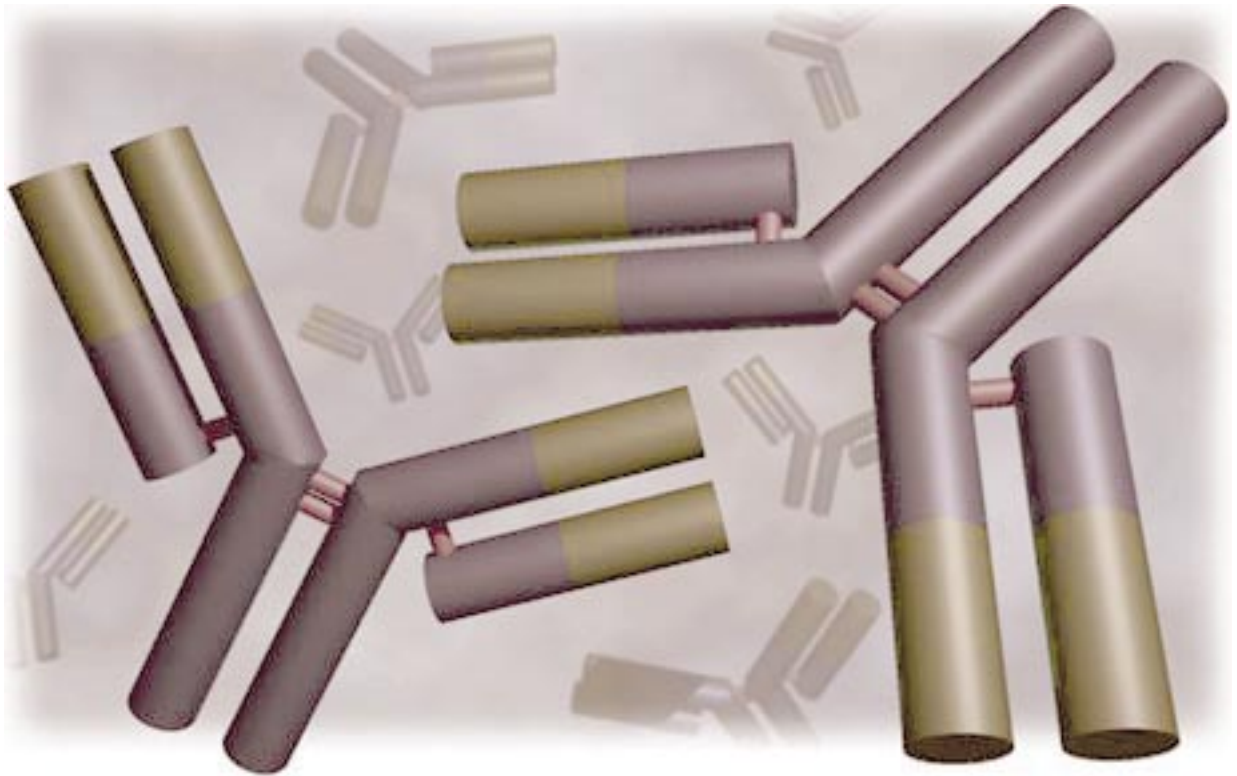


**Πανεπιστήμιο Κρήτης**  
**Σχολή Θετικών Επιστημών**  
**Τμήμα Βιολογίας**  
**Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

# **Βελτίωση της Ανοσοσυγγένειας Ανθρώπινων Αντισωμάτων με Γενετική Μηχανική**



**Πολίτης Εμμανουήλ**

Επιβλέπων Ερευνητής: Ηλίας Κραμποβίτης  
Υπεύθυνος Καθηγητής: Μιχάλης Κοκκινίδης

**Ηράκλειο 1999**

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ηλία Κραμποβίτη για την υποστήριξη και τις συμβουλές που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής μου. Ευχαριστώ ολόκληρη την ομάδα Εφαρμοσμένης Ανοσολογίας και Βιοχημείας που εκτός από συνεργάτες ήταν και φίλοι μου και ειδικά την Μαρία Κανδηλογιαννάκη και Γεώργιο Κουτσοδάκη για την στενή συνεργασία μας. Θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Μιχάλη Κοκκινίδη, Αποστόλη Κλινάκη και Ροΐδη Αλέξανδρο για την βοήθεια και τις κρίσιμες συμβουλές τους.

Τέλος, αφιερώνω την εργασία αυτή στην οικογένεια μου και στην Αλεξάνδρα που στάθηκε καλή μου φίλη τα τελευταία δύο χρόνια.

## Αγγλικοί όροι σε ελεύθερη Ελληνική μετάφραση

- Αλληλούχιση DNA : sequencing
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης: PCR
- Εκκινητής: primer
- Εκφυλισμένος εκκινητής: degenerate primer
- Μεταβλητό τμήμα μονής αλυσίδας: scFv
- Μεταλλαξιγένεση με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με επαγωγή λαθών: Error prone PCR
- Μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων: atomic force microscope
- Παρουσίαση σε φάγους: phage display
- Πελέτα: pellet (στερεά φάση κυττάρων μετά από φυγοκέντρηση)
- Πεπτίδιο-σινιάλο: signal peptide
- Υποκατάσταση αλανινών: Alanine substitution
- Ηλεκτροέκλυση: electroelution

## Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη των μηχανισμών που διέπουν την ωρίμανση συγγένειας των αντισωμάτων. Για να προσεγγίσουμε το θέμα αυτό κρίθηκε απαραίτητη η επιλογή ενός ζεύγους αντισώματος-αντιγόνου των οποίων τις ιδιότητες αλληλεπίδρασης μελετήσαμε. Επιλέξαμε σαν αντιγόνο την βλεννίνη muc-1 που συναντάται σε αδενοκαρκίνους επιθηλιακών κυττάρων. Η βλεννίνη αυτή αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες ενός εικοσαμερούς πεπτιδίου και ο σκελετός της θεωρείται σαν ένας από τους πιο ορθολογικούς στόχους για τον εντοπισμό και θεραπεία των καρκίνων αυτής της μορφής. Σε προηγούμενες μελέτες [Henderikx et al., 1998] απομονώθηκαν δυο αντισώματα σε μορφή scFv με ειδικότητα για το παραπάνω πεπτίδιο, αλλά με σχετικά χαμηλό βαθμό συγγένειας. Επιλέξαμε το αντίσωμα με την υψηλότερη ειδικότητα (10A) και προκαλέσαμε τυχαίες μεταλλάξεις στις περιοχές CDR1 και CDR2 της βαριάς αλυσίδας του. Αφού έγινε η συγκρότηση των μεταλλαγμένων τμημάτων και η κλωνοποίηση σε φαγεμιακό φορέα, κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες μεγέθους  $5,6 \times 10^6$  μελών με μεταλλαγές στην CDR1 περιοχή και  $5,4 \times 10^6$  με μεταλλαγές ταυτόχρονα στις CDR1 και CDR2 περιοχές. Μετά από την πραγματοποίηση δύο κύκλων επιλογών στις βιβλιοθήκες αυτές επιτύχαμε εμπλουτισμό σε scFv με ειδικότητα για το muc-1, 48 φορές για την CDR1 βιβλιοθήκη και 149 φορές για την CDR1- CDR2 βιβλιοθήκη. Από 60 αποικίες της εμπλουτισμένης CDR1 βιβλιοθήκης που ελέχθησαν, πήραμε 20 αποικίες (33%) με αυξημένη αντίδραση ως προς το αρχικό 10A αντίσωμα και αντίστοιχα 9 στις 60 (15%) στην περίπτωση της βιβλιοθήκης CDR1-CDR2. Δώδεκα αποικίες από τις δυο βιβλιοθήκες είναι της διαδικασίας της αλληλούχισης των scFv τους, ενώ υπό εξέλιξη βρίσκεται η διαδικασία αξιολόγησης της συγγένειας τους.

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
Αγγλικοί όροι σε ελεύθερη Ελληνική μετάφραση.....	4
Περιεχόμενα.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1Ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα και ο ρόλος του στην ανοχή σε αντιγόνα-εαυτού. ....	8
1.2 Εισαγωγή στα Αντισώματα.....	9
1.2.1 Αντισώματα κατά παραγγελία.....	13
1.2.2 Επιλογή πεπτιδίων παρουσιασμένα σε νηματοειδείς φάγους .....	15
1.3 Στρατηγικές δημιουργίας βιβλιοθηκών αντισωμάτων .....	17
1.4 Τρόποι επέμβασης στην ειδικότητα και συγγένεια των αντισωμάτων.....	18
1.5 Αντιγόνα επιλογής .....	19
1.6 Πειραματική προσέγγιση .....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2Ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1 Παραγωγή αντισωμάτων.....	22
2.1.1 Πλασμίδια-Φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των scFv .....	22
2.1.2 Σχεδιασμός scFv.....	22
2.1.3 Επαγωγή των scFv σε υγρή καλλιέργεια κωνικής φιάλης .....	24
2.1.4 Επαγωγή των scFv σε υγρή καλλιέργεια σε πλάκα καλλιέργειας 96-πηγαδίων.....	25
2.1.5 Απομόνωση των scFv με την τεχνική παγώματος-τήξης.....	26
2.1.6 Απομόνωση των scFv με την τεχνική του οσμωτικού σοκ.....	26
2.1.7 Καθαρισμός scFv με κολώνα Ni-NTA.....	27
2.1.8 Συμπύκνωση διαλύματος scFv .....	29
2.1.9 Σταθερότητα των scFv στους 37°C.....	29
2.2 Ανίχνευση ειδικότητας και πρόσδεσης των scFv με ELISA .....	29
2.2.1 Πρωτόκολλο ELISA (κλασικό πρωτόκολλο).....	30
2.2.2 Πρωτόκολλο ELISA (πρωτόκολλο στρεπταβιδίνης) .....	31
2.2.3 ELISA για την μέτρηση υπερκειμένου καλλιεργείων σε πλάκα καλλιέργειας 96 πηγαδίων.....	32
2.2.4 ELISA ανταγωνιστικής εκτόπισης .....	33

2.2.5 Παραγωγή πεπτιδίων-αντιγόνων για χρήση σε ELISA και επιλογή με βακτηριοφάγους .....	34
2.3 Μεταλλαξηγένεση των scFv .....	35
2.3.1 Παραγωγή πλασμιδιακού DNA.....	35
2.3.2 Παραγωγή επιδεκτικών κυττάρων κατάλληλα για την δημιουργία βιβλιοθηκών .....	35
2.3.3 Μετασηματισμός πλασμιδιακού DNA σε επιδεκτικά κύτταρα.....	37
2.3.4 Μεταλλαξηγένεση με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με πολυμορφικούς εκκινητές (degenerate primers) .....	38
2.3.5 Μεταλλαξηγένεση με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με επαγωγή λαθών (Error prone PCR).....	41
2.3.6 Προετοιμασία ενθεμάτων scFv για κλωνοποίηση.....	42
2.3.7 Προετοιμασία του pCANTAB-6 φορέα για κλωνοποίηση βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων ενθεμάτων scFv .....	43
2.3.8 Δημιουργία βιβλιοθηκών scFv .....	45
2.3.9 Τρόποι ελέγχου της ποιότητας μια βιβλιοθήκης .....	45
2.4 Επιλογή των βιβλιοθηκών scFv με παρουσίαση σε φάγους.....	46
2.4.1 Ανάκτηση της βιβλιοθήκης των scFv.....	46
2.4.2 Προετοιμασία φάγων και επιλογή.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3Ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	51
3.1 Επιλογή και προσαρμογή τεχνικών για την παραγωγή scFv.....	52
3.1.1 Επαγωγή των scFv σε υγρή καλλιέργεια.....	52
3.1.2 Απομόνωση και καθαρισμός των scFv. ....	53
3.1.3 Μέτρηση ποσοτήτων λειτουργικών scFv με ELISA.....	55
3.2 Απομόνωση νέων scFv.....	57
3.2.1 Επιλογή scFv για την εφαρμογή των μεταλλαγών .....	57
3.2.2 Επιλογή CDRs για μεταλλαξογένεση .....	59
3.2.3 Επιλογή εκκινητών για εισαγωγή μεταλλαγών στα CDRs .....	60
3.2.4 Δημιουργία βιβλιοθηκών.....	62
3.2.5 Συμπεράσματα.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4Ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5Ο: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	77

## *Κεφάλαιο 1ο: Εισαγωγή*

## 1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα και ο ρόλος του στην ανοχή σε αντιγόνα εαυτού.

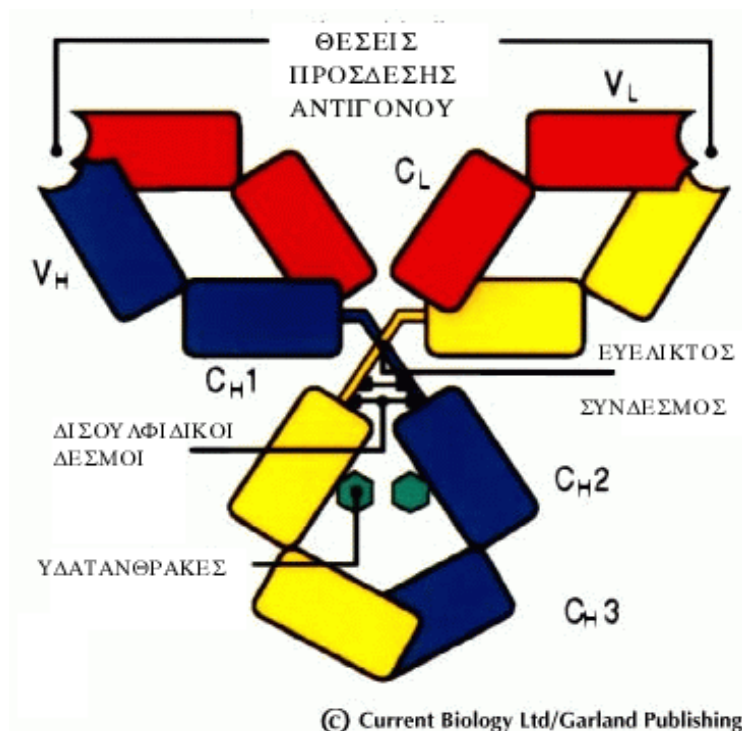
Η κύρια λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος ενός οργανισμού είναι η προστασία του από εξωγενείς παράγοντες. Κάθε οργανισμός ζει σε ένα περιβάλλον το οποίο είναι γεμάτο από μολυσματικούς γι' αυτόν παράγοντες. Γι' αυτό όλα τα είδη έχουν αναπτύξει κάποιο μηχανισμό άμυνας από εξωτερικούς εισβολείς. Καθώς οι οργανισμοί γίνονται πιο πολύπλοκοι ανεβαίνοντας στην εξελικτική βαθμίδα ο συντονισμός των διαφόρων μηχανισμών γίνεται δυσκολότερος με αποτέλεσμα μερικές φορές ο έλεγχος τους να χάνεται. Σε τέτοιες περιπτώσεις έχουμε τη δημιουργία των πρώτων σταδίων ενός καρκίνου. Αυτό το σενάριο δεν είναι τόσο σπάνιο, αντιθέτως, η συχνότητα με την οποία παρουσιάζονται τέτοια προβλήματα, ειδικά σε οργανισμούς εξελιγμένους όσο τα θηλαστικά είναι αρκετά μεγάλη. Οι σύνθετοι ανοσολογικοί μηχανισμοί που έχουν εξελιχθεί στα είδη αυτά, που τους δίνουν την ικανότητα να διακρίνουν καλύτερα ένα ξένο σωματίδιο ανεξάρτητα με την προέλευση του, αντιμετωπίζουν επίσης την πλειοψηφία των περιπτώσεων πρώιμων καρκίνων. Έτσι οι καρκίνοι που τελικά εκδηλώνονται είναι ένα εξαιρετικά μικρό ποσοστό αυτών που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της ζωής του ατόμου. Οι περιπτώσεις των αυτόλογων καρκίνων που δεν αντιμετωπίζονται από τον οργανισμό είναι εκείνες στις οποίες ο καρκινογόνος παράγοντας δεν προκαλεί απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε γιατί είναι πολύ όμοιος με την φυσιολογική πρωτεΐνη του κυττάρου, είτε γιατί ο καρκίνος προκαλείται από μεταβολή στην συγκέντρωση του ή λόγω συνδυασμού τέτοιων καταστάσεων. Η ελλιπής απόκριση οφείλεται εν μέρη στην μη συμμετοχή των T-λεμφοκυττάρων που οδηγεί σε αδυναμία παραγωγής αντισωμάτων εναντίων πρωτεϊνών του εαυτού. Ως εκ τούτου σε περιπτώσεις όπου έχουμε παραγωγή αντισωμάτων, αυτά είναι χαμηλής συγγένειας. Οι σύγχρονες εξελίξεις της επιστήμης ιδιαίτερα στα πεδία της μοριακής βιολογίας και γενετικής μηχανικής μας δίνουν την δυνατότητα να ξεπεράσουμε τους περιορισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος και να οδηγηθούμε σε υψηλής συγγένειας αντισώματα. Πριν μπούμε όμως σε λεπτομέρειες για το πως προσεγγίζει η επιστήμη σήμερα τέτοια προβλήματα, θα γίνει μια αναφορά σε γενικά στοιχεία για την λειτουργία των αντισώματα στο ανοσοποιητικό σύστημα.



## 1.2 Εισαγωγή στα Αντισώματα

Κάθε ουσία που το ανοσοποιητικό αναγνωρίζει σαν ξένη, προκαλεί ανοσολογική απόκριση. Τότε η ουσία αυτή αποκαλείται **αντιγόνο** (**Antigen: Antibody generator**). Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί και διακρίνει μόρια ακόμα και με μικρές διαφορές στην αλληλουχία τους, μερικές φορές ακόμα και αλλαγή ενός αμινοξέος.

Οι αποκρίσεις του ανοσοποιητικού μπορούν να χωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: σε αποκρίσεις όπου η καταπολέμηση πραγματοποιείται κυρίως με κύτταρα (**κύτταρική ανοσία**) και σε αποκρίσεις **αντισωμάτων** (**χυμική ανοσία**). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει την παραγωγή αντισωμάτων, πρωτεϊνών που ονομάζονται και **ανοσοσφαιρίνες**. Αντισώματα μπορούν να παραχθούν σε απόκριση για έναν μεγάλο αριθμό ουσιών που υπάρχει στην φύση αρκεί να αναγνωριστούν σαν ξένα μόρια από έναν οργανισμό. Τα χαρακτηρίζει η μεγάλη ειδικότητα για το αντιγόνο τους και η ικανότητα να προσδένονται σε αυτό με μεγάλη συγγένεια. Όμως περνούν διάφορα στάδια πριν φτάσουν σε αυτό το επίπεδο λειτουργικότητας. Δεν θα ήταν δυνατό ένας οργανισμός να φέρει έτοιμα αντισώματα για οποιοδήποτε αντιγόνο που θα μπορούσε να συναντήσει κατά την διάρκεια της ζωής του. Γι' αυτό έχουν εξελιχτεί μηχανισμοί με τους οποίους ένα αντίσωμα ωριμάζει σταδιακά βελτιώνοντας την ειδικότητα και την συγγένεια ως προς το αντίστοιχο αντιγόνο. Τα αντισώματα ανήκουν στην ομάδα των ανοσοσφαιρινών. Αποτελούνται από διακριτές δομικές και λειτουργικές περιοχές όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 1**:



Σχήμα 1: Δομή αντισώματος

Είναι μόρια σχήματος Y και αποτελούνται από δυο πανομοιότυπες αλυσίδες των 50 KDa (βαριές, **H**) και δύο πανομοιότυπες αλυσίδες των 25 KDa (ελαφριές, **L**). Δισουλφιδικοί δεσμοί κρατούν ενωμένες μια βαριά και μια ελαφριά αλυσίδα, καθώς και τις δυο βαριές μεταξύ τους. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από μία περιοχή που είναι μεταβλητή σε αλληλουχία και ευθύνεται για την πρόσδεση του αντισώματος με το αντιγόνο και μία ή περισσότερες σταθερές σε αλληλουχία περιοχές που μέρος τους είναι υπεύθυνο για την βιολογική δράση (effector's function) του μορίου. Αυτές οι περιοχές (**Fc**) αλληλεπιδρούν με παράγοντες του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλώντας την ανταπόκριση του στους ξένους γι' αυτόν παράγοντες. Η ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μια μεταβλητή (**V<sub>L</sub>**) και μία σταθερή (**C<sub>L</sub>**) περιοχή, ενώ η βαριά από μια μεταβλητή (**V<sub>H</sub>**) και τρεις σταθερές (**C<sub>H1</sub>**, **C<sub>H2</sub>**, **C<sub>H3</sub>**). Η **C<sub>H2</sub>** περιέχει μια θέση για N-προσδεμένη γλυκοζυλίωση, ενώ οι **C<sub>H2</sub>** και **C<sub>H3</sub>** έχουν αλληλουχίες που διαμεσολαβούν στην συγκέντρωση κυτοτοξικών κυττάρων και στην έναρξη της δράσης του συμπληρώματος. Μέσα σε κάθε μεταβλητή περιοχή βρίσκονται 3 **υπερμεταβλητές** σε αλληλουχία περιοχές. [Schier et al., 1996]. Αποκαλούνται '**περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας**' (Complementarity Determining Regions: **CDRs**) και κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από αυτές σχηματίζουν δομές σαν δάκτυλα που έρχονται σε άμεση επαφή με το αντιγόνο. Οι περιοχές αυτές φαίνεται να είναι στόχος κάποιου μηχανισμού δημιουργίας μεταλλαγών, που ονομάζονται **σωματικές**. Το υπόλοιπο τμήμα των μεταβλητών περιοχών δημιουργεί τέσσερις περιοχές (**FR1-FR4**) και παίζει τον ρόλο υποστύλωματος περιβάλλοντας και στηρίζοντας τις CDRs. Τα αμινοξέα που αποτελούν τις περιοχές αυτές ονομάζονται αμινοξέα **υποστήριξης (framework, FR)**. Από στατιστικές μελέτες στην αλληλουχία των CDRs έχουν προταθεί οι λεγόμενες '**κανονικές**' δομές [Chothia et al., 1989],[Chothia et al., 1992]. Σύμφωνα με αυτήν την θεωρία σε συγκεκριμένες θέσεις στις πέντε από τις έξι CDRs, βρίσκονται κάποια συντηρημένα αμινοξέα-κλειδιά, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο την διαμόρφωση της τρισδιάστατης δομής τους στον χώρο. Η CDR3 της βαριάς αλυσίδα είναι η μόνη CDR για την οποία δεν έχει βρεθεί 'κανονική' δομή. Γι' αυτό πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ειδικότητας του αντισώματος μια και έχει την μεγαλύτερη ποικιλομορφία.

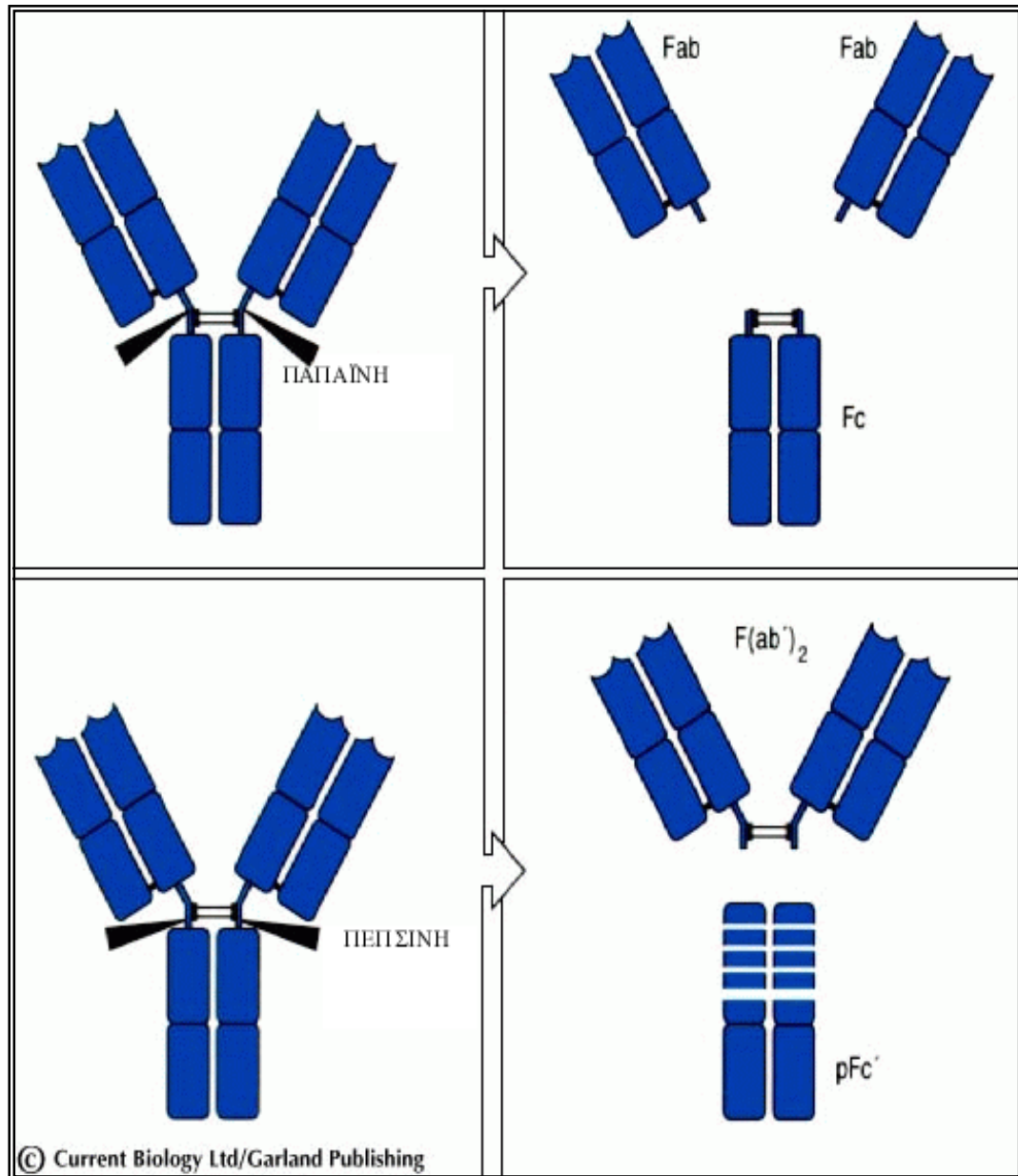
Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι η επιφάνεια που δημιουργούν οι CDRs περιοχές είναι **συμπληρωματικές** τόσο δομικά, όσο και ηλεκτροστατικά με αυτήν του επιτόπου που αναγνωρίζεται πάνω στο αντιγόνο. Φαίνεται ότι 12 με 20 αμινοξέα κάνουν την

επαφή, ενώ 10 με 15 δεσμοί υδρογόνου και 2 με 3 δεσμοί άλατος σταθεροποιούν την δομή. Πλήθος δυνάμεων Van der Waals συνεισφέρει στη συνολική συγγένεια με το αντιγόνο [Dougan et al., 1998]. Πάντως φαίνεται ότι κάθε αντίσωμα είναι διαφορετικό, μια και προσπάθειες στο να προσδιοριστούν γενικοί κανόνες για τις αλληλεπιδράσεις που κάθε φορά καθορίζουν την ειδικότητα και την συγγένεια αντισώματος - αντιγόνου δεν έχουν εντοπιστεί. Η ενθαλπία και η εντροπία του αντισώματος και οι αλλαγές τους κατά την πρόσδεση με το αντιγόνο, οι δεσμοί υδρογόνου, άλατος και Van der Waals και το μήκος των CDRs δεν μπορούν άμεσα να συσχετισθούν με την συγγένεια του αντισώματος για το αντιγόνο [ανασκόπηση :Rees et al, 1994]. Φαίνεται ότι κάθε φορά ο συγκεκριμένος συνδυασμός καθορίζει το αποτέλεσμα.

