

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion des scFv-Fragmentes von TÛ165

Dank seiner T-Zell-Rezeptor-ähnlichen Eigenschaften stellt der mAk TÛ165 einen interessanten Kandidaten für die Herstellung eines Modellsystems dar, mit dem die Wechselwirkung eines T-Zell-Rezeptors mit einem HLA-Komplex, unter Umständen sogar mittels der Röntgenstrukturanalyse, untersucht werden kann. Wie im Abschnitt 1.1.4 dargestellt, eignen sich rekombinante Antikörperfragmente am besten hierzu. Bei Herstellung der Fab- oder Fv-Fragmente aus IgM ist jedoch schwierig. Eine möglicherweise günstigere Alternative bietet die Expression von funktionellen Antikörperfragmenten in *E.coli*. Deshalb wurde ein scFv-Fragment von TÛ165 hergestellt. Das Verfahrensschema zur Herstellung eines rekombinanten scFv-Fragmentes von TÛ165 ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

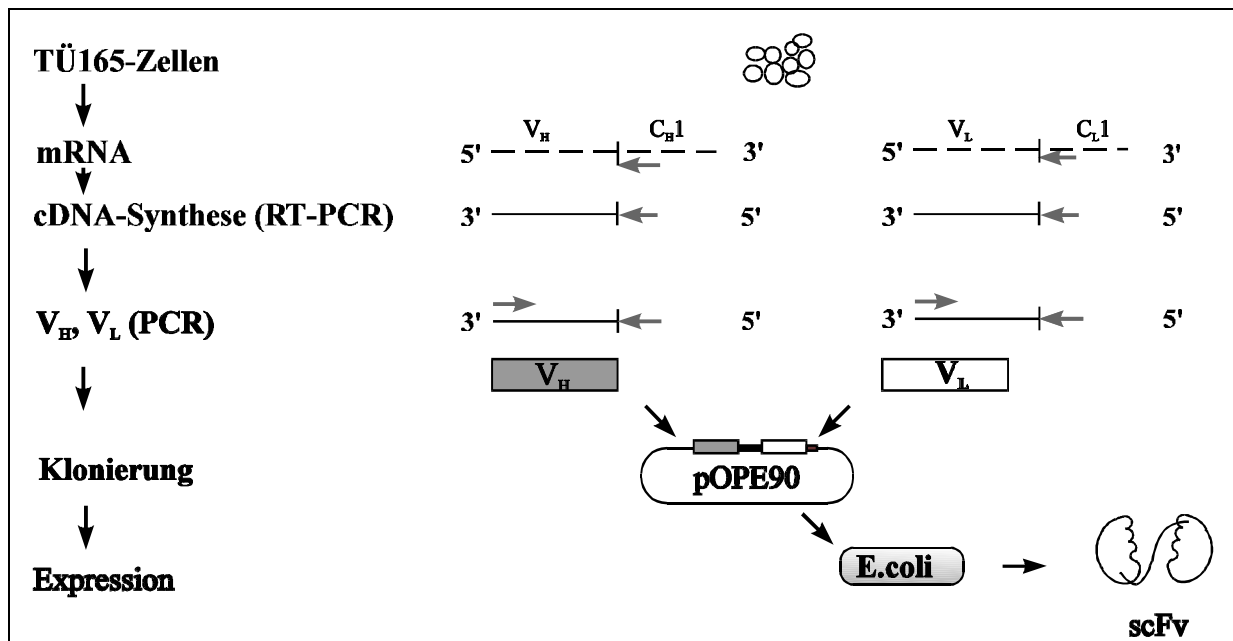


Abbildung 4-1. Strategie der Herstellung des scFv-Fragmentes des monoklonalen Antikörpers TÛ165.

Zuerst wurde die mRNA aus TÛ165-Myelomhybridzellen extrahiert und für die Synthese von cDNA mittels Revers-Transkriptase-PCR (RT-PCR) eingesetzt. Die mit Hilfe der PCR amplifizierte V_H- und V_L-Regionen wurden dann in den Plasmidvektor pOPE90 ligiert und sequenziert. Nach der Expression in Bakterien wurden die scFv-Fragmente aus bakteriellen *inclusion bodies* mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden

Bedingungen isoliert und später renaturiert. Anschließend wurde die Spezifität des Fragmentes auf HLA-typisierten Zellen mittels Durchflußzytometrie getestet.

Der Vektor pOPE90 (Dübel *et al.*, 1993), der das scFv-Fragment des Anti-Lysozym-Antikörpers D1-3 enthält (Verhoeyen *et al.*, 1988), wurde für die Konstruktion und Expression des TÛ165-scFv-Fragmentes verwendet. Die aminoternale Signalsequenz des bakteriellen *Leaders* für die Pectatlyase (*pelB*; Lai *et al.*, 1987) sollte den Transport der scFv-Fragmente durch die innere Membran in das Periplasma gewährleisten. Der Plasmidvektor pOPE90 (Abb. 2-1) ist so konstruiert, daß sich zwischen den V_H- und V_L-Fragmenten ein Verbindungsstück (Linkerpeptid) befindet, das ein α -Tubulin-Epitop (EEGEFSEAR) (Kilmartin *et al.*, 1982, Breitling *et al.*, 1986) enthält. Dies erlaubt den Nachweis des exprimierten Proteins mittels eines anti-Tubulin-Antikörpers im Western-Blot und in der Durchflußzytometrie. Am C-Terminus des scFv-Fragments befinden sich zudem noch fünf Histidin-Reste, um eine Reinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie zu ermöglichen.

4.1.1 Konstruktion der Primer für die PCR

Für die Amplifizierung von V_H- und V_L-Regionen des mAk TÛ165 wurde zunächst RNA aus der Zelllinie TÛ165 isoliert und für die Synthese der cDNA mittels RT-PCR verwendet.

Dabei wurde der erste Strang der cDNA mit Hilfe des spezifischen Rückwärtsprimers C _{μ} B für die schwere Kette bzw. C _{κ} B für die leichte Kette synthetisiert. Die Rückwärtsprimer hybridisierten am 5'-Ende (zwischen den Resten 114 und 130) der ersten konstanten Domäne. Unmittelbar danach wurden die V_H- und V_L-cDNAs mit den Rückwärts(C _{μ} B, C _{κ} B)- und den universalen Vorwärts(V _{μ} F, V _{κ} F)-Primern nach dem Verfahren von Dübel *et al.* (1992) amplifiziert. Die Primer für die PCR-Vorwärtsreaktion sollten zum 5'-Ende der variablen Region (*framework* (FR)-1-Bereich) komplementär sein. Die variable Region der schweren Kette wurde mit den Primern V _{μ} F und C _{μ} B bei der optimalen Annealing-Temperatur von 65°C amplifiziert. Die PCR für die V_L-Region wurde mit den Primern V _{κ} F und C _{κ} B bei einer Annealing-Temperatur von 64°C durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente hatten die erwartete Größe von etwa 400 bp. Die PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen verdaut (PstI und HindIII für das V_H-Fragment, BstEII und BamHI für das V_L-Fragment),

m-Kette

	----- Leader-Sequenz -----																		
2b2	ATG	GCT	GTC	CTG	GTG	CTG	TTC	CTC	TGC	CTG	GTT	GCA	TTT	CCA	AGC	TGT	GTC	CTG	TCC
H26g	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5c3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12g10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Konsensus	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	----- 5'-V _H -----																		
2b2	CAG	GTG	CAG	CTG	AAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GGC	CTG	GTG							
H26g	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
5c3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
12g10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
Konsensus	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
TÜ165	--A	--T	---	---	C--	---	---	---	---	---	---	---							
	←	-----										→							
	1																		10

k-Kette

	----- Leader-Sequenz -----																													
Mopc173	ATG	GAC	ATG	AGG	GCT	CCT	GCT	GAG	GTT	TTT	GGC	TTC	TTG	TTG	CTC	TTG	TTT	CAA	GGT	ACC	AGA	TGT								
Mopc41	---	---	---	---	---	---	--A	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	-A-	---	---	---	---							
18c10	---	-T-	T-C	T--	---	---	T-C	C--	--T	C--	C--	---	---	---	-GT	---	---	---	---	---	---							
Bxw16	---	---	--C	---	---	---	---	---	T--	C--	---	A--	---	---	---	---	-G-	---	-C-	---	G--	---	---							
Konsensus	---	---	---	---	---	---	---	---	T--	C--	---	---	---	---	---	---	-/-	---	---	---	---	---	---							
	----- 5'-V _L -----																													
Mopc173	GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	TTA	TCT	GCC	TCT	CTG	GGA	GAA	AGA	GTC	AGT	CTC	ACT								
Mopc41	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
18c10	--T	---	---	---	---	---	A--	A--	---	---	C-G	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	-CC	A--	-G-						
Bxw16	---	---	---	---	-TT	---	---	---	---	-G	A-G	-T-	-G-	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	T--						
Konsensus	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---						
TÜ165	--T	---	---	---	---	--A	AGC	---	AG-	AG-	C-G	AGC	---	AGC	---	--T	--C	--G	---	-CC	A--	-A-								
	←	-----																	→											
	1																							20						
Mopc173	TGC	CGG																												
Mopc41	---	---																												
18c10	--C	A--																												
Bxw16	--C	---																												
Konsensus	---	---																												
TÜ165	---	---																												
	→	-----																					→							
	23																													

Abbildung 4-2. Vergleichsdarstellung der 5'-Sequenzen der variablen schweren und leichten Ketten des mAk TÜ165 mit einigen Sequenzen aus den Untergruppen Ib (für die schwere Kette) und V_κ9 (für die leichte Kette). Die durch verwendete Primer und Klonierungsverfahren eingeführten Nukleotide sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Identische Nukleotide sind durch einen Strich (-) dargestellt. Die Numerierung der Triplets erfolgte nach Kabat *et al.* (1991).

in den Plasmidvektor pOPE90 getrennt kloniert und sequenziert. Nach dem Sequenzieren konnten die erhaltenen V_H- und V_L-Fragmente auf Grund einer mindestens 80%-igen Homologie Genfamilien zugeordnet werden (Kabat-Datenbank). Der Vergleich zeigte, daß das klonierte V_H-Fragment zu der Maus-Immunglobulin-Untergruppe Ib und das V_L-Fragment zu der Gruppe V_κ9 gehört. In Abbildung 4-2 sind die N-terminale Sequenzen der klonierten variablen Fragmente des mAk TÜ165 mit denen aus der Kabat-Datenbank

verglichen. Auf Grundlage von mindestens vier Sequenzen aus jeder Gruppe wurden für die leichte und schwere Kette Konsensus-Sequenzen zusammengestellt und mit den klonierten μ - und κ -Ketten verglichen. Auf Grund dieses Vergleichs wurde festgestellt, daß die verwendeten Vorwärtsprimer *mismatches* am 5'-Ende der beiden Genfragmente aufwiesen. So führte der verwendete V_{μ} F-Primer in Position 5 ein Glutamin (Q) ein, obwohl in der Gruppe Ib an dieser Stelle gewöhnlich ein Lysin (K) angetroffen wird. Der Vorwärtsprimer für die κ -Kette hybridisierte an die Region, die zwischen Aminosäuren 11 und 20 liegt. Dadurch wurde die für die ersten zehn Reste kodierende Sequenz nicht erfaßt. Außerdem enthält dieser Primer eine BstEII-Restriktionsstelle, was dazu führte, daß die TÛ165- κ -Kette nach dem Klonieren in pOPE90 18 Aminosäuren aus der leichten Kette des D1.3-scFv enthielt. Um vollständige und korrekte V_H - und V_L -Regionen zu amplifizieren, wurden auf Grundlage der bekannten Konsensus-Sequenzen der 5'-Regionen und der dazugehörigen *Leader*-Sequenzen neue Vorwärtsprimer (TÛ165- V_{μ} und TÛ165- V_{κ}) konstruiert (Abb. 4-3, A), die für die ersten Aminosäuren (7 für die schwere und 5 für die leichte Kette) kodieren. Die neuen Rückwärtsprimer wurden aufgrund der 5'-Sequenzen der ersten konstanten Domäne (C_H1 und C_L1) einer Maus- μ - und - κ -Kette konstruiert (Abb. 4-3, B).

4.1.2 Vervielfältigung der V-Regionen

Die V_H - und V_L -Regionen wurden mit Hilfe neuer Primer mit RT-PCR und PCR amplifiziert. Die optimale Annealing-Temperatur für die Amplifizierung von V_H - und V_L -Regionen war 60°C bzw. 57°C. Die erhaltenen Fragmente hatten die erwartete Länge von 400 bp (Abb. 4-4). Die PCR-Produkte sind als einzelne Banden sichtbar, was zeigt, daß die verwendeten Primer optimal ausgewählt worden waren. Die amplifizierten variablen Domänen der schweren und leichten Ketten wurden jeweils auf einem 1,5%-igen TBE-Agarosegel getrennt und mit Hilfe einer DEAE-Membran eluiert. Die eluierten V_H - und V_L -PCR-Produkte wurden mit PvuII und HindIII bzw. mit MluI und BamHI verdaut.

