

1 Einleitung

Das Immunsystem der Vertebraten kann zwischen körpereigenen und fremden Strukturen unterscheiden und reagiert auf die Anwesenheit infektiöser Organismen durch eine Immunantwort, die durch zwei verschiedene Abwehrmechanismen zustande kommt: die angeborene und die adaptive Immunität. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Infektionserreger vergleichsweise unspezifisch. Diese Immunantwort setzt wenige Stunden nach dem Beginn der Infektion ein und ist in den ersten Tagen der einzige Schutz. Bei andauernder Infektion wird der Abwehrmechanismus der adaptiven Immunität ausgelöst, wobei die daran beteiligten Zellen an bestimmte Molekülkonformationen (Epitope) der Pathogene binden. Dieses kann nur durch einen flexiblen Anpassungsmechanismus gewährleistet werden.

Die adaptive Immunität wird dabei durch zwei Lymphozytenfamilien vermittelt: die B- und die T-Zellen. Die B-Lymphozyten sind für das Zustandekommen der humoralen Immunantwort zuständig: sie spüren im interzellulären Medium lebende Pathogene und zirkulierende antigene Makromoleküle auf. Die B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche oder sezernieren in die Körperflüssigkeiten Antigenrezeptoren, die als Antikörper bezeichnet werden. Diese können dreidimensionale konformationsabhängige Strukturen in der Lösung und auf einer Zelloberfläche erkennen.

Viele Pathogene, z.B. Viren, vermehren sich intrazellulär und sind deshalb für Antikörper nicht erreichbar. Für die hier notwendige zellvermittelte Immunreaktion sind T-Zellen zuständig, welche Rezeptoren (T-Zellrezeptoren, TCR) exprimieren, deren Genorganisation und Proteinstruktur denen der Immunglobuline ähneln. T-Zellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: CD8⁺-Korezeptor exprimierende, zytotoxische T-Zellen und CD4⁺-Korezeptor exprimierende Helferzellen. Zytotoxische Lymphozyten erkennen infizierte Zellen und lysieren sie. Die Bindung einer Helferzelle dient der Regulation und Koordination der Wechselwirkung zwischen den Komponenten des Immunsystems. Im Gegensatz zu Antikörpern binden die TCR nicht nur an das Antigen allein, sondern erkennen einen molekularen Komplex. Dieser Komplex besteht aus einem Antigenfragment, in aller Regel einem Peptid, sowie einem Histokompatibilitätsantigen. Letzteres wird von einem Genkomplex kodiert, der als Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) bezeichnet wird. Beim Menschen liegen die MHC Gene

auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und werden als HLA (*human leukocyte antigen*)-Komplex bezeichnet.

Die HLA-Klasse I-Moleküle binden kurze, überwiegend intrazellulär entstehende Peptide, die normalerweise aus eigenen Proteinen stammen. Diese Proteinfragmente werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Stammen die Peptide von einem in der Zelle normalerweise nicht vorhandenen Pathogen, werden die entstehenden HLA/Peptid-Komplexe von zytotoxischen Lymphozyten erkannt und die infizierten Zellen eliminiert. Die HLA-Klasse II-Moleküle binden Peptide, die meist aus extrazellulären Proteinen stammen (Bjorkman und Parham, 1990; Yewdwell und Bennink, 1992).

1.1 Antikörper und rekombinante Antikörper-Fragmente

1.1.1 Aufbau eines Antikörpermoleküls

Ein Antikörper hat zwei Funktionen im Rahmen der Immunabwehr: erstens die spezifische Erkennung fremder Moleküle (Antigene) und zweitens die Auslösung einer Kette von Immunreaktionen, die sogenannte effektorische Funktion. Die Funktion eines Antikörpers spiegelt sich in seiner Struktur wider. Bei Verdauung eines Antikörpermolekül mit der Protease Papain entstehen drei Fragmente: die zwei identischen antigenbindenden Fragmente Fab und das für die effektorische Funktion verantwortliche Fragment Fc (Abb. 1-1). Die Analyse der Aminosäuresequenz und der Raumstruktur vieler Antikörper hat gezeigt, daß ein

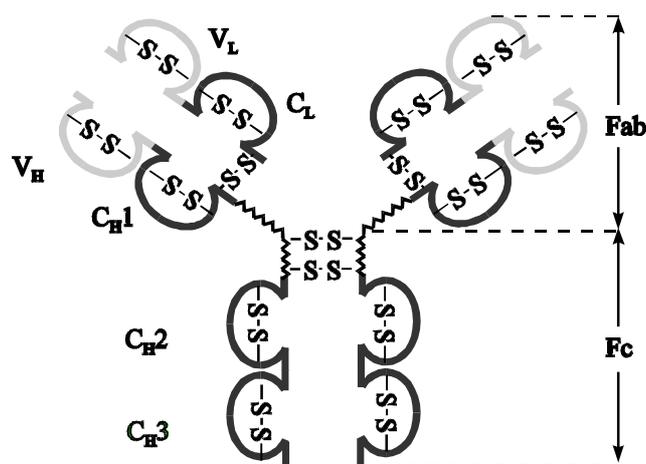


Abbildung 1-1. Schematische Darstellung eines Antikörper-Moleküls am Beispiel von Immunglobulin G.

typisches Molekül aus je zwei gleichen schweren und leichten Polypeptidketten besteht. Alle vier sind über Disulfidbrücken und nichtkovalente Bindungen zu einem Y-förmigen Molekül

verbunden. Jede Polypeptidkette gliedert sich in einzelne Domänen von etwa 110 Aminosäuren Länge. So besteht eine leichte Kette aus einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne. Eine schwere Kette setzt sich aus einer variablen (V_H) und, abhängig von dem Isotyp des Antikörpers (siehe unten), aus drei (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) oder vier konstanten Domänen zusammen. Die Flexibilität eines Antikörpermoleküls ist durch zwei Bereiche bedingt: die Scharnier- (*hinge*) Region und durch die Region zwischen V_H (V_L)- und C_H (C_L)-Domänen, die relativ beweglich ist.

Alle Antikörperdomänen bilden kompakte Einheiten mit einer charakteristischen Faltung. Jede Domäne besteht aus zwei Schichten antiparalleler, durch Wasserstoffbrücken stabilisierter β -Faltblattstrukturen. Diese Sekundärstrukturelemente zeichnen sich durch eine besondere hohe Stabilität aus (Jaenicke *et al.*, 1996). In einer variablen Domäne bestehen diese beiden Schichten aus jeweils fünf und vier und in einer konstanten Domäne aus vier und drei β -Faltblättern. Die Schichten sind durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden. Die entsprechenden Cysteinreste, L23 und L88 für V_L und H22 und H92 für V_H (Numerierung nach Kabat *et al.*, 1991), sind hochkonserviert und in den meisten Immunglobulinen vorhanden. Nur in 0,5 % der analysierten V_H - und in 0,6 % der V_L -Sequenzen wurden in diesen Positionen andere Aminosäuren nachgewiesen (Proba *et al.*, 1997). Die β -Faltblätter werden durch Schleifen verschiedener Größe verbunden. Die aminoterminalen V-Domänen individueller Antikörper weisen eine hohe Variabilität auf. Die Sequenzanalyse der variablen Domänen verschiedener Antikörper hat gezeigt, daß jede variable Region der leichten und der schweren Kette drei relativ kurze hochvariable Segmente enthält, die unmittelbar an der Bindung des Antigens beteiligt sind. Sie werden als *complementarity determining regions* (CDR) bezeichnet und bestimmen die Antigenspezifität des Antikörpers. Die dazwischenliegenden Bereiche bilden den Rahmen (*framework*). In der dreidimensionalen Struktur eines Antikörpers zeigen die CDR in Schleifen nach außen. Jeweils drei CDR der leichten und der schweren Ketten bilden die antigenbindende Region. Ein typisches Ig-Molekül enthält zwei solcher Regionen, die mulden- oder auch taschenförmig ausgebildet sein können. Bei Antikörpern gleicher Spezifität können verschiedene Fc-Regionen auftreten. Fünf Klassen von konstanten Regionen schwerer Ketten (μ , γ , α , δ , und ϵ) wurden in Folge serologischer Untersuchungen definiert, die in der Anzahl der konstanten Domänen variieren: drei für γ , α und δ und vier für μ und ϵ . Die Klassen bestimmen den Isotyp eines Antikörpers: IgG, IgA, IgD, IgM und IgE. Die Isotypen führen verschiedene Effektorfunktionen aus. Beispielsweise

besitzen die membrangebundenen Antikörper IgM und IgD μ - und δ -Ketten. Die in der Blutbahn zirkulierenden Antikörper enthalten fast immer γ -, α - oder μ -Ketten.