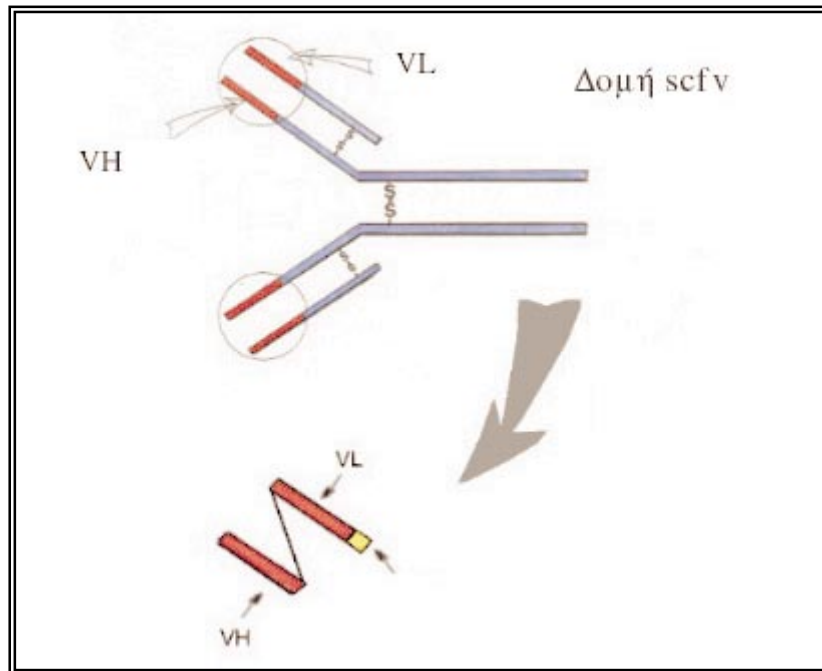
Η δομή των ανοσοσφαιρινών είναι συντηρημένη στα διάφορα είδη. Σήμερα με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής είναι δυνατή η ανταλλαγή των τμημάτων με την βιολογική δράση του αντισώματος (**Fc**) ή των περιοχών καθορισμού της συμπληρωματικότητας (**CDRs**) από ένα αντίσωμα σε ένα άλλο, ακόμα και διαφορετικού είδους. Μεταφέροντας, για παράδειγμα, τις CDRs περιοχές ενός αντισώματος γίνεται μεταφορά και της ιδιότητας του να αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Είναι δυνατό να διασπάσουμε τα αντισώματα και να απομονώσουμε τα τεμάχια εκείνα που κατέχουν μόνο την λειτουργία της αναγνώρισης και πρόσδεσης με το αντιγόνο. Τα μόρια αυτά είναι τα **F(ab)<sub>2</sub>** και **Fab** (**Σχήμα 2**), που προέρχονται από την επίδραση συγκεκριμένων πρωτεασών στην ανοσοσφαιρίνη. Το **μεταβλητό τμήμα μονής αλυσίδας** ή όπως αποκαλείται διεθνώς **scFv** (single chain Fragment variable) περιλαμβάνει μόνο τις μεταβλητές περιοχές ενός αντισώματος και μπορεί να προέλθει από αυτό με μοριακές μεθόδους (**Σχήμα 3**). Ο σχεδιασμός του σε επίπεδο DNA επιτρέπει την εναλλαγή του από scFv σε πλήρες IgG αντίσωμα και ανάποδα, με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με κατάλληλους εκκινητές. Τα scFv σε σχέση με τις άλλες μορφές ανοσοσφαιρινών έχουν υψηλότερη διεισδυτικότητα στους ιστούς [Yokota et al, 1992], γρηγορότερη απομάκρυνση από την κυκλοφορία, και μεγαλύτερη ειδικότητα [Milenic et al., 1991]. Ακόμα λόγω του μικρότερου μεγέθους τους και την έλλειψη των σταθερών περιοχών είναι λιγότερο αντιγονικά. Επίσης μπορούν ευκολότερα να συνενωθούν με άλλα μόρια για την δημιουργία χμαιρών, με θεραπευτικές χρήσεις για τον λήπτη τους. Τέτοια μόρια έχουν παρουσιαστεί από διάφορες ομάδες. Με προσθήκη για παράδειγμα μιας **τοξίνης** δημιουργείται μια **ανοσοτοξίνη** η οποία αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό προκαλώντας

έντονη απόκριση προς το κύτταρο ή μόριο το οποίο έχει προσδεθεί το scFv [Chowdhury et al., 1998]. Επίσης έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχημένες προσπάθειες πρόσδεσης με ραδιοϊσότοπα όπου τα κύτταρα-στόχοι καταστρέφονται με την διάσπαση του DNA τους από την ραδιενέργεια.



Σχήμα 2: Δημιουργία Fab και F(ab)<sub>2</sub> με την χρήση περιοριστικών ενζύμων.



**Σχήμα 3:** Με την σύντηξη των μεταβλητών περιοχών ενός αντισώματος δημιουργείτε ένα νέο είδος ανοσοσφαιρίνης που ονομάζεται scFv.

### 1.2.1 Αντισώματα κατά παραγγελία

Αν και η πιθανή χρήση των αντισωμάτων στην θεραπεία αναγνωρίστηκε πριν περίπου 100 χρόνια [Behring et al., 1893], οι αλλεργικές αντιδράσεις και άλλες παρενέργειες περιόρισαν την χρησιμότητά τους. 75 χρόνια μετά, είχαμε την παραγωγή του πρώτου ποντικίσου μονοκλωνικού αντισώματος και μόνο τα τελευταία 3 με 5 χρόνια αρχίζουμε να αξιοποιούμε τις πλήρεις δυνατότητες τους στην κλινική ιατρική. Τα πρώτα μονοκλωνικά αντισώματα ήταν ποντικίσια και η χορήγηση τους στον άνθρωπο οδηγούσε στην παραγωγή ανθρώπινων αντι-ποντικίσιων αντισωμάτων προκαλώντας την λεγόμενη αντίδραση **HAMA** (human anti-mouse antibody response), αφού αναγνωρίζονταν ως ξένα μόρια από το ανοσοποιητικό σύστημα. Μετέπειτα προσπάθειες για την παραγωγή πλήρως ανθρώπινων αντισωμάτων με την κυτταρική σύντηξη ανθρώπινων B λεμφοκυττάρων δεν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα λόγω τεχνικών δυσκολιών. Βέβαια και η κατά παραγγελία ανοσοποίηση ανθρώπων είναι ηθικά και δεοντολογικά ανεπίτρεπτη. Τα παραπάνω

προβλήματα οδήγησαν τους ερευνητές σε τεχνικές **ανθρωποποίησης** των ποντικίστων αντισωμάτων μεταφέροντας τις μεταβλητές περιοχές (και αργότερα μόνο τις CDR) των επιθυμητών ποντικίστων αντισωμάτων σε ανθρώπινα, διατηρώντας έτσι την αρχική τους ειδικότητα [Foote et al., 1992], [Couto et al., 1995]. Τα υβριδικά αυτά αντισώματα αν και μείωσαν σημαντικά την αντίδραση **HAMA**, δεν έλυσαν το πρόβλημα. Ακόμα και οι μεταβλητές αυτές περιοχές αναγνωρίζονται σαν ξένες σε ποσοστό ασθενών μεγαλύτερο του 50% μετά από παρατεταμένη χρήση τους. Στην περίπτωση που μεταφέρονται μόνο CDRs, επιπλέον αλλαγές απαιτούνται για να διατηρήσει το αντίσωμα της ιδιότητες του. Αυτές είναι αλλαγές σε αμινοξέα υποστήριξης που επηρεάζουν την θέση στον χώρο αμινοξέων σημαντικών για την αλληλεπίδραση των CDRs με το αντιγόνο. Η αναγνώριση αυτών των αμινοξέων είναι δύσκολη και χρονοβόρα απαιτώντας σημαντική υπολογιστική και κρυσταλλογραφική εργασία, γεγονός που έχει αποτρέψει την ευρεία χρήση της μεθόδου.

Τα τελευταία χρόνια δυο νέες τεχνικές παρουσιάστηκαν στον χώρο της τεχνολογίας αντισωμάτων που φιλοδοξούν να λύσουν τα παραπάνω προβλήματα, παράγοντας πλήρως ανθρώπινα αντισώματα (ανασκόπηση : [Vaughan et al., 1998]). Η μια μέθοδος κάνει χρήση την τεχνολογία των διαγονιδιακών ποντικίων με τον σκοπό να δημιουργηθούν γενιές που θα εκφράζουν ανθρώπινα αντισώματα. Η τεχνική αυτή απαιτεί την δημιουργία ποντικίων που έχουν απενεργοποιημένα τα ενδογενή γονίδια των ανοσοσφαιρινών τους (knockout mice), και τους έχουν προστεθεί τα ανθρώπινα ομόλογα τους στην πρώιμη μορφή τους. Λόγω του μεγάλου μεγέθους των ανθρώπινων γενετικών τόπων που κωδικοποιούν τις ανοσοσφαιρίνες και αποτελούνται από εκατοντάδες γονίδια, πρέπει να εντεθούν εξαιρετικά μεγάλα κομμάτια DNA στην βλαστική σειρά του ποντικού. Κάτι τέτοιο είναι δυνατόν με την χρήση τεχνικών όπως αυτή των τεχνητών χρωμοσωμάτων του σακχαρομύκητα (**YACs**) που επιτρέπουν την ένθεση συνεχόμενων κομματιών ανθρώπινου DNA μέχρι και μιας μεγαβάσης (1Mb). Τα πρώτα πλήρως ανθρώπινα αντισώματα από ποντίκια με την μέθοδο αυτήν παρουσίαζαν μέτρια συγγένεια. Επίσης μικρός μόνο αριθμός μονοκλωνικών αντισωμάτων δημιουργούνταν εναντίων των αντιγόνων επιλογής. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι μέρος μόνο των ανθρώπινων γονιδίων μεταφέρεται στο ποντίκι. Με τις πρόσφατες εξελίξεις στην μοριακή γενετική μηχανική, όλο και μεγαλύτερος αριθμός μονοκλωνικών αντισωμάτων υψηλότερης συγγένειας παρουσιάζονται. Παρόλα αυτά κανένα μονοκλωνικό αντίσωμα προερχόμενο από διαγονιδιακό ποντίκι δεν έχει ακόμα μπει σε κλινικές μελέτες, γεγονός όμως που δεν αποκλείεται να αλλάξει σύντομα. Πρόσφατα νέα προβλήματα στην μέθοδο αυτήν φαίνεται να εμφανίζονται [Borrebaeck et al., 1999]. Πρώτο θέμα είναι το πως

θα μπορέσει κάποιος να διατηρήσει ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό που έχει παραχθεί με ανοσοποίηση διαγονιδιακού ποντικού, αφού παραμένει πρόβλημα η επιλογή κατάλληλης καρκινικής κυτταρικής σειράς για την αθανατοποίηση με σύντηξη των Β-κυττάρων που το παράγουν. Το μεγαλύτερο πρόβλημα φαίνεται όμως να είναι το πρότυπο γλυκοζυλίωσης που χρησιμοποιεί το ποντίκι, το οποίο απέχει πολύ από το να χαρακτηριστεί ανθρώπινο. Η αιτία είναι η χρήση ενός σακχαρίτη του **Gala1-3Gal**, εναντίων του οποίου υπάρχει αντίσωμα σε μεγάλη ποσότητα (100μg/ml) στον ανθρώπινον οργανισμό [**Borrebaeck et al., 1993**].

Τέλος μια νέα τεχνολογία που επικρατεί τα τελευταία χρόνια και εφαρμόζεται από πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο είναι η επιλογή scFv και Fab αντισωμάτων παρουσιασμένα σε **νηματοειδείς φάγους** και μέχρι σήμερα έχει δώσει τα υψηλότερης συγγένειας μονοκλωνικά αντισώματα [Vaughan et al., 1996],[Xie et al., 1997]. Η μέθοδος παρουσιάστηκε πρώτη φορά το 1990 [McCafferty et al., 1990] και έκτοτε εκατοντάδες πλήρως ανθρώπινα αντισώματα υψηλής συγγένειας και μεγάλης ειδικότητας έχουν παραχθεί με τον τρόπο αυτό. Λόγο της σημαντικότητας της, θα παρουσιαστεί αναλυτικά παρακάτω.

### 1.2.2 Επιλογή πεπτιδίων παρουσιασμένα σε νηματοειδείς φάγους

Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να επιλέγουμε γονίδια με βάση τις ιδιότητες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Πεπτίδια και πρωτείνες παρουσιάζονται στην επιφάνεια φάγων με την σύντηξη στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης 3 του φάγου (**pIII**). Φάγοι με συγκεκριμένες δυνατότητες πρόσδεσης, απομονώνονται από μεγάλες βιβλιοθήκες τυχαίων ή πολυμορφικών πεπτιδίων που παρουσιάζονται στην **pIII** μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επιλογής και πολλαπλασιασμού τους. Βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιούνται είναι ο **M13**, ο **fd** και ο **f1** οι οποίοι μεταξύ τους είναι κοντινοί συγγενής. Μολύνουν το 'αρσενικό' *E.coli*, και έχουν σχήμα λεπτό και μακρύ, σαν στυλό με μέγεθος 1-2 μm σε μήκος και 6-7 nm σε διάμετρο. Το γένωμα τους είναι κυκλικό μονόκλωνο DNA (ssDNA), με μέγεθος περίπου 6.400 βάσεις το οποίο είναι αρκετό για να κωδικοποιήσει τα 10 γονίδια του ιού. Η αναπαραγωγή του πραγματοποιείται σε τρεις κύριες φάσεις. Ο κύκλος της μόλυνσης αρχίζει με την προσκόλληση της επιφανειακής πρωτεΐνης pIII στην άκρη του F-νηματιδίου *E.coli*. Ακολουθεί η ενσωμάτωση του ssDNA (+αλυσίδα, plus strand) στο βακτήριο. Το DNA χρησιμοποιείται από ένζυμα του ξενιστή σαν μήτρα για την παραγωγή της (-) αλυσίδας (minus strand), γεγονός που οδηγεί στον σχηματισμό δίκλωνου DNA (dsDNA). Η μορφή αυτή ονομάζεται **αναπαραγωγική** και αποτελεί την μήτρα για την μεταγραφή σε mRNA. Η

δεύτερη φάση περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό της αναπαραγωγικής μορφής για την παραγωγή εκατοντάδων μορίων σε 10 λεπτά περίπου. Στο τρίτο στάδιο μια παραγόμενη πρωτεΐνη η "ssDNA (-) αλυσίδας-προσδεμένη πρωτεΐνη" η οποία μειώνει την σύνθεση της (-) αλυσίδας. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται ο αριθμός της αναπαραγωγικής μορφής σε σταθερά επίπεδα. Η συγκρότηση του ιού πραγματοποιείται εκτός βακτηρίου μετά από την εξαγωγή του ssDNA (που πραγματοποιείται τις περισσότερες φορές χωρίς την καταστροφή του βακτηρίου και χωρίς την διακοπή των κυτταρικών διαιρέσεων). Στην επιφάνια του ο ιός έχει χιλιάδες (περίπου 2700) pVII μόρια και 5 αντίγραφα της πρωτεΐνης pIII. Αυτή η πρωτεΐνη με παρεμβάσεις γενετικής μηχανικής μπορεί να παρουσιάσει κατάλληλα μια πρωτεΐνη της αρεσκείας μας. Το γένωμα του ιού έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε τα απαιτούμενα γονίδια για την λειτουργία του να περιέχονται σε 3000 βάσεις μονόκλωνου DNA, μαζί με την προσθήκη γονιδίων αντίστασης σε αντιβιοτικά. Επίσης κατάλληλες περιοριστικές θέσεις έχουν δημιουργηθεί ώστε να μπορούμε να κατασκευάζουμε βιβλιοθήκες ενθεμάτων στο ίδιο ανοικτό πλαίσιο διαβάσματος με την πρωτεΐνη pIII. Η πρωτεΐνη pIII διαλέχτηκε από τις άλλες επιφανειακές πρωτεΐνες του ιού γιατί είναι η μόνη που μπορεί και παρουσιάζει σχετικά μεγάλες πρωτεΐνες χωρίς πρόβλημα. Οι φορείς (vectors) που προέρχονται από ιικά γονιδιώματα ονομάζονται φαγεμίδια. Το φαγεμίδιο έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε από μόνο του να μην μπορεί να παράγει μολυσματικό ιό και επομένως απαιτείται η παράλληλη μόλυνση με ένα βοηθητικό φάγο ο οποίος θα παράγει τις απαραίτητες πρωτεΐνες για το πακετάρισμα του. Το φαγεμίδιο πακετάρεται και εκκρίνεται πιο αποτελεσματικά από τον βοηθητικό φάγο, αφού αυτός είναι ελαττωματικός στην αναπαραγωγή του: με γενετική μηχανική πρόσθεσαν το γονίδιο της ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη και μια περιοχή έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου στην μέση ενός βασικού γονιδίου του βοηθητικού ιού με αποτέλεσμα να πακετάρεται ο φαγεμιδιακός ιός που περιέχει το άθικτο γονίδιο.

Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου, εκτός την πλήρως ανθρώπινη φύση των ανασυνδυασμένων scFv που παράγονται, είναι ο σημαντικά μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων τους, αφού χρησιμοποιείται το σύστημα έκφρασης των βακτηρίων. Ένα πρόβλημα της τεχνολογίας ήταν η αρχικά μέτρια συγγένεια τους για το αντιγόνο. Τα τελευταία όμως χρόνια υψηλής συγγένειας αντισώματα έχουν απομονωθεί από μεγάλα αντισωματικά ρεπερτόρια ανοίγοντας τον δρόμο προς την θεραπευτική χρήση τους. Διάφορες στρατηγικές έχουν παρουσιαστεί μια και τα πρωτόκολλα μπορούν να προσαρμοστούν στις απαιτήσεις του ερευνητή. Έτσι, 10 χρόνια σχεδόν μετά την παρουσίαση της μεθόδου, υψηλής συγγένειας αντισώματα με δράση εξουδετέρωσης,



αναγνώρισης ειδικών επιτόπων ή κυττάρων, ανταγωνιστική υποδοχέων και καταλυτική έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Επιπλέον, ξεφεύγοντας από περιορισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν και απομονώνονται πλέον ειδικά αντισώματα για αντιγόνα εαυτού, για πρωτεΐνες που δεν είναι αρκετά αντιγονικές, καθώς και για τοξικές ουσίες (οι οποίες δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για ανοσοποιήσεις). Η δυνατότητα της χρήσης ολόκληρων πρωτεϊνών ή και κυττάρων για αντιγόνα επιλογής επιτρέπει την παραγωγή αντισωμάτων που μπορούν και αναγνωρίζουν αντιγόνα στην φυσική τους μορφή.

Η καινοτομία της μεθόδου αυτής είναι ότι μας δίνει την δυνατότητα σε ένα σωματίδιο να συνυπάρχει μια πρωτεΐνη και ταυτόχρονα η πληροφορία που την κωδικοποιεί. Έτσι μια επιλεγμένη πρωτεΐνη 'επιβιώνει' μέσω της επιλογής, και παράλληλα μεταφέρει μαζί της την (πολύτιμη) πληροφορία της σύστασης της. Εν μέρη η μέθοδος είναι μια προσομοίωση της διαδικασίας επιλογής και ωρίμανσης των αντισωμάτων στα βλαστικά κέντρα. Αυτό όμως που πρέπει να έχει προηγηθεί της μεθόδου, είναι ένας μηχανισμός εισαγωγής ποικιλομορφίας ο οποίος θα προσφέρει τον αρχικό πληθυσμό διαφορετικών μελών από το οποίο ανταγωνιστικά θα επιλεγούν τα καλύτερα.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να δημιουργήσει κανείς την απαιτούμενη ποικιλομορφία. Παρακάτω θα αναλύσουμε τους πιο σημαντικούς.

### 1.3 Στρατηγικές δημιουργίας βιβλιοθηκών αντισωμάτων

Στο ίδιο τον οργανισμό η δημιουργία του τεράστιου ρεπερτορίου αντισωμάτων πραγματοποιείται με ένα συνδυασμό μηχανισμών. Εκτός από τις σωματικές μεταλλαγές που αναφέραμε και που αφορούν τα τελικά στάδια ωρίμανσης της συγγένειας, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν ανοσοσφαιρίνες. Αυτά με σταδιακό μάτισμα του DNA (απομάκρυνση ολόκληρων τεμαχίων του και επανένωση των ακρών) δίνουν τον τελικό συνδυασμό γονιδίων που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή ενός συγκεκριμένου αντισώματος. Οι ελαφριές αλυσίδες χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τις κ και τις λ και έχουν από δυο γενετικούς τόπους που τις συνθέτουν, τον V και J. Στον άνθρωπο οι κ έχουν 40 V και 5 J, ενώ οι λ 35V και 4 J, δίνοντας 340 διαφορετικούς συνδυασμούς. Οι βαριές αλυσίδες έχουν τρεις τόπους, τους V, D και J, με 51, 30 και 6 διαφορετικά μέλη αντίστοιχα. Έτσι η ποικιλομορφία των βαριών (9.000) συνδυασμένη με των ελαφριών αλυσίδων (340) δίνουν στον ανθρώπινο οργανισμό την δυνατότητα να δημιουργήσει 3 εκατομμύρια διαφορετικούς συνδυασμούς V(D)J περιοχών. Συνυπολογίζοντας το φαινόμενο της λανθασμένης

επανασύνδεσης κατά το μάτισμα και των σωματικών μεταλλαγών που αναφέραμε, ανεβάζει την ενδογενή δυνατότητα του ανοσοποιητικού μας για παραγωγή αντισωμάτων σε τόσο αστρονομικά νούμερα, που ο οργανισμός δεν θα μπορούσε ποτέ να έχει αρκετά Β λεμφοκύτταρα για να εκμεταλλευτεί όλη αυτήν την ποικιλομορφία.

Πρέπει λοιπόν να μπορούμε να δημιουργούμε μεγάλες βιβλιοθήκες διαφορετικών μελών, ώστε να είναι αυξημένες οι πιθανότητες ανάμεσα σε αυτά να βρίσκεται κάποιο αντίσωμα με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο μας. Συχνά χρησιμοποιείται η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με επαγωγή λαθών [Hawkins et al., 1992] όπου σε συγκεκριμένο τμήμα του scFv (πχ στα CDRs) η πολυμεράση κάνει λάθος προσθήκη βάσεων με ρυθμό αρκετά μεγαλύτερο από τον φυσιολογικό. Για την δημιουργία πραγματικά τεράστιου πολυμορφισμού στις CDRs περιοχές των scFv χρησιμοποιείται ο λεγόμενος **κορεσμός των CDRs σε μεταλλαγές**. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί εκφυλισμένους εκκινητές [Yang et al., 1995],[Barbas et al., 1994], οι οποίοι δίνουν όλους τους δυνατούς συνδυασμούς αμινοξέων στην περιοχή αυτή, φτάνοντας ποικιλομορφία της τάξης του  $10^{20}$  διαφορετικών μελών. Δυστυχώς μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει δυνατό να κατασκευαστούν βιβλιοθήκες τόσο μεγάλες, αφού τα επιδεκτικά κύτταρα που έχουν δημιουργηθεί μέχρι σήμερα αδυνατούν να πλησιάζουν τα νούμερα απόδοσης μετασχηματισμού που απαιτούνται. Όμως ουσιαστικά το φαινόμενο αυτό συμβαίνει και στο οργανισμό, όπου ένα μικρό μόνο τμήμα της ποικιλομορφίας που είναι δυνατό να δημιουργηθεί, αξιοποιείται. Οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούνται σαν πρώτο στάδιο για την παραγωγή κάποιων scFv, τα οποία μπορούν να βελτιωθούν ακόμα περισσότερο με συγκεκριμένες επεμβάσεις στην αλληλουχία τους, όπως θα δούμε παρακάτω.

## 1.4 Τρόποι επέμβασης στην ειδικότητα και συγγένεια των αντισωμάτων

Όπως έχει αναφερθεί, κάθε αντίσωμα πρέπει να αντιμετωπίζεται σαν ξεχωριστή περίπτωση. Όμως η μεγάλη πληροφορία που έχει συγκεντρωθεί τα τελευταία χρόνια από κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δώσει νέες δυνατότητες στον σχεδιασμό των αντισωμάτων. Είναι πλέον δυνατή η ικανοποιητική πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής τους με την χρήση **μοντέλων** σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές [Martin et al., 1989],[Chowdhury et al., 1998], [Nieba et al., 1997], [Vasmatzis et al., 1994]. Έτσι μικρές αλλαγές μερικών αμινοξέων μπορούν να προσομοιωθούν στον υπολογιστή, δίνοντας μας μια πιστή εικόνα για το πως διπλώνεται το μεταλλαγμένο μόριο στον χώρο. Η μέθοδος έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα

επιτυχημένη στα scFv. Με τον τρόπο αυτό παίρνουμε πληροφορίες όχι μόνο για την επίδραση μεταλλαγών στην συγγένεια του scFv αλλά και για την επίδραση τους στη σταθερότητα του μορίου [Lee et al., 1997]. Στις περιπτώσεις που η αλλαγή φαίνεται να βελτιώνει κάποιο από τα χαρακτηριστικά του αντισώματος πραγματοποιείται και στην πράξη για την επαλήθευση της πρόβλεψης. Μετά με συγκέντρωση των επιτυχημένων μεταλλαγών σε ένα scFv, παίρνουμε εκθετική αύξηση της συγγένειας σε σχέση με κάθε μεταλλαγή ξεχωριστά [Yanget al., 1995]

Η ίδια η φύση έχει μηχανισμούς για να κατευθύνει μεταλλαγές σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών (ανασκόπηση: [Diaz et al., 1998]. Το κωδικόνιο της σερίνης AGY, είναι ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα εντοπισμού μεταλλαγών. Είναι χαρακτηριστικό ότι βρίσκεται στην CDR1 περιοχή στα αντισώματα σχεδόν όλων των ειδών, ενώ όταν συναντάμε σερίνη σε αμινοξέα υποστήριξης, χρησιμοποιείται άλλο κωδικόνιο της, το οποίο δεν μεταλλάσσεται (πχ TCN,) [Betz et al., 1993]. Έχει παρατηρηθεί επίσης μια προτίμηση στις σημειακές μεταλλαγές του DNA, έναντι των ελλειμμάτων και ενθέσεων. Από τις βάσεις του DNA η θυμίνη αντικαθίσταται πολύ λιγότερο από ότι οι υπόλοιπες και οι πυριμιδίνες λιγότερο από τις πουρίνες. Τέλος στις υπερμεταβλητές περιοχές οι μεταλλαγές εντοπίζονται στην αλυσίδα του DNA που μεταγράφεται. Φαίνεται δηλαδή ότι εξελικτικά τα CDRs έχουν γίνει ευνοϊκά υποστρώματα για την δημιουργία σωματικών μεταλλαγών

## 1.5 Αντιγόνα επιλογής

Είναι κρίσιμης σημασίας η επιλογή του σωστού αντιγόνου με το οποίο θα προσπαθήσουμε να απομονώσουμε από μια βιβλιοθήκη τα αντισώματα εκείνα που θα μπορέσουν να είναι αποτελεσματικά και *in-vivo*. Ειδικά στην περίπτωση καρκίνων, είναι δύσκολο να καταφέρει κανείς να εντοπίσει μια πρωτεΐνη, που ενώ παράγεται από τον ίδιο τον οργανισμό, βρίσκεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα. Κυτταρικές πρωτεΐνες μεταλλάσσονται στον οργανισμό μας αρκετά συχνά. Συνήθως όμως αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και καταστρέφονται. Αυτό σημαίνει ότι για να έχουμε φτάσει στο σημείο να έχει δημιουργηθεί ένας καρκίνος, το ανοσοποιητικό αδυνατεί να αναγνωρίσει το πρόβλημα ώστε να μπορεί να το αντιμετωπίσει. Για παράδειγμα, περιπτώσεις καρκίνων που προκαλούνται από αύξηση της συγκέντρωσης μιας πρωτεΐνης δεν μπορούν να αναγνωριστούν από το ανοσοποιητικό μια και δεν υπάρχει κάποιο νέο μόριο στον οργανισμό. Σε άλλες περιπτώσεις πάλι έχουμε ενδοκυτταρικές αλλαγές πρωτεϊνών οι οποίες

δεν παρουσιάζονται σε κάποιο τάξης I μόριο ιστοσυμβατότητας, με αποτέλεσμα να μην προκαλείται ανοσολογική απόκριση.