1. Das amplifizierte V_H -Fragment. 2. Das amplifizierte V_L -Fragment. M. Molekulargewichtsmarker (bp). Die PCR-Produkte wurden auf einem 5%-igem PAA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

4.1.3 Klonierung der V-Fragmente in das Plasmid pOPE90.

Zunächst wurde die verdaute variable Domäne der schweren Kette in den mit PvuII und HindIII geschnittenen Vektor pOPE90 ligiert. Das entstandene Plasmid pOPE90/TÜ165- V_H wurde in den *E.coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Von zehn verschiedenen Klonen wurden Plasmide isoliert (Plasmid-Minipräparation), mit Bsu36I und PvuI geschnitten und auf einem 1%-igem Agarosegel auf das Vorhandensein des TÜ165- V_H -Fragments untersucht. Drei positive (nicht von Bsu36I geschnittene) Klone wurden sequenziert (PELseq-Primer). Die V_H -Sequenzen bei allen drei Klonen waren identisch und unterschieden sich von den der ursprünglichen schweren Kette des Antikörpers D1-3.

Die mit MluI und BamHI verdaute κ -cDNA wurde dann in den mit BssHII und BamHI

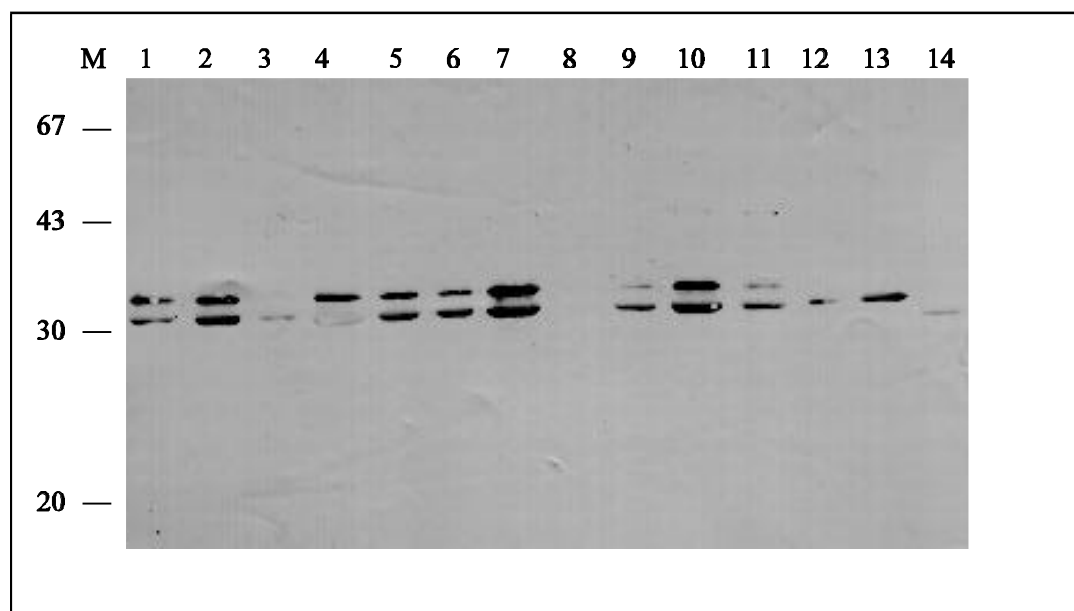


Abbildung 4-5. Western-blot-Analyse von dreizehn *E.coli*-Klonen für die Expression der scFv-Fragmente nach dem Ligieren des V_L -Gens in das Plasmid pOPE90/TÜ165- V_H (1-13). Die scFv-Fragmente wurden mit dem mAb YOL34/1 detektiert, der ein vom Linker kodierte Tubulin-Epitop erkennt. Alle Proben entsprachen einer 150 μ l Kultur. Zum Vergleich wurden 0,5 μ g vom gereinigten scFv-Fragment des Antikörpers D1-3 aufgetragen (14). M - Molekulargewichtsmarker (kDa).

geschnittenen Vektor pOPE90/TÜ165- V_H ligiert. Mit dem Ligationsprodukt pOPE90/TÜ165- $V_{H,L}$ wurde der Stamm XL1-Blue transformiert. Einzelne Klone wurden aufgezogen und bei einer OD_{600} von 0,5 mit 100 μ M IPTG induziert. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation wurden die Bakterienpellets mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-

Blot-Analyse auf Expression des scFv-Fragmentes von T \ddot{U} 165 überprüft (Abb. 4-5). Die meisten Klone exprimierten ein scFv-Fragment, das durch zwei Banden repräsentiert wurde, die der prozessierten und nicht prozessierten Form des Proteins entsprachen. Wie der Western-Blot zeigte, waren alle Fragmente, länger als das ursprüngliche, durch pOPE90 kodierte scFv-Fragment des Antikörpers D1-3. Zwei der positiven Klone wurden für die μ - und κ -Ketten sequenziert (PELSEQ- und YOLSEQ-Primer).

4.1.4 Charakterisierung der Sequenzen

Die Sequenzen der variablen Domänen der schweren und der leichten Kette des Antikörpers T \ddot{U} 165 sind in Abbildung 4-6 gezeigt. Das V_H-Fragment wurde so kloniert, daß sich am Carboxyterminus noch acht Reste aus der konstanten C_H1-Domäne befinden. Zusammen mit dem YOL-Epitop (EEGEFSEAR) bilden sie ein Verbindungsstück (Linker) zwischen den V_H- und V_L-Domänen. Die V_L-Domäne hat am C-Terminus zwanzig Reste aus der konstanten C_L-Domäne und 5 Histidine. Das gesamte konstruierte scFv-Fragment weist im prozessierten Zustand eine Länge von 272 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 30 kDa auf. Das Protein mit Signalsequenz hat eine Länge von 294 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 32 kDa.

Die schwere Kette des mAk T \ddot{U} 165 gehört zu der Maus-Immunglobulingruppe Ib. Das V_H-Gen setzt sich aus dem V_H-Keimbahnsegment V_{Ox1} (Griffiths *et al.*, 1984), dem D-Minigen der DFL16.1-Familie (Kabat *et al.*, 1991) und dem J_H4-Segment (Kabat *et al.*, 1991) zusammen. Von dem V_{Ox1}-Keimbahnsegment unterscheidet sich die T \ddot{U} 165- μ -Kette durch ein Threonin statt eines Arginins in der Position 94 (FR3). Die höchste Homologie in der gesamten Nukleotid- und Peptidsequenz (94%) besteht zur V_H-Domäne des Antikörpers H220-22 (IgM; Kavalier *et al.*, 1990; Abb. 4-7). Dieser Antikörper erkennt die Cb-Determinante des aus dem A/PR/8/34-Influenza-Virus stammenden Hämagglutinins.

Die T \ddot{U} 165-V κ -Region besteht aus dem nichtmutierten Keimbahnsegment Gloop1 (Darsley and Rees, 1985), das zur Untergruppe V κ 9 gehört, und dem J κ 1-Gen (Kabat *et al.*, 1991). Die höchste Homologie in der Nukleotid- (97%) und Peptidsequenz (97%) bestand zum V κ -Fragment des Antikörpers CNJ206 (Charbonnier *et al.*, 1995), der gegen p-Nitrophenylphosphat gerichtet ist. Die Ketten unterscheiden sich durch die Reste 94 und 96 in der CDR3. T \ddot{U} 165-V κ weist in diesen Positionen ein Tyrosin und ein Prolin, CNJ206-V κ dagegen ein Serin und ein Tyrosin auf (Abb. 4-7).

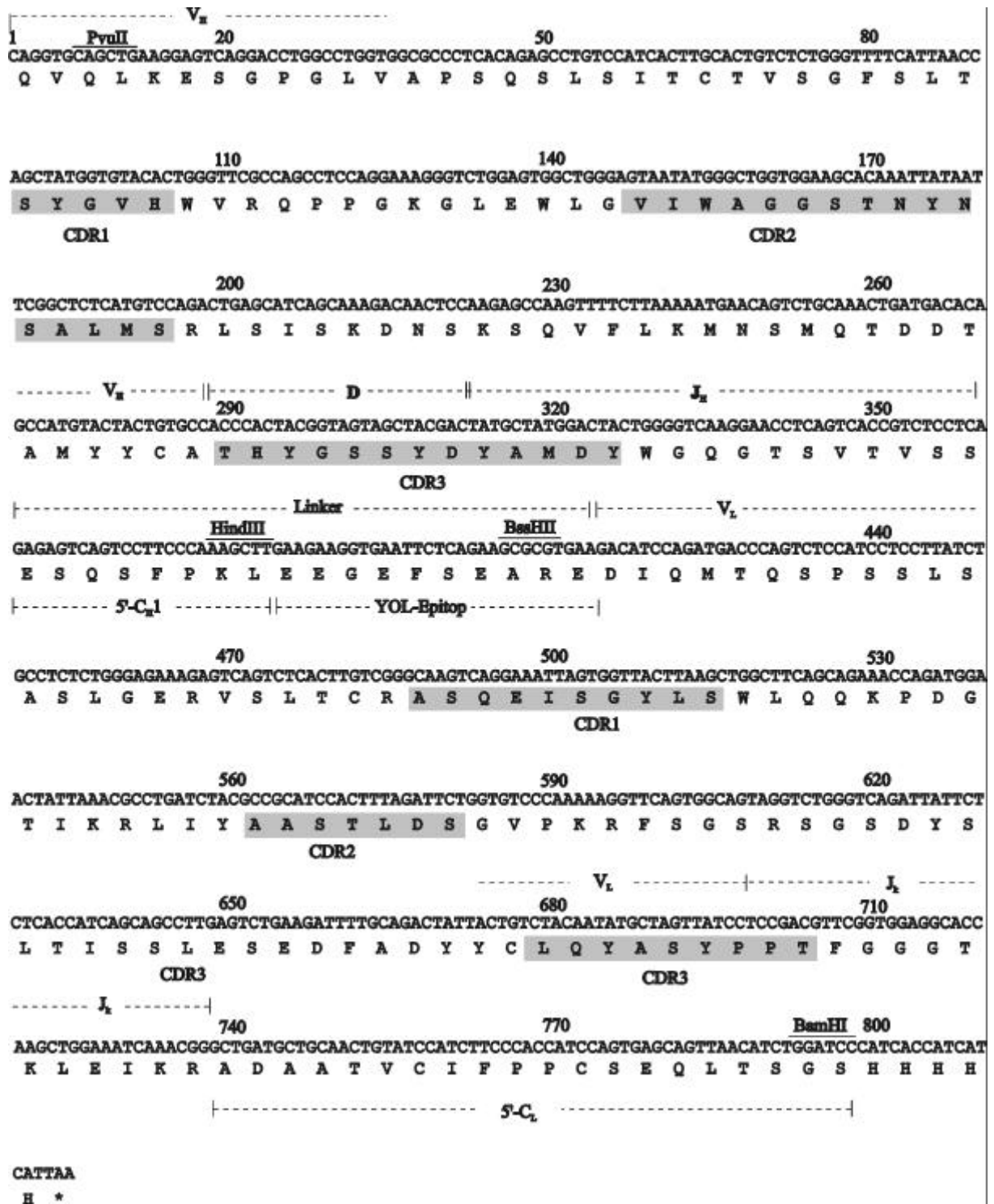


Abbildung 4-6. Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Tü165-scFv-Fragmentes (ohne *pelB*-Signalsequenz). Die V-Region der schweren Kette erstreckt sich von der Position 1 bis 360, die V-Region der leichten Kette - von der Position 414 bis 735 und der Linker - von 361 bis 413. Die den CDR-Regionen entsprechenden Aminosäuresequenzen sind von grauen Kästchen umschlossen. Die Zusammensetzung der V_H- und V_L-Fragmente aus den Gensegmenten V_H, D, J_H und bzw. V_L, J_L sind schematisch gekennzeichnet. Am C-Terminus des Fragmentes befinden sich fünf Histidin-Reste. * - Stop-Kodon.