IgM ist während der Primärantwort die zuerst und am zahlreichsten ausgeschüttete Immunglobulinart. IgM-Monomere sind als Rezeptoren in der Membran "naiver" B-Zellen vorhanden. Im Serum tritt IgM als Pentamer auf, wobei fünf Monomere durch Disulfidbrücken zwischen benachbarten C_{H4} -Domänen und benachbarten C_{H3} -Domänen zu einem sternförmigen Molekül verbunden sind. Zwei dieser Monomere werden an den C_{H4} -Domänen durch das J-Polypeptid (MW 15000 Da) verbunden. Das Pentamer hat zehn Bindungsstellen und kann durch seine hohe Valenz mit mehreren gleichartigen Determinanten eines Antigens interagieren.

1.1.2 Organisation der für einen Antikörper kodierenden Gene

Immunglobuline werden durch drei separate Genfamilien kodiert: eine für die leichte κ -Kette, eine für die leichte λ -Kette und eine für die schweren Ketten. Jede dieser Genfamilien teilt sich in variable und konstante Regionen, die entsprechend für variable (V) und konstante (C) Teile einer Immunglobulinkette kodieren. Die Genorganisation entspricht der Aufteilung des Proteins in verschiedene Domänen, wobei jede Domäne in der Regel von einem Exon kodiert wird.

Die für die schwere Kette kodierenden Gene liegen auf dem Chromosom 12 bei der Maus und auf dem Chromosom 14 beim Menschen. Die konstante Region (C_H) einer Maus besteht aus acht Genen: μ , δ , γ_1 , γ_3 , γ_{2b} , γ_{2a} , ϵ und α . Die menschliche konstante Region (C_H) enthält neun funktionelle Gene: μ , δ , γ_3 , γ_1 , α_1 , γ_2 , γ_4 , ϵ und α_2 .

Genfamilien, die die beiden Typen der leichten Kette kodieren, liegen auf den Chromosomen 6 und 16 bei der Maus und auf den Chromosomen 2 und 22 beim Menschen. Zur konstanten Region einer Maus gehören ein C_{κ} - und vier C_{λ} -Gene, wobei jedes C_{λ} -Gen mit einem eigenen J-Segment (siehe unten) verbunden ist. Die humane konstante Region einer leichten Kette wird entweder durch ein C_{κ} - oder eines der 6 bis 9 C_{λ} -Gene kodiert (Tonegawa, 1983).

1.1.3 Erzeugung der Antikörpervielfalt

Theoretisch können beim Menschen bis zu 10^{30} verschiedene Antikörper gebildet werden (Winter and Milstein, 1991), dabei gibt es aber nur eine begrenzte Zahl von Antikörpergenen in

der Keimbahn. Die enorme Vielfalt von Antikörpermolekülen entsteht, während sich B-Lymphozyten aus ihren Stammzellen entwickeln, und beruht auf folgenden Grundlagen: der Vielfalt von somatischen Rekombinationen verschiedener Gensegmente, dem Assoziieren verschiedener schwerer und leichter Ketten auf zufallsbedingte Weise und der Variabilität der Verbindungsregionen sowie somatischen Mutationen. Diese vier Erscheinungen werden im folgenden kurz beschrieben:

Die somatische Rekombination

Die große Anzahl von Antikörperspezifitäten wird in erster Linie durch die freie Kombination verschiedener Gensegmente erzeugt. So wird die variable Domäne einer schweren Kette von drei Gensegmenten kodiert: das variable (V_H), das D- (*diversity*) und das J_H - (*joining*) Segment. Das V_H -Segment kodiert für die ersten 94 - 95 Aminosäuren, einschließlich CDR1 und CDR2. Die D- und J_H -Segmente kodieren 1 - 13 und 15 - 17 Aminosäuren und bilden CDR3.

Während der Entwicklung einer Stammzelle in eine Prä-B-Zelle werden die Gensegmente rearrangiert, wodurch ein Gen für eine funktionsfähige Immunglobulin-Kette entsteht (Abb. 1-2). Die reife Boten-RNA (mRNA) kommt durch zwei Prozesse zustande: durch die somatische Rekombination der Gensegmente und durch das Spleißen von primären Transkriptionsprodukten (Tonegawa, 1983; Janeway und Travers, 1994). Als erstes werden auf der DNA die D- und J-Segmente sowie anschließend die V-Segmente miteinander verbunden. Dann wird die daraus resultierende DNA zunächst vollständig in eine primäre RNA umgeschrieben, welche den VDJ-Komplex, das C-Gen sowie das Intron dazwischen umfaßt.

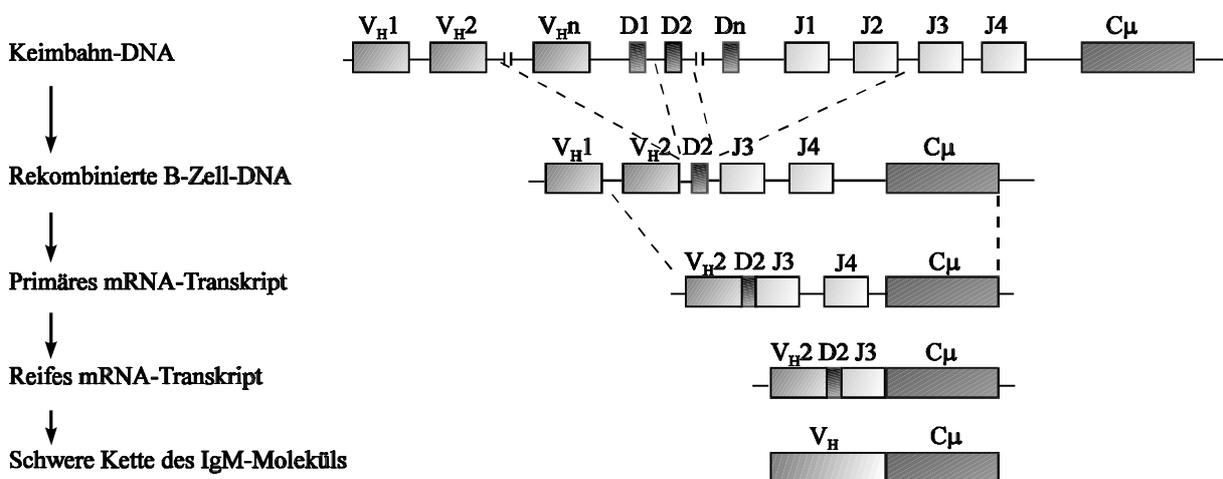


Abbildung 1-2. Schematische Darstellung von Genrearrangements und Erzeugung einer schweren Kette eines IgM-Moleküls während der Differenzierung einer B-Zelle.

Während des RNA-Spleißens werden Intron und überflüssige J-Segmente herausgeschnitten, wodurch eine reife Sequenz der mRNA entsteht.

Die variable Domäne der leichten Kette wird durch ein variables (V_L) und ein J_L -Segment kodiert. Wie bei der schweren Kette wird das J_L - zuerst mit dem V_L -Segment kombiniert, transkribiert und beim RNA-Spleißen mit der konstanten Region verbunden.

Vor jedem V_H - und V_L -Exon befindet sich das für ein N-terminales Signalpeptid kodierende *leader*-Exon. Signalpeptide steuern die Translokation der synthetisierten Ketten in das endoplasmatische Retikulum, wo diese gefaltet und assembliert werden. Diese Signalpeptide sind extrem variabel in ihrer Länge und Sequenz.

Die Kombination schwerer und leichter Ketten

In einem Antikörpermolekül bilden die variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Kette ein Antigenbindungszentrum, das für die Antigenpezifität des Antikörpers verantwortlich ist. Die Vielfalt wird sowohl durch die freie Umlagerung verschiedener Gensegmente auf einem chromosomalen Abschnitt als auch durch die zufällige Kombination verschiedener schwerer und leichter Ketten erzeugt. Die potentielle Komplexität eines primären Repertoires bei der Maus läßt sich, wie folgt, errechnen: Die Anzahl möglicher Kombinationen für die schwere Kette ist $200 (V_H) \times 15 (D) \times 4 (J_H) = 1,2 \times 10^4$, für die leichte κ -Kette $250 (V_k) \times 4 (J_k) = 10^3$. Durch die zufällige Kombination beider Ketten erhöht sich die Zahl möglicher Kombinationen auf etwa 10^7 .

Die Variabilität der Verbindungsregionen

Die bei der Rekombination der Gensegmente erzeugte Antikörpervielfalt wird allerdings durch die Variabilität der Verknüpfungstellen weiter vergrößert.

Alle V-, D- und J-Gensegmente enthalten Erkennungssequenzen für die somatische Rekombination. Die Erkennungssequenzen bestehen aus einer Heptamer- und einer Nonamersequenz, die durch eine Spacersequenz von 12 oder 23 bp Länge getrennt sind (Tonegawa, 1983). Die Asymmetrie der Spacer steuert den Ablauf der Rekombination einzelner Gensegmente. Nur die Enden, die unterschiedliche Spacersequenzen haben (12 und 23 bp), können miteinander verknüpft werden. So befinden sich die Erkennungssequenzen mit 23-bp-langem Spacer am 3'-Ende eines V_H - und am 5'-Ende eines J_H -Segments. Das D-

Segment hat an beiden Enden einen 12-bp-langen Spacer. In der Regel werden zuerst D- und J_H verbunden und dann V_H.