Σε μερικές περιπτώσεις καρκίνων, με την βοήθεια τεχνολογικών εργαλείων που έχουν προαναφερθεί, είναι δυνατή η διάκριση των καρκινικών κυττάρων από τα φυσιολογικά. Ένα τέτοιο μόριο είναι η βλεννίνη **muc-1**. Η βλεννίνη αυτή αποτελείται από μεγάλο αριθμό επαναλήψεων μιας αλληλουχίας είκοσι αμινοξέων και σε φυσιολογικές συνθήκες είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένη σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια πολλών επιθηλιακών εκκριτικών κυττάρων, και λειτουργεί σαν προστατευτικό υλικό τριβής και επαφής των κυττάρων. Σε περιπτώσεις αδenoκαρκίνων του μαστού και του εντέρου προκαλείται σημαντική μείωση στην γλυκοζυλίωση του μορίου και σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του. Το γεγονός της υπογλυκοζυλίωσης επιτρέπει την έκθεση του βασικού αμινοξικού σκελετού [**Girling et al., 1989**] γεγονός που διαφοροποιεί τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά. Η αύξηση της συγκέντρωσης της muc-1 στο αίμα θεωρείται ένδειξη ύπαρξης καρκίνου σε ένα άτομο. Αντίστοιχα έχει αναφερθεί ότι η μείωση της συγκέντρωσης στην κυκλοφορία είναι ένδειξη θετικής αντίδρασης σε θεραπεία [**Denton et al., 1997**]. Οι παραπάνω λόγοι μας οδήγησαν στην επιλογή του συνθετικού muc-1 (το οποίο λόγω χημικής σύνθεσης δεν γλυκοζυλιώνεται) σαν ένα καλό υποψήφιο αντιγόνο για την παραγωγή ανασυνδυασμένων αντισωμάτων, με απώτερο σκοπό την χρήση των αντισωμάτων αυτών στον εντοπισμό και την θεραπεία μορφών καρκίνου που εμπλέκεται το muc-1.

## 1.6 Πειραματική προσέγγιση

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Ανοσολογίας και Βιοχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) επιλέξαμε την στρατηγική την οποία θα ακολουθήσουμε για την βελτίωση της συγγένειας ενός scFv που η παραπάνω ομάδα απομόνωσε με την μέθοδο της επιλογής με φάγους εναντίον της βλεννίνης muc-1, σε συνεργασία με το Κέντρο Μηχανικής και Επιλογής Αντισωμάτων του Πανεπιστημίου και Νοσοκομείου του Maastricht [**Henderikx et al., 1998**]. Ο σκοπός της μελέτης ήταν να συλλέξουμε πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις που είναι σημαντικές για την συγγένεια του συγκεκριμένου scFv με το muc-1, ώστε να μπορέσουμε να επέμβουμε ορθολογικά αυξάνοντας την σε επίπεδα τα οποία θα μας επιτρέψουν να χρησιμοποιήσουμε τα scFv αυτά σε θεραπευτικές εφαρμογές. Για την εκπλήρωση του σκοπού αυτού ήταν απαραίτητη η συγκρότηση των κατάλληλων τεχνολογικών εργαλείων και η βελτιστοποίησή τους για την χρήση τους στο αντικείμενο μας.

## *Κεφάλαιο 2ο: Υλικά και μέθοδοι*

## 2.1 Παραγωγή αντισωμάτων

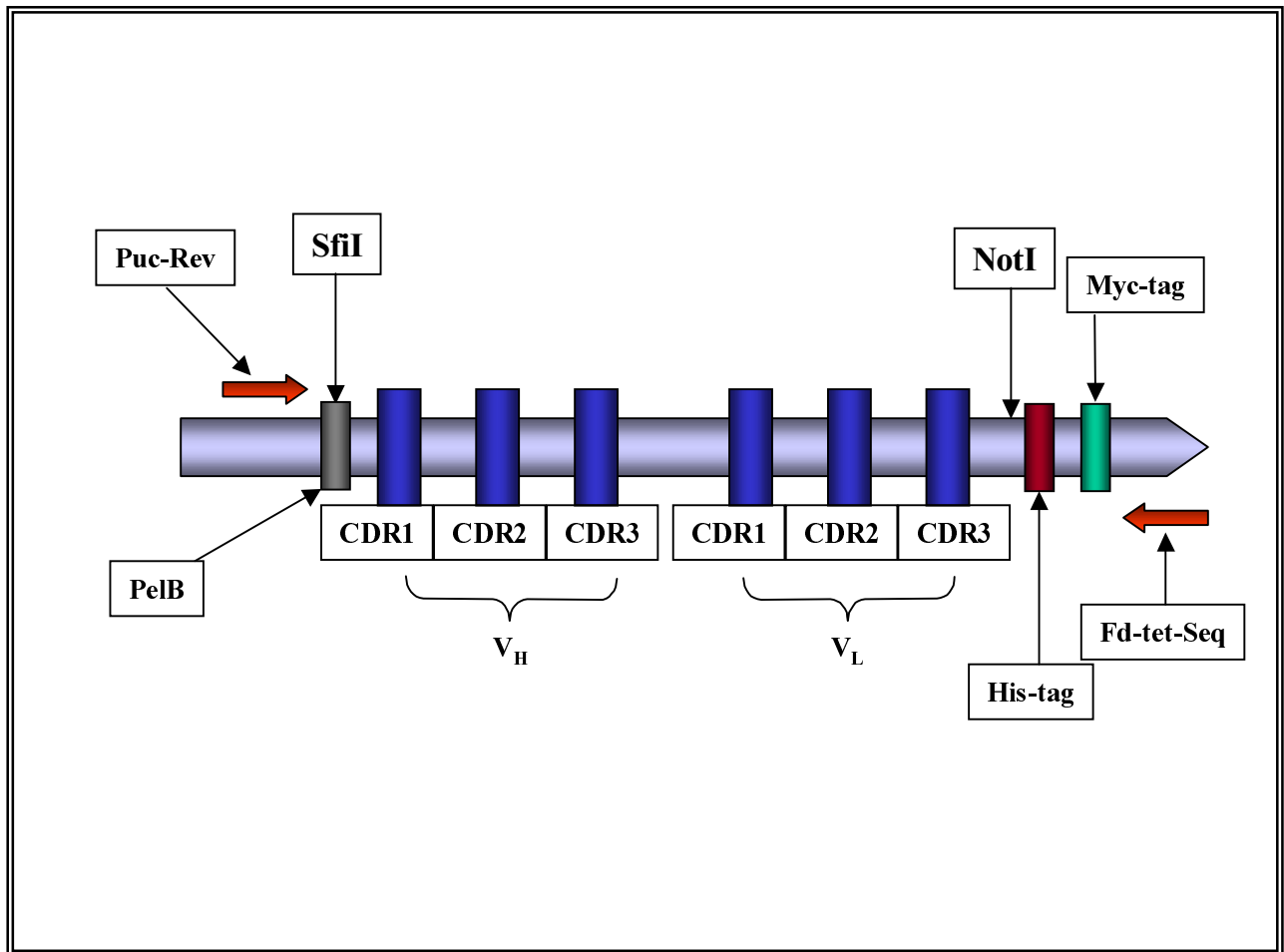
### 2.1.1 Πλασμίδια-Φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των scFv

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση γονιδίων scFv με σκοπό την παραγωγή τους είναι ο **pCANTAB-6**. Πρόκειται για ένα φαγεμίδιο το οποίο προέρχεται από το **pHEN-1** [Hoogenboom et al, 1991] το οποίο με την σειρά του είναι απόγονος του **puc-119** [Vieira et al., 1987]. Το pCANTAB-6 σε σχέση pHEN-1 διαφέρει στην ύπαρξη επιπλέον περιοριστικών θέσεων για την ευκολότερη υποκλωνοποίηση scFv αντισωμάτων. Επίσης το pCANTAB6 περιέχει και μια **εξαϊστιδινική ουρά (6 His-Tag)** κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του ενθέματος, που βοηθάει στον καθαρισμό της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή είναι σχεδιασμένο έτσι, ώστε να περιέχει ότι χρειάζεται για να μπορούν υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις τα scFv να παρουσιάζονται στην επιφάνια του φάγου μαζί με την **πρωτεΐνη 3 (pIII)**. Περιέχει ακόμα το γονίδιο που κωδικοποιεί το πεπτιδίο **pelB**, το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά της εκφραζόμενης πρωτεΐνης στο περίπλασμα του βακτηρίου για την ευκολότερη απομόνωση της, και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικυλλίνη. Αμέσως μετά την εξαϊστιδινική ουρά βρίσκεται το γονίδιο το οποίο προσθέτει στο καρβοξυτελικό άκρο του scFv τον επίτοπο **c-myc** ο οποίος αναγνωρίζεται από ένα ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα, το **9E10**.

Ο φορέας έχει κατάλληλες περιοριστικές θέσεις ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίηση scFv με τα περιοριστικά ένζυμα **sfiI** και **NotI**. Εξωτερικά των περιοριστικών θέσεων υπάρχουν οι αλληλουχίες αναγνώρισης των εκκινητών **fd-tet-Seq** και **puc-Reverse** όπως φαίνεται στο σχήμα 4.

### Σχεδιασμός scFv

Η δομή των scFv αναφέρεται στην εισαγωγή. Στο σχήμα 4 φαίνεται το τμήμα του φαγεμίδιου στο οποίο κλωνοποιείται κάθε scFv και η μοριακή οργάνωσή του.



**Σχήμα 4:** Οργάνωση του τμήματος του φαγεμίδιου που κωδικοποιεί το scFv. Στο σχήμα φαίνονται οι θέσεις των εκκινήτων fd-tet-Seq και puc-Reverse και η δομή του scFv. Το PelB είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το πεπτίδιο-σινιάλο για μεταφορά του scFv στο περίπλασμα, το His-tag την εξαΐστιδινική αλληλουχία και το c-myc την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα 9E10. Φαίνονται επίσης οι περιοριστικές θέσεις που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή των scFv (sfiI-NotI).

### 2.1.2 Επαγωγή των scFv σε υγρή καλλιέργεια κωνικής φιάλης

Συνήθως 50 ml καλλιέργειας παράγουν ποσότητα scFv για ικανοποιητικό αριθμό πειραμάτων, εφόσον αυτά παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα στους 4°C . Το παρακάτω πρωτόκολλο χρησιμοποιούνταν στις περισσότερες περιπτώσεις επαγωγής. Σε μερικές περιπτώσεις όπου συγκεκριμένο είδος κυττάρων παρουσίαζε προβλήματα ανάπτυξης στις συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιήσαμε, κάποιες μικρές αλλαγές (θερμοκρασία, χρόνος επώασης) έπρεπε να γίνουν. Ο σκοπός του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου ήταν να παραχθεί η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα σωστά διπλωμένου (λειτουργικού) scFv στο περίπλασμα. Η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε γιατί περιορίζει την έκφραση πρωτεϊνών από τον φορέα έκφρασης (pCANTAB-6) αφού υψηλά επίπεδα γλυκόζης 'κλείνουν' την μεταγραφή από τον εκκινητή **lacZ** του πλασμιδίου. Αυτό είναι απαραίτητο γιατί έχουμε χαμηλά επίπεδα έκφρασης έχουμε ακόμα και χωρίς την παρουσία του επαγωγέα **IPTG** (ισοπροπυλθειογαλακτοσιδάση) του συστήματος. Το IPTG είναι μην αναστρέψιμος καταστολέας του σιωπητή LacI γεγονός που απουσία γλυκόζης επάγει το σύστημα lacZ.

Οι καλλιέργειες έγιναν ως εξής:

1. Από στερεά καλλιέργεια σε πιάτο με 2XTY με Αμπικυλλίνη (50μg/ml) και 2% γλυκόζη (2XTYAΓ2%), μολύνουμε 50 ml υγρής καλλιέργειας 2XTY με Αμπικυλλίνη και 2% γλυκόζη και επωάζουμε στους 30°C για 18 ώρες.
2. Μια νέα κωνική φιάλη των 250 ml η οποία περιέχει 50 ml 2XTY Αμπικυλλίνη με 0.1% γλυκόζη (2XTYAΓ0,1%) εμβολιάζεται με 500μl από την καλλιέργεια αυτήν.
3. Επωάζουμε σε επιδαπέδιο επωαστήρα στους 37°C με ισχυρή ανάδευση (270 rpm) για περίπου 2 ώρες.
4. Μόλις η οπτική πυκνότητα στα 600 nm ( $OD_{600}$ ) της καλλιέργειας φτάσει ανάμεσα σε 0,75 και 0,8, μεταφέρουμε την καλλιέργεια στους 30°C (σε υδατόλουτρο) για να κατεβάσουμε άμεσα την θερμοκρασία. Μετά από 5 λεπτά επάγουμε την έκφραση των scFv προσθέτοντας IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και επωάζουμε για 4 ώρες.



5. Φυγοκεντρούμε στις 4.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Η πελέτα είναι έτοιμη για να χρησιμοποιηθεί με ένα από τα παρακάτω πρωτόκολλα για την εξαγωγή των scFv από το βακτηριακό περίπλασμα.

Αν επιθυμούμε να παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα scFv στο υπερκείμενο της καλλιέργειας ακολουθούμε την ίδια διαδικασία τροποποιώντας τον χρόνο επώασης στο στάδιο 4 σε 18 ώρες, γεγονός που προκαλεί την εξαγωγή των scFv στο υπερκείμενο.

### **2.1.3 Επαγωγή των scFv σε υγρή καλλιέργεια σε πλάκα καλλιέργειας 96-πηγαδιών**

1. Μεγαλώνουμε κατά την διάρκεια της νύκτας μια πλάκα με 96 πηγαδάκια που περιέχουν 100 μl 2XTY με Αμπικυλλίνη και 2% γλυκόζη. Η μόλυνση έχει γίνει από πιάτα με αποστειρωμένα ξυλάκια μόλυνσης (συνήθως αμέσως μετά από την επιλογή scFv με φάγους, βλέπε 2.4).
2. Ετοιμάζουμε μια πλάκα καλλιέργειας 96-πηγαδιών Costar με πηγαδάκια σχήματος U, βάζοντας 100 μl 2XTY με Αμπικυλλίνη και 0,1 % γλυκόζη, και από την πλάκα του σταδίου 1 μολύνουμε τα αντίστοιχα πηγαδάκια με πολυπιπέτα μεταφέροντας 1 μl.
3. Επωάζουμε στους 37°C για περίπου 4 ώρες υπό ισχυρή ανάδευση (250 rpm).
4. Σε 3 με 4 ώρες η οπτική πυκνότητα έχει φτάσει το 0,5 με 0,8 και οι συνθήκες και η συγκέντρωση των κυττάρων είναι κατάλληλες για την επαγωγή με IPTG (1mM τελική συγκέντρωση). Πριν προσθέσουμε το IPTG αφήνουμε για 10 λεπτά την πλάκα σε θερμοκρασία δωματίου για να πέσει η θερμοκρασία του θρεπτικού κοντά στους 30 °C .
5. Επωάζουμε στους 30°C για 12 με 18 ώρες υπό ισχυρή ανάδευση (250 rpm).
6. Φυγοκεντρούμε σε φυγόκεντρο Beckmann με τον ειδικό προσαρμοστή για πλάκες 96-πηγαδιών στις 4.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Λόγω του σχήματος των πηγαδιών, σχηματίζεται μια μικρή πελέτα στο κέντρο κάθε πηγαδιού, επιτρέποντας μας να αφαιρέσουμε επιλεκτικά μόνο το υπερκείμενο το οποίο έχει τα εκφραζόμενα scFv.
7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται με πολυπιπέτα σε πλάκα ELISA για την μέτρηση της περιεκτικότητας σε λειτουργικό scFv όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο 2.2.3 .

### 2.1.4 Απομόνωση των scFv με την τεχνική παγώματος-τήξης

Η τεχνική αυτή βασίζεται στο ότι διαδοχικές εναλλαγές παγώματος-τήξης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων προκαλεί αρκετά ρήγματα ώστε να διαρρεύσουν τα scFv από το περίπλασμα χωρίς την λύση του βακτηρίου.

Η καλλιέργεια (50 ml) διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 4°C για 30') σε υπερκείμενο και πελέτα. Οι πελέτες φυλάσσονται στους -20°C ή κατεργάζονται κατευθείαν ως εξής:

1. Ψύξη σε υγρό άζωτο (ή ξηρό πάγο με αιθανόλη) για 2 λεπτά.
2. Τοποθέτηση σε δοχείο με νερό και πάγο (4°C) για 8 λεπτά.
3. Επανάληψη του 1 και 2 τρεις φορές. Κατά την διαδικασία αυτή το περιπλασμικό περιεχόμενο των βακτηρίων ελευθερώνεται.
4. Προσθήκη στην πελέτα 300 $\mu$ l διαλύματος 20 mM Tris/HCl (pH=8.0) και ελαφρά ανακίνηση με το χέρι ή ομογενοποίηση με πιπέτα Pasteur.
5. Τοποθετούμε σε δοχείο νερού /πάγου για 30 λεπτά. Ανακινούμε περιοδικά.
6. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά σε 10.000g στους 4 °C.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο των 1.5 ml και επαναλαμβάνουμε το στάδιο 6 για την απομάκρυνση και των τελευταίων κυτταρικών υπολειμμάτων.
8. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο των 1.5 ml και προσθέτουμε PMSF (αναστολέας πρωτεασών) σε τελική συγκέντρωση 1 mM . Το δείγμα περιέχει το περιπλασμικό περιεχόμενο των βακτηρίων μαζί με το scFv που έχουμε εκφράσει στα βακτήρια, και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι την χρήση του. Αν πρόκειται να γίνει άμεση χρήση του, φυλάσσεται στους 4°C .

### 2.1.5 Απομόνωση των scFv με την τεχνική του οσμωτικού σοκ

Στην τεχνική αυτή έχουμε καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων από το οσμωτικό σοκ που προκαλεί η ύπαρξη του EDTA σε υπερτονικό διάλυμα (TES: 0,2M Tris-HCl, 0,5mM EDTA, 0,5 M σουκρόζη pH=8,0) και η άμεση αραιώση του σε παγωμένο διάλυμα μικρής οσμωτικής πίεσης (TES/H<sub>2</sub>O). Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται στο παρακάτω πρωτόκολλο ισχύουν για πελέτα που προέρχεται από 50 ml καλλιέργειας.

1. Απομακρύνουμε και τις τελευταίες σταγόνες υπερκειμένου και επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 530 ml παγωμένου TES. Επωάζουμε για 5 λεπτά σε πάγο ανακινώντας τακτικά με απαλές κινήσεις.
2. Μεταφέρουμε σε σωληνάριο των 1,5 ml τύπου erpendorf.
3. Ξεπλένουμε το άδειο σωληνάριο με 0,590 ml TES/H<sub>2</sub>O για να μαζέψουμε και τα υπόλοιπα βακτήρια και τα μεταφέρουμε στο σωληνάριο του σταδίου 2.
4. Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο.
5. Φυγοκεντρούμε σε 14.000 rpm για 2 λεπτά και μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο σε ένα νέο σωληνάριο των 1,5 ml τύπου erpendorf. Επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντριση για 10 λεπτά για την απομάκρυνση και των τελευταίων κυτταρικών υπολειμμάτων.
6. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο. Το υπερκείμενο περιέχει το περιπλασματικό περιεχόμενο των βακτηρίων.

Σε περίπτωση που θα επακολουθήσει κάποιο στάδιο καθαρισμού με κολώνα χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου, η πελέτα του σταδίου 5 επαναδιαλύεται σε 0,67 ml TES/5mM MgSO<sub>4</sub> και επωάζουμε στον πάγο για 20 λεπτά. Έπειτα φυγοκεντρούμε ξανά όπως στο στάδιο 5 και αναμειγνύουμε με το υπερκείμενο από τα στάδια 6.

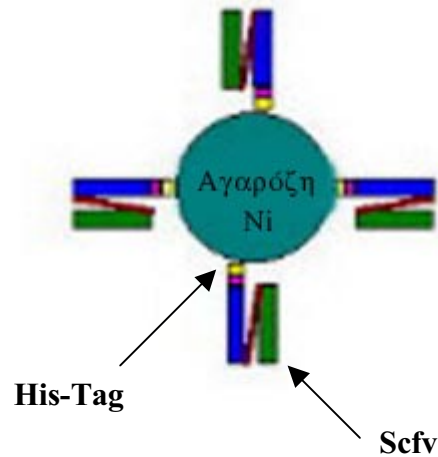
Για την απομάκρυνση του EDTA χρησιμοποιούμε την ειδική μεμβράνη διαπίδυσης και μοριακού αποκλεισμού.

### 2.1.6 Καθαρισμός scFv με κολώνα Ni-NTA

Η δυνατότητα της προσθήκης ενός πεπτιδίου στην πρωτεΐνη μας το οποίο επιτρέπει την ειδική πρόσδεση της σε υλικό χρωματογραφίας συγγένειας και παράλληλα δεν την επηρεάζει στο δίπλωμα της, μας λύνει το πρόβλημα τους καθαρισμού της από τις υπόλοιπες βακτηριακές πρωτεΐνες στα δείγματα μας. Η συγκεκριμένη πλασμιδιακή κατασκευή περιείχε το επιτόπιο His-Tag, δηλαδή μια εξαϊστιδινική ουρά κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης μας η οποία έχει υψηλή συγγένεια για χηλικές ενώσεις φορτισμένες με ιόντα νικελίου.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση το χρωματογραφικό υλικό ανήκε στην τυποποιημένη συσκευασία δοκιμασίας Qiaexpressionist της Qiagen. Αποτελείται από νικέλιο - NTA (Ni-NTA) ακινητοποιημένο σε κοκκία αγαρόζης. Για την απομόνωση των scFv από υπερκείμενο

καλλιέργειας ή βακτηριακό περίπλασμα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εγχειρίδιο της εταιρίας.



**Σχήμα 5:** Πρόσδεση scFv σε κοκκία αγαρόζης-Ni

Συνοπτικά :

1. Το δείγμα μας (υπερκείμενο ή βακτηριακό περίπλασμα) τοποθετείται σε μεμβράνη μοριακού αποκλεισμού (διαπίδυσης) και τοποθετείται για 4 ώρες σε 2 lt διαλύματος 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH=8.0, 300mM NaCl υπό έντονη ανάδευση με σκοπό την εξισορρόπηση της εσωτερικής συγκέντρωσης άλατος με την εξωτερική.
2. Αλλάζουμε το παραπάνω διάλυμα με φρέσκο και αφήνουμε πάλι για 4 ώρες υπό ανάδευση.
3. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2.
4. Για κάθε 4 ml αρχικού δείγματος προσθέτουμε 1 ml του 50% διαλύματος αγαρόζης Ni-NTA.
5. Το δείγμα τοποθετείται σε επιτραπέζιο περιστροφικό αναδευτήρα στους 4°C για 1 ώρα για να γίνει η πρόσδεση της πρωτεΐνης στην κολώνα.

6. Μεταφέρουμε το δείγμα σε κατάλληλη συσκευή στήριξης του χρωματογραφικού υλικού με το κάτω άκρο κλειστό.
7. Ανοίγουμε το άκρο για να απομακρυνθεί ότι δεν έχει προσδεθεί στην κολώνα.
8. Εκτελούμε δυο πλυσίματα με 4 ml διάλυμα πλύσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=8.0, 300mM NaCl, 20mM imidazole)
9. Εκλούουμε την προσδεμένη πρωτεΐνη 4 επί 0.5 ml διαλύματος έκλουσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=8.0, 300mM NaCl, 250mM imidazole)

Από όλα τα δείγματα κρατάμε μικρές ποσότητες για να τις τρέξουμε σε αναλυτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS, για να δούμε το ποσοστό καθαρισμού, καθώς και το ποσοστό ανάκτησης σε σχέση με την αρχική ποσότητα που φορτώσαμε στην κολώνα.

### **2.1.7 Συμπύκνωση διαλύματος scFv**

Το υπερκείμενο από καλλιέργεια scFv συμπυκνώνονταν με μονάδα υπερδιήθησης αερίου αζώτου με μεμβράνη μοριακού αποκλεισμού της Amicon. Το υπερκείμενο πριν συμπυκνωθεί φυγοκεντρώνταν 30 λεπτά σε 30.000 g στους 4 °C σε υπεφυγόκεντρο Sorval, για την απομάκρυνση του συνόλου των κυττάρων.

### **2.1.8 Σταθερότητα των scFv στους 37°C**

Τα πειράματα σταθερότητας στους 37°C πραγματοποιήθηκαν αφήνοντας στην θερμοκρασία αυτήν δείγματα scFv τόσο από υπερκείμενο καλλιέργειας όσο και από βακτηριακό περίπλασμα για 4, 8, 11, 13, 15, 17,19 και 21 ώρες. Κάθε δείγμα μόλις απομακρυνθεί από τους 37°C, φυλάσσονταν στους 4°C μέχρι την στιγμή που θα μετρήσουμε την ποσότητα λειτουργικού αντισώματος με ELISA.

## **2.2 Ανίχνευση ειδικότητας και πρόσδεσης των scFv με ELISA**

Τα παρακάτω πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση λειτουργικού scFv σε δείγματα από υπερκείμενο καλλιέργειας και βακτηριακού περιπλάσματος.

### 2.2.1 Πρωτόκολλο ELISA (κλασικό πρωτόκολλο)

1. Διαλύουμε το αντιγόνο σε διάλυμα επικάλυψης σε συγκέντρωση 1μg/ml και αφήνουμε στους 4°C για 18 ώρες.
2. Καλύπτουμε τις διαθέσιμες σε πρωτεΐνες θέσεις του υλικού της πλάκας προσθέτοντας 200 μl διαλύματος 1% BSA σε PBS (150 mM NaCl, 10 mM PB pH=7.4) και αφήνουμε στον ειδικό αναδευτήρα για πλάκες ELISA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της πλάκας και ξεπλένουμε τα πηγαδάκια 3 φορές με 0.05% tween σε απιονισμένο νερό.
4. Πραγματοποιούμε τις επιθυμητές αραιώσεις του δείγματος σε διάλυμα ανάλυσης (0.1% BSA σε PBS) και προσθέτουμε 100μl ανά πηγαδάκι. Συμπεριλαμβάνουμε θετικά και αρνητικά δείγματα ελέγχου (δείγματα με ήδη μετρημένη υψηλή ποσότητα λειτουργικού scFv και δείγματα από βακτήρια που δεν περιέχουν κλωνοποιημένο scFv αλλά έχουν περάσει από τις ίδιες διαδικασίες απομόνωσης του).
5. Επωάζουμε στους 37°C για 1 ώρα.
6. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της πλάκας και ξεπλένουμε τα πηγαδάκια 3 φορές με 0.05% tween σε απιονισμένο νερό.
7. Σε διάλυμα ανάλυσης προσθέτουμε στην κατάλληλη αραιώση το αντίσωμα που αναγνωρίζει το scFv μας και προσθέτουμε 100 μl ανά πηγαδάκι. Συνήθως χρησιμοποιούμε το 9E10 [Evan, 1985] σε αραιώση 1/2000 το οποίο αναγνωρίζει τον επίτοπο c-myc που βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του scFv.
8. Επωάζουμε στους 37°C για 1 ώρα.
9. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της πλάκας και ξεπλένουμε τα πηγαδάκια 3 φορές με 0.05% tween σε απιονισμένο νερό.
10. Πραγματοποιούμε την κατάλληλη αραιώση του συντηγμένου αντι-αντισώματος (conjugate) σε διάλυμα ανάλυσης και προσθέτουμε 100 μl ανά πηγαδάκι. Για το 9E10 (ποντικίσιο μονοκλωνικό) χρησιμοποιούμε ένα αντι-ποντικίσιο IgG

συζευγμένο με την υπεροξειδάση HRP (horse radish peroxidase, SIGMA) αντίσωμα σε αραίωση 1/2000.

11. Επωάζουμε στους 37°C για μια ώρα.
12. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της πλάκας και ξεπλένουμε τα πηγαδάκια 3 φορές με 0.05% tween σε απιονισμένο νερό.
13. Προσθέτουμε ανά πηγαδάκι 100 μl από διάλυμα 1:1 χρωμογόνου (τετραμεθυλοβενζιδίνη) και υποστρώματος ( $H_2O_2$ ) της HRP και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 με 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος.
14. Μόλις το διάλυμα στα πηγαδάκια πάρει ένα έντονο μπλε χρώμα σε περίπου 10 με 15 λεπτά (τόσο εντονότερο όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του scFv), σταματάμε την αντίδραση με 50 μl 4N  $H_2SO_4$ .
15. Μετράμε τις απορροφήσεις σε κατάλληλο φωτόμετρο για πλάκες ELISA στα 450 nm.

