

# **Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Antikörperfragmenten gegen HLA-Klasse I-Moleküle**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde des  
Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Natalija Backmann  
aus St. Petersburg

# Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Antikörperfragmenten gegen HLA-Klasse I-Moleküle

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 ANTIKÖRPER UND REKOMBINANTE ANTIKÖRPER-FRAGMENTE.....	2
1.1.1 Aufbau eines Antiköpermoleküls.....	2
1.1.2 Organisation der für einen Antikörper kodierenden Gene.....	4
1.1.3 Erzeugung der Antikörpervielfalt.....	4
1.1.4 Rekombinante einkettige Antikörperfragmente und ihre Eigenschaften.....	7
1.1.5 Expression von scFv-Fragmenten in Bakterien.....	10
1.2 HLA-KLASSE I-MOLEKÜLE.....	11
1.2.1 Struktur der HLA-Klasse I-Moleküle.....	12
1.2.2 Funktion der HLA-Klasse I-Moleküle.....	14
1.2.3 Der monokonale Antikörper TÜ165.....	15
1.3 PHAGENBIBLIOTHEKEN DER ANTIKÖRPER-FRAGMENTE UND IHRE EIGENSCHAFTEN.....	17
1.3.1 Aufbauprinzipien und Verwendung einer Phagenbibliothek.....	17
1.3.2 Affinität von scFv-Fragmenten aus einer Phagenbibliothek.....	19
1.3.3 Selektionsstrategien.....	22
1.4 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	23
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>25</b>
2.1 EUKARYOTISCHE ZELLINIEN.....	25
2.2 BAKTERIENSTÄMME.....	26
2.3 VEKTOREN, OLIGONUKLEOTIDE UND PEPTIDE.....	26
2.3.1 Vektoren.....	26
2.3.2 Synthetische Oligonukleotide.....	27
2.3.3 Peptide.....	28
2.4 ANTIKÖRPER.....	28
2.5 ENZYME.....	29
2.6 CHEMIKALIEN.....	29
2.7 ALLGEMEINE MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN.....	30
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>33</b>
3.1 cDNA-SYNTHESE.....	33
3.1.1 Isolierung von RNA.....	33
3.1.2 Erststrangsynthese mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	33
3.1.3 in-vitro-Vervielfältigung von DNA durch PCR.....	34
3.2 REINIGUNG VON DNA.....	34
3.2.1 Ethanolpräzipitation von DNA.....	34
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	34
3.2.3 Präparation von DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation).....	35
3.2.4 Präparation von DNA im mittleren Maßstab (Midipräparation).....	35
3.3 IN-VITRO-REKOMBINATION VON DNA.....	36
3.3.1 Restriktionsverdau.....	36
3.3.2 Gelelution von DNA-Fragmenten definierter Größe mit Hilfe von DEAE-Zellulose (Modifiziert nach Sambrook et al. (1989)).....	36
3.3.3 Ligation überstehender DNA-Enden (Modifiziert nach Sambrook et al. (1989)).....	36
3.4 DNA-GELELEKTROPHORESE.....	37
3.4.1 Agarosegele zur DNA-Auftrennung.....	37
3.4.2 Polyacrylamid-Gele zur DNA-Auftrennung.....	37
3.4.3 Silberfärbung.....	37
3.5. TRANSFORMATION VON E. COLI MIT PLASMIDEN.....	37
3.5.1 Kompetenzinduktion von Bakterien.....	37
3.5.2 Transformation von kompetenten Bakterien.....	38

3.6 SEQUENZIERUNG DOPPELSTRÄNGIGER PLASMID-DNA .....	38
3.7. METHODEN ZUM NACHWEIS VON PROTEINEN .....	40
3.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3.7.2 Western-Blot-Analyse.....	41
3.7.3 Zellfraktionierung.....	42
3.7.4 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	43
3.8 EXPRESSION UND REINIGUNG VON REKOMBINANTEN scFv-FRAGMENTEN AUS INCLUSION BODIES.....	43
3.8.1 Expression von TÛ165-scFv in E.coli.....	43
3.8.2 Isolierung der inclusion bodies.....	43
3.8.3 Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metall-Ionen (IMAC).....	44
3.8.4 Rückfaltung von scFv-Fragmenten .....	44
3.9. ZELLKULTUR .....	45
3.9.1 Anzucht von Zellen.....	45
3.9.2 Einfrieren der Zellen.....	45
3.9.3 Beladen von BM36.1-Zellen mit Peptiden.....	45
3.9.4 Fixieren der Zellen mit Glutaraldehyd.....	45
3.10 DURCHFLUßZYTOMETRIE (NACH UCHANSKA-ZIEGLER ET AL., 1980) .....	46
3.11. PHAGENBIBLIOTHEK.....	47
3.11.1 Bestimmung des Phagentiters .....	47
3.11.2 Bestimmung des Phagemidtiters .....	47
3.11.3 Präparation der Helferphagen.....	48
3.11.4 Anzucht der Phagen-Bibliothek.....	48
3.11.5 Präparation von Phagemidpartikeln.....	48
3.11.6 Selektion.....	49
3.11.7 Untersuchung der Spezifität der isolierten Phagen mittels ELISA.....	49
3.11.8 Produktion von löslichen scFv-Fragmenten.....	50
3.11.9 Fingerprinting der Klone.....	51
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
4.1 KONSTRUKTION DES scFv-FRAGMENTES VON TÛ165.....	52
4.1.1 Konstruktion der Primer für die PCR.....	53
4.1.2 Vervielfältigung der V-Regionen.....	55
4.1.3 Klonierung der V-Fragmente in das Plasmid pOPE90.....	57
4.1.4 Charakterisierung der Sequenzen .....	58
4.2 EXPRESSION VON TÛ165-scFv IN E. COLI .....	61
4.3 REINIGUNG DER TÛ165-scFv-FRAGMENTE.....	63
4.4 SPEZIFITÄTSBESTIMMUNG DES scFv-TÛ165-FRAGMENTES.....	65
4.4.1 Reaktivität des TÛ165-scFv-Fragments mit humanen Zelllinien .....	65
4.4.2 Spezifität des TÛ165-scFv-Fragments im ELISA.....	72
4.5 EXPRESSION DES TÛ165-scFv-FRAGMENTES AUF DER PHAGENOBERFLÄCHE.....	72
4.6 SELEKTION EINER PHAGENBIBLIOTHEK AUF ZELLEN .....	73
4.6.1 Selektion der Nissim-Phagenbibliothek auf fixierten Zellen.....	73
4.6.2 Spezifität der gewonnenen Klone .....	78
4.6.3 Charakterisierung der Sequenzen .....	83
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
5.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DES TÛ165-scFv-FRAGMENTES .....	87
5.1.1 Charakterisierung der Sequenzen .....	87
5.1.2 Probleme der Expression des TÛ165-scFv-Fragments in E. coli.....	91
5.1.3 Spezifitätsunterschiede zwischen dem monoklonalen Antikörper TÛ165 und dem TÛ165-scFv-Fragment .....	93
5.2 METHODISCHE ASPEKTE EINER SELEKTION VON scFv-FRAGMENTEN MIT INTAKTEN ZELLEN.....	95
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>100</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>102</b>