Der genaue Mechanismus der Rekombination ist noch nicht klar. Es wurde aber bewiesen, daß der Prozess von den Produkten der Gene RAG1 (*recombination activator gene*) und RAG2 gesteuert wird. Diese Proteine katalysieren auch die genaue Verbindung zweier verschiedener DNA-Moleküle (McBlane *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1993). Die Verknüpfung der V-Segmente ist dagegen nicht genau und durchläuft eine Prozessierung, wobei an den Verknüpfungsstellen zusätzliche Nukleotide eingeführt werden können. Dies verändert den Leserahmen sowie die Länge der CDR3-Region und führt, in einem Drittel der Fälle, zur Entstehung neuer Spezifitäten.

Die somatischen Mutationen.

Die oben beschriebenen Prozesse finden in einer "naiven" B-Zelle statt, die keinen Kontakt zu einem Antigen hatte. Wenn ein Antigen von einem Ig gebunden wird, entwickelt sich die Zelle weiter: sie vermehrt sich und bildet einen Klon reifer B-Zellen, die große Mengen von IgM synthetisieren und in das Medium ausscheiden (primäre Immunantwort). Während sich die Zelle differenziert, können Punktmutationen auftreten (Tonegawa, 1983; Berek und Milstein, 1988; Neuberger und Milstein, 1995). Dieser Prozess, allgemein als Reifung der Immunantwort bezeichnet, ist mit einer mutationsbedingten Änderung der Antikörperstruktur verbunden. Die Mutationsfrequenz während der Immunantwort beträgt etwa 10^{-3} pro Basenpaar und Zellteilung, wobei die normale Frequenz einer zufälligen Mutation auf 10^{-12} geschätzt wird. Mutationen können im gesamten V-Gen auftreten, jedoch betrifft der größte Teil die CDR. Nur die B-Zellen, deren Antikörper eine hohe Affinität zum Antigen aufweisen, überleben und entwickeln sich zu Plasmazellen, was mit der Zeit zu einer Erhöhung der Affinität der Antikörperpopulation führt.

1.1.4 Rekombinante einkettige Antikörperfragmente und ihre Eigenschaften

Mit Hilfe der in 1.1.3 dargestellten Mechanismen kann das Immunsystem der Vertebraten und des Menschen spezifische hochaffine Antikörper (10^6 - 10^{11} M⁻¹) gegen praktisch alle Antigene ausbilden. Bei der Einwirkung eines Antigens entsteht jedoch ein polyklonale Immunantwort. Für die Forschung sowie für viele Anwendungen ist es hingegen wünschenswert, über eine homogene Antikörperpopulation zu verfügen. Die Züchtung einer Antikörper-sezernierenden

B-Zelle in Kultur ist über einen längeren Zeitraum hinweg jedoch nicht möglich. Die Technologie der Produktion monoklonaler Antikörper, die auf einer Entdeckung von Köhler und Milstein (1975) beruht, bot eine Lösung dieses Problems. Man fusioniert eine Myelomzelle mit einem aktivierten B-Lymphozyten. Das entstehende Myelomhybrid vereint die Eigenschaften der an der Zellfusion beteiligten Elternzellen in sich, d.h., sowohl das unbegrenzte Wachstum als auch die Synthese eines monospezifischen Antikörpers. Diese Technologie löste eine stürmische Entwicklung des Wissens über Antikörper und deren Anwendung aus. Gleichzeitig aber traten auch die Unzulänglichkeiten zutage: es gelang nicht, gegen jedes beliebige Antigen Antikörper herzustellen, und Manipulationsmöglichkeiten, wie die Fusion der Antikörper mit Enzymen und Toxinen sind streng limitiert. Mit der breiteren Applikation von monoklonalen Antikörpern bestand auch das Bedürfnis nach vereinfachten Methoden ihrer Gewinnung.

Der erste Versuch, ein intaktes Ig-Molekül in *E.coli* zu exprimieren, wurde von Boss und Wood (1984) unternommen. Die vollständige schwere und leichte Kette wurden jedoch in unlöslicher Form produziert, ein verbreitetes Phänomen bei heterologer Expression. Außerdem kann eine schwere Kette im Bakteriensystem wegen des Fehlens des entsprechenden Mechanismus nicht glykosyliert werden, was für die effektorischen Funktionen und die Stabilität eines Antikörpermoleküls von Bedeutung sein kann. Mit der Expression kleinerer antigenbindender Antikörperfragmente in *E.coli* konnte dieses Problem schließlich umgangen werden. Mittlerweile ist die Expression von funktionellen Antikörperfragmenten in *Escherichia coli* zu einer attraktiven Alternative zur klassischen Produktion von Antikörpern mit Hilfe von Myelomhybrid-Zellen geworden (Plückthun *et al.*, 1996).

Das variable Fragment (Fv) eines Ig-Moleküls besteht aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L) und ist die kleinste Einheit eines Antikörpers, die eine intakte antigenbindende Tasche enthält (Abb 1-3). Das erste Fv wurde von Skerra und Plückthun (1988) hergestellt, wobei die in den gleichen Vektor getrennt klonierten V_H - und V_L -Ketten in das Periplasma sezerniert wurden, wo sie miteinander ein Fv-Fragment bildeten. Sowohl das Fv-Fragment als auch auf ähnliche Weise produzierte Fab-Fragmente (Better *et al.*, 1988) waren funktionell aktiv und wiesen eine ähnliche Affinität wie der Ursprungsantikörper auf. Jedoch hatten die V_H - und V_L -Ketten eine niedrige Affinität zueinander (K_a von etwa 10^6 M^{-1}), was zu ihrer Dissoziation bei hoher Verdünnung und zu einer niedrigeren Thermostabilität im Vergleich zum Fab-Fragment führte. Ein Fv-Fragment ist

deshalb nicht für die klinische Verwendung geeignet. Da an der Interaktion der variablen Domäne auch die CDR beteiligt sind, ist die Stabilität eines Fv-Fragments von Antikörper zu Antikörper verschieden (Glockshuber *et al.*, 1990).

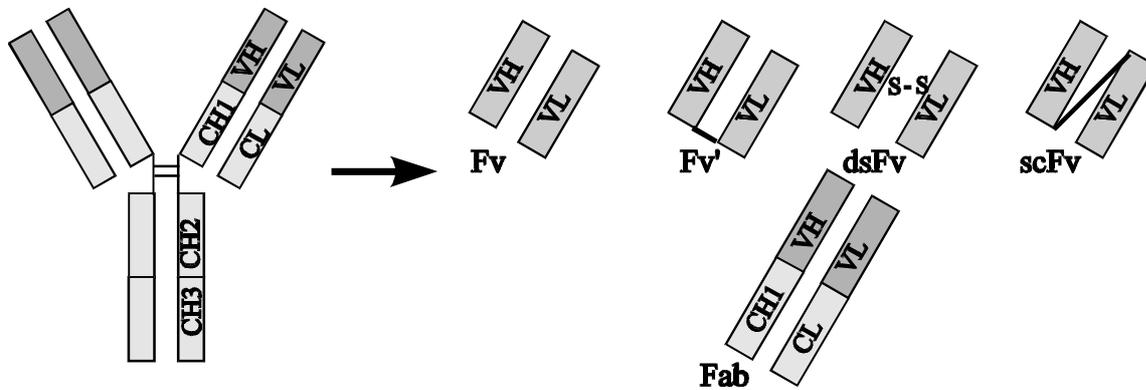


Abbildung 1-3. Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls und seiner rekombinanten Fragmente. Fv - die variable Domänen, Fv' - ein mittels Glutaraldehyd stabilisiertes Fv-Fragment, dsFv - ein durch eine Disulfidbrücke stabilisiertes Fv-Fragment, scFv - ein durch einen Peptidlinker stabilisiertes Fv-Fragment.

Die Stabilität eines Fv-Fragments kann durch eine kovalente Verbindung der V_H - mit der V_L -Domäne erhöht werden. Dies kann durch eine Glutaraldehydbehandlung, durch die Verbindung mit Hilfe von Disulfidbrücken oder mittels eines Peptids erreicht werden. Die erste Methode kann in Anwesenheit des Antigens angewendet werden, um eine Änderung der antigenbindenden Tasche zu vermeiden, was offensichtlich ein großer Nachteil ist. Die zweite Methode beinhaltet die Konstruktion einer Disulfidbrücke (dsFv), die zwischen den FR-Regionen beider Domänen eingeführt wird. dsFv weisen gleiche Vorteile wie einkettige Fv (siehe unten) auf und sind meistens stabiler. Es ist jedoch notwendig, die dreidimensionale Proteinstuktur zu kennen, um die Brücke an einer passenden Stelle einzuführen (Reiter *et al.*, 1994a).