### 2.2.2 Πρωτόκολλο ELISA (πρωτόκολλο στρεπταβιδίνης)

Το παρακάτω πρωτόκολλο είναι το ήδη δημοσιευμένο [Henderikx et al, 1998] με μικρές τροποποιήσεις.

1. Διαλύουμε Biotin-BSA σε PBS σε τελική συγκέντρωση 2 μg/ml και προσθέτουμε 100 μl / πηγαδάκι σε πλάκα ELISA (Nunc-τύπου polysorp).
2. Επωάζουμε 1 ώρα στους 37 °C.
3. Πλένουμε 3 φορές με Tween 0,05% .
4. Διαλύουμε Streptavidin σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml σε PBS + 0,5% αποδιατεταγμένη ζελατίνη (degraded gelatin) και μοιράζουμε 100 μl / πηγαδάκι. Επωάζουμε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Πλένουμε 3 φορές με Tween 0,05%.
6. Αφήνουμε την πλάκα κατά την διάρκεια της νύκτας στους 4 °C ή προχωράμε στα επόμενα βήματα. (Η πλάκα δεν διατηρείται παραπάνω από 24 ώρες στους 4°C )
7. Διαλύουμε το βιοτινιλιωμένο μου αντιγόνο σε 2% Marvel PBS (MPBS) και μοιράζουμε 100 μl / πηγαδάκι.
8. Τοποθετούμε την πλάκα σε ελαφρά ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Πλένουμε 3 φορές με Tween 0,05%.

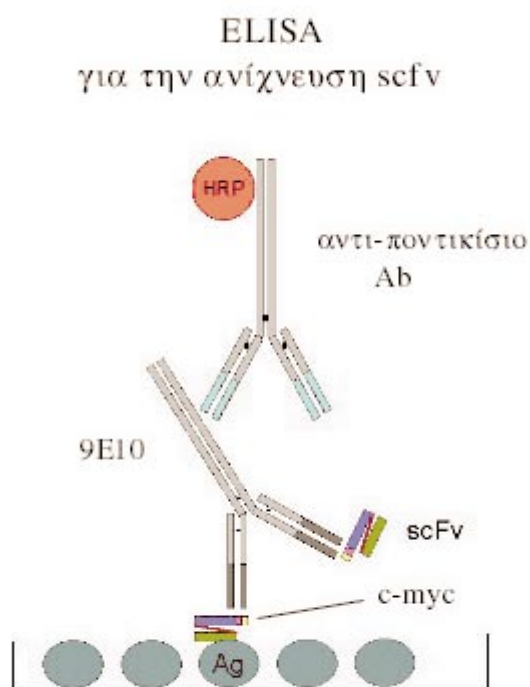
10. Διαλύουμε το προς μέτρηση αντίσωμα σε MPBS έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι πάντα 2% σε MPBS. Μοιράζουμε 100 μl / πηγαδάκι. Τα δείγματα συνήθως μετριοούνται δυο φορές για μεγαλύτερη ακρίβεια. Έτσι φορτώνονται 2 πηγαδάκια από κάθε δείγμα.
11. Επώαζουμε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Πλένουμε 3 φορές με Tween 0,05%.
13. Διαλύουμε το αντί-αντίσωμα που χρησιμοποιώ ανά περίπτωση (το 9E10 στην περίπτωση των scFv, σε αραιώση 1/2000) σε 2% MPBS και μοιράζουμε 100 μl / πηγαδάκι.
14. Επώαζουμε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Πλένουμε 3 φορές με Tween 0,05%.
16. Πλένουμε 1 φορά με nano-pure νερό.
17. Διαλύουμε αντίσωμα συζευγμένο με την **HRP** horse radish peroxidase (Conjugate) που αναγνωρίζει το (ποντικίσιο) 9<sup>E</sup>10 (anti-mouse IgG) σε 2% MPBS. (1/2000) και μοιράζουμε 100 μl / πηγαδάκι.
18. Επώαζουμε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Πλένουμε 3 φορές με Tween 0,05%.
20. Φτιάχνουμε διάλυμα 1:1 υποστρώματος-χρωμογόνου και μοιράζουμε 100 μl / πηγαδάκι.
21. Περιμένουμε περίπου 15 λεπτά έως τα πηγαδάκια να πάρουν το μπλε χρώμα που προκαλεί η αντίδραση της HRP με το διάλυμα υποστρώματος-χρωμογόνου. Τα πηγαδάκια με την μεγαλύτερη ποσότητα λειτουργικού scFv πρέπει να έχουν και περισσότερο έντονο χρώμα.
22. Σταματάμε την αντίδραση με 50 μl / πηγαδάκι 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
23. Μετράμε στον κατάλληλο φωτομετρητή ELISA στα 450 nm.

### **2.2.3 ELISA για την μέτρηση υπερκειμένου καλλιεργείων σε πλάκα καλλιέργειας 96-πηγαδιών**

Η διαδικασία είναι όμοια με αυτήν που περιγράφεται παραπάνω (2.2.2 ), με την διαφορά ότι στο στάδιο 10 έχουμε τοποθετήσει στο πηγαδάκι ήδη 50 μl 4% MPBS, ώστε με την μεταφορά (με πολυπιπέτα) 50 μl από την πλάκα στην οποία έχουμε επάγει τα scFv, να μας δώσει το τελικό 2% MPBS. Το υπόλοιπο πρωτόκολλο ακολουθείται όπως έχει.



Σχηματικά η μέθοδος δίνεται στο Σχήμα 6



**Σχήμα 6:** Ανίχνευση scFv με ELISA. Το ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα 9E10 αναγνωρίζει τον επίτοπο c-myc που περιέχουν τα ανασυνδυασμένα scFv.

## 2.2.4 ELISA ανταγωνιστικής εκτόπισης

Ένας τρόπος για να συγκρίνουμε δυο αντισώματα (ή scFv), όσο αφορά την συγγένεια με την οποία προσδένονται στο αντιγόνο τους είναι η ELISA ανταγωνιστικής εκτόπισης. Στηρίζεται στην προεπάση του αντισώματος με διαλυτό αντιγόνο πριν τοποθετηθεί στην πλάκα ELISA για την επάση σε ακινητοποιημένο αντιγόνο. Με τον τρόπο αυτόν όσο πιο

μεγάλη είναι η συγγένεια του αντισώματος για το αντιγόνο, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η μείωση της ποσότητας που τελικά θα προσδεθεί στην πλάκα και θα μετρηθεί από εμάς στο τέλος της διαδικασίας. Η τιμή συγκρίνεται πάντα με ένα δείγμα ελέγχου το οποίο δεν θα προεπωαστεί με διαλυτό αντιγόνο [Dahlenborg et al., 1996]. Η διαδικασία είναι η ίδια που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2 με προσθήκη ενός σταδίου προεπάσης σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά του scFv με διαλυτό αντιγόνο, το οποίο δεν θα πρέπει να είναι βιοτινιλωμένο. Ετοιμάζονται 4 διαφορετικά δείγματα για προεπάση: ένα με συγκέντρωση διαλυτού αντιγόνου 10 ng/ml, ένα με 100ng/ml, ένα με 1mg/ml, και ένα δείγμα χωρίς αντιγόνο. Η προεπάση γίνεται παρουσία 2%MPBS. Μετά τοποθετούνται ανά 100 μl ανά πηγαδάκι σε διπλές επαναλήψεις και συνεχίζει το πρωτόκολλο 2.2.2 από το στάδιο 13. Τα αποτελέσμα μας δίνουν μια πτωτική καμπύλη. Όσο πιο απότομη είναι αυτή τόσο μεγαλύτερη συγγένεια παρουσιάζει το συγκεκριμένο scFv για το αντιγόνο.

## 2.2.5 Παραγωγή πεπτιδίων-αντιγόνων για χρήση σε ELISA και επιλογή με βακτηριοφάγους

Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην κανονική και βιοτινιλωμένη τους μορφή για την χρήση τους σαν αντιγόνα, κατασκευάστηκαν με χημεία F-moc όπως έχει περιγραφεί προηγούμενα [Krambovitis et al., 1998]

Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. **muc-1** εικοσαμερές με αλληλουχία: PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP
2. **muc-1** εξηνταμερές με αλληλουχία: (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP)<sub>3</sub>
3. **muc-1** εκατονταμερές με αλληλουχία: (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP)<sub>5</sub>
4. **muc-2** με αλληλουχία: (TTTPITTTTTVTPTPTGTQTP)
5. **muc-3** με αλληλουχία: (TSSITTTGTTSHSTPSP)
6. **muc-4** με αλληλουχία: (VTDTSASTGHATPLP)
7. **Τέτανος** με αλληλουχία: (QYIKANSKFIGITEL)
8. **HIV-1** με αλληλουχία: (RKSIRIQRGPGRAFV)

Το κύριο αντιγόνο επιλογής μας για τις ELISA και την επιλογή με την παρουσίαση scFv σε φάγους ήταν το **muc-1** εκατονταμερές, πολυμερές του εικοσαμερούς. Τα άλλα δύο μικρότερα muc-1 πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση του με το εκατονταμερές το

οποίο πιστεύεται ότι έχει το κρίσιμο μέγεθος για να αποκτήσει μια στερεοδιάταξη που μοιάζει περισσότερο σε αυτήν της φυσικής βλεννίνης muc-1.

## 2.3 Μεταλλαξηγένεση των scFv

Παρακάτω αναλύονται τα πρωτόκολλα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή μεταλλαγών στο γονίδιο των scFv με σκοπό την δημιουργία βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων scFv.

### 2.3.1 Παραγωγή πλασμιδιακού DNA

Για την εξαγωγή πλασμιδιακού DNA από βακτήρια χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη συσκευασία δοκιμασίας της Qiagen, Qiagen plasmid midi prep με Qiagen-tip 100. Επίσης το κλασικό πρωτόκολλο της εξαγωγής με βράσιμο [Sambrook et al., 1989] χρησιμοποιούνταν όταν δεν χρειαζόμασταν μεγάλη καθαρότητα δείγματος.

### 2.3.2 Παραγωγή επιδεκτικών κυττάρων κατάλληλα για την δημιουργία βιβλιοθηκών

Η κατασκευή μιας βιβλιοθήκης όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 1.3) απαιτεί επιδεκτικά κύτταρα με δυνατότητα να μετασχηματίζονται πιο αποδοτικά από ότι απαιτείται για τις περισσότερες άλλες χρήσεις τις μοριακής βιολογίας. Τα συμβατικά επιδεκτικά κύτταρα που δημιουργούνται με τις κλασικές μεθόδους (πχ θερμικού σοκ) έχουν την ικανότητα από 1γ πλασμιδιακού DNA να δίνουν μέχρι  $10^7$  κύτταρα, που έχουν τουλάχιστον ένα αντίγραφο μέσα τους. Τα επιδεκτικά κύτταρα που χρησιμοποιούνται συνήθως όπου απαιτείται υψηλή επιδεκτικότητα παράγονται με την μέθοδο της δημιουργίας ηλεκτρικού παλμού (electroporation) και μπορούν και μας δίνουν μέχρι και  $10^{10}$  κύτταρα από την ίδια ποσότητα πλασμιδιακού DNA. Αυτό σημαίνει βέβαια ότι απαιτείται 1000 φορές μικρότερη ποσότητα DNA για την δημιουργία ίδιου αριθμού μελών (αποικιών) στην βιβλιοθήκη μας. Παρακάτω περιγράφεται το πρωτόκολλο το οποίο μετά τις απαραίτητες βελτιώσεις μας έδωσε υψηλής απόδοσης επιδεκτικά κύτταρα.

1. Βάζουμε καλλιέργεια κυττάρων XL-1Blue σε 2XTY χωρίς αντιβιοτικό να μεγαλώνουν κατά την διάρκεια της νύκτας (O/N). Το στέλεχος αυτό διαλεκτικέ μετά από δοκιμές και με κύτταρα TG-1, μια και μας έδωσε υψηλότερη απόδοση μετασχηματισμού. Βάζουμε νερό αποστειρωμένο και 10% γλυκερόλη στους 4°C για να βρίσκονται την επόμενη μέρη στην απαραίτητη θερμοκρασία λειτουργίας.
2. Ετοιμάζουμε μεγάλες φλάσκες με θρεπτικό 2XTY. Σε φλάσκα των 2 λίτρων τοποθετούμε περίπου 400-500 ml θρεπτικού.
3. Εμβολιάζουμε την παραπάνω φλάσκα από την O/N καλλιέργεια σε αραιώση 1/100. Τοποθετούμε στους 37 °C
4. Όταν η O.D.<sub>600</sub> της καλλιέργειας φτάσει στο 0.7-0.8 (**ποτέ >0.9**) την μοιράζουμε σε σωληνάρια Falcon των 50 ml και τα τοποθετούμε στο ψυχρό δωμάτιο (cold room) για περίπου 20 λεπτά μέχρι η θερμοκρασία τους να κατέβει στους 4°C. Ωστόσο τοποθετούμε τον απαιτούμενο αριθμό σωληναρίων των 1.5 ml στους -80°C έτσι ώστε όταν μοιραστούν τα κύτταρα να παγώσουν αμέσως. Όλη η παρακάτω διαδικασία πραγματοποιείται στο ψυχρό δωμάτιο.
5. Φυγοκεντρούμε στους 4°C, 2000 rpm για 10 λεπτά και πετάμε όλο το υπερκείμενο. Μετά τη φυγοκέντρωση τοποθετούμε τα κύτταρα σε πάγο και τα μεταφέρουμε στο ψυχρό δωμάτιο.
6. Βάζουμε 25 ml αποστειρωμένο νερό ανά σωληνάριο Falcon των 50 ml και προσεκτικά χωρίς να παίρνουμε πελέτα διαλύουμε περίπου την μισή ποσότητα κυττάρων με γυάλινη πιπέτα των 25 ml. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι 50 ml και διαλύουμε εντελώς την πελέτα ανακινώντας και κτυπώντας ελαφρά το σωληνάριο. Τα κύτταρα δεν πρέπει να παραμένουν έξω από τον πάγο περισσότερο από 1-2 min.
7. Φυγοκεντρούμε 2800 rpm για 10 λεπτά.
8. Πετούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 25 ml (μισό όγκο) νερό. Επαναδιαλύουμε την πελέτα ανακινώντας ελαφρά και επαναφυγοκεντρούμε στις 2800 rpm για 10 λεπτά.
9. Πετούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ανά σωληνάριο Falcon των 50 ml, 1 ml 10% γλυκερόλη. Ανακινούμε χωρίς να αναποδογυρίζουμε τα σωληνάρια για να διαλυθεί η πελέτα. Συγκεντρώνουμε όλα τα κύτταρα σε ένα σωληνάριο και φυγοκεντρούμε ξανά στις 2800 rpm για 10 min.
10. Πετούμε όσο υπερκείμενο μπορούμε και προσθέτουμε 1,5 ml 10% γλυκερόλη για κάθε 1 ml πελέτας.

11. Μοιράζουμε τα κύτταρα σε σωληνάρια των 1.5 ml (100 μl ανά σωληνάριο) και τα τοποθετούμε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
12. Για την εξακρίβωση της απόδοσης επιδεκτικότητας την οποία καταφέραμε να πετύχουμε πραγματοποιούμε έναν δοκιμαστικό μετασχηματισμό με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου χρησιμοποιώντας υπολογισμένη ποσότητα πλασμιδιακού DNA. Συμπεριλαμβάνουμε και ένα πιάτο στο οποίο έχουμε τοποθετήσει επιδεκτικά κύτταρα τα οποία δεν έχουμε μετασχηματίσει με DNA σαν αρνητικό έλεγχο, όπου κανονικά δεν πρέπει να δώσουν αποικίες.

### 2.3.3 Μετασχηματισμός πλασμιδιακού DNA σε επιδεκτικά κύτταρα

1. Προετοιμασία: παγώνουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες, τις ειδικές κυψελίδες μετασχηματισμού Gene Pulser/E.Coli της Bio-RAD και το θρεπτικό που θα χρησιμοποιήσουμε (2XTY με 2% γλυκόζη), τοποθετώντας σε πάγο 30 λεπτά πριν την έναρξη της διαδικασίας.
2. Τοποθετούμε στον πάγο για να ξεπαγώσουν αργά, επιδεκτικά κύτταρα που δημιουργήθηκαν με το πρωτόκολλο 2.3.2 . Μόλις ξεπαγώσουν τοποθετούμε την απαραίτητη ποσότητα DNA και ανακατεύουμε προσεκτικά. Γενικά αποφεύγουμε να ακουμπάμε απευθείας την κυτταρική πελέτα.
3. Ρυθμίζουμε την ειδική συσκευή μετασχηματισμού Gene Pulser της Bio-RAD στα 1,7 Volt.
4. Μόλις όλα είναι έτοιμα μεταφέρουμε μέσα στην ειδική κυψελίδα 80 μl δείγματος DNA-κυττάρων (30 μl DNA και 50 μl κύτταρα) και σιγουρευόμαστε ότι το υγρό καλύπτει όλη την επιφάνεια της κυψελίδας που θα εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο. Απομακρύνουμε υπολείμματα υγρού από το εξωτερικό της κυψελίδας και την τοποθετούμε στην ειδική συσκευή μετασχηματισμού.
5. Παίρνουμε με μια πιπέτα Gilson 980 μl θρεπτικού και ενεργοποιούμε το πεδίο. Αμέσως ρίχνουμε το θρεπτικό στα μετασχηματισμένα κύτταρα. Τα μεταφέρουμε σε δοκιμαστικό σωλήνα τον οποίο τοποθετούμε σε επιδαπέδιο επωαστήρα στις 180 rpm στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα.
6. Απλώνουμε τα κύτταρα σε πιάτα με 2XTY με 2% γλυκόζη και αμικυλλίνη. Χρησιμοποιούμε ένα επιπλέον πιάτο όπου έχουμε απλώσει κύτταρα σε μεγάλη αραιώση ώστε την επόμενη μέρα να υπολογίσουμε την απόδοση του

μετασχηματισμού μας στην συγκεκριμένη βιβλιοθήκη που κατασκευάσαμε, μετρώντας τον αριθμό των αποικιών που θα πάρουμε.

### 2.3.4 Μεταλλαξηγένεση με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με πολυμορφικούς εκκινητές (degenerate primers)

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, ένας από τους τρόπους για την εισαγωγή μεταλλαγών στις CDRs περιοχές, είναι με την χρήση εκφυλισμένων εκκινητών. Η τεχνική αυτή διαλέχτηκε γιατί στο στάδιο που βρισκόμαστε δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τα ποία αμινοξέα είναι κρίσιμης σημασίας για την αλληλεπίδραση με το αντιγόνο ώστε να μπορούμε να προχωρήσουμε σε συγκεκριμένες αλλαγές. Η δυνατότητα της επιλογής με την παρουσίαση scFv σε φάγους μας εξασφαλίζει ότι τα καλύτερα αντισώματα που περιέχονται στην βιβλιοθήκη που θα δημιουργήσουμε θα επιλεγούν σαν ποιο ικανά να προσδεθούν στο αντιγόνο μας ( muc-1 εκατονταμερές). Για τον εκφυλισμό των εκκινητών διαλέχτηκε η τακτική του κωδικονίου NNS, [Lowman et al., 1993] [Barbas III et al., 1992] [Barbas et al., 1994] (όπου N οποιοδήποτε βάση και S γουανίνη ή κυτοσίνη) το οποίο κωδικοποιεί όλα τα αμινοξέα και μόνο ένα κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης το οποίο μάλιστα σε βακτηριακά στελέχη όπως το XL-1Blue δεν αναγνωρίζουν σαν κωδικόνιο τερματισμού.

Η στρατηγική που ακολουθήσαμε βασίζεται στην δημιουργία δυο προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 8, το ένα από τα δύο προϊόντα λόγω της χρήσης του πολυμορφικού εκκινητή είναι πλήρως εκφυλισμένο στο συγκεκριμένο CDR. Το δεύτερο χρησιμοποιείται για να μπορέσουμε με την χρήση των εξωτερικών εκκινητών muc-Reverse και fd-tet-Seq, να πάρουμε το πλήρους μήκους προϊόν. Αυτό επιτυγχάνεται με το να έχει μια περιοχή ομόλογη με τον εκφυλισμένο εκκινητή. Έτσι στο στάδιο **συγκρότησης**, όπως το ονομάζουμε, τα δύο προϊόντα υβριδίζονται δημιουργώντας ένα το οποίο με τους εξωτερικούς εκκινητές θα μας δώσει το τελικό προϊόν. Επομένως για κάθε CDR είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός δυο εκκινητών.

Το scFv το οποίο χρησιμοποιήσαμε σαν μήτρα για τις μεταλλαγές είναι το **10A**, το οποίο έχει προέλθει από επιλογή με παρουσίαση scFv με φάγους από μια μεγάλη άωρη βιβλιοθήκη scFv μεγέθους  $6 \times 10^9$ , και αναγνωρίζει ειδικά το καρκινικό αντιγόνο muc-1 με το οποίο και επιλέχτηκε [Henderikx et al., 1998].

Οι εκκινητές κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Η ακολουθία των βάσεων τους φαίνεται στον πίνακα 1

Όνομα εκκινητή	Νουκλεοτιδική ακολουθία (5'-3')
VH1(CDR1)	GGT GAA GCT GTA TCC AGA AGC C
VH2(CDR1)	G GCT TCT GGA TAC AGC TTC ACC NNS NNS NNS NNS NNS TGG GTG CGA CAG GCC CCT GG
VH3(CDR2)	TCC CAT CCA CTC AAG CCC TTG TCC GGG CTT GAG TGG ATG GGA NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS
VH4(CDR2)	NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS AGG GTC ACC ATG ACC TGG G
Fd-tet-Seq	TTT GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT
puc-R	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA

Πίνακας 1

Οι αντιδράσεις χωρίζονται σε 3 στάδια.. Στο πρώτο παράγουμε τα προϊόντα A και B για κάθε CDR. Στο δεύτερο πραγματοποιείται η συγκρότηση τους ενώ στο τρίτο το πλήρους μήκους προϊόν αυξάνει σε αριθμό. Στον πίνακα παρακάτω περιγράφονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης που αντιστοιχούν στα παραπάνω στάδια. Η επιλογή των CDR1 και CDR2 έγινε αφού εικάζεται ότι το CDR3 της βαριάς αλυσίδας παίζει ρόλο κυρίως για την ειδικότητα και όχι τόσο στην συγγένεια του αντισώματος.

Αντιδραστήριο	Αντίδραση 1				Αντίδραση 2	Αντίδραση 3
	Προϊόν A CDR1	Προϊόν B CDR1	Προϊόν A CDR2	Προϊόν B CDR2	(ξεχωριστά για κάθε CDR)	(ξεχωριστά για κάθε CDR)
Νερό						
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (10X)	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	2 μl	5 μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	1 μl	2,5 μl
dNTPs (10mM)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
Fd-tet-seq (10μM)		2.5 μl		2.5 μl		2.5 μl
Ruc-Rev (10μM)	2.5 μl		2.5 μl			2.5 μl
Εκκινητής VH1 (10μM)	2.5 μl					
Εκκινητής VH2 (10μM)		2.5 μl				
Εκκινητής VH3 (10μM)			2.5 μl			
Εκκινητής VH4 (10μM)				2.5 μl		
DNA	10A πλασμίδιο (100ng)	10A πλασμίδιο (100ng)	10A πλασμίδιο (100ng)	10A πλασμίδιο (100ng)	100ng από κάθε προϊόν αντ/σης 1	1 μl από την αντ/ση 2
Πολυμεράση (amplitaq) (5 unit/ μl)	0.4 μl	0.4 μl	0.4 μl	0.4 μl	0,2 μl	0.4 μl
Συνολικός όγκος	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	20 μl	50 μl
Συνθήκες αντίδρασης	94°C (1') 55°C (1') 72°C (2')	94°C (1') 55°C (1') 72°C (2')	94°C (1') 55°C (1') 72°C (2')	94°C (1') 55°C (1') 72°C (2')	94°C (1') 50°C (1') 72°C (2')	94°C (1') 60°C (1') 72°C (2')
Κύκλοι	30	30	30	30	25	25

Πίνακας 2



Ειδικά η αντίδραση 1, επωάζεται στους 94°C για 6 λεπτά πριν βάλουμε και την πολυμεράση στο σωληνάριο ώστε να αποδιαταχτεί πλήρως το πλασμιδιακό DNA. Για την αποφυγή της εξάτμισης του μείγματος της αντίδρασης τοποθετούνται σε κάθε σωληνάριο και 30 μl παραφινέλαιου.

### 2.3.5 Μεταλλαξηγένεση με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με επαγωγή λαθών (Error prone PCR)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενδογενή ιδιότητα της DNA πολυμεράσης να πραγματοποιεί λάθη κατά την αντιγραφή του DNA με κάποια συγκεκριμένη συχνότητα. Γνωρίζοντας ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες (πχ αυξημένη συγκέντρωση ιόντων  $Mn^{++}$ ) επιταχύνεται η λειτουργία της πολυμεράσης και παράλληλα πραγματοποιεί περισσότερα λάθη, μπορούμε να την χρησιμοποιήσουμε για την εισαγωγή τυχαίων μεταλλαγών σε κάποιο γονίδιο της επιλογής μας. Με τα υπάρχοντα πρωτόκολλα [Ausubel et al., 1996] μπορούμε να προκαλέσουμε μέχρι και 1 λάθος σε κάθε 1000 βάσεις του DNA. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήσαμε τους ακραίους εκκινητές puc-Rev και fd-tet-seq για να εισάγουμε τυχαίες μεταλλαγές σε ολόκληρο το γονίδιο του scFv. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε στο πλασμίδιο pCANTAB-6 το οποίο περιείχε κλωνοποιημένο το scFv 10A. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφεται το πρωτόκολλο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με επαγωγή λαθών.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Νερό	Μέχρι τα 100 μl
Εκκινητής fd-tet-Seq	3 μl
Εκκινητής puc-Rev	3 μl
KCl (1M)	5 μl
Tris pH=8,3 (1M)	1 μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	28 μl
DTT (0,1M)	1 μl
DNTPs (25mM)	1 μl
MnCl <sub>2</sub> (5mM)	10 μl
Πολυμεράση (Amplitaq, 5u/μl)	1 μl
DNA (πλασμίδιο με το 10A)	100ng

Πίνακας 3

Το  $MnCl_2$  το προσθέτουμε τελευταίο πριν την πολυμεράση και ανακινούμε καλά το σωληνάριο. Μετά 10 λεπτά στους 95 °C όπου πραγματοποιείται η αποδιάταξη του πλασμιδίου η αντίδραση ακολουθεί το παρακάτω πρόγραμμα στο ειδικό μηχάνημα:

- 94 °C για 10 δευτερόλεπτα,
  - 45 °C για 30 δευτερόλεπτα
  - 72 °C για 30 δευτερόλεπτα,
- που επαναλαμβάνεται για 24 κύκλους.