4.2 Expression von TÜ165-scFv in *E.coli*

Die *pelB*-Signalsequenz am N-Terminus des scFv-Fragmentes bewirkt, daß das in Bakterien exprimierte Protein ins Periplasma sezerniert wird. Im Zytoplasma herrschen reduzierende Bedingungen, die die Bildung der Disulfid-Brücken nicht zulassen (siehe Abschnitt 1.1.5). Deshalb werden die meisten rekombinanten Proteine im zytoplasmatischen Raum als *inclusion bodies* abgelagert. Unter Abspaltung der *pelB*-Sequenz kann das Protein aber durch die Membran transportiert werden und so ins Periplasma gelangen. Im oxidierenden Milieu des periplasmatischen Raumes und mit Hilfe periplasmatischer Proteine bilden sich die nativen S-S-Brücken aus, wodurch das Protein in löslicher Form vorliegen wird.

Mit dem Plasmid pOPE90/TÜ165-scFv wurde der *E.coli*-Stamm JM109 transformiert, der zusätzlich noch das Plasmid pDMI1 erhielt. Neben der Kanamycin-Resistenz und einem p15A-Origin besitzt dieses Plasmid noch das für den lac-Repressor (*lacI^q*) kodierende Gen. Durch die Zugabe von Glukose läßt sich der in pOPE90 vorhandene Promotor $P_{A1/O4/O3}$ gut inaktivieren. Deshalb enthielt das Kulturmedium 50 μM Ampicillin, 50 μM Kanamycin und 100 μM Glukose (Breitling, 1991).

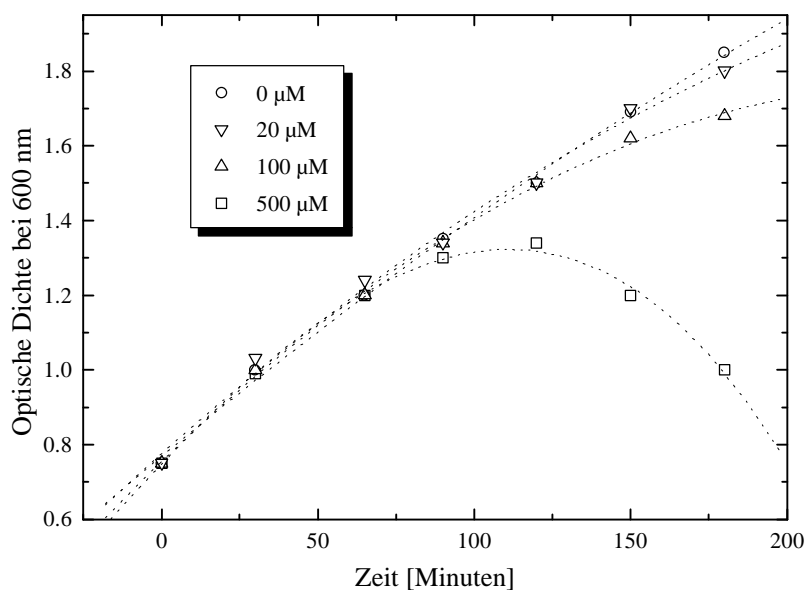


Abbildung 4-8. Wachstumskurve von einem pOPE90/TÜ165-Klon in dem Bakterienstamm JM109 (+pDMI1). Die Bakterien wurden bis zu einer OD_{600} von 0,7 gezüchtet. Aliquotes davon wurden mit IPTG in einer Endkonzentration 20 μM , 100 μM und 500 μM induziert.

Die Expressionsbedingungen sind für jedes rekombinante Protein verschieden und werden durch mehrere Faktoren beeinflusst. Dazu gehören die Konzentration von IPTG, die Temperatur und die Dauer der Expression, sowie auch die Primärstruktur des Proteins (Nieba

et al., 1997). Um den Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von IPTG zu untersuchen, wurden Wachstumskurven bei verschiedenen Konzentrationen (20 μM , 100 μM und 500 μM sowie ohne IPTG) bei einer Temperatur von 37°C aufgenommen (Abb. 4-8). Bei der IPTG-Konzentration von 500 μM lysieren die Zellen schon nach zwei Stunden. Als optimal erwies sich die Konzentration von 20 μM . Unter diesen Bedingungen verweilen die Bakterien am längsten in der logarithmischen Wachstumsphase.

Die Verteilung des exprimierten TÜ165-scFv-Fragments in verschiedenen Zellfraktionen ist in Abbildung 4-9 gezeigt. Die Bakterienkulturen wurden zwei Stunden nach der Induktion mit jeweils 20 μM und 100 μM IPTG geerntet. Aus dem Bakterienpellet wurden die periplasmatische, zytoplasmatische, die Membran- und eine schwerlösliche Fraktion isoliert. Die Proteine aus dem Überstand wurden mit Trichloressigsäure gefällt. Alle diese Fraktionen sowie der Kulturüberstand wurden in einem *Western blot* untersucht. Das rekombinante Protein wurde mit dem monoklonalen Antikörper YOL/34 (Kilmartin *et al.*, 1982), nachgewiesen, der das Tubulinepitop auf dem Verbindungsstück zwischen V_{H} - und V_{L} -Domäne erkennt.

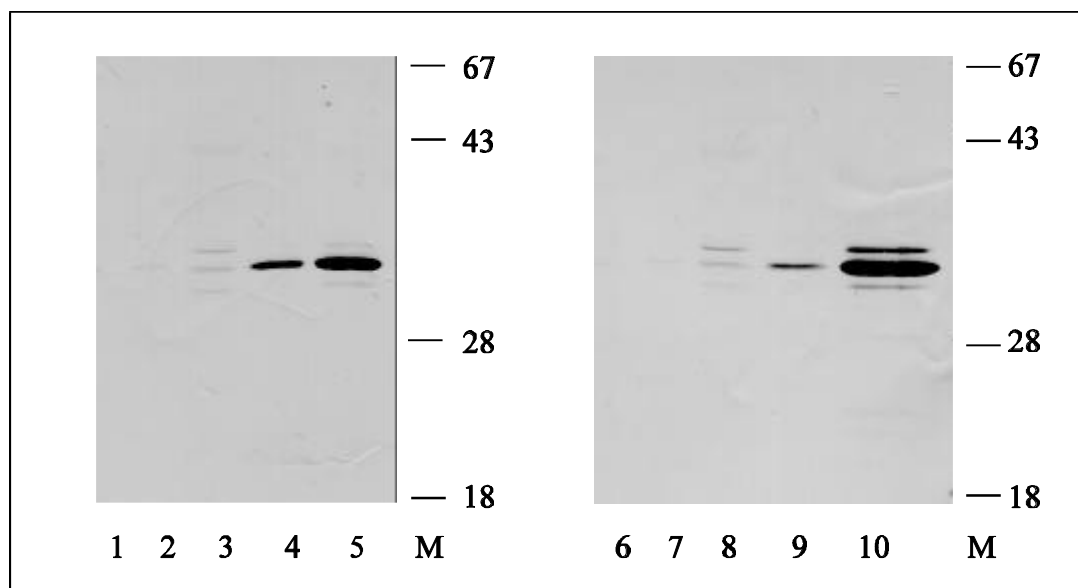


Abbildung 4-9. Western-blot-Analyse eines 12%-igen SDS-Gels zum Nachweis von TÜ165-scFv-Fragmenten in verschiedenen Zellfraktionen. Die Bakterien wurden bei einer OD_{600} von 0,7 mit IPTG in einer Konzentration von 20 μM (1-5) und 100 μM (6-10) induziert und nach 1 Stunde geerntet. 1, 6 - Kulturüberstand; 2, 7 - periplasmatische Fraktion; 3, 8 - cytoplasmatische Fraktion; 4, 9 - Membranfraktion; 5, 10 - schwerlösliche Fraktion; M - Molekulargewichtsmarker (kDa).

Die Ergebnisse der Zellfraktionierung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Nur ein sehr geringerer Anteil des gewünschten Proteins wurde in löslicher Form im Periplasma aufgefunden. Der größte Teil des exprimierten Proteins wurde in der

schwerlöslichen Fraktion nachgewiesen. TŪ165-scFv-Fragmente werden also überwiegend als *inclusion bodies* akkumuliert. Nach der Induktion mit 100 μ M IPTG ist die *inclusion-body*-Fraktion durch drei Banden charakterisiert (Abb. 4-9, vergl. 5 und 10). Die unterste schwache Bande entspricht einem Abbauprodukt. Die mittlere intensive Bande wurde dem prozessierten scFv-Fragment und die obere schwache Bande dem nicht prozessiertem scFv zugeordnet.

Das Molekulargewicht eines Proteins läßt sich nur ungenau mit Hilfe der Gelelektrophorese bestimmen. Um hinreichend zu beweisen, daß die Hauptbande die prozessierte Form des scFv-Fragmentes darstellt, wurden die N-terminalen zwanzig Reste des Produktes sequenziert (Dr. H. Urlaub, Max-Delbrück-Centrum, Berlin). Das Ergebnis zeigte, daß die pelB-Signalsequenz bereits abgespalten war. Dies bedeutet, daß der größte Teil des exprimierten Proteins in das Periplasma transportiert worden war und sich dort als periplasmatische *inclusion bodies* akkumulierte. Die letzteren lassen sich nicht bei der Zellfraktionierung von den cytoplasmatischen *inclusion bodies* trennen und werden gemeinsam als schwerlösliche Fraktion isoliert. Diese ungewöhnliche Form der Ablagerung der *inclusion bodies* im Periplasma tritt in Einzelfällen auf und wurde bereits in der Literatur beschrieben, zum Beispiel für R_{TEM} β -Lactamase (Bowden *et al.*, 1991, Pugsley A.P., 1993).

Um zu erreichen, daß die unlösliche Fraktion nur aus prozessiertem Protein besteht (periplasmatischen *inclusion bodies*), wurde die *E.coli*-Kultur mit einer geringeren Menge IPTG induziert (20 μ M) und bei 30°C 3,5 h inkubiert. Höhere Konzentrationen von IPTG und Inkubations-Temperaturen führten zur Anreicherung des nicht prozessierten, hier unerwünschten Proteins. Deshalb wurden die genannten Bedingungen weiterhin bei der Präparation des Proteins in größerem Maßstab verwendet.

4.3 Reinigung der TŪ165-scFv-Fragmente

TŪ165-scFv-Fragmente wurden aus bakteriellen *inclusion bodies* isoliert. Dabei wurde nach folgender Strategie verfahren: die *inclusion bodies* wurden aus dem Bakterienpellet extrahiert und anschließend denaturiert; daraus wurden die scFv-Fragmente gereinigt und durch Dialyse renaturiert. Die Trennung des scFv-Fragmentes von sämtlichen anderen *E.coli*-Proteinen, die in den *inclusion bodies* vorhanden sind, wurde mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt (Lilius *et al.*, 1991). Die Verwendung dieser Methode war möglich, da das Fragment in das Plasmid pOPE90 so kloniert worden war, daß sich am

C-Terminus zusätzlich noch fünf Histidine befanden. Die Metallion-Chromatographie beruht auf der Affinität der Poly-Histidingruppe zu Metallionen wie Ni^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} .

Die Reinigung des scFv-Fragmentes aus den *inclusion bodies* wurde bei denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer Ni-Sepharosesäule durchgeführt. Diese Methode gewährleistet einen extrem hohen Reinheitsgrad, wie Abb. 4-10 zu entnehmen ist.

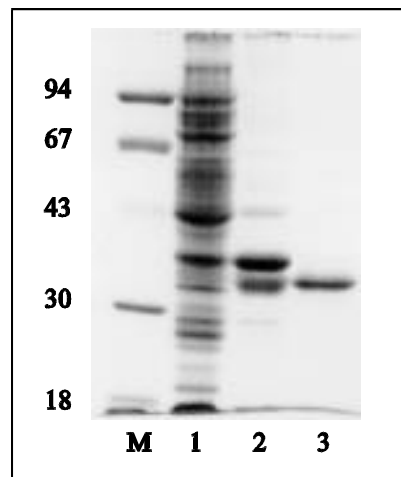


Abbildung 4-10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12%) zur Überprüfung der Reinheit des TÜ165-scFv-Fragmentes (Coomassie-Blau-Färbung).

1 - Bakterienpellet; 2 - *Inclusion-bodies*-Fraktion; 3 - gereinigte TÜ165-scFv-Fragmente; M - Molekulargewichtsmarker (kDa).

Die Rekonstitution des Proteins wurde nach der Methode von Kipriyanov *et al.* (1994) durchgeführt. Das gesamte Eluat wurde so konzentriert, daß die Proteinkonzentration nicht mehr als 0,3 mg/ml betrug, um eine Präzipitation der Proteine zu vermeiden. Danach erfolgte eine Dialyse gegen einen L-Argininchlorid enthaltenden Puffer. L-Argininchlorid ist ein Struktur analog des Harnstoffs und wird verwendet, um durch möglichst milde Renaturierungsbedingungen eine korrekte Faltung des Proteins zu fördern (Buchner *et al.*, 1992). Dann wurde gegen PBS dialysiert und TÜ165-scFv-Fragment auf 1 mg/ml konzentriert. Nach der beschriebenen Methode lassen sich aus 1 l Bakterienkultur 1-1,2 mg TÜ165-scFv-Fragment reproduzierbar isolieren. Zur Stabilisierung des scFv-Fragments während der Lagerung wurde BSA in einer Endkonzentration von 5 mg/ml zugegeben. Bei diesen Bedingungen bleibt das TÜ165-scFv-Fragment bei -20°C mindestens drei Monate aktiv.