Die Verbindung beider Domänen durch einen Peptid-Linker hat bisher die weiteste Verbreitung gefunden (Huston *et al.*, 1988; Bird *et al.*, 1988). Dabei werden V_H - und V_L -Gene so in einen Vektor kloniert, daß zwischen ihnen eine für das Verbindungsstück kodierende Sequenz liegt. Das resultierende Protein wird als einkettiges Fv-Fragment (scFv) exprimiert, wobei der Carboxyterminus der V_H -Domäne mit dem Aminoterminal der V_L -Domäne verbunden ist (Abb.1-3). Ein kritischer Parameter ist dabei die Länge des Verbindungsstücks (Plückthun, 1992). Um eine sterische Hinderung der Fragmentfaltung zu vermeiden und die

korrekte Struktur der antigenbindenden Tasche zu gewährleisten, muß ein Linker mindestens 15 Aminosäuren lang sein (Huston *et al.*, 1991), was etwa 3,5 nm entspricht (Kortt *et al.*, 1994). Längere Verbindungsstücke scheinen keine modifizierende Wirkung auf die Spezifität des scFv-Fragments zu haben. Außerdem muß der Linker hinreichend flexibel und hydrophil sein. Deshalb enthalten die zur Zeit am meisten verwendeten Vektoren (Gly₄ Ser)₃-Linker. Breitling *et al.* (1991) haben einen Linker entwickelt, der das Tubulin-Epitop EEGEFSEAR enthält, um das exprimierte Produkt mit einem anti-Tubulin-Antikörper nachweisen zu können. Das mit diesem Linker konstruierte anti-Lysozym-scFv-Fragment (Breitling, 1991) war spezifisch. Das für den CD19-Rezeptor spezifische scFv-Fragment erkannte das Antigen auch auf der Zelloberfläche (Kipriyanov *et al.*, 1996).

Lösliche scFv-Fragmente haben die Neigung zu dimerisieren und zu aggregieren. Dies ist von der Stabilität der V_H- und V_L-Domänen und ihrer Assoziationskonstante, also von Parametern, die für jedes Reagenz unterschiedlich sind, abhängig (Plückthun, 1992). Bei gleichen Bedingungen unterscheidet sich deshalb der Anteil an Monomeren, Dimeren und Multimeren für jedes scFv-Fragment. Höhere Konzentrationen verschieben das Gleichgewicht in Richtung von Dimeren, was z.B. bei der Kristallisation, bei der hohe Proteinkonzentrationen benötigt werden, problematisch ist. Auch das Einfrieren des Fragments kann diesen Prozeß auslösen. Dimere haben die gleiche Spezifität wie die Monomeren und eine etwa zweimal höhere Bindungskonstante. Letzteres beruht auf einem Aviditätseffekt (Kortt *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1993). Keine eindeutigen Daten existieren über den Einfluß der Linkerlänge auf die Dimerbildung. Plückthun *et al.* (1996) haben z.B. festgestellt, daß ein 20-mer optimal für die Existenz eines Monomers zu sein scheint.

1.1.5 Expression von scFv-Fragmenten in Bakterien

Im Unterschied zum glykosylierten intakten Antikörper kann ein funktionelles scFv-Fragment in *E.coli* exprimiert werden. Es gibt zwei Strategien für die Produktion. Die erste beinhaltet die Produktion des Proteins im Zytoplasma als *inclusion bodies* und seine Faltung *in vitro*. Das größte Problem stellt hierbei die Bildung korrekter Disulfidbrücken dar. Die meisten Expressionssysteme basieren allerdings auf der Sekretion des Proteins ins Periplasma (Plückthun, 1991). Die scFv-Fragmente werden so kloniert, daß sich am N-Terminus ein bakterielles Signalpeptid befindet, das die Sekretion der exprimierten Fragmente steuert und während der Membrantranslokation abgespalten wird. Die im Periplasma herrschenden

oxidierenden Bedingungen lösen die Bildung der Disulfidbrücken, und als Folge die Entstehung eines funktionellen Fragments aus (Hockney, 1994). Auf dieser Weise wurden eine ganze Reihe von funktionellen spezifischen scFv-Fragmenten hergestellt (Plückthun *et al.*, 1996). Sie sind in der Regel löslich und korrekt gefaltet. Am C-Terminus können sie eine aus 5 oder 6 Histidinen bestehende Sequenz aufweisen, die eine schnelle Aufreinigung des Fragmentes mit Hilfe der immobilisierten IMAC (Metallion-Affinitätschromatographie) gewährleistet.

scFv-Fragmente sind stabiler als Fv-Fragmente und weisen in der Regel eine ähnliche Spezifität wie der intakte Antikörper auf (Malby *et al.*, 1993; Marasco *et al.*, 1993; Shodin und Kranz, 1993; Kortt *et al.*, 1994; Debrock *et al.*, 1997; Nicholson *et al.*, 1997). Sie sind für therapeutische Zwecke besser nutzbar als das intakte Ig-Molekül oder ein Fab-Fragment, da ein scFv-Fragment dank seiner geringen Größe besser in Tumorgewebe eindringen kann. Auf diese Weise können scFv-Moleküle Toxine und Radionuklide zum Tumorgewebe transportieren. Ein mit dem *Pseudomonas*-Exotoxin (PE38) fusioniertes scFv-Fragment war in der Lage, das Wachstum von, in eine Maus eingepflanzten, humanen Karzinomzellen zu inhibieren und sie zu töten (Reiter *et al.*, 1994b). Allerdings weisen scFv-Fragmente eine kürzere Halbwertszeit auf und werden schneller aus dem Organismus ausgeschieden (Yokota *et al.*, 1992). Auch bei Strukturuntersuchungen sind scFv-Fragmente von Vorteil, weil kleinere Moleküle häufig besser geordnete Kristalle bilden. scFv-Fragmente können auch miteinander fusioniert werden, um multivalente oder bispezifische Reagenzien zu erhalten (Mallender und Voss, 1994). Außerdem ist es möglich, ein scFv-Repertoire auf Phagen zu exprimieren. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, Antikörper gänzlich *in vitro* zu produzieren (siehe Abschnitt 1.3), ohne ein Tier oder einen Menschen immunisieren zu müssen.

1.2 HLA-Klasse I-Moleküle

Bei der Vermittlung und Kontrolle der zellulären Immunantwort spielen die Interaktionen zwischen Molekülen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) und Antigenrezeptoren der T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle (Yewdwell und Bennink, 1992). Der MHC-Komplex stellt ein System von nahverbundenen Loci dar, die auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 liegen (Campbell und Trowsdale, 1993). Die physiologische Funktion der MHC-Moleküle des Menschen (HLA-Moleküle) besteht in der Bindung von kurzen Peptiden innerhalb der Zelle

und ihrer Präsentation auf der Zelloberfläche, wo die HLA/Peptid-Komplexe von T-Lymphozyten erkannt werden können (Bjorkman und Parham, 1990; Yedwell und Bennick, 1995). Beteiligt sind daran zwei verschiedene Typen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren Peptide, welche Bruchstücke intrazellulär synthetisierter Proteine sind, während MHC-Klasse II-Moleküle phagozytierte und anschließend prozessierte extrazelluläre Moleküle präsentieren. Im folgenden Abschnitt werden nur HLA-Klasse I-Moleküle, die in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse sind, beschrieben.

1.2.1 Struktur der HLA-Klasse I-Moleküle

HLA-Klasse I-Moleküle sind Heterotrimere, die aus einer schweren Kette, dem nichtkovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin (β_2m , 12 kDa) und einem Peptid variabler Länge bestehen (Abb. 1-4A). Der extrazelluläre Teil der schweren Kette (44 kDa) ist in drei Domänen gegliedert: α_1 , α_2 und α_3 , die jeweils ca. 90 Aminosäuren lang sind. Die Membranregion besteht aus etwa 25, und der zyttoplasmatische Teil aus ca. 30 Aminosäuren. Die α_3 -Domäne