### 2.3.6 Προετοιμασία ενθέματων scFv για κλωνοποίηση

Όλα τα ενθέματα απομονώνονται από πηκτή αгарόζης 1% με την τυποποιημένη συσκευασία δοκιμασίας της Qiaquick Gel extraction της Qiagen. Μετά την αντίδραση 1 (2.3.3) τα προϊόντα A και B από κάθε CDR καθαρίζονται από την πηκτή συμπυκνώνονται με το μηχάνημα ταχείας εξάτμισης κενού (speedvac) της Heto και χρησιμοποιούνται για την αντίδραση 2. Από αυτήν 1 μl χρησιμοποιούνται για την αντίδραση 3. Το προϊόν καθαρίζεται από την πηκτή και συμπυκνώνεται και κόβεται με τα κατάλληλα περιοριστικά (Sfi-I, Not-I) με τις συνθήκες που προτείνει η εταιρία (Minotech). Πρώτα κόβεται με το Sfi-I για 1,5 ώρες στους 50 °C και έπειτα με το Not-I για 1,5 ώρες στους 37 °C. Ο παρακάτω πίνακας περιέχει την σύσταση των αντιδράσεων:

Sfi-I (50 μl )		Not-I (25 μl )	
Νερό		Νερό	
NEB2	5λ	Not-I buffer	2,5 μl
DNA	1 μg	NaCl (1M)	5 μl
BSA (10mg)	0,5 μl	BSA (10mg)	0.25
Sfi-I (12u/ μl )	1 μl	Not-I (12u/ μl )	1 μl
50 °C x 1,5 ώρες		37 °C x 1,5 ώρες	

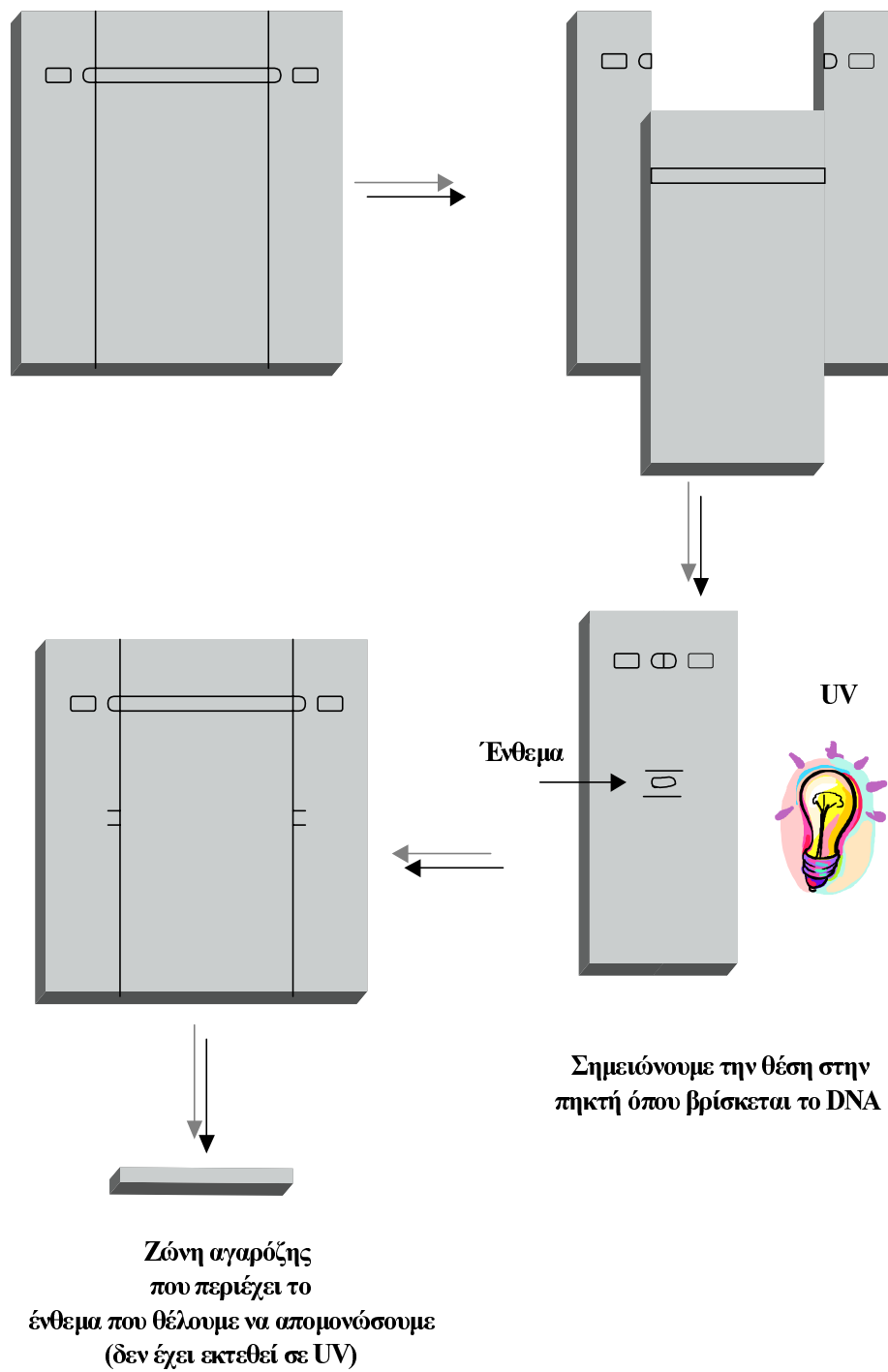
Πίνακας 4

Μετά την αντίδραση το κομμένο προϊόν καθαρίζεται από πηκτή αгарόζης, συμπυκνώνεται και χρησιμοποιούνται άμεσα για την κλωνοποίηση. Κάθε διαδικασία που περιλαμβάνει τον καθαρισμό από πηκτή γίνεται ως εξής: πρώτα φορτώνονται μια μικρή ποσότητα σε πηκτή για την επιβεβαίωση του σωστού μεγέθους του προϊόντος μας. Αν το μέγεθος και τα προϊόντα ήταν τα αναμενόμενα η υπόλοιπη ποσότητα φορτώνεται σε

πηγαδάκια ειδικά κατασκευασμένα για την απομόνωση μεγάλων ποσοτήτων DNA από αυτά. Τα πηγαδάκια αυτά είναι μεγαλύτερα σε πλάτος από τα κανονικά έτσι ώστε να μπορεί κανείς να αφαιρέσει τα άκρα τους καταναλώνοντας μικρή μόνο ποσότητα από το συνολικό προϊόν. Στο **σχήμα 8** αναλύεται η διαδικασία. Με τον τρόπο αυτόν αποφεύγουμε την έκθεση του ενθέματος μας στην υπερϊώδη ακτινοβολία η οποία προκαλεί κοψίματα στην αλυσίδα του DNA με αποτέλεσμα να έχουμε μειωμένη απόδοση στην δημιουργία μιας βιβλιοθήκης.

### 2.3.7 Προετοιμασία του pCANTAB-6 φορέα για κλωνοποίηση βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων ενθεμάτων scFv

Ο φορέας pCANTAB-6 απομονώθηκε από XL-1Blue κύτταρα με την τυποποιημένη συσκευασία δοκιμασίας της Qiagen plasmid midi prep με Qiagen-tip 100. Μικρή ποσότητα εξετάστηκε σε πηκτή αγαρόζης 0,7% για ποσοτικοποίηση και μετά πραγματοποιήθηκε η περιοριστική αντίδραση με τα ίδια ένζυμα όπως και τα ενθέματα, με ανάλογα μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμων. Η επιθυμητή ζώνη απομονώθηκε από πηκτή αγαρόζης 0,7% με τον τρόπο που αναφέρεται στο **σχήμα 7**. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε χαμηλά Volt για την καλή διαχώριση των διαφόρων ζωνών. Το DNA απομονώθηκε από την ζώνη αγαρόζης με ηλεκτροέκλυση και την τυποποιημένη συσκευασία δοκιμασίας Centricon της Amicon όπου αφήνει το δείγμα καθαρό. Έπειτα το δείγμα συμπυκνώνονταν με ισοβουτανόλη (η οποία αφυδατώνει το δείγμα) και καθαρίζονταν με φαινόλες/χλωροφόρμιο [Sambrook et al., 1989]. Το τελικό δείγμα κατακρημνίζονταν με 100% αιθανόλη και θειικό αμμώνιο 3 M pH=5.2 [Sambrook et al., 1989]. Η επαναδιάλυση γίνονταν σε 2 μl ανά μg φορέα. 100ng από τον φορέα δοκιμάζονταν με κλωνοποίηση για την ικανότητα του να κυκλοποιείται (**self-ligation**) παρόλο την ασυμβατότητα υβριδισμού των άκρων του. Μετά από μετασχηματισμό με ηλεκτρικό παλμό μετράμε τον αριθμό των αποικιών που παίρνουμε και συμπεραίνουμε το ποσοστό του φορέα που μας δίνει αποικίες κατά μια κλωνοποίηση χωρίς ουσιαστικά να έχει δεχτεί το ένθεμα. Στην πράξη, παρουσία ενθέματος η αντίδραση της κλωνοποίησης μετατοπίζεται ακόμα περισσότερο προς την δημιουργία κυκλικών φορέων που δεν έχουν δεχτεί ένθεμα. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για να δούμε αν ο φορέας μας είναι κατάλληλος για να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μιας βιβλιοθήκης, συγκρίνοντας κάθε φορά τα αποτελέσματα που παίρνουμε με παλιότερες επιτυχημένες προσπάθειες. Αν ο φορέας είναι καλός χωρίζεται σε 1-2 μg ανά σωληνάριο και χρησιμοποιείται άμεσα ή φυλάσσεται στους -20 °C.



Σχήμα 7: Ασφαλής απομόνωση ζώνης DNA από πηκτική αγαρόξης

### 2.3.8 Δημιουργία βιβλιοθηκών scFv

Η προετοιμασία ενθεμάτων και φορέα γίνονται παράλληλα έτσι ώστε να είναι έτοιμα ταυτόχρονα, μια και η αποθήκευση ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες δεν τα προστατεύει απόλυτα από την σταδιακή φθορά. Η μοριακή αναλογία ενθέματος – φορέα που χρησιμοποιήσαμε σαν ποιο αποδοτική είναι 1 προς 4 αντίστοιχα. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήσαμε 1,5 με 2 μg φορέα με 100 ng ένθεμα. Η λιγάση και το ρυθμιστικό της διάλυμα ήταν της NEBs. Η αντίδραση είχε συνολικό όγκο 10 μl και επωάζονταν στους 16 °C για 12 με 18 ώρες. Μετά το DNA κατακρημνίζονταν και επαναδιαλύονταν σε 240 μl νερό. Το DNA μετασχηματίζονταν όπως αναφέρουμε παραπάνω (2.3.3 ) και χρησιμοποιούνταν 30 μl από το παραπάνω διάλυμα σε 50 μl επιδεκτικών κυττάρων. Για κάθε βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκαν 400 μl επιδεκτικών κυττάρων ( 8 μετασχηματισμοί).

### 2.3.9 Τρόποι ελέγχου της ποιότητας μια βιβλιοθήκης

Μετά την δημιουργία μιας βιβλιοθήκης πρέπει να ελεγχθεί το ποσοστό των αποικιών που περιέχουν ένθεμα, το μέγεθος της και η ποικιλομορφία της.

Το μέγεθος μετριέται πραγματοποιώντας κατάλληλη αραίωση στα μετασχηματισμένα κύτταρα, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει αναγωγή στην συνολική ποσότητα κυττάρων.

Για να υπολογίσουμε το ποσοστό των αποικιών που περιέχουν φορέα με ένθεμα, πραγματοποιούμε 10 αντιδράσεις πολυμεράσης με τους εξωτερικούς εκκινητές fd-tet-Seq και ruc-Rev σε 10 μοναδικές αποικίες. Αν το προϊόν έχει μέγεθος κοντά στις 1000bp τότε η συγκεκριμένη αποικία έχει φορέα με το ένθεμα. Αν το προϊόν έχει μέγεθος κοντά στις 250bp , τότε δεν έχει κλωνοποιηθεί ένθεμα στην αποικία αυτή.

Τέλος, μια ένδειξη για την ποικιλομορφία της βιβλιοθήκης μπορούμε να πάρουμε κόβοντας με το περιοριστικό ένζυμο **BstN-I**. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία CC(AT)GG.

Η αλληλουχία αυτή αντιπροσωπεύεται συχνά στο DNA. Έτσι κόβοντας μέρος του προϊόντος της παραπάνω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, παίρνουμε ένα πρότυπο ζωνών σε πηκτή αгарόζης. Ανάλογα με την ποικιλομορφία που έχουμε το πρότυπο αυτό θα είναι διαφορετικά σε μερικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σαν ένδειξη ύπαρξης ποικιλομορφίας και όχι για τον υπολογισμό της.

## 2.4 Επιλογή των βιβλιοθηκών scFv με παρουσίαση σε φάγους.

Παρακάτω θα αναλυθεί η μέθοδος επιλογής από μια βιβλιοθήκη με μεγάλο αριθμό scFv εκείνων που εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια με το αντιγόνο muc-1. Η πορεία χωρίζεται πειραματικά σε 2 κύρια στάδια : την ανάκτηση της βιβλιοθήκης των scFv, και την προετοιμασία των φάγων με την επιλογή.

### 2.4.1 Ανάκτηση της βιβλιοθήκης των scFv.

1. Μολύνουμε 50 ml θρεπτικού 2XTY με Αμπικυλλίνη και 2% γλυκόζη με 10 μl από την βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων scFv και επωάζουμε υπό ανάδευση 3 με 4 ώρες στους 37°C.
2. Όταν η οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub> φτάσει ανάμεσα στο 0,4 και 0,6 μεταφέρουμε 5 ml σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon των 50 ml. Προσθέτουμε 40 μl από τον βοηθητικό φάγο M13K07 (περίπου 10<sup>12</sup> μονάδες σχηματισμού σωματιδίων φάγου) που θα επιτρέψει το πακετάρισμα των φαγεμιδίων της βιβλιοθήκης.
3. Επωάζουμε στους 37°C σε υδατόλουτρο με περιοδική ανάδευση (περίπου ανά 5 λεπτά). Είναι σημαντικό να παραμένουν οι φάγοι που παράγονται στους 37°C γιατί αλλιώς χάνουν την ικανότητα να είναι μολυσματικοί.
4. Φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά στις 4000 rpm.
5. Αφαιρώ όλο το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 50 ml 2XTY με αμπικυλλίνη και καναμυκίνη (50 μg/ml) (χρειάζεται για τον βοηθητικό φάγο).
6. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για όλη την νύκτα υπό ανάδευση.

Παράλληλα βάζουμε να μεγαλώνουν και κύτταρα XL-1Blue σε 2XTY με τετρακυκλίνη (50 μg/ml τελική συγκέντρωση) που θα χρειαστούν την επόμενη μέρα.

Τώρα το σύνολο της μεταλλαγμένης βιβλιοθήκης μας έχει εκφραστεί στην επιφάνια των φάγων. Το επόμενο στάδιο είναι η απομόνωση και προετοιμασία των φάγων για την επιλογή.

## 2.4.2 Προετοιμασία φάγων και επιλογή

1. Η καλλιέργεια του σταδίου 6 του παραπάνω πρωτοκόλλου φυγοκεντρείται στις 4.000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon των 50 ml και προσθέτουμε 10 ml διαλύματος PEG 6000 με 2,5M NaCl.
3. Επωάζουμε σε πάγο για 1 ώρα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 4.000 rpm για 15 λεπτά για την καθίζηση των φάγων.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και η πελέτα επαναιωρείται σε 1 ml PBS, και μεταφέρουμε σε σωληνάριο των 1,5 ml τύπου ependdorf.
6. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 rpm για 2 λεπτά για την απομάκρυνση και των υπόλοιπων βακτηρίων.
7. Προσθέτουμε 200 μl διαλύματος PEG 6000 με 2,5M NaCl και αφήνουμε στον πάγο για 20 λεπτά.
8. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 rpm για 5 λεπτά και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
9. Επαναδιαλύουμε σε 1 ml PBS.

Αν χρειάζεται τα τελευταία βήματα καθαρισμού των φάγων από τα βακτήρια επαναλαμβάνονται.

10. Τα 500 μl τα κρατάμε για τον υπολογισμό του αριθμού εισόδου των φάγων στην επιλογή (**input**). Στα υπόλοιπα 500 μl των φάγων προσθέτουμε 500 μl από 4%MPBS και επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστροφικό αναδευτή για την εξισορρόπηση των φάγων.
11. Παράλληλα διαλύουμε 200 μl μαγνητικών σφαιριδίων καλυμμένων με στρεπταβιδίνη της **Dyna** (dynabeads) αρχικής συγκέντρωσης 10 mg/ ml σε 1 ml PBS. Τοποθετούμε σε περιστροφικό αναδευτή σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες για την εξισορρόπηση τους.
12. Αμέσως μετά μολύνουμε με 300 μl 30 ml καλλιέργειας 2XTY με τετρακυκλίνη και επωάζουμε στους 37°C . Τα κύτταρα φτάνουν σε οπτική πυκνότητα περίπου 0,4 με 0,6 μετά από 3 με 4 ώρες οπότε και θα τα χρησιμοποιηθούν σαν ξενιστές για τους φάγους μετά την επιλογή.
13. Στο τέλος της 1 ώρας του σταδίου 10 προσθέτουμε στους φάγους βιοτινιλιωμένο αντιγόνο muc-1 σε τελική συγκέντρωση 5 μg / ml , και επωάζουμε για 1 ώρα σε

θερμοκρασία δωματίου σε περιστροφικό αναδευτή. Εδώ πραγματοποιείται η πρόσδεση των βιοτινιλιωμένων αντιγόνων στα scFv των φάγων.

14. Χρησιμοποιούμε την ειδική μαγνητική υποδοχή για την ανάκτηση των μαγνητικών σφαιριδίων τα οποία επαναδιαλύονται σε 200  $\mu$ l MPBS. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα σφαιρίδια να συγκεντρώνονται σε μια λεπτή στοιβάδα στην μία πλευρά του σωληνάριου τύπου erenddorf. Αυτό μας επιτρέπει να απομακρύνουμε το υγρό (που περιέχει τα χαλαρά προσδεμένα μόρια που ξεπλένονται με τα πλυσίματα) χωρίς να αφαιρέσουμε σφαιρίδια και τους φάγους που είναι προσδεμένοι ειδικά πάνω σε αυτά.
15. Αναμειγνύουμε τα μαγνητικά σφαιρίδια με τους φάγους και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστροφικό αναδευτή αυστηρά για 15 λεπτά. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η πρόσδεση της βιοτίνης των αντιγόνων που έχουν προσδεθεί στα scFv των φάγων με την στρεπταβιδίνη των μαγνητικών σφαιριδίων.
16. Σε αυτό το στάδιο ξεκινούν τα πλυσίματα των φάγων για την απομάκρυνση των μην ειδικά προσδεμένων φάγων από τα μαγνητικά σφαιρίδια. Τα πλυσίματα πραγματοποιούνται τοποθετώντας τα σωληνάρια τύπου erenddorf στην ειδική μαγνητική υποδοχή. Σε κάθε πλύσιμο νέο σωληνάριο των 1,5 ml τύπου erenddorf χρησιμοποιείται. Ξεπλένουμε:
  - 5 φορές με MPBS,
  - 8 φορές με PBS με 0,1% tween και
  - 2 φορές με PBS.
17. Στο τέλος επαναδιαλύουμε τα σφαιρίδια σε 100  $\mu$ l PBS.
18. Τα 30  $\mu$ l τα κρατάμε στους 4°C και στα υπόλοιπα 70 προσθέτουμε 1 ml από κύτταρα XL1-Blue που βρίσκονται σε εκθετική φάση (από το στάδιο 12).
19. Πραγματοποιούμε αραιώσεις για τον υπολογισμό του αριθμού 'εξόδου' των φάγων από την επιλογή (**output**). Μεταφέρουμε σε 495  $\mu$ l θρεπτικού 2XTY 5 ml από τα 70  $\mu$ l της επιλογής (1/100 αραιώση). Από αυτά μεταφέρουμε 5  $\mu$ l σε επόμενο σωληνάριο των 1,5 ml τύπου erenddorf με 495  $\mu$ l 2XTY αραιώνοντας 1/10.000 τους φάγους. Συνεχίζουμε έτσι μέχρι και την αραιώση  $10^{-6}$ . Την ίδια τακτική ακολουθούμε και για την 'είσοδο' της επιλογής φτάνοντας όμως αυτήν την φορά μέχρι την αραιώση  $10^{-10}$ . Μόλις ολοκληρωθούν οι αραιώσεις, προσθέτουμε ανά σωληνάριο 500  $\mu$ l των παραπάνω XL1-Blue



(συμπεριλαμβανομένου και του σωληναρίου που περιέχει τα υπόλοιπα 495 μl με τους φάγους εξόδου), ανακινούμε και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37°C .

20. Στρώνουμε 10 ή 100 μl σε πιάτα με 2ΧΤΥΑΓ2% από τις παραπάνω αραιώσεις έτσι ώστε την επόμενη μέρα σε κάποια από τα πιάτα να έχουμε τέτοιο αριθμό αποικιών που να μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό φάγων εισόδου και εξόδου της επιλογής. Επίσης στρώνουμε σε ένα πιάτο και 100 μl από τα XL1-Blue κύτταρα για αρνητικό έλεγχο. Το κύριο μέρος της επιλογής το απλώνουμε σε 2 ή περισσότερα μεγάλα πιάτα με 2ΧΤΥΑΓ2% και την επόμενη μέρα μαζεύουμε τα κύτταρα με θρεπτικό 2ΧΤΥ (1 όγκος πελέτας κυττάρων, 2 όγκοι θρεπτικό, 1 όγκος 60% γλυκερόλη), και τα φυλάσσουμε στους -80°C.

Το επόμενο στάδιο είναι μια δεύτερη επιλογή η οποία πραγματοποιείται όπως παραπάνω, έχοντας αυτήν την φορά σαν βιβλιοθήκη έναρξης αυτήν που έχουμε μαζέψει από την πρώτη επιλογή. Υπολογίζουμε και πάλι τον λόγο εισόδου / εξόδου για την δεύτερη επιλογή και τον συγκρίνουμε με αυτόν της πρώτης. Από την σχέση αυτή υπολογίζουμε τον εμπλουτισμό που πραγματοποιήθηκε κατά την δεύτερη επιλογή. Η πληροφορία αυτή μας δίνει μια πρώτη εκτίμηση για το αν πράγματι η πρώτη επιλογή μας έδωσε κάποια ειδικά scFv τα οποία θα αποτελούσαν και την πλειοψηφία της εισόδου της δεύτερης. Έτσι αν η δεύτερη επιλογή έχει μικρότερο λόγο εισόδου / εξόδου από την πρώτη αυτό σημαίνει ότι έχουμε εμπλουτισμό σε ειδικές αλληλουχίες. Η διαδικασία της επιλογής επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί για να φτάσουμε σε έναν σχετικά μικρό αριθμό επιλεγμένων και ειδικών scFv. Μπορούμε σε κάθε διαδοχική επιλογή να μειώνουμε την ποσότητα του αντιγόνου που χρησιμοποιούμε αναγκάζοντας έτσι τους φάγους με τα scFv να ανταγωνιστούν για λιγότερες αντιγονικές θέσεις. Έτσι μόνο τα scFv με την υψηλότερη συγγένεια για το αντιγόνο θα επιλεχθούν.

Από τα πιάτα που χρησιμοποιήσαμε για τον υπολογισμό του αριθμού εξόδου της κάθε επιλογής μολύνουμε πιάτα καλλιέργειας 96-πηγαδιών μεταφέροντας μια αποικία κάθε φορά σε ένα πηγαδάκι. Τα πηγαδάκια περιέχουν 2ΧΤΥΑΓ2% και από αυτά μετά μιας νύκτας επώαση στους 30°C υπό ανάδευση, πραγματοποιούμε μια αραιώση 1/50 σε νέα πλάκα καλλιέργεια 96-πηγαδιών σχήματος U με σκοπό την επαγωγή και παραγωγή των νέων scFv. Το πρωτόκολλο αυτό περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3 Ακολουθούν πειράματα σύγκρισης των νέων scFv που επιλέχθηκαν από την μεταλλαγμένη βιβλιοθήκη με ELISA αναστολής (2.2.4 ) και τέλος επιλέγουμε τα στελέχη που θα σταλούν για τον χαρακτηρισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.



## *Κεφάλαιο 3ο: Αποτελέσματα-Συμπεράσματα*

### 3.1 Επιλογή και προσαρμογή τεχνικών για την παραγωγή scFv

Πριν φτάσουμε στο σημείο να δημιουργήσουμε νέα scFv πρέπει προηγουμένως να έχουμε στην διάθεση μας όλα τα τεχνολογικά εργαλεία που θα μας επιτρέψουν να υπολογίζουμε την ειδικότητα και την συγγένεια τους για να μπορούμε, συγκρίνοντας τα με ήδη μελετημένα scFv, να κάνουμε εκτιμήσεις για τις δυνατότητες τους. Καταρχήν πρέπει να διαθέτουμε ένα σύστημα έκφρασης που θα μας παρέχει αρκετή ποσότητα scFv για την εκτέλεση των διαδικασιών χαρακτηρισμού. Στην συνέχεια είναι απαραίτητη μια μέθοδος απομόνωσης των scFv από τις άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες. Εφόσον το ζητούμενο είναι η επέμβαση μας στην συγγένεια του scFv για το αντιγόνο, πρέπει να μπορούμε να υπολογίζουμε την λειτουργική ποσότητα των scFv σε ένα δείγμα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της ειδικότητας και της συγγένειας ανάμεσα σε διαφορετικά scFv. Έχοντας όλα αυτά τα εργαλεία μπορούμε να υπολογίσουμε τις δυνατότητες ενός καινούργιου scFv και να εκτιμήσουμε την βελτίωση που επιτύχαμε στην συγγένεια του σε σχέση με το 'μητρικό' scFv.

#### 3.1.1 Επαγωγή των scFv σε υγρή καλλιέργεια

Τα scFv όπως και άλλες πρωτεΐνες που εισάγονται σε *E. Coli*, δεν είναι φυσιολογικές για το βακτήριο, το οποίο προσπαθεί να διακόψει την έκφραση τους με την χρήση μηχανισμών που τις καταστρέφουν. Γι 'αυτό πραγματοποιούμε την έκφραση σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (μικρότερη των 30°C), όπου το βακτήριο υπολειτουργεί, και έχουμε την ελαχιστοποίηση του φαινόμενο αυτού. Έτσι ενώ η μόλυνση της καλλιέργειας γίνεται στους 37°C, η επαγωγή του συστήματος γίνεται στους 28 με 30 °C. Ένα σημείο που όπως αποδείχτηκε επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της έκφρασης, είναι η θερμοκρασία του θρεπτικού την στιγμή που τοποθετείται το IPTG. Πρέπει να έχουμε σιγουρευτεί ότι ήδη έχει κατέβει στους 30°C. Σε τέτοιες θερμοκρασίες το scFv δεν είναι πολύ τοξικό για τα βακτήρια με αποτέλεσμα να μην τους δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην ανάπτυξη τους. Μετά την επαγωγή τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με πολύ αργότερους ρυθμούς, αφού απασχολούν τους μηχανισμούς παραγωγής των πρωτεϊνών τους για δημιουργία των scFv. Έτσι, για να έχουμε ικανοποιητική παραγωγή πρωτεΐνης πρέπει στο στάδιο που τα επάγουμε να έχουμε ήδη ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων. Παράλληλα όμως δεν θα πρέπει η συγκέντρωση των βακτηρίων να έχει περάσει την εκθετική φάση ανάπτυξής τους, γιατί θα υπάρχει μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Έτσι μετά από δοκιμαστικές επαγωγές σε διάφορες συγκεντρώσεις

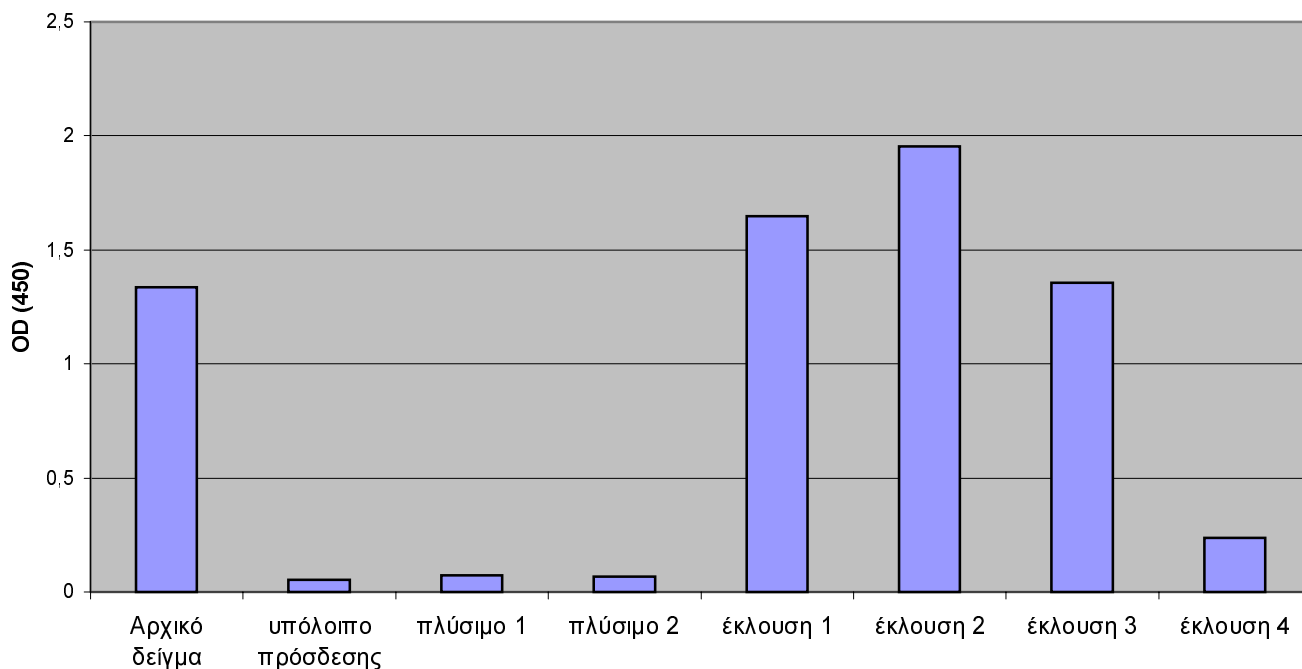
βακτηρίων, επιλέξαμε να επάγουμε το σύστημα σε OD<sub>600</sub> μεταξύ 0,8 και 0,9 που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα δειγμάτων μετρημένων σε ELISA.

