripes</i>), Maus (<i>Mus musculus</i>), Mensch (<i>Homo sapiens</i>)).....	6
Tabelle 2.	Verwendete Primer	27
Tabelle 3.	Peptidsequenzen für das Screening der Phagenbibliothek	39
Tabelle 4.	Übersicht der Ergebnisse des ELISA mit Phagenüberständen	76
Tabelle 5.	Übersicht der ELISA-Ergebnisse mit aufgereinigten Fabs	83
Tabelle 6.	Minimale Epitope der gegen die intrazelluläre Sequenz von TRPC4 gerichteten positiven Fab-Klone	92
Tabelle 7.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 1 nach Selektionsrunde 3	105
Tabelle 8.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 2 nach Selektionsrunde 3	105
Tabelle 9.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 2 nach Selektionsrunde 4	105
Tabelle 10.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 3 nach Selektionsrunde 3	106
Tabelle 11.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 4 nach Selektionsrunde 3	106
Tabelle 12.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 5 nach Selektionsrunde 3	106
Tabelle 13.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 5 nach Selektionsrunde 4	107
Tabelle 14.	ELISA mit Phagenüberständen: Peptid C5 nach Selektionsrunde 4	107
Tabelle 15.	Sequenzierung: Fabs gegen Peptid 1	111
Tabelle 16.	Sequenzierung: Fabs gegen Peptid 3	112
Tabelle 17.	Sequenzierung: Fabs gegen Peptid 4	113
Tabelle 18.	V-, J-, D-Gensegmentverteilung der verschiedenen Fab-Klone	114



Abbildungsverzeichnis

Die folgenden Abbildungen wurden durch den Autor dieser Arbeit erstellt.

Abbildung 1.	Schematische Darstellung eines TRP-Transmembranproteins	7
Abbildung 2.	Strukturmodell eines TRPC-Kanals	9
Abbildung 3.	Schematischer Vergleich eines Fragment antibody binding (Fab) und eines IgG-Antikörpers.....	11
Abbildung 4.	Aufbau der Fab-Ketten aus V-, D- und J-Segmenten.....	13
Abbildung 5.	Phagen-Hüllprotein mit Fab	18
Abbildung 6.	Selektionsrunden Phagen-Display.....	19
Abbildung 7.	Fab-Fragmente erreichen Abschnitte der Kanalpore, die für IgG-Antikörper nicht zugänglich sind.....	21
Abbildung 8.	Schema "Amber-Codon" zwischen Fab und Gen III-Protein (gIII)	25
Abbildung 9.	pCES-Klonierungsvektor	26
Abbildung 10.	pCES-Konstrukt mit TRP-Fragment und Hinge-BAD-Region.....	38
Abbildung 11.	Schematische Darstellung eines TRP-Transmembranproteins	66
Abbildung 12.	Ausschnitt aus einem Alignment von TRP-Proteinen im Bereich der E3-Schleife	67
Abbildung 13.	Ausschnitt aus einem Alignment von TRP-Proteinen im Bereich des S4-S5-Linkers	68
Abbildung 14.	Sequenzabschnitte von TRPC5 und TRPM1	69
Abbildung 15.	Kyte-Doolittle-Analyse für mTRPC5.....	70
Abbildung 16.	Kyte Doolittle Analyse für mTRPM1	71
Abbildung 17.	TRP-Peptidexpression M1 und C5 zu verschiedenen Syntheszeitpunkten	72
Abbildung 18.	Western-Blot zur Detektion der biotinylierten TRPM1- und TRPC5-Peptide	73
Abbildung 19.	Western-Blot: Expression eines Fabs mit Hilfe von AvB101-Bakterien	74
Abbildung 20.	Peptidexpression und Isolation des TRPM1-Fragmentes	75
Abbildung 21.	Agarosegel nach PCR von Fab-Klonen gegen die extrazelluläre TRPM3-Sequenz mit den Primern M13rev und fdtet25	77

Abbildung 22.	„Fingerprint-PCR“-Amplifikate der Fabs, die gegen TRPC5 (P6) gerichtet sind	78
Abbildung 23.	Sequenz von P1C10 zwischen pCES-Vektor und Phagenprotein gIII	80
Abbildung 24.	ELISA mit Fabs gegen Peptid 1 nach Selektionsrunde 3	82
Abbildung 25.	Coomassie Blue gefärbte SDS-Gele mit den Elutions-Fraktionen des Klons P3A8 nach Säulenaufreinigung	84
Abbildung 26.	Proteinbestimmung mittels BSA-Standardreihe im Coomassie Blue gefärbten SDS-Gel.....	85
Abbildung 27.	Western-Blot mit Lysat TRPM3 überexprimierender Zellen und deren Detektion mit Antikörpern, die gegen TRPM3 gerichtet sind (a).....	86
Abbildung 28.	Western-Blot mit Lysat TRPM3 überexprimierender Zellen und deren Detektion mit Antikörpern, die gegen TRPM3 gerichtet sind (b).....	87
Abbildung 29.	Vergleich von Standard- und Far Western-Blot TRPM3 exprimierender Zellen (Inkubation mit dem Fab P1C8)	89
Abbildung 30.	Epitopbestimmung der Fab-Klone gegen die extrazelluläre TRPM3-Sequenz mittels Dot Blot	91
Abbildung 31.	Alignment zur Epitopbestimmung von Fabs gegen TRPM3	91
Abbildung 32.	Immunpräzipitation von TRPM3 durch AK695 und Detektion mittels Fabs.....	94
Abbildung 33.	Western-Blot mit RIPA-Lysat TRPC4 überexprimierender HEK-Zellen	95
Abbildung 34.	FACS-Messungen nach Permeabilisierung durch 0,05% Tween	98
Abbildung 35.	FACS-Messungen nach Permeabilisierung durch 0,3% Saponin	100
Abbildung 36.	Immunzytochemische Färbungen mit etablierten polyklonalen Antikörpern (20x Vergrößerung)	102
Abbildung 37.	Immunzytochemische Färbungen mit Fabs (20x Vergrößerung)	104
Abbildung 38.	Fab-ELISA: Peptid 1 nach Selektionsrunde 3	108
Abbildung 39.	Fab-ELISA: Peptid 3 nach Selektionsrunde 3	108
Abbildung 40.	Fab-ELISA: Peptid 4 nach Selektionsrunde 3	109
Abbildung 41.	Fab-ELISA: Peptid 5 nach Selektionsrunde 4	109
Abbildung 42.	Fab-ELISA: Peptid 6 nach Selektionsrunde 4	110
Abbildung 43.	Sequenz von P3A8 zwischen pCES-Vektor und Phagenprotein gIII	116
Abbildung 44.	Ergebnisse der Peptid-Spot-Analyse für Fabs gegen die TRPC4-Sequenz (P3).....	117

Abbildung 45. Ergebnisse der Peptid-Spot-Analyse für Fabs gegen den intrazellulären Sequenzabschnitt von TRPM3 (P4)	117
Abbildung 46. Ergebnisse der Peptid-Spot-Analyse für die Fabs gegen die TRPM1-Sequenz (P5).....	117
Abbildung 47. Ergebnis der Peptid-Spot-Analyse für den Fab C5C2 gegen die TRPC5-Sequenz	118
Abbildung 48. Immunpräzipitation von TRPC4 durch AK1056 und Detektion mittels Fab P3A8.....	118



Die Herstellung der Fab-Antikörper wurde bis zum Schritt der Expression von Birgit Bette und Gabi Carbon aus der Arbeitsgruppe PD Dr. Gerhard Held im José-Carreras-Zentrum unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh, Klinik für Innere Medizin I, Hämatologie und Onkologie (Universitätsklinikum des Saarlandes), durchgeführt.

1. Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die ersten TRP-Ionenkanäle wurden bereits 1969 in Fotorezeptorzellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Die TRP-Mutante war nicht in der Lage, eine konstante Depolarisation der Zellmembran aufrecht zu erhalten und reagierte mit einem intermittierenden, transienten Rezeptorpotenzial. Das Wissen über diese Familie kationenpermeabler Kanäle, die an sehr vielen wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt ist, wächst kontinuierlich. Da bislang kaum spezifische Agonisten und Antagonisten für die einzelnen TRP-Proteine existieren, besteht ein vielversprechender Ansatz zur besseren Charakterisierung der TRP-Kanäle in der Entwicklung von spezifischen TRP-Antikörpern, die die Kanalfunktion beeinflussen können. So können detaillierte Informationen über Struktur und Funktion der TRP-Kanäle erlangt werden. Ziel dieser Arbeit war es, solche Antikörper gegen Maus-TRPC- und Maus-TRPM-Kanäle zu gewinnen (TRPC4, TRPC5, TRPM1 und TRPM3).

Zunächst wurden rekombinante Antikörperfragmente (Fabs) gewonnen, die gegen TRP-Proteine gerichtet waren. Zur Isolierung und Selektion spezifischer Antikörperfragmente wurde eine Phagenbibliothek mit einem humanem Fab-Repertoire einer Diversität von $3,7 \times 10^{10}$ mit fünf verschiedenen Peptiden (13-57 Aminosäuren Länge) gescreent. Die verwendeten TRP-Peptide wurden im Rahmen ihrer Synthese biotinyliert und anschließend mit Hilfe von Streptavidin-Beads selektioniert. Es wurde an einer Klonierungsstrategie gearbeitet, um entsprechende TRP-Proteine mit Hilfe von *E. coli*-Bakterien herzustellen und zu biotinylieren. Anschließend sollten die biotinylierten TRP-Proteine aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt werden.

Die gewonnenen Fabs wurden hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber den zur Selektion verwendeten TRP-Peptiden mittels ELISA getestet. Die Klone, die im ELISA ein spezifisches Bindungsverhalten zeigten, wurden auf Grund ihrer DNA-Sequenzanalyse weiter selektioniert. Es verblieben 16 gegen TRPM3 gerichtete Klone (13 gegen die extrazelluläre Domäne und drei gegen die intrazelluläre Domäne), drei gegen TRPM1, zehn gegen TRPC4 und einer gegen TRPC5, die im Weiteren systematisch rekombinant in *E. coli* synthetisiert und anschließend funktionellen Untersuchungen unterzogen wurden. Mittels Immunoblot-Analysen wurden zum einen die minimal benötigten Epitope der Fabs mit Hilfe von Peptid-Spots auf Nitrozellulose-Membranen bestimmt. Es stellten sich dabei minimal benötigte

Epitope der Fabs von drei bis zehn Aminosäuren Länge heraus. Zum anderen wurden die TRP-Proteine mittels Western-Blot-Analysen mit Zelllysaten (aus überexprimierenden Zellen), vor und nach Anreicherung durch Immunpräzipitation, nachgewiesen. Während die Fabs nach Inkubation mit den Zelllysaten zunächst nur ein unspezifisches Bindungsverhalten zeigten und die Vollängenproteine nur von wenigen Klonen schwach gebunden wurden, wurden die TRP-Proteine nach Anreicherung durch Immunpräzipitation nachgewiesen: statt eines diffusen Bandenmusters wie zuvor, zeigte sich nur noch eine Bande stärkerer Intensität.

Zusätzlich wurde mittels Durchflusszytometrie und Immunzytochemie versucht, die jeweiligen TRP-Proteine auf zellulärer Ebene durch die gewonnenen Antikörperfragmente darzustellen. Während der Nachweis der TRP-Proteine durchflusszytometrisch nicht gelang, konnten diese in den immunzytochemischen Untersuchungen durch bereits etablierte anti-TRP-Antikörper detektiert werden. Hingegen war der Nachweis der Kanalproteine durch die Antikörperfragmente mittels zellfärbender Techniken nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Strategie implementiert, mit der Fabs gezielt auf Spezifität gegen das zu ihrer Selektion verwendete Antigen getestet werden können. Dabei erwies es sich als sinnvoll, nach einer ersten Selektion im ELISA, mittels Peptid-Spot-Analyse die minimal benötigten Epitope, die von den Antikörperfragmenten erkannt werden, zu bestimmen. Es konnte eine weitere Auswahl an Fabs getroffen werden, die den gewünschten Kanalabschnitt erkannten. Schließlich verblieben noch wenige Fabs für die verschiedenen Western-Blot-Untersuchungen und immunzytochemischen Analysen.

Durch die oben beschriebene Vorgehensweise gelang eine schrittweise Selektion TRP-Peptid spezifischer Antikörperfragmente, die für weitere funktionelle Untersuchungen der TRP-Kanäle in derzeit laufenden Untersuchungen verwendet werden können.

1.2 Abstract

The first TRP ion channels were discovered as early as 1969 in photo receptor cells in *Drosophila melanogaster*. The TRP mutant was not able to maintain a constant depolarisation of the cell membrane and responded with an intermittent, transient receptor potential. The knowledge about this family of cation channels which is involved in many physiological processes, is continuously increasing. As hardly any agonists and antagonists for the individual TRP proteins exist thus far, the development of TRP-specific antibodies which are able to influence channel functions may present a promising approach to better characterising TRP channels. This way, detailed information on structure and function of TRP channels can be obtained. The aim of this work was to gain such antibodies against murine TRPC and TRPM ion channels (TRPC4, TRPC5, TRPM1 and TRPM3).

First of all, recombinant antibody fragments (fabs) directed against TRP proteins were obtained. To isolate and select specific antibody fragments, a bacteriophage library with a human fab repertoire of a diversity of 3.7×10^{10} was screened for five peptides (13-57 amino acids in length). The employed TRP peptides were biotinylated during their synthesis and subsequently selected using streptavidin beads. A clonation strategy was developed in order to produce and biotinylate corresponding TRP proteins in *E. coli*. Then, the biotinylated TRP proteins were supposed to be isolated and purified.

The specificity of the fabs against the TRP peptides used for selection was tested by means of ELISA. Those clones showing a specific binding were further selected by means of DNA sequencing analysis. As a result 16 clones remained for TRPM3 (13 extracellular, 3 intracellular), three for TRPM1, ten for TRPC4 and one for TRPC5, which were subjected to further functional testing. On the one hand, Immunoblot analysis yielded the minimum epitope required by means of peptide spots on nitrocellulose membranes. The minimum epitope of the fabs was three through ten amino acids in length. On the other hand, western blot analysis verified TRP proteins in lysed overexpressive cells, before as well as after accumulation by immunoprecipitation. While the fabs only showed unspecific binding qualities and only few clones bound the full protein weakly, the TRP proteins were able to be detected after immunoprecipitation: instead of one diffuse band as before, a band of greater intensity was detectable.

Additionally, an attempt at visualising the TRP proteins on cellular level with the gained antibody fragments was made by means of flow cytometry and immunocytochemistry.

While flow cytometry did not detect the TRP proteins, immunocytochemistry analysis with already established anti-TRP antibodies was able to detect them. However, the detection of the channel proteins using antibody fragments and cell staining techniques was not possible.

The course of action described above yielded a step for step selection of TRP-specific antibody fragments which might be able to be used for the functional testing of TRP channels in ongoing work.

2. Einleitung

2.1 TRP-Kanäle

Transient receptor potential channels (TRP-Kanäle) stellen eine umfangreiche Familie von kationenpermeablen Ionenkanälen dar. Ionenkanäle sind porenbildende Transmembranproteine, die Ionen das Durchqueren von Biomembranen ermöglichen. Entdeckt wurden TRP-Proteine erstmals in Fotorezeptorzellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Cossens und Manning, 1969). Die „transient receptor potential“ (TRP)-Mutante war nicht in der Lage, auf kontinuierlichen Lichtreiz die Depolarisation der Zellmembran aufrecht zu erhalten, die Fotorezeptoren reagierten nur mit einem transienten, d.h. schnell inaktivierenden, Membranstrom (Montell et al., 1985). Nachdem ein Lichtreiz nicht nur ein transientes Potenzial hervorrief, sondern auch ein verminderter Ca^{2+} -Einstrom zu beobachten war, wurde vermutet, dass es sich um kalziumpermeable Kanäle handelt (Minke et al., 1975). Montell und Rubin identifizierten 1989 das Gen, das für diese Mutation verantwortlich ist und fanden heraus, dass dieses für ein integrales Membranprotein kodiert (Montell und Rubin, 1985). Die phänotypischen Auswirkungen der *Drosophila*-Mutante – die Reaktion auf anhaltende Lichtreize („transient receptor potential“) – war namensgebend für die verantwortlichen Proteine. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um Kationenkanäle handelt (Hardie und Minke, 1992, 1993; Phillips et al., 1992). Mittlerweile weiß man, dass die in *Drosophila* mutierten TRP-Kanäle tatsächlich Kalzium-permeabel sind (Hardie, 2001). Bis heute wurden zahlreiche TRP-Kanäle identifiziert und charakterisiert. Bei der Maus wurden 28 Gene gefunden, die für TRP-Kanäle kodieren. Auch in anderen Spezies (Fliegen, Würmer, Fische und beim Menschen) konnten TRP-ähnliche Kationenkanäle nachgewiesen werden (Tabelle 1, modifiziert nach Flockerzi, 2007). Die TRP-Gene kodieren für diverse Kanalproteine, die in sieben Protein-Familien zusammengefasst werden: TRPC (klassisch), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPA (Ankyrin Transmembran Protein 1, ANKTM1), TRPN (no mechanoreceptor potential C, NOMPC), TRPP (Polycystin) und TRPML (Mucolipin). Die meisten der TRP-Kanäle leiten Kationen. Am häufigsten sind sie für Na^+ , K^+ - oder Ca^{2+} -Ionen permeabel. Auch die Leitung von Mg^{2+} -Ionen wurde beschrieben.

2. Einleitung

TRP-Familie	Fliege	Wurm	Fisch	Maus	Mensch
TRPC	3	3	8	7	6
TRPV	2	5	4	6	6
TRPM	1	4	6	8	8
TRPA	4	2	1	1	1
TRPN	1	1	-	-	-
TPRPP	4	1	2	3	3
TRPML	1	1	4	3	3
Insgesamt	16	17	25	28	27

Tabelle 1. Unterfamilien der TRP-Proteine und Anzahl ihrer Gene in verschiedenen Organismen (Fliege (*Drosophila melanogaster*), Wurm (*Caenorhabditis elegans*), Fisch (*Fugu rubripes*), Maus (*Mus musculus*), Mensch (*Homo sapiens*))

Modifiziert nach Flockerzi, 2007.

Eine Gemeinsamkeit der Proteine dieser Kanalfamilie liegt darin, dass es sich um integrale Membranproteine mit sechs erwarteten Transmembrandomänen (TM1-TM6) handelt, wobei diese als α -Helices die Membran durchspannen. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich intrazellulär. Zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs ist die dritte Extrazellulärschleife (E3) an der Bildung der ionenleitenden Pore beteiligt (Reaves et al., 2007). Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines TRP-Proteins. Die eingezeichneten Regionen des S4-S5-Linkers (Verbindung zwischen den Transmembrandomänen 4 und 5) sowie der E3-Schleife sind für diese Arbeit von besonderer Bedeutung.

Die Transmembranregion lässt sich in Porenregion und Sensor-domäne unterteilen. Man nimmt an, dass die S5 und S6-Segmente, wie bei den strukturähnlichen gut untersuchten Kaliumkanälen, die zentrale ionenleitende Pore bilden (Jiang et al. 2002, 2003; Long et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass der S5-S6-Linker eine in die Membran eintretende Schleife bildet, welche jedoch innerhalb der verschiedenen TRP-Familien stark in Länge und Sequenz variiert (Voets und Nilius, 2003).

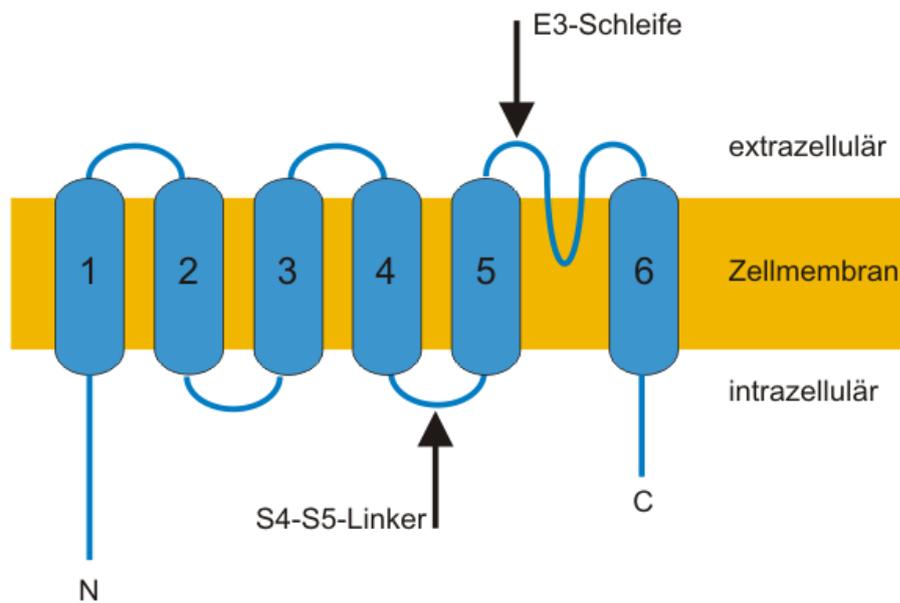


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines TRP-Transmembranproteins

Das abgebildete TRP-Protein besteht aus sechs Transmembrandomänen. Der Amino- und Carboxyterminus befinden sich im Zytosol. Die Region, die an der kanalbildenden Pore beteiligt ist, liegt zwischen Transmembrandomäne 5 und 6. Als S4-S5-Linker und E3-Schleife gekennzeichnet sind die zwei Regionen, die in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung sind.

Der Begriff Sensordomäne beschreibt den Bereich zwischen den Transmembrandomänen eins und vier. Diese Namensgebung entstand in Anlehnung an die Shaker-Kaliumkanäle, die auf Grund von diversen positiven Ladungen in diesem Sequenzabschnitt Spannungsunterschiede entlang der Lipidmembran erfassen und daraufhin die Pore öffnen können (Aggarwal et al., 1996; Seoh et al., 1996; Tombola et al., 2005). Im Gegensatz zu den Kaliumkanälen handelt es sich bei den TRP-Kanälen jedoch nicht um primär spannungsabhängige Kanäle. Eine ähnliche Funktion konnte für die Capsaicin-Bindungsstelle (TRPV1) und die Icilin-Bindungsstelle (TRPM8) in der S2-S3-Region nachgewiesen werden (Jordt et al., 2002; Chuang et al., 2004).

In Analogie zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv-Familie) wurde vermutet, dass sich auch die TRP-Proteine zu Homo- oder Heterotetrameren zusammenlagern (Harteneck et al., 2000; Yellen et al., 2002; Amiri et al., 2003). Dieser Nachweis gelang bereits für einige Subtypen wie zum Beispiel für TRPC3 (Mio et al., 2007), TRPM2 (Maruyama et al., 2007), TRPM8 (Stewart et al., 2010), TRPV1 (Miseenkova-Bell et al., 2008; Jahn et al., 2001; Kadei et al., 2001), TRPV5 und TRPV6 (Hoenderop et al., 2003).

TRP-Kanäle sind an sensorischen Prozessen wie z.B. der Schmerz Wahrnehmung (Caterina et al., 2000), der Geruchs- und Geschmacksempfindung (Zhang et al., 2003), sowie der Wär-

mewahrnehmung (Peier et al., 2002) beteiligt. Es konnte aber auch die Beteiligung an anderen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Blutdruckregulation (Freichel et al., 2001; Mathar et al., 2010) oder der Magnesiumhomöostase (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002) nachgewiesen werden. Auf Grund ihrer vielfältigen Einflüsse spielen TRP-Kanäle auch bei der Entstehung von Krankheiten eine Rolle. Bisher wurden vier Kanalopathien nachgewiesen, bei denen ein Defekt im TRP-Kanal-kodierenden Gen die direkte Ursache für die Krankheit ist (Nilius et al., 2005b). So führt beispielsweise ein TRPC6-Defekt zu einer fokal segmentalen Glomerulosklerose. Auf Grund ihrer Rolle als Rezeptoren für diverse Liganden sind TRP-Kanäle auch an der Entstehung vieler Systemerkrankungen beteiligt. Hierunter fallen unter anderem häufige Krankheiten der Atemwege wie Asthma und COPD (Gosling et al., 2005; Sweeny et al., 2002), Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz (Watanabe et al., 2009) oder Nephropathien wie z.B. proteinurische Nierenerkrankungen (Möller et al., 2007).

Das Wissen über die TRP-Kanäle ist in den 40 Jahren seit ihrer Entdeckung stetig gewachsen. Dennoch sind ihre genauen physiologischen Rollen, Aktivierungs- und Regulationsmechanismen bisher nur teilweise bekannt. Neben Mutagenese-Studien kann die Entwicklung spezifischer Antikörper zur Erweiterung der Kenntnisse über TRP-Kanäle beitragen. Bislang existieren kaum Agonisten und Antagonisten für die einzelnen Kanäle, mit denen die Kanalaktivität beeinflusst wird und somit weitere Information über Struktur und Funktion der TRP-Kanäle gewonnen werden kann. In den letzten Jahren setzten sich vermehrt Arbeitsgruppen mit der Funktionsbeeinflussung von TRP-Kanälen mit Hilfe spezifischer Antikörper auseinander.

Mehrere Mutagenese-Studien (Nilius et al., 2005a; Dodier et al., 2004; Voets et al., 2004) konnten zeigen, dass der E3-Abschnitt eine essentielle Bedeutung für die Ionenleitfähigkeit und -selektivität des Kanals besitzt. Die ersten Antikörper, deren Angriffspunkt die extrazelluläre E3-Schleife war, wurden gegen verwandte spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv1.2 und Kv3.1) entwickelt (Zhou et al., 1998). Es folgten Antikörper gegen die ebenso ähnlich aufgebauten Kanäle Nav1.5, Eag1, Cav2.1/2 (Chioni et al., 2005; Gomez-Varela et al., 2007; Liao et al., 2008) sowie gegen die TRP-Kanäle C1, C5 und M3 (Xu et al., 2001; Xu et al., 2005; Xu et al., 2006; Naylor et al., 2008). Ihnen gemeinsam ist eine spezifische Blockade des Kanals, gegen den sie gerichtet sind, durch einen wahrscheinlich identischen, bislang unbekanntem Mechanismus (Naylor et al., 2008). Dabei zeigte sich eine Reduktion der Kanalaktivität um maximal 50%. Klionsky et al. (2006) gelang es, einen spezifischen Antikörper gegen

die E3-Schleife des Kaninchen-TRPV1-Kanals zu entwickeln, der als voller Antagonist die Protonen-gesteuerte und als partieller Antagonist die Capsaicin-gesteuerte Ca^{2+} -Aufnahme verhindert.

Die Bedeutung des S4-S5-Linkers wurde u.a. von Voets et al. (2007) beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die TM4 und der S4-S5-Linker die Sensitivität von TRPM8 bezüglich Spannungsabhängigkeit, Temperatur und Menthol bestimmen. Ein Effekt durch Antikörper, die im Bereich des S4-S5-Linkers angreifen, wurde jedoch bisher noch nicht beschrieben. Hingegen wurden bedeutende Effekte durch Einführen einer Mutation im Bereich des S4-S5-Linkers der verschiedenen TRP-Kanäle gezeigt. So zeigte eine Punktmutation in TRPC3 abnorme Purkinjezellen (Becker et al., 2009), Mutationen in TRPV3 und TRPML3 führten zur konstitutiven Aktivierung des jeweiligen Kanals (Asakawa et al., 2006; Grimm et al., 2007; Xiao et al., 2008). Asakawa et al. beschrieben 2006 die konstitutive Aktivierung von TRPV3 durch Mutation von Glycin 573 zu Serin bzw. Cystein.

Prof. Dr. Volkhard Helms, Leiter des Zentrums für Bioinformatik der Universität des Saarlandes in Saarbrücken, entwarf ein Strukturmodell des TRPC-Kanals für die offene und geschlossene Konformation des Kanals. Dieses wurde auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu Kaliumkanälen sowie anhand der Information über die Lokalisation der Mutation erstellt (Harteneck et al., 2000; Long et al., 2005). Das Modell bietet einen Erklärungsansatz für die Auswirkung der Mutation auf die Kanalaktivität (Abbildung 2).

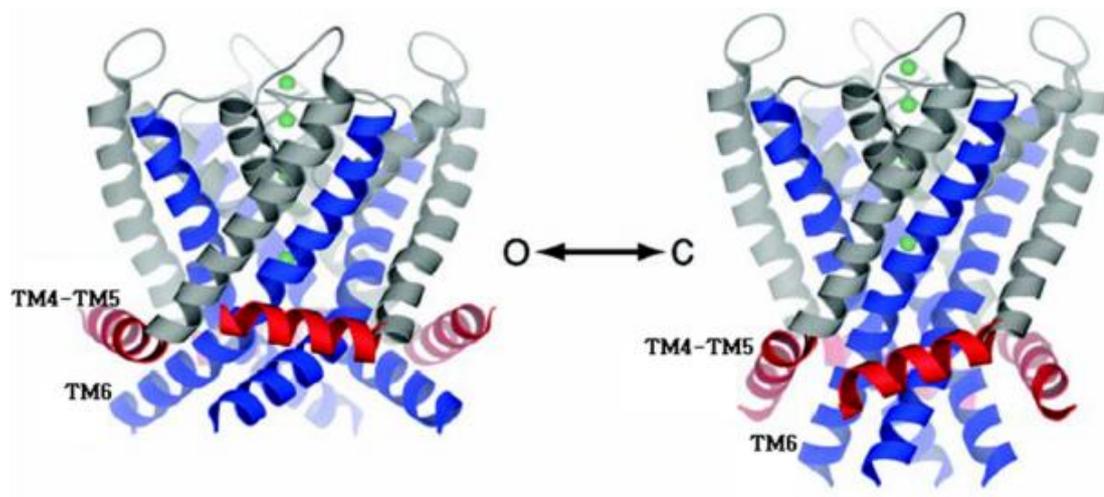


Abbildung 2. Strukturmodell eines TRPC-Kanals

Entworfen von Prof. Dr. Volkhard Helms, Bioinformatik, Fakultät 8, Universität des Saarlandes. Links: Kanal in offener Konformation (O), rechts in geschlossener (C). TM4-TM5 (rot): S4-S5-Linker, TM6 (blau): Transmembrandomäne 6, grau: weitere TM sowie intra- und extrazelluläre Linker

Abbildung 2 zeigt den TRPC-Kanal als Tetramer. Links dargestellt ist die offene Konstitution des Kanals, rechts die geschlossene. Die Transmembrandomänen sind als α -Helices dargestellt. Im jeweils linken Bildabschnitt ist der S4-S5 Linker in rot sichtbar, sowie das S6-Segment schräg rechts daneben in blau. In grau dargestellt sind die weiteren Transmembrandomänen sowie intra- und extrazelluläre Linker des TRPC-Proteins.

In Analogie zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen geht man davon aus, dass der S4-S5-Linker im geschlossenen Zustand über Aminosäure-Seitengruppen mit dem S6-Segment interagiert. Diese Interaktion ist im offenen Zustand durch die Änderung der Orientierung des S6-Segmentes aufgehoben (Schug et al., 2006). Durch die Einführung einer Mutation im S4-S5-Linker kann die Interaktion mit der sechsten Transmembrandomäne nicht stattfinden. Folglich kann sich die geschlossene Konformation nicht mehr ausbilden, wodurch der Kanal konstitutiv aktiviert ist.

2.2 Aufbau und Herstellung von Antikörpern

Im Folgenden werden verschiedene Möglichkeiten zur Antikörperherstellung sowie die Entscheidung für die Gewinnung von Fab-Fragmenten im Rahmen dieser Arbeit erläutert.

2.2.1 Aufbau und Diversität von Antikörpermolekülen (Immunglobuline)

Ein typisches Antikörpermolekül besteht aus jeweils zwei identischen leichten und schweren Ketten, die über Disulfidbrücken und nicht kovalente Bindungen zu einem Y-förmigen Molekül verbunden sind. Antikörper besitzen somit immer mindestens zwei identische Antigenbindungsregionen. Anhand ihrer schweren Ketten lassen sich Immunglobuline in fünf Isotypen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) einteilen. Den größten Anteil stellen hierbei Antikörper des IgG-Typs dar. In Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung eines solchen IgG-Antikörpers mit seinen Strukturen abgebildet.

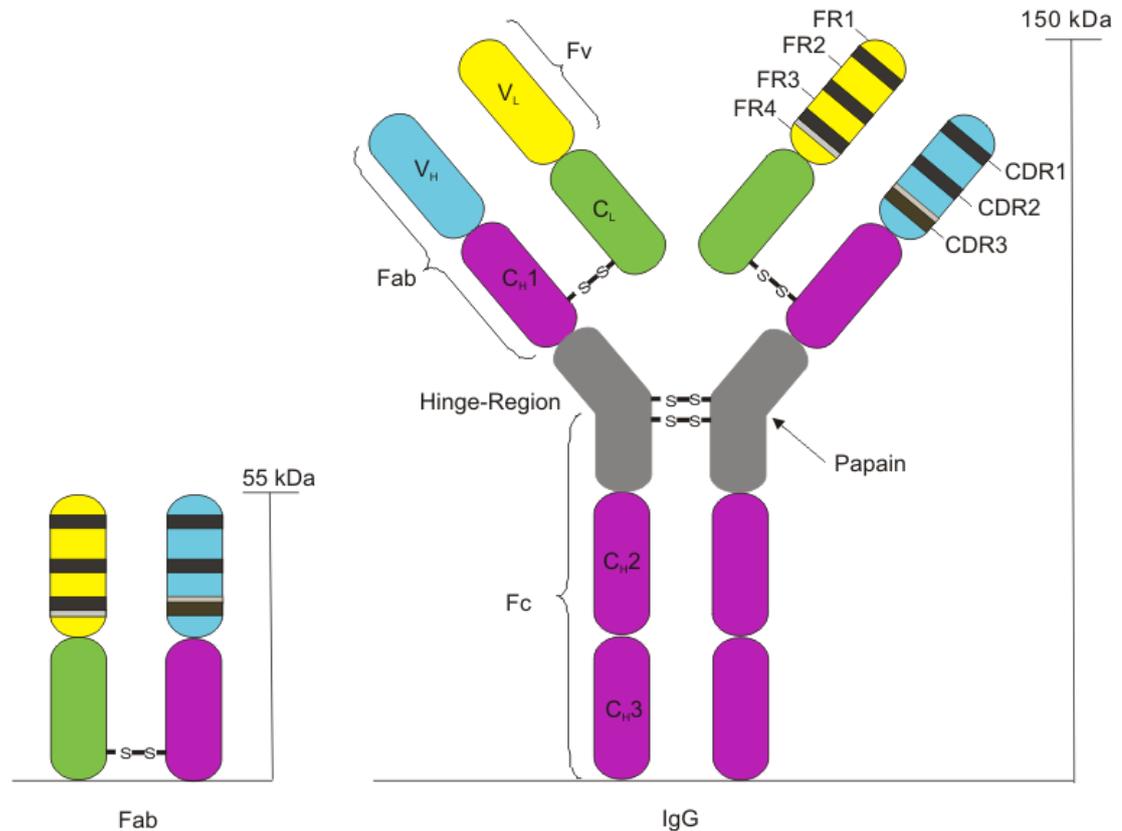


Abbildung 3. Schematischer Vergleich eines Fragment antibody binding (Fab) und eines IgG-Antikörpers

Links: Fab, rechts: IgG. Abkürzungen: V_H : variable Domäne der schweren (heavy) Kette; V_L : variable Domäne der leichten (light) Kette; C_{H1-3} : konstante Domänen der schweren Ketten; C_L : Konstante Domäne der leichten Kette; S-S: Disulfidbrücke; Fv: variables Fragment, Fab: antigenbindendes Fragment, F_c : konstantes Fragment, CDR: complementarity determining regions; FR: framework regions.

Jede der beiden leichten Ketten eines IgG-Antikörpers hat ein Gewicht von ca. 25 kDa, jede der schweren etwa 50 kDa. Das Gesamtgewicht eines IgG-Antikörpers beträgt somit etwa 150 kDa. Im Vergleich zum kompletten IgG Immunglobulin weisen die Fabs (Fragment antigen binding) nur eine leichte Kette, sowie den V_H - und C_{H1} -Teil einer schweren Kette auf, das Molekulargewicht beträgt ca. 55 kDa.

Von den leichten Ketten gibt es zwei strukturell unterschiedliche Formen. Sie werden als kappa- bzw. lambda-Leichtketten bezeichnet. Beide Formen der leichten Ketten setzen sich aus einer konstanten und einer variablen Domäne zusammen, während die schweren Ketten neben einer variablen Domäne drei (bei anderen Isotypen auch 4) konstante Domänen besitzen. Die Variabilität eines Antikörpers ist nicht über die gesamte Region der variablen Domänen verteilt, sondern konzentriert sich hauptsächlich auf drei hypervariable Regionen, die sogenannten complementarity determining regions (CDR). Diese werden durch Protein-domänen mit geringerer Sequenzvariabilität, den framework regions (FR) voneinander ge-

trennt. Die FRs ordnen sich so an, dass die CDRs im funktionell gefalteten Protein direkt nebeneinander liegen und in Schleifen nach außen zeigen. Über diese Bereiche erfolgt die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen.

Die große Diversität der Antikörper wird durch folgende Mechanismen erreicht: Zum einen kann diese durch somatische Rekombination erfolgen. Darunter versteht man das Herstellen einer kombinatorischen Vielfalt durch die Verknüpfung zahlreicher verschiedener V-, J- und D- Gensegmente (Tonegawa, 1983, 1988). Hierbei kodieren die V-Gensegmente (V = variable) für den größten Abschnitt der variablen Region.

Insgesamt gibt es etwa 65 V-Gensegmente der schweren Kette, die in sieben Familien (V_H1 - V_H7) zusammengefasst sind. Diese sieben Familien der schweren Kette lassen sich zu drei Sippen, sogenannten Clans, zusammenfassen (V_H1 , V_H5 , V_H7 sowie V_H3 und V_H2 , V_H4 , V_H6) (Cook et al., 1995). Die leichten Ketten werden durch 40 (kappa-Ketten) bzw. 30 (lambda-Ketten) V-Gensegmente kodiert. Sie lassen sich in sieben (kappa) bzw. acht (lambda) Familien zusammenfassen. Innerhalb einer Familie herrschen mindestens 80% Homologie auf Niveau der Nukleotidsequenzen. Die J-Gensegmente (J = joining) kodieren für den Rest der variablen Domäne und verbinden den durch die V-Segmente kodierten Teil mit der konstanten Region. Sie werden bei den schweren Ketten durch insgesamt sechs Gene, bei den leichten Ketten durch fünf (kappa) bzw. vier (lambda) Gene kodiert (Ravetch et al., 1981). Der Übergang von der V- zur J-Region wird als Junktion bezeichnet. Im Bereich der V-J-Junktion liegt der Abschnitt der jeweiligen Kette mit der höchsten Antigenvariabilität. Diese Stelle wird auch als complementarity determining region 3 (CDR3) oder hypervariable Domäne bezeichnet (Abbas, 2003). Die CDRs sind kurze Sequenzabschnitte von circa zehn Aminosäuren (AS) Länge. Pro variabler Domäne gibt es drei CDRs. Da ein Fab-Fragment zwei Polypeptidketten (leicht und schwer) besitzt, enthält dieses somit sechs CDRs. Bei den schweren Ketten gibt es zusätzlich noch D-Segmente (D = diversity), welche zwischen den V- und J-Segmenten eingefügt werden. Sie sorgen für eine weitere Zunahme der Diversität. Insgesamt gibt es 27 Gene, die für D-Segmente kodieren.

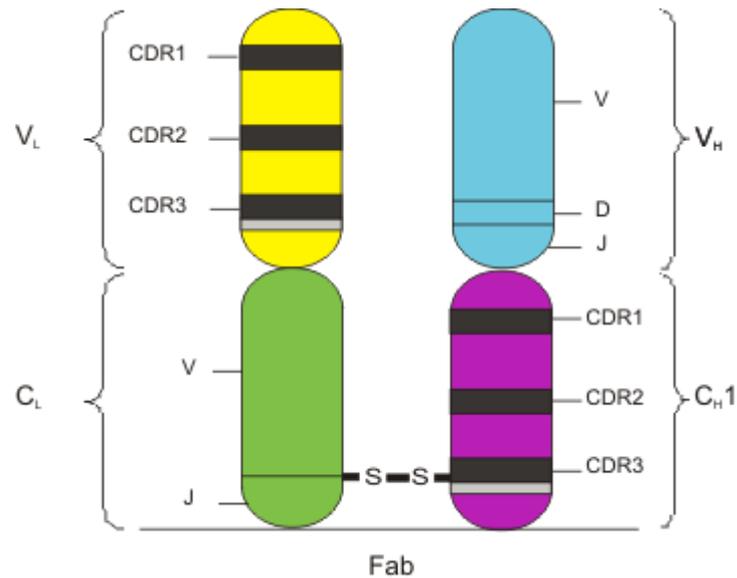


Abbildung 4. Aufbau der Fab-Ketten aus V-, D- und J-Segmenten

In Analogie zu Abbildung 3 sind die leichten Ketten des Fabs in gelb (V_L) und grün (C_L) dargestellt. Sie sind jeweils aus einem V- und einem J-Segment aufgebaut. Dies ist schematisch für die C_L -Kette gezeigt. Die Abschnitte der schweren Kette sind in blau (V_H) und violett (C_H1) abgebildet. Im Bereich der V_H -Kette ist der Aufbau der schweren Ketten aus V-, D- und J-Segmenten eingezeichnet.

In der genomischen DNA liegen die einzelnen Regionen mit den Sequenzen für die V-, D- und J-Segmente weit auseinander. Erst durch verschiedene Umlagerungsprozesse bilden sich durchgehende Exons. Wenn die zusammengesetzte DNA-Sequenz in eine mRNA übersetzt werden kann, die für einen Antikörper kodiert, spricht man von einer produktiven Immunglobulin-Rearrangement-Sequenz. Kann die DNA-Sequenz nicht übersetzt werden, kommt es zunächst zu einem Rearrangement auf einem zweiten Allel. Ergibt dieses ebenso keine produktive Immunglobulin-Rearrangement-Sequenz, kommt es zur Apoptose der entsprechenden Zelle. Insgesamt ist nur etwa jede dritte Umlagerung produktiv, d.h. viele B-Zellen können keine funktionsfähigen Immunglobuline erzeugen.

Ein weiterer Mechanismus, durch den die Diversität des Antikörperrepertoires vergrößert wird, ist die junktionale Vielfalt, die die Variabilität bei der Verknüpfung der einzelnen Gensegmente durch Einfügen von unspezifischen Nukleotiden (sog. Palindrom- oder nontemplated Nukleotide) an der Verknüpfungsstelle bezeichnet (Gauss et al., 1996).

Die Diversität der Antikörper wird ebenso durch die somatische Hypermutation sowie durch Punktmutationen im Bereich der variablen Regionen im Rahmen der Affinitätsreifung in den Keimzentren vergrößert (Wagner et al., 1996). Insgesamt sind $1,8 \times 10^6$ theoretische Kombinationen aus etwa 6000 schweren und 320 leichten Ketten möglich, welche jedoch nicht alle stabile Moleküle ergeben (Le Franc, 2003; Ohlin et al., 2003). Aus der Kombination aller Mechanismen, die für die Antikörperdiversität verantwortlich sind, entsteht ein

humanes Antikörperrepertoire, das etwa 10^{11} verschiedene Antikörperspezifitäten enthält (Janeway et al., 2002).

2.2.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

(Luttmann et al., 2009; Harlow et al., 1998)

Polyklonale Antiseren sind eine Mischung aus verschiedenen Antikörpern, die sich in ihren Epitopspezifitäten unterscheiden. Die Antikörper besitzen alle die gleiche Antigenspezifität, sind aber gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet. Diese Mischpopulation wird, sobald sie in aufgereinigter Form vorliegt, als polyklonaler Antikörper bezeichnet.

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wird ein Versuchstier mit einem Antigen (meist rekombinant in Bakterien oder synthetisch hergestellte Peptide) immunisiert. Je nach Applikation können sowohl verschiedene Antigene als auch verschiedene Spezies verwendet werden. Großer Vorteil dieser Antikörper ist, dass sie das Protein in seiner gefalteten und glykosylierten Form erkennen und sich somit auch für funktionelle Untersuchungen anbieten.

Zur Immunisierung können verschiedene Tierspezies verwendet werden. Die verwendete Spezies sollte von der Homologie des vorliegenden Antigens zu korrespondierenden Proteinen im Tier abhängig gemacht werden. Je höher die Homologie, desto geringer die Antigenität und somit die Ausbeute. Für die Gewinnung polyklonaler Antiseren eignen sich vor allem Kaninchen. Auch Mäuse, Ratten und Ziegen bieten sich an. Die Immunisierung wird mehrfach wiederholt (Boost-Immunisierung). Nach einigen Wochen kann das polyklonale Antiserum entnommen und gereinigt werden.

Polyklonale Antikörper lassen sich auf diese Weise unkompliziert, schnell und kostengünstig gewinnen und bedürfen nicht eines zeitaufwändigen Selektionsverfahrens. Dadurch, dass sie ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern gegen mehrere Epitope eines Antigens darstellen, können die Klone, die unspezifisch binden, ausgeglichen und so trotzdem eine hohe Gesamtspezifität erreicht werden. Dennoch bleibt festzuhalten, dass im Serum der Versuchstiere ebenso Antikörper gegen andere Antigene enthalten sind, die bereits vor der Immunisierung vorhandenen waren oder durch weitere ungewollte Immunisierungen entstanden sind. Der Anteil von gewünschten Antikörpern beträgt nicht mehr als 10%. Häufig ist er deutlich geringer (1%) (Luttmann et al., 2009).

2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

(Luttmann et al., 2009; Harlow et al., 1998; Löffler et al., 2007)

Trotz der vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten von polyklonalen Antikörpern besitzen diese Nachteile, die durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern (mabs) vermieden werden können. Monoklonale Antikörper besitzen im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern eine hohe Epitop-Spezifität, da sie nur von einem B-Zell Klon produziert werden und somit nur gegen ein Epitop gerichtet sind. Unspezifität durch Kreuzreaktionen ist nur in sehr geringem Ausmaß zu erwarten. Desweiteren ist die Produktion eines polyklonalen Antikörpers zeitlich begrenzt und durch stetige Änderungen der Qualität nicht konstant, während die monoklonale Antikörperproduktion zeitlich unbegrenzt ist und auch keine Variabilität der Antikörperspezifität zu erwarten ist. Die Aufreinigung aus Kulturmedium ist deutlich einfacher als die aus Serum, da im Kulturmedium weniger Begleitsubstanzen enthalten sind.

Die Methode zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die sogenannte Hybridomatechnologie, wurde erstmals von Köhler und Milstein (1975) beschrieben. Dazu wird ebenso wie bei der Herstellung polyklonaler Antikörper ein Versuchstier durch Injektion eines Antigens immunisiert. Nach erfolgter Immunantwort in Form von Antikörperbildung werden dem Tier die antikörpersezernierenden Plasmazellen (aus Milz oder Lymphknoten) entnommen. Da diese terminal differenziert sind und nicht mehr die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen, werden sie mit einer Tumorzelllinie fusioniert, wodurch sie immortalisiert werden. Die fusionierten Zellen werden als Hybridzellen bzw. Hybridome bezeichnet. Die Zellhybride sind in der Lage sich unbegrenzt zu vermehren und große Mengen an spezifischen Antikörpern zu bilden. Wird ein Hybrid gefunden, das einen bestimmten Antikörper produziert und sezerniert, kann diese Zelllinie in Kultur stark expandiert werden. Da alle Zellen auf den selektierten Klon zurückzuführen sind, handelt es sich bei allen Zellen der Kultur um identische Kopien. Sie produzieren alle identische Antikörper, von denen theoretisch eine unendlich große Anzahl hergestellt werden kann (Löffler et al., 2007).

2.2.4 Rekombinante Antikörper

Rekombinante Antikörper werden *in vitro* in Bakterien oder kultivierten Zellen hergestellt, d.h. ohne Immunisierung und Verwendung eines Versuchstieres (Schmiedl et al., 2004). Hauptsächlich werden rekombinante Antikörper durch Selektion aus Antikörpergenbibliotheken gewonnen, welche eine große Vielfalt an Antikörpergenen enthalten. Die Protein-

biosynthese der ausgewählten Antikörper kann in Bakterien, d.h. einem Organismus der unkompliziert und preisgünstig kultiviert werden kann, erfolgen. Dies hat weitere Vorteile: Da die DNA-Sequenz rekombinanter Antikörper bekannt ist, können sie zu jedem Zeitpunkt erneut von Bakterien produziert werden. Im Gegensatz zur Herstellung monoklonaler Antikörper müssen keine Kulturen mit den produktivsten Klonen aufrecht erhalten werden. Rekombinante Antikörper können in unbegrenzten Mengen produziert werden und sind stets in gleicher Form und unbegrenztem Maß verfügbar.

Zusätzlich können Spezifität, Affinität und Stabilität von Antikörpern durch gezielte genetische Manipulation verändert werden oder definierte Fusionen an beliebige Komponenten wie Radioisotope, Enzyme oder Toxine vorgenommen werden. Auch die Herstellung von Antikörpern mit mehreren Spezifitäten (z.B. bi- oder trispezifische Antikörper) ist möglich. Ein weiterer Vorteil der rekombinanten Antikörper besteht darin, dass Antikörpergenbibliotheken auch gegen Antigene getestet werden können, die *in vivo* z.B. wegen ihrer Tertiärstruktur oder intrazellulären Lage schwer zugänglich sind oder auf Grund ihrer schädigenden Wirkung nicht als Antigen für Immunisierungsversuche zur Verfügung stehen (z.B. tödliche Pathogene, hochgiftige Substanzen) (Dübel et al., 1997; Schmiedl et al., 2004).

Durch die Verwendung rekombinanter Antikörper entstehen maßgeschneiderte Antikörper für Forschung, Diagnostik und Therapie mit erweiterten, neuartigen Funktionen, die natürliche Antikörper nicht besitzen (Dübel et al., 1997). Durch die Verwendung von humanen Antikörpergenbibliotheken erhält man humane Antikörper, die im therapeutischen Einsatz im Gegensatz zu murinen monoklonalen Antikörpern keine unerwünschten humanen anti-Maus Immunantworten (HAMA) auslösen. Rekombinante Antikörper werden in vielen diagnostischen und therapeutischen Bereichen (Lee et al., 2009) eingesetzt. Hier sind v.a. hämatoonkologische Krankheiten (z.B. Rituximab bei CD20 positiven B-Zell-Lymphomen; McLaughlin et al., 1998) sowie Autoimmunerkrankungen (z.B. Adalimumab bei Rheumatoider Arthritis; Pap, 2010) zu nennen.

Zunehmend werden rekombinante Antikörper auch für Studien von Protein-Protein-Interaktionen verwendet (O'Brien et al., 2002).