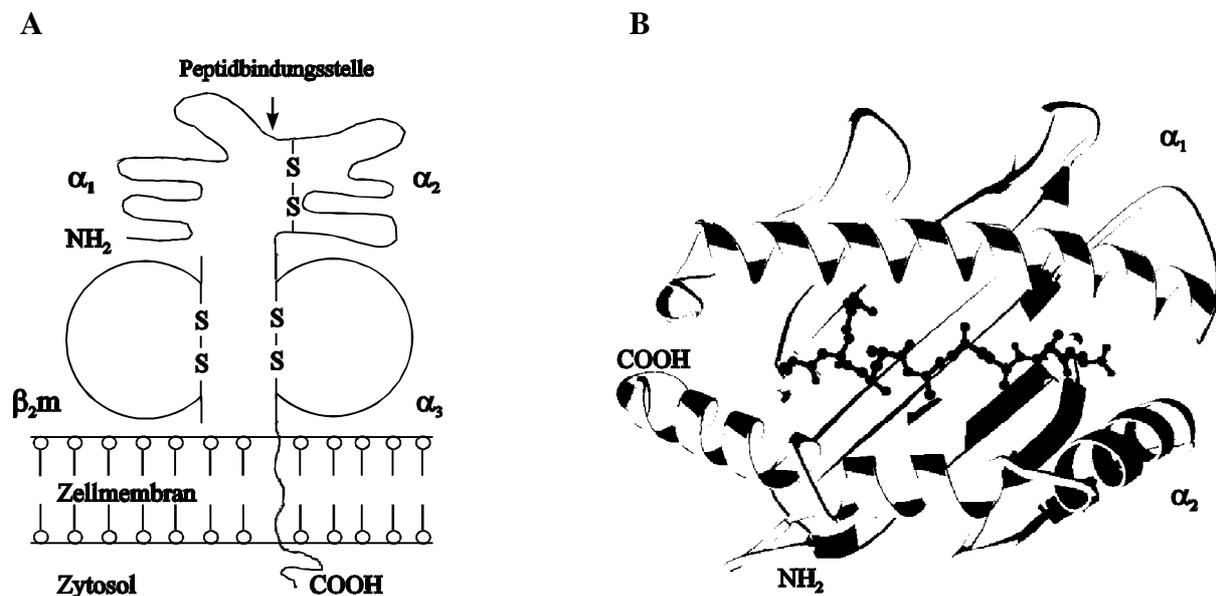


Abbildung 1-4. Struktur der HLA-Klasse I-Moleküle. A: Schematische Darstellung der Seitenansicht eines HLA-Klasse I-Moleküls (nach Davey, 1991). B: Die nach den Röntgen-Strukturdaten gezeichnete Draufsicht des HLA-B27-Moleküls (nur α_1 - und α_2 -Domäne) mit einem gebundenem Peptid. Die Abbildung wurde anhand der Koordinaten von Madden *et al.* (1992) mit Hilfe des Programms Molskript angefertigt.

und β_2m ähneln sowohl in der Primär- als auch in der Tertiärstruktur stark den konstanten Domänen von Antikörpern. Strukturuntersuchungen der HLA-Antigene haben gezeigt, daß die peptidbindende Spalte von den Domänen α_1 - und α_2 ausgebildet wird (Abb. 1-4A). Die Spalte

entsteht durch eine Schicht aus insgesamt acht β -Faltblättern, über die zwei α -Helices gelagert sind (Abb. 1-4B) (Bjorkman und Parham, 1990). Sie dient der spezifischen Bindung von Molekülen, die gegenüber T-Zellen präsentiert werden, in aller Regel kurze Peptide.

Die HLA-Klasse I-Antigene zeichnen sich durch einen extremen Polymorphismus aus. So kennt man schon jetzt jeweils 72, 157 und 35 Allele für die HLA-A, B und C-Gene (Parham, 1996). Die meisten Differenzen in der Peptidsequenz sind in den α 1- und α 2-Domänen konzentriert. Die α 3-Domäne hingegen ist kaum polymorph. Das β _{2m}-Gen jedoch ist nicht polymorph und liegt auf dem Chromosom 15. Für zahlreiche HLA-Klasse I-Allele sind Subtypen definiert worden; so sind für HLA-B35 zur Zeit 21 Subtypen bekannt, wobei B*3501 in der mitteleuropäischen Bevölkerung am meisten vorkommt.

Untersuchungen der Struktur verschiedener MHC/Peptid-Komplexe lieferten detaillierte Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen MHC-Klasse I-Molekülen und Peptiden (Übersicht in Madden, 1995). Die Peptide werden in einer gestreckten Konformation gebunden und liegen in der Spalte parallel zur α 1-Helix. Die Aminosäure-Seitenketten, die an der Ausbildung der Spalte beteiligt sind, bilden eine irreguläre Oberfläche, so daß entlang der Spalte insgesamt sechs Taschen A, B, C, D, E und F entstehen, in denen einige Seitenketten des Peptids verankert werden können (Abb. 1-5). (Matsumura *et al.*, 1992). Die Aminosäuren

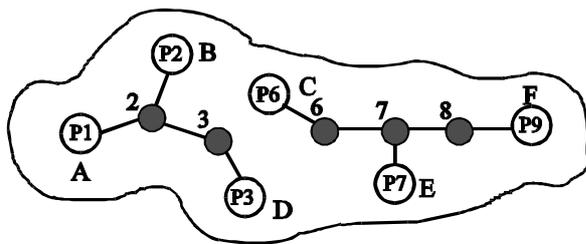


Abbildung 1-5. Lage eines Peptids in der Peptidspalte. A-F - die Positionen der Taschen. Die schwarzen und weißen Kreise bezeichnen entsprechend $C\alpha$ -Atome bzw. die Seitenketten eines Nonapeptids. Die Tasche A bindet den N-Terminus des Peptids, wobei die Seitenkette P1 immer in Richtung der Oberfläche des HLA Moleküls zeigt, und die F-Tasche verbirgt den C-Terminus und die P9-Seitenkette. Abbildung entnommen aus Matsumura *et al.* (1992).

des HLA Proteins an beiden Enden der Spalte interagieren mit dem N- und C-Terminus des Peptids durch ein konserviertes Netz von Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kontakten und bestimmen dadurch die Orientierung des Peptids. Diese Reste sind bei den meisten HLA-Klasse I-Molekülen konserviert, und das beschriebene Bindungsmuster entsteht unabhängig von der Sequenz des gebundenen Peptids.

Eine von der Peptidsequenz abhängige Bindung entsteht zwischen den Seitenketten des Peptids und polymorphen HLA-Resten, die die tiefen Taschen B, C und F bilden. Die Seitenketten des

Peptids, die nach unten gerichtet sind, können in diesen Taschen vollständig aufgenommen werden, was zur Verankerung des Peptids am HLA-Molekül führt. Diese Peptidreste werden deshalb Anker-Aminosäuren genannt. Jedes HLA-Antigen hat mindestens eine solche Tasche. Durch den extremen Polymorphismus der HLA-Antigene unterscheidet sich die Struktur der Taschen bei verschiedenen HLA-Typen, was zur Bindung von Peptiden nur mit bestimmten Aminosäuren in den Ankerpositionen führt (Jardetzky *et al.*, 1991; Elliott *et al.*, 1993; Rötzschke *et al.*, 1992; Cano *et al.*, 1998). Die anderen Reste des Peptids können variieren. Sie unterscheiden sich auch durch die Orientierung der Seitenketten.

In der Regel weisen die an das HLA-B*3501-Molekül bindenden Peptide als Anker-Aminosäuren an Position 2 ein Prolin und am C-Terminus (an Position 8 oder 9) ein Tyrosin auf. Es wurden jedoch Peptide isoliert, die am C-Terminus ein Leucin, Isoleucin oder Methionin haben (Falk *et al.*, 1993).

Die Bindung von Peptiden stabilisiert die Wechselwirkung zwischen der schweren Kette und β_2m in einem MHC-Klasse I-Molekül (Fahnestock *et al.*, 1992). Für eine effiziente Bindung müssen die Peptide meist relativ kurz sein, mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren. Es ist jedoch bekannt, daß einzelne HLA-Klasse I-Moleküle, wie B27, auch bis etwa 35 Aminosäuren lange Peptide binden können (Urban *et al.*, 1994). HLA-B*3501-Proteine können auch zehn oder elf Aminosäuren lange Peptide binden, falls sich ein Tyrosin am C-Terminus befindet (Falk *et al.*, 1993; Takamyja *et al.*, 1993).

1.2.2 Funktion der HLA-Klasse I-Moleküle

HLA-Klasse I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie binden Peptide, die ganz überwiegend aus dem Pool intrazellulärer Proteine stammen. Die Peptide sind in der Regel Bruchstücke normaler Zellbestandteile, können aber auch Proteinen entstammen, die von intrazellulär lebenden Parasiten, etwa Viren, in die Zelle eingeführt wurden. Zytoplasmatische Proteine werden zuerst mit Hilfe des Proteasoms zu kurzen Peptiden degradiert (Hilt und Wolf, 1996). Dann werden die Peptide mit Peptidtransporter-Molekülen (TAP1, TAP2) in das endoplasmatische Retikulum überführt. Dort binden sie an die schweren Ketten der HLA-Klasse I-Moleküle und β_2 -Mikroglobulin, damit ein stabiler ternärer Komplex entsteht, der weiter durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden kann (Monaco, 1992; Heemels and Ploegh, 1995; Pamer and Cresswell, 1998). Falls die HLA-

Moleküle Fremdantigene präsentieren, können die Komplexe von den T-Zell-Rezeptoren (TCR) zytotoxischer T-Lymphozyten erkannt und die Zellen lysiert werden.