### 3.1.2 Απομόνωση και καθαρισμός των scFv.

Για την απομόνωση των scFv από το περίπλασμα των βακτηρίων, δύο είναι οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται: η μέθοδος του παγώματος-τήξης (2.1.4) [Hecht et al., 1994] και η μέθοδος του οσμωτικού σοκ [Davis et al., 1980] (2.1.5). Αν και οι δύο μέθοδοι δίνουν παρόμοια αποτελέσματα όταν τα παραγόμενα δείγματα μετριοούνται σε ELISA, η μέθοδος του οσμωτικού σοκ μας επιτρέπει τον καθαρισμό μεγαλύτερων ποσοτήτων βακτηρίων, και παράλληλα σαν πιο ήπια μέθοδος (τα scFv δεν περνούν τις επαναλαμβανόμενες φάσεις παγώματος-τήξης) μας επιτρέπει να τα φυλάσσουμε για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4°C όπου διατηρούν καλύτερα την λειτουργικότητα τους.

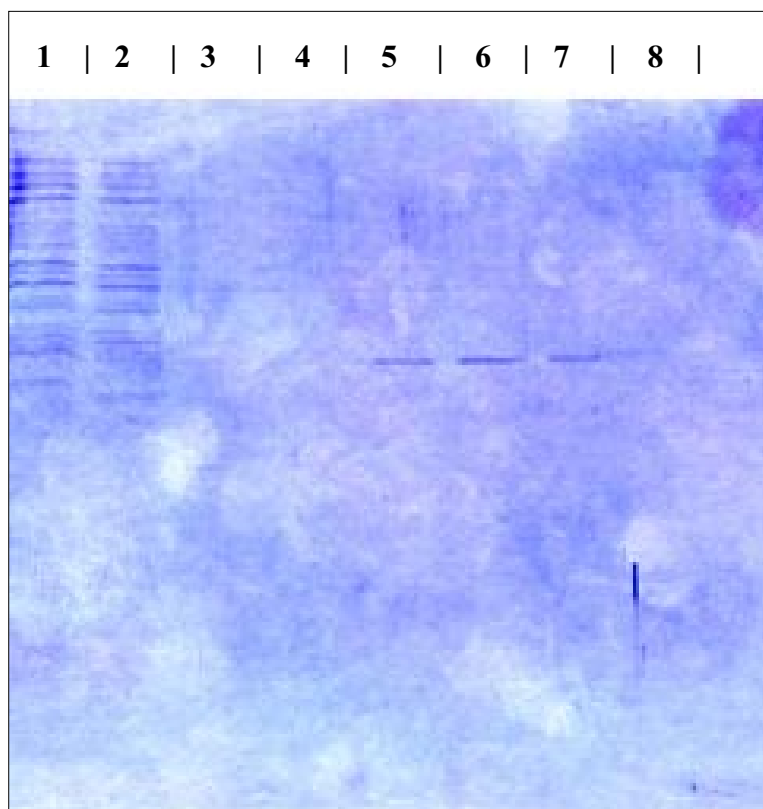
Μετά την διαδικασία του διαχωρισμού του περιπλασμικού περιεχομένου από τα κύτταρα, για επιπλέον καθαρισμό των δειγμάτων από τις υπόλοιπες περιπλασμικές πρωτεΐνες χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου που εκμεταλλεύεται την ύπαρξη της εξαϊστιδινικής ουράς στο καρβοξυτελικό άκρο του scFv. Δυο διαφορετικά πρωτοκόλλα δοκιμάστηκαν για την ικανότητα τους να καθαρίζουν δείγματα από περίπλασμα και υπερκείμενο καλλιέργειών scFv. Είναι οι τυποποιημένες συσκευασίες δοκιμασίας της Clonetech (Talon) και της Qiagen (Qiaexpressionist). Η κύρια διαφορά τους είναι ότι χρησιμοποιούν διαφορετικές χηλικές ενώσεις για να προσδέσουν το εξαϊστιδινικό πεπτίδιο. Μόνο με το χρωματογραφικό υλικό της Qiagen (2.1.6) καταφέραμε να απομονώσουμε την πρωτεΐνη μας γεγονός που μάλλον οφείλεται στο συγκεκριμένο σύστημα έκφρασης και απομόνωσης περιπλασμικού scFv που χρησιμοποιούμε. Στο **Σχήμα 8** παριστάνονται γραφικά οι τιμές που πήραμε με μέτρηση σε ELISA των διαφόρων κλασμάτων του καθαρισμού υπερκείμενου καλλιέργειας με την κολώνα.

Απορόφηση δειγμάτων των σταδίων καθαρισμού σε ELISA



**Σχήμα 8:** Τιμές απορρόφησης σε ELISA των σταδίων καθαρισμού του scFv 10A με κολώνα Ni-NTA. Τα δείγματα 'έκλουση 1', 'έκλουση 2', 'έκλουση 3' και 'έκλουση 4' που περιέχουν το σύνολο της εκλουόμενης πρωτεΐνης, έχουν συνολικά το 1/8 του όγκου του αρχικού μας δείγματος.

Στο **Σχήμα 9** βλέπουμε τα αντίστοιχα δείγματα σε πηκτική πολυακρυλαμίδης - SDS παρουσία μερκαπταιθανόλης. Τα δείγματα έχουν παραταχθεί με την ίδια σειρά με την οποία είναι και στο Σχήμα 8. Βλέπουμε στα πηγαδάκια 5, 6 και 7 ότι έχουμε επιτύχει έναν ικανοποιητικό εμπλουτισμό του δείγματος μας στο scFv 10A.



**Σχήμα 9:** Πηκτή πολυακρυλαμιδης -SDS με δείγματα από καθαρισμό του scFv 10A με κολώνα Ni-NTA. Στην διαδρομή 1 έχουμε το αρχικό δείγμα, στην 2 το υπόλειμμα πρόσδεσης της κολώνας. Στην 3 και 4 βλέπουμε τα δυο πλυσίματα της κολώνας. Στις διαδρομές 5, 6 και 7 έχουμε τα εκλούσματα 1,2 και 3 και βλέπουμε το scFv 10A σε μέγεθος ζώνης κοντά στα 30kd. Στο έκλουσμα 4 δεν βλέπουμε την αντίστοιχη ζώνη γεγονός που συμφωνεί και με τις μετρήσεις της ELISA.. Μέγεθος scFv  $\approx$  28kd.

### 3.1.3 Μέτρηση ποσοτήτων λειτουργικών scFv με ELISA

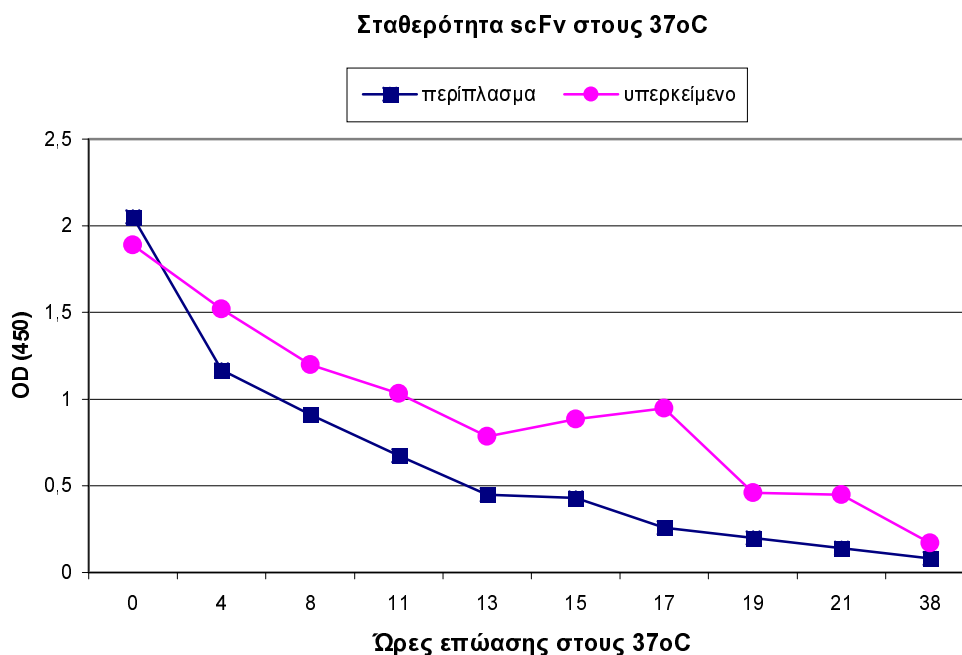
Κατά την παραγωγή των scFv στα βακτήρια ένα τμήμα μόνο από την παραγόμενη πρωτεΐνη θα πάρει τελικά την σωστή στερεοδιάταξη ώστε να δώσει ένα λειτουργικό scFv που θα μπορεί να αναγνωρίσει επιτυχώς το αντιγόνο του. Γι αυτό σε ένα δείγμα αυτό που μας ενδιαφέρει περισσότερο από την απόλυτη συγκέντρωση των scFv, είναι το λειτουργικό τους περιεχόμενο. Η μέθοδος της ELISA είναι ο καλύτερος τρόπος για να πραγματοποιηθούν

τέτοιου είδους μετρήσεις. Δυο πρωτόκολλα εξετάστηκαν για την ικανότητα τους να μας δίνουν αντιπροσωπευτικές μετρήσεις, χαμηλά επίπεδα 'θορύβου' (μη ειδικού σήματος) και καλή επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιήσαμε το κλασικό πρωτόκολλο της ELISA (2.2.1 ) με ένα πιο σύγχρονο που κάνει χρήση βιοτινιλιωμένων αντιγόνων (2.2.2 ). Στην περίπτωση μέτρησης scFv, το τελευταίο πρωτόκολλο αποδείχτηκε καλύτερο, αφού μας έδινε επίπεδα μη ειδικής πρόσδεσης χαμηλότερη του 2,5 % σε σχέση με τις ανώτερες τιμές, και παρουσίαζε υψηλή επαναληψιμότητα. Έτσι εφαρμόστηκε σε όλες τις περιπτώσεις μετρήσεων, συμπεριλαμβανομένης και της ανταγωνιστικής εκτόπισης. Η τελευταία, μετά από χρήση διαφόρων παραλλαγών της έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο (2.2.4 ).

Τέλος, στην προσπάθεια συλλογής περισσότερων πληροφοριών σχετικά με τις ιδιότητες των παραγόμενων scFv και τις πιθανές επιδράσεις που θα έχουν οι αλλαγές αμινοξέων στην σταθερότητα του μορίου, έγινε μια σειρά πειραμάτων για τον υπολογισμό της ανθεκτικότητας των scFv στους 37°C. Η ανθεκτικότητα στην θερμοκρασία αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας, αφού εάν αυτό χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς θα πρέπει να μπορεί να διατηρήσει για αρκετή ώρα την λειτουργικότητα του σε τέτοιες θερμοκρασίες ώστε να προλάβει να διεισδύσει στους ιστούς όπου εντοπίζονται τα αντιγόνα-στόχοι. Γενικότερα χρησιμοποιείται και σαν μέθοδος εκτίμησης της γενικότερης σταθερότητας του μορίου [Chowdhury et al., 1998].

Στο **Σχήμα 10** βλέπουμε τις απορροφήσεις που έδωσαν σε ELISA δείγματα που επωάστηκαν στους 37 °C για 0, 4, 8, 11, 13, 15, 17, 19, 21 και 38 ώρες. Παρατηρούμε ότι σε 8 ώρες τα δείγματα με το scFv 10A έχουν χάσει περίπου το 50% της λειτουργικότητας τους. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με την βιβλιογραφία παρατηρούμε ότι το 10A έχει σχετικά μικρή σταθερότητα [Chowdhury et al., 1998]. Πάντως ακόμα και αυτή η ανθεκτικότητα είναι αρκετή για την χορήγηση σε άνθρωπο, αφού η απομάκρυνση του από την κυκλοφορία πραγματοποιείται σε μικρότερο χρόνο.





Σχήμα 10: Σταθερότητα scFv 10A στους 37°C.

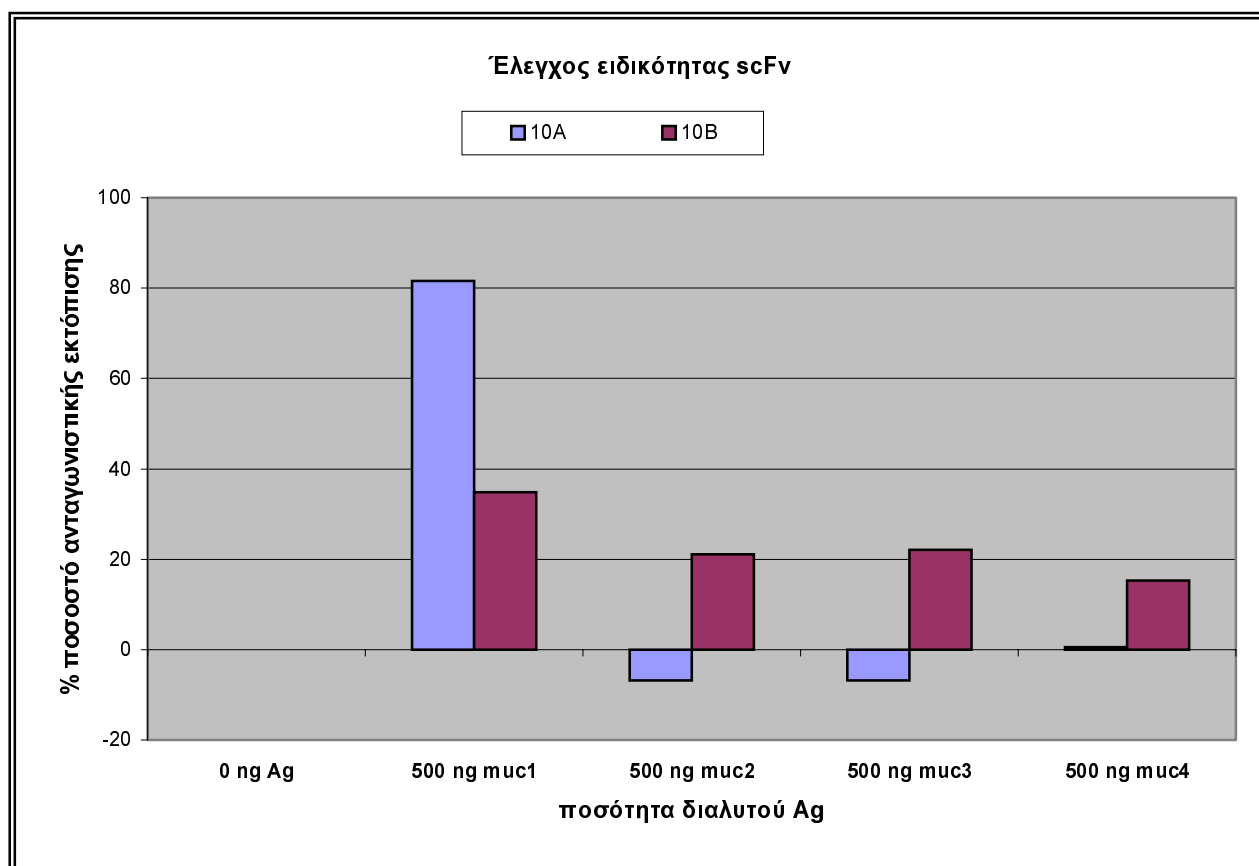
## 3.2 Απομόνωση νέων scFv

### 3.2.1 Επιλογή scFv για την εφαρμογή των μεταλλαγών

Αρχικά είχαμε μια σειρά από αντισώματα για το muc-1 από αυτά τα οποία έπρεπε να διαλέξουμε το πιο κατάλληλο για τα πειράματα μας. Τα scFv είχαν απομονωθεί χρησιμοποιώντας το 100μερές muc-1 από μια μεγάλη βιβλιοθήκη όπως έχει περιγραφεί [Henderikx et al., 1998]. Σύμφωνα με τα δεδομένα των πειραμάτων αυτών, τα καλύτερα από αυτά ήταν τα scFv 10A και 10B. Όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης τους, αυτή του 10B είναι μεγαλύτερη από αυτήν του 10A, αφού με καλλιέργεια στις ίδιες συνθήκες δίνει μέχρι και 10 φορές περισσότερη λειτουργική πρωτεΐνη όπως έδειξαν μετρήσεις με ELISA, και ανάλογα μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης όπως δείχνουν φωτομετρήσεις στα 280nm και Bradford. Για τον υπολογισμό της ειδικότητας και συγγένειας των scFv, και την μεταξύ τους σύγκριση εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανταγωνιστικής εκτόπισης όπως αυτή περιγράφεται

στην παράγραφο 2.2.4 . Στο **σχήμα 11** φαίνεται η μείωση στις τιμές των απορροφήσεων της ELISA που παρουσιάζουν τα scFv που έχουν προεπωαστεί με διαλυτό αντιγόνο σε αναλογία με την ποσότητα του. Η ποσότητα των 10A και 10B που μετρήθηκε έχει κανονικοποιηθεί για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Παρατηρούμε ότι η πτώση του 10A , εμφανίζεται ελαφρός πιο απότομη σε σχέση με το 10B, γεγονός που σημαίνει ότι το 10A προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια στο αντιγόνο [Dahlenborg et al., 1996].

Παράλληλα πραγματοποιήσαμε μια ELISA για την μελέτη της ειδικότητας που εμφανίζουν τα δυο scFv. Έτσι σε ένα πείραμα σχεδιασμένο όπως η ELISA ανταγωνιστικού εκτοπισμού, παράλληλα πραγματοποιήσαμε την προεπόαση και με ετερόλογες βλεννίνες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο **Σχήμα 11**.



**Σχήμα 11:** έλεγχος ειδικότητας των scFv 10A και 10B. Βλέπουμε ότι παρουσία μεγάλης ποσότητας αντιγόνων διαφορετικών από το αντιγόνο επιλογής muc-1, ενώ το 10A δεν επηρεάζεται το 10B εμφανίζει μέχρι και 20% ανταγωνιστικής εκτόπισης (500 ng muc-2, muc-3). Παράλληλα το 10A δείχνει ποσοστό εκτόπισης με το ειδικό αντιγόνο muc-1 μεγαλύτερο του 80%, ενώ στο 10B 30% αντίστοιχα.

Όπως βλέπουμε το 10A παρουσιάζει απόλυτη ειδικότητα για το αντιγόνο muc-1, μια και δεν επηρεάζεται ακόμα και από μεγάλη ποσότητα ετερόλογων αντιγόνων. Αντίθετα, το 10B, αναγνωρίζει τις διαφορετικές βλεννίνες με μικρότερη βέβαια συγγένεια. Αυτό συντελεί στην άποψη ότι το 10B είναι διαμορφωτικό scFv, δηλαδή αναγνωρίζει μια τρισδιάστατη διαμόρφωση και όχι μια αλληλουχία αμινοξέων όπως τα περισσότερα αντισώματα συμπεριλαμβανομένου και του 10A. Γι' αυτό και έχει χαμηλότερη ειδικότητα. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία επιλέχτηκε το 10A σαν το μητρικό scFv βάση του οποίου θα δημιουργούσαμε βιβλιοθήκες με αντι-muc-1 scFv. Αν και εκφράζεται σε χαμηλότερη ποσότητα, έχει υψηλότερη συγγένεια και ειδικότητα για το muc-1 από ότι το 10B. Εφόσον ο σκοπός μας είναι η αύξηση της συγγένειας για το muc-1, πρέπει το scFv που θα επιλεγεί να χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδικότητα για το αντιγόνο αυτό.

Μετά την επιλογή του 10A, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **Abcheck [Martin et al., 1996]**, το οποίο παρέχει μια υπηρεσία ελέγχου για αντισώματα και scFv. Το πρόγραμμα συγκρίνει τις μεταβλητές περιοχές τους με βάση τις 'κανονικές' δομές (1.2) των βάσεων δεδομένων που αναφέραμε. Για το 10A το πρόγραμμα έδειξε ότι δεν περιέχει 'ασυνήθιστα' αμινοξέα (αμινοξέα που δεν αναμένονται στην συγκεκριμένη θέση) αφού όλα τα αμινοξέα των μεταβλητών του περιοχών συναντιούνται στατιστικά πάνω από το 1% των μεταβλητών περιοχών που έχουν καταγραφεί στην αντισωματική βάση δεδομένων **Kabat [Martin et al., 1996]**.

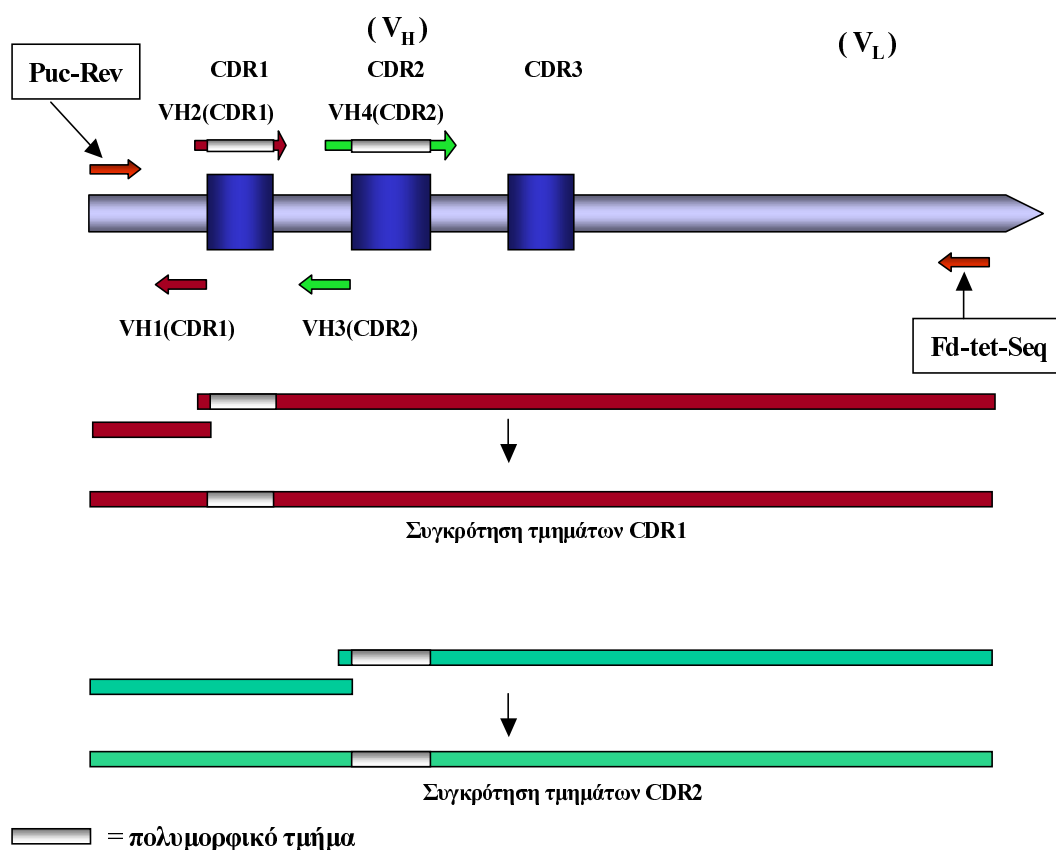
### 3.2.2 Επιλογή CDRs για μεταλλαξογένεση

Τα CDRs που επιλέχτηκαν ήταν τα CDR1 και CDR2 της βαριάς αλυσίδας. Διαλέξαμε CDRs της βαριάς αλυσίδας, αφού φαίνεται να πραγματοποιούν περισσότερες αλληλεπιδράσεις με το αντιγόνο από τα αντίστοιχα της ελαφριάς [**Charles et al., 1996**], [**Stanfield et al., 1993**]. Το CDR3 της βαριάς αλυσίδας είναι όπως αναφέρθηκε ήδη (1.2) το πιο πολυμορφικό CDR, δεν έχει 'κανονική' δομή και πραγματοποιεί τις περισσότερες επαφές με το αντιγόνο. Έτσι, θεωρώντας ότι οι ιδιότητες αυτές την χαρακτηρίζουν σαν πιθανή υπεύθυνη για την ειδικότητα προς το αντιγόνο, αποφασίσαμε να την διατηρήσουμε σταθερή. Με την ίδια λογική, αρκετά εργαστήρια επιθυμώντας να δημιουργήσουν scFv με νέες ειδικότητες, δημιουργούν βιβλιοθήκες με μεταλλαγές στην CDR3 της βαριάς αλυσίδας [**Pini**

et al., 1997], [Lewis et al., 1995], [Thompson et al., 1996], [Schier et al., 1996] [Barbas III et al., 1992] γεγονός που υποστηρίζει την στρατηγική μας αυτή.

### 3.2.3 Επιλογή εκκινητών για εισαγωγή μεταλλαγών στα CDRs

Λόγω της έλλειψης πληροφοριών για τα αμινοξέα που είναι σημαντικά στην αλληλεπίδραση του 10A με το muc-1, επιλέξαμε την τυχαία μεταλλαξογένεση των CDRs. Σχεδιάστηκε ένα σύστημα μεταλλαξογένεσης που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με την χρήση εκκινητών πλήρως εκφυλισμένων στην περιοχή που αντιστοιχεί στο CDR. Το αποτέλεσμα είναι το τμήμα του αυτό να κωδικοποιεί όλους τους δυνατούς συνδυασμούς αμινοξέων. Για την μεταλλαγή κάθε CDR, απαιτούνται τέσσερις εκκινητές (**Σχήμα 12**). Δυο νέοι εκκινητές σχεδιάστηκαν για κάθε CDR με ομολογία σε περιοχές του CDR1 και CDR2, όπως αναφέρεται στα υλικά και μεθόδους στην παράγραφο 2.3.4 . Επίσης δύο εμπορικοί χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) οι οποίοι ήταν κοινοί για τις αντιδράσεις μεταλλαξογένεσης των CDR1 και CDR2 συμπληρώνοντας τα ζευγάρια. Οι εκκινητές **VH2** και **VH4** είναι οι εκφυλισμένοι, ενώ οι **VH1** και **VH3** παίζουν το ρόλο υποστήριξης, για την δημιουργία του πλήρους μήκους προϊόντος. Αυτό επιτυγχάνεται αφού περιέχουν μια περιοχή ομολογίας περίπου 20 βάσεων με τους εκφυλισμένους, η οποία σε μια διαδικασία που ονομάζεται σύντηξη προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, προκαλεί την συνένωση των δύο προϊόντων σε ένα. Η μέθοδος περιγράφεται στο **Σχήμα 12**. Πραγματοποιήσαμε και μια επιπλέον αντίδραση μεταλλαξογένεσης στο CDR2, αλλά αυτή την φορά σε πλασμίδιο pCANTAB-6 που είχε ενσωματωθεί το scFv 10A, που ήταν ήδη μεταλλαγμένο στο CDR1. Έτσι καταφέραμε να έχουμε μεταλλαγμένα και τα δυο CDRs ταυτόχρονα.



