

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein *single chain* (sc) Fv-Fragment des HLA-B35-spezifischen, Peptid-abhängigen monoklonalen Antikörpers (mAk) TÛ165 untersucht. Dieser mAk reagiert mit HLA-B35-exprimierenden Zellen nur dann, wenn sie mit EBV infiziert sind, und weist dadurch T-Zell-Rezeptor-ähnliche Eigenschaften auf. Außerdem wurde eine semi-synthetische Phagenbibliothek auf Zellen mit dem Ziel selektioniert, HLA-Klasse-I-spezifische scFv-Fragmente zu isolieren. Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der monoklonale Antikörper TÛ165 wurde molekularbiologisch charakterisiert. Dafür wurden die V_H- und V_L-Fragmente des Antikörpers mit Hilfe eigens konstruierter PCR-Primer amplifiziert. So konnte die Primärstruktur der variablen Region bestimmt und der Antikörper klassifiziert werden: die schwere μ -Kette wurde zur Gruppe Ib und die leichte κ -Kette zur Gruppe V _{κ 9} zugeordnet.
- Ein scFv-Fragment des Antikörpers TÛ165 wurde konstruiert und in *E.coli* exprimiert. Die Bedingungen der Expression wurden optimiert. Da das Fragment in Form von periplasmatischen *inclusion bodies* abgelagert wurde, mußte zur Reinigung ein Renaturierungsverfahren angewandt werden. Die Spezifität des scFv-Fragments wurde mit Hilfe humaner HLA-typisierter Zelllinien untersucht. Dabei erwies sich, daß das TÛ165-scFv-Fragment spezifisch mit HLA-B35-positiven Zellen reagiert. Im Gegensatz zum mAk war die Reaktivität des scFv-Fragments jedoch nicht von der Gegenwart bestimmter Peptide in der Peptid-bindenden Spalte des HLA-B35-Moleküls abhängig. Die Spezifität des Fragments ist somit nicht identisch mit der des mAk TÛ165.
- Die ursprünglich vorgesehene Erarbeitung eines Modellsystems auf der Basis von TÛ165-scFv-Fragmenten zur Selektion einer Phagenbibliothek mit Zellen war daher nicht möglich. Zur Selektion für HLA-B35-Phagen wurde eine semi-synthetische Phagenbibliothek (*Nissim-library*) mit fixierten BM28.7-Zellen (HLA-A1, B35, Bw6) inkubiert. Um Reaktionen mit anderen Zellmembranmolekülen auszuschließen, mußte die Bibliothek mit fixierten BM19.7-Zellen (HLA-A2, B13, Bw4) präinkubiert werden. Es gelang, nach insgesamt vier Selektionsrunden eine Phagenpopulation mit Klonen anzureichern, die im ELISA eine bevorzugte Bindung an BM28.7-Zellen zeigten. Keiner der analysierten Klone reagierte allerdings ausschließlich mit dieser Zelllinie. Die löslichen scFv-Fragmente von vier ausgesuchten Klonen wurden auf ihre Reaktion mit menschlichen HLA-typisierten Zelllinien hin

mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht. Die erhoffte hohe Spezifität der scFv-Fragmente ließ sich jedoch mit dem gewählten Selektionssystem nicht erreichen.