TCR erkennen antigene Peptide nur, wenn sie im Komplex mit körpereigenen MHC-Molekülen gebunden sind, eine Eigenschaft, die als MHC-Restriktion bezeichnet wird. Diese Eigenschaft wird während der Reifungsphase im Thymus ausgebildet, wobei unreife T-Zellen in Kontakt mit Epithelzellen kommen, welche MHC-Moleküle präsentieren. Einerseits werden nur solche Thymozyten weiter entwickelt, die körpereigene MHC-Moleküle zu erkennen vermögen (positive Selektion; von Boehmer, 1994). Andererseits wird eine Selbsttoleranz entwickelt, wobei die Thymozyten, die stark mit den normalen körpereigenen MHC-Molekülen und Peptiden reagieren, deletiert werden (negative Selektion; Nossal, 1994). Lediglich T-Zellen, die beide Selektionsprozesse überstehen, gelangen in die Peripherie. Trotz der Eliminierung eines Großteils der unreifen T-Zellen gewährleisten beide Selektionsprozesse eine solche Vielfalt des TCR-Repertoires, daß T-Lymphozyten eine Immunantwort auf beliebige potentielle Pathogene entwickeln können. Als Ergebnis trägt eine gegebene T-Zelle ein TCR-Molekül, das gleichzeitig ein antigenes Peptid und ein bestimmtes MHC-Molekül erkennt.

Die molekularen Mechanismen dieser Wechselwirkung sind noch nicht vollständig geklärt. TCR haben eine den Immunglobulinen ähnliche Genorganisation und gehören ebenfalls der Ig-Superfamilie an (Bentley *et al.*, 1995). Die den MHC/Peptid-Komplex bindende Tasche wird von den N-terminalen variablen Domänen der α - und β -Kette gebildet. Die Strukturanalyse eines Komplexes aus HLA-A2, einem Peptid und einem TCR (Garboczi und Wiley, 1996) zeigte, daß die CDR1- und CDR3-Regionen der beiden TCR-Ketten mit dem Peptid interagieren. CDR2-Regionen wechselwirken mit den α 1- und α 2-Helices des MHC-Moleküls. Allgemein läßt sich sagen, daß ein TCR direkt mit den exponierten Aminosäureresten sowohl des Peptids als auch des HLA-Moleküls reagiert. Außerdem exprimiert jede zytotoxische T-Zelle als Co-Rezeptor CD8. Dieses Molekül gehört auch zur Ig-Superfamilie und besteht aus zwei Ketten. Das CD8-Molekül stabilisiert die Bindung zwischen dem MHC/Peptid-Komplex und dem TCR, wobei es zusätzlich mit den α 1- und α 2-Domänen der schweren Kette sowie mit β _{2m} interagiert (Gao *et al.*, 1997).

1.2.3 Der monokonale Antikörper TÜ165

Die Herstellung und Charakterisierung peptidspezifischer Antikörper gegen HLA-Moleküle ist für die Forschung, Diagnostik und Therapie von großer Bedeutung. Dank ihrer löslichen

Natur, hohen Affinität und Stabilität könnten sie in verschiedenen biochemischen Verfahren wie der Immunpräzipitation oder der Immunhistochemie eingesetzt werden, um T-Zell-Epitope auf Antigen-präsentierenden Zellen zu detektieren und zu charakterisieren. Dies eröffnete die Möglichkeit, die Grundlagen der Wechselwirkung zwischen T- und HLA-präsentierenden Zellen ohne Einsatz relativ instabiler rekombinanter T-Zell-Rezeptoren qualitativ und quantitativ zu erkunden. In der Therapie könnte mit Hilfe derartiger Antikörper die unerwünschte T-Zell-Immunantwort, die bei Autoimmunität auftritt, blockiert werden (Aharoni *et al.*, 1991). Außerdem könnten solche Antikörper Toxine zum Zielort transportieren und dadurch die Vernichtung z.B. von Tumorzellen hervorrufen (Reiter *et al.*, 1997).

Mit Hilfe der Produktion von Myelomhybriden konnte eine ganze Reihe von monoklonalen Antikörpern hergestellt werden, deren Spezifität gegen MHC-Klasse I-Antigene gerichtet ist. Es ist jedoch nur in einigen wenigen Fällen gelungen, Reagenzien herzustellen, die mit einem bestimmten MHC-Molekül auf peptidspezifische Weise, d.h. wie T-Zell-Rezeptoren, reagieren (Murphy *et al.*, 1989; Aharoni *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1994). Die Schwierigkeiten sind u.a. darauf zurückzuführen, daß die Erkennungsbereiche von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren eine unterschiedliche Topologie aufweisen. Immunglobuline erkennen in der Regel nach außen gewölbte Moleküloberflächen (McCallum *et al.*, 1996). Da die Peptide tief in der Spalte eines HLA-Proteins liegen, tragen sie wenig zur Antigenität des gesamten HLA/Peptid-Komplexes bei. Deshalb erkennen Antikörper in erster Linie den HLA-Anteil eines HLA/Peptid-Komplexes. T-Zell-Rezeptoren werden jedoch im Thymus so selektioniert, daß sie in der Lage sind, sowohl das HLA-Molekül als auch das gebundene Peptid zu erkennen. Es ist auch zweckmäßig, daß B-Lymphozyten bzw. Antikörper nicht darauf ausgerichtet sind, HLA/Peptid-Komplexe zu erkennen, um T-Zell-Epitope nicht zu blockieren.

Der monoklonale Antikörper TÛ165, ein IgM κ , ist einer der wenigen bisher gewonnenen Antikörper, der einem T-Zell-Rezeptor ähnliche Eigenschaften aufweist, wobei er die Komplexe eines HLA-B35-Moleküls mit bestimmten Peptiden aus Epstein-Barr-Virus (EBV) erkennt (Uchanska-Ziegler *et al.*, 1993). Der Antikörper reagiert nur mit HLA-B35-exprimierenden lymphoblastoiden Zellen, wenn sie mit EBV infiziert sind. Bindungsstudien an verschiedenen B35/Peptid-Komplexen haben gezeigt, daß TÛ165 die EBV-Peptide LPPHDITPY und VPATQPQY aus den Virusproteinen EBNA 3C und EBNA 3A sowie strukturell ähnliche synthetische Peptide wie LPPLDITPY, LPPHEITPY, LPPNDITPY und

LPPHAAAPY erkennt (persönl. Mitteilung von Dr. B. Uchanska-Ziegler) und keine Reaktion mit unbeladenen HLA-B35-Molekülen zeigt. Das exakte Epitop des Antikörpers ist bisher noch nicht charakterisiert. Neben den Anker-Aminosäuren (Prolin P2 und Tyrosin P9) scheint eine verzweigte aliphatische Aminosäure (Val oder Leu) als P1 wichtig zu sein. An P4 wird eine Säure oder starke Base nicht akzeptiert, obwohl die entsprechenden Peptide sehr wohl an B35-Moleküle binden können.

1.3 Phagenbibliotheken der Antikörper-Fragmente und ihre Eigenschaften

Die Einführung der Hybridomatechnik ermöglichte es, monoklonale Antikörper herzustellen, welche dank ihrer einzigartigen Spezifität und Affinität als immunodiagnostische und ansatzweise auch als therapeutische Reagenzien eine breite Verwendung gefunden haben (Waldmann, 1991). Die Anwendung monoklonaler Antikörper tierischen Ursprungs (meistens von Nagern) in der Humantherapie ist jedoch problematisch, weil sie beim Menschen eine Immunantwort provoziert. Die Herstellung sogenannter chimärer Immunglobuline, die sich aus variablen murinen Regionen und konstanten humanen Regionen zusammensetzen, verringerte die Immunogenität derartiger Antikörper stark, eliminierte sie jedoch nicht vollständig (Neuberger *et al.*, 1985; Brüggemann *et al.*, 1989). Die Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern mittels Hybridoma-Technologie ist mit verschiedenen technischen Problemen verbunden. Es gibt sehr wenige geeignete Fusionspartner für eine humane B-Zelle, um eine stabile Myelomzelle zu bilden. Außerdem weist ein Maus/Mensch-Myelomhybrid typischerweise eine niedrige oder instabile Antikörperproduktion auf. Hinzu kommt noch das ungelöste ethische Problem der Immunisierung eines Menschen mit bestimmten Antigenen (Glassy und Dilman, 1988; Parren, 1992). Darüber hinaus schließt der Toleranzmechanismus die Ausbildung monoklonaler Antikörper gegen körpereigene Proteine aus. Mit der Verwendung von Phagenbibliotheken sollte es prinzipiell gelingen, diese Nachteile zu umgehen und menschliche Antikörper bzw. antikörperähnliche Proteine *in vitro* herzustellen (Winter und Milstein, 1991).