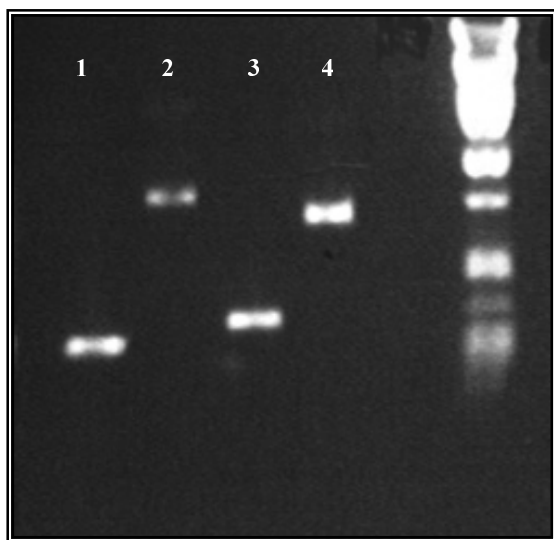
**Σχήμα 12:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με πολυμορφικούς εκκινητές. Μετά την δημιουργία των δυο τεμαχίων DNA με μια τρίτη αντίδραση τα συντήκουμε στο πλήρους μήκους scFv.

Για τον εκφυλισμό των εκκινητών επιλέχθηκε η τακτική του κωδικονίου NNS, [Lowman et al., 1993, Barbas III et al., 1992, Barbas et al., 1994] (όπου N οποιοδήποτε βάση και S γουανίνη ή κυτοσίνη). Οι συνδυασμοί νουκλεοτιδίων που δίνει, ενώ κωδικοποιούν όλα τα αμινοξέα παράγει ένα μόνο κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης (UAG: Amber codon) το οποίο μάλιστα σε βακτηριακά στελέχη αναγνωρίζεται κανονικά από tRNA σαν κωδικόνιο αμινοξέος και η πρωτεϊνσύνθεση συνεχίζεται κανονικά. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος της μεταλλαξηγένεσης με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με επαγωγή λαθών, όπου οι μεταλλαγές απλώνονται σε όλο το μήκος του γονιδίου (2.3.5). Με αυτόν τον τρόπο αυξάνουμε το ρεπερτόριο των μεταλλαγμένων περιοχών, αφού μεταλλαγές γίνονται και σε αμινοξέα υποστήριξης αλλά και στα υπόλοιπα CDRs. Δίνουμε με αυτόν τον τρόπο μια δυνατότητα στο scFv να εξελιχτεί προς διάφορες κατευθύνσεις και σε ειδικότητα και σε συγγένεια. Εφόσον μετά η βιβλιοθήκη

που θα δημιουργηθεί θα περάσει από επιλογή, δεν ανησυχούμε για τα scFv τα οποία θα επηρεασθούν αρνητικά από τις μεταλλαγές. Η μέθοδος επιλογής μας εξασφαλίζει ότι θα πάρουμε τελικά μόνο τα scFv εκείνα που είναι λειτουργικά και με ειδικότητα για το muc-1.

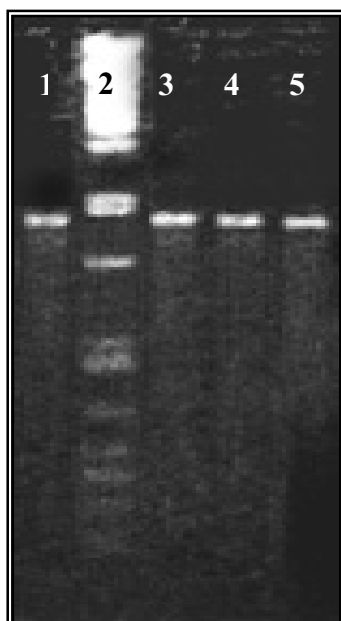
### 3.2.4 Δημιουργία βιβλιοθηκών

Από τις αντιδράσεις για τα CDR1 και CDR2 που φαίνονται στο **Σχήμα 12** πήραμε τα προϊόντα που φαίνονται στο **Σχήμα 13**



**Σχήμα 13:** Σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης 1% βλέπουμε τα προϊόν των εκκινητών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: διαδρομή 1: puc-rev και VH1 (230bp), διαδρομή 2: fd-tet-seq και VH2 (800bp), διαδρομή 3: puc-rev και VH3 (290bp), και διαδρομή 4: fd-tet-seq και VH4 (710bp). τα προϊόντα των διαδρομών 1 και δυο ανήκουν στο CDR1 και των 3 και 4 στο CDR2. Δεξιά ο μάρτυρας μεγέθους λ pst-1.

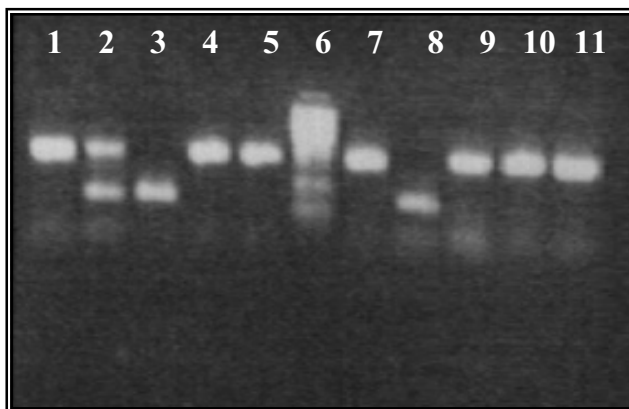
Μετά την διαδικασία της συγκρότησης παίρνουμε τα ανασυνδυασμένα προϊόντα του σχήματος 14.



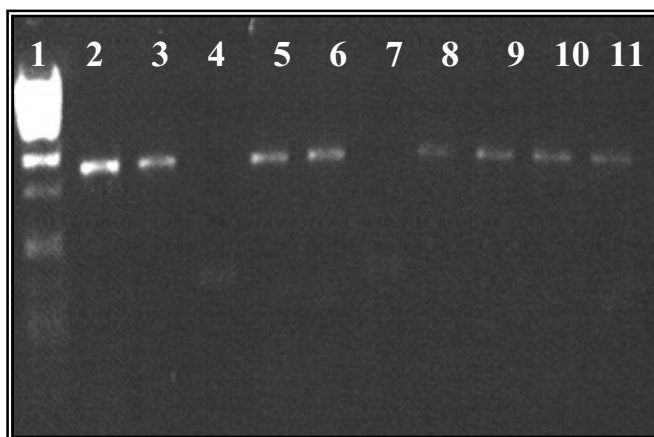
**Σχήμα 14:** Στην διαδρομή 1 του πηκτώματος αгарόζης έχουμε ένα προϊόν στα 980 περίπου bp, με μεταλλαγμένο το CDR1. Στην 2 βλέπουμε τον μάρτυρα μεγέθους λ pst-1. Στις διαδρομές 3, 4 και 5 έχουμε αντίστοιχα τα μεταλλαγμένα προϊόντα των CDR2, CDR1-CDR2 και error prone PCR σε μέγεθος 980 bp.

Μετά την διαδικασία καθαρισμού του φορέα pCANTAB-6 για την δημιουργία των βιβλιοθηκών, φορέας και προϊόντα κόπηκαν και ετοιμάστηκαν για την κλωνοποίηση (2.3.6 και 2.3.7 ). Ο φορέας που απομονώθηκε έδινε μεταξύ 65 και 220 αποικίες όταν 10 ng του κλωνοποιήθηκαν χωρίς ένθεμα και μετασχηματίστηκαν σε επιδεκτικά κύτταρα με επιδεκτικότητα κοντά στο  $10^9$  . Αυτό μας δίνει ένα ενδεικτικό (βλέπε παράγραφο 2.3.9 ) επίπεδο θορύβου ανάμεσα στο 1/150.000 και 1/45.000. Από τις βιβλιοθήκες που δημιουργήθηκαν αυτές που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία ελέγχου ενθέματος ήταν η mCDR1 (scFv με μεταλλαγμένο το CDR1) με μέγεθος μελών  $5,6 \times 10^6$  και η mCDR1+mCDR2 (scFv με μεταλλαγμένα τα CDR1 και CDR2 ) με μέγεθος μελών  $5,4 \times 10^6$  , όπως φαίνεται στα σχήματα 15 και 16 αντίστοιχα.

Εδώ βλέπουμε ότι 8 από τα 10 πηγαδάκια της mCDR1 δίνουν την ζώνη των 980bp, που σημαίνει ότι έχουν δεχτεί το ένθεμα του scFv. Τα υπόλοιπα δυο δίνουν μια ζώνη περίπου στα 300 bp και επομένως προέρχονται από κλείσιμο του φορέα χωρίς προσθήκη ενθέματος. Στην διαδρομή 2 έχουμε από λάθος χειρισμό μεταφέρει δυο αποικίες στην αντίδραση, μια θετική και μια αρνητική. Έτσι συνολικά έχουμε 8 θετικούς κλώνους στους 11, δίνοντας μας ένα τελικό μέγεθος  $4,07 \times 10^6$  μελών που περιέχουν το ένθεμα του μεταλλαγμένου scFv.



**Σχήμα 15:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ελέγχου βιβλιοθήκης mCDR1. Οι διαδρομές 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 και 11 ανήκουν σε αποικίες που περιέχουν ενθεμένο scFv, ενώ οι 2 (κάτω ζώνη), 3 και 8 δεν έχουν ένθεμα. Η διαδρομή 2 περιέχει προϊόν από δυο αποικίες από λάθος χειρισμό. Το μέγεθος της ζώνης του DNA των θετικών αποικιών είναι 980bp και των αρνητικών 300bp.



**Σχήμα 16:** Έλεγχος βιβλιοθήκης mCDR1+mCDR2. Οι διαδρομές 2,3, 5, 6, 8, 9 και 10 περιέχουν ενθεμένο scFv και δίνουν μια ζώνη μεγέθους 980bp. Οι 4 και 7 δίνουν ζώνη μεγέθους 300bp και αντιπροσωπεύουν φορείς που δεν δέχτηκαν ένθεμα αλλά κυκλοποιήθηκαν μόνοι τους.

Στην περίπτωση της mCDR1+mCDR2, έχουμε 8 στα 10 πηγαδάκια θετικά και 2 αρνητικά. Έτσι σε αυτήν την περίπτωση έχουμε  $4,3 \times 10^6$  μέλη που περιέχουν κλωνοποιημένο ένα scFv στην βιβλιοθήκη. Μετά τις παραπάνω δοκιμασίες οι βιβλιοθήκες mCDR1 και mCDR1+mCDR2 πέρασαν από την διαδικασία της επιλογής (2.4). Η mCDR1 έδωσε λόγο αριθμού φάγων εισόδου ( $2.4 \times 10^{12}$ ) προς εξόδου ( $2.06 \times 10^7$ )  $1.16 \times 10^5$  και η mCDR1+mCDR2 ( $11.4 \times 10^{12} / 8.69 \times 10^7$ )  $1.3 \times 10^5$  (βλέπε 2.4.2). Μετά ακολούθησε και δεύτερη επιλογή στις νέες βιβλιοθήκες **mCDR1<sub>επιλογή1</sub>** και **mCDR1+mCDR2<sub>επιλογή1</sub>** οι οποίες έδωσαν λόγο αριθμού φάγων εισόδου προς εξόδου ( $7.4 \times 10^{12} / 3.1 \times 10^9$ )  $2.38 \times 10^3$  και ( $6.4 \times 10^{12} / 7.34 \times 10^9$ )  $8.7 \times 10^2$  αντίστοιχα. Αυτό μας έδειξε ότι πραγματοποιήθηκε κατά την δεύτερη επιλογή ένας εμπλουτισμός σε ειδικά scFv **48** φορές για το mCDR1 και **149** για το mCDR1+mCDR2. Αφού οι βιβλιοθήκες μας έδειξαν ότι πράγματι περιέχουν λειτουργικά scFv προχωρήσαμε στην χρήση της ELISA για την σάρωση των βιβλιοθηκών **mCDR1<sub>επιλογή2</sub>** και **mCDR1+mCDR2<sub>επιλογή2</sub>** που πήραμε μετά την δεύτερη επιλογή. Περιμένει κανείς μετά από δυο επιλογές η ποικιλομορφία να έχει μειωθεί σημαντικά προς όφελος των ειδικών scFv με την μεγαλύτερη συγγένεια προς το muc-1. Έτσι διαλέχτηκαν 34 αποικίες από τις βιβλιοθήκες **mCDR1<sub>επιλογή1</sub>** και **mCDR1+mCDR2<sub>επιλογή1</sub>**, και 60 από τις βιβλιοθήκες **mCDR1<sub>επιλογή2</sub>** και **mCDR1+mCDR2<sub>επιλογή2</sub>** και καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 2.2.3. Μαζί με τα ανασυνδυασμένα scFv μολύναμε δυο πηγαδάκια ανά πλάκα ELISA με το μητρικό scFv  $10^A$  (θετικός μάρτυρας), για την σύγκριση του με τα νέα scFv που δημιουργήσαμε. Έτσι μετρήσαμε μια πλάκα ELISA για τις δυο



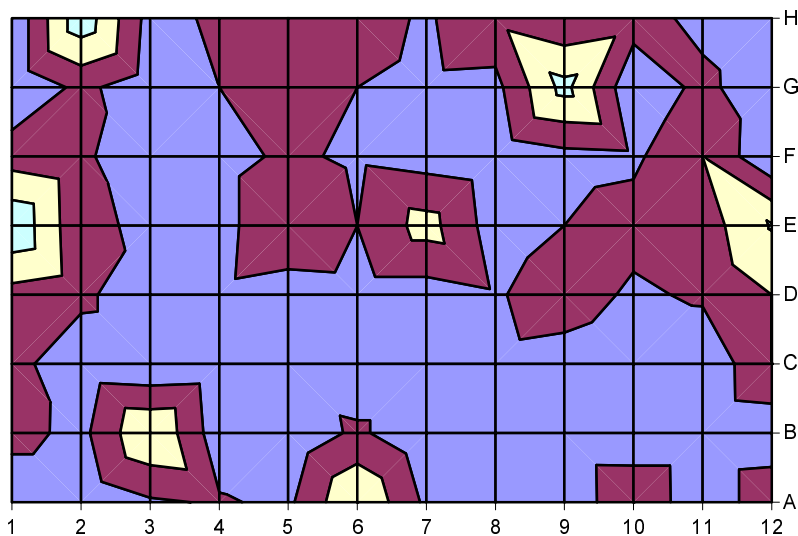
βιβλιοθήκες που προήλθαν από την αρχική **mCDR1** και μια πλάκα για βιβλιοθήκες που προήλθαν από την **mCDR2**. Αυτό μας έδωσε μια πρώτη εικόνα για την ποιότητα των νέων scFv και μια επιβεβαίωση του εμπλουτισμού των βιβλιοθηκών της δεύτερης επιλογής σε σχέση με την πρώτη. Στους πίνακες 5 και 6 δίδονται οι τιμές των μετρήσεων, ενώ στα σχήματα 17 και 18 παρουσιάζονται γραφικά δίνοντας μια συνολική άποψη των πλακών στις οποίες μετρήθηκαν.

Επιλογή 1		1	2	3	4	5	6
	A	0,068	0,079	0,426	0,562	0,393	1,516
	B	0,686	0,348	1,503	0,231	0,114	0,566
	C	0,689	0,109	0,046	0,123	0,183	0,045
Επιλογή 2	D	0,811	0,641	0,06	0,357	0,183	0,267
	E	1,935	0,596	0,419	0,346	1	0,517
	F	0,763	0,551	0,315	0,352	0,578	0,374
	G	0,075	0,618	0,188	0,525	0,472	0,547
	H	0,082	1,839	0,326	0,598	0,483	0,693

Επιλογή 1		7	8	9	10	11	12
	A	0,425	0,425	0,06	1,09	0,075	0,897
	B	0,072	0,055	0,07	0,052	0,057	0,136
	C	0,059	0,348	0,258	0,046	0,069	1,039
Επιλογή 2	D	0,247	0,441	0,801	0,39	0,586	1,017
	E	1,208	0,241	0,505	0,756	0,741	1,537
	F	0,278	0,133	0,348	0,41	1,066	0,057
	G	0,381	0,355	1,67	0,075	0,652	0,079
	H	0,449	0,863	0,55	0,749	0,333	0,06

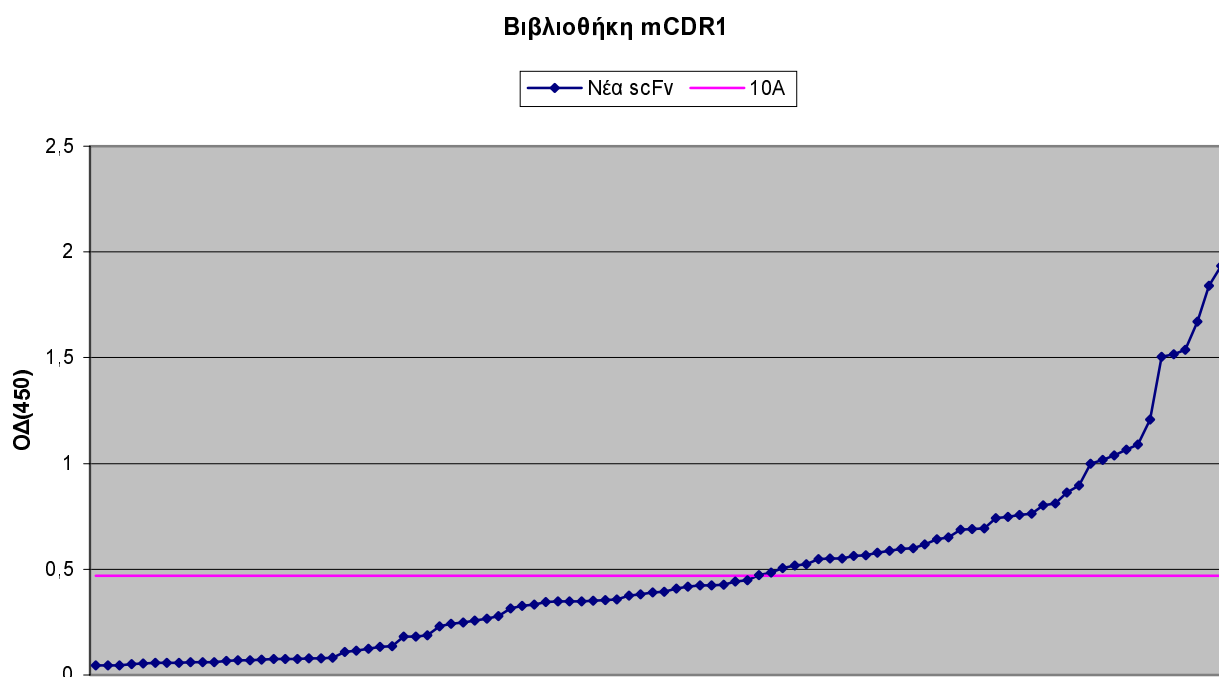
**Πίνακας 5:** Ο πίνακας αντιπροσωπεύει την πλάκα ELISA στην οποία μετρήθηκαν 34 αποικίες της πρώτης επιλογής του **mCDR1** (σειρές A, B, και C εκτός των A3 και A4) και 60 της δεύτερης επιλογής (σειρές D, E, F, G και H). Το μητρικό scFv 10A δίνει τις τιμές που βλέπουμε στα πηγαδάκια A3 και A4.

## Πρότυπο απορροφήσεων scFv προερχόμενα από την βιβλιοθήκη CDR1



**Σχήμα 17:** Εδώ παριστάνονται οι τιμές που έδωσαν τα scFv στην πλάκα ELISA της βιβλιοθήκης mCDR1. Το γαλάζιο χρώμα αντιπροσωπεύει τιμές απορρόφησης γύρω στο 2, με κίτρινο χρώμα τιμές γύρω στο 1.5, με κόκκινο τιμές από 0.5 μέχρι 1, και με μπλε τιμές χαμηλότερες του 0.5. εμφανής είναι η διαφορά των απορροφήσεων των scFv που προέρχονται από την πρώτη επιλογή της mCDR1 βιβλιοθήκης (σειρές A,B,C) με αυτές της δεύτερης (D, E,F, G, H). Τα δείγματα A3 και A4 είναι τα μητρικά 10A.

Στο **Σχήμα 18** παριστάνεται γραφικά η κατανομή τιμών των νέων scFv της mCDR1 βιβλιοθήκης σε σχέση με το μητρικό 10A.



**Σχήμα 18:** Κατανομή απορροφήσεων των νέων scFv της βιβλιοθήκης mCDR1 σε σύγκριση με το μητρικό scFv 10A.

Στον **πίνακα 6** παρουσιάζονται τα στοιχεία για τις βιβλιοθήκες **mCDR1-mCDR2**. Πάλι οι σειρές A,B,C περιέχουν τυχαίες αποικίες της πρώτης επιλογής και οι D, E, F, G, H της δεύτερης. Τα δείγματα A3 και A4 είναι τα μητρικά 10A.

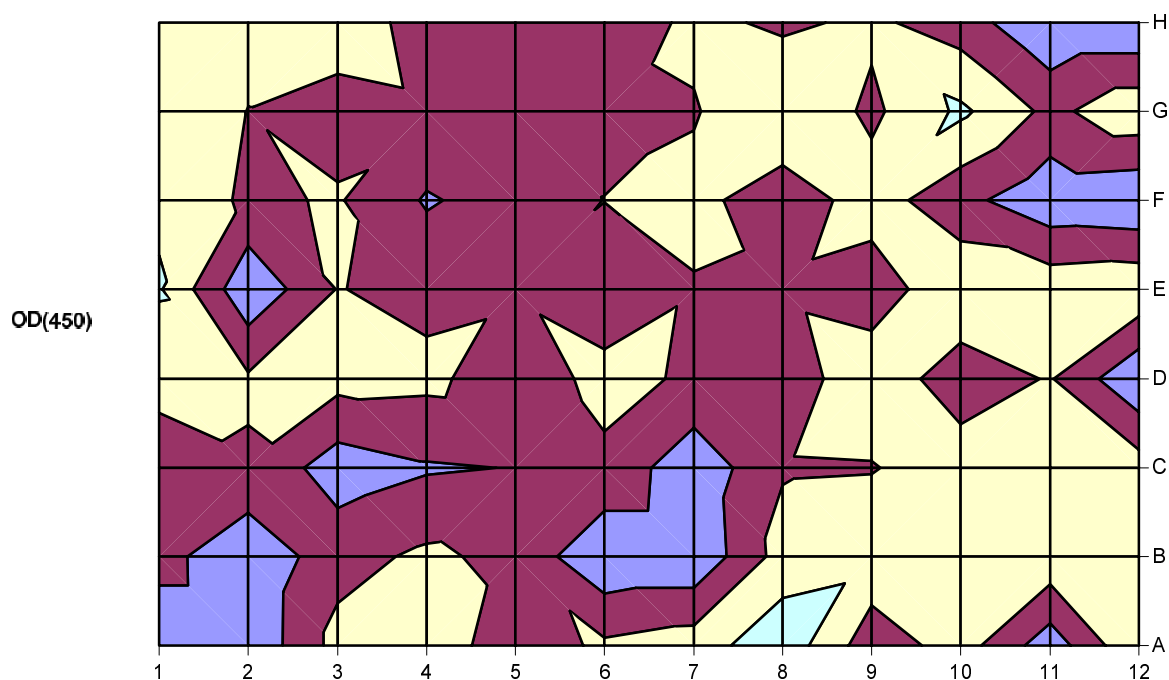
		1	2	3	4	5	6
Επιλογή 1	A	0,08	0,077	1,167	1,3	0,714	1,09
	B	0,7	0,069	0,819	1,095	0,86	0,087
	C	0,762	0,936	0,234	0,45	0,513	0,886
Επιλογή 2	D	1,15	1,07	1,169	1,13	0,675	1,166
	E	1,555	0,104	1,017	0,856	0,935	0,659
	F	1,411	0,911	1,044	0,45	0,714	1,008
	G	1,44	0,988	0,827	0,915	0,793	0,852
	H	1,165	1,21	1,235	0,839	0,886	0,61

		7	8	9	10	11	12
Επιλογή 1	A	1,261	1,833	0,702	1,231	0,203	1,48
	B	0,09	1,212	1,355	1,311	1,357	1,49
	C	0,149	0,95	0,971	1,272	1,104	1,24
Επιλογή 2	D	0,923	0,709	1,346	0,713	1,038	0,05
	E	0,96	0,875	0,704	1,416	1,322	1,4
	F	1,16	0,684	1,241	0,647	0,141	0,05
	G	0,955	1,489	0,893	1,594	0,874	1,341
	H	1,13	0,907	1,098	0,741	0,056	0,053

**Πίνακας 6:** Ο πίνακας αντιπροσωπεύει την πλάκα ELISA στην οποία μετρήθηκαν 34 αποικίες της πρώτης επιλογής του mCDR1-mCDR2 (σειρές A, B, και C εκτός των A3 και A4) και 60 της δεύτερης επιλογής (σειρές D, E, F, G και H). Το μητρικό scFv 10A δίνει τις τιμές που βλέπουμε στα πηγαδάκια A3 και A4.

Στο **Σχήμα 19** παρουσιάζεται γραφικά το πρότυπο απορροφήσεων για τις βιβλιοθήκες αυτές. Βλέπουμε όπως και στο **Σχήμα 17** ότι κατά μέσο όρο οι τιμές μετά την δεύτερη επιλογή είναι υψηλότερες της πρώτης. Αυτό συνηγορεί στην ύπαρξη εμπλουτισμού των scFv μετά τις επιλογές..

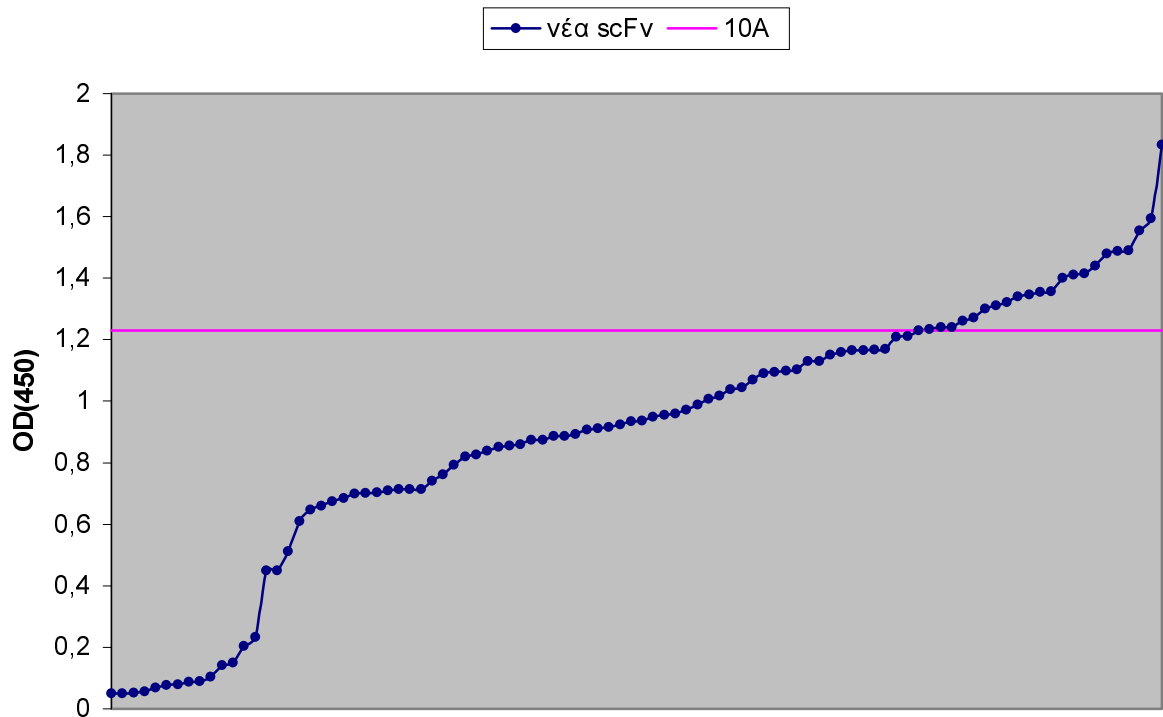
Πρότυπο βιβλιοθήκης CDR1-CDR2



**Σχήμα 18:** Εδώ παριστάνονται οι τιμές που έδωσαν τα scFv στην πλάκα ELISA της βιβλιοθήκης mCDR1-mCDR2. Το γαλάζιο χρώμα αντιπροσωπεύει τιμές απορρόφησης γύρω στο 2, με κίτρινο χρώμα τιμές γύρω στο 1.5, με κόκκινο τιμές από 0.5 μέχρι 1, και με μπλε τιμές χαμηλότερες του 0.5. εμφανής είναι η διαφορά των απορροφήσεων των scFv που προέρχονται από την πρώτη επιλογή της mCDR1-mCDR2 βιβλιοθήκης (σειρές A,B,C) με αυτές της δεύτερης (D, E,F, G, H). Τα δείγματα A3 και A4 είναι τα μητρικά 10A.

