
**Evolutionäre Ansätze zur Affinitätsmaturierung von
Antikörper-Fragmenten durch das immunrelevante
Protein *Activation-induced Cytidine Deaminase***



Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation vorgelegt von
Dipl.-Biol. Alexander Maaß
aus Wachs

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar
Korreferent: Prof. Dr. Siegfried Neumann
Tag der Einreichung:
Tag der mündlichen Prüfung:

Darmstadt 2014

D 17



Berichte aus der Biochemie

Alexander Maaß

**Evolutionäre Ansätze zur Affinitätsmaturierung von
Antikörper-Fragmenten durch das immunrelevante
Protein *Activation-induced Cytidine Deaminase***

D 17 (Diss. TU Darmstadt)

Shaker Verlag
Aachen 2014

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Darmstadt, Techn. Univ., Diss., 2014

Copyright Shaker Verlag 2014

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-3058-7

ISSN 1434-5536

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem	4
1.1.1	Die adaptive Immunantwort	5
1.1.2	Antikörper	6
1.2	Entstehung und Anpassung von Antikörpern	9
1.2.1	VDJ Rekombination	9
1.2.2	Somatische Hypermutation (SHM)	11
1.2.3	<i>Activation-induced (Cytidine) Deaminase (AID)</i>	13
1.2.4	Uracil-DNA-Glykosylase (UNG)	16
1.3	Therapeutisch relevante Antigene	17
1.4	Zielsetzung	19
2	Materialien	20
2.1	Organismen	20
2.1.1	<i>Escherichia coli</i>	20
2.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.2	Plasmide	21
2.3	Oligodesoxyribonukleotide	26
2.4	DNA-Längenstandard und Protein-Molekulargewichtsmarker	30
2.4.1	DNA-Längenstandard für DNA-Elektrophorese	30
2.4.2	Molekulargewichtsmarker für Proteinelektrophorese	30
2.5	Antikörper, Proteine, Enzyme und Nukleinsäuren	31
2.6	Chemikalien	32
2.7	Sonstige Materialien und Geräte	35
2.8	Lösungen und Puffer	39
2.9	Nährmedien	45
3	Methoden	47
3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	47
3.1.1	Sterilisation der verwendeten Geräte und Lösungen	47
3.1.2	Lagerung von Mikroorganismen	47
3.1.3	Bestimmung der Zelldichte	47
3.1.4	Vermehrung von <i>Escherichia coli</i>	47
3.1.5	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	48
3.1.6	Phagenproduktion und Phagenfällung	48
3.1.7	Vermehrung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.1.8	Herstellung und Transformation elektro-ultrakompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen	49
3.1.9	Induktion der DNA-codierten Genexpression in <i>S. cerevisiae</i> Zellen	50
3.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	51
3.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
3.2.2	Präzipitation von DNA mittels Ammoniumacetat und Ethanol	53
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	53
3.2.4	Reinigung von DNA-Lösungen mittels Gel and PCR Clean-Up System-Kit (Promega)	54
3.2.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen mittels PCR Clean-Up System-Kit (Promega)	54