Rekombinante Antikörper können auf verschiedenen Wegen gewonnen werden. So besteht z.B. die Möglichkeit mittels *in vivo* Bibliotheken menschliche Antikörper in transgenen Mäusen zu gewinnen, die einen menschlichen IgG-Lokus besitzen. Dazu wird der humanisierten Maus das jeweilige Antigen injiziert und die Antikörper mittels konventioneller Hybridomatechnologie selektioniert und produziert (Jakobovits, 1995; Lonberg et al., 1995; Fishwild et

al., 1996). Diese Vorgehensweise hat jedoch ebenso wie die Herstellung monoklonaler Antikörper in menschlichen Hybridomazellen den Nachteil, dass es nicht möglich ist, Antikörper gegen toxische, hochpathogene oder nicht-immunogene Antigene zu gewinnen.

Daher ist die geläufigste Methode zur Herstellung rekombinanter Antikörper die Verwendung von Antikörpergenbibliotheken in Kombination mit einem *in vitro* Selektionsprozess. Am meisten verbreitet ist derzeit das „Phagen-Display“, bei dem Antikörperfragmente (Fabs, scFvs) auf der Oberfläche filamentöser Phagen (M13) exprimiert werden.

Das Phagen-Display wurde erstmalig Mitte der achtziger Jahre beschrieben (Smith, 1985). Für die Erstellung einer Phagenbibliothek können verschiedene Phagen benutzt werden. Am häufigsten ist der Gebrauch von filamentösen Bakteriophagen (M13, fd, f1, ft) und Phagemiden (Bradbury et al., 2004), aber auch die Verwendung von T7- (Houshmand et al., 1999) und lambda-Phagen (Mikawa et al., 1996) wurde beschrieben. Vorteil der filamentösen Bakteriophagen ist, dass sie eine Vielzahl von Bakterien infizieren ohne diese zu lysieren und somit ihren Wirt zu töten. Hauptsächlich wird das Phagen-Display zur Gewinnung von Antikörpern aus großen Antikörperbibliotheken (McCafferty et al., 1990; Sheets et al., 1998; de Haard et al., 1999; Sblattero et al., 2000) sowie zur Verbesserung der Bindungsaffinitäten von Hormonen (Lowman et al., 1993) und anderen Proteinen (z.B. Bradbury et al., 1995; Lowman, 1997; Hoogenboom et al., 1998; Bradbury et al., 2003) verwendet. Bei den *in vitro* Antikörperbibliotheken unterscheidet man zwischen naiven und immunisierten Bibliotheken. Die naiven Antikörperbibliotheken werden sowohl aus natürlichen, nicht immunisierten „rearrangierten“ V-Genen (Marks et al., 1991; Vaughan et al., 1996; Sheets et al., 1998; de Haard et al., 1999; Sblattero et al., 2000), synthetischen humanen V-Genen (Griffiths et al., 1994; Nissim et al., 1994; de Kruif et al., 1995a; Knappik et al., 2000), sowie aus gemischten V-Genen (Soderlind et al., 2000) gewonnen. Immunisierte Antikörperbibliotheken sind dagegen aus V-Genen von immunisierten Menschen (Zebedee et al., 1992; Williamson et al., 1993) bzw. Mäusen (Orum et al., 1993; Ames et al., 1995) aufgebaut.

Als Ausgangspunkt für die Gewinnung der Fabs im Rahmen dieser Arbeit diente eine Phagenbibliothek, die aus humanem Milzgewebe gewonnen wurde und ein sehr großes, naives Fab-Repertoire mit einer Diversität von $3,7 \times 10^{10}$ aufweist (de Haard et al., 1999). Das Ausmaß der Diversität der Phagenbibliothek spiegelt sich in der großen Sequenzvariabilität der drei compability determining regions (CDR-Regionen) der schweren Kette wieder (Chen et al., 2008). Aufgrund der großen Diversität ist eine Selektion von spezifischen Antikörper-

fragmenten für beinahe jedes Antigen möglich (de Haard et al., 1999). Hust und Dübel (2005) geben einen Überblick über 28 humane „single pot“ Phagenbibliotheken. Von diesen ist die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Phagenbibliothek die zweitgrößte.

Die verwendete Phagen-Display-Bibliothek enthält eine Mischung von Phagenklonen, die alle unterschiedliche Fab-Antikörpergene besitzen und daher auch unterschiedliche Antikörper tragen. In Abbildung 5 ist das Schema eines M13-Phagen abgebildet.

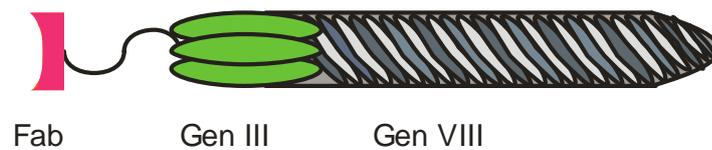


Abbildung 5. Phagen-Hüllprotein mit Fab

Auf das Haupthüllprotein Gen VIII (graue Kordel) folgt das endständige Phagenprotein Gen III (gIII, grün), an dessen N-Terminus der entsprechende Fab-Antikörper (rosa) als Fusionsprotein gebunden ist.

Das Gen III-Protein ist 406 Aminosäuren lang und kommt in drei bis fünf Kopien am infektiösen Ende des Phagen vor. Das Gen III-Protein spielt bei der Infektion von Bakterien eine wesentliche Rolle. Hierbei ist v.a. das Anheften des N-terminalen Endes des Gen III-Proteins an den F-Pilus des Bakteriums zu nennen (Lubkowski et al., 1999; Karlsson et al., 2003). C-terminal ist das Gen III-Protein an der Phagenhülle befestigt.

Für die Expression der Antikörperfragmente (Fabs) auf der Phagenoberfläche werden die für die Fabs kodierenden Gene vor das Gen des gIII in ein Phagemid kloniert. Ein Phagemid ist ein Plasmid, auf dem das Gen III-Protein kodiert wird und das sowohl einen Plasmid- als auch einen Phagen-Replikationsursprung besitzt (Breitling et al., 1991; Dübel et al., 1993; McCafferty et al., 1990). Neben dem Hüllgen wird am 5'-Ende eines jeden Phagemids zusätzlich eine Signalpeptidase eines bakteriellen Zellsekretionsapparates kodiert, die eine Antibiotika-Resistenz darstellt. Somit können durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums erfolgreich transfizierte *E. coli*-Bakterien identifiziert werden. Die Vermehrung von Phagemiden in einer Wirtszelle geschieht durch die Ausbildung doppelsträngiger Plasmidmoleküle. Da den Phagemiden jedoch der restliche genetische Phagen-Bauplan (Informationen für die Replikation der einzelsträngigen DNA sowie Bildung der übrigen Hüllproteine) fehlt, sind sie auf die Superinfektion mit sogenannten „Helferphagen“ angewiesen (Vierira und Messing, 1987). Bei den Helferphagen handelt es sich um Phagen, die einen genetisch veränderten Replikationsursprung haben. Da der Replikationsursprung des Helferphagen

defekt ist, werden zum Aufbau der Phagenpartikel zwar vorrangig Hüllproteine des Helferphagen verwendet, in der Regel aber das Phagemid-Plasmid verpackt. Die anschließende Sekretion der fertigen infektiösen Phagen ins Periplasma der *E. coli*-Bakterien erfolgt in der Regel über die PelB-Signalsequenz der Pektat-Lyase aus dem Enterobakterium *Erwinia carotovora* (Lei et al., 1987) des Phagemids.

Für die Selektion eines Peptid-spezifischen Antikörpers wird die Phagen-Bibliothek mit dem Peptid, gegen das man einen Antikörper isolieren möchte, gescreent. Dazu wird das biotinylierte Peptid gemeinsam mit den Phagen inkubiert. Durch Zugabe magnetischer Streptavidin Beads und Anlegen eines Magnetfeldes können die Peptide und mit ihnen die gebundenen Phagen immobilisiert werden. In den folgenden Waschschrritten werden nur Phagen abgewaschen, die sehr schwach oder gar nicht gebunden haben. Phagen, die am Antigen haften bleiben, können daraufhin eluiert werden.

Diese Selektionen sollten zwei bis dreimal wiederholt werden um die Zahl der unspezifischen Bindungen so gering wie möglich zu halten. Das Prinzip der Selektionen zeigt Abbildung 6.

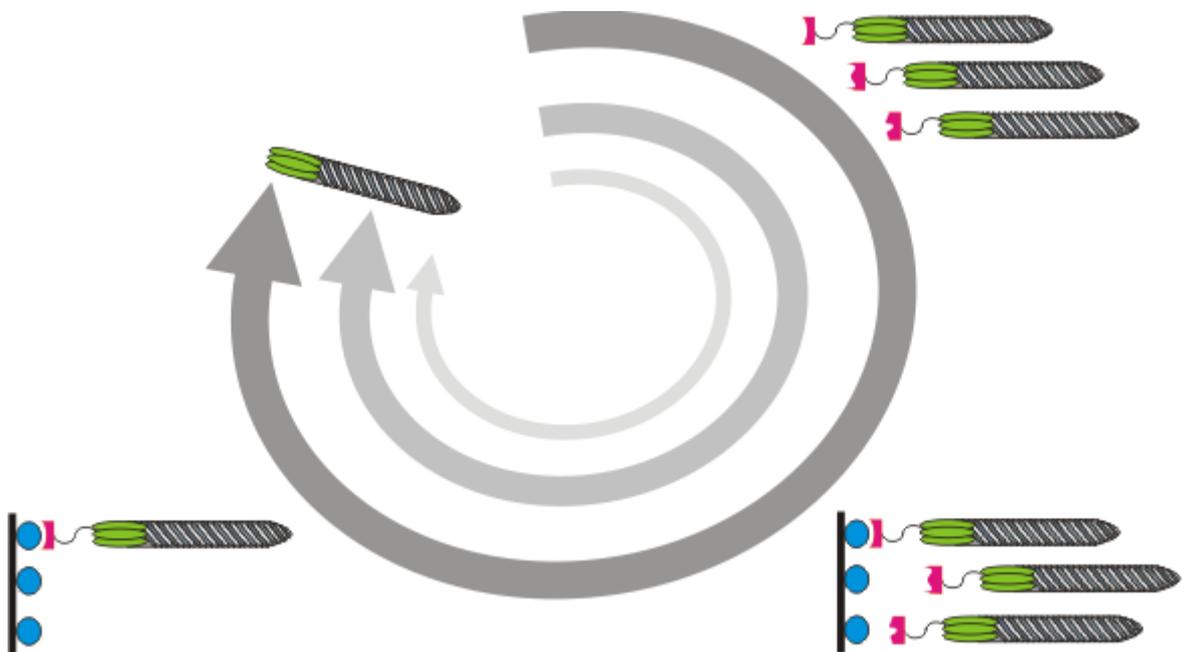


Abbildung 6. Selektionsrunden Phagen-Display

Zu Beginn liegt die gesamte Diversität der Phagen-Bibliothek vor – hier exemplarisch dargestellt durch die Phagen-Hüllproteine mit jeweiligem Fab (rechts oben). Die unterschiedli-

chen Fabs (rosa) sind durch unterschiedliche graphische Formen symbolisiert. Nach Zugabe des Antigens (blau) bindet nur der Fab mit der passenden Antigenbindungsstelle (rechts unten). Phagen mit Fabs, die nicht gebunden haben, werden abgewaschen (links unten). Durch Inkubation mit der Protease Trypsin wird die Verbindung zwischen Fab und Phagenhüllprotein getrennt. Der eluierte Phage kann nun für die Infektion von TG1-Bakterien verwendet werden, wodurch eine Amplifikation der selektierten Phageklone ermöglicht wird. Dieses Vorgehen wird mehrmals wiederholt. Insgesamt finden drei bis vier Selektionsrunden statt.

Bisher wurde das Phagen-Display noch nicht zur Gewinnung von Antikörperfragmenten gegen TRP-Proteine eingesetzt. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Antikörpern, die die TRP-Kanalaktivität beeinflussen können, handelt es sich ausschließlich um polyklonale Antikörper. Der Versuch von Klionsky et al., aus den Seren immunisierter Kaninchen einen monoklonalen Antikörper mit den gleichen Funktionen zu entwickeln, war nicht erfolgreich (Klionsky et al., 2006).

Im Gegensatz zu den von Xu et al. (2005) sowie Naylor et al. (2008) beschriebenen, an der E3-Schleife angreifenden, Antikörpern gegen TRPC5 bzw. TRPM3, könnte die Verwendung von Antikörperfragmenten jedoch einige Vorteile haben: Zum einen sind die Fabs rekombinante Antikörper und besitzen die in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Vorzüge gegenüber den von den anderen Arbeitsgruppen verwendeten poly- und monoklonalen Antikörpern. Zum anderen sind Fabs kleiner als die dreimal größeren IgG-Antikörper (siehe Abbildung 3). Dadurch könnten sie sterische Vorteile besitzen, besser in die Kanalpore passen und dort „effektiver“ angreifen als IgG-Antikörper (siehe Abbildung 7).

2.3 Ziele dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war die Gewinnung spezifischer Antikörper gegen verschiedene TRP-Kanäle. Mit dem Ziel die Kanalproteine zu beeinflussen wurden Fab-Antikörper gegen die beschriebenen intra- bzw. extrazellulären Abschnitte von TRPM1, M3, C4 und C5 entwickelt. Zwar gibt es bereits Antikörper, die die TRP-Kanalaktivität verändern können, jedoch ist mit diesen Antikörpern eine gezielte Beeinflussung der Funktion zur Charakterisierung der Kanalproteine und ihrer Ströme nur begrenzt möglich.

Da aktuell keine Antikörper existieren, die spezifisch und zuverlässig die Funktion von TRP-Kanälen modulieren, entstand die Idee, Fabs (fragment antigen binding) zu identifizieren, die gegen spezifische Sequenzen von TRP-Kanälen gerichtet sind, jedoch auf Grund des fehlenden F_c-Teils kleiner als „herkömmliche“ Antikörper sind und somit sterische Vorteile bieten könnten.

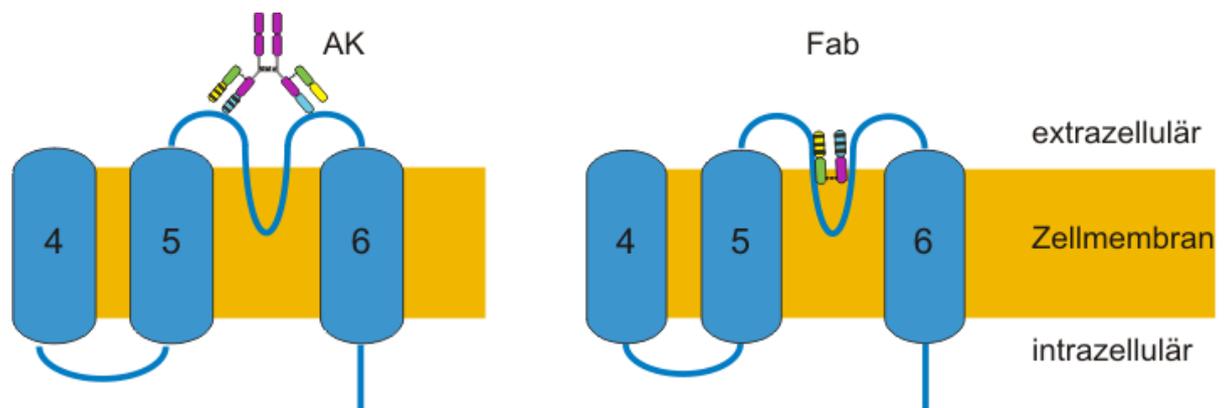


Abbildung 7. Fab-Fragmente erreichen Abschnitte der Kanalpore, die für IgG-Antikörper nicht zugänglich sind. Ausschnitt der Region um die Kanalpore eines TRP-Kanals. Links: Antikörper, rechts: Fab

Abbildung 7 beschreibt die Hypothese, dass die Fabs in die Kanalpore eindringen können und, im Gegensatz zu den dreimal größeren IgG-Antikörpern, direkt dort binden. In Abbildung 7 ist jeweils die Region rund um die Kanalpore eines TRP-Kanals dargestellt. Der linke Teil der Abbildung zeigt einen IgG-Antikörper, der auf Grund seiner Größe nur unzureichend die Porenregion des TRP-Kanals erreicht. Rechts ist ein Fab dargestellt, der bis in tiefere Abschnitte der Kanalpore dringt und dort mit einem antigenen Epitop in Interaktion tritt.

Es wurden sowohl Fabs gewonnen, die gegen extrazelluläre Sequenzabschnitte im Bereich der Kanalpore (E3-Schleife) gerichtet sind (siehe Abbildung 7), als auch Fabs, die an intrazelluläre Sequenzabschnitte im Bereich des S4-S5-Linkers binden. Die erhaltenen Antikörper sollen eine Kanalblockierung (extrazelluläres Epitop; mechanische Blockade der Kanalpore) bzw. eine konstitutive Kanalaktivierung (intrazelluläres Epitop im S4-S5 Linker; sterische Blockade der Inaktivierung) bewirken.

Mittels Phagen-Display wurden viele unterschiedliche Fabs isoliert. Für die Durchführung funktioneller Untersuchungen müssen aus dieser Vorauswahl in einem weiteren Schritt geeignete Klone identifiziert werden. Die Erfolgsrate weiterführender Experimente, wie beispielsweise FURA oder Patch-Clamp erhöht sich, wenn Fabs verwendet werden, die bereits

in Vorversuchen gute Ergebnisse zeigten. Desweiteren binden einige Fabs an Epitope, die nicht spezifisch für einen TRP-Kanal sind, sondern in mehreren Proteinen einer TRP-Unterfamilie vorhanden sind. Daher wurden Untersuchungen mit den Fab-Antikörpern durchgeführt, um diese hinsichtlich Sensitivität und Selektivität zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die nachstehenden Ziele verfolgt:

- **Herstellung biotinylierter Peptide**
Zur Selektion TRP-spezifischer Fabs werden zunächst geeignete antigene Sequenzabschnitte der TRPM- und TRPC-Proteine ausgewählt. Nach Entwicklung einer geeigneten Klonierungsstrategie werden Peptide hergestellt, die aufgrund ihrer Biotin-Akzeptor-Domäne (BAD) bereits während der Expression in Bakterien biotinyliert werden und somit anschließend im Phagen-Display als Antigene zur Selektion eingesetzt werden können.
- **Selektion TRP-spezifischer Fabs**
Die entsprechenden Peptide werden als Antigene bei der Selektion der Phagenbibliothek verwendet. Die nach mehreren Selektionsrunden erhaltenen Fabs werden mit Hilfe von Bakterien in größeren Mengen exprimiert und aufgereinigt.
- **Test auf Spezifität und Sensitivität**
Die gewonnenen Fabs werden mittels ELISA untersucht. Somit kann eine erste Reduktion der Antikörperfragmente auf die Klone mit hoher Spezifität und Sensitivität gegenüber den entsprechenden TRP-Proteinen erfolgen. Identische Klone werden nach Sequenzierung ermittelt.
- **Weitere Charakterisierung der Fabs**
Durch nachfolgende Peptid-Spot-Analysen werden die minimal benötigten Epitope der Antikörperfragmente identifiziert. Schlecht bindende Fabs oder Fabs, die auch an Epitope anderer Kanalproteine binden, werden aussortiert. Fokussiert auf diese Auswahl von Fabs kann deren Bindungsverhalten mittels weiterer Western-Blot Untersuchungen (Zelllysate, Immunpräzipitation) und zellfärbender Analysen (FACS, Immunzytochemie) charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Molekularbiologische Experimente

3.1.1 Bakterienstämme

3.1.1.1 *E. coli* AvB101

E. coli AvB101 ist ein *E. coli*-B Stamm (*hsdR*, *lon11*, *sulA1*), der das pBirAcm-Tag enthält. PBirAcm ist ein modifiziertes pACYC184-Plasmid, das ein IPTG-induzierbares BirA-Gen enthält, welches zur Überexpression der Biotinligase dient. Der AvB101-Stamm ist mit den meisten Klonierungsvektoren kompatibel und kann auf Grund seines stabilen Wachstums und der Abwesenheit von OmpT- und Lon-Proteasen zur Proteinexpression verwendet werden.

Für diese Arbeit wurde der AvB101-Stamm zur Proteinexpression biotinylierter Peptide verwendet.

3.1.1.2 *E. coli* TG1

Chromosomaler Genotyp: SupE *hsd*Δ5 *thi* Δ(*lac-proAB*), Plasmide: F'[traD36 pro AB⁺ *lacI*^q *lacZ*ΔM15]

E. coli TG1 ist ein Eco-K-Derivat von JM101, welches die transfizierte DNA weder abändert noch schneidet. Bakterien des TG1-Stammes unterstützen die Transkription von Plasmiden, die ein Amber-Codon tragen (siehe 3.1.2). Die Bakterien des TG1-Stammes wurden im Rahmen des Phagen-Displays eingesetzt sowie für Klonierungsexperimente mit dem pCES-Vektor (Sambrook et al., 1989).

3.1.1.4 Aufbewahrung

Die Bakterienstämme lagen als kompetente Zellen vor und konnten direkt zur Transformation verwendet werden. Zur Aufbewahrung wurden die Flüssigsuspensionen mit Glycerol (Endkonzentration 30%) versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.1.1.5 Antibiotika

Ampicillin

Ampicillin ist ein β-Lactam-Antibiotikum aus der Gruppe der Aminopenicilline. Es wirkt durch Hemmung der D-Alanin-Transpeptidase, welche zur Synthese der Zellwand nötig ist,

bakterizid. Somit kann Ampicillin als Selektionsmittel eingesetzt werden, da nur Bakterien mit einem Ampicillin-Resistenzgen überleben können. Dieses wird mit der Transformation eines Plasmids auf die Bakterien übertragen. Ampicillin wurde dem entsprechenden Medium in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugefügt. Die Aliquots des Antibiotikums wurden bei -20 °C gelagert.

Kanamycin

Kanamycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum aus Streptomyceten (*Streptomyces kanamyceticus*). Es durchdringt die bakteriellen Zellmembranen und lagert sich an die 30S-Untereinheit membranassoziierter Ribosomen an. Damit hemmt es die bakterielle Proteinsynthese. Ebenso wie Ampicillin kann es in der Molekularbiologie als Selektionsantibiotikum verwendet werden. Kanamycin wurde in dieser Arbeit im Rahmen der Phagen-Display Methodik verwendet. Aufgrund der Kanamycin-Resistenz der eingesetzten Helferphagen konnten diejenigen Bakterien selektioniert werden, die die Helferphagen aufgenommen hatten. Die Kanamycin-Endkonzentration im entsprechenden Medium betrug 20 µg/ml.

3.1.2 pCES-1-Vektor (Dyax)

Der pCES-1-Vektor wurde von der Arbeitsgruppe PD Dr. Gerhard Held zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um einen Phagemidvektor, der alle wichtigen Funktionen zur Klonierung von humanen Antikörperfragmenten (Fabs) enthält. Der Vektor besitzt einen lacZ-Promotor sowie die Gene für die humanen C_{kappa} und CH₁-Ketten. Die Expression von Fab-Fragmenten inklusive der V_L und V_H-Ketten wird ermöglicht durch Einfügen der entsprechenden Sequenzen zwischen die Restriktionsschnittstellen ApaI und XhoI bzw. SfiI und BstEII. Am 3'-Ende der CH₁-Kette, hinter der NotI-Schnittstelle, befinden sich ein Hexahistidin- sowie ein myc-Tag, welche zur Aufreinigung der Antikörperfragmente hilfreich sind (Hochuli et al., 1988; Munro et al., 1986). Weiter in 3'-Richtung befindet sich der Übergang zum Phagen-Protein gIII (siehe Kapitel 2.2.4). Am Übergang des C-Terminus des Antikörpers hin zum Phagen-Protein gIII befindet sich ein Amber-Codon (Hoogenboom et al., 1991). Dieses erlaubt die Herstellung der Antikörper als lösliches Fragment, ohne dass das Gen erneut rekloniert werden muss (Abbildung 8).



Abbildung 8. Schema "Amber-Codon" zwischen Fab und Gen III-Protein (gIII)

Das Amber-Codon, benannt nach seinem Erstbeschreiber Harris Bernstein (amber = *engl.* für Bernstein), wird durch das Basentriplet TAG kodiert. Dieses Basentriplet stellt ebenso wie das Ocher- und das Opal-Codon in der Regel ein Nonsense-Codon (Stopp-Codon) dar, durch das die Translation abgebrochen wird. Durch die Verwendung von Suppressorstämmen, die tRNA-Moleküle mit verändertem Anticodon enthalten, kann jedoch eine Übersetzung in eine Aminosäure stattfinden. Bakterien mit supE-mutierter tRNA (Suppressorgen glnV/supE) übersetzen das Amber-Codon (TAG) mit der Aminosäure Glutamin und fügen diese in die Aminosäuresequenz ein (Knippers, 2006). Für die Herstellung der Fabs ist dies von folgender Bedeutung: Solange die Fabs an die Phagen gebunden sind, sollten möglichst supE-mutierte Bakterien verwendet werden (Brenner und Stretton, 1964). Dadurch wird ermöglicht, dass die Sequenz des Phagenhüllproteins gIII, die kein eigenes Startcodon besitzt, ebenfalls abgelesen werden kann. Da die Expression des Amber-Codons unter Kontrolle des lacZ-Promotors ist, kann über diesen gesteuert werden, ob die Antikörper an Phagen gebunden oder als lösliche Antikörper hergestellt werden. Wählt man hohe Glukosekonzentrationen wird das lacZ-System herunter reguliert, wodurch die Bakterien sensibler für Helferphagen werden und mit deren Hilfe Antikörperfragmente bilden, die an das gIII-Protein gekoppelt sind (siehe Kapitel 2.2.3). In dieser Arbeit wurden dazu *E. coli* Bakterien des TG1-Stammes verwendet. Für die Produktion der löslichen Fab-Antikörper hingegen ist die Übersetzung als Stopp-Codon erwünscht, so dass nur der Antikörper produziert wird. Durch die Induktion mittels IPTG in Abwesenheit von Glukose wird das lacZ-System induziert, das Amber-Codon als Stopp-Codon verwendet, und es werden vornehmlich lösliche Antikörper gebildet.

Für diese Arbeit wurde der pCES-1-Vektor (Abbildung 9) für das Phagen-Display, die Herstellung der Fabs sowie zur Klonierung von biotinylierten Fusionsproteinen verwendet.

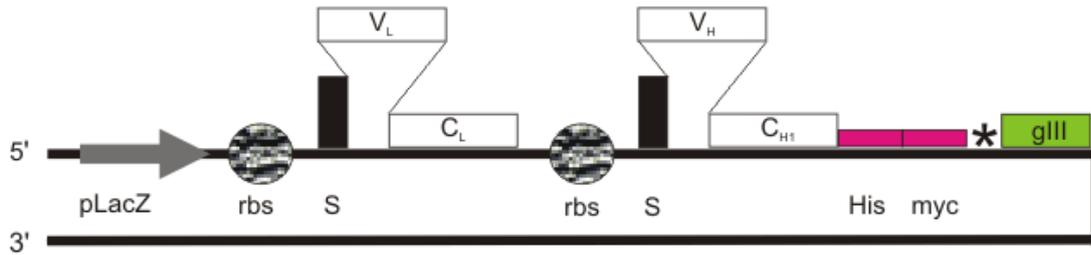


Abbildung 9. pCES-Klonierungsvektor

Das Operon ist unter Kontrolle des LacZ-Promotors (grauer Pfeil). Jeweils vor der leichten und der schweren Kette ist die ribosomale Bindungsstelle (rbs) kodiert. Vor der variablen Region der jeweiligen Kette befindet sich eine Signalsequenz (S). Am 3'-Ende der C_{H1}-Kette befinden sich ein Hexahistidin- sowie ein myc-Tag, gefolgt vom Ambercodon (*). Es folgt der Übergang zum Phagen-Protein gIII.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.3.1 Prinzip der PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wird heute als etablierte Technik zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Erstmals beschrieben wurde die PCR 1983 (Mullis et al., 1983).

Der PCR liegt folgendes Prinzip zu Grunde: In sich wiederholenden und gleich ablaufenden Zyklen wird der vorliegende DNA-Doppelstrang (Template DNA) amplifiziert. Der erste Schritt ist die sogenannte Denaturierung. Hierbei wird die Template DNA bei einer Temperatur von über 90 °C durch Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen in Einzelstränge getrennt. Vor dem ersten Zyklus findet häufig eine längere initiale Denaturierung statt. Somit wird sichergestellt, dass die Ausgangs-DNA sowie die vorliegenden Primer vollständig getrennt vorliegen. Das anschließende Anlagern der sequenzspezifischen Primer an das DNA-Template bezeichnet man als Annealing. Die hierbei herrschende Temperatur ist abhängig von der „Schmelztemperatur“ („melting temperature“) der Primer. Für jedes Adenin und Thymin werden 2 °C, für jedes Guanin und Cytosin jeweils 4 °C berechnet. Die Annealingtemperatur liegt meist 2-5 °C unterhalb der Schmelztemperatur, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Im dritten Schritt, der Elongation, findet die Synthese des komplementären DNA-Strangs durch hitzestabile DNA-Polymerase statt. Die verwendete Phusion-Polymerase (siehe Kapitel 3.1.3.3) benötigt pro 1000 Basen 20 Sekunden. Abhängig von der verwendeten Matrize kann so die Elongationszeit bestimmt werden. Im Idealfall wird die DNA-Menge nach jedem Zyklus verdoppelt, so dass eine exponentielle DNA-Amplifikation stattfindet.

3.1.3.2 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Tabelle 2) wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon (Ebersberg) synthetisiert, aufgereinigt (High Purity Salt Free, HPSF) und im lyophilisierten Zustand verschickt. Vor Gebrauch wurden die Primer in Aqua dest. aufgenommen (10 pmol/ μ l).

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
1	SL 57 (M1 forw)	CAT GCC ATG GCG CCA CTG GGA AGC CTG
2	SL 58 (M1 rev)	CCG GAA TTC ACC CAG TTG AGC AGC
3	SL 59 (C5 forw)	CAT GCC ATG GCG CTT TAC TTT TAC TAT GAG AC
4	SL 60 (C5 rev)	CCG GAA TTC AGG GAG ATG ACG TTG TAT G
5	pET22b forw	GCG GAT AAC AAT TCC CCT C
6	pET22b rev	CCC CTC AAG ACC CGT TTA G
7	VO1	GGC GGC GGC TCT GGT G
8	VO2	GCC CGA GAT AGG GTT GAG TG
9	VO3	CAG CGG TAA GAT CCT TGA GAG
10	VO4	CCA CCG CTA CCA GCG GTG
11	pCESM1 for	AAT TAT GTG CAC AGA TGG CGC CAC TGG GAA GC
12	pCESC5 for	AAA TAT GTG CAC AGA TGG CGC TTT ACT TTT ACT ATG AG
13	pCESM1/C5 rev	ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGT GGT GGT GGT GGT GG
14	pCES rev o Stopp	ATA AGA AAT GCG GCC GCG TGC CAT TCG ATT TTC TGA GC
15	M13 rev	AAC AGC GAT GAC CAT G
16	pCES rev	CCT TTC TAT TCT CAC AGT GCA CTT
17	CH1 3' (rev)	TGG ACG CCG CTG GTC AGG GC
18	CH1 5' (forw)	GCC CTG ACC AGC GGC GTC CA
19	Fd tet 25	TTT GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT

Tabelle 2. Verwendete Primer

3.1.3.3 Verwendete Polymerasen und PCR-Programme

Phusion-Polymerase

Phusion-Polymerase, HF-Puffer und dNTPs wurde von der Firma Finnzymes (Espoo, Finnland) bezogen.

Die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase hat eine hohe Prozessivität von ungefähr 1.000 bp in 20 Sekunden sowie eine geringe Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$ in HF-Puffer). Bei der verwendeten Phusion-Polymerase handelt es sich um eine Hybridpolymerase, bei der die Pyrococcus DNA-Polymerase mit einer Doppelstrang-DNA-bindenden Domäne fusioniert wurde. Dadurch wird die Affinität der Polymerase für doppelsträngige DNA und damit ihre Effizienz erhöht. Desweiteren kann die Phusion-Polymerase bei Temperaturen von bis zu 98 °C ein-

gesetzt werden. Da sie DNA-Fragmente mit glatten Enden erzeugt, was die Klonierung in passende Vektoren erleichtert, wurde die Phusion-Polymerase in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung von PCR-Fragmenten für Klonierungsexperimente verwendet.

- Protokoll für eine PCR-Reaktion mit der Phusion-Polymerase:
 - 5-500 ng Matrizen-DNA
 - 2,5 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
 - 2,5 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl)
 - 10 µl HF-Puffer
 - 1 µl dNTPs
 - 0,5 µl Phusion-Polymerase (2 U/µl)
 - Aqua dest. ad 50 µl Gesamtvolumen
- Beispiel für einen PCR-Zyklus (Amplifizierung des TRPM1-Fragments):
 1. 98 °C 1 min (Denaturierung)
 2. 98 °C 5 s (Denaturierung)
 3. 58 °C 10 s (Annealing)
 4. 72 °C 10 s (Elongation)
 5. Abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2 bis 4 wurden dreißigmal wiederholt.

Taq-Polymerase

Die verwendete Taq-Polymerase wurde in unserer Arbeitsgruppe hergestellt. Sie wurde ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert (Engelke et al., 1990). Ihre maximale Enzymaktivität liegt im Bereich von 68-73 °C. Ihr Vorteil besteht neben der Hitzestabilität auch in einer hohen Prozessivität (Synthese von 1000 Basen in 30 Sekunden). Als nicht unbedeutender Nachteil der Taq-Polymerase ist die fehlende 3'-5'-Proofreading-Aktivität zu nennen. Somit werden unter anderem die unspezifisch an das 3'-Ende gehangenen Adenosinreste nicht wieder eliminiert. Insgesamt hat die hitzestabile Polymerase eine hohe Fehlerrate von 4×10^{-3} pro Zyklus. Daher wurde die Taq-Polymerase im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Klonierungsexperimente, sondern nur zum Nachweis der TRP-kodierenden DNA mittels Kolonien-PCR (3.1.3.4) verwendet.

Für die Fingerprint-PCR (3.2.3) wurde eine Taq-Polymerase der Fa. Fermentas verwendet. Sie hat eine Fehlerrate von $2,2 \times 10^{-5}$ Fehler pro Nukleotid und Zyklus.

3.1.3.4 Kolonien-PCR

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung der Fragmente (TRPM1 bzw. TRPC5 mit der BAD) in den pCES-Vektor wurde die Kolonien-PCR verwendet.

- Protokoll für die Kolonien-PCR:

3 µl	Taq-Puffer
1,5 µl	forward Primer (SL57 10 pmol/µl)
1,5 µl	reverse Primer (SL58 10 pmol/µl)
0,6 µl	dNTPs
0,6 µl	Taq-Polymerase
22,8 µl	Aqua dest. ad 30 µl

Zur Durchführung der PCR wurde Zellmaterial von Einzelkolonien mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers direkt in das vorbereitete PCR-Reaktionsgemisch überführt. Mit geeigneten Primern (SL57 und SL58) konnten die gesuchten Fragmente amplifiziert werden.

- Thermocycler-Protokoll

1. 94 °C	3 min	(Denaturierung)
2. 94 °C	30 s	(Denaturierung)
3. 56 °C	30 s	(Annealing)
4. 72 °C	15 s	(Elongation)
5. 72 °C	2 min	(Elongation)
6.	Abkühlen auf 4 °C	

Die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich aufgrund der Eigenschaft ihrer Nukleotide als Polyanionen in einem elektrischen Gleichspannungsfeld mittels Agarosegelen nach ihrer Molekülgröße und Ladung auftrennen (Sharp et al., 1973). Die verwendete Agarosegelkonzentration ist abhängig von der Molekülgröße. Für diese Arbeit wurden DNA-Fragmente zwischen 170 und 6.000 bp analysiert. Daraus ergaben sich Agarosegelkonzentrationen von 0,8% und 2%. Zur Herstellung der Agarosegele wurde eine entsprechende Menge an Agarose in entsprechendem Volumen (abhängig von der Konzentration des Geles) 1x TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erwärmt, bis sich eine klare, einheitliche Suspension ergab. Diese kühlte unter ständigem Rühren auf etwa 50 °C ab und wurde nach der Zugabe von Ethidiumbromid (0,05

µg/ml) in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Der Fluoreszenzstoff Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Doppelstränge und ist notwendig um die DNA später im UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar zu machen.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken. In die Geltaschen wurde ein Probevolumen von 10-100 µl sowie 1/10 des Volumens an DNA-Auftragspuffer (Blaumarker) pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenmarker (puC18 bzw. M9) aufgetragen. Diese dienten dazu, die Größe der untersuchten DNA-Fragmente abschätzen zu können.

- pUC18: 65 - 75 - 220 - 396 - 517 - 1.412 kb
- M9: 348 - 469 - 1.138 - 1.326 - 2.088 - 3.334 - 4.724 - 6.100 - 9.745 kb

Durch Anlegen einer Spannung von anfangs 80V und später 120V wurden die im Gel befindlichen DNA-Fragmente aufgetrennt. Das Ergebnis konnte unter UV-Licht betrachtet und durch Fotoaufnahmen festgehalten werden.

3.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mit dem oben beschriebenen Prinzip der Auftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer Molekülgröße und Ladung können gewünschte DNA-Fragmente isoliert und für weitere Klonierungen verwendet werden. Um die Intaktheit der DNA zu wahren, wurde das Agarosegel nach der elektrophoretischen Auftrennung unter schonenderem UV-Licht ($\lambda = 366\text{nm}$) betrachtet und die DNA-Fragmente mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten.

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden zusammen mit 300 µl 1x TBE in vorbereitete Dialyseschläuche gegeben und bei 135 mA für 30 min bei 4 °C elektroeluiert. Die DNA diffundierte in die Pufferflüssigkeit, sodass sie abpipettiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Der Dialyseschlauch wurde mit 100 µl 1x TBE gespült, um die gesamte DNA aus dem Dialyseschlauch in das Eppendorf-Reaktionsgefäß zu überführen. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert.

3.1.6 Schneiden von DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen werden verwendet, um DNA-Fragmente zu schneiden. Die Restriktionsenzyme erkennen in der Regel eine palindromische Sequenz von vier bis acht Basenpaaren, so dass sie die DNA-Stücke mit einer hohen Spezifität an der gewünschten Stelle durch Spaltung der Phosphodiesterbindungen schneiden.

Zu analytischen Zwecken wurden 1 µg DNA mit jeweils 0,5 µl der benötigten Restriktionsenzyme (10-20.000 U/ml) sowie 2 µl entsprechendem Puffer und Aqua dest. ad 20 µl für 1h bei meist 37 °C inkubiert.

Beim Durchführen weiterer Klonierungsexperimente wurden 10 µg DNA mit je 3 µl Enzym (10-20.000 U/ml), 10 µl Restriktionspuffer, bei Bedarf 10 µl bovines Serumalbumin (BSA) sowie H₂O in einem 100 µl Ansatz für mindestens 3h bei 37 °C inkubiert.

Es wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet: XhoI, EcoRI, NcoI, Styl, ApaLI, NotI, NotI HF. Sie erzeugen alle überhängende Enden. Die Enzyme, die in den folgenden Arbeitsprotokollen im Rahmen dieser Arbeit aufgeführt werden, wurden, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) bezogen.

3.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach dem Verdau mit Restriktionsendonukleasen besitzen die Vektoren noch Phosphatreste an ihrem 5'-Ende. Deren Entfernung wird durch das Enzym Antarctic Phosphatase (NEB, Ipswich, Massachusetts, USA) katalysiert. Für diese Reaktion wurden 1-5 µg DNA in H₂O gelöst und 3 µl Antarctic Phosphatase-Puffer sowie 1 µl Antarctic Phosphatase (5.000 Units/ml) zugegeben. Der Gesamtansatz von 30 µl wurde für 60 min bei 37 °C (Heizblock) inkubiert. Anschließend erfolgte die Enzyminaktivierung durch Erhitzen auf 65 °C für fünf Minuten. Die nun dephosphorylierten linearisierten Vektoren können nicht mehr religieren, so dass die Anzahl an Religationen in den folgenden Ligationsexperimenten gering blieb (Chaconas und van de Sande, 1980).

3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Der Einbau von DNA-Fragmenten in Vektoren wird als Ligation bezeichnet (Sgaramella et al., 1970; Dugaiczky et al., 1975). Diese Reaktion wird durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Die T4-DNA-Ligase erzeugt Phosphodiesterbrücken zwischen 5'-Phosphoryl- und 3'-Hydroxyl-Termini doppelsträngiger DNA.

Pro Ligationsansatz wurden stets 1 µl T4-DNA-Ligase (400.000 U/ml), 2 µl Ligasepuffer sowie DNA-Fragment, Vektor und Aqua dest. ad 20 µl gegeben. Die zusammengestellten Ligationsansätze wurden für 14-16 Stunden bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

3.1.9 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien (Chung et al., 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Plasmidaufnahme gezielt durch Hitzeschockbehandlung induziert. Auf diese Weise übertragene Plasmide werden innerhalb der wachsenden Bakterienkolonie stabil vererbt. Die Plasmidaufnahme kann indirekt durch Marker, wie z.B. dadurch erworbene Antibiotikaresistenzen, nachgewiesen werden.

Der Ligationsansatz wurde zusammen mit kompetenten *E. coli*-Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Für eine Minute erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C. Danach wurden die Bakterien nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde Medium (LB bzw. 2xTY) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde in einen Schüttelinkubator (37 °C) gestellt und dann auf Agarplatten aufgebracht. Die LB- bzw. 2xTY-Agar-Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Lagerung der Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

3.1.10 Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA

3.1.10.1 Klassische „Mini-Präparation“

Um nach Transformation eines Ligationsansatzes Bakterienklone mit der gewünschten Plasmid-DNA zu identifizieren, wurde bei einer großen Anzahl von Bakterienklonen eine analytische Isolierung von Plasmid-DNA durchgeführt. Zur Gewinnung geringer Mengen an Plasmid-DNA wurde das folgende Protokoll der sogenannten „Mini-Präparation“ angewandt.

Von den LB- bzw. 2xTY-Agar-Platten wurden mit Hilfe autoklavierter Zahnstocher einzelne Klone gepickt und in 5 ml LB- bzw. 2xTY-Medium gegeben. Die Ansätze wurden mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Von diesen Bakterienlösungen wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 200 µl STET-L (100 µg/ml Lysozym) gelöst. Das zugefügte Lysozym unterstützt das Aufbrechen der Zellwände und optimiert somit die Ausbeute der Plasmid-DNA. Dazu wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Durch anschließendes Erhitzen auf 100 °C (1 min) denaturierten die genomische DNA sowie weitere unerwünschte Zellbestandteile. Diese können sich im Gegensatz zur Plasmid-DNA nach Abkühlen nicht mehr korrekt zusammenlagern. Vor der Zentrifugation (15 min bei 14.000 rpm und RT) der Reaktionsansätze erfolgte eine Abkühlung für 2-3 min auf Eis. Die abge-

setzten Bakterienrückstände konnten mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt werden. Es wurden 200 µl reines Isopropanol hinzugegeben und 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Alkohol wurde dekantiert und das Sediment getrocknet. Anschließend erfolgte die Resuspension in 50 µl RNase-H₂O. Die isolierte Minipräparations-DNA konnte nun mit den entsprechenden Restriktionsenzymen analysiert werden. Dazu wurden 5 µl der DNA-Lösung verwendet.

3.1.10.2 „Spin-Mini“

Als Alternative zur klassischen Mini-Präparation konnten zur Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA sogenannte „Spin-Minis“ mit entsprechenden Kits von GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Großbritannien) bzw. Sigma & Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) durchgeführt werden. Beide Spin-Mini-Kits basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Vorteil der Spin-Mini-Präparation gegenüber der klassischen Mini-Präparation ist die höhere Reinheit der erhaltenen Plasmid-DNA durch Bindung an Siliziumoxid-basierte Membranen. Im Gegensatz zur klassischen Mini-Präparation kann diese direkt für Sequenzierungen am ABI Prism 310 Genetic Analyzer eingesetzt werden. Die Protokolle der einzelnen Kits unterschieden sich geringfügig.

Illustra plasmid Prep Spini-Mini Kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien):

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde entfernt, das Pellet in 200 µl Puffer 7 resuspendiert sowie mit 200 µl Puffer 8 und 400 µl Puffer 9 vorsichtig gemischt und für 5 min bei 14.800 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand, etwa 800 µl, wurde auf die Säulen pipettiert, welche auf die Sammelgefäße (2 ml Reaktionsgefäße) gesetzt wurden. Nach Zentrifugation für 30 s bei 14.800 rpm wurden 400 µl (Wasch-) Puffer 1 auf die Säule gegeben und erneut für 1 min zentrifugiert. Die Säulen wurden auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und 50 µl (Elutions-) Puffer 4 auf die Säule pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 s bei RT erfolgte die Elution bei 14.800 rpm (30 s) in das Eppendorf-Reaktionsgefäß.

Gen Elute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma & Aldrich, St. Louis, Missouri, USA):

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde entfernt, das Pellet in

200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und mit 200 µl Lysepuffer versetzt. Nach etwa 5 min klarte die Lösung auf. Anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 14.800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zuvor äquilibrierte Säulen (Zugabe von 500 µl Äquilibrationspuffer und 1-minütige Zentrifugation bei 14.800 rpm) pipettiert. Die mit Überstand beladenen Säulen wurden erneut für 1 min bei 14.800 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit 500 µl Waschpuffer 1 bzw. 750 µl Waschpuffer 2, mit jeweils einem Zentrifugationsschritt (1 min bei 14.800 rpm). Die Säulen wurden daraufhin auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt, in dem das Eluat aufgefangen wurde, das nach Zugabe von 50 µl Elutionspuffer und 1 min Zentrifugation bei 14.800 rpm gewonnen wurde.

3.1.11 Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA

Der Schritt der "Maxipräparation" erlaubt die Aufbereitung von amplifizierten Klonen, die beispielsweise nach Minipräparation und anschließenden Restriktionsverdau selektioniert wurden. Es können Mengen hochreiner Plasmid-DNA im Milligramm-Bereich gewonnen werden.

Zur Aufbereitung der Bakterien diente das Qiagen Plasmid Maxi Kit. Nach einer initialen alkalischen Lyse wurde die gewonnene Plasmid-DNA auf eine Anionen-Austauscher-Säule gegeben. Zur Bindung an die Säule herrschte in der Reaktionslösung eine niedrige Salzkonzentration und ein entsprechender pH-Wert. Durch Erhöhen des Salzanteils auf eine mittlere Konzentration (Waschschriffe mit entsprechenden Puffern) wurde die Plasmid-DNA von Proteinen, RNA und anderen Verunreinigungen befreit. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch einen Puffer mit sehr hoher Salzkonzentration. Mittels Isopropanol-Präzipitation und einem Waschschriff mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA von den unerwünschten Salzen befreit.

Aus den Bakteriensuspensionen, die den richtigen Klon enthielten, wurden 200 µl entnommen und zu 200 ml LB-Medium mit 200 µl Ampicillin (Endkonzentration: 500 µg/ml) in einen 1.000 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Die Bakteriensuspension wurde danach bei 12-16 Stunden bei 37 °C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Zur Vorbereitung des Zelllysates wurden die Bakterienkulturen unter sterilen Konditionen in einen Zentrifugenbecher gegeben und für 15 min bei 6.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Medium im Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet in 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen und in ein autoklaviertes 30 ml Glasröhrchen gegeben. Dann wurden 10 ml alkalischer Lysepuffer hin-

zugegeben. Damit die Plasmid-DNA durch den Lysepuffer nicht zu stark denaturierte, wurde die Reaktion nach maximaler Inkubation von 5 min bei RT durch Neutralisation mit 10 ml saurem Präzipitationspuffer gestoppt. Zur Sedimentierung der entstandenen Zellreste wurde für 20 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden die Anionen-Austauscher-Säulen mit 10 ml Äquilibrationpuffer vorbereitet und anschließend mit dem Lysat-Überstand befüllt. Das sedimentierte Bakterienpellet konnte verworfen werden. Nachdem die Plasmid-DNA an die Säulen gebunden hatte, wurde sie mit 60 ml Waschpuffer gereinigt. Zur Elution wurden neue Zentrifugenröhrchen unter die Säulen platziert und 15 ml Elutionspuffer hinzugegeben. Mittels Isopropanol-Präzipitation (Zugabe von 10,5 ml Isopropanol, Zentrifugation für 30 min bei 12.000 rpm, 4 °C) wurde die erhaltene Plasmid-DNA entsalzt und konzentriert. Um danach weiterhin bestehende Salzrückstände zu eliminieren, erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 5 ml 70%-igem Ethanol (15 min 12.000 rpm, 4 °C). Nach dem Trocknen der sedimentierten Plasmid-DNA wurde diese in Aqua dest. aufgenommen und die Konzentration photometrisch gemessen. Durch anschließende Verdünnung konnte die gewünschte Konzentration von 1 mg/ml eingestellt werden. Die anschließende Analyse der erhaltenen Plasmid-DNA erfolgte mittels Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung.

3.1.12 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung der Mini- bzw. Maxi-Präparationen wurde das Gerät ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) benutzt. Zur Sequenzierung längerer DNA-Abschnitte wurden die Proben an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt.

Nachdem erste Sequenzierungsverfahren auf chemischer DNA-Spaltung (Maxam und Gilbert, 1980) oder enzymatischer Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. 1977) beruhten, wird heute bei der automatisierten DNA-Sequenzierung das Prinzip des „Cycle Sequencing“ (Murray, 1989) verwendet. Hierbei werden Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) benutzt, die mit einem jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die verschiedenen ddNTPs können somit zusammen mit DNA-Matrize, Primern, Polymerase, nicht fluoreszenzmarkierten dNTPs, Puffer und Wasser in ein gemeinsames PCR-Reaktionsgefäß gegeben werden. Während der Polymerasekettenreaktion kann nach Einbau der fluoreszenzgekoppelten ddNTPs kein weiteres Nukleotid mehr eingebaut werden, da den ddNTPs eine 3'-OH-Gruppe fehlt. Folglich bricht die PCR an dieser Stelle ab, so dass

am Ende viele Fragmente unterschiedlichster Länge vorliegen. Mittels Kapillarelektrophorese werden die entstandenen Kettenabbruchprodukte aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Da am Ende eines jeden Fragments nun ein ddNTP eingebaut ist, welches an einen spezifisch fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, kann anhand des Farbsignals der Fluoreszenz auf die eingebaute Base rückgeschlossen werden.