4.4 Spezifitätsbestimmung des scFv-TÜ165-Fragments

4.4.1 Reaktivität des TÜ165-scFv-Fragments mit humanen Zelllinien

Das TÜ165-scFv-Fragment wurde auf seine Wechselwirkung mit verschiedenen menschlichen HLA-typisierten Zelllinien untersucht. Die Bindung des Fragments an die Zellen wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachgewiesen. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die HLA-Moleküle während der Analyse ihre native Struktur behalten. Außerdem wird nicht die Gesamtpopulation gemessen, sondern es kann jede Zelle einzeln analysiert werden. Die vorher gezüchteten Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte aliquotiert und mit dem scFv-Fragment inkubiert. Das gebundene Protein wurde erst mit dem anti-Tubulin-mAk YOL1/34 und anschließend mit FITC-markiertem anti-Ratte-IgG gefärbt.

Parallel zu den Experimenten mit dem scFv-Fragment wurde jede Zelllinie mit einem Panel von positiven und negativen Kontroll-Antikörpern auf die Expression verschiedener HLA-Moleküle untersucht. Als negative Isotyp-Kontrollen wurden die monoklonalen Maus-Antikörper W6.32/HK (IgG) und TÜ25 (IgM) herangezogen, die keine Reaktion mit HLA-Klasse I-Molekülen zeigen. Der Antikörper W6.32/HL (IgG) stellte die positive Kontrolle für alle Typen von HLA-Klasse I-Molekülen dar. Auch für bestimmte HLA-Moleküle wurden spezifische Antikörper eingesetzt: HC10 (anti-HLA-B- und -C schwere Ketten), SFR8-B6 (anti-HLA-Bw6-Determinante) und TÜ110 (anti-HLA-B13).

Der Originalantikörper TÜ165 ist spezifisch gegen HLA-B35/ β_2m -Komplexe gerichtet, die ganz bestimmte Peptide aus dem Epstein-Barr-Virus (EBV) tragen. Die Histogramme in Abbildung 4-11 spiegeln diese Eigenschaften von TÜ165 wider. 4-11a und 4-11b zeigen die Reaktion des Antikörpers mit den BM19.7- und BM28.7-Deletionsmutanten, die aus der Mutagenese und Immunselektion der EBV-positiven lymphoplastoiden Zelllinie BJAB-B95.8.6 (HLA-A1, A2, B13 und B35) hervorgingen (Uchanska-Ziegler *et al.*, 1993; Volz *et al.*, 1992). Sie sind auf Grund einer Deletion oder sogar Monosomie 6 hemizygot für den HLA-Komplex. So hat BM28.7 nur den A1-Haplotypen (A1, B35, Bw6) und BM19.7 den A2-Haplotypen (A2, B13, Bw4) behalten. TÜ165 reagiert mit der HLA-B35-positiven Zelllinie BM28.7, nicht hingegen mit der B35-negativen Zelllinie BM19.7. In den Histogrammen 4-11c und 4-11d ist zu sehen, daß die Spezifität des Antikörpers entscheidend von der Gegenwart eines Peptids abhängt. Die Zelllinie BM36.1 ging aus BM28.7 hervor und weist zusätzlich eine Mikrodeletion auf, die zur Inaktivierung des ABC-Transporterproteins TAP2 führt (Kelly *et al.*, 1992). Daher

können die HLA-Moleküle im endoplasmatischen

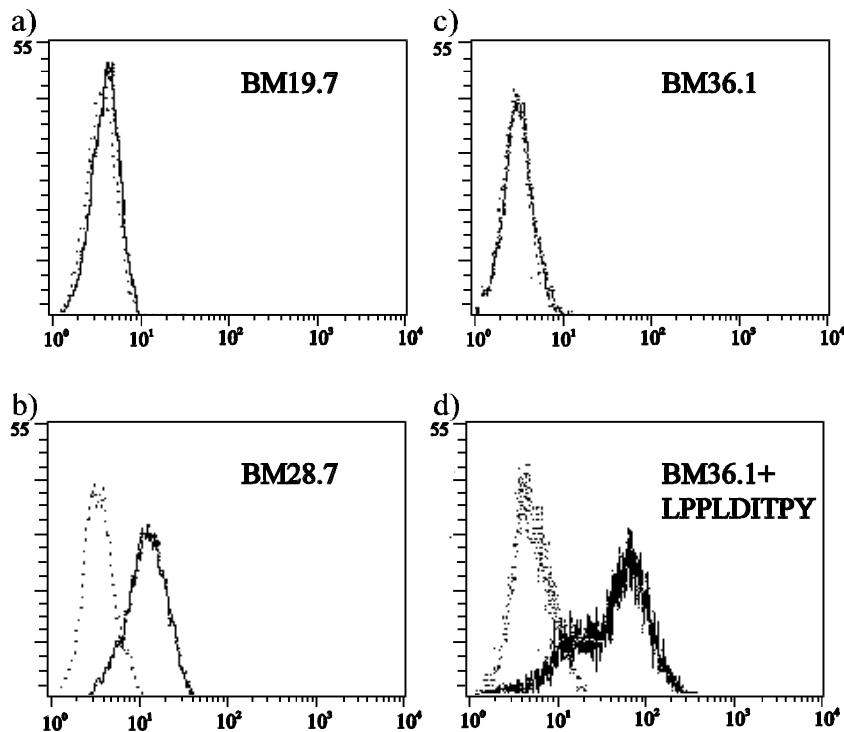


Abbildung 4-11. Die Reaktivität verschiedener Zelllinien mit dem monoklonalen Antikörper TÛ165. Ordinate: relative Zellzahl; Abszisse: Fluoreszenzintensität. Als negative Kontrolle wurde der monoklonale Antikörper TÛ25 (HLA-Klasse I-negativ) herangezogen (punktierte Linie).

Reticulum nicht mit Peptiden beladen werden. Da unbeladene HLA-Moleküle bei 37°C nicht so stabil sind wie die Komplexe, führt dies zu einer viel geringeren, aber noch meßbaren Expression von HLA-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Unter diesen Bedingungen zeigt der Antikörper keine Reaktion mit BM36.1 (Abb. 4-11c). Bei 26°C können unbeladene B35-Moleküle jedoch durch Inkubation der Zellen mit einem Peptid, z. B. mit LPPLDITPY, beladen werden. Dieses Peptid ist vom EBV-Peptid LPPHDITPY abgeleitet, welches wie ersteres TÛ165 die Reaktion mit B35-Molekülen erlaubt (Abb. 4-11d).

Das TÛ165-scFv-Fragment wurde insgesamt auf 25 HLA-typisierten Zelllinien getestet. Zunächst mußte die Konzentration der scFv-Fragmente optimiert werden, da es sich herausstellte, daß bei Konzentrationen von etwa 50 µg/ml und höher die scFv-Fragmente unspezifisch an die Zellen binden. Deshalb wurde eine Verdünnungsreihe des Fragments mit den Zelllinien BM19.7 und BM28.7 getestet. Als Kontrolle wurde das scFv-Fragment des

Antikörpers D1-3, der gegen Lysozym gerichtet ist, eingesetzt. Erst bei einer Konzentration von 25 µg/ml gelang es, eine unspezifische Bindung auszuschließen. Das TÛ165-scFv-Fragment wurde bei weiteren Messungen deshalb in dieser Konzentration verwendet.

TÛ165 erkennt die Komplexe des B35-Moleküls mit Peptiden nur auf der Oberfläche von lymphblastoiden B-Zellen. Deshalb wurde als nächstes ein Panel aus verschiedenen derartigen Zelllinien getestet (Tabelle 4-I, A; Abb. 4-12, a-h). Der Originalantikörper TÛ165 reagierte, wie erwartet, nur dann mit B35-positiven Zellen, wenn sie mit EBV transformiert sind (BJAB-B95.8.6, BL41-95.8, BM8.5 und BM28.7). Das scFv-Fragment hingegen reagierte mit allen Zelllinien, die das HLA-B35-Molekül exprimieren, also auch z. B. mit BJAB-BH. Dagegen gab es keine Reaktion mit B35-negativen Zellen wie BM19.7 und DAUDI. Die Kontrolle mit diesen beiden Zellen war besonders wichtig, da diese auch aus Burkitt-Lymphomen stammen. Es zeigte sich, daß die Bindung des Fragments HLA-B35-spezifisch ist. Erstaunlich war die Reaktion des Fragmentes mit BM36.1-Zellen, die eine geringe Menge von leeren B35-Molekülen exprimieren und offenbar deshalb von TÛ165 nicht erkannt werden. Eine Reaktion des Fragments mit anderen lymphblastoiden B-Zelllinien wie Bristol8 und LCL721.221, die keine HLA-B35-Moleküle präsentieren, war nicht nachweisbar. Am besten reagierte das TÛ165-scFv-Fragment mit den BM28.7- und BM36.1-Zellen, bei denen die Reaktion 3,5- bzw. 5,5-mal höher ausfiel als das Signal der unspezifischen Reaktion (im weiteren Hintergrundsignal).

Um die Spezifität des scFv-Fragmentes zu klären, wurden verschiedene weitere B-Zelllinien und andere Zelllinien getestet (siehe Tabelle 4-I, B). Zu den B35-positiven Zellen gehörten die B-Zelllinie C1R, die Vorläufer-Zelllinie KM3 und T-Zelllinie JMN. Der Originalantikörper reagierte nicht mit C1R und JMN und zeigte mit KM3 nur ein sehr schwaches positives Signal (etwa 1,5-mal höher als das Hintergrundsignal). Das scFv-Fragment erkannte C1R-Zellen, nicht hingegen KM3- und JMN-Zellen.

Insgesamt 25 Zelllinien wurden getestet, wobei verschiedene HLA-A- und B-Allele auf die Kreuzreaktion mit dem scFv-Fragment untersucht wurden. Dazu gehörten verschiedene Allele mit der Bw6-Determinante wie B7, B8, B18 und B49, und Allele mit der Bw4-Determinante, wie B5, B13, B17, B21, B27 und B44. Folgende HLA-A-Moleküle wurden getestet: A1, A2, A3, A11, A23, A30, A32 und A66.2. Das TÛ165-Fragment reagierte mit allen lymphblastoiden B-Zelllinien, die das HLA-B35-Molekül auf der Oberfläche präsentierten, vorausgesetzt, daß sie EBV-positiv waren. Es wurden keine Kreuzreaktionen mit anderen HLA-Molekülen festgestellt. Im Gegensatz zu TÛ165 erkannte das scFv-Fragment auch die

Zellen, die EBV-negativ waren (siehe Tabelle 4-I, A). Daraus kann man schließen, daß das scFv-Fragment ein Epitop erkennt, das ohne Teilnahme eines EBV-Peptids