3.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Minipreps/Midiprep DNA System-Kits (Promega) ..54	54
3.2.7	Isolierung und Reinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform.....55	55
3.2.8	Bestimmung der Konzentration von DNA oder Protein in wässrigen Lösungen55	55
3.2.9	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen55	55
3.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten56	56
3.2.11	Hochdurchsatz-Sequenzierung - 454-Sequenzierung56	56
3.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden57	57
3.3.1	Proteinproduktion in <i>E. coli</i>57	57
3.3.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>57	57
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)58	58
3.3.4	Immunologische Detektion von Proteinen: <i>Western Blot</i>59	59
3.3.5	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)60	60
3.3.6	Dialyse von Proteinen61	61
3.3.7	Biotinylierung von Proteinen61	61
3.3.8	Lagerung von Proteinen62	62
3.4	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....62	62
3.4.1	Bestimmung der Mutationsrate in <i>S. cerevisiae</i>62	62
3.4.2	Oberflächenpräsentation & Immunfluoreszenznachweis auf <i>S. cerevisiae</i>64	64
3.4.3	Antigenbindung und Immunfluoreszenzmarkierung von <i>S. cerevisiae</i>66	66
3.4.4	Analyse oder Durchmusterung mittels fluoreszenzabhängige Zell-Durchflusszytometrie 66	66
4	Ergebnisse und Diskussion.....68	68
4.1	Grundlagenexperimente70	70
4.1.1	Klonierung von Genen für AID Varianten und Generierung eines <i>S. cerevisiae</i> EBY100 Δ UNG1 Hefestammes70	70
4.1.2	Bestimmung der Mutationsraten ausgewählter Mutatorproteine in <i>S. cerevisiae</i>72	72
4.1.3	Aufnahme einer Wachstumskurve und der Einfluss der Canavanin-Selektion auf die Mutationsrate von <i>S. cerevisiae</i> bei der Expression von AID.....74	74
4.1.4	Charakterisierung des AID (731 & 732) vermittelten DNA-Substratspektrum (<i>in vivo</i>) ..77	77
4.1.5	Diskussion81	81
4.2	AID732 vermittelte <i>semi in vivo</i> Generierung und Durchmusterung von anti-hEGFR Fab-Bibliotheken86	86
4.2.1	Maturierung von anti-hEGFR Fab-Fragmenten in <i>S. cerevisiae</i> CG379-3-29RL Δ UNG1 durch AID732 und Generierung einer Bibliothek in <i>S. cerevisiae</i> EBY10086	86
4.2.2	Durchmusterung der <i>semi in vivo</i> generierten anti-hEGFR Fab Bibliothek in <i>S. cerevisiae</i> EBY100 und Analyse von Einzelklonen90	90
4.2.3	Diskussion97	97
4.3	AID731 vermittelte <i>in vivo</i> Generierung und Durchmusterung von anti-EpCAM VNAR-Bibliotheken101	101
4.3.1	Maturierung und Durchmusterung von anti-EpCAM VNAR-Fragmenten in <i>S. cerevisiae</i> EBY100 durch AID731 <i>in vivo</i>101	101
4.3.2	Analyse von Einzelklone aus der Durchmusterung sowie 454-Sequenzierung der anti-EpCAM VNAR Bibliothek in <i>S. cerevisiae</i> EBY100 (AID731 <i>in vivo</i>)106	106
4.3.3	Diskussion114	114
4.4	AID731 vermittelte <i>in vitro</i> Generierung und Durchmusterung von Antikörper-Bibliotheken unter Verwendung von Doppelstrang-DNA120	120
4.4.1	Klonierung, Expression, Reinigung und Aktivitätsnachweis von His-AID731120	120



4.4.2	His-AID731 <i>in vitro</i> Generierung von DNA-Punktmutationen, Anreicherung über spezifische Oligonukleotidprimer und Isolierung der entsprechenden DNA zur Hochdurchsatz-Sequenzierung	126
4.4.3	Generierung, Durchmusterung und Einzelklon-Analyse einer anti-hEGFR Fab-Bibliothek in <i>S. cerevisiae</i> EBY100 nach <i>in vitro</i> His-AID731 dsDNA Behandlung.....	140
4.4.4	Diskussion.....	146
4.5	AID731 vermittelte <i>in vitro</i> Generierung und Durchmusterung von Antikörper-Bibliotheken unter Verwendung von Einzelstrang-DNA.....	151
4.5.1	Generierung von VNAR-Antikörper Einzelstrang-DNA zur <i>in vitro</i> Reaktion mit His-AID731.....	151
4.5.2	Generierung, Durchmusterung und Einzelklon-Analyse einer His-AID731 <i>in vitro</i> ssDNA vermittelten <i>S. cerevisiae</i> VNAR-Bibliothek	154
4.5.3	Hochdurchsatz-Sequenzanalyse vor und nach der His-AID731 <i>in vitro</i> ssDNA generierten <i>S. cerevisiae</i> VNAR-Bibliothek.....	159
4.5.4	Diskussion.....	167
5	Zusammenfassung und Ausblick	171
6	Exkurs: Translation der transienten Antigenbindung in eine kovalenten Markierung am Phagen	172
7	Literaturverzeichnis	174
8	Anhang.....	186
8.1	Abkürzungsverzeichnis	186
8.2	Publikationen	187
8.3	Eidesstattliche Erklärung	189
8.4	Danksagung.....	191
8.5	Lebenslauf	193