Für die PCR-Sequenzreaktion wurde ein Reaktionsvolumen von 12 μl eingesetzt. Dieses setzte sich zusammen aus: 0,5 μg DNA aus den Maxi-Präps bzw. 3 μl Mini-Präps, 1 μl des entsprechenden Primers (10 pmol/ μl), 1,5 μl Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) sowie der benötigten Menge an HPLC- H_2O um die gewünschten 12 μl zu erreichen. Die anschließende PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 95 °C 3 min (Denaturierung)
2. 95 °C 30 s (Denaturierung)
3. 58 °C 2 min 30 s (Annealing und Elongation)
4. Abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2 und 3 wurden 30-mal wiederholt.

Zusätzlich wurde eine Sepharose-Quellplatte für die Sequenzierung vorbereitet. Für die Äquilibration der Sepharose wurden in jedes Well 300 μl HPLC- H_2O pipettiert und für 3h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose-Quellplatte für 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, mit 150 μl HPLC- H_2O pro Well befüllt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Vor der Sequenzierung erfolgte die Aufreinigung der PCR-Ansätze, in dem diese jeweils auf ein Sepharose-Well pipettiert und durch Zentrifugation (Konditionen wie oben beschrieben) in ein neues 0,2 ml-Reaktionsgefäß, welches mit 8 μl HiDi-Formamid versehen war, überführt wurden. Durch die Zugabe von Formamid wird die Schmelztemperatur von DNA-DNA-Hybriden gesenkt. Unerwünschte Zusammenlagerungen und damit verbundene Beeinträchtigungen der Sequenzierung werden somit verhindert. Das Eluat konnte anschließend sequenziert oder mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

3.1.13 Klonierung einer Biotin-Akzeptor-Domäne in den pCES-Vektor für die Biotinylierung von Peptiden

Es wurde eine Klonierungsstrategie verfolgt, die es ermöglichte, durch Zugabe von Biotin bei der bakteriellen Expression von Peptiden deren Biotinylierung zu bewirken. Bei der Biotinylierung werden Moleküle kovalent mit Biotin verbunden. Die für das Phagen-Display

benötigten biotinylierten Peptide können durch entsprechende Bakterienstämme selbst kostengünstig und mit geringem Zeitaufwand hergestellt werden.

Eine Biotinylierung kann durch chemische *in vitro*-Biotinylierung oder enzymatische *in vivo*-Biotinylierung erfolgen. Die erstgenannte Methode der chemischen Biotinylierung erfolgt in der Regel mit Hilfe der Substanz NHS-SS-Biotin. Diese ist in der Lage, Aminosäuren mit primärer (v.a. Lysin) oder endständiger NH₂-Gruppe zu biotinylieren. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass es sich um eine sehr einfache Reaktion handelt. Eine Steuerung des Biotinylierungsgrades erfolgt über die molare Ratio zwischen Biotin und Protein. Nachteil der chemischen Biotinylierung ist jedoch, dass die Lokalisation der Biotinylierung nicht beeinflussbar ist. Es kann zur Biotinylierung von Lysinresten in strukturell oder funktionell wichtigen Domänen und damit zu bedeutenden Änderungen der Proteineigenschaften kommen (Hoyer-Hansen et al., 2000).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die enzymatische Biotinylierung, mittels BirA-Enzym, einer Biotin-Ligase, zurückgegriffen. Hierfür wurde der die Biotin-Ligase überexprimierende *E. coli*-Stamm AvB101 verwendet, der mit einem für die Biotin-Ligase BirA kodierenden Plasmid transfiziert wurde (Cloutier et al., 2000).

Um die Biotinylierung zu ermöglichen, wurde eine Biotin-Akzeptor-Domäne (BAD) benötigt. Diese wurde gemeinsam mit einer Hinge-Region zwischen die Schnittstellen EcoRI und NotI des pCES-Vektors eingesetzt. Die Hinge-Region wurde als Platzhalter zwischen Peptid und BAD geschaltet. Die entsprechenden Oligonukleotide für die BAD-Hinge-Region enthielten folgende Sequenzen:

```

SL55 hinge-BAD-f:      CC ACG GTA AGC TAA AAG ACT CGA AGC TTT TAT
SL56 hinge-BAD-r: TCG AGG TGC CAT TCG ATT TTC TGA GCT TCG AAA ATA

SL55 hinge-BAD-f: AGC AAG TCC GGA GGC CGC CGA CCG CCT CAT CTG CCT
SL56 hinge-BAD-r: TCG TTC AGG CCT CCG GCG GCT GGC GGA GTA GAC GGA

SL55 hinge-BAD-f: CTC CGT CAA CCG CCT CAT CTG CCT CTT AA
SL56 hinge-BAD-r: GAC GGA GTT GGC GGA GTA GAC GGA G

```

Anschließend wurde der Vektor an den Schnittstellen ApaI und EcoRI geschnitten und mit den vorbereiteten, für die Peptide kodierenden DNA-Fragmenten, ligiert. Es wurden Fragmente von TRPC5 und TRPM1 verwendet, die zuvor mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

(Primer für TRPC5 SL59, SL60 für TRPM1 SL57, SL58) amplifiziert, den Enzymen EcoRI und ApaI verdaut und anschließend elektroeluiert worden waren.

Die Ausgangssequenzen der TRP-Proteine:

- **TRPC5 Nukleotidsequenz (228 bp):**

```
CTT TAC TTT TAC TAT GAG ACC AGA GCT ATT GAT GAA CCT AAC AAC
TGC AAG GGG ATC CGA TGT GAA AAA CAG AAC AAC GCC TTC TCC ACG
CTC TTT GAA ACC CTT CAG TCG CTC TTC TGG TCT GTC TTT GGC CTC
CTA AAT CTC TAT GTT ACC AAT GTG AAG GCC CGA CAT GAG TTC ACT
GAG TTT GTG GGA GCT ACG ATG TTT GGG ACA TAC AAC GTC ATC TCC
CTG
```

TRPC5 AS-Sequenz:

```
LYFYY ETRAI DEPNN CKGIR CEKQN NAFST LFETL QSLFW SVFGL LNLYV
TNVKA RHEFT EFVGA TMEGT YNVIS L
```

- **TRPM1 Nukleotidsequenz (171 bp):**

```
CCA CTG GGA AGC CTG GCC CCT CCT GTG GAC ACC AAA GCC ACA GAG
AAG GAA AAG AAG CCA CCC ACA GCC ACC ACC AAG GGG AGA GGA AAA
GGA AAA GGC AAG AAG AAA GGC AAA GTG AAA GAG GAA GTG GAG GAA
GAG ACG GAC CCC CGG AAG CTT GAG CTG CTC AAC TGG
```

TRPM1 AS-Sequenz:

```
PLGSL APPVD TKATE KEKKP PTATT KGRGK GKGKK KGKVK EEVEE ETDPR
KLELL NW
```

Die TRP-Fragmente, gefolgt von der BAD-Hinge-Region, wurden hinter die Signalsequenz des pCES-Vektors eingefügt. Durch die Signalsequenz werden die Proteine nach der Translation im ER ins Periplasma transportiert. Hinter der NotI Schnittstelle werden ein his- und ein myc-Tag kodiert, über die die späteren Proteine aufgereinigt und detektiert werden können. Der Aufbau der hergestellten Konstrukte ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.



Abbildung 10. pCES-Konstrukt mit TRP-Fragment und Hinge-BAD-Region.

Mittels Maxi-Präparation erfolgte eine Amplifizierung der Plasmide, deren korrekte Zusammensetzung durch Restriktionsverdau überprüft wurde.

3.2. Gewinnung der Fab-Antikörper

3.2.1 Phagen-Display

Die Fab-Fragmente wurden mittels Phagen-Display (Hoogenboom und Chames, 2000) gewonnen. Die verwendete Phagenbibliothek besaß eine Diversität von $3,7 \times 10^{10}$ (de Haard et al., 1999). Für das Screening der Phagenbibliothek wurden folgende Peptide (Tabelle 3) von der Firma NMI Technologietransfers (Reutlingen) bezogen.

Nr.	Bezeichnung	Aminosäuresequenz
P1	mM3	Biot-SGGGG SFGNE EPSWK LAKNI FYMPY-OH
P2	mC5	Biot-SGGGG SFYYE TRAIID EPNNC KGIRC EKQ-OH
P3	mC4	Biot-SGGGG SNSHL HPLQI SLGR-OH
P4	mM3	Biot-SGGGG SNKYL GPYVM MIGK-OH
P5	mM1	Biot-PLGSL APPVD TKAAE KEKKP PTATT KGRGK GKGKK GKVKE EVEEE TDPRK LELLN W-OH
C5	mC5	Biot-SGGGG SANGL NQLYF YYETR AIDEP NNCKG IRCEK QNN-OH

Tabelle 3. Peptidsequenzen für das Screening der Phagenbibliothek

Nach Erhalt der Peptide als lyophilisierte Trifluoressigsalze wurden diese in DMSO (Endkonzentration 1 mg/ml) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3 Selektionen

Um das gesamte Spektrum der Phagenbibliothek abzudecken, wurden Phagen in zehnfach bis hundertfacher Menge der Diversität der Phagen-Bank eingesetzt. Zur Quantifizierung der eingesetzten Menge wurden 10 µl Phagen-Suspension abgenommen. Mittels einer Verdünnungsreihe konnte der Phagentiter der Ausgangslösung bestimmt werden (Kapitel 3.2.1.2). Das für die Selektionen verwendete Volumen an Phagenbibliothek betrug 500 µl und wurde mit gleichem Volumen an 4% MPBS in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und für 60 min unter Rotation bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Streptavidinbeads „Dynabeads M280 Streptavidin“ (DynaL Biotech, Oslo, Norwegen) vorbereitet. Diese bestehen aus einem supermagnetischen Polystyrol-Kern, an den Streptavidin kovalent gebunden ist. 300 µl der Streptavidinbeads wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Anlegen eines Magnetfeldes immobilisiert, so dass die restliche Lösung verwor-

fen werden konnte. Die Streptavidinbeads wurden in 1 ml 2% MPBS resuspendiert und für ein bis zwei Stunden Rotation bei RT äquiliert.

Zu der vorbereiteten Phagenlösung wurden schließlich 20-500 nmol der biotinylierten Peptide gegeben. Die Menge an Peptid wurde von einer Selektionsrunde zur anderen reduziert. Zu Beginn wurden 500 nmol eingesetzt. Dies entsprach je nach Peptid 1-2 µl der DMSO-Lösung. Das Gemisch wurde eine Stunde bei RT unter Rotation inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Dynabeads mit Hilfe des Magnetfeldes vom Puffer befreit, mit der Phagen-Antigen-Mischung resuspendiert und 15 min bei RT invertiert. Durch erneutes Anlegen des Magnetfeldes für mindestens 1 min wurden die Peptide über die Bindung an die Streptavidin-Beads immobilisiert. Es folgten nun mehrere Waschschriffe, die die nicht oder nur sehr schwach gebundenen Phagen entfernten. Zunächst wurde sechsmal mit 1 ml 2% MPBS 0,1% Tween-20 gewaschen, anschließend die Suspension in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sechsmal mit 1 ml PBS 0,1% Tween-20 gewaschen. Nach erneutem Transfer in ein frisches Reaktionsgefäß wurde die Suspension noch weitere zweimal mit 1 ml PBS gereinigt. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte mittels pH-Änderung (basisch), durch den sich die Antikörperstruktur so veränderte, dass sich die Antikörper-Antigen-Bindung löst. Es wurde 1 ml 100 mM TEA (pH 12,0) hinzugegeben, das Eppendorf-Reaktionsgefäß verschlossen und für 10 min mit Hilfe eines Rotors bei RT invertiert. Die im Überstand befindlichen abgelösten Phagen wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, in dem 0,5 ml 1,0 M Tris-HCl (pH 7,4) vorgelegt waren. So erfolgte eine rasche Neutralisation, die die Unversehrtheit der Phagen und der an sie gebundenen Antikörper gewährleistete. Die erhaltenen Phagen konnten bei 4 °C gelagert oder direkt zur Infektion von TG1-Bakterien genutzt werden.

3.2.1.2 Infektion von *E. coli*

Die Infektion von *E. coli*-Bakterien mit den Phagen erfolgte, um spezifische Klone zu selektionieren (= Phagentitration) und diese zu amplifizieren. Es wurden *E. coli*-Bakterien des Stammes TG1 verwendet, die in der Lage sind, F-Pili auszubilden. Nachdem sich der Phage mit Hilfe des Hüllproteins gIII an den F-Pilus angelagert hat, kommt es zur Internalisierung des Phagemids. Hierdurch erhalten die *E. coli*-Bakterien eine Antibiotikaresistenz gegenüber Ampicillin, womit sie durch ihr Wachstum auf 2xTY-Ampicillin-Agar-Platten selektioniert werden können. Nur infizierte Bakterien sind gegenüber dem Antibiotikum resistent und überleben auf den Agarplatten. Die Anzahl der Kolonien korrespondiert demnach mit der Menge stattgehabter Infektionsereignisse, die den Phagentiter widerspiegelt.

Bestimmung des Phagentiters

Zunächst wurden 10^4 - bis 10^6 -fache Verdünnungen der eluierten Phagen (Output) in 2xTY-Medium angelegt. Das Endvolumen eines jeden Verdünnungsansatzes betrug 500 μ l. Nach Zugabe von 500 μ l *E. coli*-Bakterien vom TG1-Stamm wurden die Reaktionsansätze für 30 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. 100 μ l jeder Verdünnung wurden auf 2xTY-AG Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Durch Zählen der Kolonienzahl am nächsten Tag konnte der Phagentiter berechnet werden. Der Phagentiter wurde mit dem der Phagenbibliothek (Input) verglichen. Um den Titer der Phagenbibliothek zu bestimmen, wurden auf Grund der höheren Anzahl von Phagen 10^8 - bis 10^{12} -fache Verdünnungen angesetzt. Fand eine Abnahme der colony forming units (cfu) pro ml statt, so war die Selektion erfolgreich.

Der Phagentiter lässt sich wie folgt berechnen:

Phagentiter [cfu/ml] = (# Kolonien) x (1/Verdünnungsfaktor) x (1/aufgetragene Fraktion) x 2

Beispielrechnung:

$$\text{Phagentiter Input} = 159 \times 1/10^{-9} \times 1/(1/10) \times 2 = 3,18 \times 10^{12}$$

$$\text{Phagentiter Output} = 56 \times 1/10^{-4} \times 1/(1/10) \times 2 = 1,12 \times 10^7$$

Amplifikation der selektionierten Phagen

Zur Amplifikation wurden 1 ml der eluierten Phagen mit 4 ml 2xTY-Medium sowie 5 ml der TG1-Bakterien-Suspension zusammengegeben und für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Um das auszuplattierende Volumen zu reduzieren, wurde der 10 ml Ansatz für 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in 500 μ l 2xTY-Medium resuspendiert. Nach der ersten Selektionsrunde wurde der Ansatz auf vier 16 cm² großen 2xTY-AG-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu jeder großen Platte 5 ml 2xTY-AG gegeben und die Bakterien mit einem sterilen Spatel abgekratzt. Die Ansätze wurden vereint, komplett resuspendiert, die Bakterien durch Zentrifugation (10 min 4.000 rpm) pelletiert und nach Zugabe von sterilem Glycerol (Endkonzentration 15-30%) rasch bei -80 °C gelagert, um möglichst wenige Bakterien durch das Glycerol abzutöten. Diese Stocks dienten als Phagenrepertoires für die jeweils anschließende Runde.

Hierzu wurden etwa 10-15 μ l von der hergestellten Glycerolkultur abgenommen und in 50 ml 2xTY-AG gegeben. Die Menge der verwendeten Glycerolkultur war von deren Konzentration abhängig. Insgesamt sollten die 50 ml eine optische Dichte von 0,05 besitzen. Diese 50 ml Bakterienkultur wuchsen bei 37 °C und 255 rpm bis zu einer OD von 0,5. Danach wurden

5 ml abgenommen und mit 1 μ l M13K07 Helferphagen (2×10^{13} pfu/ml) für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Diese wurden benötigt, damit die von den Bakterien produzierten Phagen nach Synthese in das Medium sezerniert werden. Durch die hohe Glukosekonzentration im Medium wird das lacZ-System herunter reguliert, wodurch die Bakterien sensibler für die Helferphagen werden. Mit Hilfe der Helferphagen bilden die Bakterien Antikörperfragmente, die an das gIII-Protein gekoppelt sind.

Nach 10 min Zentrifugation bei 4.000 g wurde der Überstand komplett entfernt. Das Pellet wurde in 25 ml vorgewärmtem 2xTY-AK resuspendiert und für 14-18 h bei 30 °C und 255 rpm inkubiert. Die Helferphagen besitzen ein Kanamycin-Resistenzgen. Durch die Zugabe von Kanamycin werden somit die Bakterien selektioniert, die die Helferphagen aufgenommen haben. Zum Fällen der Phagen wurde die Suspension zunächst für 20 min bei 3.000 g zentrifugiert und dann der Überstand entnommen. Dieser wurde für mindestens eine Stunde auf Eis mit 1/5 des Volumens (10 ml) PEG/NaCl-Lösung inkubiert. Die ausgefallenen Phagen wurden mittels Zentrifugation (15 min, 4.000 g, 4 °C) sedimentiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm (2 min) wurden die verbliebenen Bakterien entfernt und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde nochmals mit 200 μ l PEG und 1 ml PBS wiederholt. Beide Male wurde nun jedoch für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Die Phagen konnten nun für die nächste Selektionsrunde verwendet werden. Hierzu wurde das Volumen bestimmt und in gleicher Menge 4% MPBS hinzugegeben. Die weiteren Schritte entsprechen dem Vorgehen in Kapitel 3.2.1.2. Insgesamt wurden pro verwendetem Peptid drei bis fünf Selektionsrunden durchgeführt.

3.2.1.3 Expression einzelner Phagenklone

Nach der dritten Selektion konnten von den Agarplatten der Verdünnungsreihen einzelne Bakterienkolonien, die jeweils die DNA-Sequenz für einen Antikörper enthielten, gepickt sowie einzeln amplifiziert und exprimiert werden. Anschließend war eine Testung auf Spezifität gegen das Antigen im ELISA möglich. Dazu mussten die Bakterien mit den entsprechenden Phagen zunächst in 96-Well-Rundbodenplatten wachsen (über Nacht mit 2xTY bei 30 °C) und anschließend die Phagen inklusive des an sie gebundenen Antikörpers mit Hilfe von Helferphagen (siehe 3.2.1.2) exprimiert werden.

Von dieser Vorkulturplatte wurden am Folgetag 2 μ l eines jeden Wells auf die entsprechende Position einer neuen 96-Well-Platte überführt, jeweils 120 μ l 2xTY-AG hinzugefügt. Bei 37 °C und 255 rpm im Schüttelinkubator fand ein Wachstum der Bakterienkultur bis zu ei-

ner OD von 0,5 statt. Aus der Vorkulturplatte (Masterplatte), wurde eine Glycerolkultur angelegt, die bei -80 °C gelagert wurde. Nachdem auf der zweiten 96-Wellplatte die gewünschte OD erreicht wurde, wurden 40 µl 2xTY-AG, die 2×10^9 pfu M13K07 Helferphagen enthielten (Konzentration 5×10^{10} pfu/ml), hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt und anschließend 10 min bei 1.700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt, das Pellet wurde in 120 µl 2xTY-AK resuspendiert und für 14-18 h bei 30 °C und 255 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 1.700 rpm) konnten 25-50 µl des Überstandes für ELISA-Untersuchungen verwendet werden.

3.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das erstmals 1971 gleichzeitig von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Avrameas und Gilbert, 1971; Engvall und Perlmann, 1971). Eine Komponente – sei es das Antigen (wie in dieser Arbeit) oder der Antikörper – wird an eine feste Phase (z.B. Boden einer 96-Well-Platte) immobilisiert. Diese Bindung wird als Coating bezeichnet. Der darauffolgende Schritt des Blockens dient dazu, Hintergrundaktivitäten möglichst stark zu reduzieren. Anschließend werden Antigen und Antikörper zusammengeführt. Antikörper oder Antigen (nicht immobilisierter Teil) werden zuvor mit einem Enzym markiert. Dieses setzt ein Substrat um. Der Substratumsatz ist direkt abhängig von der Antikörper- bzw. Antigenkonzentration und kann je nach Substrat kolorimetrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das kolorimetrisch detektierbare Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Kolorimetrische Substrate werden häufig verwendet, da die entstehenden Endprodukte nach Beenden der Reaktion lange Zeit stabil sind, ihre Messung schnell und mit günstigen Fotometern erfolgen und das Ergebnis bei Screeningverfahren bereits visuell abgeschätzt werden kann. Reagiert TMB mit dem Peroxidase-Konjugat, entsteht ein blaues Reaktionsprodukt. Durch Abstoppen der Farbreaktion mit 50 µl 2M H₂SO₄ (pro Well) ändert sich die Farbe von blau nach gelb. Das Ausmaß der Reaktion kann bei einer Wellenlänge von 450 nm im Fotometer als OD gemessen werden.

Zum Test auf Spezifität der Antikörper gegen das TRP-Peptid, mit dem die Phagenbibliothek gescreent wurde, wurde eine 96-Well-Platte mit dem entsprechenden TRP-Peptid gecoatet. Dazu wurden pro Reaktionsansatz je 100 µl des Peptides (0,5 µg/ml) in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben. Um eine möglichst gute Exposition des TRP-Peptids gegenüber

den Antikörperfragmenten zu erreichen, wurde zunächst biotinyliertes BSA sowie Streptavidin in die Wells gegeben. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen, von denen eine zur Bindung an das biotinylierte BSA verwendet wurde. Über die verbliebenen drei freien Bindungsstellen wurden die TRP-Peptide immobilisiert. Auf einer zweiten 96-Well-Platte wurde ein anderes unspezifisches Peptid als Negativkontrolle gecoatet. Vor der Antikörperzugabe wurden die Peptide für 30 min mit 2% MPBS geblockt und zweimal mit PBS-Tween 20 (0,1%) sowie zweimal mit PBS gewaschen.

50 µl der Phagensuspension aus 3.2.1.3 wurden mit gleichem Volumen an 4% MBPS versetzt und hinzugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation. Die im Phagen-ELISA gescreenten Phagenantikörper wurden mittels eines HRP-markierten anti-M13 AK sowie mittels TMB sichtbar gemacht.

Für weitere ELISA-Assays wurden aufgereinigte Fab-Antikörper verwendet. Diese wurden, wie nachfolgend beschrieben, unter Verwendung von 10 ml Medium, exprimiert (3.2.5) und aufgereinigt (3.2.6). Von den jeweiligen Fabs wurden pro Well 100 µl einer Konzentration von 20 µg/ml aufgetragen. Um die gebundenen antigenspezifischen Fabs sichtbar zu machen, wurden diese zunächst über ihr myc-tag von einem anti-myc-Antikörper (Hybridoma-Überstand des Klons 9E10) detektiert, der über einen Peroxidase-konjugierter anti-Maus-Antikörper (aus Kaninchen) erkannt und dann mittels TMB sichtbar gemacht werden konnte.

3.2.3 Fingerprint-PCR

Die Methode der PCR wurde bereits in Kapitel 3.1.3 PCR beschrieben.

Nachdem im ELISA jene Klone selektioniert wurden, die spezifisch an das zum Screening verwendete TRP-Peptid binden, wurden die für den jeweiligen Fab kodierenden DNA-Abschnitte der Klone nun mittels PCR amplifiziert und miteinander verglichen. Dieser Schritt diente zur Eliminierung von Klonen mit identischer Fab-kodierender DNA sowie zu deren Sequenzanalyse. Es wurden die Primer M13rev (Nr. 15) und fd tet25 (Nr. 19), Taq-Polymerase (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada), sowie folgendes Thermocyclerprotokoll verwendet:

1. 95 °C	5 min	Denaturierung
2. 95 °C	45 s	Denaturierung
3. 60 °C	30 s	Annealing
4. 72 °C	1 min 30 s	Elongation

5. 72 °C 5 min Elongation

6. Abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2 bis 4 wurden fünfunddreißigmal wiederholt.

Durch Auftrennen der PCR-Produkte auf einem Agarosegel konnten zunächst Klone erkannt werden, die ein von der erwarteten Größe abweichendes Molekulargewicht hatten und somit nicht korrekt waren. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit BstN1 verdaut. Man erhielt DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge für jeden individuellen Fab. BstN1 wurde ausgewählt, da für dieses Enzym (erkannte Palindromsequenz CCWGG), viele Schnittstellen in der genomischen DNA vorliegen.

3.2.4 Anlage Glycerolkultur

Von der Masterplatte und den durch Fingerprint-PCR selektionierten Klonen wurden zur längerfristigen Konservierung Glycerolkulturen angelegt. Dazu wurden zu 700 µl Bakterien-suspension in 2xTY-Medium 300 µl 100%-iges Glycerol gegeben. Die Glycerolkulturen können bei -80 °C bis zu mehreren Monaten gelagert werden.

3.2.5 Expression der Fabs in Bakterien

Mit einer Impföse wurde eine geringe Menge Glycerolkultur entnommen, in 10 ml 2xTY-AG gelöst und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Kulturen wurden am Morgen des Folgetages zu 1.000 ml 2xTY-Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Ebenso wurden 1 ml Ampicillin und 2,5 ml 40%-Glukose (Endkonzentration 0,1%) zugefügt. Die Bakterien wurden nun bei 37 °C mit 255 rpm geschüttelt.

Nach etwa zwei Stunden erreichte die Bakteriensuspension eine OD von ca. 0,8. Die Messung der Zelldichte erfolgte mit dem Fotometer Gene Quant pro (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Als Referenzwert wurde vor Beginn des Experimentes 1 ml des 2xTY-Mediums abgenommen und seine OD als Nullwert gesetzt. Hatte die Probe die Ziel-OD erreicht, erfolgte die Induktion mit 1 ml IPTG 1 M (Endkonzentration 1 mM). Nach weiteren vier Stunden Inkubation bei 37 °C waren genügend Fabs durch die Bakterien produziert. Die Bakteriensuspension wurde für 20 min bei 4.600 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und man konnte das gewonnene Pellet (mit enthaltenen Fabs) bei -20 °C lagern oder direkt mit der Aufreinigung der Fabs beginnen.

3.2.6 Aufreinigung der Fabs

Die Zellpellets wurden in 10 ml TS-Puffer gelöst und in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt. Es wurden 400 µl EDTA-freie Proteaseinhibitoren der Firma Roche (Basel, Schweiz) hinzugefügt. Die Proteaseinhibitoren lagen als Tabletten vor. Eine Tablette wurde in 2 ml Aqua dest. gelöst. Der Zentrifugenbecher, in dem das Pellet sedimentiert wurde, wurde zusätzlich mit 11 ml einer Mischung, die aus zwei Teilen TS-Puffer und einem Teil Aqua dest. bestand, sowie mit 440 µl Proteaseinhibitoren gespült. Die gelösten Zellpellets wurden nun für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend für 20 min mit 9.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde verworfen. Der Überstand, der die gewünschten Fabs enthielt, wurde weiter bearbeitet.

3.2.6.1 Aufreinigung mittels Metallionenaffinitätschromatographie

Bei der Reinigung der Fab-Antikörper wurde das Histidin-Tag der Fabs genutzt, über das die Fabs an die verwendeten Talon-Beads gebunden haben. Die Talon-Beads besitzen zentralständige Co^{2+} -Ionen, an die Elektronen von freien N-Atomen des Histidins binden (Chaga et al., 1999; Porath, 1992).

Zeitgleich zur Zentrifugation der Bakterien wurden die Talon-Beads gewaschen. 1 ml Talon-Beads der Firma Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA) wurde in 10 ml PBS-Puffer (pH = 8,0) gewaschen und für 3 min bei 1.700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der die Fabs enthaltende Überstand aus der Zentrifugation wurde zu den Talon-Beads gegeben. Das Gemisch wurde für 30 min bei 4 °C inkubiert und dann für 5 min bei 1.700 rpm zentrifugiert. Da die Fabs nach der Inkubationszeit an die Beads gebunden hatten, konnte der Überstand entfernt und die Talon-Beads (inklusive Fabs) mit 20 ml 5 mM Imidazol in PBS (pH = 8,0) gewaschen und erneut für 5 min bei 1.700 rpm zentrifugiert werden. Währenddessen wurden die Trennsäulen mit 5 ml PBS (pH = 8,0) äquilibriert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Talon-Beads in 5 ml 5 mM Imidazol in PBS (pH = 8,0) gelöst und auf die Säule gegeben. Es erfolgten weitere Waschschrte mit 20 ml 5 mM Imidazol und 0,1% Tween in PBS (pH = 8,0) sowie 20 ml 5 mM Imidazol in PBS (pH = 8,0), bevor mit zweimal 1 ml 100 mM Imidazol eluiert wurde. Die Eluate wurden jeweils in Dialysehschläuche pipettiert und für 16-20 Stunden in 3.000-4.000 ml PBS-Puffer dialysiert. Die Dialyse diente dazu, die Antikörper von dem verwendeten Imidazol zu befreien. Um ein ausreichend großes Konzentrationsgefälle zu gewährleisten, wurde der Dialysepuffer mindestens

zweimal nach jeweils ca. zwei Stunden gewechselt. Die Fabs wurden anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

3.2.6.2 Aufreinigung mittels Nickel-Säule

Eine weitere Methode zur Fab-Aufreinigung war die Säulenaufreinigung mittels Nickelsäulen. Hierzu wurde das Gerät „ÄKTA-Prime“ (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) eingesetzt. Bei der Säulenaufreinigung können Tags des entsprechenden Proteins genutzt werden, über die das Protein an die jeweilige Säule bindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein His-Tag zusammen mit einer Nickel-Säule genutzt. Es wurden dazu zwei verschiedene Puffer eingesetzt. Der hier als Puffer 1 bezeichnete TS-Puffer (5 mM Imidazol) wurde zum Spülen der Apparatur, Äquilibrieren der Nickel-Säule sowie für diverse Waschschriffe verwendet. Als Elutionspuffer wurde TS-Puffer mit 500 mM Imidazol verwendet.

Zu Beginn des Arbeitens mit „ÄKTA-Prime“ wurde die Apparatur mit 20% Ethanol gereinigt, um eventuelle Proteinerückstände zu beseitigen. Anschließend wurde das System mit 5 ml Puffer 1 beladen. Der die Fabs enthaltende Überstand aus der Zentrifugation des resuspendierten Bakterienpellets (3.2.6) wurde in einen Glaskolben gegeben. Dieser wurde mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach der Systemäquilibrierung wurde die Säule mit dem Überstand beladen. Dazu wurde Puffer 1 mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min in den Kolben gegeben. Über das Hexahistidin-Tag konnten die Antikörper an die His-Säule binden. Der Durchfluss wurde in Fraktionen à 4 ml aufgefangen. Diese konnten zusammengeführt und bei Bedarf erneut auf die Säule gegeben werden. Nach dem Beladen der Säule folgte ein Waschschriff mit 5 ml Puffer 1. Die Elution erfolgte in Fraktionen von 300 µl. Dazu wurde ein Gradient (eingesetztes Volumen 2,1 ml) mit ansteigender Konzentration an Elutionspuffer (0-100%) sowie absteigender Konzentration an Bindingpuffer (100-0%) angelegt. Es folgte eine Elution mit weiteren 12 ml Elutionspuffer (100%). Das System wurde nochmals mit 5 ml Puffer 1 gewaschen und abschließend mit 20% Ethanol gereinigt.

Je Fraktion wurden 20 µl entnommen und mit gleichem Volumen an SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer) versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-Page getrennt. Nach Färbung mit Coomassie-Blue konnte gezeigt werden, in welchen Fraktionen sich der Antikörper befand. Diese wurden vereinigt und in einer Dialysekammer (Biorad, Hercules, Kalifornien, USA) dialysiert und somit vom enthaltenen Imidazol befreit. Die erhaltene Antikörperlösung wurde mit Hilfe von Vivaspin-Röhrchen (Sartorius Biolab Products, Göttingen) mittels Zentrifugation aufkonzentriert.

3.2.7 Proteinbestimmung der Fab-Lösungen

Nach dem Dialyseschritt wurden die Konzentrationen der Fab-Lösungen bestimmt. Hierzu wurden die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Verfahren angewandt.

3.2.7.1 Extinktionsmessungen mittels Fotometer

Zur Konzentrationsbestimmung mittels Fotometer musste zunächst ein Referenzwert festgelegt werden. Dazu wurden 80 µl der Dialyseflüssigkeit in eine Quarzküvette gegeben und die Extinktion gemessen. Nach dieser Kalibrierung konnten die Konzentrationen der verschiedenen Fabs gemessen werden. Die Messung der Extinktion erfolgte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Mittels Lambert-Beerschen Gesetz und Koeffizient der beiden Wellenlängen wurde die Konzentration der entsprechenden Lösungen berechnet.

3.2.7.2 BSA-Standardreihe im Coomassie-Blue gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel

Zur Proteinbestimmung mit Hilfe des Coomassie-Blue gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gels wurden definierte Mengen an BSA (0,5-8 µg) auf das Gel aufgetragen sowie mehrere Spuren mit unterschiedlichen Volumina (4-16 µl) der Fab-Lösung befüllt, dessen Konzentration bestimmt werden sollte. Nach Färbung des Gels konnte die Bandenintensität von BSA und Fab verglichen werden. Banden gleicher Intensität stellten die gleiche Proteinmenge dar. Da die Proteinmenge von BSA bekannt war, konnte von dieser auf die Konzentration des Antikörpers geschlossen werden.

3.2.7.3 Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Der Assay beruht auf dem Prinzip der Bicinchoninsäure-Reaktion (Smith, 1985). Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Diese ergeben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff. Es wurden 49/50 mit Lösung A und 1/50 von Lösung B aus dem Protein-Assay-Kit gemischt. Davon wurden jeweils 300 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, in welches 50 µl der zu untersuchenden Probe vorgelegt wurden. Neben Verdünnungsreihen des zu untersuchenden Proteins wurde auch eine BSA-Standardreihe (0-0,1 mg/µl) zur Erstellung einer Eichgeraden durchgeführt. Das Probengemisch wurde für 30 min im Heizblock bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl jeder Probe in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm fotometrisch gemessen.

3.2.8 Sequenzierung der Fabs

Alle Fabs wurden mit den Primern Nr. 19 und 21 (CH1 und M13 rev) sequenziert. Dazu wurden die Proben an das Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern geschickt. Um die Fab-Sequenz, sowie deren Übergänge zur Vektor-Sequenz (gIII-Phagen-Protein C-terminal bzw. pCES-Vektor N-terminal) zu analysieren, wurden ein Klon, der gegen TRPM3 (P1C10), und ein Klon, der gegen TRC4 (P3A8) gerichtet war, mit den Primern Nr. 19-23 durch die Firma MWG Operon (Ebersberg) sequenziert. Das Protokoll für die Sequenzreaktion ist in Kapitel 3.1.12 beschrieben. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms IMGIT/V-Quest (Immunogenetics Information System) abgeglichen.

3.2.9 Aufbewahrung der Fabs

Die Fabs wurden nach der Proteinbestimmung entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

3.3 Angewandte proteinbiochemische Methodik

3.3.1 Proteinexpression und Proteinaufreinigung

Ebenso wie die Fabs (Kapitel 3.2.5) wurden auch die TRP-Peptide mit der durch Klonierung angehängten BAD-Region mit Hilfe von *E. coli*-Bakterien exprimiert. Wie bei der Mini-Präparation wurden von den LB- bzw. 2xTY-Agar-Platten einzelne Klone mittels autoklavierter Zahnstocher gepickt und in 5 ml LB- bzw. 2xTY-Medium (mit einer Ampicillin-Endkonzentration von 100 µg/ml) gegeben. Diese wurden über Nacht in den Schüttelinkubator bei 37 °C gestellt. Am Morgen des Folgetages wurden 10 ml Übernachtskultur (zwei Ansätze à 5ml) zu 200 ml autoklaviertem Medium (LB bzw. 2xTY) gegeben und bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nachdem eine OD von 0,6-1,0 erreicht war, wurden 500 µl 1 M IPTG und 2 ml 5 mM Biotin hinzugegeben, um die Proteinproduktion zu induzieren. Stündlich (t = 0, 1h, 2h, 3h und 4h) wurden Proben (je 1 ml) abgenommen und der OD gemessen, um sicherzustellen, dass die Bakterien weiter wuchsen und das exprimierte Protein nicht toxisch wirkte. Jede Probe der Bakteriensuspension wurde 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 100 µl Lämmli-Puffer aufgenommen, für 5 min bei 95 °C denaturiert und mit Hilfe einer Spritze mit englumiger Kanüle geschert. Die Ansätze wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Nach vier Stunden wurde die Expression beendet. Die Bakterien konnten sofort weiterverarbeitet werden. Eine Lagerung für mehrere Tage bei 4 °C war ebenso möglich. Für die Aufreinigung wurde zunächst das Medium durch 20-minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm vom Bakterienpellet abgetrennt. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eines Bindingpuffers (5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris) aufgenommen und Proteaseinhibitoren in entsprechenden Konzentrationen (siehe 3.6.3) zugeführt. Die Bakteriensuspension wurde für 30 min mit Lysozym (Endkonzentration 10 µg/ml) auf Eis inkubiert und schließlich zweimal bei -80 °C eingefroren, so dass die Zellwände noch nicht abgebauter Bakterien perforierten. Nach dem Auftauen wurde die Bakteriensuspension geschert und für 30 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die biotinylierten Peptide sollten sich größtenteils im Überstand befinden. Mit dem Überstand wurde weiter gearbeitet, das Pellet erneut in Bindingpuffer gelöst und der oben beschriebene Vorgang wiederholt.

Als alternative Methode zur Proteinisolierung wurde das erhaltene Zellpellet nach Abzentrifugieren des Mediums in TS-Puffer aufgenommen. Der Isolierung mit dem TS-Puffer liegt das Prinzip des osmotischen Schocks zu Grunde, durch den die Zellen zerstört und die Peptide aus dem Periplasma freigesetzt werden. Die weiteren Arbeitsschritte (Einfrieren, Auftauen, Zentrifugieren) waren identisch.

3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung eines Proteingemisches bieten sich mehrere Verfahren an. Zum einen kann die Aufreinigung mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) erfolgen. SDS ist ein anionisches Detergens, welches die formgebenden hydrophoben Bereiche innerhalb eines Proteins auflöst, so dass das Protein nur noch in gestreckter, linearer Form vorliegt. Es erfolgt eine Denaturierung der Proteine durch Zerstörung aller nicht-kovalenten Bindungen durch das Detergens. Durch die starke negative Eigenladung des SDS maskiert dieses die Eigenladungen der Proteine, welche vernachlässigbar klein werden. Somit werden die Proteine bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Gleichspannungsfeld nicht nach ihrer Ladung sondern nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die negative Oberflächenladung der denaturierten Proteine ist nun direkt proportional, die Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld indirekt proportional zu seinem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Ausschlaggebend für die Trenngenauigkeit der Proteine ist die Porengröße des Gels, welche durch die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt wird.

Je kleiner die Molekularmasse des aufzutrennenden Proteins, desto höher sollte der Acrylamidgehalt sein.

Die Polymerisation der Gele wurde durch das Hinzufügen von 10% Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Um eine bestmögliche Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit das 1970 von Laemmli beschriebene Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Page angewandt. Die Proteine werden zunächst in einem Sammelgel fokussiert, bevor sie in das Trenngel übertreten. Es wurden Polyacrylamidgele der Konzentration 6,5% bis 15% verwendet. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 80 V (Sammelgel) bzw. 150 V (Trenngel). Zur Bestimmung der relativen Proteinmasse dienten Markerproteine bekannter Molekülmasse („dual color“ bzw. „all blue“ (Biorad, Hercules, Kalifornien, USA)).

3.3.3 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Die Färbung mittels Coomassie Blue-Lösung ist eine Methode, um Proteine, die durch SDS-Page getrennt wurden, zu visualisieren. Dazu wurde das Polyacrylamidgel zum Färben für mindestens drei Stunden in Coomassie Blue-Lösung gegeben und danach mit Entfärbelösung behandelt. Die Zusammensetzung von Färbe- und Entfärbepuffer ist unter 3.6.3 beschrieben. Um das Ergebnis festzuhalten, wurden die Gele eingescannt.

3.3.4 Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)

Um die durch SDS-Page getrennten Proteine mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren, wurden die Proteine durch Western-Blot (Immunoblot) elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Membran (Hybond Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) übertragen (Towbin et al., 1979; Burnett et al., 1981). Zunächst erfolgte die Äquilibration des Polyacrylamid-Geles, der Nitrozellulose-Membran sowie des Whatman-Papiers (Filterpapier) für 15 min in Blottingpuffer. Gel und Membran wurden aufeinander und zwischen jeweils zwei Bögen Whatman-Papier gelegt und, durch Schaumstoffschwämme gepolstert, in eine Blottingkammer gegeben. Die Kammer wurde mit Blottingpuffer aufgefüllt. Um eine Überhitzung während des Proteintransfers zu vermeiden, wurde die Apparatur mit Eis gekühlt und bei 4 °C aufgestellt. Der Proteintransfer erfolgte über 90 min bei einer Stromstärke von 350 mA. Nach Abschluss des Proteintransfers wurde das Polyacrylamidgel verworfen, die Membran beschriftet und in Ponceau-Lösung gegeben. Die Ponceau-Lösung wurde nach 10 min entfernt und die

Membran mit Aqua dest. gespült. Die transferierten Proteine imponierten nun als rote Banden. Somit entstand ein orientierender Eindruck, wie viel Protein übertragen wurde und wo dieses auf der Membran lokalisiert ist. Sofern einzelne Abschnitte der Nitrozellulose-Membran mit unterschiedlichen Erstantikörpern inkubiert wurden, wurde die Membran entsprechend in mehrere Streifen geschnitten. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für 60 min in 5%-iger Magermilch inkubiert. Anschließend wurde der spezifische Erstantikörper, der gegen das zu detektierende Protein gerichtet war, über Nacht auf die Nitrozellulose-Membran gegeben. Nach Entfernen der Erstantikörperlösung erfolgten drei Waschschrte mit TBST für jeweils 10 min. Daraufhin wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Eine Ausnahme stellte der Streptavidin-Peroxidase-Antikörper dar: Dieser wurde direkt als Peroxidase-gekoppelter Erstantikörper verwendet. Er benötigt nur eine Inkubationszeit von 60 min ohne weiteren Zweitantikörper. Nicht gebundener, überschüssiger Zweitantikörper wurde im Anschluss zweimal für je 10 min mit TBST sowie für weitere 10 min mit TBS von der Membran gewaschen. Der Proteinnachweis erfolgte mit Hilfe des Western-Lightning Plus ECL-Kits und dem Gerät LAS3000 (Fuji-Film, Bedfordshire, Großbritannien). Western-Lightning Plus ist ein nicht radioaktives lichtemittierendes System, bei dem Meerrettich-Peroxidase eine Lichtemission durch die Oxidation von Luminol induziert.

3.3.5 Wiederverwendung von Western-Blots

Um einen Western-Blot nacheinander mit mehreren verschiedenen Erstantikörpern inkubieren zu können, ist es notwendig, bereits gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen (Stripping). Dazu wurde die verwendete Nitrozellulose-Membran nach der Reaktion mit dem ECL-Kit viermal für fünf Minuten mit TBST gewaschen und anschließend für 30 min bei 50 °C mit Stripping-Puffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Das in dem Puffer enthaltene SDS und β -Mercaptoethanol wurde durch sechsmaliges Waschen der Membran für fünf Minuten mit TBST vollständig entfernt. Die freigewordenen Bindungsstellen der Membran wurden erneut mit Magermilchpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, so dass eine wiederholte Inkubation der Membran mit einem Erst-Antikörper möglich war.

3.3.6 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) bezeichnet die Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen und ist eine Methode, mit der die Antigenspezifität monoklonaler Antikörper untersucht wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methodik der IP verwendet, um TRP-Proteine für die anschließende Inkubation mit den gewonnenen Antikörperfragmenten anzureichern. Der Antikörper wird an eine feste Phase (z.B. Sepharose) gekoppelt und im Überschuss hinzugegeben. Die Bindung an Protein A bzw. G, welches an die Sepharose gekoppelt ist, erfolgt über den F_c-Teil des Antikörpers. Somit sind seine Antigenbindungsstellen frei zugänglich. Nach Zugabe des Antigens können die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zentrifugation isoliert werden.

Das nach Zentrifugation gewonnene Zellpellet einer großen Kulturflasche wurde in 1 ml RIPA-Puffer (mit Proteaseinhibitoren) resuspendiert, die Zellen durch Scheren mittels einer dünnen Kanüle denaturiert und für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellreste wurden verworfen, das Lysat verarbeitet. Vom Überstand wurden 50 µl abgenommen und das gleiche Volumen an Lämmli-Puffer zugesetzt. Das Zelllysate wurde später im Western-Blot als Kontrolle aufgetragen. Während der Zentrifugation wurde die Sepharose äquilibriert. Dazu wurden pro Reaktionsansatz 100 µl Protein G-Sepharose in 1 ml RIPA-Puffer aufgenommen und für 3 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Prozedur wiederholt. Für die Präabsorption wurden Lysat und äquilibrierte Sepharose vereinigt, für 1h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert und für 3 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und mit 10 µg Antikörper (TRPM3: AK695, TRPC4: AK1056) für mindestens 2h bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Mischung aus Antikörper und Lysat für mindestens eine Stunde (oder über Nacht) auf äquilibriertes Säulenmaterial gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden. Die Sepharose mit den Antigen-Antikörperkomplexen wurde viermal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 3 min, 4.000 rpm, 4 °C). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Puffer abpipettiert und 100 µl Lämmli-Puffer zur Sepharose gegeben. Durch das darin enthaltene reduzierende β-Mercaptoethanol wurden die Disulfidbrücken gespalten und somit die Komplexe von der Sepharose-Matrix gelöst. Zur vollständigen Denaturierung und Lösung der Antigen-Antikörper Bindung wurden die Proben zusätzlich für 5 min auf 95 °C erhitzt. Der Über-

stand, der nur noch aus angereichertem Antigen und Antikörper bestand, konnte nun auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot analysiert werden.

Als Negativkontrolle wurde das gesamte Protokoll der Immunpräzipitation ohne Antikörper durchgeführt, so dass keine Antigen-Antikörper-Komplexe entstehen konnten. Dadurch sollte im Western-Blot auf Höhe des getesteten Proteins in der Negativkontrolle keine Bande sichtbar sein.

3.4 Zellkultur und Transfektion

3.4.1 Zellkultur

Für die beschriebenen Methoden wurden Zelllysate von „Human Embryonic Kidney“-Zellen (HEK293-Zellen) verwendet, die das entsprechende TRP-Protein überexprimierten. Es wurden folgende stabile Zelllinien benutzt:

- HEK TRPC4 β
- HEK TRPC5
- HEK TRPM1
- HEK myc TRPM3 α 2 pCDNA3 Klon 36

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37 °C in wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Atmosphäre. Das zellbiologische Arbeiten erfolgte stets an einer Steril-Bank mit laminarem Fluss. Als Gebrauchsgegenstände dienten sterile Einmalartikel. Die benötigten Lösungen wurden autoklaviert.

Die adhärenenten Zellen wurden in ihrer exponentiellen Wachstumsphase gehalten, indem das Medium mehrmals wöchentlich gewechselt wurde und sie bei Erreichen der Konfluenz verdünnt und neu ausgesät wurden. Das Lösen der adhärenenten Zellen vom Boden der Kulturflasche geschah mittels Trypsinbehandlung. Hierzu wurde zunächst das Medium abpipetiert und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin (Gibco 10x auf 1x verdünnt) und kurzer Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Zellen vom Gefäßboden abgelöst werden. Durch Zugabe von Medium (dreifaches Volumen im Vergleich zu Trypsin) und fetal calf serum (FCS) erfolgte die Inaktivierung des Trypsins. Die so gewonnenen Zellen wurden auf neue Kulturflaschen verteilt oder sofort für Untersuchungen eingesetzt.

Zur Herstellung der für die proteinbiochemischen Untersuchungen benötigten Zelllysate wurden die Zellen für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert, das Medium entfernt und in 10 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1.000 rpm) konnte der Waschpuffer

abgenommen und die Zellen, je nach Protokoll, mit Lämmli- oder RIPA-Puffer lysiert werden.

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde eine bestimmte Zellzahl in der Suspension benötigt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese besitzt vier Quadranten mit einer Fläche von jeweils 1 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm. Der Mittelwert der Zellzahl der ausgezählten Quadranten multipliziert mit 10⁴ ergibt die Zellzahl pro Milliliter. Es wurden jeweils 1 x 10⁶ Zellen pro Reaktionsansatz verwendet.

3.4.2 Transiente Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von fremder DNA in eukaryotische Zellen. Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden HEK293-Zellen mit Konstrukten transfiziert, die sowohl für TRP-Proteine als auch für ein IRES-GFP kodieren. Durch die IRES (Internal Ribosomal Entry Site) lagern sich die Ribosomen erneut an und ermöglichen die unabhängige Translation der RNA des grünfluoreszierenden Proteins (GFP), obwohl die Translation der RNA des vorangehenden TRP-Proteins bereits durch ein Stopp-Codon beendet wurde. Transfizierte Zellen exprimieren daher sowohl die TRP-Proteine als auch das GFP. Anhand des Fluoreszenzsignals des GFP können im Fluoreszenzmikroskop TRP-enthaltende Zellen lokalisiert werden.

Die Zellen wurden 24h vor der transienten Transfektion in Zellkulturschälchen mit einem Durchmesser von 35 mm auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Nach Austausch des Mediums auf den vorbereiteten Zellkulturschälchen wurde das Transfektionsgemisch zugegeben. Pro Ansatz wurden 100 µl Optimem 1-Medium (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zu 5 µl des Transfektionsagens FuGENE 6 (Roche, Basel, Schweiz) gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden 2 µg des Plasmids gegeben. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit (RT) wurde diese Lösung vorsichtig auf die vorbereiteten HEK-Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgte mit folgenden Plasmiden:

- mKoz 26B3 TRPC4 long, pcAGGS M2-IRES GFP Kl. 3-4 endofree 0,5 µg/µl
- mKoz TRPM3 pcAGGS M2-IRES GFP-5 endofree 0,5 µg/µl

Nach 48 Stunden weiterer Inkubationszeit konnte mit den Untersuchungen begonnen werden.

3.5 Angewandte Zellfärbungsmethoden

3.5.1 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Für die Erfindung und Weiterentwicklung des Fluorescence activated cell sorting (FACS) Ende der 1960er Jahre (Herzenberg et al., 1976) wurde L. Herzenberg im Jahre 2006 mit dem Kyoto-Preis ausgezeichnet. Mit dieser Methode kann die Absolut-Zellzahlbestimmung sowie die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften diverser Partikel, wie zum Beispiel Zellen, in einem Flüssigkeitsstrom erfolgen. Für viele Anwendungen ist es hilfreich, die Proben mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Dies kann beispielsweise mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin etc. erfolgen. Somit können bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z.B. die Quantifizierung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen bis hin zu DNA- und Zellzyklusanalysen, auf Einzelzellebene veranschaulicht werden.