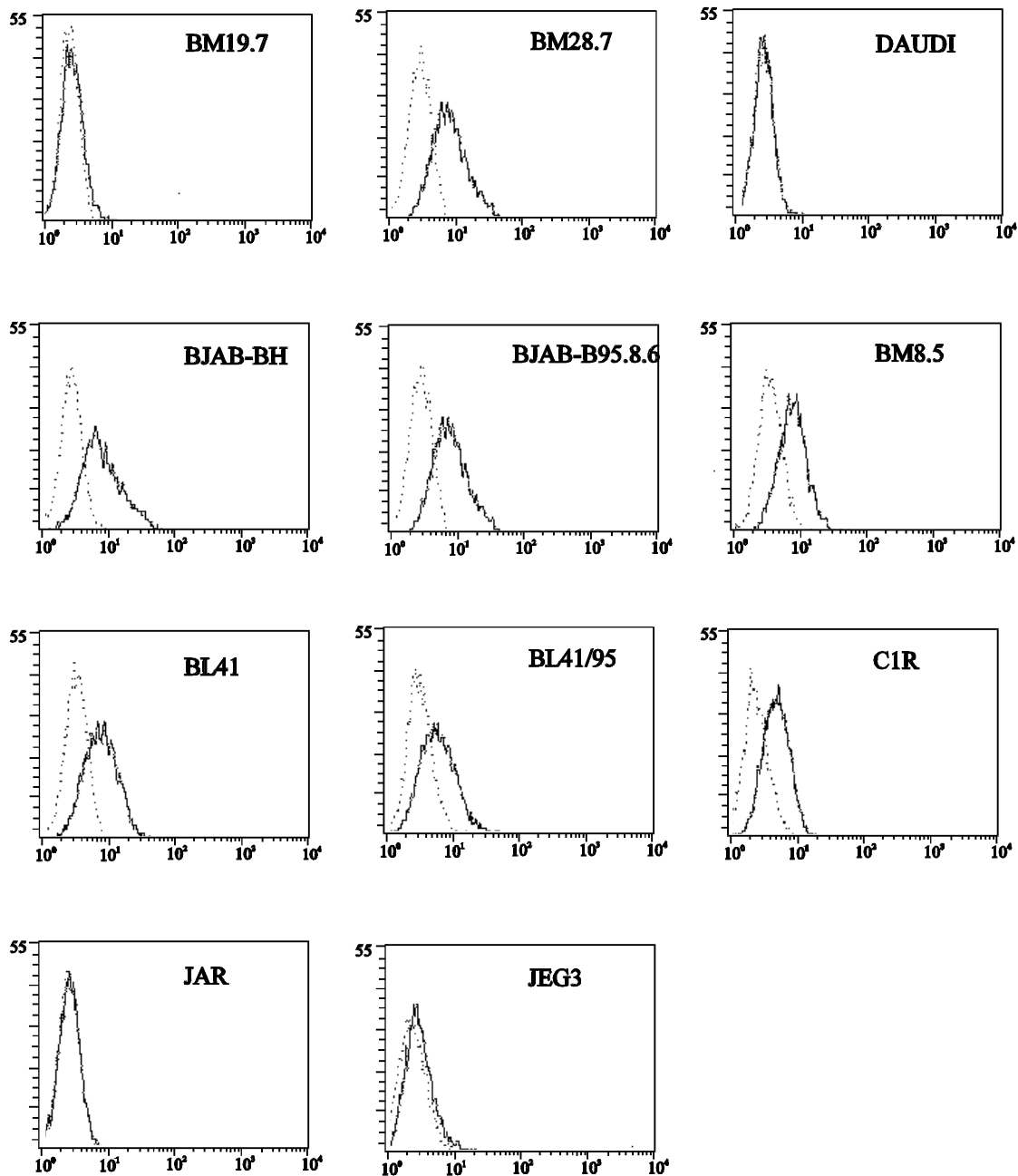


Abbildung 4-12. Reaktivität verschiedener Zelllinien mit dem TÛ165-scFv-Fragment in der Durchflußzytometrie (durchgezogene Linie). Als negative Kontrolle wurde das anti-Lysozym-scFv-Fragment herangezogen (punktierte Linie). Ordinate: relative Zellzahl; Abszisse: Fluoreszenzintensität. Das TÛ165-scFv-Fragment wurde mit den Zellen in einer Konzentration von 25 µg/ml inkubiert und dann mit dem monoklonalen Antikörper YOL/34 (Ratte) und mit FITC-konjugiertem anti-Ratte-IgG gefärbt. 5000 Zellen wurden jeweils detektiert. Abgestorbene Zellen wurden durch die Färbung mit Propidiumiodid nachgewiesen und von der Messung ausgeschlossen.

Tabelle 4-I. Reaktion des monoklonalen Antikörpers TÜ165 und seines scFv-Fragments mit HLA-typisierten humanen Zelllinien.**A**

Zelllinie	HLA-Antigene	Reaktivität		
		TÜ165-scFv	TÜ165	SFR8-B6
BJAB	A1/2, B35/13, Bw6/Bw4, Cw4	2,7	1	17
BJAB-B95.8.6*	A1/2, B35/13, Bw6/Bw4, Cw4	2,5	9,5	50
BM19.7*	A2, B13, Bw4	1	1	1
BM28.7*	A1, B35, Bw6, Cw4	3,5	5	77
BM36.1* (37°C)	Wenig A1, B35, Bw6, Cw4	5,5	1	7
BM8.5*	A1, B35, Bw6, Cw4	2,7	5,7	83
DAUDI*	Keine HLA-Klasse I	1	1	1
BL41	A11/32, B35/49, Bw6/Bw4	2,6	1	64
BL41.B95.8*	A11/32, B35/49, Bw6/Bw4	2,3	3,4	53

B

Bristol 8*	A1/2, B8/13, Bw6/Bw4	1	1	200
LCL721.221*	Keine HLA-A, B, C	1	1	1,5
C1R*	Cw4, wenig B35, Bw6	2,5	1	2,5
KR3598*	A2, B44, Bw4 homozygot	1	1	1
LG2*	A2, B2705, Bw4 homozygot	1	1	1
H2LCL*	A3, B7, Bw6 homozygot	1	1	133
KM3	A23/32, B35/21, Bw6, Cw4	1	1,5	1,5
JMN	A3/11, B35/7, Bw6	1	1	60
K562	Wenig HLA-Klasse I	1	1	1,5
HUT102	A30/66.2, B17/18, Bw6/Bw4	1	1	112
T2	TAP-Defekt, wenig A2	1	1	1
T2/A3LCL	T2 + wenig A3	1	1	1
U937	A3/19, B18/5, Bw6/Bw4	1	1	21
CCRF-CEM	A1/30, B8, Bw6	1	1	10
JAR	HLA-E, keine A, B, C, G	1	1	1
JEG3	HLA-G und-C, keine HLA-A, B	1	1	1

Die angegebenen Werte sind für TÜ165 auf den negativen mAk TÜ25, für SFR8-B6 auf den negativen mAk W6/32.HK und für TÜ165-scFv-Fragment auf das anti-Lysozym-Fragment (D1-scFv) bezogen. A - aus Burkitt-Lymphomen stammende Zellen, B - verschiedene Typen von B-, T- und Gewebe-Zellen. * - mit Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte Zellen.

gebildet wird. Eine weitere Charakterisierung des TÛ165-scFv-Fragmentes wurde mit BM36.1-Zellen durchgeführt. Durch eine Deletion im Peptidtransporter-Protein präsentiert diese Zelllinie bei 37°C nur eine geringe Menge von HLA-Klasse I-Komplexen. Bei 26°C können “nackte” B35/ β_2 m-Komplexe mit verschiedenen Peptiden beladen und dadurch stabilisiert werden. Dieses Verfahren ermöglicht es, die Wirkung eines Peptides auf die Bindung des Antikörpers an B35-Moleküle zu untersuchen. Die Zellen wurden jeweils mit zwei verschiedenen Peptiden, LPPLDITPY und VPLRPMTY, beladen. Das aus dem EBV-Peptid LPPHDITPY abgeleitete Nonapeptid LPPLDITPY ist eines der am besten bindenden Peptide, das die Aminosäuren Prolin (P2) und (P9) Tyrosin in den für HLA-B35-bindende Peptide charakteristischen Ankerpositionen 2 und 9 enthält. Das Oktapeptid VPLRPMTY stammt aus dem nef-Protein eines HI-Virus (HIV) und hat die gleichen Aminosäuren in Ankerpositionen 2 und 8 wie das EBV-Peptid. Nach dem Beladen mit den Peptiden wurden die Zellen etwa zwei Stunden bei 37°C inkubiert, um die nicht stabilen Komplexe zu entfernen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-13 zusammengefaßt. Man kann sehen, daß die Erkennung der HLA-B35-Moleküle durch TÛ165 streng von der Anwesenheit des „richtigen“ Peptides abhängig ist (Abb. 4-13). TÛ165 reagierte nicht mit den bei 37°C gezüchteten BM36.1-Zellen, da keine Komplexe eines B35-Moleküls mit einem EBV-Peptid exprimiert werden. Dagegen reagierte der Antikörper mit Zellen, wenn sie vorher mit dem Peptid LPPLDITPY beladen wurden, nicht jedoch nach Inkubation der Zellen mit dem nef-Oktapeptid VPLRPMTY. Wie die Ergebnisse zeigten, reagierte das TÛ165-scFv-Fragment anders als der Original-Antikörper. Das Fragment erkannte, ohne Behandlung der Zellen mit einem Peptid, die BM36.1-Zellen mit einem Optimum bei 37°C. Die Inkubation der Zellen bei 26°C und das Beladen mit dem EBV-Peptid führt eigenartigerweise zu einem geringeren Signal (nicht gezeigt). Es wurde kein Unterschied bei der Reaktion mit den verschiedenen Peptiden beobachtet.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Bindung des TÛ165-scFv-Fragments nicht von der Gegenwart eines EBV-Peptides in der Peptid-Bindungsspalte des B35/ β_2 m-Komplexes abhängt.

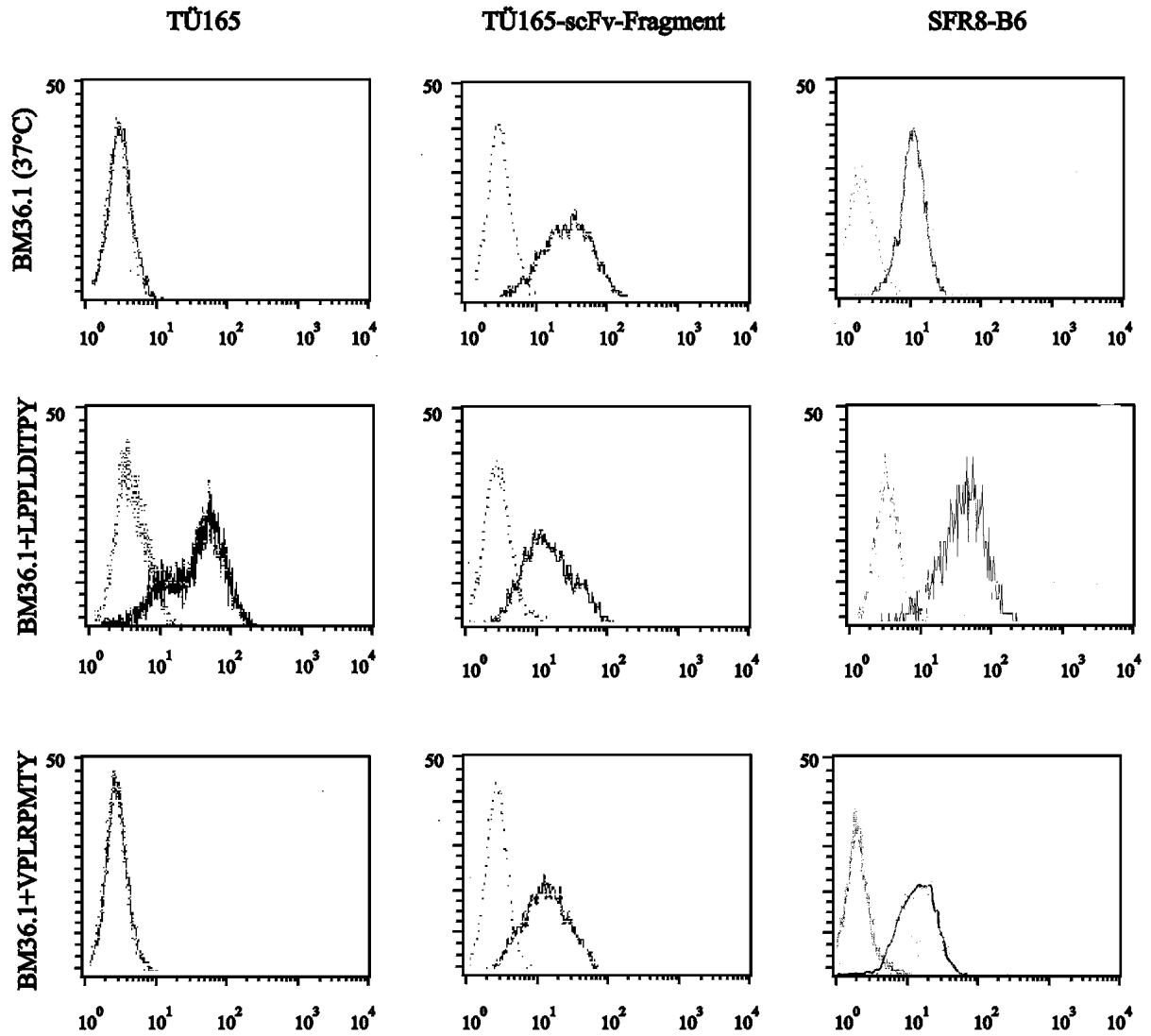


Abbildung 4-13. Reaktivität der Zelllinie BM36.1 mit TÛ165, dem TÛ165-scFv-Fragment und dem mAk SFR8-B6 in Gegenwart und Abwesenheit eines Peptids. Ordinate: relative Zellzahl; Abszisse: Fluoreszenzintensität.