1.3.1 Aufbauprinzipien und Verwendung einer Phagenbibliothek

Das Prinzip einer Phagenbibliothek beruht auf der Nachahmung des *in-vivo*-Selektionsprozesses im Immunsystem. Ein Repertoire von Antikörper-Fragmenten (scFv oder

Fab, siehe 1.1.4.) wird auf der Oberfläche filamentöser Phagen exprimiert, wobei jeder Phagenpartikel ein Antikörperfragment nur einer Spezifität trägt. Die Bibliothek wird durch die Bindung der Phagenpartikel an ein Antigen selektioniert. Mit den auf diese Weise angereicherten Phagen werden anschließend Bakterien infiziert, die nach dem Eindringen der Phagen entsprechende lösliche Fragmente sezernieren (Übersicht in Winter *et al.*, 1994). Die Affinitätsreifung der gewonnenen Fragmente, die bei Immunglobulinen durch somatische Mutationen verursacht wird, kann durch Punktmutationen oder den Austausch der Ketten erhöht werden. Bei der Herstellung und Verwendung von Phagenbibliotheken werden zwei technologische Errungenschaften genutzt: die Amplifizierung eines Repertoires von V_H - und V_L -Genen aus antikörperproduzierenden Zellen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Orlandi *et al.*, 1989) und die Möglichkeit, kurze Peptide auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen zu exprimieren (Smith 1985; Marks *et al.*, 1992a).

Die filamentösen Bakteriophagen M13, fd und fl gehören zu einer Gruppe engverwandter Viren, die gram-negative Bakterien infizieren, ohne sie zu lysieren. Das Genom eines filamentösen Phagen besteht aus etwa 6400 Nukleotiden und kodiert für zehn Proteine. Die Phagenhülle wird aus dem Produkt des Gens VIII (pVIII), das in etwa 3000 Kopien vertreten ist und aus den Produkten der Gene III (pIII), VI, VII und IX, die jeweils etwa in Form von fünf Proteinen vertreten sind, zusammengesetzt. Das Hauptprotein pVIII ist für die Umhüllung der einzelsträngigen DNA verantwortlich. Das Protein pIII wird auf der Spitze des Phagenpartikels exprimiert und ist für die Infektion von Bakterien verantwortlich. Es koppelt an den F-Pilus der Bakterienmembran an. Ein Peptid kann an das N-terminale Ende von pIII fusioniert werden, ohne die Morphogenese und die Infektionsfähigkeit des Phagen zu beeinträchtigen (Parmley und Smith, 1988). Auf der Phagenoberfläche können auch scFv- und Fab-Fragmente exprimiert werden (McCafferty *et al.*, 1990; Hoogenboom *et al.*, 1991).

Für die Expression auf Phagen werden die für Antikörperfragmente kodierenden Gene und das pIII-Gen in ein chimärisiertes Plasmid, genannt Phagemid, kloniert. Dieses Plasmid enthält sowohl einen Replikationsursprung für Plasmide als auch den Phagen-Replikationsursprung (Hoogenboom *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991, Dübel *et al.*, 1993). Phagemids vermehren sich in einer Wirtszelle wie doppelsträngige Plasmidmoleküle. Werden die Zellen jedoch gleichzeitig mit einem Helferphagen infiziert, so vermehren sich die Phagemids wie ein Einzelstrang-DNA-Bakteriophage. Die DNA eines Helferphagen enthält die genetische Information für alle Phagenproteine, die für die Verpackung und Sekretion von

Phagenpartikeln nötig sind, jedoch einen defekten Replikationsursprung, wodurch sie mit einer niedrigeren Effektivität als das für das scFv/pIII-Fusionsprotein kodierende Phagemid repliziert wird. Am Ende entsteht ein infektiöser Phagenpartikel, der sowohl pIII als auch das fusionierte Protein scFv/pIII präsentiert und das für das Fusionsprotein kodierende Phagemid trägt (Abb. 1-6). Manche Phagemids haben ein Amber-Stopcodon zwischen den Antikörperketten- und dem pIII-Gen (pHEN1; Hoogenboom et al., 1991). Dies erlaubt eine Umschaltung von der Expression des Fusionproteins zur Produktion eines löslichen Antikörperfragments in einem nichtsuppressiven Stamm.

Ein Repertoire der V_H - und V_L -Gene kann aus der Population peripherer B-Lymphozyten (PBL) (Ward *et al.*, 1989) isoliert und zur Konstruktion einkettiger variabler Domänen (z. B. scFv-Fragmenten) verwendet werden. Eine zufällige Kombination der schweren und leichten Ketten führt dabei zur Entstehung einer Bibliothek von Antikörper-Fragmenten verschiedener Spezifität (Huse *et al.*, 1989; Marks *et al.*, 1992). Die Expression der Bibliothek auf der Oberfläche von Phagen bietet die Möglichkeit, mit Selektionstechniken Reagenzien zu erzeugen, die prinzipiell jedes beliebige Antigen erkennen können sollten.

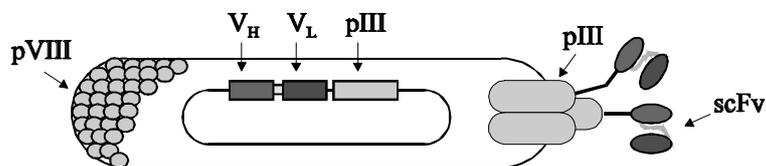


Abbildung 1-6. Schematische Darstellung eines scFv-exprimierenden Phagenpartikels.

1.3.2 Affinität von scFv-Fragmenten aus einer Phagenbibliothek

Die potentielle Affinität von Fragmenten ist von der Komplexität der Phagenbibliothek abhängig. Mit zunehmender Komplexität einer Phagenbibliothek wächst auch die Chance, Antikörper mit hoher Affinität im vorgegebenen Repertoire zu finden. Nach ihrem Aufbauprinzip lassen sich Phagenbibliotheken in unterschiedliche Typen einteilen:

Naive Bibliotheken

Die primäre Immunantwort umfaßt ein großes Repertoire von 10^6 - 10^8 Antikörpern vom IgM-Typ, die in der Lage sind, verschiedenste Antigene mit meist niedriger Affinität zu erkennen. Dieses naive Repertoire der bereits *in vivo* rekombinierten V-Gene der schweren und leichten Ketten kann in Form von μ -, κ - und λ -mRNA aus peripheren B-Lymphozyten (PBL)

nichtimmunisierter Spender gewonnen werden. Die so hergestellte Bibliothek der V_H - und V_L -Gene wird in das Phagemid kloniert, wobei eine zufällige Zusammenstellung der beiden Ketten entsteht (Marks *et al.*, 1991; Dübel *et al.*, 1992). Die erste *single pot*-Phagenbibliothek humaner scFv-Fragmente wurde aus den PBL zweier Spender etabliert und enthielt $2,9 \times 10^7$ Klone (Marks *et al.*, 1991). Aus dieser Bibliothek konnten scFv-Fragmente mit einer Spezifität für 25 verschiedene Antigene isoliert werden, darunter humane Proteine wie lösliche CD4-Rezeptoren und TNF α (*tumor necrosis factor*) (Griffiths *et al.*, 1993). Die Affinität der isolierten Antikörper betrug 10^6 - 10^7 M $^{-1}$ und entsprach der Affinität der IgM-Antikörper in der primären Immunantwort, war jedoch nicht genügend hoch für eine therapeutische Anwendung dieser Antikörper.

Vor kurzem wurde eine Phagenbibliothek aus V-Genen von 43 nichtimmunisierten Spendern hergestellt, deren Repertoire etwa $1,4 \times 10^{10}$ Klone umfaßt und die zur Zeit die komplexeste naive Bibliothek ist (Vaughan *et al.*, 1996). Die PCR-Primer wurden so konstruiert, daß die V-Gene aller fünf bekannten Antikörperklassen isoliert werden konnten. Die gewonnenen Antikörper wiesen eine sehr hohe Affinitätskonstante von etwa 10^9 - 10^{10} M $^{-1}$ auf und waren damit vergleichbar mit den mittels der Hybridomatechnologie hergestellten Antikörpern.

Hieraus ist zu ersehen, daß der größte Nachteil einer naiven Phagenbibliothek die Abhängigkeit der Affinität der Antikörper von der Bibliotheksgröße ist. Außerdem ist die Komplexität der Bibliothek durch die Eigenschaften jedes IgM-Repertoires begrenzt: durch unterschiedliche Expression der V-Genfamilien und verschiedene „immune Vorgeschichten“ der Spender, die zu somatischen Mutationen der Ketten führt.

Synthetische Bibliotheken.

Bei der Konstruktion einer synthetischen Bibliothek werden die V-Gene aus bereits klonierten V-Gensegmenten *in vitro* zusammengesetzt. Wie im Abschnitt 1.1.3 beschrieben, entsteht ein V_H -Gen durch die Rekombination der V_H , D, und J_H -Segmente, wobei die CDR3 von D- und J_H -Segmenten kodiert werden. Die CDR3-Region der schweren Kette weist die größte Struktur- und Längenvariabilität auf und spielt eine Schlüsselrolle in der Bestimmung der Antikörperspezifität (Kabat and Wu, 1991).