Die FACS-Messungen für diese Arbeit wurden an dem Gerät FACSCanto (Becton and Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) durchgeführt. Das FACS-Gerät ist aus einem flüssigkeitsgefüllten (Kapillarsystem), einem optischen und einem elektronischen System aufgebaut. Die untersuchten Zellen werden, in einer Einzelzellsuspension aneinandergereiht, im Durchflusssystem an einem Argon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm vorbeigeleitet. Durch die entstehende Lichtbeugung und Lichtstreuung können Informationen über die Zellgröße mittels „Forwardscatter“ und der Granularität durch im 90° Winkel abgestrahltes Seitwärtsstreulicht („Sidescatter“) gewonnen werden.

Grundlage für die FACS-Analysen im Rahmen dieser Arbeit war eine Antigen-Antikörper Reaktion, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wurde. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde durch einen monochromatischen Laserstrahl angeregt, woraufhin der Farbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge emittierte. Mit dieser Methode kann für jeden Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal gemessen werden. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff Phycoerythrin (PE) verwendet, dessen Emissionsmaximum bei etwa 578 nm liegt.

Die Färbungen wurden nach einem Protokoll einer Arbeitsgruppe des onkologischen Labors der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh) durchgeführt.

Zunächst wurden 1×10^6 Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Diese wurden mit 1 ml 1x PBS gewaschen und 3 min bei 500 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Bei der Durchführung von intrazellulären Färbungen wurden die Zellen

zusätzlich mit Tween bzw. Saponin (in unterschiedlichen Konzentrationen) permeabilisiert. Nach dem Waschschrift folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl Fab-Fragmenten (Konzentration 50 µg/ml) für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Es wurden mehrere Ansätze vorbereitet:

- Inkubation der TRP-überexprimierenden HEK-Zellen mit PBS (Kalibrierung)
- Inkubation der TRP-überexprimierenden HEK-Zellen ohne Fab (Test des Sekundärsystems)
- Inkubation der TRP-überexprimierenden HEK-Zellen mit einem Fab, der eine andere TRP-Sequenz erkennen soll (Negativkontrolle)
- Inkubation der TRP-überexprimierenden HEK-Zellen mit Fabs gegen das vorhandene TRP-Protein
- Inkubation nicht transfizierter HEK-Leerzellen mit Fabs gegen das vorhandene TRP-Protein

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml 1x PBS gewaschen und je 3 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Detektion der gebundenen Fabs über das myc-Tag. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl anti c-myc Überstand des Klons 9E10 (unverdünnt) für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml 1x PBS sowie 3 min Zentrifugation bei 500 g. An das myc-Tag konnte der Biotin-gekoppelte anti-Maus-Antikörper binden. Die Zellen wurden hierzu mit 50 µl anti-Maus-Biotin (1:500) für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml 1x PBS sowie 3 min Zentrifugation bei 500 g, anschließen wurden die Zellen mit 50 µl Strep-PE (1:500) für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgten nochmals zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml 1x PBS sowie 3 min Zentrifugation bei 500 g. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 500 µl 1x PBS resuspendiert und in die FACS-Röhrchen überführt.

Zur Datenverarbeitung wurde die Software FACS Diva (Becton and Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Programm WinMDI (Freeware, entwickelt von Joe Trotter).

3.5.2 Immunzytochemie

Neben den durchflusszytometrischen Analysen wurden weitere zellfärbende Untersuchungen durchgeführt, um die TRP-Proteine auf zellulärer Ebene durch die Fabs nachzuweisen. Dazu wurden HEK293-Zellen wie in 3.4.2 beschrieben transfiziert. Das Zellkulturmedium

wurde entfernt, die Zellen viermal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd (pFA) fixiert (60 min). Nach weiteren Waschschritten (PBS) erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1% Triton in PBS (30 min), sowie erneutes Waschen in PBS. Die Zellen wurden nun über Nacht mit den jeweiligen Erstantikörpern inkubiert. Diese wurden am Morgen des Folgetags zurückpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von Fluoreszenz-gekoppeltem Zweitantikörper (Alexa fluor, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit einer einstündigen Inkubationszeit. Je nach Erstantikörper war dies ein anti-Kaninchen- oder ein anti-Maus-Zweitantikörper. Für die Detektion der Fabs wurde zusätzlich ein Inkubationsschritt mit einem anti-c-myc-Antikörper durchgeführt, bevor der Fluoreszenz-mar-kierte Antikörper zu den Zellen pipettiert wurde. Nach Entfernen des Zweitantikörpers wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Um die Deckgläschen, die die Zellen enthielten, lösen zu können, wurde nochmals 1 ml PBS hinzugefügt. Die Deckgläschen wurden mit einem Tropfen Prolong Gold auf dem Objektträger fixiert. Die Analyse erfolgte am Mikroskop unter Zuhilfenahme spezifischer Farbfilter.

3.6 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Medien

3.6.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Die Zusammensetzung der Pufferlösungen richtete sich nach Sambrook und Russell (2001). Zum Teil fanden laborinterne Modifikationen der Protokolle statt. Es wurde entionisiertes autoklaviertes Wasser zur Herstellung für Puffer und Lösungen verwendet und, falls nicht anders angegeben, bei 121 °C und 1 bar für 20 Minuten autoklaviert.

LB-Medium

- 10 g NaCl
- 10 g Bakto-Trypton
- 5 g Hefe
- ad 1000 ml Aqua dest.

10x DNA-Auftragspuffer

- 0,25% Bromophenolblau
- 0,25% Xylencyanol FF
- 0,01 M Tris (pH = 7,0; RT)
- 0,05 M EDTA (pH = 8.0)
- 40% (w/v) Harnstoff

- 40% (w/v) Glycerol, wasserfrei

Puffer für PCR mit Taq-Polymerase

- 100 mM Tris (pH = 8,3; RT)
- 15 mM $MgCl_2$
- 500 mM KCl

STET-L-Puffer

- 0,05 M Tris-HCl (pH = 8,0; RT)
- 0,05 M EDTA (pH = 8,0)
- 5% (v/v) Triton X-100
- 8% (w/v) Saccharose
- Vor Gebrauch Zugabe von Lysozym (10 μ l Lysozym-Lösung pro ml STET)

Lysozym-Lösung

- 10 mg/ml Lysozym

TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer (pH = 8,0; RT)

- 0,089 M Tris
- 0,089 M Borsäure
- 0,001 M EDTA

3.6.2 Puffer und Lösungen für die Fab-Gewinnung

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde, falls nicht anders angegeben, entionisiertes Wasser verwendet.

Carbonatpuffer

- 10,6 g Na_2CO_3
- 8,4 g $NaHCO_3$
- ad 1000 ml Aqua dest. für 0,1M Lösung

PBS-Puffer (pH = 8,0)

- 0,14 M NaCl
- 2,7 mM KCl
- 1,5 mM KH_2PO_4
- 8 mM Na_2HPO_4

TEA 100 mM

- 140 μ l Triethylamin

- ad 10 ml Aqua dest.
- frische Zubereitung (pH = 12,0)!

TS-Puffer (pH = 8,0)

- 0,2 M Tris-HCl
- 0,5 M Saccharose

2xTY-Medium

- 16 g Bakto-Trypton
- 10 g Hefe
- 5 g NaCl
- ad 1000 ml Aqua dest.

2xTY-AG

- 2xTY-Medium wie oben beschrieben
- 100 µg/ml Ampicillin
- 2% Glukose

2xTY-AK

- 2xTY-Medium wie oben beschrieben
- 100 µg/ml Ampicillin
- 25 µg/ml Kanamycin

2xTY-AG Agar-Platten

- 2xTY-AG wie oben beschrieben
- 15 g Agar

3.6.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, diene entionisiertes Wasser als Lösungsmittel.

Blockierungspuffer

- 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

Blotting-Puffer (pH = 8,3)

- 0,25 M Tris
- 1,92 M Glycin
- 20% (v/v) Methanol
- 1% (w/v) SDS

Coomassie-Blue-Färbelösung

- 0,125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
- 45% (v/v) Ethanol
- 10% (v/v) Essigsäure

Entfärbe-Lösung

- 9% (v/v) Ethanol
- 6% (v/v) Essigsäure

Lämmli-Puffer (= 2x SDS-Probenpuffer) (pH = 6,8)

- 120 mM Tris
- 20% (v/v) Glycerol
- 10% (v/v) β -Mercaptoethanol
- 8% (w/v) SDS
- 0,01% (w/v) Bromphenolblau

PBS-Puffer (pH = 7,4)

- 0,14 M NaCl
- 2,7 mM KCl
- 1,5 mM KH_2PO_4
- 8 mM Na_2HPO_4

Ponceau S-Färbelösung

- 2% (w/v) Ponceau S
- 3% (v/v) Trichloressigsäure

Proteaseinhibitoren

Ansatz in Stammlösungen und Verdünnung in späteren Puffern auf die angegebene Konzentration.

- 90 mM Iodacetamid
- 1 mM Benzamidon
- 1 mM Phenanthrolin
- 2 μM Leupeptin
- 2 μM Pepstatin
- 1 μM Antipain
- 0,1 μM PMSF
- 0,3 μM Aprotinin

RIPA-Puffer

- 150 mM NaCl
- 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0; 4 °C)
- 5 mM EDTA
- 1% Nonidet P40
- 0,1% SDS
- 0,5% Na-Deoxycholat

4x Sammelgelpuffer (pH = 6,8)

- 0,5 M Tris
- 0,4% (w/v) SDS

10x SDS-Elektrophorese-Puffer

- 0,25 M Tris
- 1,92 M Glycin
- 1% (w/v) SDS

Strippingpuffer (pH = 6,8)

- 2% (w/v) SDS
- 0,1 M β -Mercaptoethanol
- 0,00625 M Tris

10x TBS-Puffer (pH = 7,5)

- 0,5 M Tris
- 1,5 M NaCl

TBST-Puffer

- 0,5 M Tris
- 1,5 M NaCl
- 0,01% Tween 20

4x Trenngelpuffer (pH = 8,8)

- 1,5 M Tris
- 0,4% (w/v) SDS

3.7 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien in dieser Arbeit wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen GE Healthcare (Chalford St. Giles, Großbritannien), Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA), New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München) bezogen.

3.8 Computersoftware

Zur Datenerhebung, Auswertung und Erstellung der Arbeit wurden folgende Programme verwendet:

- Accelrysgene
- AIDA (advanced image data analyzer)
- Becton Dickinson FACS Diva
- Carl Zeiss Axio Vison
- Corel Draw X4
- Microsoft Excel 2007
- Microsoft Word 2007
- WinMDI 2.8



4. Ergebnisse

TRP-Kanäle sind kationenpermeable Kanäle, die an vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Bisher sind kaum spezifische Aktivatoren/Inhibitoren für die TRP-Kanäle bekannt. Es wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen versucht, die Funktion der TRP-Proteine mit Hilfe von Antikörpern zu beeinflussen (Xu et al. 2005; Naylor et al., 2008), jedoch gelang mit diesem Ansatz bisher – bis auf eine Ausnahme (Klionsky et al., 2006) – lediglich eine partielle Inhibition der Kanalfunktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fabs (fragment antigen binding) gegen verschiedene TRP-Kanäle gewonnen. Auf Grund ihrer, im Vergleich zu vollständigen Immunglobulinen, geringen Größe ist es denkbar, dass Fabs besser an der Kanalpore angreifen und somit eine wirksamere Modulation der Kanalaktivität erzielen können. Für die Gewinnung der Antikörperfragmente wurden Sequenzen von TRPC- und TRPM-Kanälen verwendet. Auf Grund ihrer Homologie zu den anderen TRP-Kanälen könnten die Ergebnisse auch auf weitere TRP-Proteine übertragen werden.

Im ersten Teil des Ergebniskapitels wird eine Klonierungsstrategie für die Herstellung biotinylierter Fusionsproteine als Antigene für das Phagen-Display dargestellt.

Im zweiten Teil schließen sich Methoden zur Untersuchung auf Spezifität und Sensitivität der gewonnenen Antikörperfragmente an (ELISA, Western-Blot, Durchflusszytometrie, Immunzytochemie).

4.1 Auswahl der Peptide

Die als Antigen zur Selektion der Fabs ausgewählten TRP-Peptide beruhen auf extra- und intrazellulären Sequenzen von Maus-TRPM3 und TRPC4. Wie für die in Kapitel 3.1.13 beschriebenen TRPM1- und TRPC5-Peptide existieren verfügbare Mausmodelle (knock-out-Mäuse), aus denen Negativkontrollen für Untersuchungen von TRPM3 und TRPC4 in nativen Geweben gewonnen werden können. Ebenso wurden in unserem Institut bereits mehrere Antikörper gegen diese Proteine generiert, die für diese Arbeit u.a. als Positivkontrollen für Western-Blots und Immunzytologie verwendet werden können. TRPM3 und TRPC4 sind für Ca^{2+} -Ionen permeabel, sodass auch die Möglichkeit von Kalzium-Imaging-Untersuchungen besteht. Aufgrund der Homologie unter den TRP-Kanälen könnten die TRPM3 und TRPC4-Proteine repräsentativ zur Etablierung der Methodik verwendet werden.

4.1.1 Inhibierung von TRP-Kanälen

Wie in Kap. 2.1 dargestellt, bestehen TRP-Kanäle aus 6 Transmembrandomänen, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind (siehe auch Abbildung 11).

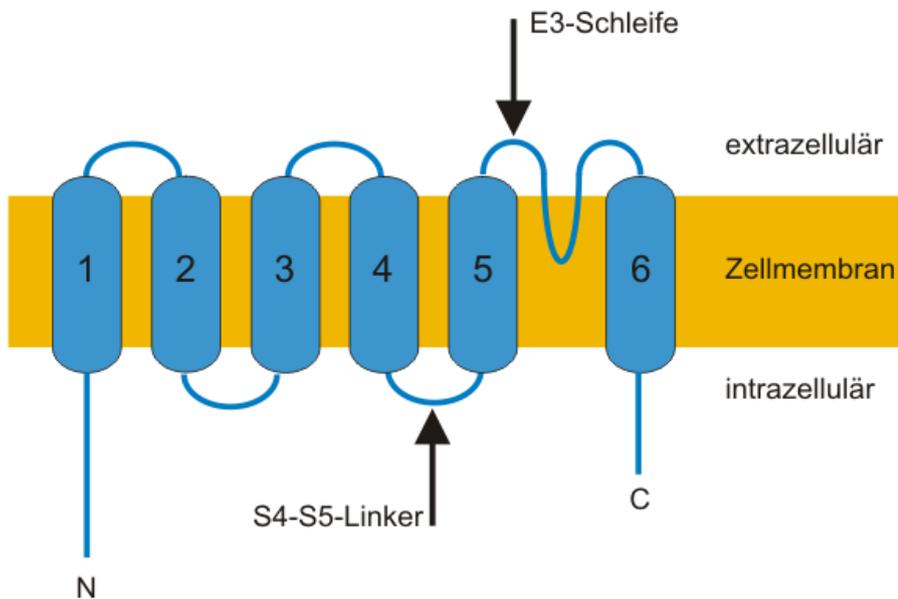


Abbildung 11. Schematische Darstellung eines TRP-Transmembranproteins

Das abgebildete TRP-Protein besteht aus sechs Transmembrandomänen. Die kanalbildende Pore liegt zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6. Der S4-S5-Linker (intrazellulär) und die E3-Schleife (extrazellulär) sind die beiden Regionen, die die spezifischen Epitope der Antikörperfragmente darstellen.

Bei der Auswahl der Peptide zur Generierung von Fabs, die die Kanalpore blockieren, wurde ein Abschnitt in der dritten Extrazellulärschleife (E3) gewählt, der im Anfangsbereich der Kanalpore liegt. Bei der E3-Schleife handelt es sich um einen Abschnitt des jeweiligen Kanalproteins, an den Antikörper nicht nur binden, sondern auch die Funktion beeinflussen können (siehe 2.1).

Die ausgewählten Peptidsequenzen, gegen die Antikörperfragmente zur Kanalinhibition entwickelt wurden, sind im Alignment (Abbildung 12) hervorgehoben.

mTRPM2	RMMKDVFFFLFLLAVWVVSFGVAKQAILIHNE	SRVDWIFRGVVYHSY	LTIF	977
mTRPM8	RMLIDVFFFLFLLFAVWMVAFGVARQGILRONE	QRWRWIFRSVIYEPY	LAMF	912
mTRPM4	KMMKDVFFFLFLLCVWLVAVGVATEGILRP	QDRSLPSILRRVYFRPY	LQIF	971
mTRPM5	RMMKDVFFFLFLLSVWLVAYGVTQALLHP	HDGRLEWIFRRVLYR	PYLQIF	917
mTRPM1	KMMIDMLYFVVIIMLVVLMVLSFGVARQAILH	PEEKPSWKLARNIF	YMPYWMIY	1056
mTRPM3	KMMIDMMYFVIIMLVVLMVLSFGVARQAILH	FPNEEPSWKLARNIF	YMPYWMIY	1055
mTRPM6	KMAANMFYIVIIMAILVLLSFGVARKAILS	PKPEPPSWRLARDI	VFEFYWMMY	1028
mTRPM7	KMVANMFYIVVIMALVLLSFGVPRKAILYP	HEEPSWSLAKDI	VFHYPYWMIF	1045
Antigen M3 außen (P1)				
mTRPC4	LAFANGLNQLYFY	YETKG---	LSCKGIRCEKQ-NN	AFSTLFETLQSLFWS 577
mTRPC5	LAFANGLNQLYFY	YETRAIDEPNNCKGIRCEKQ-NN	AFSTLFETLQSLFWS	579
mTRPC1	FSFTIGLTQLYDKGYTSKEQ--	KDCVGLIFCEQ	QSN	DTFHSTGTCFALFWY 614
mTRPC3	LAFMIGMFILYSYY	LGAKV-----	NPAFTTVEESFKTLFWS	613
mTRPC7	VAFMIGMFNLYSYY	RGAKY-----	NPAFTTVEESFKTLFWS	627
mTRPC6	VAFMIGMFNLYSYY	IGAKQ-----	NEAFTTVEESFKTLFWA	681
mTRPC2	TAFLCGLNNIYVPYQSEK-	-----	LGNFNETFQFLFWT	775
Antigen C5 außen (P2)				
Antigen C5 außen (längeres zweites C5, P6)				

Abbildung 12. Ausschnitt aus einem Alignment von TRP-Proteinen im Bereich der E3-Schleife

Im oberen Bildabschnitt ist ein Ausschnitt aus einem Alignment der TRPM-Proteine, im unteren Bildabschnitt ein Ausschnitt aus einem Alignment der TRPC-Proteine dargestellt. Die extrazellulären Sequenzabschnitte, die als Peptide für das Screening mittels Phagen-Display verwendet wurden, sind gelb gefärbt. In grüner Schrift und unterstrichen ist das verlängerte TRPC5 Peptid dargestellt, das als Peptid 6 (P6) bezeichnet wurde.

4.1.2 Konstitutive Aktivierung von TRP-Kanälen

Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, konnten einige Arbeitsgruppen durch Mutationen in der TRP-Sequenz eine konstitutive Aktivierung des entsprechenden Kanals bewirken. Im Labor des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes konnte für weitere TRP-Kanäle (TRPV6, TRPC4, TRPC5) gezeigt werden, dass der Austausch der in allen TRP-Kanälen konservierten Aminosäure Glycin zu Cystein an der entsprechenden Position in der Sequenz zur konstitutiven Kanalaktivierung führt (siehe Alignment in Abbildung 13, türkis hinterlegt).

Die zur Fab-Selektion ausgewählten Aminosäure-Sequenzabschnitte von TRPC4 und TRPM3 sind im Alignment (Abbildung 13) durch eine grüne Markierung hervorgehoben. Sie beschreiben einen Teil der Sequenz des S4-S5-Linkers und enthalten beide die oben beschriebene Mutation. Die beschriebenen Sequenzen wurden auf Grund der Annahme ausgewählt, dass eine Antikörperbindung die Interaktion zwischen dem S4-S5-Linker und dem S6-Segment verhindern könnte, da der Antikörper die für die Interaktion wichtigen AS-Seitengruppen blockiert bzw. abschirmt und somit eine konstitutive Aktivierung des Kanals bewirkt (siehe Kapitel 2.1).

4. Ergebnisse

mTRPV3	TRGFQSMGMYSVMIQKVILHDVLKFLFVYILFLLGFGVALASLIE	610
mTPRM2	FTISKTLGPKIIIVKRMKDVFFFLFLLAVWVVSFGVAKQAILIHNESRVDWI	964
mTPRM8	FTVSRNLGPKIIMLQRMILIDVFFFLFLLFAVWVAFGVARQGILRQNEQRWRWI	869
mTRPM4	FTV NK QLGPKIVIVS K MMKDVFFFLFLLCVLWLVAYGVATEGILRPQDRSLPSI	935
mTPRM5	FAIHKQLGPKIIIVERMMKDVFFFLFLLSVWLVAAYGVTTQALLHPHDGRLEWI	874
mTPRM1	FGVNKYLGPYVMMIGKMMIDMLYFVVIIMLVVLMVLSFGVARQAILHPPEEKPSWKL	1013
mTPRM3	FGVNKYLGPYVMMIGKMMIDMMYFVIIMLVVLMVLSFGVARQAILFPNEEPSWKL	1012
mTRPM6	FAVNQHAGPYVTMIAKMAANMFYIVIIMAVLLSFGVARKAILSPKEPPSWRL	985
mTRPM7	LAVNQAGPYVMMIGKMVANMFYIVVIMALVLLSFGVPRKAILYPHEEPSWSL	992
Antigen M3 innen (P4)		
mTRPC4	FTANSHLGPLQISLGRMLLDILKFLFIYCLVLLAFANGLNQLYFYYEETKG--	545
mTRPC5	FTANSHLGPLQISLGRMLLDILKFLFIYCLVLLAF <u>ANGLNQLYFYYETRAIDE</u>	549
mTRPC1	YTTSSILGPLQISMGQMLQDFGKFLGMFLLVLSFTIGLTQLYDKGYTSKEQ-	583
mTRPC3	LPANESFGPLQISLGRTVKDIKFKMVLFIIMVFLAFMIGMFILYSYYLGAKV--	588
mTRPC7	LPANESFGPLQISLGRTVKDIKFKMVIIFIMVFVAFMIGMFNLYSYYRGAKY--	602
mTRPC6	LPANESFGPLQISLGRTVKDIKFKMVIIFIMVFVAFMIGMFNLYSYYIGAKQ--	656
mTRPC2	LPAHESLGTLQISIGKMIIDDMIRFMFILMIILTAFLCGLNNIYVPYQSEK--	864
Antigen C4 innen (P3)		

Abbildung 13. Ausschnitt aus einem Alignment von TRP-Proteinen im Bereich des S4-S5-Linkers

Der abgebildete Ausschnitt des Alignments verschiedener TRP-Proteine zeigt deren Sequenzen in der Nähe des S4-S5-Linkers. In der ersten Zeile ist ein Ausschnitt der TRPV3-Sequenz gezeigt. Die von Asakawa et al. (2006) beschriebene Mutation an Position 573 (Glycin zu Serin bzw. Cystein) ist in türkis hervorgehoben. Im mittleren Bildabschnitt ist ein Ausschnitt aus einem Alignment der TRPM-Proteine dargestellt. Der intrazelluläre Sequenzabschnitt des Peptides, das für das Screening mittels Phagen-Display verwendet wurde, ist grün eingefärbt. Im unteren Bildabschnitt ist ein Ausschnitt aus dem Alignment der TRPC-Proteine zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die abgebildeten Sequenzen homolog sind und dass das beschriebene Glycin an Position 573 aus TRPV3 in allen abgebildeten TRP-Proteinen sowie den zur Selektion verwendeten Peptiden vorhanden ist. In grüner Schrift und unterstrichen ist das verlängerte TRPC5 Peptid dargestellt, das als Peptid 6 (P6) bezeichnet wurde.

4.2 Herstellung biotinylierter Peptide

Die Gewinnung und Selektion der Fabs erfolgte mittels Phagen-Display. Da für diese Methode biotinylierte TRP-Peptide als Antigene benötigt wurden, wurde ein entsprechendes Konstrukt zur Expression in Bakterien kloniert.

Die zusätzliche Biotinylierung von Peptiden mittels spezieller Bakterienstämme ermöglicht, die für das Phagen-Display benötigten biotinylierten Peptide kostengünstig und mit geringem Zeitaufwand herzustellen. Hierzu wurde der die Biotin-Ligase überexprimierende *E. coli*-Stamm AvB101 verwendet, der ein Biotin-Ligase BirA kodierendes Plasmid trägt (Cloutier et al., 2000).

Für die Klonierungsexperimente wurden Sequenzen von TRPC5 und TRPM1 verwendet. Die verwendeten AS-Sequenzen sind in Abbildung 14 dargestellt (grau hinterlegt).

mTRPC5	LGRMLLDILKFLFIYCLVLLAFANGLNQLYFYYETRAIDEPNNCKGIRCEKQ-N	563
mTRPC5	NAFSTLFETLQSLFWSVFGLLN-LYVTNVKARHEFTEFVGATMFGTYNVISL	613
mTRPM1	APDQLSLALAWNVRVDIARSQIFVFGPHWPPGLGSLAPPVDTKAAEKEKKPPTATT	470
mTRPM1	KGRGKGGKGGKGGKVKKEEVEEETDPRKLELLNWVNALEQAMLDALVLDREVDFVKL	524

Abbildung 14. Sequenzabschnitte von TRPC5 und TRPM1

Die AS-Sequenzen der beiden TRP-Fragmente, die für die Klonierungsexperimente verwendet wurden, sind grau eingefärbt.

Abbildung 8 zeigt den Aufbau des verwendeten Konstruktes (siehe Kap. 3.1.13). Nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum wird durch die der TRP-Sequenz vorangehende Signalsequenz der Transport der Proteine ins Periplasma vermittelt. Der Sequenz des jeweiligen TRP-Fragments folgt die der Hinge-BAD-Region. Diese ist für die Biotinylierung durch die BirA-Biotin-Ligase wichtig. Die 13 AS lange Sequenz der BAD ist ausreichend, um eine Biotinylierung zu ermöglichen (Schatz, 1993). Es kommt zu einer gerichteten Biotinylierung des Lysinrestes in der BAD. Da die Biotinylierung nur an der BAD erfolgen kann, können keine anderen strukturell oder funktionell wichtigen Domänen biotinyliert und dadurch in ihren Proteineigenschaften verändert werden (Hoyer-Hansen et al., 2000).

C-terminal der Hinge-BAD-Region befinden sich ein hexa-Histidin- und ein myc-Tag. Über diese Tags können die exprimierten Proteine mittels anti-his- bzw. anti-myc-Antikörpern im Western-Blot detektiert werden. Desweiteren dienen die Tags zur Aufreinigung der Proteine.

Da Peptide, die in intrazelluläre Membranen eingebaut werden, schwerer isoliert werden können (Lidskog et al., 2005), ist es für die Expression der biotinylierten Peptide wichtig, dass diese ins Periplasma sezerniert werden. Mittels Hydrophobizitätsanalyse (Kyte und Doolittle, 1982) können hydrophobe sowie hydrophile Regionen der TRP-Kanal-Proteine und somit auch Anzahl und Lokalisation ihrer Transmembrandomänen (TM) vorhergesagt werden. Diese Vorhersagen beruhen auf statistischen Modellen. Eine Transmembrandomäne wird durch eine Folge von mindestens 17 hydrophoben Aminosäuren beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit für das tatsächliche Vorliegen einer Transmembrandomäne in einem solchen Bereich ist umso höher, je hydrophober die betrachtete Region ist und je mehr AS sie umschreibt. Die in der Literatur anerkannte Annahme, dass die TRP-Kanal-Proteine aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut sind, wurde bisher nur für den TRPC3-Kanal tatsächlich nachgewiesen (Vannier, Birnbaumer et al., 1998). Für andere TRP-Kanäle wird diese Annahme aus Hydrophobizitätsblots und Sequenzhomologien in Analogie getroffen.

4. Ergebnisse

In den Abbildungen 15 und 16 sind entsprechende Kyte-Doolittle Analysen der TRPC5- und TRPM1-Kanalproteine abgebildet. Die sechs wahrscheinlichen Transmembrandomänen (TM) wurden durch Verwendung und Vergleich mehrerer Statistik-Programme vorhergesagt und sind in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet (TM1-6). Die Hydrophobizitätsvorhersage für den Sequenzbereich der untersuchten TRP-Peptide ist in grau dargestellt. Aufgrund der Hydrophobizitätsanalysen der beteiligten Aminosäuren der Proteine (grau) ist davon auszugehen, dass es sich um nicht-transmembranäre Abschnitte handelt. Das 75 AS lange TRPC5-Fragment beschreibt einen Teil der Porenregion, was durch die Hydrophobizitätsanalyse wiedergegeben wird. Mit knapp 40% hydrophoben AS ist deren Anteil bei diesem Fragment deutlich höher als bei dem verwendeten TRPM1-Fragment. In zwei Bereichen sind zehn hydrophobe oder nur schwach hydrophile AS hintereinander gereiht. Das Alignment mit dem TRPC4-Gesamtprotein (Uniprot Accessionnummer Q9UL62) ergibt, dass es sich um einen weitgehend extrazellulär sowie helikal gelegenen Abschnitt handeln muss. Dies korreliert mit der Annahme, dass die porenbildende Schleife von TRPC5 zum Teil in die Membran eintaucht. Ein Export des Peptids ins Periplasma nach der Synthese ist somit sehr wahrscheinlich.

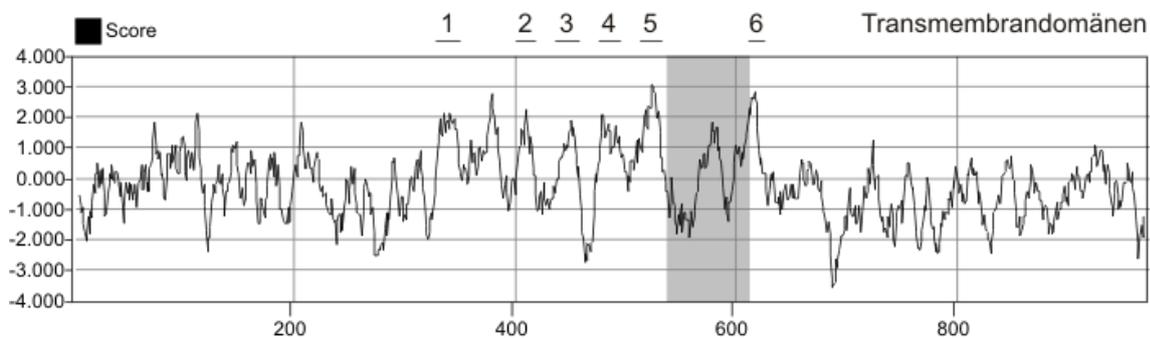


Abbildung 15. Kyte-Doolittle-Analyse für mTRPC5

Die vorhergesagten vermutlichen Lokalisationen der Transmembrandomänen sind mit den Ziffern 1-6 gekennzeichnet. Das mittels Hydrophobizitätsanalyse untersuchte TRPC5-Peptid beschreibt den Bereich der Kanalpore (grau dargestellt).

Das ausgewählte TRPM1-Fragment umschreibt ein Exon, für das ein Effekt auf die Regulation der Kanalfunktion vermutet wird. Das 57 AS lange Fragment besteht zu über 80% aus hydrophilen Aminosäuren. Die 11 hydrophoben AS sind über die gesamte Sequenz verteilt. Wie in Abbildung 15 (Kyte-Doolittle-Analyse von TRPM1) dargestellt, ist dies mit der Annahme vereinbar, dass es sich um einen N-terminalen extrazellulären Kanalproteinabschnitt handelt. Dies zeigt auch das Alignment mit dem TRPM1-Gesamtprotein (UniProt Accessionnummer Q7Z4N2). Somit ist die Wahrscheinlichkeit für einen Einbau in intrazelluläre Memb-

ranen sehr gering. Es ist davon auszugehen, dass auch das TRPM1-Peptid nach Synthese ins Periplasma exportiert wird und eine Aufreinigung möglich ist.

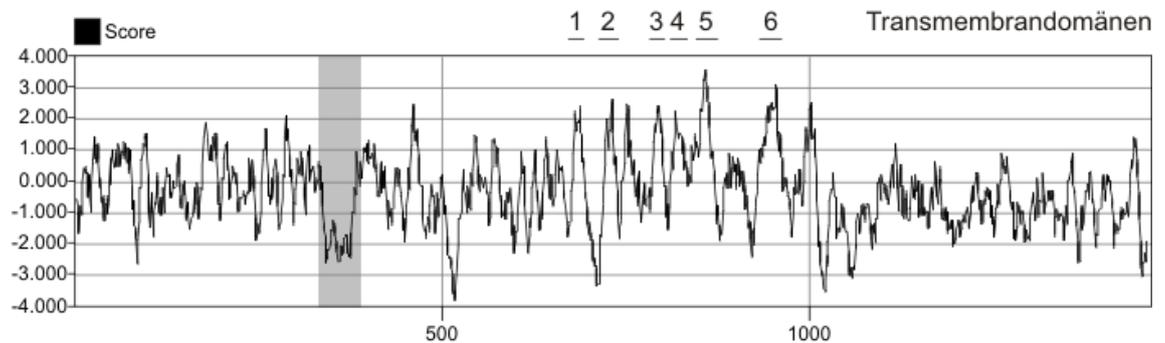


Abbildung 16. Kyte Doolittle Analyse für mTRPM1

Die vorhergesagten vermutlichen Lokalisationen der Transmembrandomänen sind mit den Ziffern 1-6 gekennzeichnet. Das mittels Hydrophobizitätsanalyse untersuchte TRPM1-Peptid beschreibt ein Exon im N-terminalen zytosolischen Bereich (grau dargestellt).

Im Weiteren wurden die AvB101-Bakterien mit dem TRPM1- bzw. TRPC5-Plasmid transfiziert. Die Bildung der biotinylierten Peptide wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Synthese mittels Coomassie Blue-Färbung sowie Western-Blot kontrolliert. Das errechnete Molekulargewicht für die biotinylierten Peptide mit BAD und Hinge-Region beträgt für TRPM1 10,8 kDa und TRPC5 12,8 kDa.

In Abbildung 17 ist das zugehörige Coomassie Blue gefärbte SDS-Gel abgebildet. In den Spuren 1-5 wurden Proben aufgetragen, die während der Expression des TRPM1-Peptides gewonnen wurden, in den Spuren 6-9 entsprechend Zelllysate TRPC5 enthaltender Bakterien. Auf Höhe des rechnerisch erwarteten Molekulargewichtes sind weder für TRPM1 noch für TRPC5 adäquate Banden zu sehen. Durch Pfeile markiert sind Banden in Höhe von ca. 18 kDa, die den jeweiligen TRP-Proteinen entsprechen könnten.

Von links nach rechts, d.h. von frühen Zeitpunkten der Expression hin zu späteren, ist eine Zunahme der Proteinmenge zu sehen. Zwar gewinnen die Banden nur leicht an Intensität, jedoch gilt hierbei zu berücksichtigen, dass mit zunehmender Synthesedauer der Auftrag der Probenmenge angepasst wurde ($t = 0\text{h } 20\ \mu\text{l}$, $t = 1\text{h } 10\ \mu\text{l}$ und $t = 2\text{-}4\text{h } 5\ \mu\text{l}$). Bei gleicher Intensität bedeutet dies, dass die Gesamtproteinmenge zugenommen hat.

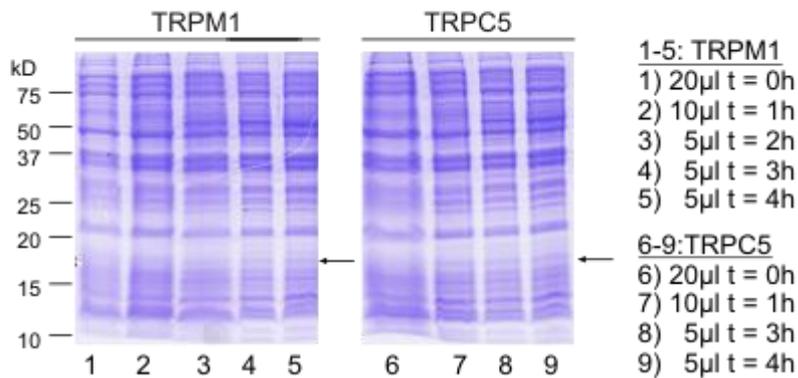


Abbildung 17. TRP-Peptidexpression M1 und C5 zu verschiedenen Synthese-Zeitpunkten

Coomassie Blue-Färbung eines SDS-Gels. Spuren 1-5: TRPM1, 6-9: TRPC5; Spuren 1 und 6: 20 µl Proben zu t = 0h, Spuren 2 und 7: 10 µl Proben zu t = 1h, Spur 3: 5µl Probe zu t = 2h, Spuren 4 und 8: Proben zu t = 3h und Spuren 5 und 9: Proben zu t = 4h. Durch die Pfeile markiert sind Banden in Höhe von ca. 18k Da, die dem jeweiligen TRP-Protein entsprechen könnten.

Expression und Zunahme der Proteinmenge konnte, wie in Bild A von Abbildung 18 dargestellt, im Western-Blot mittels anti-c-myc-Antikörper nachgewiesen werden. Das Bild beschreibt die Ergebnisse der Expression von TRPM1 (links) und TRPC5 (rechts). Die Proben wurden zu den Zeitpunkten t = 0h, t = 1h, t = 2h und t = 4h nach Expressionsbeginn gewonnen und als Bakterienlysate aufgetragen. Die Detektion der synthetisierten TRP-Peptide erfolgte mittels anti-myc-Hybridoma-Überstand (Erstantikörper) sowie einem Peroxidasegekoppelten anti-Maus-Zweitantikörper.

In Spur 1 wurden 10 µl der Probe, die vor Beginn der Induktion (t = 0h) abgenommen wurde, aufgetragen. Erwartungsgemäß ist in dieser Spur kein Peptid detektierbar. In den Spuren 2, 3 und 4 wurden 5 µl Zellysate aus der TRPM1-Expression zu t = 1h sowie 2,5 µl zu t = 2h bzw. zu t = 4h aufgetragen. Trotz Halbierung des aufgetragenen Probenvolumens gewinnen die in Abbildung 18 mit einem Pfeil gekennzeichneten Proteinbanden an Intensität, was für eine deutliche Anreicherung spricht. Gleiches gilt für TRPC5. Hier wurde zusätzlich eine Probe zum Zeitpunkt t = 3h aufgetragen (2,5 µl). Die Intensität des erhaltenen Signals ist bei TRPC5 generell schwächer als bei TRPM1, jedoch ist auch hier eine kontinuierliche Zunahme der Proteinmenge über die Zeit zu beobachten.

Des Weiteren konnte im Western-Blot die Biotinylierung der synthetisierten TRP-Proteine nachgewiesen werden. Dazu wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter (HRP, engl. = horseradishperoxidase) Streptavidin-Antikörper verwendet, der spezifisch an Biotin bindet. Die Zunahme der biotinylierten Peptide über die Zeit ist in Bild B (Abbildung 18) dargestellt. Ebenso wie in Bild A sind links Ergebnisse von TRPM1 und rechts von TRPC5 zu sehen. Es wurden jeweils 10 µl Bakterienlysate pro Spur aufgetragen. Insgesamt ist im Verlauf der vier-

stündigen Expressionszeit eine Zunahme der Bandenintensität (Zunahme an biotinyliertem Protein) zu beobachten. Ebenso wie in der Coomassie-Blue Färbung (Abbildung 16) ist das Molekulargewicht der Banden größer als errechnet.

Es ist somit von einer Expression der TRP-Peptide als auch von deren Biotinylierung in Bakterien auszugehen. Allerdings handelt es sich vermutlich um die Synthese relativ geringer Proteinmengen. Während die Signalstärke im Western-Blot von den verwendeten Antikörpern abhängig ist und nur die relative Zunahme an Protein wiedergegeben werden kann, gibt das Coomassie-Blue gefärbte Gel mehr Auskunft über die absolute Proteinmenge. Die Intensität der Banden war hier (Abbildung 17) sehr gering.

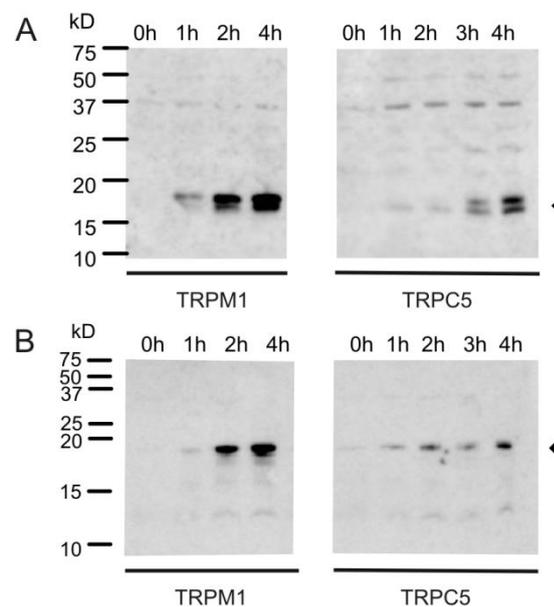


Abbildung 18. Western-Blot zur Detektion der biotinylierten TRPM1- und TRPC5-Peptide

Proteinexpression von TRPM1 und TRPC5 zu den Zeitpunkten $t = 0\text{h}$, 1h , 2h , 3h bzw. 4h . Bild A: Verwendeter 1. Antikörper: anti-myc (Hybridoma Überstand des Klons 9E10), 2. Antikörper: anti-Maus-POX, Bild B: Verwendeter Antikörper: Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Streptavidin Antikörper (Streptavidin-HRP).

Zum Test der Kompatibilität von Vektor und Bakterien wurde die Expression eines weiteren Proteins (Fab, von der Arbeitsgruppe PD Dr. G. Held zur Verfügung gestellt) unter Verwendung des gleichen Systems durchgeführt (Abbildung 19). Der exprimierte Fab-Antikörper konnte mit Hilfe eines anti-human-Fab- und eines anti-his-Antikörpers nachgewiesen werden. In den Spuren 1-5 wurden Bakterienlysate (20 , 10 , 5 , 5 , $5\ \mu\text{l}$) aufgetragen, die zu den Zeitpunkten $t = 0\text{h}$, 1h , 2h , 3h , 4h gewonnen und mit dem anti-human-Fab-Antikörper detektiert wurden. In den Spuren 6-9 wurden Proben zu den Zeitpunkten $t = 0\text{h}$, 1h , 2h und 4h (20 , 10 , 5 , $5\ \mu\text{l}$) aufgetragen und mit einem anti-his-Antikörper detektiert. Durch den anti-

his-Antikörper ist nur die schwere Kette des Fabs nachweisbar, da die beiden Ketten durch Denaturierung getrennt wurden und lediglich die schwere Kette das hexa-Histidin-Tag besaß. Mit Hilfe beider Antikörper war eine Zunahme der Proteinmenge über die Zeit (t = 0h bis t = 4h) nachweisbar. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die verwendeten Bakterien und der pCES-Vektor kompatibel sind und somit eine Proteinexpression mittels *E. coli* AvB101 Bakterien und pCES-Vektor prinzipiell möglich ist.

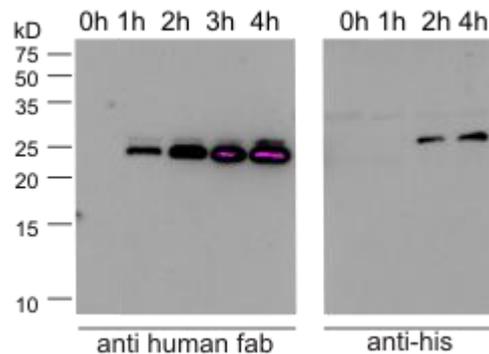


Abbildung 19. Western-Blot: Expression eines Fabs mit Hilfe von AvB101-Bakterien

Proben aus der Proteinexpression eines Fabs zu verschiedenen Zeitpunkten (t = 0h, 1h, 2h, 3h bzw. 4h). Verwendeter Antikörper in den Spuren 1-5: anti-human-Fab, 2. Antikörper: HRP-gekoppelter Streptavidin-Antikörper, Spuren 6-9: Verwendeter 1. Antikörper: anti-his-Antikörper, 2. Antikörper: anti-Kaninchen-POX.

Die exprimierten TRP-Proteine mussten nun aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt werden. Die Proteinisolierung gestaltete sich jedoch schwierig, da weder nach einmaliger Zentrifugation (Überstand 1) noch nach wiederholter Zentrifugation (Überstand 2) die Peptide aus dem Bakterienlysat gewonnen werden konnten. Die Proteinisolierung wurde deswegen wie folgt durchgeführt: Für die Bakterienlyse wurde TS-Puffer anstelle von Bindung-Puffer verwendet (siehe 3.3.1). Jedoch führte auch dieser Schritt nicht zum gewünschten Erfolg. Auch hier enthielten weder Überstand 1 noch Überstand 2 die gebildeten Peptide. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Proteinisolierung von TRPM1 in Abbildung 20 abgebildet. Die Isolierung von TRPC5 zeigte ein ähnliches Bild.

Die Detektion der Peptide nach der Bakterienlyse mittels Bindungs- bzw. TS-Puffer erfolgte mit dem anti-myc-Antikörper durch Western-Blot (Abbildung 20). In den Spuren 1-3 wurde Bakterienlysat zu verschiedenen Zeitpunkten der Peptidsynthese aufgetragen. Während in Spur 1 zum Zeitpunkt t = 0h noch kein Protein gebildet wurde, sieht man in Spur 2 und 3 (t = 2h bzw. 4h), dass zunehmend Protein synthetisiert wurde. In Spur 4 und 5 sind die Überstände nach Lyse des Bakteriensediments mit dem TS-Puffer aufgetragen. Hier waren keine Peptide im Überstand detektierbar. Ebenso konnte in den Überständen, die nach Lyse des

Bakteriensediments mit Bindingpuffer erhalten wurden (Spur 7 und 8), kein Proteinnachweis erfolgen. Hingegen erhielt man ein sehr starkes Signal in den Spuren, in denen eine Probe des verbliebenen Zellpellets aufgetragen wurde (Spur 6 bzw. 9). Die TRP-Peptide waren somit kaum in den Überständen, sondern vorwiegend in den Zellpellets enthalten und konnten nicht vom Bakteriensediment separiert werden.

Die Verbesserung der Methodik zur Synthese und Aufreinigung der Peptide war im zur Verfügung stehenden Zeitrahmen nicht möglich, weshalb schließlich auf kommerziell synthetisierte Peptide zurückgegriffen wurde. Die benötigten biotinylierten Proteine wurden von der Firma NMI Technologietransfers (Reutlingen) erworben.

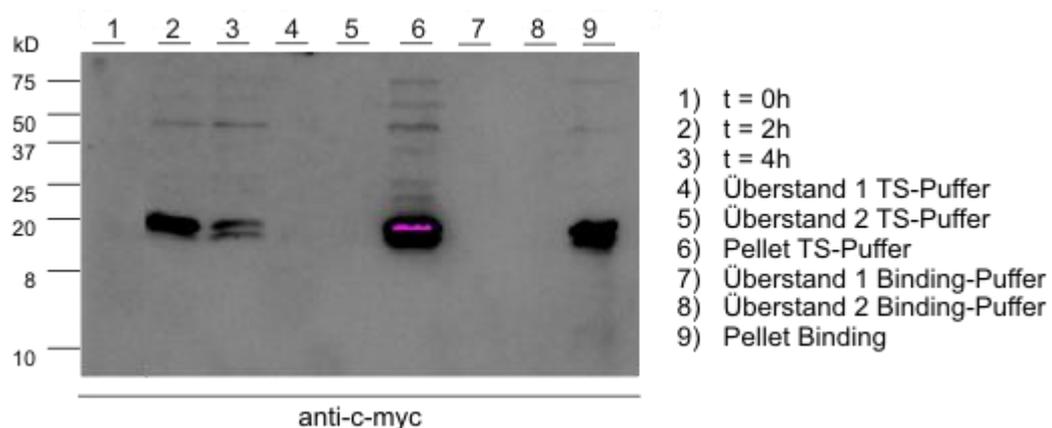


Abbildung 20. Peptidexpression und Isolation des TRPM1-Fragmentes

Detektion des biotinylierten TRPM1 nach einmaliger (Überstand 1) und wiederholter Zentrifugation (Überstand 2, Pellet). Proteinisolation mittels TS-Puffer (Spuren 4-6) bzw. Binding-Puffer (Spuren 7-9). Verwendeter 1. Antikörper: anti-myc-Antikörper, 2. Antikörper: anti-Maus-POX.

4.3 Fabs: Gewinnung und Eigenschaften

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, konnten mit Hilfe des Phagen-Display rekombinante Fab-Antikörper selektioniert werden. Die Resultate der Fab-Testung auf Spezifität und Sensitivität sind in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

4.3.1 Testung der Phagenüberstände auf Spezifität und Sensitivität für TRP-Proteine mittels ELISA

Nach der dritten Selektionsrunde verblieben jeweils etwa 100 Phagen mit bindendem Antikörperfragment gegen das entsprechende Antigen, gegen das die Phagenbibliothek geselektiert wurde. Im Sinne einer ersten Vorselektion wurden die Überstände dieser verbliebenen Phagen im ELISA auf Spezifität und Sensitivität getestet. Es wurden Messungen mit

dem Antigen als auch mit einer Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen durchgeführt. Die Phagenüberstände wurden dazu zusätzlich mit einem Kontrollpeptid inkubiert, das einen Sequenzabschnitt eines anderen TRP-Proteins oder einen anderen Sequenzabschnitt des gleichen Proteins repräsentierte. Wurde eine Absorption von größer oder gleich 0,5 (OD) auf der mit dem korrekten Antigen gecoateten Platte, nicht jedoch auf der mit dem Kontrollpeptid erreicht, so wurde der vom Phage präsentierte Fab als spezifischer Binder bezeichnet. Eine Übersicht darüber, welche Antigene und Kontrollpeptide für die entsprechenden Phagenüberstände verwendet wurden, gibt Tabelle 4. Gegen Peptid 2 (P2), das einen extrazellulären TRPC5-Sequenzabschnitt repräsentiert, konnten keine spezifischen Binder ermittelt werden. Daher wurde zusätzlich Peptid 6 (P6) hergestellt, das sich von P2 dadurch unterscheidet, dass es um insgesamt 10 AS verlängert wurde (8 AS in 5'-, 2 AS in 3'-Richtung).

96 Phagenüberstände erhalten:	Antigen	Kontrollpeptid	Anzahl spezifischer Binder
anti-TRPmM3 (extrazellulär)	P1	P2	43
anti-TRPmC5 (extrazellulär)	P2	P1	0
anti-TRPmC4 (intrazellulär)	P3	P4	62
anti-TRPmM3 (intrazellulär)	P4	P3	63
anti-TRPmM1 (intrazellulär)	P5	P2	4
anti-TRPmC5 (extrazellulär)	P6	Ca7	45

Tabelle 4. Übersicht der Ergebnisse des ELISA mit Phagenüberständen

Die für die Fabs kodierenden Plasmidabschnitte der selektionierten Phagenklone („spezifische Binder“) wurden im Weiteren mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, um nach anschließendem Verdau und Auftrennen im Agarosegel identische Klone aussortieren zu können.