4.4.2 Spezifität des TÛ165-scFv-Fragments im ELISA

Die Spezifität des Fragmentes wurde auch mittels ELISA untersucht. Als Antigen wurde der *in vitro* rekonstituierte Komplex zwischen dem löslichen HLA-B35-Molekül, β_2m und dem Peptid LPPLDITPY verwendet (Menßen *et al.*, 1999). Als negative Kontrollen wurden in PBS gelöste Proteine aus den *inclusion-bodies*-Fraktionen von B35 und β_2m eingesetzt. Das TÛ165-scFv-Fragment wurde auf eine Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Um die unspezifische Bindung zu unterdrücken, enthielt der Puffer 2% Milchpulver. Bei TÛ165 wurde der unverdünnte Überstand verwendet. Die Ergebnisse zeigen, daß TÛ165 mit dem Komplex erst dann reagierte, wenn er in der ungewöhnlich hohen Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ vorlag. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die Abwesenheit der zellulären Umgebung, die für die Spezifität des TÛ165 sehr wichtig ist, fehlte. Es wurde keine Bindung des scFv-Fragments mit dem rekonstituierten Komplex beobachtet.

4.5 Expression des TÛ165-scFv-Fragments auf der Phagenoberfläche

Selektionsmethoden einer Phagenbibliothek mit Eukaryoten-Zellen sind nur ansatzweise etabliert. Die Erarbeitung solcher Methoden ist mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden. Eines der größten Probleme ist die Komplexität einer Zelle als Matrix. Im Unterschied zur Selektion der scFv-Fragmente mit einem bestimmten Protein präsentiert eine Zelle auf der Oberfläche eine große Anzahl verschiedener Proteine. Am Beispiel der TÛ165-scFv-Fragmente-tragenden Phagenpartikel sollte ein Modellsystem für die Selektion von zellantigenspezifischen Phagen aus einer Phagenbibliothek unter Verwendung von Zellen aufgebaut werden.

Um die Expression der variablen Domäne auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen zu ermöglichen, wurde das TÛ165-scFv-Fragment in ein Phagemid umkloniert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor pHEN verwendet. Wird das Phagemid in die Bakterien des TG1-Stammes aufgenommen, wird dort ein Fusionsprotein produziert, das dann mit Hilfe eines Wildtyp-Phagen in ein Phagenpartikel verpackt wird. Zur Klonierung in pHEN war die Einführung der Restriktionstellen NcoI und NotI in das scFv-Fragment erforderlich. Dies wurde mittels PCR mit den Primern scFv-up und scFv-do erreicht. Die PCR-Produkte wurden auf einem präparativen Agarosegel (1%) aufgetrennt, das amplifizierte DNA-Fragment (etwa 800 bp) aus dem Gel isoliert, mit Ethanol gefällt und in Wasser aufgenommen. Nach einem

Restriktionsverdau mit den Enzymen NcoI und NotI wurde das Fragment in das mit den gleichen Enzymen verdauten Phagemid pHEN kloniert.

Mit dem Ligationsprodukt wurden TG1-Bakterien transformiert. Die einzelnen Klone wurden in Flüssigkulturen in kleinem Maßstab (200 µl) herangezogen, mit IPTG induziert und auf die Expression der Fusionsproteine durch *western blot* überprüft. Zwei positive Klone konnten isoliert werden. Die Phagemids wurden nach Superinfektion des M13K07-Phagen in Phagenpartikel verpackt und die entsprechenden Phagen in 300 ml Kultur angezüchtet. Der Phagemidtitert der Medienüberstände wurde bestimmt, wobei für das pHEN/TÜ165-scFv-Konstrukt ein verhältnismäßig niedriger Titer von etwa 10^{10} Amp^Rtu/ml festgestellt wurde. Für die Kontrolle (ein NIP-spezifischer Klon aus der Nissim-Bibliothek) betrug der Titer etwa 10^{12} Amp^Rtu/ml. Die Phagenpartikel wurden aus den Überständen gefällt und in PBS aufgenommen.

Die vorbereiteten Phagen wurden im FACS auf die Bindung an BM28.7- und BM19.7-Zellen FACS überprüft, wobei jeweils 5×10^5 Zellen mit 100 µl Phagen-Lösung (etwa 10^{10} Phagen) inkubiert wurden. Die gebundenen Phagenpartikel wurden mit dem anti-M13-Antikörper (vom Schaf) und mit dem FITC-Konjugat eines anti-Schaf-Antikörpers nachgewiesen. Es wurde jedoch weder mit BM28.7 noch mit BM19.7 eine Bindung festgestellt.

4.6 Selektion einer Phagenbibliothek auf Zellen

Der Versuch, den monoklonalen Antikörper TÜ165 auf der Oberfläche eines Phagen zu exprimieren und dadurch ein Modellsystem für die Selektion der spezifischen Phagen mittels Zellen zu etablieren, war wie in 4.5 beschrieben nicht gelungen. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, die für Oberflächenmoleküle spezifischen Phagenpartikel bzw. scFv-Fragmente direkt aus einer semi-synthetischen Phagenbibliothek zu gewinnen. Das Ziel des Versuchs bestand darin, eine Selektionsmethode zu erarbeiten, um für HLA-Klasse I-Moleküle spezifische scFv-Fragmente anzureichern.

4.6.1 Selektion der Nissim-Phagenbibliothek auf fixierten Zellen

Die zur Verfügung stehende, hierfür prinzipiell geeignete Phagenbibliothek (Nissim *et al.*, 1994) enthielt zirka 10^8 verschiedene Klone. Aus dieser Bibliothek wurden bereits mehrere spezifische scFv-Fragmente gegen unterschiedliche Antigene isoliert. Dabei konnten die Antigene, darunter auch rekombinante Oberflächenmoleküle, an einer Festphase (Nunc

Immunotubes) adsorbiert werden, was eine leichte Trennung der spezifischen von den nicht gebundenen Phagen gewährleistete. Da am Anfang der Arbeit keine etablierten Selektionsmethoden für Zellen bekannt waren, wurde beschlossen, glutaraldehydfixierte Zellen einzusetzen. Derart präparierte Zellen lassen sich leicht abzentrifugieren. Die Zellen wurden schonend mit Glutaraldehyd (0,125 % Lösung) behandelt, damit sie ihre antigenen Determinanten behielten. Die auf diese Weise fixierten Zellen wurden im ELISA mit HLA-Klasse I-positiven (HC10 und W6/32.HL) und negativen (W6/32.HK) Antikörpern überprüft (Abb.4-14). Die positive Reaktion mit HC10 zeigte, daß HLA-B-schwere Ketten vorhanden waren. Mit der positiven Reaktion von W6/32.HL wurde das Vorliegen von β_2 m-assoziierten HLA-Klasse I schweren Ketten nachgewiesen. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß die mit Glutaraldehyd fixierten Zellen die erforderliche Determinanten trugen.

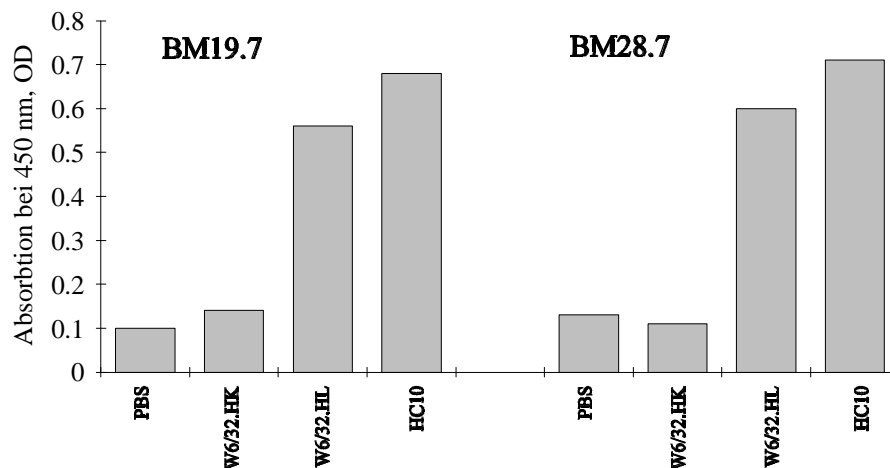


Abbildung 4-14. ELISA-Analyse verschiedener monoklonaler anti-HLA-Antikörper mit fixierten BM19.7- und BM28.7-Zellen. Die verwendeten Antikörper sind unten angegeben. Als negative Kontrollen dienen W6/32.HK und PBS-Puffer.

Antikörper wurden als Überstände der entsprechenden Zellkulturen verwendet. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden mit 100 μ l Antikörper-Lösung inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde peroxidasekonjugiertes Ziege-anti-Maus IgG verwendet.

Um die Population der gegen HLA-Klasse I-Moleküle gerichteten scFv-Fragmente zu isolieren, wurde die Phagenbibliothek mit frisch fixierten BM28.7-Zellen selektiert. Die Vorgehensweise ist schematisch in Abb. 4-15 gezeigt. Außer HLA-Molekülen exprimieren Zellen viele andere Oberflächenantigene, die Phagenpartikel während der Selektion binden können. Außerdem könnten Phagen unspezifisch an verschiedene HLA-Moleküle binden. Um solche Phagenpartikel auszuschließen, wurde die Phagenpräparation (zirka 10^{13} pfu) zunächst mit BM19.7-Zellen (5×10^7 Zellen) präinkubiert. Diese Zelllinie wurde deshalb ausgewählt, weil

sie aus der gleichen Mutterzelle wie BM28.7 stammt und sich folglich nur in Bezug auf exprimierte HLA-Moleküle von BM28.7 unterscheiden sollte. Bei der Präinkubation mit BM19.7-Zellen sollten sämtliche Phagen, die scFv-Fragmente mit einer Spezifität für

Anzucht der Phagenbibliothek und Phagenpräparation

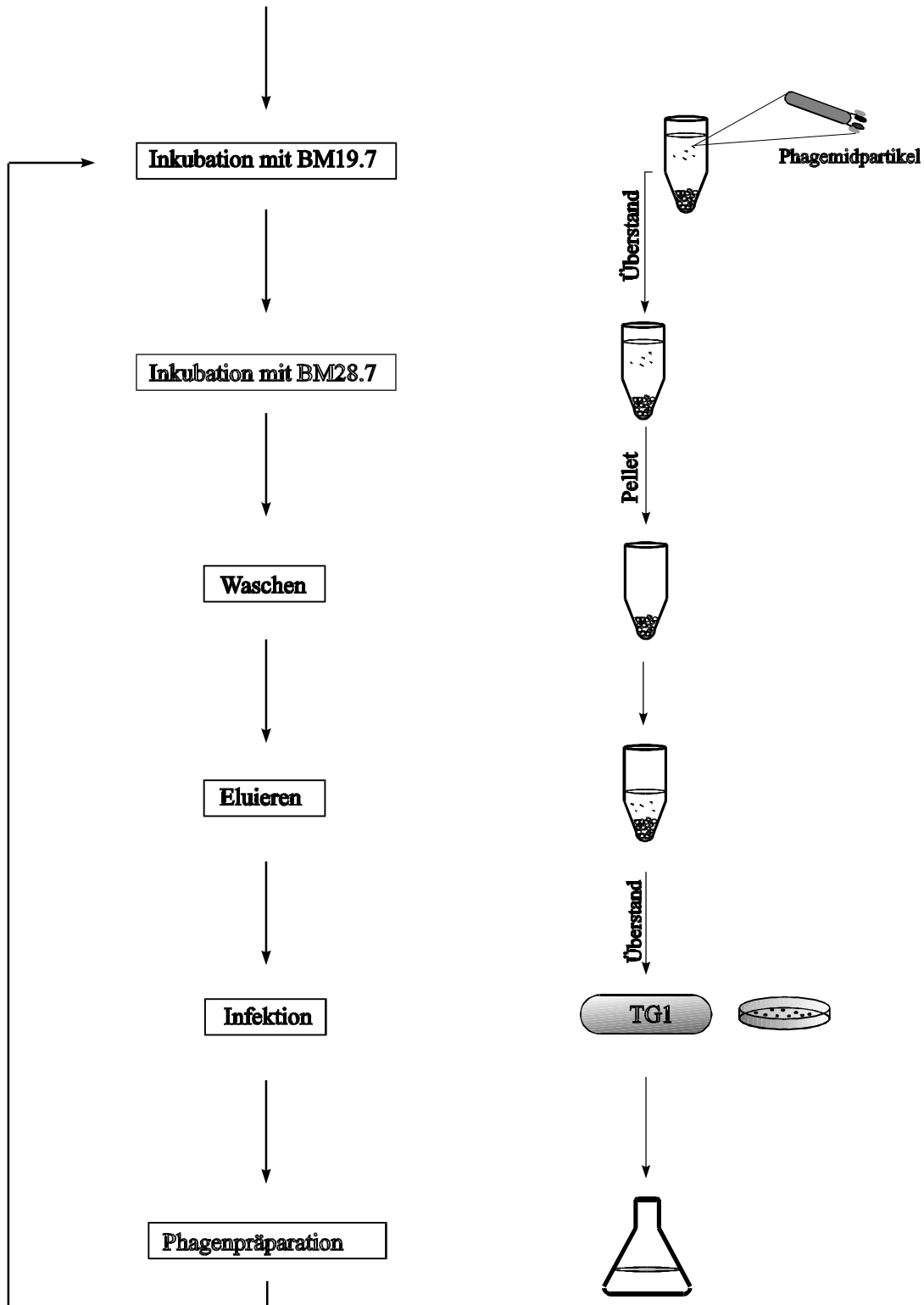


Abbildung 4-15. Strategie der Selektion der Nissim-Bibliothek mit den fixierten BM19.7- und BM28.7-Zellen. Zelloberflächenantigene dieser Zelllinie aufweisen, gebunden werden. Nach der Präinkubation wurden die BM19.7-Zellen abzentrifugiert und der Überstand weiter mit den BM28.7-Zellen (1×10^7 Zellen) inkubiert. Danach wurden die BM28.7-Zellen abzentrifugiert und gewaschen. Gebundene Phagenpartikel wurden durch Inkubation in Triethylamin-Lösung eluiert. Mit dem Eluat wurden TG1-Bakterien infiziert. Die selektionierten Phagemids wurden in den Bakterien vermehrt und mit Hilfe von M13K07-Phagen in Phagenpartikel verpackt. Die so erhaltene Phagenpräparation wurde für eine weitere Selektionrunde verwendet.