In der ersten synthetischen Bibliothek (Hoogenboom and Winter, 1992) wurden 49 vorher klonierte V_H -Segmente eines Menschen mit einer synthetischen CDR3-Region und dem J_H4 -Segment mittels PCR rekombiniert (Tomlinson *et al.*, 1992). Die CDR3-Region wies eine

Länge von fünf oder acht Resten auf, wobei die fünf ersten Aminosäuren durch Zufallssequenz kodiert wurden. Das hergestellte V_H -Repertoire wurde mit der $V_{\lambda 3}$ -Kette als scFv-Fragment auf Phagen exprimiert. Die Bibliothek enthielt etwa 2×10^7 Klone und die Affinität der isolierten Antikörper betrug 10^6 M^{-1} . Die Komplexität war noch nicht hoch genug, weil es schwierig war, Reagenzien mit Spezifität für Protein-Antigene zu gewinnen. Nach der Einführung der synthetischen CDR3-Regionen mit einer Länge von 4-12 Aminosäuren, kodiert durch eine vollständig zufällige Sequenz, ist es dann gelungen, eine hochkomplexe Bibliothek zu konstruieren, die etwa 10^8 Klone enthält (Nissim *et al.*, 1994). Aus dieser Bibliothek wurden Antikörper gegen mindestens 18 Antigene isoliert. Dazu gehörten Haptene, menschliche Proteine, z.B. das Tumorsuppressorprotein p53, sowie Zelloberflächenproteine, z.B. lösliche T-Zell-Rezeptoren. Das anti-p53-scFv-Fragment erkannte das Protein auch auf der Zelloberfläche (Nissim *et al.*, 1994).

Später wurde eine ähnliche Bibliothek konstruiert, bei der die CDR3 eine Länge von 6-15 Resten hatten, wobei nur die ersten sechs Reste variierten. Das V_H -Repertoire war mit sieben leichten Ketten der Familien $V_{\kappa 1}$, $V_{\kappa 4}$, $V_{\lambda 1}$ sowie $V_{\lambda 3}$ verbunden (de Kruif *et al.*, 1995). Dadurch stieg die Komplexität auf $3,8 \times 10^8$ Klone. Die Affinität der gewonnenen Antikörper lag in derselben Größenordnung wie bei den oben beschriebenen und betrug $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Die Affinität der gewonnenen Antikörper kann *in vitro* durch weitere Veränderung der V-Gene verbessert werden. Allerdings beinhaltet dies die Konstruktion einer zweiten Bibliothek (der Mutanten) und ihre Selektion. Zufällige Mutationen werden durch PCR mit *error-prone*-Polymerase durchgeführt (Gram *et al.*, 1992; Deng *et al.*, 1994). Mit Hilfe von CDR-walking ist es gelungen, die Affinität des anti-gp120 Fab-Fragments 420-fach zu erhöhen und den picomol-Bereich zu erreichen (Yang *et al.*, 1996). Diese Methode beruht auf dem Mutieren einer CDR und der anschließenden Selektion von Klonen am Antigen. Der beste Klon wird in der nächsten CDR-Region mutiert. Kettenaustausch (*chain shuffling*) wurde bei Marks *et al.* (1992b) verwendet, um die Affinität der anti-Hapten-scFv von 10^{-7} M auf 10^{-9} M zu verbessern. Schließlich ist es Schier *et al.* (1996) gelungen, die Affinität eines scFv gegen das Tumorantigen c-erbB-2 6-mal zu verbessern und eine für monoklonale Antikörper charakteristische Dissoziationskonstante von 10^{-9} M zu erreichen.

1.3.3 Selektionsstrategien

Die meistens bisher isolierten spezifischen scFv-Fragmente wurden durch die Bindung an gereinigte Antigene gewonnen, die an eine Festphase wie z.B. an spezielle Plastikröhrchen durch Inkubation immobilisiert wurden (Marks *et al.*, 1991). Als Festphase wurden auch Latexkügelchen (Andersen *et al.*, 1996) oder paramagnetische Streptavidinkügelchen für biotinylierte Antigene (Hawkins *et al.*, 1992) verwendet. Die freien Bindungsstellen werden mit Milchpulver abgesättigt und die scFv-exprimierenden Phagen dazugegeben. Nach der Inkubation werden die nichtgebundenen Phagen abgewaschen und gebundene Phagenpartikel mittels Triethylamin eluiert. Dann werden TG1-Bakterien mit den angereicherten Phagen infiziert und auf einer Agarplatte vermehrt. Danach folgt die Infektion der Bakterien mit einem Helferphagen, was zur Entstehung der scFv-exprimierenden Phagenpartikel führt. Sie werden isoliert und für eine weitere Selektionsrunde verwendet. Mit den nach 4-5 Runden angereicherten Phagen werden HB2151-Bakterien infiziert, die lösliche scFv-Fragmente exprimieren.

Der Nachteil dieser Methode besteht in der aufwendigen Herstellung des nativen Antigens für die *in vitro*-Inkubation. Marks *et al.* (1993) ist es gelungen, blutgruppenantigenspezifische scFv-Fragmente mittels Inkubation mit antigenexprimierenden Zellen zu isolieren. Generell ist die Selektion einer Phagenbibliothek auf den Zellen jedoch noch nicht etabliert.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Gegen HLA/Peptid-Komplexe gerichtete peptidabhängige Antikörper sind von großem wissenschaftlichen Interesse und potentiell in Diagnostik und Therapie von Bedeutung. Antikörper sind entsprechend ihrer Natur gut löslich und stabil, sie können für die Bestimmung von T-Zell-Epitopen unter Bedingungen, die die Verwendung von T-Zellen und rekombinanten T-Zell-Rezeptoren ausschließen, eingesetzt werden. Die Charakterisierung bereits vorhandener monoklonaler Antikörper mit T-Zell-Rezeptor-ähnlichen Eigenschaften, wie sie der HLA-B35-spezifische Peptid-abhängige mAk TÜ165 aufweist, kann Erkenntnisse über molekulare Vorgänge bei der Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und HLA/Peptid-präsentierenden Zellen liefern. Zu diesem Zweck bietet sich die Konstruktion einkettiger variabler Domänen (scFv-Fragmente) dieses Antikörpers an, da sich hierbei genügende Mengen des entsprechenden Immunglobulins relativ schnell gewinnen lassen.

Phagenbibliotheken menschlicher scFv-Fragmente ermöglichen es, spezifische Antikörperfragmente gänzlich *in vitro* zu gewinnen und auf das aufwendige Verfahren der Hybridoma-Technologie zu verzichten. Die Möglichkeiten dieser Methode ließen sich wesentlich erweitern, wenn es gelänge, die Selektion einer Bibliothek an Zellen mit dem Ziel durchzuführen, gegen ein bestimmtes Zelloberflächen-Protein, insbesondere HLA-Klasse I-Moleküle, gerichtete scFv-Fragmente zu gewinnen.

Die Aufgabestellung wurde in folgende Problemkomplexe aufgeteilt:

- *Molekularbiologische Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers TÜ165.*

Dies sollte die Klonierung und Sequenzierung der variablen Fragmente der schweren und leichten Ketten von TÜ165 beinhalten.

- *Expression und Charakterisierung des scFv-Fragments von TÜ165.*

Die variablen Genfragmente sollten in einen Expressionsvektor kloniert werden, um ein funktionelles scFv-Fragment gewinnen zu können. Auch die Expressions- und Reinigungsbedingungen des rekombinanten Proteins sollten optimiert werden. Schließlich sollte die Reaktivität des erhaltenen scFv-Fragments mit humanen HLA-typisierten Zelllinien getestet und mit der Reaktivität des ursprünglichen Antikörpers verglichen werden.

- *Erarbeiten und Optimieren von Selektionsmethoden am Beispiel von TÜ165-scFv-tragenden Phagen.*

Durch die Klonierung des TÛ165-scFv-Fragments in ein Phagemid sollten TÛ165-scFv-tragende Phagenpartikel hergestellt, und die Bedingungen für die Isolierung der Phagenpartikel aus einem Überschuß unspezifischer Phagen mittels HLA-B35-präsentierenden Zellen untersucht werden. Mit Hilfe dieser modellhaften Selektion sollten die Bedingungen für die Selektion einer Phagenbibliothek mit Zellen erarbeitet und optimiert werden.

- *Isolierung HLA-Klasse I-Molekül-spezifischer scFv-Fragmente aus einer Phagenbibliothek und ihre Charakterisierung.*

Es sollte versucht werden, durch die Selektion mit der synthetischen humanen Phagenbibliothek (Nissim *et al.*, 1994) unter Verwendung der HLA-hemizygoten Zelllinie BM28.7 (Volz *et al.*, 1992) scFv-Fragmente mit einer Spezifität für HLA-Klasse I-Moleküle zu gewinnen und zu charakterisieren.