4.3.2 PCR

Durch die Amplifizierung der die Fab-Sequenz flankierenden Bereiche entstanden DNA-Produkte mit einer Sequenzlänge von etwa 1,8 kb. Nach Auftrennen der PCR-Produkte im Agarosegel konnten Fab-Klone erkannt werden, die zu klein und somit nicht korrekt waren. Abbildung 21 zeigt ein Agarosegel, auf dem die PCR-Produkte von Fabs gegen die extrazelluläre TRPM3-Sequenz dargestellt sind. In der mit Stern markierten Spur fällt auf, dass das

aufgetragene DNA-Fragment deutlich unter der erwarteten Größe liegt. Das PCR-Amplifikat ist zu klein und spiegelt keine korrekte Fab-Sequenz wieder.

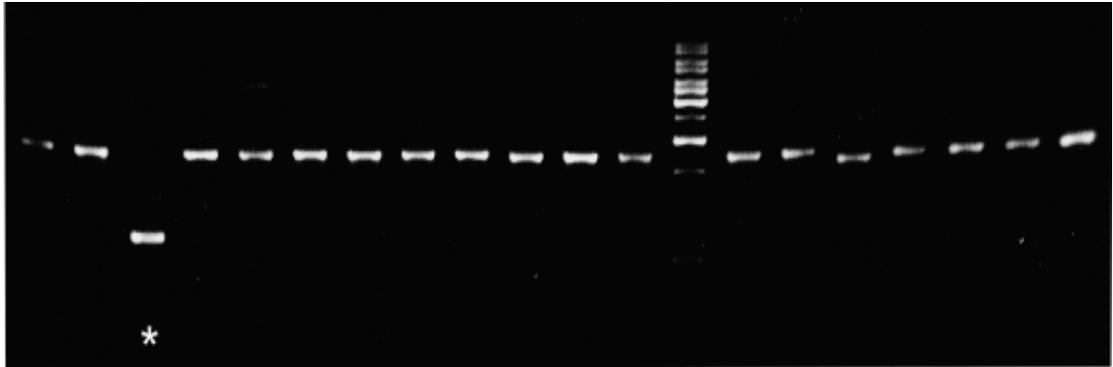


Abbildung 21. Agarosegel nach PCR von Fab-Klonen gegen die extrazelluläre TRPM3-Sequenz mit den Primern M13rev und fdtet25

Durch Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen erhielt man DNA-Fragmente der verschiedenen Fabs von unterschiedlicher Länge. Ein gleiches Bandenmuster zweier verschiedener Klone im Agarosegel deutet auf Fabs mit identischer Sequenz hin. In Abbildung 22 ist exemplarisch das Ergebnis des „Fingerprints“ für einen Teil der TRPC5-Klone (P6) dargestellt. Die nebeneinander aufgetragenen Klone A5, A6, A8, A9 können beispielhaft herausgegriffen werden. Sie zeigen ein identisches Bandenmuster: drei näher aneinander liegende Banden im oberen Drittel des Bildes mit unterschiedlicher Intensität (schwach – stark – schwach), sowie eine weitere Bande im mittleren Bildabschnitt von schwächerer Intensität. Damit heben sie sich von den daneben aufgetragenen Klonen A4 und A10 ab. Weitere Ähnlichkeiten zwischen A5-A9 bestehen auch zu den Klonen A1, A2, A11, A12, B4, B8 und B12. Es ist davon auszugehen, dass sie alle eine identische Sequenz besitzen, während B5, B6, C1, C2 und C6 ein deutlich anderes Bandenmuster aufzeigen. Auf diese Weise konnte für die folgenden Untersuchungen eine Vorselektion getroffen werden.

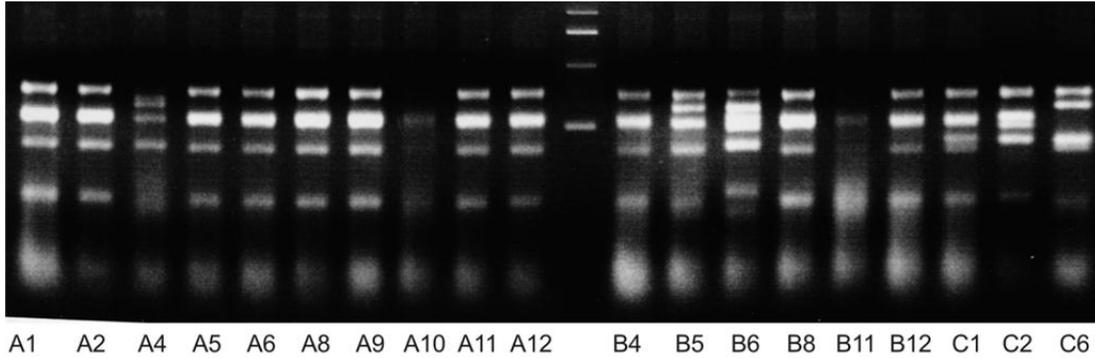


Abbildung 22. „Fingerprint-PCR“-Amplifikate der Fabs, die gegen TRPC5 (P6) gerichtet sind
Agarosegel nach Verdau der PCR-Amplifikate mit BstN1. A1-C6: Bezeichnung der unterschiedlichen Klone gegen P6.

4.3.3 Sequenzierung der Fabs

Die Plasmide der verbliebenen Klone nach „Fingerprint-PCR“ wurden sequenziert. Durch die Ergebnisse der Sequenzierung konnte ausgeschlossen werden, dass weitere identische Klone vorlagen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms IMGT/V-Quest abgeglichen. Dieses vergleicht die eingegebenen Sequenzen der Fabs mit den in der Datenbank hinterlegten V-, J- und D-Gen-Familien und ordnet ihnen diejenige Familie mit der größten Homologie zu. Die Identität lag zwischen 90 und 100%. Gleichzeitig erhält man Informationen darüber, ob es sich bei den variablen Regionen der leichten Ketten um lambda- oder kappa-Ketten handelt.

Mit dieser Analyse konnte ermittelt werden, ob es sich bei der betrachteten Fab-Sequenz um eine produktive Immunglobulin Rearrangement-Sequenz handelte. Dies konnte bei fast allen Fabs gezeigt werden. Eine Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse ist in den Tabellen 15-18 im Anhang (Kapitel 4.5.3) zu finden. Dort ist ebenso die Korrelation der Ergebnisse der Fab-Sequenzierung mit denen des Fingerprints gezeigt. Klone, die nach der PCR das gleiche Bandenmuster zeigten, wurden als identisch angesehen. Dies konnte durch Sequenzierung bestätigt werden. Wiesen Klone im Gel ein unterschiedliches Bandenmuster auf, so deutete dies auf eine andere Sequenz hin, was ebenfalls durch die Sequenzanalyse bewiesen wurde.

Um die Fab-Sequenz sowie deren Übergänge im Vektor (zum gIII-Phagen-Protein C-terminal bzw. in den pCES-Vektor N-terminal) vollständig zu betrachten, wurden je ein Klon, der gegen TRPM3 (P1C10) und ein Klon, der gegen TRPC4 (P3A8) gerichtet war, zusätzlich mit weiteren Primern sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung des Klons P1C10 ist in Ab-

bildung 23 dargestellt, das von P3A8 in Kapitel 4.5.3. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in rot hinterlegt.

Signalsequenz
M K K L L F A I P L V V P F Y S H S A L
GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT **CCT TTC TAT TCT CAC AGT GUA CTI**

Variable Domäne der leichten Kette (Vkappa+Jkappa)
Vk2-28*01
D V V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C
GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC

----- CDR1 -----
R S S Q S L L H S N G Y N Y L D W Y L Q K P G
AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGG

-- CDR2--
Q S P Q L L I Y M G S N R A S G V P D R F S G
CAG TCT CCA CAA CTC CTG ATA TAT ATG GGT TCT AAT CCG GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGC GGC

S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y
AGT GGA TCA GGC ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GIT GGG GTT TAT TAC

-- **Junktion V -> J** -- CDR3 -- **Jk4*01**
C M Q D L Q T P T F G G G T K V E I K
TGC ATG CAA GAT CTA CAA ACT CCT ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

Konstante Domäne der leichten Kette (Ckappa)
R T V A A P S C F I F P P S D E Q L K S G T A
CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC

S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC

L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S
CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC

S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T E Q
AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG

G L S S P V R K S F N R G E G * *
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAA TAA

GGC GCG CCA

Ribosomale Bindungsstelle
ATT CTA TTT CAA GGA GAC AGT CAT A

Signalsequenz
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A
GTG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC

Variable Domäne der schweren Kette
Vh6-1 02
Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A
CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGT CCG GGA CTG GTG AAG CCC TCG CAG ACC CTC TCA CTC ACC TGT GCC

----- CDR1 -----
I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S P S R G
ATC TCC GGG GAC AGT GTC TCT AGC AAC AGT GCT GCT TGG AAC TGG ATC AGG CAG TCC CCA TCG AGA GGC

----- CDR2 -----
L E W L G R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S
CTT GAG TGG CTG GGA AGG ACA TAC TAC AGG TCC AAG TGG TAT AAT GAT TAT GCA GTA TCT GTG AAA AGT

4. Ergebnisse

```

R I T I N P D T S K N Q F S L Q L N S V T P E
CGA ATA ACC ATC AAC CCA GAC ACA TOC AAG AAC CAG TTC TCC CTG CAG CTG AAC TCT GTG ACT CCC GAG

Junktion V -> J ---- D6-13*01----CDR3---- J3*02
D T A V Y Y C A R E V R G I A G A F D I W G Q
GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG GTC CCG GGT ATA GCA GGG GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA

G T M V T V S S
GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

Konstante Domäne der schweren Kette (CH1)
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A
GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TOC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG

CH1 seq 5' rev bzw. CH1 seq 3'new
A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L
GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GGC CTG

T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V
ACC AGC GGC GTC CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTA GTG

T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T
ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC

His Tag
K V D K K V E P K S C A A A H H H H H H G G A
AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA

myc-Tag
E Q K L I S E E D L H G A A amber
GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG

```

GIII-Gen

```

T V E S C L A K P H T E N S F Ed tet 25
V W K D D K T L D R Y A N Y E G C
L W N A T G V V V C T G D E T Q C
Y G T W V P I G L A I P E N E G G
G S E G G G S E G G G S E G G T
K P P E Y G D T P I P G Y T Y I N
P L D G T Y P P G T E Q N P A N P
N P S L E E S Q P L N T F M F Q N
N R F R N R Q G A L T V Y T G T V
T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S
S K A M Y D A Y W N G K F R D C A
F H S G F N E D P F V C E Y Q G Q
S S D L P Q P P V N A G G S G G
G S G G S E G G G S E G G S E
G G G S E G G ...

```

Abbildung 23. Sequenz von P1C10 zwischen pCES-Vektor und Phagenprotein gIII

Zur besseren Übersicht wurden die unterschiedlichen Antikörper-Regionen in den gleichen Farben markiert wie bereits in Abbildung 2 (Kapitel 2.2.1). Desweiteren rot markiert: Sequenz der verwendeten Primer; gelb markiert: Sequenz der variablen Domäne der leichten Kette; grün markiert: Sequenz der konstanten Domäne der leichten Kette; türkis markiert: Sequenz der variablen Domäne der schweren Kette; violett markiert: Sequenz der konstanten Domäne der schweren Kette; violette Schrift und türkis hinterlegt: His- und myc-Tag; grau markiert: Junctionsbereiche von V-Segment zum J-Segment; unterstrichen: compability determining regions (CDRs).

Der Leserahmen für die leichten und schweren Ketten der Fabs beginnt jeweils mit dem Triplet GTG, das das Startcodon der Signalsequenz bildet. Dieses codiert ebenso wie ATG für Formylmethionin als erste Aminosäure. GTG (14%) ist nach ATG (77%) das zweithäufigste Startcodon bei Prokaryonten (Peabody, 1989). Bekanntes Beispiel für diese alternativen

Startcodons sind lacI (GTG) und lacA (TTG) im lac-Operon von *E. coli* (Knippers, 2006). Die Signalsequenz dient dem Transport der einzelnen Polypeptidketten der Fabs ins Periplasma, wo diese über Disulfidbrücken miteinander verbunden werden (Hoogenboom et al., 1991). An die Signalsequenz schließt sich die Nukleotidsequenz der leichten Kette des Antikörpers an. Der in Abbildung 23 abgebildete Klon P1C10 besitzt als leichte Kette eine kappa-Kette. Sie besitzt 97,6% Identität zu dem V-Gen $V_{\kappa}2-28*01$ sowie 89,8% zu $V_{\kappa}2-40*01$ und 88,44% zu $V_{\kappa}2-18*01$. Das IMGT/V-Quest-Programm identifizierte weiterhin 100% Identität der Sequenz von P1C10 mit dem J-Gen $J_{\kappa}4*01$, 97,06% mit $J_{\kappa}4*02$, 88,24% $J_{\kappa}1*01$, 85,29% $J_{\kappa}2*02$, 85,29% $J_{\kappa}3*0$. Die AS-Sequenz der CDR3-Region des Klons P1C10 ist CAREVRGIAGAFDIW. Im Vergleich zu den anderen Fabs (gegen TRPM3 und TRPC4) zeigte sich, dass CAR(D) und DIW oder DYW sich wiederholende AS-Sequenzen in den CDR3-Regionen sind. Sie flankieren den Bereich, der sich von Fab zu Fab stark unterscheidet. Hierbei sind keine Gemeinsamkeiten der Fab-Klone gegen TRPM3 mit den Klonen gegen TRPC4 erkennbar.

Der Sequenz für die variable Domäne der leichten Kette folgt die der konstanten Domäne, C_{κ} . Am Ende der konstanten Domäne codiert die P1C10-Sequenz für zwei Stoppcodons. Vor der variablen Domäne der schweren Kette des Fabs ist nochmals eine Signalsequenz eingefügt, die ein neues Startcodon (ATG) enthält.

Größte Homologie besitzt die P1C10-Sequenz zu $V_{\mu}6-1*02$ mit 100%, sowie $J_{\mu}3*02$ mit 86% und D6-13. Auch die variablen Regionen der schweren Ketten besitzen complementarity determining regions. Während auch hier die CDR1 und CDR2 in der V-Region liegen, liegt die CDR3 der variablen Domäne der schweren Kette im Bereich der V-D-J-Junktion. Am C-terminalen Ende der $C_{\mu}1$ -Region, der konstanten Domäne der schweren Kette, befinden sich His- und Myc-Tag, die zur Detektion und Aufreinigung der Fabs verwendet wurden.

Eine weitere Besonderheit der Fab-Sequenz ist das Amber-Codon, das die $C_{\mu}1$ -Region vom Phagenprotein gIII trennt (siehe Kapitel 3.1.2). Mit Hilfe des Amber-Codons kann unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen die Expression von löslichen oder an Phagen gebundenen Fabs erfolgen. Die abgebildete Sequenz erfasst das Phagenprotein gIII ungefähr zur Hälfte. Die erhaltene Sequenz des gIII-Proteins stimmt mit der erwarteten Sequenz (NCBI accession number: 1814345 A) überein.

4.3.4 Testung der Fabs auf Spezifität und Sensitivität gegenüber TRP-Proteinen mittels ELISA

Die nach PCR und Sequenzierung verbliebenen Fabs wurden ebenso wie die Phagenübersstände (siehe 4.3.1) im ELISA auf ihre Spezifität und Sensitivität gegenüber den jeweiligen TRP-Proteinen getestet. Dazu wurden erneut Untersuchungen sowohl mit dem korrekten Antigen als auch mit einem Kontrollpeptid (Sequenzabschnitt eines anderen TRP-Proteins oder anderer Sequenzabschnitt des gleichen Proteins) durchgeführt. In Abbildung 24 sind exemplarisch die Ergebnisse für die Fabs gegen die extrazelluläre TRPM3-Sequenz aufgeführt. Auf der Ordinate ist die Absorption aufgetragen. Wie in 4.3.1 beschrieben, kommt ein Fab als spezifischer Binder in Betracht, wenn er eine Absorption mit einer OD von mindestens 0,5 erreicht. Auf der Abszisse sind die Bezeichnungen der jeweiligen Fab-Klone notiert. Das Ausmaß der Bindung eines Fabs gegenüber dem zur Selektion verwendeten Antigen ist als blauer Balken dargestellt. In rot sichtbar ist die Bindung an das Kontrollpeptid (hier: Peptid 4 (P4, intrazellulärer TRPM3-Sequenzabschnitt)). Aus dieser ELISA-Testung gingen die 13 Klone P1A1, P1A3, P1A4, P1A6, P1B2, P1B10, P1C8, P1C10, P1D3, P1D6, P1G3, P1H9 und P1H11 als spezifische Binder gegen den extrazellulären TRPM3-Sequenzabschnitt (P1) hervor.

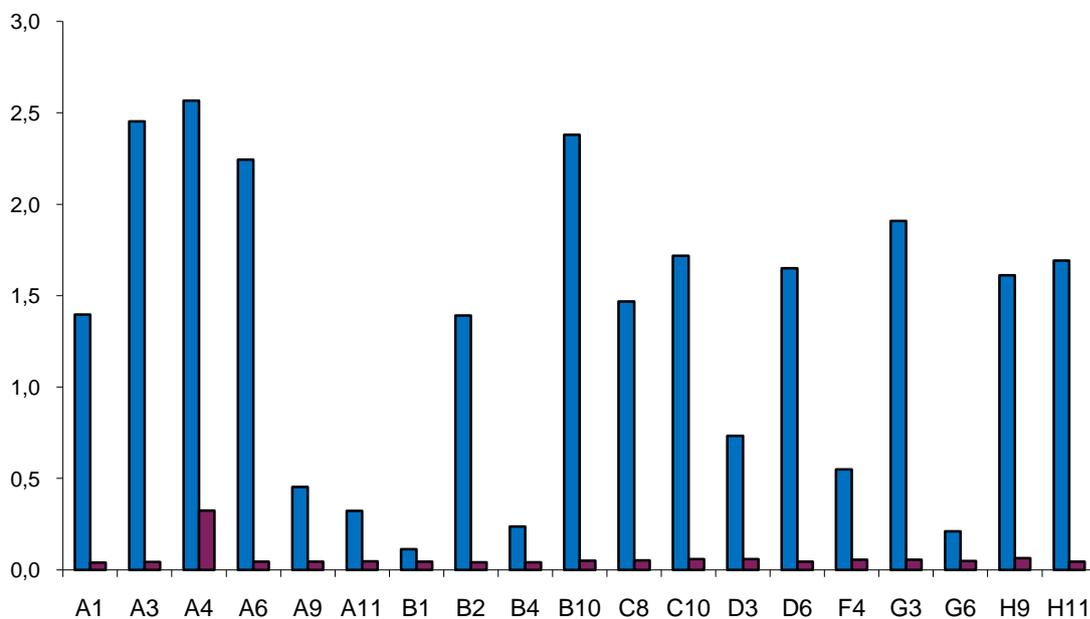


Abbildung 24. ELISA mit Fabs gegen Peptid 1 nach Selektionsrunde 3

Blaue Balken: Bindung der Fabs an das Antigen (P1), rote Balken: Bindung der Fabs an das Kontrollpeptid (P4)

Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der durchgeführten ELISA-Messungen zusammen. Details der ELISA-Ergebnisse sind im Anhang (4.5.1) in den Tabellen 7-15 gezeigt.

Anzahl getesteter Fabs	Antigen	Kontrollpeptid	Spezifische Binder
19	P1 (TRPmM3)	P4	13: P1A1, P1A3, P1A4, P1A6, P1B2, P1B10, P1C8, P1C10, P1D3, P1D6, P1G3, P1H9, P1H11
0	P2 (TRPmC5)	-	Keine spezifischen Binder in Phagenüberständen
11	P3 (TRPmC4)	P2	10: P3A1, P3A3, P3A6, P3A8, P3B5, P3B12, P3C2, P3E2, P3G8
5	P4 (TRPmM3)	P1	3: P4A3, P4A11, P4B2
4	P5 (TRPmM1)	P2	3: P5A6.1, P5A12.1, P5D6.1
12	C5 (TRPmC5)	CaV 36/37	1: C5C2

Tabelle 5. Übersicht der ELISA-Ergebnisse mit aufgereinigten Fabs

Aus dem Vergleich zwischen den ELISA-Ergebnissen mit den Ergebnissen der Fab-Sequenzierung geht hervor, dass kein Zusammenhang zwischen Anzahl der Klone mit gleicher Sequenz und ihrem Bindungsverhalten im ELISA besteht. Ein häufiges Vorkommen identischer Sequenzen korrelierte nicht mit einem guten Bindungsverhalten der entsprechenden Fabs an das jeweilige TRP-Protein. Während die Klone P1A1, P4A4, P1A6, P3A8 und P4A8, zu denen es mehrere identische Fab-Klone gab, im ELISA spezifisch das jeweilige TRP-Protein erkannten, zeigten die Klone P3A7, P3A9, P3B11 und P4A7, zu denen es ebenfalls mehrere identische Klone gab, nur eine schwache Reaktion im ELISA.

4.3.5 Aufreinigung der Antikörperfragmente

Zur Aufreinigung der Fabs wurden die Metallionen-Affinitätschromatografie und die Aufreinigung mit Hilfe einer Nickelsäule herangezogen, denen beiden das gleiche Prinzip zu Grunde liegt: Die Aufreinigung mit Hilfe des His-Tags der Antikörper.

Talon-Beads, die über ein zentrales Kobaltion an das His-Tag der Fabs binden, eigneten sich vor allem zur gleichzeitigen Aufreinigung mehrerer verschiedener Fabs. Nach Elution und Dialyse erhielt man etwa 2 ml Antikörperlösung mit einer Protein-Konzentration zwischen 50 und 200 µg/ml.

4. Ergebnisse

Die Aufreinigung größerer Mengen eines Klons gelang mittels Nickel-Säule und dem ÄKTA-Prime System, mit dem die Elutions-Fraktionen gesammelt wurden. Durch eine anschließende Coomassie-Färbung wurden die unterschiedlichen Proteinmengen des Antikörpers in den entsprechenden Spuren sichtbar. Die Elutions-Fraktionen mit hoher Fab-Konzentration wurden vereinigt (Abbildung 25).

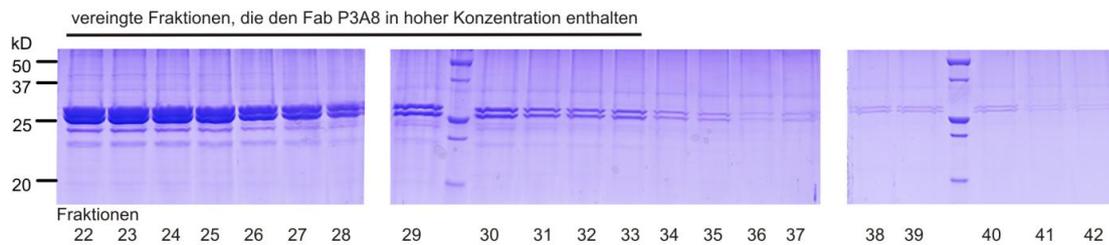


Abbildung 25. Coomassie Blue gefärbte SDS-Gele mit den Elutions-Fraktionen des Klons P3A8 nach Säulenaufreinigung

Aufgetragene Fraktionen (22-42) sind jeweils mit einer Nummer gekennzeichnet. 22-33: Fraktionen, die den Fab in hoher Konzentration enthielten und vereinigt wurden.

Nach Vereinigung und Dialyse Fabs enthaltender Eluate erhielt man bis zu 10 ml Antikörperlösung mit einer Fab-Konzentration von bis zu 500 µg/ml. Verglichen mit der Aufreinigung mittels Talon-Beads konnte bei gleicher Menge an Bakterienlysat mit Hilfe der Nickelsäule etwa die sechsfache Ausbeute an Antikörpern gewonnen werden. Darüber hinaus war eine Konzentrierung der Antikörperlösung bis zu 4 mg/ml möglich.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Fotometer, Protein-Assay oder im Vergleich mit einer BSA-Standardreihe im Coomassie-Gel. Beispielhaft für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Aufreinigung des Klons P1C10 ist das zugehörige Coomassie Blue-gefärbte Gel in Abbildung 26 gezeigt. In Abbildung 26 A und B wurden jeweils absteigende Mengen (10-8-4-2-1 µg) an BSA aufgetragen, was in der Coomassie-Färbung durch Banden mit geringerer Intensität von links nach rechts dargestellt ist. Die Fab-Banden gewinnen an Intensität, je mehr Antikörperfragment (Bild A 10-25 µl, Bild B 4-16 µl) aufgetragen wurde. Anhand des Vergleiches der Intensität der BSA- und Fab-Banden kann die Konzentration des Fab-Antikörpers abgeschätzt werden.

In Abbildung 26 ist weiterhin das unterschiedliche Erscheinungsbild der Fabs im denaturierten (Bild A) und nicht denaturierten (Bild B) Zustand zu erkennen. Da durch die Denaturierung (β-Mercaptoethanol) die Disulfidbrücken gelöst werden, sind schwere und leichte Ketten der Fabs sichtbar (zwei übereinanderliegende Banden mit einer Größe etwa 25 bzw. 30 kDa). Dabei hat die schwere Kette ein größeres Molekulargewicht und läuft im Gel lang-

samer als die leichte Kette. In Bild B wurde die aufgetragene Antikörperlösung zuvor nur mit Blaumarker versetzt, jedoch weder durch β -Mercaptoethanol noch durch Erhitzen denaturiert. Schwere und leichte Kette bleiben so miteinander verbunden und zeigen ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa.

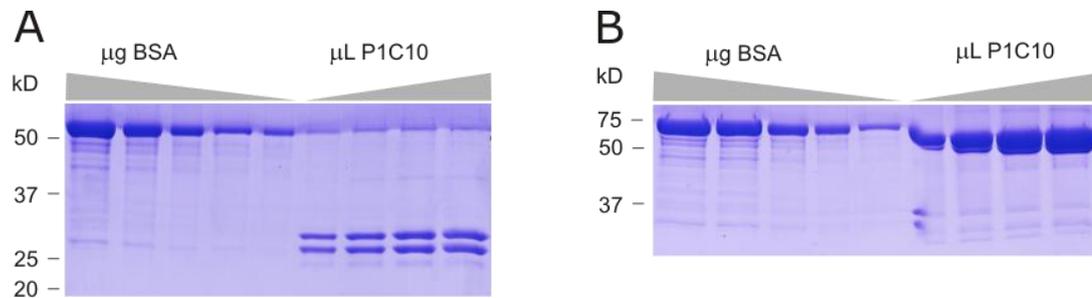


Abbildung 26. Proteinbestimmung mittels BSA-Standardreihe im Coomassie Blue gefärbten SDS-Gel
 Bild A: absteigende Massen an BSA; von links nach rechts 10 μ g – 8 μ g – 4 μ g – 2 μ g – 1 μ g, zunehmendes Volumen an Fab-P1C10 10 μ l – 15 μ l – 20 μ l – 25 μ l; Bild B: absteigende Massen an BSA; von links nach rechts 10 μ g – 8 μ g – 4 μ g – 2 μ g – 1 μ g, zunehmendes Volumen an Fab-P1C10 4 μ l – 8 μ l – 12 μ l – 16 μ l.

4.4 Bindungsverhalten der Fabs an Vollängen-TRP-Proteine

Ziel der Fab-Gewinnung waren spezifischer Antikörper gegen TRP-Kanäle. Mit Hilfe dieser Antikörper könnte die Kanalaktivität durch Inhibierung oder konstitutive Aktivierung beeinflusst werden. Durch eine solche Veränderung der Kanalaktivität wäre es möglich, weitere Informationen über die Funktionen und Regulationsmechanismen der TRP-Kanäle zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das Bindungsverhalten der gewonnenen Fabs gegenüber der entsprechenden Vollängenproteine (TRPM1 und M3, TRPC4 und C5) untersucht. Hierzu wurden die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen durchgeführt.

4.4.1 Western-Blot

Es wurden verschiedene Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Fabs als Erstantikörper verwendet wurden. Da in der Arbeitsgruppe bisher nicht mit gegen TRP-Kanälen gerichteten Fabs gearbeitet wurde, musste zunächst die einzusetzende Fab-Konzentration der Antikörperlösung gefunden werden. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit bivalenten Antikörpern, für die in der Regel Ausgangskonzentrationen von 1-2 μ g/ml eingesetzt werden, wurde eine anfängliche Konzentration der monovalenten Fabs von 5 μ g/ml in der Erstantikörperlösung festgelegt.

4.4.1.1 Western-Blot mit Zellysaten TRP überexprimierender Zellen

Zur Detektion der Ionenkanäle in TRP-überexprimierenden Zellen wurden Fabs als Erstantikörper für die Western-Blot-Untersuchungen eingesetzt. Zur Detektion wurde ein anti-human-Fab Zweitantikörper eingesetzt. Auch der Nachweis über das his- und myc-Tag der Fabs mit anti-myc bzw. anti-his-Antikörpern war alternativ möglich.

Abbildung 27 zeigt einen Western-Blot, bei dem TRPM3-Proteine mittels verschiedener Fab-Antikörper-Klone detektiert werden sollten. Der links abgebildete Membranstreifen (1) wurde als Kontrolle mit dem etablierten anti-TRPM3-Antikörper AK695 (polyklonal) inkubiert. Der AK695 erkennt eine Bande der Größe von 187 kDa. Dies entspricht der Größe des TRPM3-Proteins. Die weiteren Membranteile (2-9) wurden jeweils mit einem Fab inkubiert (Klone P1A1, P1B2, P1A4, P1A6, P1A3, P1B10, P1C8 und P1C10), allerdings konnte kein Signal der gewünschten Größe detektiert werden (siehe Abbildung 27A). Um nachzuweisen, dass das TRPM3-Protein in allen Spuren in ausreichendem Maße auf der Membran immobilisiert wurde, wurde die Western-Blot-Membran gestrippt und anschließend mit dem etablierten AK695 inkubiert (Bild B). Neben dem ersten Blotstreifen zeigten in diesem Fall auch alle anderen Streifen Signale identischer Intensität der erwarteten Größe (187 kDa).

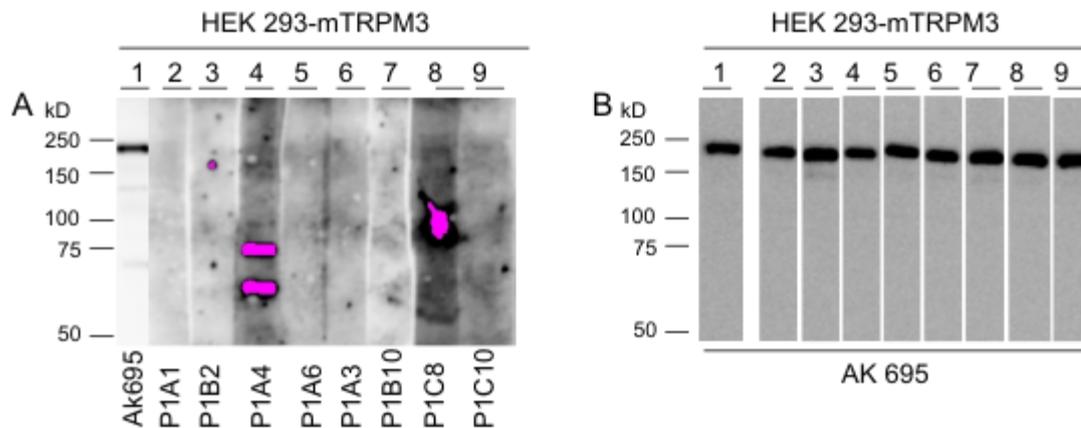


Abbildung 27. Western-Blot mit Lysat TRPM3 überexprimierender Zellen und deren Detektion mit Antikörpern, die gegen TRPM3 gerichtet sind (a)

Bild A: Spur 1: 1. Antikörper AK695 (1 : 200) (Positivkontrolle), 2. Antikörper: anti-Kaninchen-POX (1 : 50.000); Spuren 2-9: 1. Antikörper (pro Streifen von links nach rechts: P1A1, P1B2, P1A4, P1A6, P1A3, P1B10, P1C8, P1C10 (5 µg/ml), 2. Antikörper: anti-human-Fab (1 : 100.000)

Bild B: 1. Antikörper: AK695 (1 : 200), 2. Antikörper: anti-Kaninchen-POX (1 : 50.000)

Um eine zu geringe Fab-Konzentration als Ursache für fehlende Banden im Western-Blot auszuschließen, wurde diese auf 10 µg/ml erhöht. Wie in Abbildung 28 dargestellt, waren daraufhin im Western Blot verschiedene Banden unterschiedlicher Größe sichtbar.

In den Spuren 2 und 3 wurden Lysate TRPM3 überexprimierender HEK-Zellen, in Spur 4 nichttransfizierte HEK-Zellen aufgetragen. Diese drei Membranstreifen wurden mit dem Fab-Klon P1D6 als Erstantikörper inkubiert. In den beiden Membranabschnitten, die mit den TRPM3 enthaltenen Lysaten gefüllt sind, zeigten sich jeweils zwei Banden, die nicht in der Negativkontrolle sichtbar waren. Diese Banden lagen auf einer Höhe von 55 und 170 kDa. Vergleicht man die obere Bande mit der der Positivkontrolle im ersten Membranstreifen (AK695), so sieht man, dass diese Bande ein zu geringes Gewicht zeigt, um das TRPM3-Protein darzustellen. Die Membranstreifen 5-7 wurden mit dem Fab-Klon P1C8 inkubiert. Es zeigte sich ein Muster aus mehreren Banden starker Intensität (60, 115, 140, 160, 190, 250 kDa) in den beiden Membranabschnitten mit den Zelllysaten der TRPM3 überexprimierenden HEK-Zellen. Auch bei einer Größe von ca. 190 kDa ist eine Bande erkennbar. Verglichen mit der Positivkontrolle könnte sie dem gesuchten TRPM3-Protein (187 kDa) entsprechen. In der Negativkontrolle (Spur 7) sind wenige Banden schwacher Intensität sichtbar, nicht jedoch auf Höhe des TRPM3-Proteins. Das Signal in den Spuren 5 und 6 ist somit mit der Detektion von TRPM3 vereinbar. Das Signal der mit dem Klon P1C10 inkubierten Membranstreifen 8 und 9 ist von deutlich schwächerer Intensität. Ein Nachweis des TRPM3-Proteins durch P1C10 (Spur 8) wäre auf Grund der Höhe der schwach sichtbaren Bande möglich, ist aber nicht sicher nachweisbar. Die Negativkontrolle (Lysat nicht-transfizierter HEK-Zellen) in Spur 9 zeigt keine Banden.

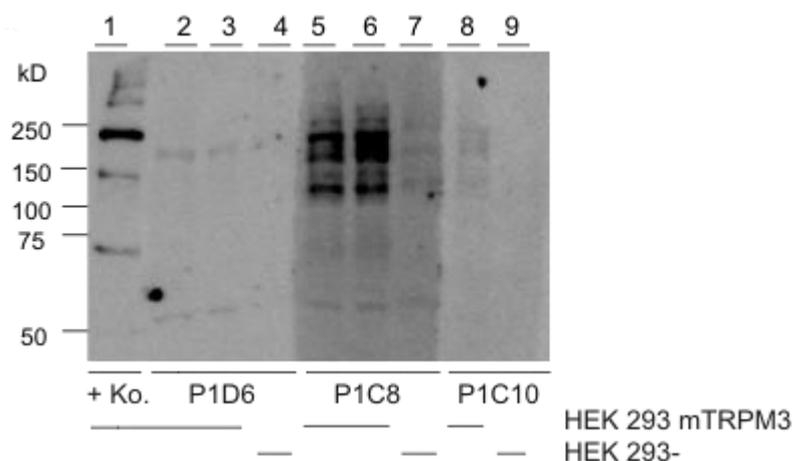


Abbildung 28. Western-Blot mit Lysat TRPM3 überexprimierender Zellen und deren Detektion mit Antikörpern, die gegen TRPM3 gerichtet sind (b)

Verwendetes Antigen: Spuren 1-3, 5-6 und 8: Zelllysate TRPM3 überexprimierender HEK-Zellen, Spuren 4, 7 und 9: Zelllysate von nichttransfizierten HEK-Zellen. Verwendeter 1. Antikörper in Spur 1: AK695 (1 : 200), 2. Antikörper: anti-Kaninchen-POX (1 : 50.000), verwendeter 1. Antikörper Spuren 2-4: P1D6, 5-7: P1C8, 8-9: P1C10. Konzentration Fab-Antikörperlösungen 10 µg/ml, 2. Antikörper: anti-human-Fab (1 : 100.000)

Da die meisten Klone sowohl gegen TRPM3, wie in Abbildung 28 dargestellt, als auch gegen TRPC4 (nicht abgebildet) nur ein diffuses Bandenmuster zeigten, wurden weitere Veränderungen im Versuchsprotokoll vorgenommen. Unter anderem wurde die Fab-Konzentration in der Antikörperlösung weiter erhöht und die Inkubationszeit der Nitrozellulose-Membran mit der Antikörperlösung verlängert. Dies führte allerdings zu keiner Veränderung der Ergebnisse.

Um die Bildung löslicher, temperaturabhängiger Antikörperpräzipitate auszuschließen, wurden die Fab-Lösungen vor Anwendung von 4 °C auf 37 °C erwärmt. Das Erwärmen der Fab-Antikörperlösungen auf 37 °C für 15 min vor Inkubation mit den TRP-Protein enthaltenden Zellysaten zeigte jedoch ebenfalls keinen Effekt auf das Bindungsverhalten der Fabs im Western-Blot.

Zur Untersuchung der Proteine in nicht-denaturierter (renaturierter) Konformation wurden sogenannte Far-Western-Blots nach einem Protokoll von Wu et al. (2007) durchgeführt. Die TRP-Proteine wurden hierfür zunächst wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben geblottet, wobei sie durch die Behandlung mit SDS und Lämmli-puffer bereits reduziert und denaturiert wurden. Anschließend wurde die Membran mit einer Guanidinhydrochloridlösung inkubiert, wodurch die Proteine weiter denaturiert, und anschließend durch das graduelle Senken der Guanidinkonzentration wieder renaturiert wurden. Dieser Schritt führte zum erneuten Ausbilden der Sekundär- und Tertiärstrukturen der TRP-Proteine. Nachdem das Guanidin-Hydrochlorid wieder vollständig entfernt wurde, wurde die Membran zum Blockieren eine Stunde in Magermilchpuffer gegeben, mit den Fab-Lösungen inkubiert und die Proteine schließlich mit entsprechendem Zweitantikörper detektiert. In Abbildung 29 ist das Ergebnis des Far-Western-Blots dargestellt. Zum Vergleich ist im linken Teil der Abbildung ein konventioneller Western-Blot dargestellt.

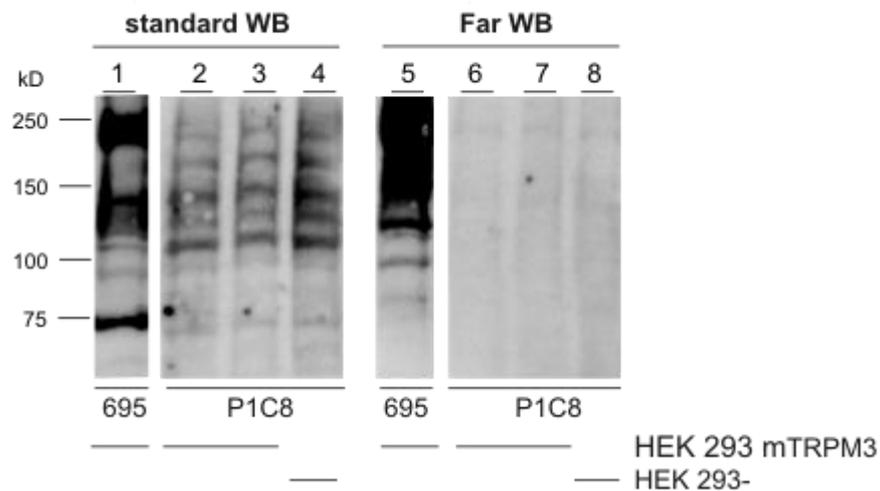


Abbildung 29. Vergleich von Standard- und Far-Western-Blot TRPM3 exprimierender Zellen (Inkubation mit dem Fab P1C8)

Verwendetes Antigen (Spuren 1-3 und 5-7): Proteinlysat TRPM3 überexprimierender HEK-Zellen; Spuren 4 und 8: HEK293-. Verwendete Antikörper: Spur 1 und 5: AK 695 (1 : 200), 2. Antikörper anti-Kaninchen-POX (1 : 50.000), Spuren 2-4 und 7-9 P1C8 (10 µg/ml), 2. Antikörper anti-human-Fab (1 : 100.000). Die Abschnitte 1-4 wurden wie ein Standard-WB behandelt, die Abschnitte 5-9 wurden mit einem Guanidindgradienten in absteigenden Konzentrationen (6-0 M) Guanidin-HCl behandelt.

In beiden Versuchsansätzen wurden Antikörperlösungen des Fab-Klons P1C8 (anti-TRPM3 extrazellulär) verwendet sowie identische Volumina an Zelllysat (30 µl) aufgetragen. Die beiden Western-Blots unterscheiden sich somit nur durch die Anwendung des Guanidindgradienten. Als Positivkontrolle diente der etablierte anti-TRPM3-Antikörper AK695. Während das Signal der Positivkontrollen sehr stark war, war das Signal des Fabs von sehr niedriger Intensität.

Im Standard-WB ist das in Abbildung 27 dargestellte diffuse Bandenmuster aus vier Banden (115, 140, 160, 190 kDa) stärkerer Intensität sowie weiterer Banden schwächerer Intensität (ca. 60, 90, 130, 250 kDa) erkennbar. Trotz einer Bande auf Höhe von 190 kDa ist dieses Ergebnis nicht als spezifische Bindung zu werten, da diese Bande auch in Spur 4 (Negativkontrolle) zu sehen ist.

Nach De- und Renaturierung mit Guanidin-HCl ist der Nachweis des TRPM3-Proteins mittels AK695 nach wie vor möglich. P1C8 hingegen zeigt eine sehr schwache Bande auf Höhe des gesuchten TRPM3-Proteins, das jedoch ebenfalls in der Spur mit der Negativkontrolle enthalten ist.

4.4.1.2 Screening der Fabs auf TRP-Spezifität mittels Peptid-Spot-Analyse

Es wurde eine möglichst effektive Methode gesucht, mit der TRP-spezifische Fab-Klone von nichtspezifisch bindenden Klonen abgegrenzt werden konnten. Mit Hilfe von Dot Blots

wurden die Epitope der jeweiligen Klone bestimmt. Somit war ersichtlich, ob ein Fab das entsprechende TRP-Protein bindet, und die Sequenz seines minimal benötigten Epitops konnte bestimmt werden. Die untersuchten Fabs wurden weiter charakterisiert und voneinander unterschieden.

Die in Abbildung 30 gezeigten, auf eine Membran aufgetragenen, 24 bzw. 25 Peptid-Spots waren jeweils zehn AS lang und ihre Sequenzen zueinander um je eine Aminosäure versetzt. Insgesamt deckten sie so die gesamte Sequenz des zur Selektion verwendeten TRP-Peptids ab. Für TRPM3 waren dies die AS 1023-1059, für TRPC4 die AS 489-521 des Kanalproteins. Durch Inkubation der Peptid-Spots mit den verschiedenen Fab-Klonen wurden die Epitope der Fabs bestimmt, die im ELISA eine Bindung zwischen Fab und TRP-Protein aufzeigten. In Abbildung 22 ist beispielhaft das Ergebnis der Peptid-Spot-Analyse der extrazellulär an TRPM3 angreifenden Fabs dargestellt. Die Ergebnisse der Fabs gegen die intrazellulären TRPM3, TRPC4 und TRPM1 Sequenzabschnitte sowie die gegen die TRPC5-Sequenz (extrazellulär) sind im Anhang (Kapitel 4.5.3) gezeigt.

In Abbildung 30 ist die Epitopanalyse für die extrazellulär an TRPM3 angreifenden Fabs zu sehen. Die meisten Klone zeigen nur eine schwache Bindung an das TRPM3-Peptid (P1A3, P1A4, P1A6, P1B2, P1D6, P1H9, P1H11). Von den 13 untersuchten Fabs zeigte nur der Klon P1C10 ein mehrere AS langes Epitop. Wie in Abbildung 31 dargestellt (grau hinterlegt), ergibt sich das minimale Epitop EPSWKL. Bis auf die Aminosäure Glutamat (E) ist dieser Sequenzabschnitt auch im nahe verwandten TRPM1-Protein enthalten. Auch die Sequenz von TRPM7 enthält mit dem Sequenzabschnitt EPSWSL ein ähnliches Epitop. Die mit dem von P1C10 erkannten TRPM3-Epitop identischen Aminosäuren sind ebenso grau gekennzeichnet. Im Alignment (unterer Teil von Abbildung 31) wurde zum Vergleich die Sequenz des für das Screening der Phagenbibliothek verwendeten Peptids gelb hervorgehoben.

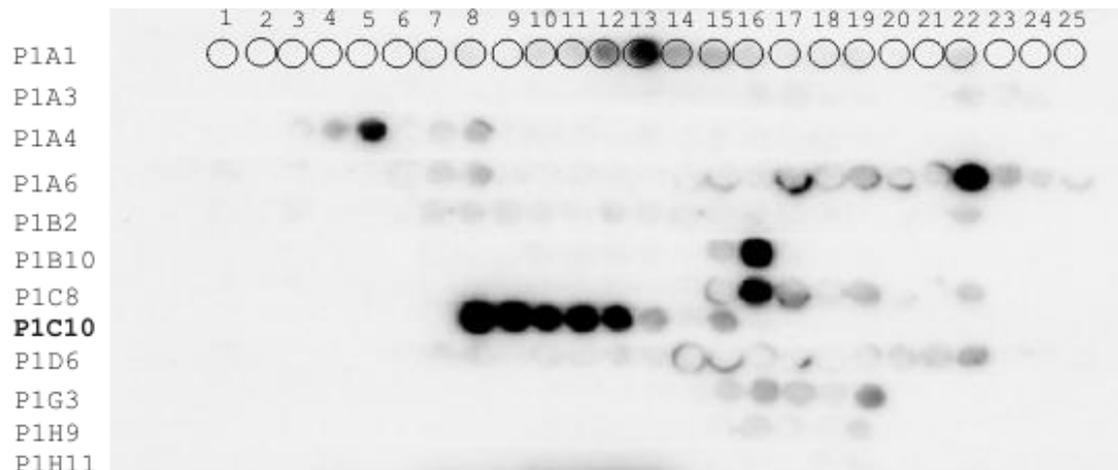


Abbildung 30. Epitopbestimmung der Fab-Klone gegen die extrazelluläre TRPM3-Sequenz mittels Dot Blot
 In jeder Zeile wurden 25 Peptidspots aufgetragen (Lage der Peptidspots auf der Membran durch Umrandung gekennzeichnet und von 1-25 durchnummeriert). Pro Zeile ist jeweils die Inkubation der Peptidspots mit einem anderen Fab (1. Antikörper) dargestellt; Fab-Konzentration: 10 µg/ml, 2. Antikörper: anti-human-Fab (1 : 100.000), Expositionszeit: 66 min.

1	VARQAILFPN	
2	ARQAILFPNE	
3	RQAILFPNEE	
4	QAILPFNEEP	
5	AILPFNEEPS	
6	ILPFNEEPSW	
7	LPFNEEPSWK	
8	PFNEEPSWKL	
9	FNEEPSWCLA	
10	NEEPSWKLAK	
11	EEPSWKLAKN	
12	EPSWKLAKNI	
13	PSWKLAKNIF	
14	SWKLAKNIFY	
15	WKLAKNIFYM	
16	KLAKNIFYMP	
17	LAKNIFYMPY	
18	AKNIFYMPYW	
19	KNIFYMPYWM	
20	NIFYMPYWMI	
21	IFYMPYWMIY	
22	FYMPYWMIYG	
23	YMPYWMIYGE	
24	MPYWMIYGEV	
25	PYWMIYGEVF	
mTRPM2	FFFLFLAVVVSFGVAKQAILIHNESRVDWIFRGVVYHSYLTIF	977
mTRPM8	FFFLFLFAVWMVAFGVARQGILRQNEQRWRWIFRSVIYEPYLAMF	912
mTRPM4	FFFLFLCVLWLVAYGVATEGILRPQDRSLPSILRRVYRPLYLQIF	971
mTRPM5	FFFLFLSVLWLVAYGVTTQALLHPHDGRLEWIFRRVLYRPLYLQIF	917
mTRPM1	LYFVIMLVVLMVMSFGVARQAILHPEEKPSWKLARNIFYMPYWMIY	1056
mTRPM3	MYFVIMLVVLMVMSFGVARQAIL FPNEEPSWKLAKNIFYMPY WMIY	1055
mTRPM6	FYIVIMLVVLMVMSFGVARKAAILSPKEPPSWRLARDIVFEFYWMIY	1028
mTRPM7	FYIVVIMALVLLSFGVPRKAILYPHE EPSW SLAKDIVFHPYWMIY	1045

Abbildung 31. Alignment zur Epitopbestimmung von Fabs gegen TRPM3

In grau: minimales Epitop, das durch Fab P1C10 erkannt wird; in gelb: Sequenz des zur Fab-Selektion verwendeten Peptids.

Weiterhin zeigten zwei der drei Fabs (P4A3 und P4A11), die gegen den intrazellulären TRPM3-Sequenzabschnitt gerichtet sind, ein Signal, das auf die minimalen Epitope LGP bzw. KYLGPIV hinwies. Diese beiden Klone wurden ebenfalls für weitere Experimente verwendet.

Bei den Untersuchungen der gegen TRPC4 gerichteten Fabs zeigten mehrere Klone eine spezifische Bindung an die immobilisierten Peptide. Es ergab sich ein starkes Signal bei Bindung an jeweils mindestens drei Peptid-Spots. Daraus konnten die in Tabelle 6 aufgeführten minimalen Epitope ermittelt werden.