Insgesamt wurden vier Selektionsrunden vorgenommen. Die Zahl der an den BM28.7-Zellen gebundenen Phagenpartikel wurde durch Titration bestimmt. Die Tabelle 4-II zeigt die Anreicherung der BM28.7-spezifischen Phagen während der Selektion. Die nach jeder Runde

Tabelle 4-II. Anreicherung der BM28.7-spezifischen Phagen

Zelllinie	Selektionrunde			
	1	2	3	4
BM28.7	$4,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$

TG1-Bakterien wurden mit den von BM28.7 eluierten Phagen infiziert. Die Zahl der Ampicillin-resistenten Klone wurde bestimmt.

gewonnenen Phagenpopulationen wurden auf Reaktivität mit BM28.7- und BM19.7-Zellen getestet. Für diesen Zweck wurde ein ELISA für fixierte Zellen entwickelt. Etwa 5×10^5 fixierte Zellen wurden zunächst mit Milchpulver-Lösung und danach mit phagenenthaltenden Bakterienüberständen inkubiert. Die Bindung wurde anschließend mit dem anti-M13-Antikörper und dem Peroxydase-Konjugat des sekundären Antikörper nachgewiesen. Die nach der ersten und zweiten Selektion isolierten Populationen zeigten keine Bindung.

Das Diagramm in Abbildung 4-16 zeigt aber auch, daß schon nach der dritten Selektionrunde die Phagenpopulation mit den an den Zellen bindenden Phagen angereichert wurde. Nach der vierten Selektionrunde war der Meßwert mit BM28.7 etwa fünfmal stärker als das Hintergrund-Signal. Außerdem gab es nach der vierten Runde einen Unterschied zwischen der Bindung an BM28.7- einerseits und BM19.7-Zellen andererseits. Das positive Signal mit BM28.7 lag etwa zweimal höher als mit BM19.7. Als negative Kontrolle wurde die nichtselektionierte Nissim-Bibliothek eingesetzt. Obwohl eine Anreicherung der bindenden Phagen schon nach der dritten Runde im ELISA zu sehen war (Abb. 4-16), konnte eine

Titererhöhung der bindenden Phagenpartikel erst nach der vierten Selektionsrunde festgestellt werden (Tab. 4-II).

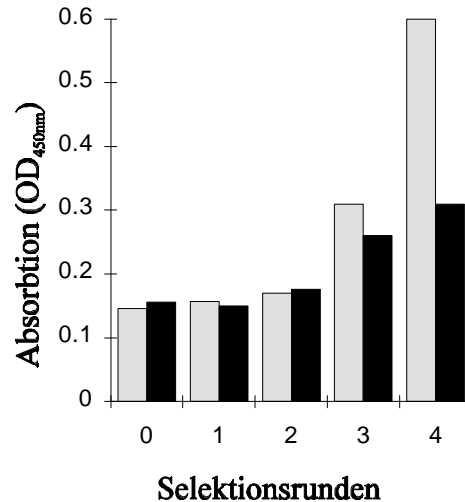


Abbildung 4-16. Phagenselektion auf den BM28.7-Zellen. Die Nissim-Phagenbibliothek wurde nach Entfernung unspezifisch mit BM19.7-Zellen reagierender Phagen mit fixierten BM28.7-Zellen selektiert. Nach jeder Selektionsrunde wurden die gebundenen Phagen eluiert, in *E. coli* vermehrt und im ELISA auf Bindung an den fixierten BM28.7- (grau) und BM19.7-Zellen (schwarz) getestet..

Jeweils 5×10^5 fixierte Zellen wurden mit den phagenenthaltenden Bakterienüberständen inkubiert. Die gebundene Phagen wurden mit dem anti-M13-Antikörper (Esel) und mit dem Peroxidase-Konjugat des Schaf-anti-Esel-IgG nachgewiesen.

Als nächstes wurden die nach der vierten Selektionsrunde an die Zellen bindenden Klone identifiziert. Dafür wurden die schweren Ketten bei vierzig Klonen mittels PCR amplifiziert. Der Vorwärtsprimer LMB3 hybridisiert am M13-Vektor vor der pelB-Signalsequenz, während der Rückwärtsprimer PCR-H-Link komplementär zum Linker ist. Die amplifizierten schweren Ketten wurden mit dem Restriktionsenzym MvaI verdaut und auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel untersucht (Abb. 4-17; 37 Klone sind gezeigt). Der Restriktionsverdau

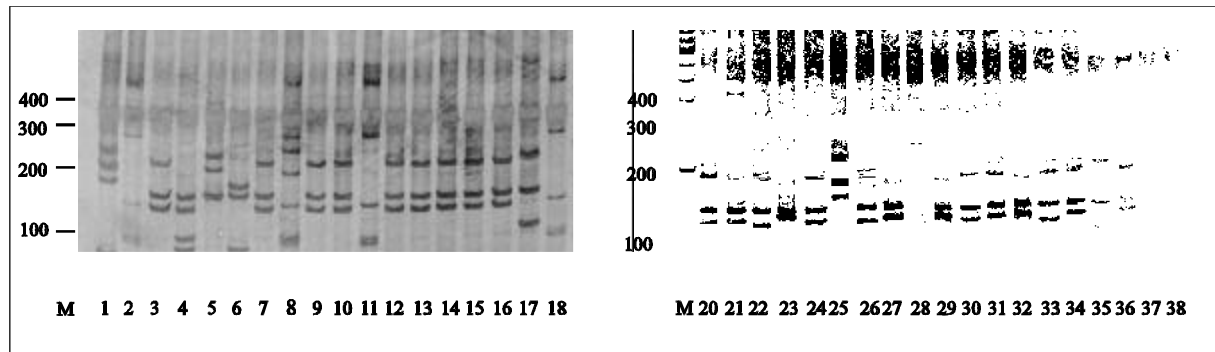


Abbildung 4-17. Fingerprinting der scFv-Klone nach der vierten Selektionsrunde. Die V_H -Fragmente einzelner Klone (1-37) wurden amplifiziert, die PCR-Produkte wurden mit MvaI verdaut und auf einem 5%igem PAA-Gel analysiert. M - Molekulargewichtsmarker (bp).

zeigte, daß 25 der 40 Klone das gleiche Muster aufweisen. Zur Hauptgruppe gehörten Klone 3, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 24, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38. Der Rest bestand aus kleinen Gruppen I (2, 8, 11, und 18), II (17 und 35), III (22 und 26) und Einzelklonen (1, 4, 5, 6, 23, 25, 28 und 30).

4.6.2 Spezifität der gewonnenen Klone

Bindung der Phagenpartikel

Alle Gruppen und die verbleibenden Einzelklone wurden im ELISA mit fixierten Zellen (5×10^5 Zellen pro Probe) BM28.7 und BM19.7 als Phagenpartikel getestet.

Die stärkste Reaktion mit den BM28.7-Zellen zeigten die Klone der Hauptgruppe (unter anderen Klon 3, Abb. 4-18). Die Reaktion mit BM28.7 war viermal höher als das Hintergrundsignal. Die Phagen banden jedoch auch an BM19.7, wobei sie eine 40% schwächere Bindung als an BM28.7 zeigten. Die zu den kleineren Gruppen I und II gehörenden Klone zeigten keine Reaktion mit beiden Zelllinien. Klone der Gruppe III, z.B. 22 (Abb. 4-18), banden nur schwach an den beiden Zelllinien. Unter den Einzelklonen wurde nur

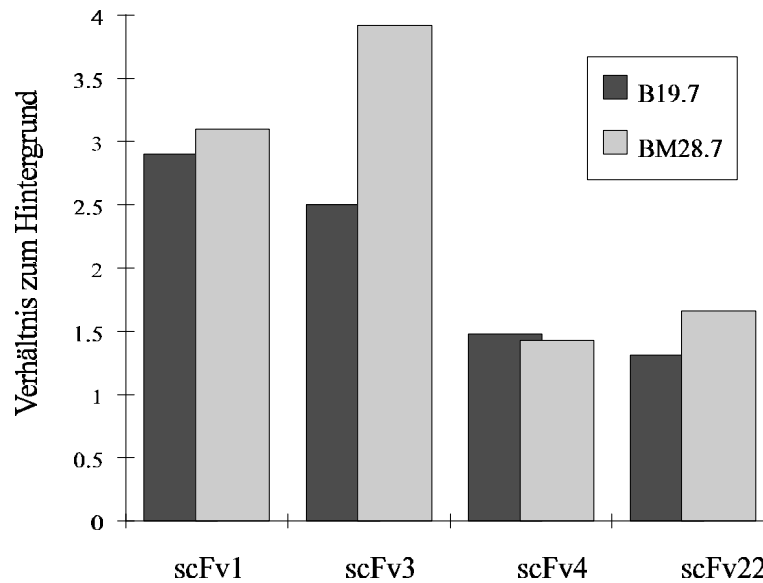


Abbildung 4-18. Bindung verschiedener Klone nach der vierten Selektionsrunde an die fixierten Zellen BM19.7 und BM28.7. Die Phagemidpartikel wurden in 3 ml Bakterienkultur gezüchtet. 50 µl Kulturüberstand wurde mit 50 µl 4% MPBS versetzt und für die Analyse mit 5×10^5 Zellen verwendet. Der Nachweis der gebundenen Partikel wurde wie bei den polyklonalen Phagenpopulationen durchgeführt (siehe Abb. 4-15). Als negative Kontrolle wurde die nichtselektionierte Nissim-Bibliothek verwendet.

für den Klon 1 (Abb. 4-18) eine deutliche Bindung (dreimal stärker als der Hintergrund) an den beiden Zelllinien festgestellt, wobei es keinen Unterschied zwischen den Reaktionen mit BM28.7 bzw. BM19.7 gab. Der Klon 4 zeigte schwache Bindung mit beiden Zelllinien. Die im ELISA mit Zellen reagierenden Klone 1, 3, 4 und 22 wurden für die Herstellung löslicher scFv-Fragmente verwendet.

Bindung der löslichen scFv-Fragmente an intakte Zellen.

Die löslichen scFv-Fragmente aus den Klonen 1, 3, 22 und 4 wurden in HB2151-Bakterien produziert. Die periplasmatischen Fraktionen wurden extrahiert und unverdünnt in der Durchflußzytometrie verwendet. Als Kontrolle wurde das gegen 3-Iodo-4-Hydroxyl-5-Nitrophenylacetat-BSA (NIP-Protein) gerichtete scFv-Fragment angesetzt.

Die scFv-Fragmente 1, 3, 4 und 22 wurden zuerst an den Zelllinien BM28.7 und BM19.7 getestet (Abb. 4-19). Die Klone 4 und 22 zeigten keine Reaktion. Klon 1 reagierte nur sehr schwach mit BM19.7. Klon 3 zeigte geringe Bindung (Signal etwa zweimal so stark wie der Hintergrund) an BM28.7 und keine an BM19.7.

Um die Spezifität der gewonnenen Klone weiter zu charakterisieren, wurden die scFv-Fragmente auf ihre Reaktion mit 24 HLA-typisierten Zelllinien mit Hilfe der Durchflußzytometrie getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-III zusammengefaßt.