Στο **Σχήμα 20** παριστάνεται γραφικά η κατανομή τιμών των νέων scFv της mCDR1-mCDR2 βιβλιοθήκης σε σχέση με το μητρικό 10A

## Βιβλιοθήκη mCDR1-mCDR2



**Σχήμα 20:** Κατανομή απορροφήσεων των νέων scFv της βιβλιοθήκης mCDR1-mCDR2 σε σύγκριση με το μητρικό scFv 10A.

### 3.2.5 Συμπεράσματα

Βλέπουμε από τις τιμές των απορροφήσεων στους πίνακες 5 και 6 ότι έχουμε επιτύχει την δημιουργία και απομόνωση μιας πληθώρας νέων scFv, πολλά από τα οποία εμφανίζονται με σημαντικά υψηλότερη συγγένεια για το muc-1 από ότι το μητρικό 10A. Είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό το γεγονός ότι μεταξύ των νέων scFv, περιέχονται μερικά με σήμα μέχρι και 4 φορές υψηλότερο σε σχέση με το 10A (βιβλιοθήκη **mCDR1**<sub>επιλογή2</sub> πηγάδι 2H). Στην πρώτη βιβλιοθήκη (mCDR1), 20 από τα 60 πηγαδάκια της δεύτερης της επιλογής έδωσαν υψηλότερο σήμα από το μητρικό scFv 10A που αντιπροσωπεύει ποσοστό **33%** της βιβλιοθήκης **mCDR1**<sub>επιλογή2</sub>. Αντίστοιχα για την βιβλιοθήκη **mCDR1-mCDR2**<sub>επιλογή2</sub> το ποσοστό είναι **15%** (9 στα 60 πηγαδάκια).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ πρόσφατα και δεν έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία του χαρακτηρισμού των νέων scFv. Επιλέχθηκαν 3 scFv από κάθε μια από τις τέσσερις βιβλιοθήκες επιλεγμένων scFv, για αλληλούχιση του DNA τους η οποία θα ολοκληρωθεί σύντομα. Με τα στοιχεία αυτά, θα μπορέσουμε να αξιολογήσουμε τις πρώτες πληροφορίες για τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις αμινοξέων των CDR1 και CDR2 με το muc-1. Παράλληλα έχουν ξεκινήσει και τα πειράματα ανταγωνιστικής εκτόπισης, για να δούμε το μέγεθος της βελτίωσης της συγγένειας που επιτύχαμε με μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι με την απλή ELISA, και να δούμε και τυχόν επίδραση των αλλαγών αυτών στην ειδικότητα των νέων scFv.





## *Κεφάλαιο 4ο: Συζήτηση*

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε αυτή την εργασία αποτέλεσαν το πρώτο στάδιο στην προσπάθεια μας για την μελέτη και βελτίωση της συγγένειας πρόσδεσης των αντισωμάτων. Αφού ξεπεράστηκαν τα διάφορα τεχνικά προβλήματα που είχαμε κυρίως στην δημιουργία βιβλιοθηκών, είμαστε τώρα έτοιμοι να προχωρήσουμε στην συλλογή πληροφοριών για τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις του *myc-1* με τα νέα scFv που κατασκευάσαμε. Η στρατηγική που ακολουθήσαμε πιστεύουμε ότι αποτελεί έναν ορθολογικό τρόπο για να βελτιώσει κανείς τα χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου αντισώματος, για το οποίο ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν. Γι' αυτό ανάμεσα στα scFv που έχουμε υπό αλληλούχιση, περιέχονται και μερικά με χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης για το *muc-1* από ότι το μητρικό 10A. Έτσι, δεν θα εντοπίσουμε μόνο αλλαγές αμινοξέων που συνεισφέρουν στην πρόσδεση με το αντιγόνο, αλλά και αυτές που την παρεμποδίζουν. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί σημαντικό για να βελτιώσουμε την συγγένεια του scFv μειώνοντας τις απωστικές δυνάμεις που μπορεί να προκαλούνται από μερικά αμινοξέα στην επιφάνεια πρόσδεσης.

Στα άμεσα σχέδια μας είναι η εφαρμογή μιας μεθόδου που επιτρέπει την εκτίμηση της συνεισφοράς κάθε αμινοξέως που ανήκει στα CDRs στην συγγένεια του αντισώματος με το αντιγόνο. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται **σάρωση των CDRs με υποκατάσταση αλανινών** και στηρίζεται στην σταδιακή υποκατάσταση των αμινοξέων των CDRs με την αλανίνη, ένα αμινοξύ που εμφανίζει ουδέτερη συμπεριφορά σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις [Lewis et al, 1995]. Αυτό επιτρέπει την δημιουργία ενός χάρτη αλληλεπιδράσεων των αμινοξέων των CDRs με πληροφορίες για την επίδραση τους στην συγγένεια πρόσδεσης με το αντιγόνο. Ήδη θετικά αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί από αρκετά εργαστήρια, οδηγώντας σε αντισώματα πολύ υψηλής συγγένειας [Lowman et al., 1993; Kobayashi et al., 1999; Lewis et al., 1995].

Η κρυσταλλογραφία πάντα ήταν ένα εξαιρετικό εργαλείο για την αναγνώριση και χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων. Η δυσκολίες της όμως την κάνουν μια επίπονη και τεχνικά απαιτητική διαδικασία και λίγοι έχουν την πολυτέλεια να αποκτούν κρυσταλλογραφικά δεδομένα της επίδρασης των μεταλλαγών που έχουν προκαλέσει σε ένα αντίσωμα τους. Σήμερα όμως μετά από 8 χρόνια εντατικής δουλειάς πάνω στα αντισώματα, οι βάσεις δεδομένων τρισδιάστατων δομών πρωτεϊνών περιέχουν αρκετά αντισώματα ώστε να μας έχουμε πλέον την δυνατότητα να μπορούμε να προσομοιώσουμε σε υπολογιστή την διαδικασία της μεταλλαξογένεσης ενός αμινοξέος. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να προβλεφθεί με ικανοποιητική ακρίβεια η επίδραση της μεταλλαγής στην διαμόρφωση του

CDRs στον χώρο. Ήδη συζητάμε με εργαστήρια που έχουν την τεχνογνωσία του **μοντελισμού πρωτεϊνών**, ώστε η μέθοδος αυτή να εφαρμοστεί και στα δικά μας scFv.

Για τον υπολογισμό της συγγένειας των scFv χρησιμοποιούμε την ELISA. Όμως ο ακριβής υπολογισμός απαιτεί την χρήση ενός μηχανήματος μετρήσεων αλληλεπιδράσεων που ονομάζεται **surface plasmon resonance**, (**BIAcore instrument -Pharmacia Biosensor**). Επίσης μια νέα τεχνολογία έχει κάνει την εμφάνιση της στον χώρο υπολογισμού αλληλεπιδράσεων που ονομάζεται **μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (atomic force microscope)** και που πρόσφατα εφαρμόστηκε με επιτυχία για την μέτρηση της αλληλεπίδρασης ενός scFv με το αντιγόνο του [Ros, 1998]. Προς το παρόν πρόσβαση σε τέτοια εργαλεία έχουμε μόνο σε εργαστήρια του εξωτερικού με τα οποία συνεργαζόμαστε.

Θέλοντας να μελετήσουμε τις πραγματικές δυνατότητες που έχουν *in-vivo* τα scFv μας, σχεδιάζουμε την σύντηξη τους με την τοξίνη της *Pseudomonas* [Chowdhury et al., 1998]. Έχουμε στην κατοχή μας ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές με τις οποίες μπορούμε να προκαλέσουμε καρκίνους σε ποντίκια ώστε να μελετήσουμε τις επιπτώσεις της χορήγησης της ανοσοτοξίνης (scFv-τοξίνη *Pseudomonas*) στην εξέλιξη της ασθένειας.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει για εμάς και η δυνατότητα προσομοίωσης της διαδικασίας ωρίμανσης της συγγένειας των αντισωμάτων που πραγματοποιείται στα βλαστικά κέντρα. Εκεί δρουν παράλληλα δύο μηχανισμοί: ένας που εισάγει ποικιλομορφία στις μεταβλητές περιοχές των αντισωμάτων και ένας μηχανισμός θετικής επιλογής κυττάρων με κριτήριο την συγγένεια των επιφανειακών τους αντισωμάτων με τα αντιγόνα που τους παρουσιάζονται. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να προσομοιωθεί στο εργαστήριο με διαδοχικούς κύκλους μεταλλαξογένεσης και επιλογής με φάγους. Όμως κάτι τέτοιο θα ήταν εξαιρετικά χρονοβόρο. Γι' αυτό σκεπτόμαστε την χρήση ενός συστήματος όπου η εισαγωγή μεταλλαγών θα γίνεται παράλληλα με την επιλογή των scFv με φάγους. Σε αυτήν την περίπτωση η διαδικασία θα οδηγηθεί με μεγαλύτερη ταχύτητα σε υψηλότερα επίπεδα συγγένειας προς το αντιγόνο επιλογής. Παρόμοιες προσπάθειες έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία με διαφορετική όμως πειραματική προσέγγιση και με μέτρια αποτελέσματα.

Η γενετική βελτίωση της συγγένειας των αντισωμάτων είναι μια αργή και επίπονη διαδικασία. Οι δυνατότητες όμως της τεχνολογίας στην παραγωγή γνώσης και η πιθανότητα της εφαρμογής της για την θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών είναι ένα δυνατό κίνητρο για περισσότερη προσπάθεια προς την κατεύθυνση αυτή.



## *Κεφάλαιο 5ο: Βιβλιογραφία*

1. Andersson E., Henderikx P., Krambovitis E., Hoogenboom H.R. & Borrebaeck C.A. (1999) A tandem repeat of MUC1 core protein induces a weak in vitro immune response in human B cells. *Cancer Immunol Immunother*, **47**, 249.
2. Andrew D. Griffiths, Magnus Malmqvist, James D. Marks, Jacqueline M. Bye, M.J. Emblenton J.M., Michael Baier, K. Philipp Holliger, Barbara D. Gorick, Nevil C. Hughes-Jones & Winter H.R.H.a.G. (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO*, **12**, p725.
3. Arndt K.M., Muller K.M. & Pluckthum A. (1998) Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry*, **37**, p12918.
4. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., D.D. M., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl K. (1996) Current Protocols in Molecular Biology. *Wiley*, **4**.
5. Balint R.F. & Larrick J.W. (1993) Antibody engineering by parsimonious mutagenesis. *Gene*, **137**, 109.
6. Barbas C.r., Hu D., Dunlop N., Sawyer L., Cababa D., Hendry R., Nara P. & Burton D. (1994) In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, p3809.
7. Barbas III C.F., Bain J.D., Hoekstra D.M. & Lerner R.A. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, p4457.
8. Barry A. Fields, Fernando A. Goldbaum, Xavier Ysern & Mariuzza R.P.a.R.A. (1995) Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotope. *Nature*, **374**, p739.
9. Behring E.A. (1893) Die geschichte der Diphthrie. *Thieme*, p186.
10. Berek C., Berger A. & Apel M. (1991) Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, **67**, p1121.
11. Betz A.G., Neuberger M.S. & Milstein C. (1993) *Immunol. Today*, **14**, p405.
12. Borrebaeck C.A. (1998) Tapping the potential of molecular libraries in functional genomics. *Immunol Today*, **19**, 528.
13. Borrebaeck C.A.K. (1999) Human monoclonal antibodies: The emperor's new clothes. *Nature Biotechnology*, **17**, p621.
14. Borrebaeck C.A.K., Maimborg A. & Ohlin M. (1993) *Immunol. Today*, **14**, p477.

15. Burks E.A., Chen G., Georgiou G. & Iverson B.L. (1997) In vitro scanning saturation mutagenesis of an antibody binding pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 412.
16. Chapman A., Antoniw P., Spitali M., West S., Stephens S. & King D.J. (1999) Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nature Biotechnology*, **17**, p780.
17. Charles A., Janeway J. & Travers A. (1996) The Immune System in Health and Disease. *Immunobiology*.
18. Chothia C., Lesk A., Anna Tramontano, Levitt M., Sandra J. Smith-Gill, Gillian Air, Steven Sheriff, Eduardo A. Padlan, David Davies, William R. Tulip, Peter M. Colman, Silvia Spinelli & Pedro M. Alzari and Poljak R. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, **342**, p877.
19. Chothia C., Lesk A.M., Gherardi E., Tomlinson I.M., Walter G., Marks J.D., Llewelyn M.B. & Winter G. (1992) Structural repertoire of the human VH segments. *J.Mol.Biol.*, **227**, p799.
20. Chowdhury P., Viner J., Beers R. & Pastan I. (1998) Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, p669.
21. Chowdhury P.S., Vasmatzis G., Beers R., Lee B. & Pastan I. (1998) Improved stability and yield of a Fv-toxin fusion protein by computer design and protein engineering of the Fv. *J Mol Biol*, **281**, 917.
22. Chowdhury P.S. & Pastan I. (1999) Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. *Nature Biotechnology*, **17**, p568.
23. Couto J.R., Christian R.B., Peterson J.A. & Ceriani R.L. (1995) Designing human consensus antibodies with minimal positional templates. *Cancer Research (suppl)*, **55**, p5973.
24. Dahlenborg K., Hultman L., Carlsson R. & Jansson B. (1996) Human monoclonal antibodies specific for the tumor associated Thomsen-Friedenreich antigen. *Int.J.Cancer*, **70**, p63.
25. Davies G.M., Bosze S., Hudecz F., Price M.R. & Tendler S.J. (1994) Characterisation of a recombinant Fv fragment of anti-MUC1 antibody HMFG1. *Cancer Lett*, **82**, 179.
26. Davis (1980) *Microbiology, Harper, Third edition*.
27. de Kruif J., van der Vuurst de Vries A.R., Cilenti L., Boel E., van Ewijk W. &

Logtenberg T. (1996) New perspectives on recombinant human antibodies. *Immunol Today*, **17**, 456.

28. Denton G., Sekowski M., DIR S., Hughes O.D., Murray A., Denley H., Tendler S.J. & Price M.R. (1997) Production and characterization of a recombinant anti-muc1 scfv reactive with human carcinomas. *British Journal of Cancer*, **76**, p614.

29. Diaz M. & Flajnik M. (1998) Evolution of somatic hypermutation and gene conversion in adaptive immunity. *Immunol Rev*, **162**, 13.

30. Dougan D., Malby R., Gruen L., Kortt A. & Hudson P. (1998) Effects of substitutions in the binding surface of an antibody on antigen affinity. *Protein Eng*, **11**, p65.

31. Dowel W.J., Miller J.F. & Ragsdale C.W. (1988) High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, **16**, p6127.

32. Edmundson A.B. & Borrebaeck C.A. (1998) Progress in programming antibody fragments to crystallize. *Immunotechnology*, **3**, 309.

33. Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G. & Bishop J.M. (1985) isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Molecular and Cellular Biology*, **5**, p3610.

34. Foote J. & Milstein C. (1991) Kinetic maturation of an immune response. *Nature*, **352**, p530.

35. Foote J. & Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol*, **224**, p487.

36. Gao C., Mao S., Lo C., Wirsching P., Lerner R. & Janda K. (1999) making artificial antibodies:A format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, p6025.

37. Georgiou H.J.M.a.G. (1994) Construction and characterization of a set of E. coli Strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology*, **12**, p1107.

38. Girling A., Bartkova J., Burchell J., Gendler S., Gillet C. & Taylor-Papadimitriou J. (1989) A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary breast carcinomas. *Int.J.Cancer*, **43**, p1072.

39. Hanes J. & Pluckthun A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4937.

40. Hanes J., Jermutus L., Weber-Bornhauser S., Bosshard H.R. & Pluckthun A. (1998) Ribosome display efficiently selects and evolves high affinity antibodies in vitro from



immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, p14130.

41. Hawkins R., Russell S. & Winter G. (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol*, **226**, p889.

42. Hayashi N., Welschhof M., Zewe M., Braunagel M., Dubel S., Breitling F. & Little M. (1994) Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *Biotechniques*, **17**, 310.

43. Hecht B.H.J.a.M.H. (1994) Recombinant proteins can be isolated from E. coli cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Biotechnology*, **12**, p1357.

44. Henderikx P., Kandilogiannaki M., Petrarca C., von M.-P.S., Hilgers J., Krambovitis E., Arends J. & Hoogenboom H. (1998) Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. *Cancer Res*, **58**, p4324.

45. Holliger P., Prospero T. & Winter G. (1993) Diabodies: Small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, p6444.

46. Hoogenboom H., Griffiths A., Johnson K., Chiswell D., Hudson P. & Winter G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res*, **19**, p4133.

47. Hoogenboom H., Griffiths A., Johnson K., Chiswell D., Hudson P. & Winter G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res*, **19**, p4133.

48. Hoogenboom R.H. (1997) Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *TIBTECH*, **15**, p62.

49. Huls G.A., Heijnen I.A.F.M., Cuomo M.E., Koningsberger J.C., Wiegman L., Boel E., van der Vuurst de Vries A.R., Loyson S.A.J., Helfrich W., van Berge Henegouwen G.P., van Meijer M., de Kruif J. & Logtenberg T. (1998) A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nature Biotechnology*, **17**, p276.

50. Jirholt P., Ohlin M., Borrebaeck C.A.K. & Soderlind E. (1998) Exploiting sequence space: shuffling in vivo formed complementarity determining regions into a master framework. *Gene*, **215**, 471.

51. Jung S. & Pluckthun A. (1997) Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Eng*, **10**, p959.

52. Karsten U., Diotel C., Klich G., Paulsen H., Goletz S., Muller S. & Hanisch F.G. (1998) Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC-1 tandem repeat

peptide is mediated by site-specific glycosylation. *Cancer Research*, **58**, p2541.

53. Katz B. (1997) Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **26**, 27.

54. Keitel T., Kramer A., Wessner H., Scholz C., Schneider-Mergener J. & Hohne W. (1997) Crystallographic analysis of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody cross-reactivity and polyspecificity. *Cell*, **91**, p811.

55. Kim S., Davis M., Sinn E., Pattern P. & Hood L. (1981) Antibody diversity: Somatic hypermutation of rearranged VH genes. *Cell*, **27**, p573.

56. Kipriyanov S., Moldenhauer G., Martin A., Kupriyanova O. & Little M. (1997) Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Eng*, **10**, p445.

57. Knappik A. & Pluckthun A. (1995) Engineering turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Engineering*, **8**, p81.

58. Kobayashi N., Soderlind E. & Borrebaeck C.A.K. (1997) Analysis of assembly of synthetic antibody fragments: Expression of functional scfv with predefined specificity. *BioTechniques*, **23**, p500.

59. Kobayashi H., Morioka H., Tobisawa K., Torizawa T., Kato K., Shimada I., Nikaido O., Stewart J.D. & Ohtsuka E. (1999) Probing the interaction between a high-affinity single-chain Fv and a pyrimidine (6-4) pyrimidone photodimer by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **38**, 532.

60. Krambovitis E., Hatzidakis G. & Barlos K. (1998) Preparation of MUC-1 oligomers using an improved convergent solid-phase peptide synthesis. *J.Biol.Chem.*, **18**, p10874.

61. Kramer A., Keitel T., Winkler K., Stocklein W., Hohne W. & Schneider-Mergener J. (1997) Molecular for binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell*, **91**, p799.

62. Lake D., Lam K., Peng L. & Hersh E. (1994) Molecular cloning, expression and mutagenesis of an anti-insulin single chain Fv (scFv). *Mol Immunol*, **31**, p845.

63. Lee B. & Vasmataz G. (1997) Stabilization of protein structures. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 423.

64. Lewis C., Hollis G., Mark G.r., Tung J. & Ludmerer S. (1995) Use of a novel mutagenesis strategy, optimized residue substitution, to decrease the off-rate of an anti-gp120 antibody. *Mol Immunol*, **32**, p1065.

65. Lorimer I., Keppler-Hafkemeyer A., Beers R., Pegram C., Bigner D. & Pastan I. (1996) Recombinant immunotoxins specific for a mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, p14815.
66. Lowman H. & Wells J. (1993) Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J Mol Biol*, **234**, p564.
67. Lubkowski J., Hennecke F., Pluckthun A. & Wlodawer A. (1998) The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nat Struct Biol*, **5**, p140.
68. Mandal C., Kingery B., Anchin J., Subramaniam S. & Linthicum D. (1996) ABGEN: a knowledge-based automated approach for antibody structure modeling. *Nat Biotechnol*, **14**, p323.
69. Mao S., Gao C., Lo C.H.L., Wirsching P., Wong C.H. & Janda K. (1999) Phage display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor associated carbohydrate antigens sialyl Lewis and Lewis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, p6953.
70. Martin A., Cheetham J. & Rees A. (1989) Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, p9268.
71. Martin A.C.R. (1996) Accessing the Kabat antibody sequence database by computer. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **25**, p130.
72. McCafferty J., Griffiths A., Winter G. & Chiswell D. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, p552.
73. Mendez .
74. Merienne K., Germain N., Zinn-Justin S., Boulain J.C., Ducancel F. & Menez A. (1997) The functional architecture of an acetylcholine receptor-mimicking antibody. *J Biol Chem*, **272**, 23775.
75. Milenic D.E., Yokota T., Filpula D., Finkleman M.A., Dodd S.W., Wood J.F., Whitlow M., Snow P. & Schlom J. (1991) *Cancer Res.*, **51**, p6363.
76. Near R.I. (1992) Gene conversion of immunoglobulin variable regions in mutagenesis cassettes by replacement PCR mutagenesis. *Biotechniques*, **12**, p88.
77. Nieba L., Honegger A., Krebber C. & Pluckthun A. (1997) Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng*, **10**, p435.

78. Ohlin M. & Borrebaeck C.A. (1998) Insertions and deletions in hypervariable loops of antibody heavy chains contribute to molecular diversity. *Mol Immunol*, **35**, 233.
79. Pelletier J.N., Arndt K.M., Pluckthum A. & Michnick S.W. (1999) An in vivo library-versus-library selection of optimized protein-protein interactions. *Nature Biotechnology*, **17**, p683.
80. Peters A. & Storb U. (1996) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity*, **4**, p57.
81. Pini A., Spreafico A., Botti R., Neri D. & Neri P. (1997) Hierarchical affinity maturation of a phage library derived antibody for the selective removal of cytomegalovirus from plasma. *J. Immun. Meth.*, **206**, p171.
82. Proba K., Honegger A. & Pluckthun A. (1997) A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding. *J Mol Biol*, **265**, p161.
83. Pruetz P.S. & Air G.M. (1998) Critical interactions in binding antibody NC41 to influenza N9 neuraminidase: amino acid contacts on the antibody heavy chain. *Biochemistry*, **37**, 10660.
84. Raab A., Han W., Badt D., Smith-Gill S.J., Lindsay S.M., Schindler H. & Hinterdorfer P. (1999) Antibody recognition imaging by force microscopy. *Nature Biotechnology*, **17**, p902.
85. Rees A.R., David Staunton, David M. Webster, Stephen J. Searle & Pedersen A.H.H.a.J.T. (1994) Antibody design: beyond the natural limits. *TIBTECH*, **12**, p119.
86. Reynaud C.A., Garcia C., Hein W.R. & Weill J.C. (1995) Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell*, **80**, p115.
87. Riechmann L., Clark M., Waldmann H. & Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, **332**, p323.
88. Rogerson B., Hackett J.J., Peters A., Haasch D. & Storb U. (1991) Mutation pattern of immunoglobulin transgenes is compatible with a model of somatic hypermutation in which targeting of the mutator is linked to the direction of DNA replication. *EMBO J*, **10**, p4331.
89. Roguska M., Pedersen J., Keddy C.A., Henry A., Searle S., Lambert J., Blattler W., Rees A. & Guild B. (1994) Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, p969.
90. Ros R., Schwesinger F., Anselmetti D., Kubon M., Schafer R., Pluckthun A.

& Tiefenauer L. (1998) Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, p7402.

91. Sambrook G., Fritsch T. & Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA*.

92. Schier R., Bye J., Apell G., McCall A., Adams G., Malmqvist M., Weiner L. & Marks J. (1996) Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol*, **255**, p28.

93. Schier R., McCall A., Adams G., Marshall K., Merritt H., Yim M., Crawford R., Weiner L., Marks C. & Marks J. (1996) Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol*, **263**, p551.

94. Schier R., McCall A., Adams G., Marshall K., Merritt H., Yim M., Crawford R., Weiner L., Marks C. & Marks J. (1996) Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol*, **263**, p551.

95. Sergey M. Kipriyanov, Gerhard Moldenhauer & Little M. (1997) High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *Journal of Immunological methods*, **200**, p69.

96. Soderlind E., Simonsson A.C. & Borrebaeck C.A. (1992) Phage display technology in antibody engineering: design of phagemid vectors and in vitro maturation systems. *Immunol Rev*, **130**, 109.

97. Soderlind E., Vergeles M. & Borrebaeck C.A. (1995) Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions. *Gene*, **160**, 269.

98. Stanfield R., Takimoto-Kamimura M., Rini J.M., Profy A.T. & I.A. W. (1993) *Structure*, **1**, p83.

99. Storb U., Peters A., Klotz E., Kim N., Shen H., Hackett J., Rogerson B., O'Brien R. & Martin T. (1998) Immunoglobulin transgenes as targets for somatic hypermutation. *Int J Dev Biol*, **42**, p977.

100. Storb U., Klotz E., Hackett J.J., Kage K., Bozek G. & Martin T. (1998) A hypermutable insert in an immunoglobulin transgene contains hotspots of somatic mutation and sequences predicting highly stable structures in the RNA transcript. *J Exp Med*, **188**, p689.

101. Storb U. (1998) Progress in understanding the mechanism and consequences of somatic hypermutation. *Immunol. Rev.*, **162**, p5.

102. Thompson J., Pope T., Tung J.S., Chan C., Hollis G., Mark G. & Johnson K.S. (1996) Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human immunodeficiency virus: use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *J Mol Biol*, **256**, 77.
103. Vasmataz G., Brower R. & Delisi C. (1994) Predicting immunoglobulin-like hypervariable loops. *Biopolymers*, **34**, 1669.
104. Vaughan T.J., Williams A.J., Pritchard K., Osbourn J.K., Pope A.R., Earnshaw J.C., McCafferty J., Hodits R.A., Wilton J. & Johnson K.S. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol*, **14**, 309.
105. Vaughan T.J. & Osbourn J.K.a.T., P.R. (1998) Human antibodies by design. *Nature Biotechnology*, **16**, p535.
106. Vieira J. & Messing J. (1987) *Methodw in Enzymol.*, **153**, p3.
107. Wagner S.D. & Neuberger M.S. (1996) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, **14**, 441.
108. Winter G. & Milstein C. (1991) Man-made antibodies. *Nature*, **349**, 293.
109. Winter G., Griffiths A., Hawkins R. & Hoogenboom H. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, **12**, 433.
110. Worn A. & Pluckthun A. (1998) Mutual stabilization of VL and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. *Biochemistry*, **37**, 13120.
111. Xie M.H., Yuan J., Adams C. & Gurney A. (1997) Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. *Nat Biotechnol*, **15**, 768.
112. Yang W.P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A.T., Burton D.R. & Barbas C.F., 3rd (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol*, **254**, 392.
113. Yokota T., Milenic D., Whitlow M. & Schlom J. (1992) Rapid tumor penetration of a scFv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.*, **52**, p3402.
114. Zabarovsky E.R. & Winberg G. (1990) High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Research*, **18**, p5912.
115. Zdanov A., Li Y., Bundle D.R., Deng S.J., MacKenzie C.R., Narang S.A., Young N.M. & Cygler M. (1994) Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv)

fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6423.