Fab-Klon	Minimales Epitop	Antigen
P3A8	HLGPLQIS	TRPC4 (P3, intrazellulär)
P3B5	GPLQISL	TRPC4 (P3, intrazellulär)
P3E2	PLQISLGR	TRPC4 (P3, intrazellulär)
P3G8	HLGPLQIS	TRPC4 (P3, intrazellulär)
P3A1	HLGPLQIS	TRPC4 (P3, intrazellulär)
P3A3	HLGPLQIS	TRPC4 (P3, intrazellulär)

Tabelle 6. Minimale Epitope der gegen die intrazelluläre Sequenz von TRPC4 gerichteten positiven Fab-Klone

Die in Tabelle 6 für die anti-TRPC4-Fabs aufgeführten Epitope sind sowohl in der TRPC4-Sequenz als auch im verwandten TRPC5-Kanal, nicht jedoch in anderen TRPC-Familienmitgliedern vorhanden. Nach Inkubation mit den Fabs P3A6, P3B6 und P3C2 wurde lediglich ein sehr schwaches Signal detektiert. Bei einer Belichtungszeit von 15 s war kein Signal für spezifische Peptid-Spots erkennbar. Die im Anhang (Kapitel 4.5.3) gezeigten Bilder wurden nach einer Expositionszeit von 66 min aufgenommen, wobei auch nach dieser Expositionszeit nur einzelne Peptid-Spots sichtbar waren.

4.4.1.3 Immunpräzipitation

Nachdem mit den durchgeführten ELISA-Messungen auch mittels Peptid-Spot-Analyse nachgewiesen konnte, dass einige Fab-Klone (siehe Abbildungen 30, 44 und 45) an die entsprechenden TRP-Peptide binden, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um die Bindung an Vollängen-TRP-Proteine nachzuweisen. Durch Immunpräzipitation (IP) mit etablierten, polyklonalen Antikörpern (TRPM3: AK695, TRPC4: AK1056) wurden die TRP-Proteine präzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Membran wurde sowohl mit einem Kontroll-Antikörper (etablierter monoklonaler anti-TRP-

Antikörper, Spuren 1-3) als auch mit Fab-Lösungen (Spuren 4-6 und 7-9) inkubiert und gebundene Antikörper mit dem entsprechenden Zweitantikörper detektiert.

Zu Beginn der IP wurden 50 µl Zellysat von HEK-Zellen, die TRP-Protein überexprimierten, abgenommen und später im SDS-Gel (für den Western-Blot) in die erste Spur aufgetragen. Die zweite Spur stellte eine Negativkontrolle dar (Probe, die während der Immunpräzipitation nicht mit dem selektionierenden Antikörper behandelt wurde). Die jeweils dritte Spur beinhaltete die durch IP angereicherten TRP-Proteine.

Bei den zur Präzipitation verwendeten Antikörpern AK695 und AK1056 handelt es sich um polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum. Damit bei der Detektion der TRP-Proteine keine Störsignale durch Kaninchen-Proteine auftraten, wurden als Kontrolle Antikörper verwendet, die aus einer anderen Spezies gewonnen wurden. Für den Nachweis der spezifischen TRP-Protein-Anreicherung wurden die in unserem Labor hergestellten monoklonalen Antikörper (aus Ratte) 9F6G8 (TRPM3) und PK2D2-F2 (TRPC4) benutzt. Sie wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Ihre Detektion erfolgte durch einen Peroxidasegekoppelten anti-Ratte-Sekundärantikörper. Diese monoklonalen Antikörper erkannten das jeweilige TRP-Protein sowohl in der Spur mit den unbehandelten Zellysaten als auch in der Spur mit den präzipitierten TRP-Proteinen. Da diese nach IP stark angereichert wurden, stieg auch die Signalstärke an.

In Abbildung 32 ist exemplarisch das Ergebnis einer IP dargestellt, in der TRPM3 angereichert und sowohl mit dem monoklonalen Antikörper als auch mit den Fabs P1C10, P4A11 untersucht wurde. Die Untersuchungen der angereicherten TRPM3-Proteine mit mehreren Fabs als Erstantikörper ergaben, dass der Klon P1C10 als einziger eine Bande in der dem TRPM3 entsprechenden Höhe (187 kDa) nachwies.

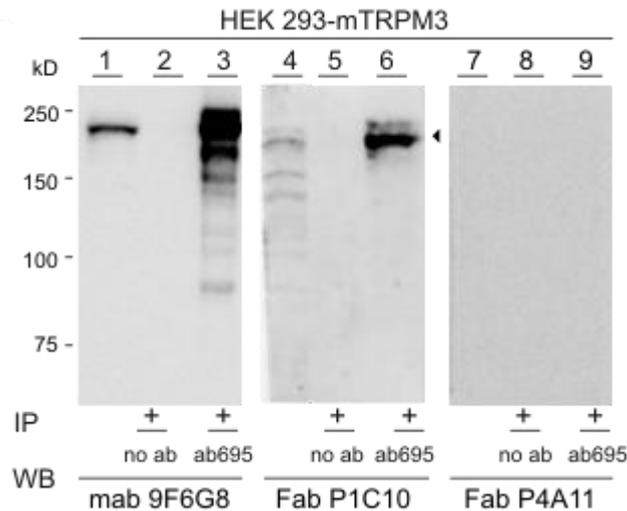


Abbildung 32. Immunpräzipitation von TRPM3 durch AK695 und Detektion mittels Fabs

Die Zelllysate (Spur 1: 15 μ l, Spuren 4 und 7: 30 μ l) sowie die nach der mit AK695 durchgeführten Immunpräzipitation angereicherten TRPM3-Proteine (Spur 3: 10 μ l, 6 und 9: 25 μ l) wurden mit den angegebenen Antikörpern inkubiert: Spuren 1-3: mab 9F6G8 (5 μ g/ml), 4-6: Fab P1C10 (100 μ g/ml), 7-9: P4A11 (100 μ g/ml). Die Detektion des monoklonalen Antikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper, die der Fabs mit dem anti-human-Fab-Antikörper.

Bei den Untersuchungen der gegen TRPC4 gerichteten Fabs (Klone gegen Peptid 3) zeigte sich, dass P3A8 (siehe Abbildung 48 im Anhang) und P3G8 (hier nicht dargestellt) in der Spur, in der das angereicherte TRPC4 β -Protein aufgetragen wurde, eine Bande auf einer Höhe von etwa 84 kDa erkannten. Diese entsprach dem Molekulargewicht verwendeten TRPC4 β -Proteins. Für andere, gegen Peptid 3 gerichtete, Klone zeigte sich im Western-Blot keine Bande. In der Spur, in der die nicht mit Antikörper behandelten Lysate aufgetragen wurden, zeigte sich ebenso wie in den Western-Blot-Untersuchungen mit Zelllysaten TRP-Protein überexprimierender HEK Zellen (4.4.1.1) ein diffuses Bandenmuster. Auf einer Höhe von 80, 120 und 180 kDa zeigen sich jeweils Banden starker Intensität, auf einer Höhe von 75, 85, 95, 105, 115, 150, 200 und 250 kDa sind ebenso Banden schwächerer Intensität sichtbar. Um zu klären, ob die Bande auf Höhe von etwa 84 kDa dem TRPC4 β -Protein entspricht, wurden mit den Zelllysaten weitere gezielte Untersuchungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.4.1.4).

Sowohl für TRPM3 als auch für TRPC4 konnte gezeigt werden, dass unabhängig vom getesteten Fab die unspezifischen Banden nach der Immunpräzipitation verschwanden. Bei den beschriebenen Klonen P1C10, P3A8, P3G8 war nach der IP nur noch eine Bande derjenigen Größe detektierbar, die der des jeweiligen TRP-Proteins entsprechen könnte.

4.4.1.4 Western-Blot nach Quantifizierung der Proteinmenge von Lysaten TRP überexprimierender Zellen

Nachdem die Fabs nach Immunpräzipitation (4.4.1.3) die TRP-Proteine in der anschließenden Western-Blot-Analyse erkannten, sollte nochmals untersucht werden, ob sie das Voll-längenprotein auch im unbehandelten Zelllysat erkennen, wenn eine höhere Proteinmenge aufgetragen wird.

Hierzu wurden mit Hilfe von RIPA-Puffer Lysate TRP-überexprimierender Zellen angefertigt und die darin enthaltene Proteinmenge bestimmt. Diese Lysate wurden in aufsteigender Menge (50-200 µg) auf ein SDS-Gel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit den Fab-Antikörperlösungen inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Lysate nicht-transfizierter HEK-Zellen sowie von HEK-Zellen, die ein anderes TRP-Peptid überexprimierten (TRPM3 bzw. TRPC4), aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden monoklonale Antikörper (wie in Kapitel 4.4.1.3 beschrieben) verwendet. Exemplarisch ist in Abbildung 33 ein solcher Western-Blot mit P3A8 dargestellt.

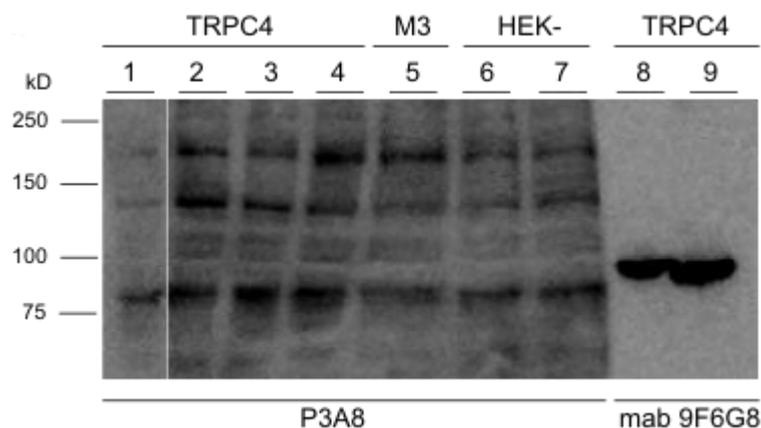


Abbildung 33. Western-Blot mit RIPA-Lysat TRPC4 überexprimierender HEK-Zellen

Aufgetragen in Spur 1: 4,5 µl RIPA-Lysat von TRPC4 überexprimierenden HEK-Zellen (50 µg), Spur 2: 9 µl (100 µg), Spur 3: 13,5 µl (150 µg), Spur 4: 18 µl (200 µg), Spur 5: 44,4 µl RIPA-Lysat von TRPM3 überexprimierenden HEK-Zellen (200 µg), Spuren 6 und 7: 43 µl HEK293 ohne TRP-Protein (150 µg). Erstantikörper für Spuren 1-7: P3A8 (100 µg/ml), Zweitantikörper: anti-human-Fab. Aufgetragen in Spur 8: 4,5 µl (50 µg) RIPA-Lysat TRPC4 überexprimierender HEK-Zellen (50 µg), Spur 9: 13,6 µl (150 µg). Erstantikörper für Spuren 8 und 9: mab 9F6G8 (1 : 200), Zweitantikörper: anti-Ratte-POX (1 : 80.000).

In den Spuren 1 bis 4 sowie 8 und 9 wurden RIPA-Lysate TRPC4 überexprimierender HEK-Zellen mit steigender Proteinmenge aufgetragen (Spur 1: 50 µg; Spur 2: 100 µg; Spur 3: 150 µg; Spur 4: 200 µg, Spur 8: 50 µg; Spur 9: 150 µg), in Spur 5 200 µg RIPA-Lysat von TRPM3 überexprimierender HEK-Zellen sowie in den Spuren 6 und 7 150 µg Lysat nicht-transfizierter HEK293-Zellen. Die Spuren 1-7 wurden mit dem Klon P3A8 (2. Antikörper: anti-

human-Fab), die Spuren 8-9 mit dem TRPC4-spezifischen monoklonalen Antikörper 9F6G8 (2. Antikörper anti-Ratte-POX) inkubiert.

Als Resultat der Inkubation mit dem Fab ist ein diffuses Muster aus drei Banden stärkerer (80, 120, 180 kDa) und mehreren Banden schwächerer Intensität (50, 70, 75, 95, 105, 115, 150, 200 und 250 kDa) zu erkennen. Dieses Muster ist in allen Spuren identisch und ändert sich durch steigende Menge an Antigen nicht in Struktur und Intensität. Dieses Ergebnis ist somit vermutlich auf Strukturproteine der HEK-Zellen zurückzuführen und nicht auf die von ihnen exprimierte TRP-Proteine. Diese Annahme korreliert auch mit der Tatsache, dass diese unspezifischen Banden in Zellen, die das Antigen überexprimierten, wie auch in nicht transfizierten HEK-Zellen sowie in HEK Zellen, die ein anderes TRP-Protein überexprimierten, durch den verwendeten Fab erkannt wurden. Lediglich die Positivkontrolle (Spuren 8 und 9) weist das entsprechende TRP-Protein (TRPC4 β , 84 kDa) spezifisch nach.

4.4.2 Durchflusszytometrie

Im Anschluss an die beschriebenen Western-Blot-Analysen sollte die Interaktion der Fabs mit den TRP-Proteinen mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Im Vergleich zum Western-Blot kann die Analyse der Eigenschaften der Antikörperfragmente auf Einzelzellebene stattfinden. Desweiteren liegen die von den Zellen überexprimierten TRP-Proteine – sofern die Zellen nicht fixiert und permeabilisiert werden – in ihrer natürlichen Sekundär- und Tertiärstruktur vor. Diskontinuierliche Epitope sollten bei den Analysen mittels Fluorescence Assisted Cell Sorting (FACS) im Gegensatz zum Western-Blot von entsprechenden Antikörpern erkannt werden können.

Es wurde mit dem in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Protokoll gearbeitet. Als Negativkontrollen wurden zum einen nichttransfizierte, zum anderen TRPM3- bzw. TRPC4- überexprimierende HEK293-Zellen, die nur mit dem Zweitantikörpersystem behandelt wurden, verwendet. Als Positivkontrollen wurden zunächst die im Western-Blot verwendeten Antikörper AK695 (TRPM3) und AK1056 (TRPC4) eingesetzt. Der Zweitantikörper (anti-Kaninchen-Biotin) wurde durch den Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) detektiert. Nach Antigen-Antikörperbindung erhöht sich das PE-Signal. Im Auswertungshistogramm wurde die Stärke des PE-Signals logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen. Ein erhöhtes PE-Signal durch eine Antikörper-Antigen-Bindung bewirkte somit eine Verschiebung der Kurve nach rechts. Auf der y-Achse der Histogramme wurde die Anzahl der statt-

gehabten Ereignisse aufgetragen. Je höher der Kurvenscheitel, desto häufiger fand ein bestimmtes Ereignis (Messung einer PE-Intensität) statt.

Da sowohl AK695 als auch AK1056 an einen intrazellulären Sequenzabschnitt der TRP-Proteine binden, wurden die Zellen mit 0,05% Tween permeabilisiert. Nach Messen der Signalstärke nach Behandlung mit den Erstantikörpern ergaben sich weder bei der Untersuchung von TRPM3- noch von TRPC4- überexprimierenden HEK-Zellen eine Signalverschiebung im Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen, die nur mit dem Zweitantikörpersystem behandelt wurden) (Abbildung 34). Für die eingesetzten Antikörper in unterschiedlicher Konzentration konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Durch unspezifische Hintergrundsignale hatten die Kurven der Negativkontrolle (schwarz) ein Maximum der Signalintensität bei einem Wert von 5 auf der Abszisse. Im Gegensatz zu einer erwarteten Zunahme der Signalintensität nach Inkubation mit den jeweils spezifischen Antikörpern überlagerten sich die Kurven (rot) mit denen ihrer Kontrolle. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 34 die Kurven nach Verwendung der vier Antikörper dargestellt: links AK695 und AK1056 (30 $\mu\text{g/ml}$), rechts P1C10 und P3A8 (50 $\mu\text{g/ml}$). Während die Antikörper 695 und 1056 durch anti-Kaninchen-Biotin detektiert wurden, erfolgte der Nachweis der Fabs über einen weiteren Zwischenschritt. Ein anti-c-myc-Antikörper detektierte die verwendeten Fabs über deren myc-Tag. Dieser Antikörper wurde dann über einen anti-Maus-Biotin-Antikörper detektiert.

4. Ergebnisse

Tween 0,05%

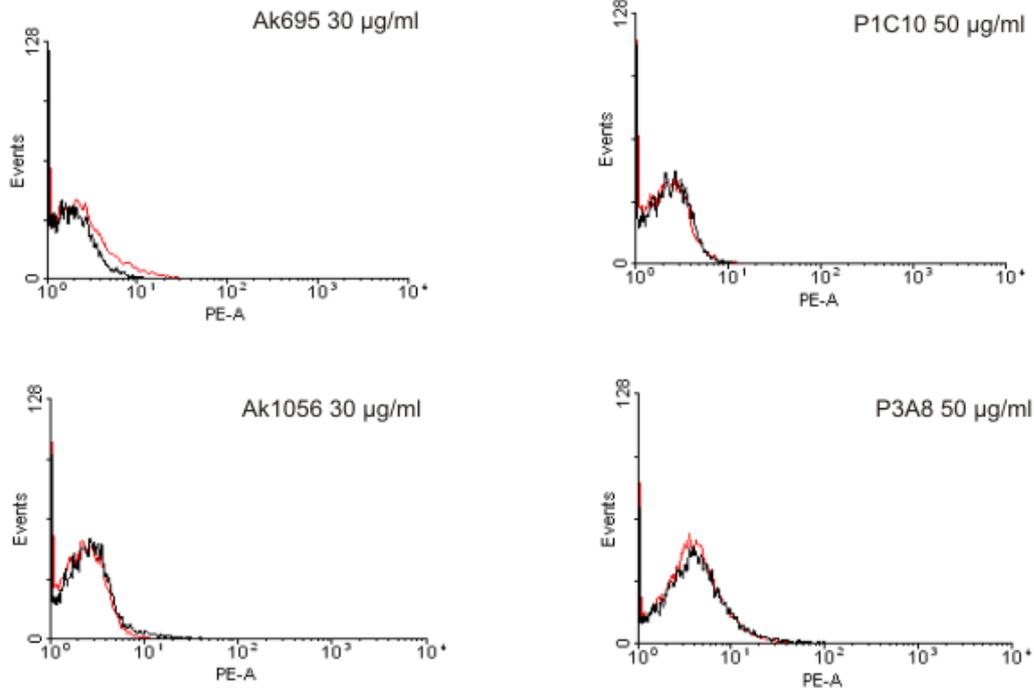


Abbildung 34. FACS-Messungen nach Permeabilisierung durch 0,05% Tween

Rot: Kurven nach Verwendung des jeweils angegebenen 1. Antikörpers (2. Antikörper gegen AK695 und AK1056 (Kontrollen): anti-Kaninchen-Biotin (arb), 2. Antikörper gegen P1C10 und P3A8 (Fabs): anti-myc und anti-Maus-Biotin (amb))
Schwarz: Kurve der Negativkontrolle (transfizierte HEK-Zellen, die nach Permeabilisierung nur mit 2. Antikörper (arb bzw. amb) und Streptavidin-PE behandelt wurden)
Oben: Fluoreszenzintensität TRPM3-überexprimierender HEK-Zellen nach Antikörperbehandlung. Links: AK695 30 µg/ml (Kontrolle), rechts: P1C10 50 µg/ml
Unten: Fluoreszenzintensität TRPC4-überexprimierender HEK-Zellen nach Antikörperbehandlung. Links: AK1056 30 µg/ml (Kontrolle), rechts: P3A8 50 µg/ml

Da keine Interaktion zwischen den etablierten polyklonalen Antikörpern (Positivkontrollen) und den TRP-Proteinen nachgewiesen werden konnte, wurden mehrere Optimierungsversuche am Protokoll unternommen. Es wurden unterschiedliche Detergenzien verwendet, es erfolgte die Variation der Konzentration der Detergenzien, die Verwendung geringer Konzentration des Detergens im Waschpuffer sowie die Variation von Fixation und Permeabilisierung. Da jedoch auch der extrazellulär angreifende Fab P1C10 keine Signalzunahme aufzeigte, sollte die Bindung der Antikörper verbessert werden. Inkubationszeiten und Temperaturen wurden variiert, PBS mit FCS NaN_3 verwendet. Zum Erreichen eines stärkeren Fluoreszenzsignals wurden die Versuche im Dunkeln wiederholt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Desweiteren wurden die Experimente unter Verwendung anderer Antikörper (anti-Aktin und anti-c-myc) wiederholt, um auszuschließen, dass die fehlende Signalverschiebung in der ungenügenden Bindung der Antikörper begründet ist.

Nach Verändern des Permeabilisierungsprotokolls konnte eine Signalzunahme beobachtet werden, wenn die Zellen zunächst mit 2% Paraformaldehyd (pFA) fixiert und dann mit 0,3% Saponin behandelt wurden. Die weiteren oben genannten Optimierungsversuche zeigten keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analysen TRPM3-überexprimierender Zellen, die mit verschiedenen Antikörpern inkubiert wurden. Im linken oberen Bild wurde der anti-TRPM3-Antikörper AK695 verwendet. Die rote Kurve zeigt eine Verschiebung des Peaks des Fluoreszenzsignals von 10 nach 40 im Vergleich zur Untersuchung, bei der permeabilisierte TRPM3-Zellen nur mit dem Zweitantikörper anti-Kaninchen-Biotin sowie mit dem fluoreszierenden Streptavidin-PE behandelt wurden (schwarze Kurve).

Im rechten oberen Bild von Abbildung 35 ist die Kurve von TRPM3-Zellen, die mit dem AK1056 inkubiert wurden dargestellt. Die sich ergebende Signalverschiebung hat in etwa das Ausmaß wie die für den TRPM3 spezifischen Antikörpers AK695. Daraufhin wurde auf andere Antikörper zurückgegriffen, die gegen Strukturproteine (anti-Aktin-Antikörper, links unten) bzw. ein an die TRP-Proteine gekoppeltes myc-Tag (anti-c-myc-Antikörper, rechts unten) gerichtet waren. Der anti-c-myc-Antikörper wurde über den anti-Maus-Biotin-Antikörper detektiert und zeigte ähnliche Ergebnisse: Im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörpersystem behandelt wurden, war eine Signalverschiebung sichtbar. Sie lag in der gleichen Größenordnung wie bei Anwendung der Antikörper 695 und 1056. Bei Einsatz des anti-Aktin-Antikörpers war keine Signalverschiebung feststellbar.

Saponin 0,3%

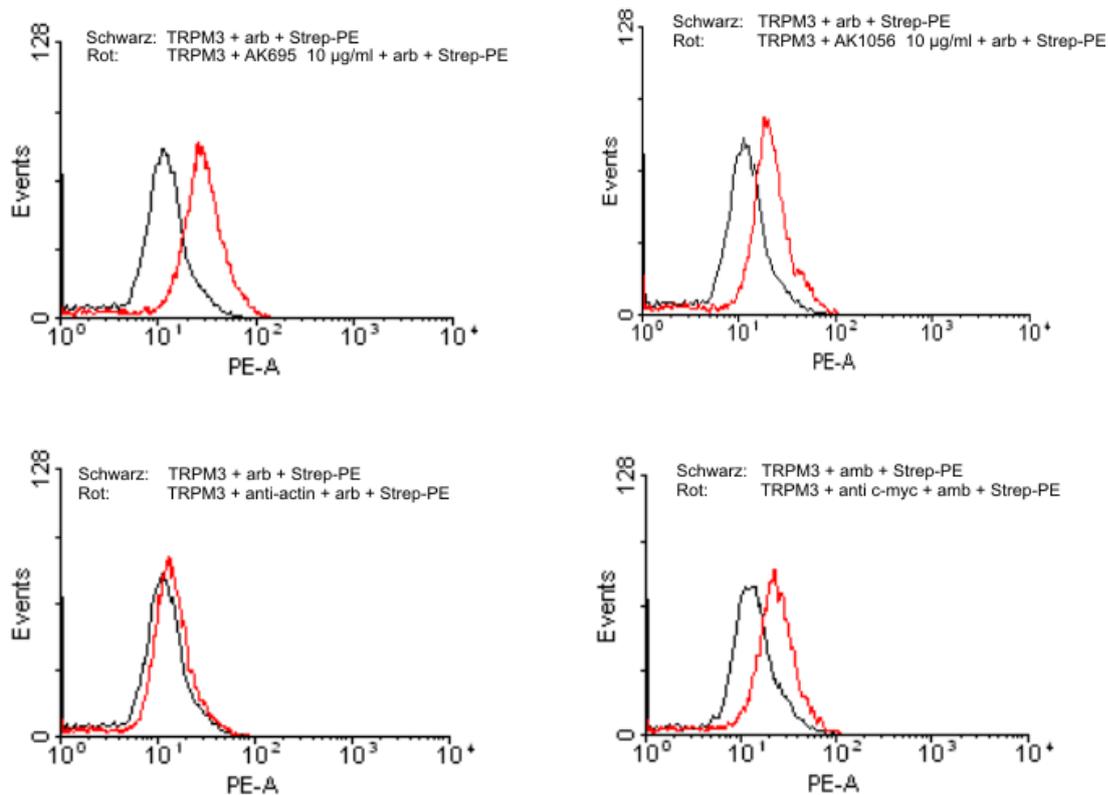


Abbildung 35. FACS-Messungen nach Permeabilisierung durch 0,3% Saponin

Verwendete Antikörper: Links oben: AK695 10 µg/ml, rechts oben: AK1056 10 µg/ml, links unten: anti-Aktin (1 : 1000), rechts unten: anti-c myc (1 : 400). Schwarze Kurven: Zellen, die nach Permeabilisierung nur mit dem Zweitantikörper sowie Streptavidin-PE behandelt wurden. Rote Kurven: Fluoreszenzintensität nach Behandlung der Zellen mit den jeweils beschriebenen Antikörpern.

Auch nach mehreren Optimierungsversuchen konnten keine Positivkontrollen des verwendeten Versuchssystems etabliert werden. Da somit keine Validierung der Ergebnisse möglich war, wurde auf weitere durchflusszytometrische Untersuchungen verzichtet.

4.4.3 Immunzytochemie

Um mittels zellfärbender Methoden den Nachweis der TRP-Proteine durch die Fabs zu zeigen, wurden weitere immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Im Unterschied zum FACS waren die Zellen hierbei auf einem Objektträger immobilisiert und wurden nach Detektion mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern unter dem Mikroskop betrachtet. Die von den Zellen überexprimierten TRP-Proteine waren, im Gegensatz zu den Lysaten, die im Western-Blot verwendet wurden, nicht denaturiert.

Für die immunzytochemischen Färbungen wurden HEK293-Zellen mit der für TRPM3 bzw. TRPC4 sowie für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) kodierenden DNA transfiziert. Vor

der DNA für das GFP befand sich eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) im Vektor. Somit bestand die Möglichkeit, dass sich nach der TRP-Synthese, die durch ein Stopp-Codon beendet wurde, erneut Ribosomen anlagerten und die Translation des GFP stattfinden konnte. Auf diese Weise exprimierten alle Zellen, die TRP-Protein produzierten, auch GFP. Anhand des Fluoreszenzsignals konnte zwischen TRP exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen, unterschieden werden. Der Fluoreszenz des GFP wurde der grüne Farbkanal zugeordnet. Die Transfektionseffizienz mit den TRP- und den grünfluoreszierenden Proteinen war relativ gering, die Zelleigenschaften wurden jedoch nicht verändert. Transfizierte Zellen zeigten die gleiche charakteristische, spindelförmige, Morphologie wie nichttransfizierte HEK-Zellen.

Die Zellen wurden mit den Antikörpern AK695 (TRPM3) und AK1056 (TRPC4) sowie verschiedenen Fabs in unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/ml bis 4 mg/ml) inkubiert. Durch Zugabe von Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern konnten die Komplexe aus 1. und 2. Antikörper dargestellt werden. Ihnen wurde der rote Farbkanal zugeordnet. Erkannete der 1. Antikörper das vorliegende TRP-Protein erhielt man sowohl ein grünes (GFP) als auch ein rotes Signal (Antigen-Antikörper Bindung) an der gleichen Stelle. Dies ließ sich durch Überlagerung beider Messungen zeigen. Bei den verwendeten Positivkontrollen (AK695 und AK1056) war genau dies nachzuweisen. Zusätzlich wurde ein weiterer Färbeschritt mit dem Fluoreszenzstoff 4'-6'-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) durchgeführt. DAPI bindet selektiv an DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. Dadurch entstehen fluoreszierende Zellkerne, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse einer solchen immunzytochemischen Färbung für AK695 sowie für AK1056 dargestellt. Bild A1 zeigt eine Übersichtsaufnahme, in der sowohl rote, grüne als auch blaue Fluoreszenz überlagert dargestellt sind. Die übrigen Bilder zeigen eine Vergrößerung des rechten mittleren Bildausschnittes. In Bild A2 dargestellt ist die Fluoreszenz des GFP, das die mit TRPM3-DNA transfizierten Zellen aufzeigt. An Hand dieses Bildes ist erkennbar, dass sich das GFP in der gesamten Zelle verteilt. Bild A3 zeigt das Signal des fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpers (anti-Kaninchen), der AK695 erkennt, welcher zuvor an die TRPM3-Kanäle der Zelle gebunden hat. In Bild A4 sind ebenso wie in Bild A1 rote, grüne und blaue Fluoreszenz überlagert. Es zeigte sich, dass das Signal von GFP und TRPM3 in den gleichen Zellen lokalisiert war. Bild A6 zeigt eine Überlagerung von Bild A4 mit dem Bild im Hellfeld (A5). Dieses zeigt die Umrisse der in diesem Gesichtsfeld liegenden

4. Ergebnisse

Zellen und verdeutlicht damit, dass die Signale roter und grüner Fluoreszenz im Bereich der Zellen detektiert wurden. In den Bildern B1-B3 sind die Signale des GFP, des rot-fluoreszierenden Zweitantikörpers (anti-Kaninchen), der den TRPC4 spezifischen AK1056 erkennt, sowie ein Bild mit Überlagerung des grünen, roten und blauen Signals gezeigt.

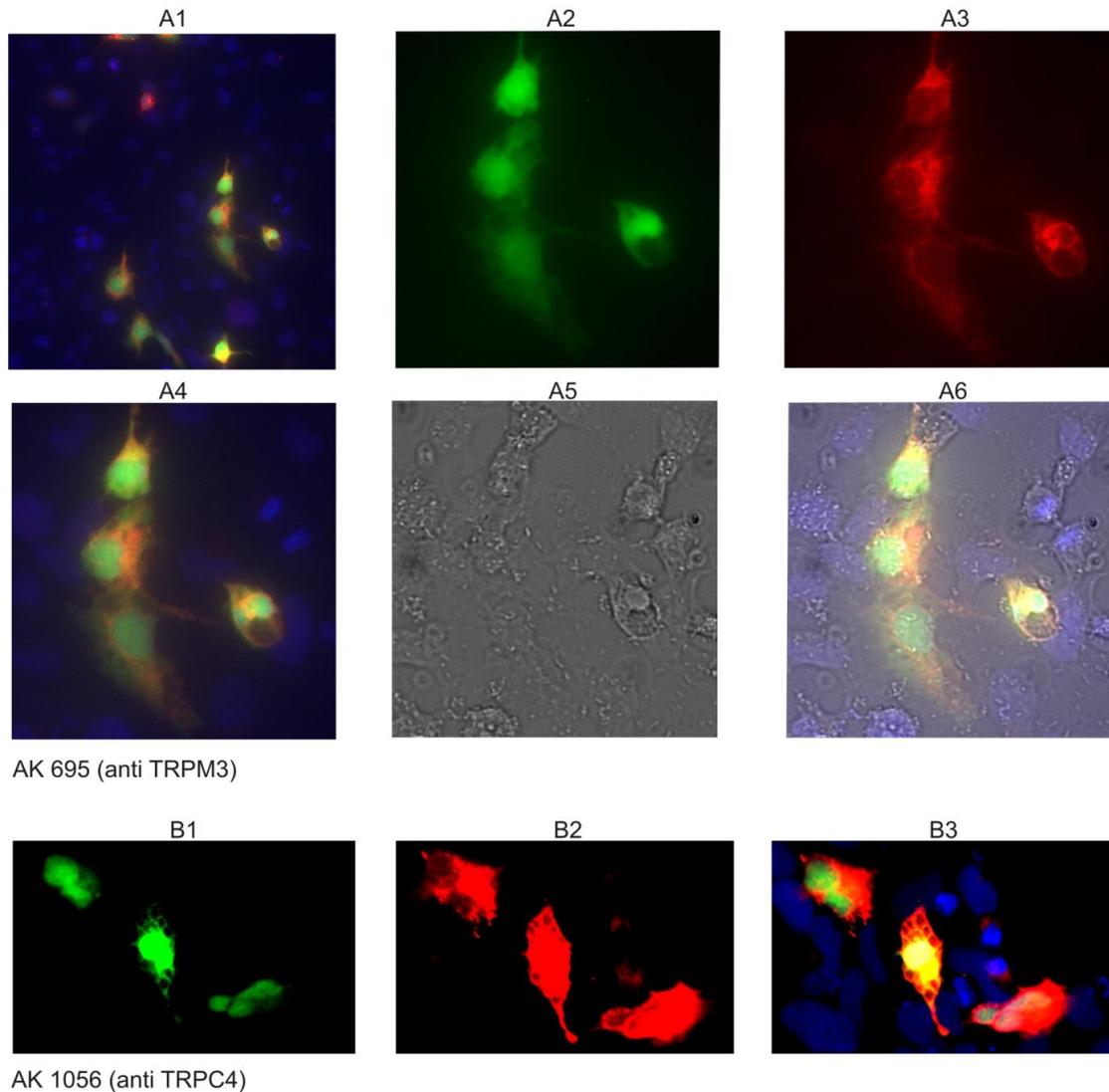


Abbildung 36. Immunzytochemische Färbungen mit etablierten polyklonalen Antikörpern (20x Vergrößerung)
A: TRPM3 transfizierte HEK-Zellen, die mit AK695 (1 : 200) und ALEXA anti-Kaninchen (1 : 500) inkubiert wurden; A1: Übersichtsbild, A2-A6: Vergrößerung eines Ausschnittes; A2: Fluoreszenz-Signal des GFP, A3: Fluoreszenz-Signal der rot fluoreszierenden 2. Antikörper, A4: Überlagerung aus grünem, rotem und blauem Fluoreszenz-Signal, A5: Durchlichtbild; A6: Überlagerung aus A4 und A5.
B: TRPC4 transfizierte HEK-Zellen, die mit AK1056 (1 : 400) und ALEXA anti-Kaninchen (1 : 500) inkubiert wurden; B1: Fluoreszenz-Signal des GFP; B2: Fluoreszenz-Signal der rot leuchtenden Antikörper; B3: Überlagerung aus grünem, rotem und blauem Fluoreszenz-Signal.

Anhand der Ergebnisse, die u.a. in Abbildung 36 dargestellt sind, konnte gezeigt werden, dass für diese Methode Positivkontrollen vorliegen, deren Ergebnisse als Referenz für die Untersuchungen der Antikörperfragmente herangezogen werden können.

Es wurden nun verschiedene Fabs gegen TRPM3 und TRPC4 in Konzentrationen von 10 µg/ml bis 4 mg/ml getestet. Hierbei wurde die Ausbildung extrazellulärer Komplexe beobachtet. Durch Konzentrationserhöhung der Fab-Lösungen war außer der Zunahme der extrazellulären Zusammenlagerungen kein weiterer Effekt auf das Bindungsverhalten festzustellen. Eine spezifische Bindung an die TRP-Proteine ließ sich nicht nachweisen. Dies galt auch für die Klone, die in der Immunpräzipitation und in der Peptid-Spot-Analyse ein starkes Signal zeigten.

In Abbildung 37 sind exemplarisch die Ergebnisse für den Klon P1C10 (TRPM3) dargestellt. In den Bildern A-D sind Übersichtsaufnahmen gezeigt, in denen jeweils das Signal der verschiedenen Fluoreszenzkanäle überlagert dargestellt ist. Die Versuchsansätze unterscheiden sich durch die unterschiedliche Konzentration der verwendeten P1C10-Antikörperlösung. Wie diese Bilder zeigen, war nach Inkubation der Fabs mit den TRP transfizierten Zellen ebenso wie bei den Positivkontrollen das grünleuchtende Protein in den Zellen detektierbar. Auch ein rotes Fluoreszenzsignal konnte aufgezeichnet werden. Dieses jedoch stimmte in seiner Lokalisation nicht mit dem der TRP-Proteine überein, die durch das GFP angezeigt wurden. Das rot fluoreszierende Signal der Fabs stellte sich als unspezifische Färbung extrazellulärer Zusammenlagerungen dar. Eine Detektion der TRP-Proteine durch die Antikörperfragmente konnte nicht gezeigt werden.

Diese rot fluoreszierenden Präzipitate zeigten im Hellfeld-Bild (Bild C1-C3) keinen Zusammenhang mit den abgebildeten Zellumrissen. Es handelte sich somit nicht um intra- oder extrazelluläre Bindungen an TRP transfizierte Zellen. Das Signal der Zusammenlagerungen nimmt mit steigender Konzentration der Antikörperlösung zu (Bilder A-C), während es nach Zugabe von ZnCl₂ (Bild D) nahezu vollständig verschwindet. Es ist davon auszugehen, dass die Fabs unspezifische, lösliche Zusammenlagerungen gebildet hatten, die durch diese Komplexbildung aufgehoben werden. Diese Präzipitate sind nicht sichtbar, wenn die Zellen nur mit dem fluoreszierenden Zweitantikörper behandelt wurden (Bilder hier nicht gezeigt). Da es sich um lösliche Präzipitate handelte, entstand die Idee, dass ihre Präzipitation möglicherweise temperaturabhängig sei und durch Erwärmen der Antikörperlösung vor deren Gebrauch verhindert werden könnte. Das Erwärmen der Fab-Antikörperlösungen auf 37 °C

4. Ergebnisse

(15 min) vor Inkubation mit den TRP-Protein exprimierenden Zellen zeigte jedoch keinen Effekt hinsichtlich der Präzipitatbildung.

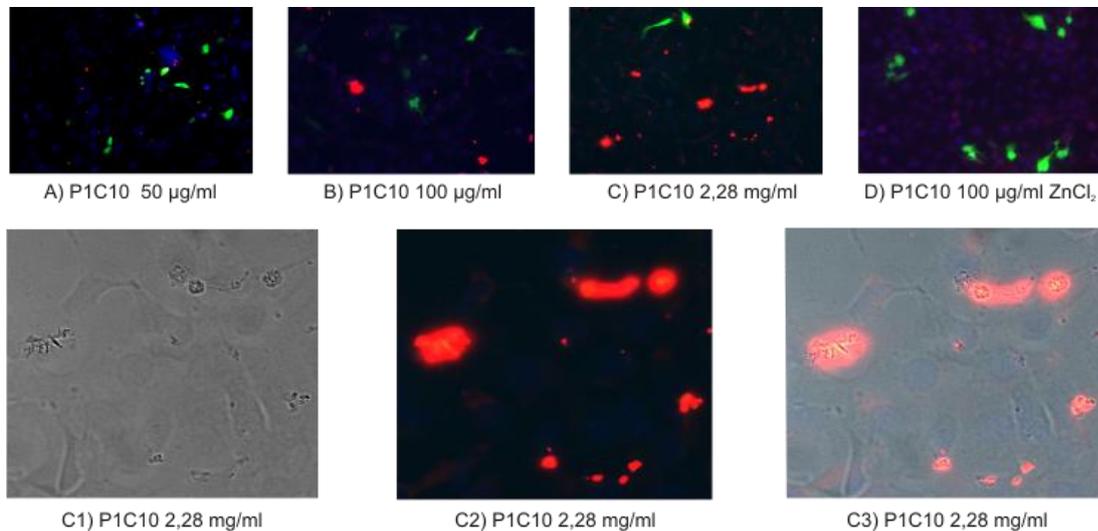


Abbildung 37. Immunzytochemische Färbungen mit Fabs (20x Vergrößerung)

A-D: Übersichtsaufnahmen mit Überlagerung von rotem, grünem und blauem Fluoreszenz-Signal. Konzentration der verwendeten Antikörperlösungen des Fabs P1C10 A: 50 µg/ml, B: 100 µg/ml, C: 2,28 mg/ml, D: 100 µg/ml + Zugabe von 10 mM ZnCl₂.

C1-C3: Vergrößerung eines Ausschnittes aus Bild C mit Präzipitaten. C1: Hellfeldbild dieses Ausschnittes; C2: Überlagerung des roten (Präzipitate) und grünen Fluoreszenz-Signals; C3: Überlagerung aus C1 und C2.

4.5 Anhang

4.5.1 Detaillierte ELISA-Ergebnisse

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der ELISA-Messungen dargestellt. Jede Tabelle gibt das Ergebnis einer Mikrotiterplatte wieder. Die Werte der Klone, die auf der jeweiligen Platte auf Grund ihrer hohen Absorption als Binder gewertet wurden, sind grau hinterlegt. In roter Schriftfarbe sind diejenigen Klone markiert, die auf der Kontrollplatte als Binder gemessen wurden. Hierbei handelt es sich um unspezifische Kreuzreaktionen. Als spezifische Binder wurden die Klone gewertet, die grau hinterlegt, nicht aber mit roter Schrift gekennzeichnet sind.

1,942	0,279	2,626	2,550	2,667	2,665	0,250	0,157	2,611	0,158	2,648	0,629
2,551	2,521	2,536	2,689	0,411	0,180	2,099	0,513	2,699	2,155	2,071	2,717
2,775	2,741	2,714	2,690	2,721	2,555	0,157	2,572	2,431	1,883	0,168	0,161
0,171	2,668	2,653	0,149	1,815	2,649	0,153	0,270	0,250	2,711	2,697	0,172
2,785	0,442	2,654	2,657	2,340	1,294	0,144	0,286	1,997	1,736	2,709	0,268
0,259	2,767	2,724	1,914	2,332	2,706	0,171	0,195	2,732	2,503	0,276	2,718
0,246	2,765	2,621	2,453	2,750	2,708	2,716	0,155	2,739	0,397	0,151	2,623
2,755	2,774	0,191	2,724	0,281	0,401	2,718	2,735	2,734	2,742	2,750	2,713

0,087	0,103	0,127	0,098	0,102	0,101	0,170	0,108	0,097	0,099	0,100	0,140
0,109	0,102	2,678	0,098	0,133	0,098	2,535	0,097	0,100	0,105	0,103	0,208
0,095	0,095	2,368	0,131	2,572	0,091	0,087	0,138	0,096	0,100	0,095	0,099
0,094	0,100	0,101	0,104	0,101	0,097	0,090	0,096	0,106	0,104	2,217	0,102
2,101	0,099	0,098	0,098	2,700	0,100	0,093	0,094	0,094	0,095	0,100	0,103
0,136	0,106	0,100	0,099	2,528	1,944	0,094	0,096	0,097	0,097	0,107	0,204
0,099	2,490	0,097	0,097	0,104	0,115	2,253	0,095	0,095	0,100	0,092	2,667
0,141	0,139	0,100	0,125	0,123	0,108	2,288	2,308	0,118	0,107	0,107	0,112

Tabelle 7. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 1 nach Selektionsrunde 3

Gecoatetes Peptid auf Platte 1: Peptid 1; Platte 2: Peptid 2

0,146	0,113	0,118	0,118	0,113	0,166	0,121	0,112	0,110	0,111	0,119	0,111
0,117	0,118	0,116	0,114	0,115	0,103	0,110	0,105	0,114	0,114	0,122	0,114
0,107	0,120	0,111	0,110	0,110	0,102	0,105	0,103	0,113	0,110	0,111	0,109
0,129	0,118	0,127	0,119	0,109	0,114	0,099	0,108	0,106	0,111	0,127	0,112
0,117	0,112	0,116	0,120	0,119	0,113	0,107	0,104	0,105	0,108	0,114	0,110
0,119	0,114	0,114	0,120	0,114	0,126	0,112	0,139	0,115	0,117	0,117	0,112
0,109	0,115	0,110	0,113	0,110	0,111	0,106	0,110	0,102	0,104	0,102	0,116
0,125	0,127	0,106	0,112	0,122	0,109	0,111	0,101	0,111	0,121	0,135	0,126

0,162	1,868	0,194	0,197	0,188	0,558	0,393	0,182	0,160	0,157	0,209	0,276
0,182	0,819	0,159	0,155	0,207	0,157	0,151	0,179	0,159	0,185	0,183	0,193
0,216	0,213	0,177	0,164	0,155	0,171	0,152	0,171	0,165	0,164	0,153	0,174
0,175	0,153	0,496	0,285	0,182	0,903	0,145	0,181	0,161	0,157	1,274	0,155
0,824	0,286	0,162	0,265	0,165	0,149	0,147	0,164	0,166	0,151	0,384	0,181
0,234	0,215	0,672	0,468	0,233	0,328	0,474	0,176	0,163	0,151	0,255	0,216
0,212	0,168	0,163	0,160	0,169	0,181	0,164	0,207	0,149	0,151	0,158	0,290
0,588	0,204	0,754	0,666	1,048	0,167	0,207	0,162	0,349	0,199	0,272	0,173

Tabelle 8. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 2 nach Selektionsrunde 3

Gecoatetes Peptid auf Platte 1: Peptid 2; Platte 2: Peptid 1

0,071	0,096	0,203	0,093	0,076	0,121	0,104	0,090	0,112	0,080	0,083	0,098
0,122	0,083	0,147	0,098	0,085	0,098	0,086	0,092	0,102	0,108	0,083	0,090
0,141	0,104	0,103	0,118	0,082	0,088	0,098	0,100	0,145	0,117	0,091	0,087
0,102	0,126	0,143	0,177	0,128	0,096	0,138	0,096	0,134	0,110	0,109	0,093
0,080	0,120	0,261	0,091	0,094	0,084	0,103	0,071	0,080	0,084	0,072	0,077
0,137	0,088	0,126	0,097	0,112	0,081	0,091	0,184	0,111	0,096	0,079	0,077
0,103	0,097	0,103	0,078	0,100	0,108	0,097	0,094	0,097	0,074	0,082	0,073
0,319	0,113	0,088	0,192	0,097	0,082	0,084	0,094	0,091	0,076	0,125	1,960

0,071	0,090	0,110	0,083	0,070	0,092	0,109	0,085	0,103	0,086	0,099	0,106
0,382	0,079	0,113	0,096	0,081	0,119	0,091	0,094	0,099	0,084	0,080	0,095
0,095	0,088	0,101	0,150	0,071	0,085	0,080	0,092	0,076	0,074	0,075	0,083
0,078	0,114	0,156	0,127	0,101	0,206	0,098	0,101	0,100	0,138	0,118	0,070
0,076	0,080	0,161	0,081	0,097	0,076	0,083	0,080	0,075	0,082	0,067	0,077
0,081	0,088	0,101	0,084	0,086	0,080	0,100	0,170	0,080	0,086	0,078	0,092
0,092	0,091	0,131	0,127	0,080	0,094	0,074	0,078	0,095	0,067	0,070	0,064
0,237	0,120	0,129	0,166	0,101	0,091	0,093	0,120	0,079	0,073	0,120	1,921

Tabelle 9. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 2 nach Selektionsrunde 4

Gecoatetes Peptid auf Platte 1: Peptid 2; Platte 2: Peptid 3

4. Ergebnisse

1,404	2,296	2,282	0,110	0,097	1,556	2,380	2,522	2,373	2,494	2,606	0,100
1,889	2,489	2,714	2,563	2,599	2,667	2,146	0,104	2,269	2,578	2,719	2,564
0,112	2,541	0,095	2,427	1,972	0,097	2,180	2,245	2,130	0,088	2,710	2,668
1,989	2,025	0,096	0,916	1,999	2,391	1,555	1,865	0,097	2,539	2,432	2,564
2,427	2,066	0,098	2,025	0,096	1,814	1,042	1,532	0,094	1,582	1,777	2,706
1,399	0,101	0,093	2,619	2,582	0,311	1,185	0,110	1,274	0,092	2,676	0,107
2,052	0,237	2,571	2,176	2,242	2,292	1,217	1,872	2,663	1,847	0,771	2,632
1,822	0,115	1,699	1,547	2,414	2,102	2,491	1,774	1,102	2,322	2,415	2,668

0,205	0,193	0,203	0,196	0,208	0,184	0,190	0,504	0,233	0,207	0,217	0,219
0,221	2,684	0,196	0,211	0,204	0,207	0,263	0,216	0,208	0,220	0,211	0,250
0,941	0,205	0,217	0,199	0,215	0,194	0,203	0,218	2,106	0,210	0,209	0,205
0,230	0,549	0,220	1,402	0,204	0,221	1,515	0,222	0,210	0,250	0,206	0,218
0,228	0,224	0,217	0,210	0,197	0,208	0,220	0,221	0,197	0,211	0,191	0,209
0,218	0,410	0,205	0,213	0,219	0,217	0,203	0,245	1,472	0,285	0,208	0,198
0,257	0,261	0,241	2,133	0,299	2,240	0,205	0,201	0,207	1,680	0,225	0,197
0,486	0,241	0,227	2,524	0,233	0,266	0,231	0,215	1,931	2,301	0,200	2,630

Tabelle 10. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 3 nach Selektionsrunde 3
Gecoatetes Peptid auf Platte 1: Peptid 3; Platte 2: Peptid 4

0,207	0,290	2,696	2,636	0,227	2,614	2,574	2,634	2,120	2,291	2,160	2,248
0,245	2,583	2,708	2,659	2,696	0,190	1,986	2,162	2,474	2,019	2,670	2,087
0,385	2,742	2,695	2,675	2,694	2,418	2,572	2,259	2,243	0,194	2,526	2,324
0,431	2,713	2,651	1,760	2,292	2,240	2,119	2,663	0,195	0,205	1,499	2,373
0,230	0,283	2,673	2,563	2,692	2,380	1,978	2,389	2,683	1,461	0,306	2,661
2,673	2,698	2,655	2,671	2,417	2,444	2,460	0,202	0,190	2,699	1,575	0,233
2,697	2,706	0,188	1,766	2,192	0,189	0,216	2,402	2,712	0,201	2,359	0,190
0,355	0,218	2,342	0,227	0,217	2,708	0,200	2,339	1,641	1,438	1,952	0,261

0,087	0,102	0,082	0,085	0,091	2,555	0,102	0,106	0,083	0,085	0,090	0,088
0,100	0,094	0,093	0,115	0,109	0,082	0,092	2,237	0,092	0,094	0,095	0,118
0,108	0,094	0,085	0,099	0,084	1,685	0,098	0,079	0,090	0,090	0,095	0,092
0,100	0,098	0,094	0,085	0,085	0,083	0,086	1,970	0,085	0,093	0,095	0,093
0,091	0,095	0,115	0,088	0,082	0,081	1,630	0,082	0,100	0,089	0,086	0,094
0,089	0,100	0,090	0,101	0,079	0,096	0,089	0,085	0,088	0,099	0,099	0,084
0,112	0,101	0,088	0,087	0,082	0,086	0,092	0,093	0,076	0,093	0,099	0,081
0,105	0,103	0,094	0,098	0,106	0,108	0,084	0,089	0,086	0,092	0,158	0,096

Tabelle 11. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 4 nach Selektionsrunde 3
Gecoatetes Peptid auf Platte 1: Peptid 4; Platte 2: Peptid 3

0,048	0,056	0,053	0,066	0,057	0,050	0,050	0,051	0,046	0,050	0,059	0,057
0,057	2,189	0,116	0,113	0,163	0,167	0,124	0,081	0,118	0,064	0,107	0,057
0,078	0,056	0,049	0,135	0,169	0,113	1,226	0,115	0,164	0,086	0,052	0,054
0,045	0,054	0,050	0,050	0,051	0,130	0,123	2,494	0,054	0,059	0,056	0,074
0,046	0,064	0,056	0,051	0,060	0,167	0,123	0,181	2,475	0,087	0,053	0,050
0,050	0,056	0,045	0,055	0,051	0,098	0,163	0,167	0,071	0,083	0,090	0,054
0,056	0,062	0,056	0,055	0,074	0,053	0,061	0,054	0,049	0,053	0,056	0,050
0,072	0,062	0,068	0,058	0,051	0,062	0,053	0,050	0,066	0,057	0,053	2,361

0,058	0,066	0,065	0,073	0,071	0,064	0,062	0,067	0,061	0,061	0,064	0,067
0,070	2,440	0,076	0,065	0,076	0,066	0,065	0,069	0,089	0,074	0,077	0,063
0,075	0,072	0,080	0,068	0,065	0,064	0,077	0,067	0,061	0,063	0,061	0,066
0,070	0,079	0,121	0,089	0,076	0,067	0,064	2,376	0,078	0,108	0,072	0,100
0,069	0,089	0,078	0,063	0,066	0,077	0,066	0,064	2,015	0,080	0,061	0,063
0,068	0,068	0,076	0,067	0,069	0,066	0,082	0,076	0,063	0,067	0,078	0,063
0,079	0,068	0,119	0,070	0,066	0,080	0,069	0,064	0,064	0,070	0,067	0,060
0,079	0,086	0,175	0,069	0,069	0,102	0,066	0,068	0,072	0,091	0,069	2,177

Tabelle 12. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 5 nach Selektionsrunde 3
Gecoatetes Peptid auf Platte 1: Peptid 5; Platte 2: Peptid 2

0,076	0,081	0,079	2,667	2,666	0,077	0,068	0,072	0,065	0,616	0,065	2,623
0,121	2,753	0,067	0,084	0,069	2,662	2,611	2,688	0,114	0,087	2,535	2,325
0,111	2,758	0,079	2,678	2,673	0,068	0,065	0,061	0,061	0,090	0,068	2,637
0,071	2,759	0,093	2,669	2,674	2,457	0,080	2,669	2,704	2,695	0,057	2,663
2,779	0,064	0,077	0,082	0,063	0,070	2,639	2,665	0,070	0,066	0,077	2,660
2,804	0,095	2,727	0,095	2,713	2,729	0,068	0,072	2,706	0,069	0,076	0,074
0,115	0,105	0,079	2,732	2,707	2,731	2,708	0,078	0,065	2,723	2,659	2,348
0,107	0,087	0,081	2,736	0,061	2,721	2,738	0,073	0,082	2,437	2,739	0,092
0,075	0,079	0,117	0,082	2,628	0,076	0,075	0,082	0,075	0,114	0,079	0,078
0,094	2,699	0,081	0,074	0,078	2,643	2,562	2,634	0,078	0,088	2,622	2,396
0,084	2,709	0,082	2,628	2,639	0,077	0,079	0,075	0,071	0,075	0,075	2,462
0,077	2,652	0,088	2,650	2,640	0,074	0,081	2,627	2,660	2,623	0,072	2,513
2,728	0,083	0,090	0,078	0,071	0,069	2,653	2,641	0,081	0,071	0,070	2,583
2,722	0,075	2,685	0,078	2,691	2,648	0,083	0,078	2,661	0,074	0,079	0,152
0,086	0,084	0,077	2,691	2,686	2,661	2,688	0,078	0,072	2,634	2,611	2,526
0,298	0,089	0,083	2,695	0,095	2,692	2,707	0,088	0,087	0,121	2,680	2,478

Tabelle 13. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid 5 nach Selektionsrunde 4

Gecoatedes Peptid auf Platte 1: Peptid 5; Platte 2: Peptid 2

2,492	2,798	2,581	0,086	2,509	2,566	2,595	2,582	2,720
2,625	2,779	2,629	0,081	2,613	0,069	0,072	2,643	2,717
2,283	2,770	1,702	1,736	0,100	0,075	2,577	2,602	2,762
2,554	2,787	2,614	2,600	0,093	2,540	2,552	2,624	2,761
2,623	2,801	2,540	2,583	0,084	0,083	2,401	0,089	2,775
0,084	0,045	2,006	1,691	2,601	2,598	2,649	2,220	2,676
1,744	2,835	2,322	1,483	2,591	0,077	2,581	0,077	0,041
0,087	2,825	2,566	2,623	2,472	2,241	2,651	2,601	2,759
0,050	0,045	0,050	0,049	0,046	0,049	0,046	0,048	0,041
0,049	0,041	0,057	0,051	0,050	0,048	0,050	0,047	0,042
0,053	0,045	0,052	0,062	0,052	0,050	0,049	0,048	0,038
0,053	0,048	0,068	0,053	0,053	0,061	0,051	0,049	0,041
0,054	0,039	0,051	0,054	0,049	0,048	0,048	0,049	0,039
0,056	0,043	0,052	0,049	0,050	0,053	0,049	0,051	0,042
0,052	0,044	0,054	0,052	0,049	0,049	0,050	0,049	0,041
0,051	0,042	0,055	0,054	0,052	0,052	0,054	0,052	2,802

Tabelle 14. ELISA mit Phagenüberständen: Peptid C5 nach Selektionsrunde 4

Gecoatedes Peptid auf Platte 1: Peptid 6; Platte 2: Ca7

Die folgenden Diagramme stellen die Ergebnisse der ELISA-Messungen grafisch dar. Auf der Ordinate ist die Absorption aufgetragen. Ein Fab wurde als spezifischer Binder gewertet, wenn er eine Absorption von mindestens 0,5 erreicht. Auf der Abszisse sind die Bezeichnungen der jeweiligen Fab-Klone notiert. Diese orientiert sich an der Lokalisation des Klons auf der 96-Well-Platte für den ELISA. Die Platte wurde von oben nach unten mit den Buchstaben A-H und von links nach rechts mit den Ziffern 1-12 nummeriert. Jedem Well ist somit eine Kombination aus Buchstabe und Zahl zuzuordnen. Die Bindungen an das zur Selektion verwendete Antigen sind als blaue Balken dargestellt. In rot sichtbar die unspezifischen Bindungen an das Kontrollpeptid (falsch positive Bindungen).