## 8 Anhang

### Abkürzungen

$\beta_2m$	$\beta_2$ -Mikroglobulin
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AMPS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	zur mRNA komplementäre Nukleinsäure
CDR	hypervariable Region ( <i>complementarity determining region</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FKS	fötale Kälberserum
FR	<i>framework</i>
g	relative Zentrifugierungskraft
G	Guanosin
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HLA	Haupt-Histokompatibilitätskomplex des Menschen
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute(n)
mRNA	Boten ( <i>messenger</i> )-Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBL	periphere B-Lymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
scFv	einkettige variable Domäne
T	Thymidin

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCR	T-Zell-Rezeptoren
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

# **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

### **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immungenetik des Universitätsklinikums Rudolf-Virchow/Charité angefertigt. Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. A. Ziegler, der das Thema für diese Arbeit zur Verfügung stellte und die Arbeit sachkundig betreute. Herrn Prof. W. Saenger danke ich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu dieser Arbeit zu erstellen.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. H.-H. Förster für die fachliche Betreuung und seine moralische Unterstützung sowie für die hilfreichen Hinweise zum Manuskript dieser Dissertation bedanken. Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. D. Mischke, der immer bereit war, zahlreiche Fragen in der Theorie und Praxis zu beantworten. Bei Frau Dr. B. Uchanska-Ziegler möchte ich mich für die Unterstützung bei der Arbeit mit den Zellkulturen, ihre Anregungen und Diskussionen bedanken. Frau A. Zank danke ich für die Einführung in die FACS-Analyse und ihre Hilfe bei der Arbeit mit Zellkulturen.

Bei allen Mitarbeitern vom Institut für Experimentelle Onkologie und Transplantationsmedizin möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Meinen lieben Freunden und meiner Familie danke ich für die moralische Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, der immer für mich da war.

Meine Arbeit wurde von der Maria-Sonnenfeld-Stiftung, Berlin und durch ein NaFöG-Abschlußstipendium des Berliner Senats unterstützt. Außerdem förderte die Europäische Union Teilaspekte des Projekts.

### Abstract

In the present work single chain fragments (scFv) of the HLA B35-specific, peptide dependent monoclonal antibody TÛ165 were studied. This monoclonal antibody interacts with cells expressing HLA only if they are infected with the Epstein Barr virus and has thus a certain similarity to T-cell receptors.

Moreover, a semi-synthetic phage library was selected with cells (human, HLA typed) in order to obtain HLA class I specific scFv. The results can be summarised as follows:

- The monoclonal antibody TÛ165 was characterised. To this aim the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> fragments of the antibody were amplified by means of specially constructed PCR primers. As a consequence the primary structure of the variable domain was determined and the antibody was classified: the heavy  $\mu$ -chain was found to belong to group 1b and the light  $\kappa$ -chain was classified as inhering to group V $\kappa$ 9.
- A scFv fragment of the antibody TÛ165 was constructed and expressed in *E. coli*. The expression conditions were optimised. As the fragment accumulated in the form of periplasmatic inclusion bodies a renaturation method had to be applied for protein purification. The specificity of the scFv fragment was investigated using human HLA typed cell lines. It was proven that the TÛ165 scFv fragment specifically binds to HLA B35-positive cells. However, in contrary to the monoclonal antibody the reactivity of the scFv fragment does not depend on the presence of certain peptides in the peptide-binding site of the HLA B35 molecule. Thus the specificity of the fragment is not identical with that of the monoclonal antibody TÛ165.
- Originally it was our intention to establish a model system based on TÛ165 scFv fragments for the selection of a phage library. We did not succeed in this objective. For the selection of HLA B35 specific phages a semi-synthetic library (Nissim library) was incubated with immobilised BM28.7 cells (HLA-A1, B35, and Bw6). In order to exclude reactions with other cell surface molecules the library was pre-incubated with immobilised BM19.7 cells (HLA-A2, B13, and Bw4). After in total 4 selection rounds a phage population was enriched which showed a preferential binding to BM28.7 cells. However, none of the analysed clones interact exclusively with this cell line. The soluble scFv fragments of 4 selected clones were tested towards their reaction with human HLA typed cell lines applying flow cytometry. The awaited high specificity could not be reached with the chosen selection system.