Die mit “+” gekennzeichneten Ergebnisse charakterisieren eine nur geringe Verschiebung zum Hintergrundsignal. Klon 4 reagierte mit keiner der Zelllinien. Dagegen reagierten die Klone 1, 3 und 22 mit verschiedenen Zelllinien. Eine besonders gute Reaktion der Klone wurde bei der Zelllinie SH00 festgestellt, die die HLA-Moleküle A1, A2, B8, B12 und die Determinanten Bw4 und Bw6 exprimiert. Es konnten jedoch keine Schlußfolgerungen über die Natur der Wechselwirkung der scFv-Fragmente mit den Zellen gezogen werden. Wenn es auch wahrscheinlich ist, daß sie mit niedriger Affinität mit Oberflächenantigenen reagieren, so scheint die Reaktivität aber unabhängig von der Expression spezifischer HLA-Klasse I-Moleküle zu sein wie die Tabelle 4-III zeigt.

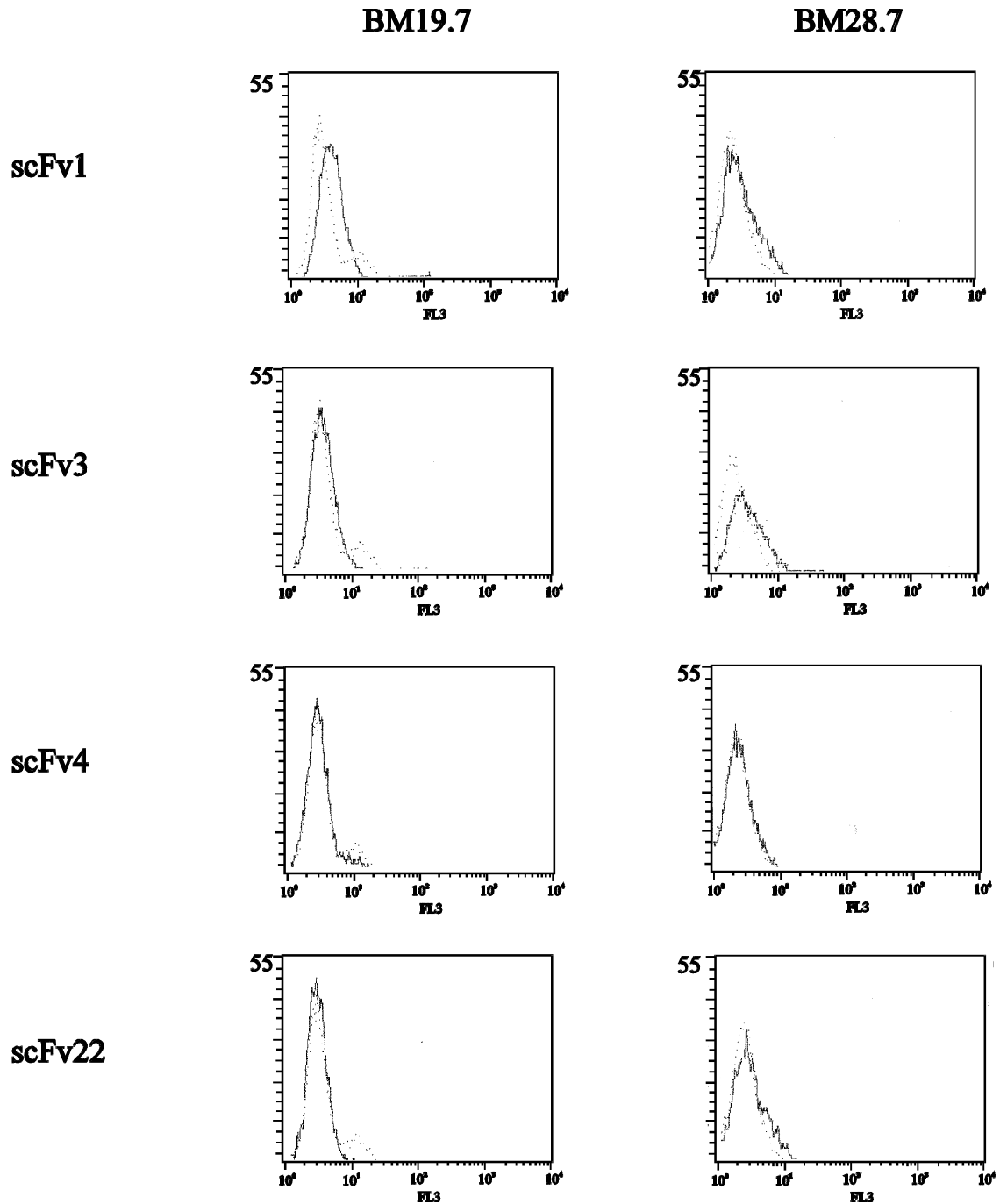


Abbildung 4-19. Reaktivität der Zelllinien BM28.7 und BM19.7 mit den aus der Nissim-Bibliothek selektierten scFv-Fragmenten in der Durchflußzytometrie (durchgezogene Linien). Als negative Kontrolle wurde das NIP-Protein-spezifische scFv-Fragment (punktierter Linie) herangezogen. Ordinate: relative Zellzahl; Abszisse: Fluoreszenzintensität.

Tabelle 4-III. Reaktivität verschiedener typisierter Zelllinien mit den scFv-Fragmenten 1, 3, 4 und 22.

Zelllinie	HLA-Haplotyp	Reaktion der scFv-Fragmenten			
		scFv1	scFv3	scFv4	scFv22
BM19.7	A2, B13, Bw4	+/-	-	-	-
BM28.7	A1, B35, Bw6	-	+/-	-	-
BM36.1/B27/26°	B27, wenig A1, B35, Bw6	-	-	-	-
BM36.7/B27/37°	B27, wenig A1, B35, Bw6	-	-	-	-
DAUDI	keine HLA-Klasse-I	-	-	-	-
HL60	A1, B17, B44, Bw4, Cw1	-	-	-	-
K562	wenig HLA-Klasse-I	-	-	-	-
BRW	A11/2, B7/12/44, Bw6/4	+/-	+/-	-	+/-
SH00	A1, A2, A8, B12, Bw6/4	+(2)	+(2,5)	-	+(2,5)
LCL5.2.4/26°C	A2, B27, (TAP2)	+/-	+/-	-	+/-
LCL5.2.4.	A2, B27, (TAP2)	+(2)	+/-	-	+/-
KR3598	A2, B44	+/-	+/-	-	+/-
LY	A9, B27/35, Bw6/4, Cw2/4	-	+/-	-	+/-
C1R	Cw4, wenig B35	-	+/-	-	+/-
C1R/B7	wie C1R, B7	-	+/-	-	+/-
C1R/B27	wie C1R, B27	-	-	-	-
C1R/B37	wie C1R, B37	-	-	-	-
C1R/B58	wie C1R, B58	+/-	+/-	-	+(3)
LCL721.221/Cw1	Cw1	+/-	+/-	-	+/-
LCL721.221/Cw5	Cw5	-	+/-	-	+(2)
LG2	A2/2, B27/27, Bw4/Bw4	-	-	-	-
H2LCL	A3/3, B7/7, Bw6, C4/7	-	-	-	-
JEG3	HLA-G, C, keine A, B	-	-	-	-
T2/A3	A2, A3, B5	-	-	-	-
T2/26°C	A2, B5	-	-	-	-

Die Zellen wurden mit 150 µl Periplasma der jeweiligen Klone inkubiert; Reaktion wurde mit dem Myc1-9E10 anti-Maus IgG-FITC nachgewiesen. Die toten Zellen wurden durch die Färbung mit Propidiumiodid erkannt und vor der Messung ausgeschlossen. “-” - Verhältnis zum Hintergrund liegt zwischen 1 und 1,5. “+/-” - Verhältnis zum Hintergrund liegt zwischen 1,5 und 2.

4.6.3 Charakterisierung der Sequenzen

Die für die scFv-Fragmente 1, 3, 4 und 22 kodierenden Nukleotidsequenzen wurden bestimmt. Die Sequenzierung wurde mit den Primern LMB3 und myc10 durchgeführt. In der Tabelle 4-IV sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der scFv-Fragmente 1, 3, 4 und 22 dargestellt. Wie erwartet, wiesen die Klone die gleiche leichte und unterschiedliche schwere Ketten auf. Die Länge der schweren Ketten betrug 115 Aminosäuren für den Klon 1, 116 - für Klone 3 und 4 und 114 - für den Klon 22. Die schweren Ketten von scFv1 und scFv4 werden durch die humanen V_H-Keimbahngene DP-47 und DP-8 kodiert (Tomlinson *et al.*, 1992). Für die schwere Kette des scFv22 wird das nichtmutierte Keimbahngen DP-4 verwendet. Die schwere Kette des Klons scFv3 unterscheidet sich von DP-4 durch die Mutationen Lys19RThr, Lys23Thr und Tyr27Phe . Die Sequenz von leichter Kette (dpl-16) entspricht den Angaben in der Literatur (Nissim *et al.*, 1994).

Tabelle 4-IV. Nukleotid- (A) und Aminosäuresequenzen (B) der schweren und leichten Ketten von den Klonen scFv 1, 3, 4 und 22**A***Schwere Ketten*

		30		60		90
scFv1	GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC					
scFv3	CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG ACT GGG TCC TCA GTG ACG GTT TCC TGC ACG GCT TCC GGA TTC ACC TTC ACC					
scFv4	CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACC					
scFv22	CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG ACT GGG TCC TCA GTG AAG GTT TCC TGG AAG GCT TCC GGA TAC ACC TTC ACC					
		120		150		180
scFv1	AGC TAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC					
scFv3	TAC CGC TAC CTG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCC GGA CAT GCG CTT GAG TGG ATG GGA TGG CTC ACA CCT TTC AAT GGT AAC ACC AAC TAC					
scFv4	GGC TAC TAT ATG CAC TGG GTG GGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT CAG TGG ATG GGA TGG ATC AAC CCT AAC AGT GGT GGC ACA AAC TAT					
scFv22	TAC CGC TAC CTG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCC GGA CAA GCG CTT CAG TGG ATG GGA TGG CTC ACA CCT TTC AAT GGT AAC ACC AAC TAC					
		210		240		270
scFv1	GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC					
scFv3	GCA CAT AAA TTC CAG GAC AGA GTC ACC ATT ACC AGG GAC AGG TCT ATG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC					
scFv4	GCA CAG AAG TTT CAG GGC TGG GTC ACC ATG ACC AGG GAC ACG TCC ATC AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGG CTG AGA TCT GAG GAC					
scFv22	GCA CAG AAA TTC CAG GAC AGA GTC ACC ATT ACC AGG GAC AGG TCT ATG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAT GAC					
		300		330		
scFv1	ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGA AAG GCG TGG CTT CGT AGG GTG . . . TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG TCG					
scFv3	ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGA TGT AAG GGG CAT ACT TGT CGT GAG TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG TCG					
scFv4	ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGA TCG TCT CAG GGT GTG ATG AGT GCT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG TCG					
scFv22	ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGA GGA CAT AGT TCA GCA ACT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG TCG					

Leichte Kette

		30		60		90
	TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT					
	GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC	120		150		180
	TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC	210		240		270
	AGC AGT GGT AAC CAT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC	300				

Die CDR-Regionen sind fett markiert. In den entsprechenden Sequenzen sind nichtvorhandene Nukleotide durch ein Punkt (.) gekennzeichnet.

B*Schwere Ketten*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
scFv1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
scFv3	QVQLVQSGAEVMKTGSSVTVSCTASGFTFT	YRYLH	WVRQAPGHLEWWMG	WLTPFNGNTNYAHKFQD	RVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
scFv4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	GYMH	WVRQAPGQGLEWWMG	WINPNSGGTNYAQKFQG	WVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAR
scFv22	QVQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFT	YRYLH	WVRQAPGQALEWWMG	WLTPFNGNTNYAQKFQD	RVTITRDRSMSTAYMELSSLRSDDTAVYYCAR
	1 10 20 30		40	50 60	70 80 90

	CDR3	FR4
scFv1	KAWLRRV	WGQGTLLVTVSR
scFv3	CKGHTCRE	WGQGTLLVTVSR
scFv4	SSQGVMSA	WGQGTLLVTVSR
scFv22	GHSSAT	WGQGTLLVTVSR
	100	110

Leichte Kette

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC	QGDSLRSYYAS	WYQQKPGQAPVLIY	GKNNRPS	GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC
	10 20	30	40	50 60	70 80
	CDR3	FR4			
	NSRDSSGNHVV	FGGGTKLTVLR			
	90	100			

Die Sequenzen sind in *framework*-Abschnitte (FR) und CDRs geteilt. Die CDR-Regionen sind fett dargestellt. Die Numerierung der Aminosäuren erfolgte nach Kabat *et al.* (1991).