4. Ergebnisse

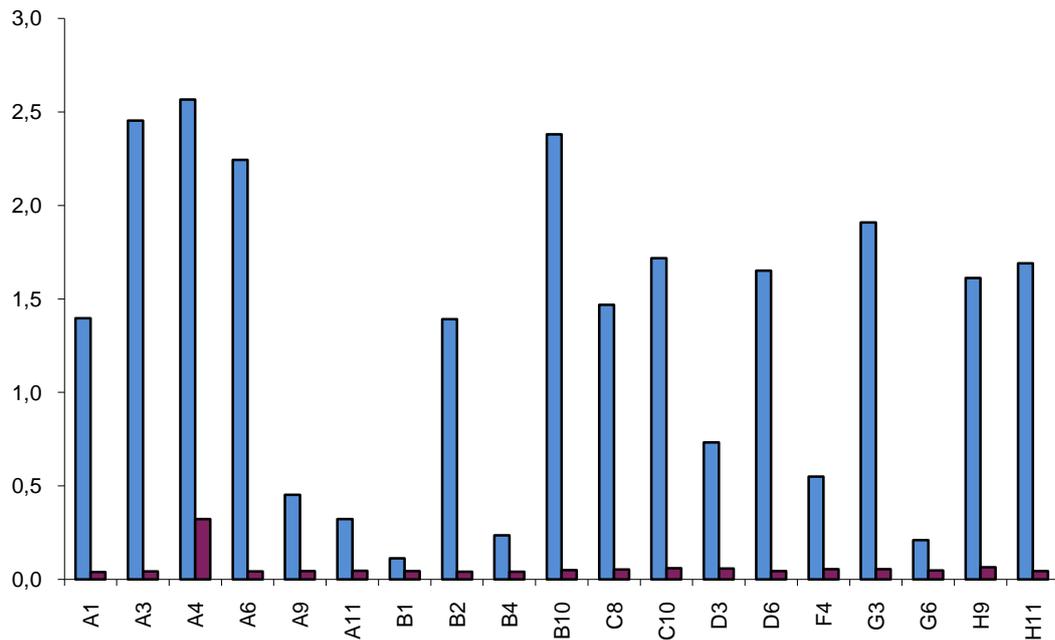


Abbildung 38. Fab-ELISA: Peptid 1 nach Selektionsrunde 3

Blaue Balken: Bindung der Fabs an das Antigen (P1), rote Balken: Bindung der Fabs an das Kontrollpeptid (P4).

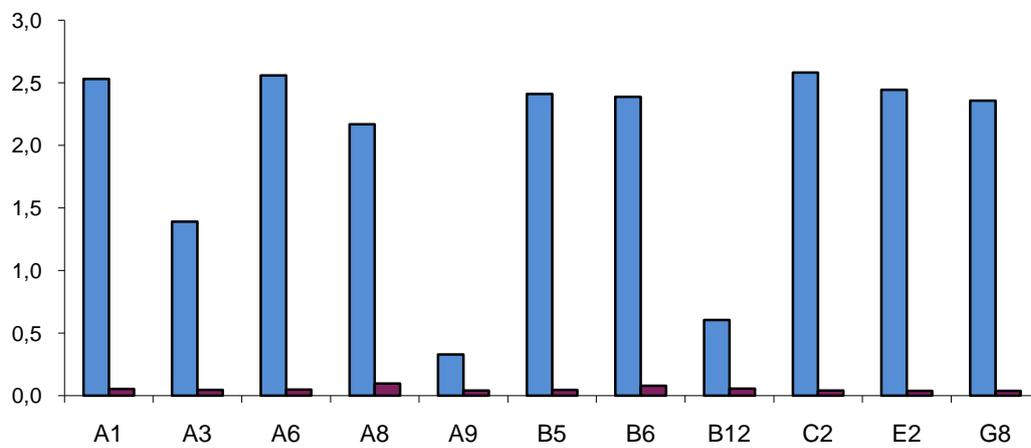


Abbildung 39. Fab-ELISA: Peptid 3 nach Selektionsrunde 3

Blaue Balken: Bindung der Fabs an das Antigen (P3), rote Balken: Bindung der Fabs an das Kontrollpeptid (P2).

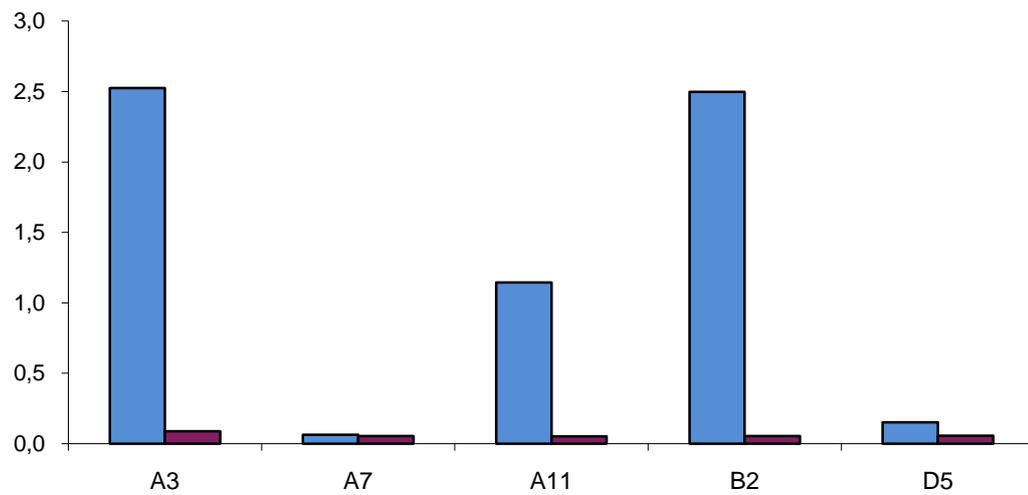


Abbildung 40. Fab-ELISA: Peptid 4 nach Selektionsrunde 3

Blaue Balken: Bindung der Fabs an das Antigen (P4), rote Balken: Bindung der Fabs an das Kontrollpeptid (P1).

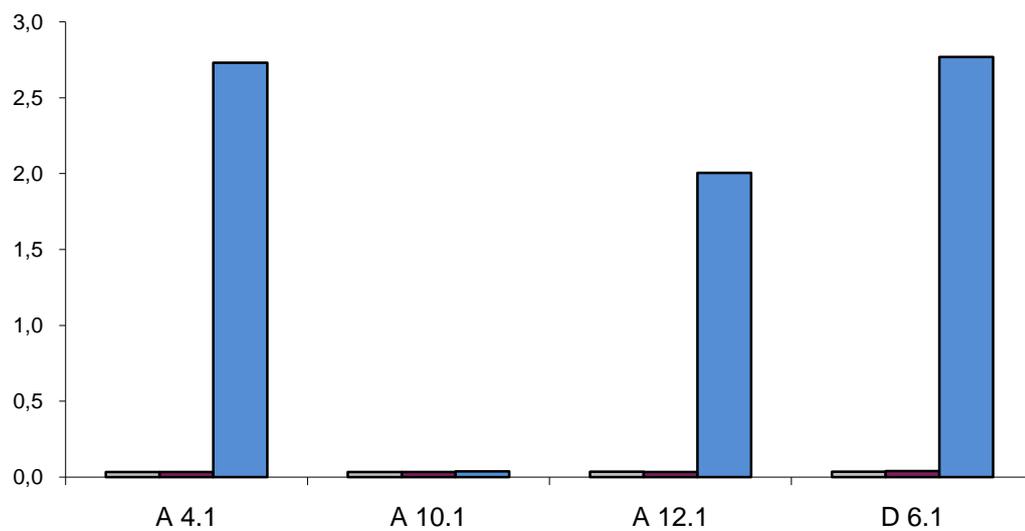


Abbildung 41. Fab-ELISA: Peptid 5 nach Selektionsrunde 4

Blaue Balken: Bindung der Fabs an das Antigen (P5), rote Balken: Bindung der Fabs an das Kontrollpeptid (P2), graue Balken: Bindung der Fabs ohne Peptid.

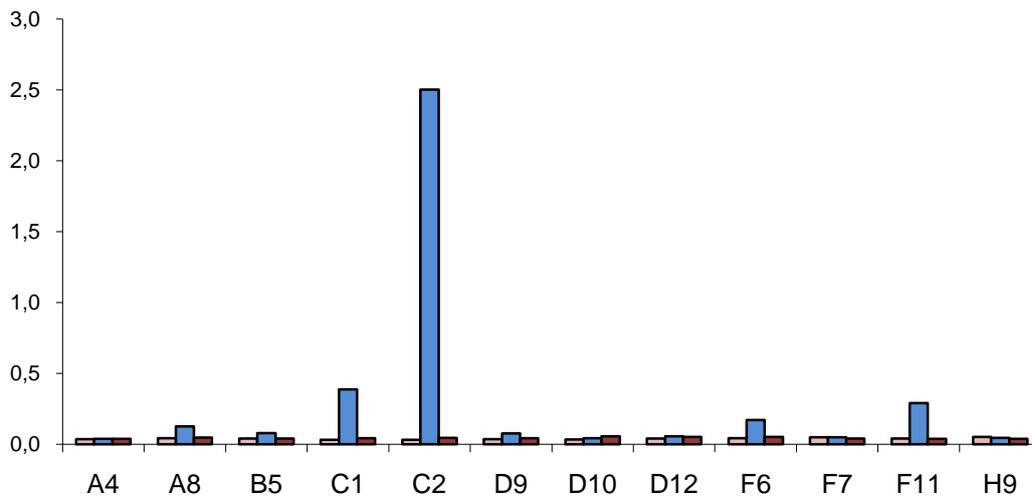


Abbildung 42. Fab-ELISA: Peptid 6 nach Selektionsrunde 4

Blaue Balken: Bindung der Fabs an das Antigen (C5), rote Balken: Bindung der Fabs an das Kontrollpeptid (CaV 36/37), graue Balken: Bindung der Fabs ohne Peptid.

4.5.2 Details der Fab-Sequenzierungen

Die folgenden Tabellen geben das Ergebnis der Fingerprint-PCR wieder. Klone, die dort zum jeweiligen Klon (Spalte 1) identisch waren, sind in der zweiten Spalte („identische Klone“) aufgeführt. Es wurde die variable Region der schweren Kette analysiert und der Subtyp des V-, J- bzw. D-Segments festgehalten. In grau hinterlegt sind die Klone, die im ELISA das zur Selektion verwendete TRP-Protein spezifisch erkannt haben.

P1 (mM3)

Klon	identische Klone	V _H	J _H	D-Segment	CDR3-Region
A1	C2, C6, C9, D2, G4	V _H 1-46	4	D6-19	CARDSPGYSSGGDFDYW
A3	-	V _H 3-30	4	D3-16	CAKDQAFGGVIAPLEYW
A4	B9, B11, E3, E9, E10	V _H 6-1	3	D3-19	CVRGNSDLRAFDIW
A5	-	V _H 6-1	3	D5-5	CAREVSDGFDFW
A6	B12, D10, E11, F2, F3, F9, F12, G5, G9, H2, H10, H11	V _H 3-30	6	D1-1	CARADWNYYYYGMDVW
A9	-	V _H 3-30	4	D1-26	CARDREWELPLDYW
A11	-	V _H 6-1	3	D2-21	CARESGLGAFDIW
B1	D5	V _H 3-23	4	D5-24	CARDGGSHW
B2	-	V _H 1-46	4	D6-13	CARDLAAAPDYW
B4	C1, E4, H1	V _H 3-30	3	D6-6	CAGRRLLKIIAARNDAHAFDIW
B10	-	V _H 1-69	4	D5-5	CAREGHTAIDYW
C8	-	V _H 3-30	4	D6-13	CARDRHSSSGIDYW
C10	-	V _H 6-1	3	D6-13	CAREVRGIAGAFDIW
D3	-	V _H 6-1	3	D2-21	CARESGLGALDIW
D6	-	V _H 1-3	4	D3-13	CARDFAAAAAFDYW
E6	-	V _H 1-18	4	D2-15	CARVLVGYCSGGSCYNDGGDYW
F4	-	V _H 6-1	2	D3-10	CAREGRVIDYWYFDLW
G3	-	V _H 3-49	3	D4-17	CASPILWGDYEEAFAFDIW
G6	-	V _H 2-5	4	D3-16	CAHIDGTAFDYW
H4	-	V _H 3-30	3	D3-10	CARDRYYGSLDIW
H9	-	V _H 4-39	3	D5-5	CARHYPATDAFDIW
C4	-	Nonsense			
F10	-	Stopp-Codon			
H12	-	Leserahmenverschiebung			

Tabelle 15. Sequenzierung: Fabs gegen Peptid 1

4. Ergebnisse

P3 (mC4)

Klon	identische Klone	V _H	J _H	D-Segment	CDR3-Region
A1	E7	V _H 3 - 30	4	D 3 - 22	CARDPGYEGYYDSSRFDYW
A2	-	V _H 3 - 23	3	D 1 - 14	CATVTQGDAFDIW
A3	D12, H8	V _H 3 - 30	6	D 3 - 10	CAKDPVSRGGMDVW
A6	B9, E10, G7	V _H 3 - 30	3	D 3 - 16	CAKDVGQLGAFDIW
A7	A10, B4, B10, C4, D1, E6, H11	V _H 3 - 23	3	D 6 - 13	CAGFGSFDAFDIW
A8	B7, D2, E8, G5, H6	V _H 3 - 30	1	D 6 - 13	CASEVAAAGTAVYW
A9	B3, C11, D6, D10, E12, G9, G12, H5, H7	V _H 3 - 30	4	D 3 - 16	CAKDPGASVLPDDYW
A11	C5	V _H 3 - 30	6	D 3 - 10	CARGIFGEADGMDVW
B1	-	V _H 3 - 23	3	D 2 - 2	CAKLSGTDAFDIW
B5	-	V _H 3 - 30	6	D 3 - 10	CARALLSDGMDVW
B6	C12, G1	V _H 3 - 30	6	D 3 - 10	CARALLSDGMDVW
B11	C7, C8, D11, F4, F11	V _H 3 - 49	4	D 1 - 26	CTRVGPTMIGDYW
B12	H3	V _H 3 - 30	6	D 2 - 21	CAKDPTWTSRDYYYYMDVW
C2	D8	V _H 3 - 23	6	D 6 - 6	CARDSPSDYMDVW
D5	-	V _H 3 - 30	4	D 5 - 12	CAKDYSGYDAMGVYGDYW
E2	-	V _H 3 - 30	4	D 7 - 27	CARDLKGVFYDYM
E4	-	V _H 3 - 30	3	D 3 - 22	CAKDRRYDSSGGAFDIW
E11	-	V _H 3 - 30	3	D 5 - 12	CASGLPSDAFDIW
F5	-	V _H 3 - 23	3	D 2 - 15	CARVGSFDAFDIW
F7	-	V _H 3 - 23	3	D 3 - 16	CARFGLDDAFDIW
E1	ev. G8	Leserahmenverschiebung			
F1	-	Leserahmenverschiebung			
G2	-	V _L (kappa) Produkt; kein V _H			
G3	ev. E1	Leserahmenverschiebung			
G8	-	nicht monoklonal			

Tabelle 16. Sequenzierung: Fabs gegen Peptid 3

P4 (mM3)

Klon	Identische Klone	V _H	J _H	D-Segment	CDR3-Region
A3	B11, C5, D2, D3, G2	V _H 1 - 69	5	D 6 - 6	CARASARSWFDPW
A7	B3, C2, E5, F2, F4, F10, G1, H6	V _H 3 - 23	4	D 3 - 16	CAKVVWSYDYFDYW
A8	B5, C4	V _H 3 - 30	4	D 4 - 23	CAKGDVGSLDYW
A9	-	V _H 1 - 18	1	D 5 - 12	CARGDTSVGYEYLRW
A10	-	V _H 1 - 69	3	D 5 - 12	CVVATSRFSYW
A11	-	V _H 4 - 39	3	D 3 - 10	CARQYYGSANAFDIW
A12	-	V _H 3 - 23	3	D 3 - 22	CAKDYYDSSGYTYAFDIW
B2	-	V _H 1 - 3	6	D 3 - 22	CARGSQVPAAMRKYYYYYYGM MDVW
B4	C7, E3, E9, G11	V _H 3 - 49	4	D 1 - 26	CTRAGGGSYIRGYFDYW
B7	-	V _H 1 - 69	6	D 2 - 8	CARVWDTDYGGMDVW
B9	-	V _H 5 - 51	4	D 4 - 23	CARYLPGGNSALDYW
B10	-	V _H 4 - 59	4	D 3 - 10	CARHLGSGTYPLDHW
B12	G8	V _H 1 - 18	6	D 3 - 10	CARDPYYGSGMSNRRGEYYYY GMDVW
C8	G9	V _H 3 - 49	3	D 3 - 22	CARDRFYYDSSGTDAFDIW
C9	C11, F7	V _H 5 - 51	4	D 6 - 19	CARLSSSGLDYW
D4	-	V _H 1 - 18	6	D 4 - 17	CARDSKYGDYAYQNYGGMD VW
D5	H8	V _H 3 - 23	4	D 3 - 9	CAKEDQRYFDWRRAPDYW
D6	D12	V _H 1 - 69	3	D 3 - 3	CVGAGDAFDIW
D7	-	V _H 1 - 46	3	D 1 - 1	CASSQGSSAFDIW
D11	-	V _H 1 - 2	6	D 6 - 13	CARDVGEAAGTGYGGMDVW
E4	-	V _H 3 - 30	3	D 4 - 23	CARDRRWSDAFDIW
E6	-	V _H 1 - 8	6	D 3 - 9	CAVNDEDAEIWSYGGMDVW
E8	-	V _H 1 - 18	4	D 3 - 16	CARVGGYHFDYW
E10	-	V _H 1 - 18	6	D 3 - 10	CARDDEGGFGESHYYYGMDVW
F1	-	V _H 1 - 46	4	D 4 - 17	CARVVDYGDYDAFGYW
F3	-	V _H 3 - 30	3	D 3 - 22	CAREGHNYDNAGQHAAFDIW
F5	-	V _H 1 - 18	3	D 3 - 10	CARGPGAFDIW
F11	G4	V _H 1 - 18	6	D 6 - 13	CARDLNTGISTPGRLYYGGMD VW
G5	-	V _H 3 - 21	4	D 6 - 13	CVKDQRSSPYFDYW
H3	-	V _H 1 - 46	3	D 4 - 23	CASHDYGGKRAFDIW
H9	-	V _H 1 - 18	6	D 3 - 16	CARNTVVSYSYHYGGMDVW
H10	-	V _H 1 - 18	6	D 4 - 17	CARDYPVDAYGDYTYGGMD VW
H11	-	V _H 1 - 18	6	D 3 - 10	CARGGPFGEHPGSHFYGGMDVW
C3	C12, E12, F6	Stopp-Codon in AS 1			

Tabelle 17. Sequenzierung: Fabs gegen Peptid 4

VDJ-Gensegment-Verteilung

P1	V _H -Segmente			J _H -Segmente			D-Segmente		
	Gen	Anzahl	Proz. Anteil	Gene	Anzahl	Proz. Anteil	Gene	Anzahl	Proz. Anteil
	V _H -1	10	21,2 %	J _H -1	0	0 %	D1	14	29,8 %
	V _H -2	1	2,1 %	J _H -2	1	2,1 %	D2	3	6,3 %
	V _H -3	24	51,0 %	J _H -3	14	29,8 %	D3	11	23,4 %
	V _H -4	1	2,1 %	J _H -4	16	34,0 %	D4	1	2,1 %
	V _H -5	0	0 %	J _H -5	0	0 %	D5	5	10,6 %
	V _H -6	11	23,4 %	J _H -6	13	27,7 %	D6	13	27,7 %
							D7	0	

P3	V _H -Segmente			J _H -Segmente			D-Segmente		
	Gen	Anzahl	Proz. Anteil	Gen	Anzahl	Proz. Anteil	Gen	Anzahl	Proz. Anteil
	V _H -1	0	0 %	J _H -1	6	10,5 %	D1	7	10 %
	V _H -2	0	0 %	J _H -2	0	0 %	D2	4	15 %
	V _H -3	57	100 %	J _H -3	18	31,5 %	D3	27	47,4 %
	V _H -4	0	0 %	J _H -4	20	35,1 %	D4	0	0 %
	V _H -5	0	0 %	J _H -5	0	0 %	D5	4	7,0 %
	V _H -6	0	0 %	J _H -6	13	22,8 %	D6	16	28,1 %
							D7	1	1,8 %

P4	V _H -Segmente			J _H -Segmente			D-Segmente		
	Gen	Anzahl	Proz. Anteil	Gen	Anzahl	Proz. Anteil	Gen	Anzahl	Proz. Anteil
	V _H -1	28	47,5 %	J _H -1	1	1,7 %	D1	6	10,2 %
	V _H -2	0	0 %	J _H -2	0	0 %	D2	1	1,7 %
	V _H -3	25	42,4 %	J _H -3	12	20,3 %	D3	28	47,5 %
	V _H -4	2	3,4 %	J _H -4	27	45,8 %	D4	9	15,2 %
	V _H -5	4	6,8 %	J _H -5	6	10,2 %	D5	2	3,4 %
	V _H -6	0	0 %	J _H -6	13	22,0 %	D6	13	22,0 %
							D7	0	0 %

Tabelle 18. V-, J-, D-Gensegmentverteilung der verschiedenen Fab-Klone

Signalsequenz

M K K L L F A I P L V V P F Y S H S A L
 GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT TTC TAT TCT CAC AGT GCA CT

Variable Domäne der leichten Kette (Vkappa+Jkappa)

Vk2-30*01

D V V M T Q S P L S L P V T P G E P V S I S C
 GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC CCT GGA GAG CCG GTC TCC ATC TCC TGC

-----CDR1-----

R S S Q S L V Y S D G N T Y L N W F Q Q R P G
 AGG TCT AGT CAA AGC CTC GTA TAC AGT GAT GGA AAC ACC TAC TTG AAT TGG TTT CAG CAG AGG CCA GGC

-- CDR2--

Q S P R R L I Y K V S N R D S G V P D R F S G
 CAA TCT CCA AGG CGC CTA ATT TAT AAG GTT TCT AAC CCG GAC TCT GGG GTC CCA GAC AGA TTC AGC GGC

S G S G S D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y
 AGT GGG TCG GGC TCT GAT TTC ACA CTG AAA ATC AGC AGG GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC

Junktion V->J-----CDR3-----J1*01

C M Q G S H W P W T F G Q G T K V E I K
 TGC ATG CAA GGG TCA CAC TGG CCC TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

Konstante Domäne der leichten Kette (Ckappa)

R T V A A P S C F I F P P S D E Q L K S F T A
 CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC

S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
 TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC

L Q S G N S Q E S V R E Q D S K D S T Y S L S
 CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC

S R L R L S K A D Y E K H K V Y A C E V T E Q
 AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG

G L S S P V R K S F N R G E C * *
 GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAA TAA

GGCGCGCC

Ribosomale Bindungsstelle

AATTCTATTTCAGGAGACAGTCATA

Signalsequenz

M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A
 GTG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC

Variable Domäne der leichten Kette

V3-30*03 or V3-30*18 or V3-30*19 or V3-30-3*01 (98,61%)

Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L S C A
 CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA

----- CDR1-----

A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
 GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG

-----CDR2-----

W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T
 TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC

I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
 ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT

Junktion V-> D -> J D6-13*01-----CDR3-----J1*01

V Y Y C A S E V A A A G T A V Y W G Q G T L V
 GTG TAT TAC TGT GCG AGC GAG GTA GCA GCA GCT GGT ACG GCC GTC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC

T V S S
 ACC GTC TCA AGC

4. Ergebnisse

Konstante Domäne der schweren Kette (CH1)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A
 GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG

A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L
 GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC G **GC CTG**

CH1 seq 5' rev bzw. CH1 seq 3' new

T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V
 ACC AGC GGC GTC **CAC** ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTA GTG

T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T
 ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC

K V D K K V E P K S C A A A H H H H H H G G A
 AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GCG GCC GCA **CAT CAT CAT CAC CAT CAC** GGG GCC GCA

myc-Tag

E Q K L I S E E D L N G A A **amber**
 GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG

GIII-Gen

T	V	E	S	C	L	A	K	P	H	T	E	N	S	F	fd tet 25	T N
V	W	K	D	D	R	T	L	D	R	Y	A	N	Y	E	G	C
L	W	N	A	T	G	V	V	V	C	T	G	D	E	T	Q	C
Y	G	T	W	V	P	I	G	L	A	I	P	E	N	E	G	G
G	S	E	G	G	G	S	E	G	G	G	S	E	G	G	G	T
K	P	P	E	Y	G	D	T	P	I	P	G	Y	T	Y	I	N
P	L	D	G	T	Y	P	P	G	T	E	Q	N	P	A	N	P
N	P	S	L	E	E	S	Q	P	L	N	T	F	M	F	Q	N
N	R	F	R	N	R	Q	G	A	L	T	V	Y	T	G	T	V
T	Q	G	T	D	P	V	K	T	Y	Y	Q	Y	T	P	V	S
S	K	A	M	Y	D	A	Y	W	N	G	K	F	R	D	C	A
F	H	S	G	F	N	E	D	P	F	V	C	E	Y	Q	G	Q
S	S	D	L	P	Q	P	P	V	N	A	G	G	S	G	G	G
G	S	G	G	G	S	E	...									

Abbildung 43. Sequenz von P3A8 zwischen pCES-Vektor und Phagenprotein gIII

Rot markiert: Sequenz der verwendeten Primer; gelb markiert: Sequenz der variablen Domäne der leichten Kette; grün markiert: Sequenz der konstanten Domäne der leichten Kette; türkis markiert: Sequenz der variablen Domäne der schweren Kette; violett markiert: Sequenz der konstanten Domäne der schweren Kette, in violetter Schrift und türkis hinterlegt: His- und myc-Tag.

Grau markiert: Junktionsbereiche von den V-Segmenten zu den J-Segmenten. Unterstrichen: compability determining regions (CDRs).

4.5.3 Ergebnisse der weiteren Peptid-Spot-Analysen

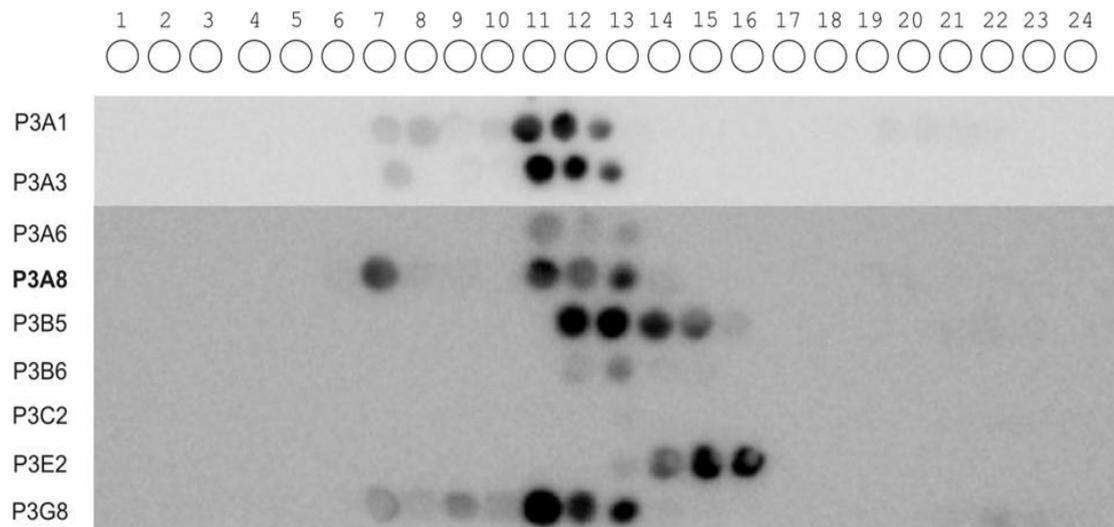


Abbildung 44. Ergebnisse der Peptid-Spot-Analyse für Fabs gegen die TRPC4-Sequenz (P3)
Fabkonzentration 10 µg/ml, 2. Antikörper anti-human-Fab 1 : 100.000; Expositionszeit 15 s.



Abbildung 45. Ergebnisse der Peptid-Spot-Analyse für Fabs gegen den intrazellulären Sequenzabschnitt von TRPM3 (P4)

Fabkonzentration 10 µg/ml, 2. Antikörper anti-human-Fab 1 : 100.000; Expositionszeit 66 min.

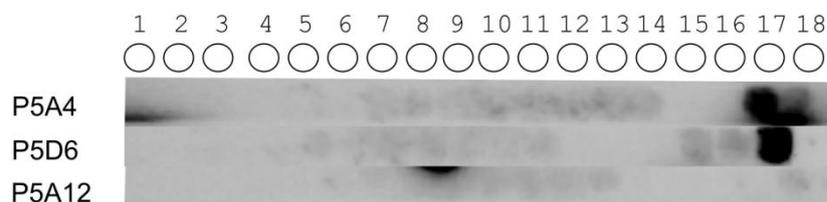


Abbildung 46. Ergebnisse der Peptid-Spot-Analyse für die Fabs gegen die TRPM1-Sequenz (P5)
Fabs in Konzentration 10 µg/ml, 2. Antikörper anti-human-Fab 1 : 100.000; Expositionszeit 66 min.

4. Ergebnisse

Im Gegensatz zu Analysen der anderen TRP-Proteinen wurden bei der Untersuchung von TRPM1 (Abbildung 46) nur 18 Peptid-Spots aufgetragen, die sich jeweils um Sprünge von drei AS unterscheiden. Die Sprünge von drei AS wurden auch bei den Spots von TRPC5 verwendet. Hier wurden 9 Peptid-Spots benötigt (Abbildung 47).

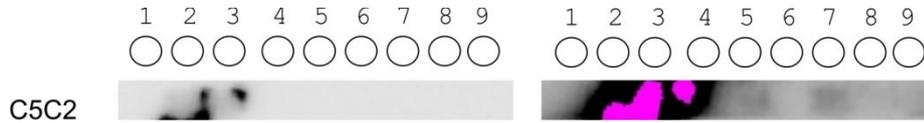


Abbildung 47. Ergebnis der Peptid-Spot-Analyse für den Fab C5C2 gegen die TRPC5-Sequenz
Fabkonzentration 10 µg/ml, 2. Antikörper anti-human-Fab 1 : 100.000, Expositionszeit links: 15 s, rechts: 66 min.

4.5.4 Ergebnis der Immunpräzipitation von TRPC4

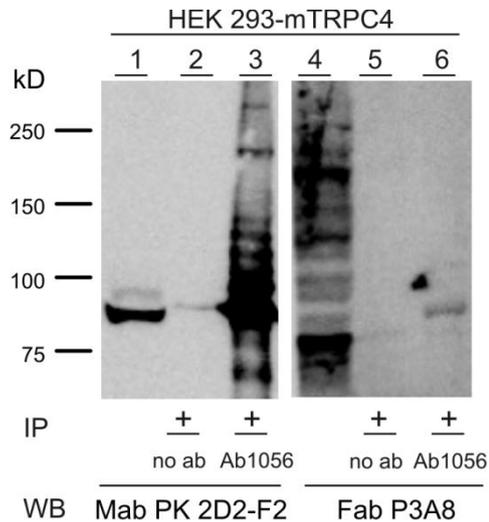


Abbildung 48. Immunpräzipitation von TRPC4 durch AK1056 und Detektion mittels Fab P3A8
Aufgetragen in Spur 1: 15 µl, in Spur 4: 30 µl Zellysate, in Spur 3: 10 µl, in den Spuren 6 und 9: 25 µl. Nach der mit AK1056 durchgeführten Immunpräzipitation angereicherten TRPC4-Proteine. 1. Antikörper in den Spuren 1-3: mab 9F6G8 (5 µg/ml), 1. Antikörper in den Spuren 4-6: Fab P3A8 (100 µg/ml). Die Detektion des monoklonalen Antikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Ratte Antikörper, die der Fabs mit dem anti-human-Fab Antikörper.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Antikörperfragmente gegen verschiedene TRP-Proteine herzustellen, um damit deren Funktion zu beeinflussen. Die Diskussion gliedert sich in folgende Abschnitte:

- Expression der biotinylierten Proteine
- Auswahl der antigenen Peptidsequenzen
- Sequenzanalyse der erhaltenen Antikörperfragmente
- TRP-Spezifität der selektionierten Fab-Antikörper
- Schlussfolgerung

5.1 Expression der biotinylierten Proteine

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, wurden in den pCES-Vektor TRPM1- und TRPC5-Sequenzen kloniert, um die entsprechenden Proteine während ihrer Expression zu biotinylieren.

Dabei traten folgende Probleme auf:

1. Obwohl sich in der Coomassie Blue-Färbung ein Muster mit vielen Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts zeigte, war kein Protein in Höhe des errechneten Molekulargewichts (TRPM1: 10,8 kDa, TRPC5: 12,8 kDa) sichtbar.
2. Die Banden auf einer Höhe von 18 kDa, die auf die biotinylierten TRP-Proteine hindeuteten, waren nur von schwacher Intensität.
3. Die Proteine konnten nicht aus den Bakterienlysaten isoliert werden.

5.1.1 Divergenzen im Molekulargewicht der TRP-Proteine

Abweichungen im Molekulargewicht werden bei Membranproteinen durchaus beobachtet. Allerdings wurde beschrieben, dass diese im SDS-Page-Gel häufig schneller laufen als erwartet und auf einer Höhe von 70-85% des erwarteten Molekulargewichtes nachgewiesen werden können (Drew et al., 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit exprimierten Proteine liegen jedoch mit ihrem Molekulargewicht etwa fünf bis sieben kDa über dem erwarteten Gewicht (TRPM1: 10,8 kDa, TRPC5: 12,8 kDa) der TRP-Proteinabschnitte.

Um einen Unterschied im Molekulargewicht von fünf bzw. sieben kDa allein durch die Biotinylierung erklären zu können, müsste eine Polybiotinylierung von 20-28 Biotinmolekülen pro TRP-Protein erfolgen. Auf Grund der gewählten Methode der enzymatischen Biotinylie-

rung mittels BirA-Ligase kann im Gegensatz zur chemischen *in vitro*-Biotinylierung von einer gezielten Biotinylierung der BAD ausgegangen werden (Parott et al., 2003). Die Biotinligase bindet genau ein Biotinmolekül an den Lysinrest der BAD (GGLNDIFEAQKIEWH) (Predonzani et al., 2008). Da ein Biotinmolekül nur 244 Da schwer ist, ist der Gewichtsunterschied durch Biotinylierung zu gering, um das beobachtete Molekulargewicht erklären zu können.

Der Nachweis im Western-Blot mit zwei unabhängigen Antikörpern (anti-myc bzw. Streptavidin-HRP) sowie die Zunahme der Proteinmenge über die Zeit sprechen jedoch trotz der Differenz zum erwarteten Molekulargewicht dafür, dass es sich um die korrekten Proteine handelt.

5.1.2 Menge der synthetisierten TRP-Proteine

Während die Signalintensität bei den Western-Blot-Untersuchungen auch von der Avidität der verwendeten Antikörper abhängig ist (Guthrie et al., 2004), kann, da es sich beim Western-Blot um eine qualitative/semi-quantitative Methode handelt, nicht über die absolute Proteinmenge geurteilt werden. Hierzu dient der Vergleich mit den Coomassie Blue-gefärbten SDS-Gelen. Da die TRP-Protein repräsentierenden Banden in diesen Gelen von schwacher Intensität sind, wurden die gewünschten Proteine nur in geringem Ausmaß synthetisiert.

Die Kompatibilität des verwendeten Vektors mit den Bakterien wurde durch die Expression eines anderen Proteins (Fab, Abbildung 18) nachgewiesen. Desweiteren nahm die optische Dichte der Bakterien (OD bei 560 nm) im Verlauf der vierstündigen Synthesezeit stetig zu. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das synthetisierte Protein für die verwendeten Bakterien nicht toxisch war.

Es ist bekannt, dass es bei der Expression von Proteinen außerhalb ihres ursprünglichen Milieus häufig zu Problemen kommen kann (Gustafsson et al., 2004). Eine Ursache für geringe Translations- und Expressionsraten von heterologen Peptiden oder Proteinen in *E. coli* ist die Translation von nicht „optimalen“ (seltener verwendeten) Codons (Li et al., 2006). Der Begriff „optimales Codon“ wurde erstmals durch T. Ikemura als Codon definiert, mit dem die tRNA nahezu perfekte Watson-Crick Basenpaare ausbildet (Ikemura, 1981). *E. coli*-Gene, die für häufige Proteine kodieren, nutzen selektiv die optimalen Codons, andere *E. coli*-Gene verwenden mehr nicht optimale Codons (Ikemura, 1985). Auch die Sequenzen der beiden exprimierten TRP-Proteine enthalten einige nicht optimale Codons. Insgesamt wird die verwendete TRPM1-Sequenz durch 15 (von 57 = 26,8%) seltene Codons kodiert,

die TRPC5-Sequenz durch 17 (von 76 = 22,4%). Es ist somit möglich, dass dies ein Grund für die geringe Ausbeute der TRP-Proteine durch den *E. coli*-Stamm AvB101 war.

5.1.3 Isolierung der TRP-Proteine

Wie in Kapitel 4.2 (Abbildung 21) dargestellt, war die Isolation der exprimierten und biotinylierten Proteine trotz Anwendung verschiedener Protokolle nicht möglich. Obwohl die zur Proteinisolierung verwendeten Protokolle etabliert und z.B. bei der Aufreinigung der Fabs anzuwenden waren, könnte auch in diesem Schritt der Grund für die geringe Proteinausbeute liegen.

Ein häufiger Grund dafür, dass sich Proteine nicht mit den üblichen Methoden (z.B. enzymatisch, osmotisch) aufreinigen lassen, ist deren Aggregation zu Einschlusskörperchen (*engl.* „inclusion bodies“). Dies sind dichte Partikel aus aggregiertem Protein, welche häufig während der Expression großer Mengen rekombinanter Proteine sowohl im Zytoplasma als auch im Periplasma von *E. coli* zu finden sind (Bowden et al., 1991; Fahnert et al., 2004). Da auch nach mehreren Isolationsversuchen kein solubilisiertes Protein im Überstand, hingegen jedoch große TRP-Proteinmengen im Zellpellet nachweisbar waren, könnte es sich hier auch um die Formation von sog. „inclusion bodies“ handeln. Um die Bildung von Einschlusskörperchen zu verhindern, kann versucht werden, die Inkubationstemperatur nach Induktion von 37 auf 29 °C zu senken, dem Medium Glukose zuzugeben oder gleichzeitig Chaperone zu exprimieren, die den Anteil an löslichen Proteinen erhöhen (Schein et al., 1988; Bergès et al., 1996; Blum et al., 1992).

Diese Vorgehensweisen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, könnten aber in zukünftigen Arbeiten bei der oben beschriebenen Problematik angewandt werden.

5.2 Auswahl der antigenen Peptidsequenzen

Für das Screening der Phagenbibliothek mittels Phagen-Display wurden, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, biotinylierte Peptide benötigt. Insgesamt wurden fünf verschiedene TRP-Proteinabschnitte ausgewählt. Diese beinhalteten sowohl Sequenzabschnitte im Bereich des S4-S5-Linkers als auch der E3-Schleife (Kapitel 4.1). Gegen vier von fünf synthetischen TRP-Peptiden (Peptid 1: TRPM3 extrazellulär, Peptid 3: TRPC4 intrazellulär, Peptid 4: TRPM3 intrazellulär und Peptid 5: TRPM1 intrazellulär), die für das Screening der Phagenbibliothek

eingesetzt wurden, ließen sich nach Selektion mehrere Phagen mit spezifisch bindenden Antikörperfragmenten gewinnen.

Lediglich gegen das Protein mit einem Sequenzabschnitt des extrazellulären TRPC5-Peptids (Peptid 2) ließen sich unter Verwendung des gleichen Versuchsprotokolls zunächst keine Phagen finden. Mit einer Länge von 28 AS unterschied es sich in der Länge der AS-Sequenz nicht von den anderen verwendeten Peptiden (P1: 25 AS, P3: 20 AS, P4: 20 AS, P5: 56 AS).

Da die Erfolgsrate, einen Antikörper gegen verschiedene Antigene zu gewinnen, durch die Diversität der Phagenbibliothek bestimmt wird, steigt die Wahrscheinlichkeit einen bindenden Antikörper mit hoher Affinität zu isolieren mit der Diversität der Phagenbibliothek (de Haard et al., 1999; Perelson et al., 1979). Die zur Gewinnung der Fabs verwendete Phagenbibliothek hatte eine Diversität $3,7 \times 10^{10}$. Diese Vielfalt entspricht nahezu der des vollständigen humanen Antikörperrepertoires von circa 1×10^{11} . Die Möglichkeit, dass kein Antikörper, der ein Epitop innerhalb der P2-Sequenz erkennt, im Repertoire der Phagenbibliothek vorhanden war, steht der Tatsache gegenüber, dass gegen das Peptid 6 im Phagen-ELISA 45 spezifische Binder gefunden wurden. Anhand der Peptid-Spot-Analyse zeigte sich ein minimal benötigtes Epitop des Fabs C5C2 (gegen P6) mit einer Länge von fünf Aminosäuren, wovon die zwei 5' gelegenen AS erst nach Verlängerung der antigenen Sequenz der Phagenbibliothek präsentiert wurden.

5.3 Sequenzanalyse der erhaltenen Fabs

Die Interaktion eines Antikörpers mit einem Antigen kann nur dann auf die gewünschte Weise erfolgen, wenn es sich um eine produktive Immunglobulin-Rearrangement-Sequenz handelt (siehe 2.2.1). Die für die gewonnenen Fabs kodierenden DNA-Sequenzen wurden bestimmt und analysiert. Für 125 von 134 Fabs konnte eine produktive Immunglobulin-Rearrangement-Sequenz nachgewiesen werden.

Die am häufigsten verwendeten V_H -Segmentgene waren bei den Fabs gegen Peptid 1 V_H1 mit einem Anteil von 21,7%, V_H3 mit 52,1% und V_H6 mit 23,9%. Die Fabs gegen Peptid 3 wurden ausschließlich durch V_H3 -Segmentgene kodiert, die gegen Peptid 4 zu 47,5% durch V_H1 und zu 42,4% durch V_H3 -Segmentgene. Insgesamt werden die in der Phagenbank enthaltenen schweren Ketten der Antikörper somit hauptsächlich durch die Familien V_H1 , V_H3 , V_H4 und V_H6 kodiert (de Haard et al., 1999). Abgesehen von V_H4 sind dies genau diejenigen Familien, die auch bei den gegen die TRP-Peptide selektierten Fabs gefunden wurden.

Ein Grund für das Abweichen der tatsächlichen von der erwarteten V_H -Gen-Verteilung kann bei der großen Diversität der Phagenbibliothek von über 10^7 Klonen in der geringen Stichprobenzahl von nur etwa 50 gewonnenen Klonen gegen das jeweilige Peptid liegen.

Neben den V_H -Genen wurden auch die Sequenzen der J- und D-Gene der schweren Kette untersucht. Es zeigte sich ein gehäuftes Vorkommen der J_H4 -, J_H3 - und J_H6 -Gensegmente (P1: J_H3 29,8%, J_H4 34,0%, J_H6 27,7%, P3: J_H3 31,5%, J_H4 35,1%, J_H6 22,8%, P4: J_H3 20,3%, J_H4 45,8%, J_H6 22,8%). Eine solche relative Häufigkeit ist für adulte B-Zellantikörper nicht bekannt, jedoch für J_H3 und J_H4 bei fetalen Antikörpern nachgewiesen worden (Schröder und Wang, 1990).

Sanz et al. (1991), Yamada et al. (1991), Huang et al. (1992) und Brezinscheck et al. (1995) zeigten, dass Segmente aus der D3-Familie am häufigsten vorkommen, Segmente aus der D6-Familie am zweithäufigsten. Diese Beobachtungen wurden auch bei der Analyse der Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Fabs gemacht (P1: D3 23,4%, D6 27,7%; P3: D3 47,4%, D6 28,1%; P4: D3 47,5%, D6 22,0%). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der Aussage von Corbett et al. (1997), dass kurze D-Segmente häufiger verwendet werden als lange D-Segmente.

Aus der Kombination der V-, D- und J-Gensegmente ergeben sich die CDR3-Regionen. Exemplarisch für die CDR3-Regionen sind in 4.5.2 die Sequenzen der CDR3-Regionen der schweren Ketten aller Fabs aufgeführt. Diese Regionen besitzen die größte Bedeutung für die Antigenvariabilität, bilden die größte Kontaktstelle mit dem Antigen (Wilson et al., 1994) und stellen die Abschnitte eines Antikörpers dar, die die größten Sequenzunterschiede von einem Antikörper zum nächsten aufzeigen (Kabat et al., 1991). Die Sequenzen der CDR3-Regionen der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Fabs variieren von 9 bis 25 Aminosäuren. Dies entspricht fast dem gesamten Spektrum der Längenverteilung humaner CDR3-Regionen von 4 bis 35 AS-Länge (Johnson et al., 2000; Wu et al., 1993). 2003 zeigten Collis et al., dass die Länge der jeweiligen CDR3-Regionen vom erkannten Antigen abhängig ist. Während Antikörper, die Haptene erkennen, kurze CDR3-Regionen (10 AS) besitzen, sind diejenigen der Antikörper, die Viren binden, deutlich länger (17 AS). Antikörper, die Peptide detektieren, besitzen durchschnittlich 12 AS, diejenigen die Proteine erkennen, 13 AS. Die CDR3-Regionen der Fabs enthielten im Mittel 14 AS. Angesichts der geringen Stichprobenzahl korreliert dieses Ergebnis bezüglich der CDR3-Länge von Antikörpern gegenüber Peptiden mit dem von Collis et al. (2003).

Neben der Längenvarianz zeigten sich bei den gewonnenen Fabs ebenso deutliche Unterschiede in der Sequenz-Zusammensetzung. Auffällig war hierbei, dass 89,3% der Fab-Klone C-terminal durch eine der drei AS-Kombinationen DYW, DIW oder DVW kodiert wurden. Diese Beobachtungen wurden auch bei anderen Arbeitsgruppen gemacht, die mehrere Fabs gleicher Spezifität untersuchten (Wu et al., 1993; Shirai et al., 1999; Zemlin et al., 2003). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei den Variationen der N-terminalen und mittleren AS um wichtige Regionen für die Spezifität handelt und es sich bei den häufig gleichen C-terminalen AS um eine Codierung von struktureller Bedeutung handelt.

Außer den CDR3-Sequenzen sind noch weitere CDR-Regionen an der Bildung der Antigenbindungsstelle („antigene combining site“, ACS) beteiligt (Vargas-Madrado et al., 1995). Erst durch Kombination der sechs CDR-Regionen unterschiedlicher Sequenzlänge und -zusammensetzung ergeben sich verschiedene Konformationen der ACS, welche ausschlaggebend für das Bindungsverhalten eines Antikörpers sind (Collis et al., 2003; Almagro et al., 2004).

5.4 TRP-Spezifität der selektionierten Fab-Antikörper

Die Gewinnung der gegen die TRP-Proteine gerichteten Fabs erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gerhard Held. Phagen-Display ist in dieser Arbeitsgruppe eine etablierte Methode zur Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Antikörper (Held et al., 2007; Neumann et al., 2009). Für TRP-Kanäle wurden bisher keine Antikörper beschrieben, die mittels Phagen-Display hergestellt wurden, jedoch konnten polyklonale Antikörper gegen die hier eingesetzten TRP-Kanäle bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben werden (z.B. Xu et al. (2001, 2005, 2006); Naylor et al. (2008)). Ebenso wurden in den Arbeitsgruppen des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlands bereits mehrere polyklonale Antikörper gegen TRP-Proteine gewonnen. Im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe um Beech konnte mit Hilfe dieser Antikörper jedoch keine Beeinflussung der Kanalaktivität nachgewiesen werden. Zum einen sind diese gegen intrazelluläre Epitope gerichtet, zum anderen greifen sie im terminalen Sequenzbereich der Proteine an (sowohl N- also auch C-terminal) und nicht wie bei der AG um Beech an den Extrazellulärschleifen. Mit Hilfe der Phagenbibliothek der Arbeitsgruppe um Held konnten bereits viele spezifische Antikörper gewonnen werden, so dass es aussichtsreich erschien, TRP-spezifische Fab-Fragmente mit Hilfe der Phagen-Display-

Technologie zu entwickeln. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen diskutiert.

5.4.1 ELISA

In Kapitel 4.3 wurde die Gewinnung der Antikörperfragmente beschrieben. Die Spezifitätsuntersuchung der Fabs erfolgte mittels ELISA. Durch die Verwendung von Kontrollpeptiden konnte nachgewiesen werden, dass es sich um spezifische Bindungen handelt. Insgesamt zeigten 40,3% aller Fabs ein spezifisches Signal. Dabei waren jedoch große Unterschiede zwischen den Fabs gegen die verschiedenen Peptide zu beobachten. So waren 72,2% der Fabs gegen P1 im ELISA positiv, jedoch nur 38,6% gegen P2 sowie 14,5% gegen P3. Auch andere Arbeitsgruppen gewannen mit Hilfe der gleichen Phagenbibliothek (de Haard et al., 1999) Fab-Fragmente und bestimmten deren Spezifität mittels ELISA. So selektionierten Denkberg et al. (2002) Fabs gegen verschiedene Epitope des Melanom-assoziierten Antigens gp100. Abhängig vom im Screening verwendeten Epitop ergaben sich auch bei ihnen unterschiedliche positive ELISA-Resultate nach der dritten Selektionsrunde (16%, 21% bzw. 70-90%). Somit scheint sich nicht jedes Epitop in gleichem Maß für die Selektion spezifischer Fabs zu eignen. Lu et al. (2002) gewannen Fab-Fragmente gegen den „kinase insert domaincontaining receptor“ (KDR) des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF). 75% der von ihnen isolierten Fabs waren im ELISA positiv. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit verwendete die Arbeitsgruppe das gecoatete Protein in einer Konzentration von 1 µg/ml (hier: 0,5 µg/ml) sowie ansteigende Antikörperkonzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM (hier: 20 µg/ml, was je nach AS-Zusammensetzung der Fabs etwa 400 nM entspricht). Es zeigte sich eine starke Zunahme der Bindungsaffinität mit steigender Antikörperkonzentration (Lu et al., 2002). Durch das Wählen niedriger Konzentrationen können somit die Antikörper mit der höchsten Spezifität selektioniert werden. Dieser Vorteil kann bei weiteren Anwendungen genutzt werden. Für die ELISA-Untersuchungen mit den Phagen („Phagen-ELISA“) wurden vergleichbare Mengen an Phagensuspension (50 µl Überstand) verwendet, wie sie bei anderen Arbeitsgruppen (z.B. Lu et al., 2002; Lindquist et al., 2002) beschrieben wurden.

5.4.2 Western-Blot

Nachdem die gewonnenen Fabs mittels ELISA auf Spezifität gegenüber dem verwendeten antigenen TRP-Peptid getestet wurden, folgten nun verschiedene Western-Blot-Analysen,

um diese Fabs weiter zu charakterisieren (siehe Kapitel 4.4.1). Folgende Fragen sollten damit beantwortet werden:

- Gegen welche Epitope der TRP-Peptide sind die Fabs gerichtet?
- Können die Vollängen-TRP-Proteine mit Hilfe der Fabs detektiert werden?

5.4.2.1 Bindungsverhalten der Fabs

In den Untersuchungen der Lysate TRP-Protein überexprimierender HEK-Zellen traten bei vielen Fab-Klonen unspezifische Bindungen auf. Diese äußerten sich als ein diffuses Muster aus Banden stärkerer und schwächerer Intensität. Eine Bande, die dem jeweiligen TRP-Protein entsprechen könnte (TRPM3: 187 kDa, TRPC4: 107 kDa) war nur schwach oder bei den meisten Klonen gar nicht sichtbar.

Eine mögliche Ursache dafür, dass die Fabs das Vollängen-TRP-Protein nicht bzw. unzureichend detektieren konnten, war möglicherweise eine zu geringe Fab-Konzentration in der Inkubationslösung. Diese wurde daher von 5 auf 10 µg/ml verdoppelt. Eine Konzentration von 10 µg/ml entspricht einer oft verwendeten Konzentration für den Einsatz von Fabs im Western-Blot in der Literatur (z.B. Weigel et al., 2010). Von einer zu geringen Proteinmenge auf der Nitrozellulose-Membran war auf Grund des starken Signals der Positivkontrolle nicht auszugehen (siehe Kapitel 4.4.1.1, Abbildung 39).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den fehlenden Proteinnachweis im Western-Blot mittels Fabs könnten die verwendeten reduzierenden Bedingungen durch Verwendung von β -Mercapto-Ethanol-haltigem Puffer darstellen. So gewannen Mutuberria et al. (2004) Fabs, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen Antigenbanden im Western-Blot nachweisen konnten. Dies gelang jedoch nicht unter reduzierenden Bedingungen. Dieses Bindungsverhalten wurde durch Bindung der Fabs an Epitope, die durch Aufbrechen der Disulfidbrücken verändert wurden, begründet. Dieses Phänomen wurde auch von Roovers et al. (2001a, 2001b) beschrieben, die Antikörperfragmente gegen epitheliale Zelladhäsionsmoleküle generierten.

Insgesamt waren die gewonnenen Fabs in Sensitivität und Spezifität früheren mono- und polyklonalen Antikörpern, die in der Arbeitsgruppe um Flockerzi entwickelt wurden, unterlegen. Die Gründe für dieses Verhalten könnten in folgenden Punkten liegen: Zum einen ist bekannt, dass die ausgewählte antigene Region eines Antikörpers Einfluss auf dessen Bildung, Sensitivität und Spezifität hat (Meissner et al., 2010). Während die bisherigen AK gegen Proteinabschnitte im Bereich des N- oder C-Terminus gerichtet waren, wurden die gewonnenen Fabs gegen Bereich des S4-S5 Linkers bzw. der E3-Schleife gerichtet. Zum an-

deren sind polyklonale Antikörper auf Grund der Tatsache, dass sie eine Mischung aus verschiedenen Antikörpern darstellen, gegen mehrere Epitope gerichtet. Es bestehen somit mehrere potenzielle Angriffspunkte für die polyklonalen Antikörper gegenüber den Fabs, wodurch sich die höhere Signalintensität erklären lässt. Des Weiteren besteht ein vollständiges Immunglobulin (Positivkontrollen) aus zwei Antigenbindungsstellen und besitzt damit doppelt so viele Bindungsstellen wie ein Fab-Antikörper. Dies erklärt ihre höhere Avidität (Abbas et al., 2003). Im Rahmen fortführender Arbeiten könnten somit Western-Blot-Experimente durchgeführt werden, bei denen nicht einzelne Fabs als Antikörper eingesetzt werden, sondern eine Antikörperlösung, in der gleichzeitig mehrere Fabs gegen dasselbe Antigen enthalten sind (Seite 365 in Harlow und Lane, 1988). Dadurch, dass diese unterschiedliche Epitope erkennen, steigen sowohl Affinität als auch Signalintensität.

Mittels Immunpräzipitation wurden die TRP-Proteine M3 und C4 angereichert. Anschließend erfolgte deren Nachweis mit den Fabs P1C10 (TRPM3) und P3A8 (TRPC4). Ohne Anreicherung der TRP-Proteine, zeigten die Fabs im konventionellen Western-Blot ein unspezifisches Bandenmuster. Da sich dieses Bandenmuster sowohl bei aufgetragenen Proteinmengen von 50 als auch 200 µg in seiner Intensität unverändert zeigte, ist davon auszugehen, dass die Fähigkeit der Fabs zur Bindung an die TRP-Proteine nicht von der aufgetragenen Proteinmenge abhängig war. Generell ist das unspezifische Bindungspotenzial eines Fab-Antikörpers umso größer, je weniger affin der Bindungspartner erkannt wird und je höher die strukturelle Ähnlichkeit von spezifischem und unspezifischem Antigen ist. Aus den Immunpräzipitationsversuchen (siehe Kapitel 4.4.1.3) lässt sich folgern, dass die Fabs nach verstärkter Anreicherung der TRP-Proteine diese erkennen und binden konnten. So wäre es möglich, dass die Fabs lediglich unspezifisch an sämtliche Proteine binden. Da nach IP nur noch TRPM3 bzw. TRPC4 vorhanden sein sollte, wären diese die einzig verbleibenden Bindungspartner für die Fabs. Um diesen Erklärungsansatz zu überprüfen, könnten neben den Negativkontrollen mit untransfizierten HEK293-Zellen auch Immunpräzipitationen von HEK293-Zellen, die ein anderes TRP-Protein überexprimieren, verwendet werden. Würde beispielsweise ein gegen TRPM3 gerichteter Fab angereichertes TRPC4-Protein genauso detektieren wie das angereicherte TRPM3-Protein, könnte von einer unspezifischen Bindung ausgegangen werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Bindungsverhalten wäre, dass die Fabs vor und nach IP die TRPM3- bzw. TRPC4-Peptide spezifisch, jedoch mit so geringer Sensitivität erkennen, dass das Signal vor der Immunpräzipitation so schwach war, dass es sich nicht von den unspezifischen Hintergrundsignalen abheben konnte.

Von einer schwachen, aber spezifischen Bindung an die TRP-Kanäle ausgehend, könnte eine affinere Bindung eventuell durch Quervernetzung der gewonnenen Fabs bewirkt werden. Bei den von Frederickson et al. (2006) entwickelten Fabs gegen den cMpl-Thrombopoietin-Rezeptor konnte mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden, dass die ebenfalls durch Phagen-Display gewonnenen Fabs spezifisch an den cMpl-Rezeptor binden. Eine Rezeptoraktivierung erfolgte jedoch erst, nachdem die Fabs mit Hilfe eines Zweitantikörpers quervernetzt wurden. Mijares et al. (2000) entwickelten Fab-Antikörper gegen den β 2-Adrenorezeptor. Sie gewannen die Antikörperfragmente durch Papain-Verdau eines zuvor etablierten monoklonalen Antikörpers, der einen nachgewiesenen aktivierenden Effekt auf den Rezeptor zeigte. Die von ihnen gewonnenen Fabs hatten zunächst keinen Effekt auf den β -Adrenorezeptor im Sinne einer Inotropiemodulation. Nach Quervernetzung der einzelnen Fab-Fragmente mittels anti-Maus IgG stieg die Herzfrequenz genauso stark an, wie nach Zugabe eines etablierten monoklonalen Antikörpers (Mijares et al., 2000). Kettritz et al. (1996) untersuchten Antikörper, die eine Ausschüttung von Superoxid bei neutrophilen Granulozyten bewirken. Während die aus etablierten monoklonalen Antikörpern durch Papain-Verdau gewonnenen Fabs zwar an die Zelloberflächen banden, aber keine Superoxid-Ausschüttung bewirkten, beschrieben sie diese Wirkung nach einer Quervernetzung der Fabs mittels anti-human IgG (F(ab)₂) sowie nach Quervernetzung von biotinylierten Fabs mittels Avidin.

In weiteren Untersuchungen könnte somit getestet werden, ob eine Quervernetzung der gegen die TRP-Kanäle gerichteten Fabs untereinander gegenüber den Fab-Monomeren eine höhere Affinität der Fabs gegenüber dem entsprechenden TRP-Proteinen bewirkt. Neben der dadurch resultierenden Erhöhung der Zahl der Antigenbindungsstellen, die zu besserer Spezifität und Sensitivität führen können, wäre es möglich, durch Vernetzung verschiedener Klone bispezifische Antikörper mit erhöhter Affinität zu generieren.

Da die Sequenz der Antikörperfragmente – insbesondere ihrer CDR-Regionen, die für die Antigenvariabilität zuständig sind – bekannt ist, könnte man durch gezielte Änderungen in diesem Bereich versuchen, eine Affinitätssteigerung herbeizuführen (Tuteja et al., 1999). So erhielten Tao et al. (2008) durch gezieltes Ändern einzelner Aminosäuren der CDR3-Regionen teilweise ein affineres Bindungsverhalten im ELISA bei den von ihnen untersuchten Fabs.

5.4.2.3 Antigenepitope der Fabs

Zur weiteren Charakterisierung der Fabs wurden Peptid-Spot-Analysen durchgeführt, um die minimal benötigten Epitope der Fabs für deren Bindung zu bestimmen. Einige Klone zeigten keine Bindung oder nur Bindungen an einen einzigen Peptid-Spot.

Wie in 5.2 beschrieben, liegt die minimal benötigte Epitoplänge eines Antikörpers bei etwa sechs bis zwölf Aminosäuren (Albert et al., 2003). Allerdings gibt es auch Antikörper, deren Epitope länger sind. So beschrieb die Arbeitsgruppe um Albert die benötigte Epitoplänge von Antikörpern, die gegen globuläre, also stark gefaltete, Proteine gerichtet sind, mit bis zu 15 AS Länge. Prasad et al. (1993) zeigten, dass sich diskontinuierliche Epitope aus 13-19 Aminosäuren zusammensetzen können. Da die aufgetragenen Peptid-Spots nur eine Länge von zehn AS hatten, ist es möglich, dass den Fabs nicht das komplette benötigte Epitop präsentiert wurde, das sie für eine Bindung an das entsprechende Antigen benötigt hatten.

Eine andere Ursache für das schlechte Bindungsverhalten der Fabs in der Peptid-Spot-Analyse könnte in der Sekundär- oder Tertiärstruktur der Peptide liegen. Während die aufgetragenen Peptid-Spots nur aus einer kurzen Sequenz von zehn Aminosäuren bestehen, wäre es möglich, dass die zur Selektion der Fabs verwendeten Peptide eine Sekundär- oder Tertiärstruktur ausbildeten, die für das Bindungsverhalten der Fabs ausschlaggebend war.

Neben dem schwachen Bindungsverhalten war ebenso zu beobachten, dass manche Fabs nur an einen einzelnen Peptid-Spot banden. Neben der Möglichkeit, dass es sich hierbei um unspezifische Bindungsphänomene handelt, ist es vorstellbar, dass es sich bei den erkannten zehn Aminosäuren exakt um das minimal benötigte Epitop des gebundenen Fabs handelt, da die benachbarten Peptid-Spots nur um eine Aminosäure verschoben waren. Um diesen Erklärungsansatz zu untersuchen, könnten weitere Experimente durchgeführt werden, bei denen längere Sequenzen der gespotteten Peptide herangezogen werden könnten.

5.4.2.3 Vergleich zwischen ELISA- und Western Blot-Ergebnissen

Während die durchgeführten ELISA-Untersuchungen viele TRP-spezifische Fabs hervorbrachten, detektierten im Western-Blot nur wenige Klone die TRP-Proteine. Dieser vermeintliche Widerspruch könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Antigene unterschiedlich präsentiert werden.

Für die ELISA-Untersuchungen wurden diejenigen synthetischen Peptide verwendet, die auch für das Screening der Phagenbibliothek eingesetzt wurden. Im Western-Blot hingegen wurden Lysate von HEK293-Zellen aufgetragen, die das TRP-Vollängenprotein exprimierten. Durch die Expression der TRP-Proteine in HEK293 Zellen wäre es möglich gewesen,

dass sie sich durch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung, Hydroxylierung oder Proteolyse von den synthetischen Proteinen unterscheiden. So besitzt z.B. TRPC5 eine vorhergesagte Glykosylierungsstelle (Uniprot Accessionnummer Q9UL62), TRPC4 vier vorhergesagte Phosphorylierungsstellen (Uniprot Accessionnummer Q9UBN4).

5.5 Schlussfolgerung

Mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie lassen sich auf einfache Weise identisch reproduzierbare Antikörperfragmente gegen TRP-Kanäle gewinnen. Die einzelnen Klone, die für diese Arbeit verwendet wurden, ließen sich mittels Metallionenaффinitätschromatographie oder Säulenauffreinigung in großen Mengen aufreinigen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Antikörperfragmente selektioniert werden, die TRP-Peptide mit Sequenzabschnitten im Bereich der E3-Schleife und des S4-S5-Linkers auf Proteinebene (mit den Techniken ELISA und Immunpräzipitation) erkannten. Diese Fabs konnten die antigenen TRPM3- und TRPC4-Peptide im ELISA und nach Immunpräzipitation, nicht aber mittels zellfärbender Methoden nachweisen. Bei der Peptid Spot-Analyse stellten sich minimal benötigte Epitope der Fabs von drei bis zehn Aminosäuren Länge heraus.

Die Charakterisierung des Bindungsverhaltens konnte mit Hilfe einer implementierten Strategie möglichst effizient gestaltet werden. Durch eine schrittweise Selektion TRP-spezifischer Fabs von einer Untersuchung zur nächsten, konnten nach und nach die „besten Binder“ gefunden werden. Es erwies sich als sinnvoll, zunächst das Bindungsverhalten im ELISA zu untersuchen und anschließend an Hand der Peptid-Spot-Analyse weitere weniger spezifische Fabs auszuschließen, um die Zahl der verbleibenden Fabs für die Western-Blot-Untersuchungen und immunzytochemischen Analysen immer weiter einzuschränken.

Weitere detaillierte Informationen über die Charakteristika der Fabs ließen sich in zukünftigen, fortführenden Experimenten auch mittels elektrophysiologischen Untersuchungen erzielen. Hierzu könnten Patch-Clamp-Versuche durchgeführt werden, bei denen die Fabs über die Patch-Pipette in den Intrazellularraum gelangen könnten. Da die Größe eines Antikörpers limitierend für dessen Diffusionsgeschwindigkeit (Pusch und Neher, 1988) ist, besitzen die Fabs für dieses Experiment im Vergleich zu vollständigen Immunglobulinen, die ein dreimal größeres Molekulargewicht besitzen, einen entscheidenden Vorteil. Anhand dieser Experimente könnte gemessen werden, welchen Effekt die Fabs auf die Kanalaktivität hätten. Da kalziumpermeable TRP-Kanäle für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit

ausgewählt wurden, wären ebenso Kalzium-Imaging-Untersuchungen wie z.B. Fura-2-Messungen möglich, um den Modulationseffekt der Fabs auf die Kanalaktivität zu untersuchen.



6. Literaturverzeichnis

1. **Abbas A, Lichtman A** (eds) (2003) *Cellular and Molecular Immunology*, 6th ed. Saunders, Philadelphia
2. **Aggarwal SK, MacKinnon R** (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺-channel. *Neuron* 16:1169-1177
3. **Albert T, Lange S, Oldenburg J, Graw J, Schramm W, Hanfland HH, Schwaab R** (2003) Charakterisierung von Faktor-VIII-Antikörperepitopen mit Faktor-VIII-Peptid-Bibliotheken. *Hämostaseologie* 23:13-17
4. **Ames RS, Tornetta MA, Deen K, Jones CS, Swift AM, Ganguly S** (1995) Conversion of murine Fabs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins. *J Immunol Methods* 184:177-186
5. **Amiri H, Schultz G, Schäfer M** (2003) FRET based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium* 33:463-470
6. **Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, Hikita I, Suzuki M, Oshima I, Tsukahara K, Arimura A, Horikawa T, Hirasawa T, Sakata T** (2006) Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol* 126:2664-2672
7. **Avrameas S, Guilbert B** (1971) A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol* 1:394-396
8. **Becker EB, Oliver PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, Hardy A, Nolan PM, Fisher EMC, Davies KE** (2009) A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *PNAS* 106:6706-6711
9. **Bergès H, Joseph-Liauzu E, Fayet O** (1996) Combined effects of the signal sequence and the major chaperone proteins on the export of human cytokines in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62:55-60
10. **Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
11. **Blum P, Velligan M, Lin N, Matin A** (1992) DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Biotechnology (NY)* 10:301-304
12. **Bowden GA, Paredes AM, Gergiou G** (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* 9:725-730
13. **Bradbury ARM, Cattaneo A** (1995) The use of phage display in neurobiology. *Trends Neurosci* 18:243-249
14. **Bradbury ARM, Velappan N, Verzillo V, Ovecka M, Chasteen L, Sblattero D, Marzari R, Lou J, Siegel R, Pavlik P** (2003) Antibodies in proteomics I: generating antibodies. *Trends Biotechnol* 21:275-81

15. **Bradbury ARM, Marks JD** (2004) Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods* 290:29-40
16. **Breitling F, Dübel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M** (1991) A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104: 147-53
17. **Brenner S, Stretton A** (1964) The amber mutation. *J Cell Physiol* 64:43-49
18. **Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE** (1995) Analysis of the heavy chain repertoire human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol* 155:190-202
19. **Burnette WN** (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203
20. **Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D** (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313
21. **Chaconas G, van de Sande JH** (1980) 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* 65:75-85
22. **Chaga G, Bochkariov DE, Jokhadze GG, Hopp J, Neslon P** (1999) Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose. *J Chromatogr A* 864:247-256
23. **Chen W, Zhu Z, Feng Y, Xiao X, Dimitrov DS** (2008) Construction of a large phage-displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain. *J Mol Biol* 382:779-789
24. **Chioni AM, Fraser SP, Pani F, Foran P, Wilkin GP, Diss JK, Djamgoz MB** (2005) A novel polyclonal antibody specific for the Na_v1.5 voltage-gated Na⁺-channel "neonatal" splice form. *J Neurosci Methods* 147:88-98
25. **Chuang HH, Neuhausser WM, Julius D** (2004) The super coiling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* 43:856-869
26. **Chung CT, Niemela SL, Miller RH** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2172-2175
27. **Cloutier SM, Couty S, Terskikh A, Marguerat L, Crivelli V, Pugnieres M, Mani JC, Leisinger HJ, Mach KP, Deperthes D** (2000) Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display selected scFV fragments on streptavidin. *Mol Immunol* 37:1067-1077

28. **Collis AVJ, Brouwer AP, Martin ACR** (2003) Analysis of the antigen combining Site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol* 325:337-354
29. **Corbett SJ, Tomlinson IM, Sonnhammer DB, Winter G** (1997) Sequence of the human immunoglobulin diversity segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, minor D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* 270:587-597
30. **Cosens DJ, Manning A** (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285-287
31. **Davies DR, Cohen GH** (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7-12
32. **de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, de Bruïne AP, Arends JW, Hoogenboom HR** (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* 274:18218-18230
33. **de Kruijff J, Boel E, Logtenberg T** (1995) Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J Mol Biol.* 248:97-105
34. **Della-Penna D, Christoffersen RE, Bennett AB** (1986) Biotinylated proteins as molecular weight standards on Western blots. *Anal Biochem* 152:329-332
35. **Denkberg G, Cohen CJ, Lev A, Chames P, Hoogenboom HR, Yoram R** (2002) Direct visualization of distinct T cell epitopes derived from a melanoma tumor-associated antigen by using human recombinant antibodies with MHC-restricted T cell receptor-like specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9421-9426
36. **Dodier Y, Banderali U, Klein H, Topalak O, Dafi O, Simoes M, Bernatchez G, Sauve R, Parent L** (2004) Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis. *J Biol Chem* 279: 6853-6862
37. **Dübel S, Breitling F, Fuchs P, Braunagel M, Klewinghaus I, Little M** (1993) A family of vectors for surface display and production of antibodies. *Gene* 128: 97-101
38. **Dübel S, Breitling F** (1997) *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
39. **Dugaiczuk A, Boyer HW, Goodman HM** (1975) Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 96:171-84
40. **Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Ginsburg D** (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 191: 396-400
41. **Engvall E, Perlmann P** (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874

42. **Fahnert B, Lilw H, Neubauer P** (2004) Inclusion bodies: formation and utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89:93-142
43. **Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, Hudson DV, Harding F, Bernhard SL, Jones D, Kay RM, Higgins KM, Schramm SR, Lonberg N** (1996) High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol* 14:845-851
44. **Flockerzi V** (ed) (2007) An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*:1-19. Springer, Berlin Heidelberg
45. **Frederickson S, Renshaw MW, Lin B, Smith LM, Calveley P, Springhorn J, Johnson K, Wang Y, Su X, Shen Y, Bowdish K** (2006) A rationally designed agonist antibody fragment that functionally mimics thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14307-14312
46. **Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B** (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3:121-127
47. **Fuglsang A** (2003) The effective number of codons for individual amino acids: some codons are more optimal than others. *Gene* 320:185-190
48. **Gauss GH, Lieber MR** (1996) Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 16:258-269
49. **Gomez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knotgen H, Sanchez A, Hettmann T, Ossipov D, Wese loh R, Contreras-Jurado C, Rothe M, Stühmer W, Pardo LA** (2007) Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res* 67:7343-7349
50. **Gosling M, Poll C, Li S** (2005) TRP channels in airway smooth muscle as therapeutic targets. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:277-284
51. **Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby W, Kontermann E, Jones PT, Low NM, Allison TJ, Prospero TD, Hoogenboom HR, Nissim A, Cox JPL, Harrison JL, Zaccolo M, Gheradi E, Winter G** (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 13:3245-3260
52. **Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J** (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22:346-353
53. **Guthrie C, Fink GR, Abelson JN, Simon MI** (eds) (2004) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Part A*. In *Methods in Enzymology Series*, 194. Elsevier Academic Press, San Diego
54. **Hardie RC, Minke B** (1992) The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643-651

55. **Hardie RC, Minke B** (1993) Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci* 16:371-376
56. **Hardie RC, Raghu P, Moore S, Juusola M, Baines RA, Sweeny ST** (2001) Calcium influx via TRP channels is required to maintain PIP₂ levels in Drosophila photoreceptors. *Neuron* 30:149-159
57. **Harlow E, Lane D** (eds) (1988) *Antibodies: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
58. **Harteneck C, Plant TD, Schultz G** (2000) From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 23:159-166
59. **Held G, Matsuo M, Epel M, Gnjjatic S, Ritter G, Lee YS, Tai TY, Cohen CJ, Old LJ, Pfreundschuh M, Reiter Y, Hoogenboom HR, Renner C** (2004) Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHCspecific antibody fragments. *Eur J Immunol* 34:2919-2929
60. **Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA** (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234:108-17
61. **Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R, Stüber D** (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology* 6:1321-1325
62. **Hoenderop JGJ, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJM** (2003) Homo- and hetero-tetrameric structure of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22:776-785
63. **Hoogenboom HR, Griffiths A, Johnson K, Chiswell D, Hudson D, Winter G** (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19:4133-4137
64. **Hoogenboom HR, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC** (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4:1-20
65. **Hoogenboom HR, Chames P** (2000) Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today* 21:371-378
66. **Houshmand H, Fröman G, Magnusson G** (1999) Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. *Anal Biochem* 268:363-70
67. **Hoyer-Hansen G, Hamers MJ, Pedersen AN, Nielsen HJ, Brunner N, Dano K, Stephens RW** (2000) Loss of ELISA specificity due to biotinylation of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 235:91-99
68. **Huang C, Stewart AK, Schwartz RS, Stollar BD** (1992) Immunoglobulin heavy chain gene expression peripheral blood B lymphocytes. *J Clin Invest* 89:1331-1343

69. **Hust M, Dübel S** (2005) Phage display vectors for the in-vitro generation of human antibody fragments. *Methods Mol Biol* 295:71-96
70. **Ikemura T** (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J Mol Biol* 151:389-409
71. **Ikemura T** (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 2:13-34
72. **Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurrek J, Hucho F** (2001) Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur J Biochem* 268:5489-5496
73. **Jakobovitz A** (1995) Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 6:561-566
74. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M** (eds) (2002) *Immunologie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
75. **Jespersen L, Messens J, Keyser A, Eeckhout, D, Van Den Brande I, Gansemans J, Lauwereys M, Vlasuk, M Stanssens P** (1995) Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology (NY)* 13:378-38
76. **Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2002) Crystal structure a mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522
77. **Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺-channel. *Nature* 423:33-41
78. **Johnson G, Wu TT** (2000) Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res* 28:214-218
79. **Jordt SE, Julius D** (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108:421-430
80. **Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C** (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, vol 1, 2, 3, U.S. Department of Health and Human services
81. **Kadei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM** (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276:28613-28619
82. **Karlsson F, Borrebaeck CA, Nilsson N, Malmberg-Hager AC** (2003) The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TOLA and phage protein 3 domain. *J Bacteriol* 185:2628-2634
83. **Kettritz R, Jennette JC, Falk RJ** (1996) Crosslinking of ANCA-Antigens stimulates superoxide release by human neutrophils. *J Am Soc Nephrol* 8:386-94

84. **Klionsky L, Tamir R, Holzinger B, Bi X, Talvenheimo J, Kim H** (2006) A polyclonal antibody to the prepore loop of transient receptor potential vanilloid Type 1 blocks channel activation. *J Pharmacol Exp Ther* 319:192-198
85. **Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhöfer G, Hoess A, Wölle J, Plückthun A, Virnekäs B** (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296:57-86
86. **Köhler G, Milstein C** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497
87. **Kyte J, Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132
88. **Knippers R** (ed) (2006) Molekulare Genetik. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
89. **Laemmli U** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
90. **Lee S, Yoon GS, Yoo ES, Kwon TG, Kim IS, Lee BH** (2009) *Application of Phage Display to Discovery of Tumor-Specific Homing Peptides: Developing Strategies for Therapy and Molecular Imaging of Cancer*. In: Inflammation and Cancer, Methods in Molecular Biology (ed Kozlov SV), 512:355-363
91. **Le Franc MP** (2003) IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Novartis Found Symp* 254:1528-2511
92. **Lei SP, Lin HC, Wang SS, Callaway J, Wilcox G.** (1987) Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol* 169:4379-4383
93. **Li YD, Li YQ, Chen JS, Dong HJ, Guan WJ, Zhou H** (2006) Whole genome analysis of non-optimal codon usage in secretory signal sequences of *Streptomyces coelicolor*. *Bio-systems* 85:225-230
94. **Liao YJ, Safa P, Chen YR, Sobel RA, Boyden ES, Tsien RW** (2008) Anti-Ca²⁺ channel antibody attenuates Ca²⁺ currents and mimics cerebellar ataxia in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2705-2710
95. **Lindquist EA, Marks JD, Kleba BJ, Stephens RS** (2002) Phage-display antibody detection of *Chlamydia trachomatis*-associated antigens. *Microbiology* 148:443-451
96. **Lindskog M, Rockberg J, Uhlén M, Sterky F** (2005) Selection of protein epitopes for antibody production. *Biotechniques* 38:723-727
97. **Löffler G, Petrides PE** (eds) (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg
98. **Lonberg N, Huszar D** (1995) Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 13:65-93

99. **Long SB, Campbell EB, Mackinnon R** (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺-channel. *Science* 309:897-903
100. **Lowman HB, Wells JA** (1993) Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J Mol Biol* 234:564-578
101. **Lowman HB** (1997) Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26:401-424
102. **Lu D, Jimenez X, Zhang H, Bohlen P, Witte L, Zhu Z** (2002) Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. *Int J Cancer* 97:393-399
103. **Lubkowski J, Hennecke F, Pluckthun S, Wlodawer A**, (1999) Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of To-1A. *Struct Fold Des* 7:711-722
104. **Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D** (2009) *Der Experimentator Immunologie*, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
105. **MacCallum RM, Martin ACR, Thornton JM** (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* 262:732-745
106. **Makrides SC** (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60:512-538
107. **Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G** (1991) Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222:581-597
108. **Maruyama Y, Ogura T, Mio K, Kiyonaka S, Kato K, Mori Y, Sato C** (2007): Three dimensional reconstruction using transmission electron microscopy reveals a swollen, bell-shaped structure of transient receptor potential melastatin type 2 cation channel. *J Biol Chem* 282:36961-36970
109. **Mathar I, Vennekens R, Meissner M, Kees F, van der Mieren G, Camacho Londoño JE, Uhl S, Voets T, Hummel B, van den Bergh A, Herijgers P, Nilius B, Flockerzi V, Schweda F, Freichel M** (2010) Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice. *J Clin Invest* 120:3267-3279
110. **Maxam AM, Gilbert W** (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 65:499-560
111. **McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ** (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348:552-554
112. **McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dalaire BK** (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for re-

- lapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16:2825-2833
113. **Meissner M, Obmann VC, Hoschke M, Link S, Jung M, Held G, Philipp SE, Zimmermann R, Flockerzi V** (2011) *Lessons of studying TRP channels with antibodies*. In: "TRP channels" CRC methods in signal transduction series (ed Zhu MX) CRC Press, New York
114. **Mijares A, Lebesgue D, Wallukat G, Hoebeke J** (2000) From Agonist to Antagonist: Fab Fragments of an Agonist-Like monoclonal Anti- β 2-Adrenoceptor Antibody behave as Antagonists. *Molecular Pharmacology* 58:373-379
115. **Mikawa YG, Maruyama IN, Brenner S** (1996) Surface display of proteins on bacteriophage lambda heads. *J Mol Biol* 262:21-30
116. **Minke B, Wu CF, Pak WL** (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258:84-87
117. **Mio K, Ogura T, Kiyonaka S, Hiroaki Y, Tanimura Y, Fujiyoshi Y, Mori Y, Sato C** (2007): The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas, *J Mol Biol* 367:73-383
118. **Moiseenkova-Bell VY, Stanciu LA, Serysheva II, Tobe BJ, Wensel TG** (2008): Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7451-7455
119. **Möller C, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, Pippin JW, Rastaldi MP, Wawersik S, Schiavi S, Henger A, Kretzler M, Shanklnad SJ, Reiser R** (2007) Induction of TRPC6 Channel in Acquired Forms of Proteinuric Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 18:29-36
120. **Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin GM** (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230:1040-1043
121. **Montell C, Rubin GM** (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323
122. **Munro S, Pelham HR** (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46:291-300
123. **Murray V** (1989) Improved Double-Stranded DNA Sequencing Using the Linear Polymerase-Chain-Reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 8889
124. **Mutuberría R, Satijn S, Huijbers A, van der Linden E, Lichtenbeld H, Chames P, Arends JW, Hoogenboom HR** (2004) Isolation of human antibodies to tumor-associated endothelial cell markers by in vitro human endothelial cell selection with phage display libraries. *J Immunol Methods* 287:31-47
125. **Naylor J, Milligan CJ, Zeng F, Jones C, Beech DJ** (2008) Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Br J Pharmacol* 155:567-573

126. **Neumann F, Sturm C, Hülsmeier M, Dauth N, Guillaume P, Luescher IF, Pfreundschuh M, Held G** (2009) Fab antibodies capable of blocking T cells by competitive binding have the identical specificity but a higher affinity to the MHC-peptide-complex than the T cell receptor. *Immunol Lett* 125:86-92
127. **Nilius B, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Wang C, Zhu MX, Voets T** (2005a) The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 280:22899-22906
128. **Nilius B, Voets T, Peters J** (2005b) TRP channels in disease. *Sci STKE* 295:8
129. **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* 13:692-698
130. **O'Brien P, Aitken R** (eds) (2002) *Antibody Phage Display*. Humana Press, Totowa, New Jersey
131. **Ohlin M, Borreback CA** (1996) Characteristics of human antibody repertoires following active immune responses *in vivo*. *Mol Immunol* 33:583-592
132. **Ohlin M, Zoulai M** (2003) The human antibody repertoire to infectious agents: implications for disease pathogenesis. *Mol Immunol* 40:1-11
133. **Orum H, Andersen PS, Oster A, Johansen LK, Riise E, Bjørnvad M, Svendsen I, Engberg J** (1993) Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. *Nucleic Acids Res* 21:4491-4498
134. **Pap T** (2010) Aktuelle Trends in Design und Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Entzündungsmediatoren zur Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol* 69:73-78
135. **Parrott MB, Adams KE, Mercier GT, Mok H, Campos SK, Barry MA** (2003) Metabolically biotinylated adenovirus for cell targeting, ligand screening and vector purification. *Mol Ther* 8:688-700
136. **Peabody D** (1989) Translation initiation at Non-AUG Triplets in Mammalian Cells. *J Biol Chem* 264:5031-5035
137. **Pedronzani A, Arnoldi F, López-Requena A, Burrone OR** (2008) In vivo site-specific biotinylation of proteins within the secretory pathway using a single vector system. *BMC Biotechnol* 8:41
138. **Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Drago- ni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A** (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and mentol. *Cell* 108:705-715
139. **Perelson AS, Oster GF** (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol* 81:645-670

-
140. **Phillips AM, Bull A, Kelly LE** (1992) Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8:631-642
141. **Prasad L, Sharma S, Vandonselaa, M, Quail JW, Lee JS, Waygood EB, Wilson K, Dauter Z, Delbaere L** (1993) Evaluation of Mutagenesis for Epitope Mapping. Structure of an antibody-protein antigen complex. *J Biol Chem* 268:10705-10708
142. **Porath J** (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 3:263-281
143. **Pusch M, Neher E** (1988) Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Arch* 411:204-211
144. **Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P** (1981) Structure of the human immunoglobulin μ locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 27:583-591
145. **Reaves BJ, Wolstenholme AJ** (2007) The *TRP* channel superfamily: insights into how structure, protein-lipid interactions and localization influence function. *Biochem Soc Trans* 35:77-80
146. **Roovers RC, van der Linden E, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR** (2001a) Identification of colon tumor-associated antigens by phage antibody selections on primary colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 37:542-9
147. **Roovers RC, van der Linden E, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR** (2001b) In vitro characterisation of a monovalent and bivalent form of a fully human anti Ep-CAM phage antibody. *Cancer Immunol Immunother* 50:51-9
148. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91
149. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (eds) (1989) *Molecular Cloning - a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
150. **Sambrook J, Russell D** (eds) (2001) *Molecular Cloning - a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
151. **Sanger F, Nicklen S, Coulson A** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
152. **Sanz J** (1991) Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 147:1720-1729
153. **Sblattero D, Bradbury A** (2000) Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18:75-80
154. **Schatz PJ** (1993) Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* 11:1138-1143

155. **Schein CS, Noteborn MHM** (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nat Biotechnol* 6:291-294
156. **Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M** (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 31:166-170
157. **Schmiedl A, Dübel S** (2004) *Rekombinante Antikörper & Phagen-Display*. In: Molekulare Biotechnologie (Ed Wink M). Wiley-VCH, Weinheim p. 511-542
158. **Schroeder HW, Wang JY** (1990) Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6146-6150
159. **Scott J, Smith G** (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249:386-390
160. **Seoh SA, Sigg D, Papazia DM, Bezanilla F** (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker, K⁺-channel. *Neuron* 16:1159-1167
161. **Skerra A, Plückthun A** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240:1038-1041
162. **Sharp PA, Sugden B, Sambrook J** (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12:3055-3063
163. **Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, Hemingsen G, Wong C, Gerhart JC, Marks JD** (1998) Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6157-6162
164. **Shirai H, Kidera A, Nakamura H** (1999) H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Letters* 455:188-197
165. **Sgaramella V, van de Sande JH, Khorana HG** (1970) Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 67:1468-75
166. **Smith GP** (1985) Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317
167. **Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenanzo M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
168. **Söderlind E, Strandberg L, Jirholt P, Kobayashi N, Alexeiva V, Aberg AM, Nilsson A, Jansso B, Ohlin M, Wingren C, Danielsson L, Carlsson R, Borrebaeck CA** (2000) Recombining

- germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18:852-856
169. **Stewart AP, Egressy K, Lim A, Edwardson JM** (2010) AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPM8 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 394:383-386
170. **Studier FW, Moffatt B**, (1986) Use of Bacteriophage T-7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J Mol Biol* 189:113-130
171. **Sweeny M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Lapp BR, Zhao Y, Thistlethwaite PA, Yuan JX** (2002) Role of capacitative Ca^{2+} entry in bronchial contraction and remodeling. *J Appl Physiol* 92:1594-1602
172. **Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY** (2005) How far will you go to sense voltage? *Neuron* 48:719-725
173. **Tonegawa S** (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581
174. **Tonegawa S** (1988) Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 8:3-26
175. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354
176. **Tuteja R** (1999) B-cell responses to a peptide epitope: mutations in heavy chain alone lead to maturation of antibody responses. *Immunology* 97:1-8
177. **Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L** (1998) The membrane Topology of Human Transient Receptor Potential 3 as Inferred from Glycosylation-scanning Mutagenesis and Epitope Immunocytochemistry. *J Biol Chem* 273:8675-8679
178. **Vargas-Madrado E, Lara-Ochao F, Almagro JC** (1995) Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulins suggests strong geometrical restrictions associated to the mechanism of immune recognition. *J Mol Biol* 254:497-504
179. **Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS** (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 14:309-14
180. **Vieira J, Messing J** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153:3-11
181. **Voets T, Nilius B** (2003) The pore of TRP channels: trivial or neglected. *Cell Calcium* 33:5-6, 299-302
182. **Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B** (2004) Outer pore architecture of a Ca^{2+} selective TRP channel. *J Biol Chem*. 279:15223-15230
183. **Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B** (2007) Trpm8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol*. 3:174-182

184. **Wagner SD, Neuberger MS** (1996) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 14:441-457
185. **Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsoia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R, Sheffield VC** (2002) Mutation of TRM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 31:171-174
186. **Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Pno K, Ito H** (2009) The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ J* 73:419-427
187. **Weigel I, Schulze G, Pischetsrieder M** (2010) Immunochemical detection of tissue from the central nervous system via myelin proteolipid protein: adaptation for food inspection and development of recombinant bivalent Fab mini-antibodies *J Agric Food Chem* 58:6587-6593
188. **Willemsen RA, Debets R, Hart E, Hoogenboom HR, Bolhuis RLH, Chames P** (2001) A phage display selected Fab fragment with MHC class I-restricted specificity for human MAGE-A1 allows for retargeting of primary human T-lymphocytes. *Gene Therapy* 8:1601-1608
189. **Williamson RA, Burioni R, Sanna PP, Partridge LJ, Barbas CF 3rd, Burton DR** (1993) Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:4141-4145
190. **Wilson IA, Stanfield RL** (1994) Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Cur Opin Struct Biol* 4:857-867
191. **Wu TT, Johnson G, Kabat EA** (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16:1-7
192. **Wu Y, Li Q, Chen X** (2007) Detecting protein-protein interactions by far western blotting. *Nature Protoc* 2:3278-3284
193. **Xiao R, Tian J, Tang J, Zhu M** (2008) The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active. *Cell Calcium* 43:334-343
194. **Xu S, Boulay G, Flemming R, Beech DJ** (2006) E3-targeted anti-TRPC5 antibody inhibits store-operated calcium entry in freshly isolated pial arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2653-H2659
195. **Xu S, Zeng F, Lei M, Li J, Gao B, Xiong C, Sivaprasadarao A, Beech DJ** (2005) Generation of functional ion-channel tools by E3 targeting. *Nat Biotechnol* 23:1289-1293
196. **Yamada M, Wasserman R, Reichard BA, Shane S, Caton AJ, Rovera G** (1991) Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity joining segments in adult human peripheral blood B lymphocytes. *J Exp Med* 173:395-407
197. **Yellen G** (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419:35-42

198. **Zebedee SL, Barbas CF 3rd, Hom YL, Caothien RH, Graff R, DeGraw J, Pyati J, LaPolla R, Burton DR, Lerner RA, Thornton GB** (1992) Human combinatorial antibody libraries to hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3175-3179
199. **Zemlin M, Klinger M, Link J, Zemlin C, Bauer K, Engler JA, Schroeder HW Jr, Kirkham PM,** (2003) Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J Mol Biol* 334:733-749
200. **Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ** (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293-301
201. **Zhou BY, Ma W, Huang XY** (1998) Specific antibodies to the external vestibule of voltage-gated potassium channels block current. *J Gen Physiol* 111:555-563



7. Publikationen/Danksagung

7.1 Publikationen

Meissner M, Obmann VC, Hoschke M, Link S, Jung M, Held G, Philipp SE, Zimmermann R, Flockerzi V (2011) Lessons of studying TRP channels with antibodies. In: "TRP channels" CRC methods in signal transduction series (ed. Michael X. Zhu) CRC Press, New York

Obmann V, Link S, Held G, Flockerzi V (2010) Recombinant Fab-antibodies for detection of TRP proteins; *Naunyn-Schmiedesberg's Arch Pharmacol* 381 (Suppl 1), 32:126

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und damit zu dieser Dissertationsarbeit einen wesentlichen Beitrag geleistet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi. Durch die Überlassung des Themas für diese Arbeit war es mir möglich, molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeitstechniken zu erlernen und Einblicke in die akutelle Forschung zu erlangen. Für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie für viele Hinweise und Ratschläge bin ich Herrn Prof. Flockerzi sehr dankbar.

Desweiteren möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Dr. Sabine Link für die Heranführung an das Thema und in die experimentellen Verfahrensweisen bedanken. Sie war jederzeit für mich ansprechbar und trug durch ihre kritischen Rückmeldungen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn PD Dr. Gerhard Held möchte ich ganz herzlich für die Kooperation danken. Ohne die Bereitstellung der Phagenbibliothek und die Unterstützung durch seine Arbeitsgruppe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Frau Birgit Bette und Frau Gabi Carbon danke ich für die Durchführung der Versuche zur Gewinnung der Fabs sowie für die Einführung in die Methodik zu deren Aufreinigung. In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh, dem Direktor des José-Carreras-Zentrums in Homburg, in dem diese Versuche stattgefunden haben.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern im Labor des Instituts für Klinische und Experimentelle Pharmakologie bedanken, die mir während meiner praktischen Arbeit bei Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Allen, die meine Arbeit unterstützt und stets meinen Ehrgeiz aufrecht erhalten haben gilt mein aufrichtiger und herzlicher Dank. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir durch ihren ständigen Rückhalt und ihre finanzielle Unterstützung mein Studium und diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Verena Obmann
Geboren am	09. Mai 1986 in Roth (Mittelfranken)
Anschrift	Graf-Siegfriedstraße 95 54439 Saarburg verenaobmann@gmx.net
Familienstand	Ledig

Ausbildung

Seit 10/2005	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
08/2010 - 07/2011	Praktisches Jahr am Bürgerspital Solothurn, Schweiz (Chirurgie) und am Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Wahlfach Radiologie und Innere Medizin)
12/2008 - 01/2010	Ganztägige Laborarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Flockerzi, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Homburg
09/2007 - 06/2008	Studium der Humanmedizin an der Université Lausanne im Rahmen des Austauschprogrammes ERASMUS
09/2007	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1996 - 2005	Staatliches Gymnasium Saarburg (Abschluss: Abitur)
SS 2004	Teilnahme an dem Projekt Früheinstieg ins Physikstudium (FiPS) an der Universität Kaiserslautern mit Erwerb des Scheines Experimentalphysik I
WS 2002/2003	Teilnahme an der Vorlesung „Zahlentheorie I“ an der Universität Trier und Erwerb des Übungsscheins
1992 - 1996	Grundschule St. Laurentius Saarburg

Praktika

08.02. - 07.03.2010	Famulatur: Abteilung für Radiologie, St. Vincenz-Krankenhaus, Paderborn
07.09. - 06.10.2009	Famulatur: Neurologische Klinik, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
01. - 31.08.2008	Famulatur: Allgemein-internistische Station, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Schweiz
01. - 31.07.2008	Famulatur: Pädiatrische Ambulanz, Hôpital d'Enfance (HEL), Lausanne, Schweiz
01. - 31.08.2006	Praktikum: Internistische Intensivstation, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Schweiz
03. - 16.04.2006	Praktikum: Institut für Pathologie, Trier
11.07. - 16.09.2005	Pflegepraktikum: Klinik für Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Schweiz
06.06. - 03.07.2005	Pflegepraktikum: Operative Intensivstation, Klinikum Bamberg
16.04. - 31.05.2005	Laborpraktikum: Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Universitätsklinikum Graz, Österreich

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Französisch	Fließend in Wort und Schrift <i>zertifiziert durch das Diplôme approfondi de la langue française</i>
Spanisch	Grundkenntnisse in Wort und Schrift
Latein	Latinum
