# Humanisierung von Cobra Venom Factor

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Johanna Kölln aus Elmshorn

Hamburg 2003

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2000 bis April 2003 am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bredehorst der Universität Hamburg durchgeführt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst
- 2. Gutachter: Prof. Dr. G. Gercken

## Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung	1
	1.1	Das Komplementsystem	1
	1.1.	1 Der klassische Aktivierungsweg	2
	1.1.	2 Der alternative Aktivierungsweg	3
	1.1.	3 Der Lektin-Aktivierungsweg	4
	1.1.4	4 Die Bildung des Membranangriffskomplexes	4
	1.1.	5 Die Komplementkomponente C3	5
	1.1.	6 Regulationsmechanismen des Komplementsystems	8
	1.2	Therapeutische Bedeutung des Komplementsystems	9
	1.2.	1 Komplement-assoziierte Erkrankungen	9
	1.2.2	2 Komplement-Inhibitoren	11
	1.3	Der Cobra Venom Factor	13
	1.3.	1 Anwendungen von Cobra Venom Factor	15
	1.3.2	2 Struktur-Funktionsanalyen des rekombinanten CVF	16
	1.4	Humanisierung von Proteinen	17
	1.5	Ziel der Arbeit	18
2	Mat	erial und Methoden	20
	2.1	Material	20
	2.2	Methoden	33
	2.2.	1 Molekularbiologische Methoden	33
	2.2.2	2 Proteinbiochemische Methoden	40
	2.2.	3 Phagentechniken	45
	2.2.4	Eukaryontische und prokaryontische Expression von Antikörpern	52
	2.2.:	5 Expression von CVF, C3 und den Hybriden in Mammalia	58
	2.2.	6 Komplementmethoden	61
	2.2.	7 Zellbiologische Methoden	67
3	Erge	ebnisse	72
	3.1	Expression und Charakterisierung von CVF und C3	72
	3.1.	1 Expression von CVF und C3 in Mammalia	72

3.	1.2	Kettenstruktur des rekombinanten CVF	. 73
3.	1.3	Aktivitätsuntersuchungen des rCVF im Überstand	. 74
3.	1.4	Partielle Reinigung und Konzentrierung des rCVF	. 76
3.	1.5	Transiente Expression von rCVF im Serum- oder Protein-freien Medium	. 78
3.2	Kor	nzeption und Etablierung eines Festphasen-Assays	. 80
3.	2.1	Fusion eines Affinitätstags an CVF und C3	. 80
3.	2.2	Evaluierung der Assaybedingungen	. 81
3.	2.3	Aktivitätsuntersuchungen der Strep-tag-Fusionsproteine	. 84
3.3	Gen	erierung und Charakterisierung der Hybride aus CVF und C3	. 85
3.	3.1	Klonierung der Konstrukte H1 und H2	. 87
3.	3.2	Konstruktion weiterer Hybride	. 90
3.	3.3	Transiente Expression der Hybride H1-H4	. 94
3.4	Sele	ektion, Expression und Verwendung löslicher Antikörper-Fragmente	. 97
3.	4.1	Selektion und Charakterisierung von Antikörper-Fragmenten	. 98
3.	4.2	Expression der löslichen Antikörper-Fragmente in E. coli	105
3.	4.3	Präzipitationen mit den löslichen Antikörper-Fragmenten	108
3.	4.4	Immobilisierung von CVF und C3 über die Antikörper-Fragmente	111
3.	4.5	Immunpräzipitation mit rekombinanten CVF	113
3.	4.6	Immunpräzipitation des Hybrides H4	114
3.	4.7	Affinitätsmessungen der Antikörper-Fragmente	116
3.5	Exp	ression von Antikörpern im IgG-Format	118
3.	5.1	Mutation der Amber-Stopcodons	118
3.	5.2	Expression in Mammalia und Hefe	118
3.6	Gen	erierung und Expression von H5	121
3.	6.1	Klonierung und Expression des Konstruktes H5	121
3.	6.2	Charakterisierung des Hybrides H5	124
3.7	Exp	ression und Charakterisierung des Hybrides H6	125
3.	7.1	Klonierung und Expression des Hybrides H6	125
3.	7.2	Charakterisierung des Hybrides H6	128
3.	7.3	Reinigung des Hybrides H6	131
3.	7.4	Klonierung und Expression des Hybrides His-H6	132
3.	7.5	Reinigung und Charakterisierung des Hybrides H6	133
3.8	Ver	gleichende Analyse der Aktivitäten der Hybride	138

4	Disl	cussic	on	140
	4.1	Das	Komplementsystem und seine Modulation	140
	4.1.	1	Der Komplementmodulator Cobra Venom Factor	141
	4.2	Exp	ression und Charakterisierung des rekombinanten CVF und humanen	C3 142
	4.2.	1	Überlegungen zur Auswahl des Expressionssystems	142
	4.2.2	2	Expression von CVF und humanem C3	143
	4.2.	3	Aktivitätsuntersuchungen des rekombinanten CVF	144
	4.2.4	4	Etablierung eines Festphasen-Assays	145
	4.3	Sele	ktion, Expression und Verwendung löslicher Antikörper-Fragmente	147
	4.3.	1	Selektion und Expression der Antikörper-Fragmente	147
	4.3.2	2	Verwendungen der Antikörper-Fragmente	149
	4.4	Gen	erierung, Expression und Charakterisierung der Hybride	151
	4.4.	1	Konstruktion der CVF/C3-Hybride H1-H4	151
	4.4.	2	Expression und Charakterisierung der CVF/C3-Hybride	154
	4.4.	3	Expression und Charakterisierung des Hybrides H5	156
	4.4.4	4	Expression und Charakterisierung des Hybrides H6	158
	4.4.	5	Reinigung und Charakterisierung des Hybrides H6	159
	4.5	Gen	erelle Erwägungen zu Komplementmodulationen in vivo	162
	4.6	Aus	blick	166
5	Zusa	amme	enfassung	167
6	Lite	ratur		170
7	Anh	ang .		186

## Abkürzungsverzeichnis

А	Adenin
ABTS	2 2'-Azino-bis(2-ethylbenzthiazoline-6-sufonic acid)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin-Resistenzgen
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BMGY	Genuffertes Glycerol-Komplexmedium
BMMY	Gepuffertes Methanol-Komplexmedium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
С	Cvtosin
C1-Inh	C1-Inhibitor
C4bp	C4-bindendes Protein
C3	Drittes Komplementprotein
CAPS	3-Cyclohexylamin-1-propansulfonsäure
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	Complementarity determining region
СНО	Chinese hamster ovary
CIAP	Alkalische Phosphatase ( <i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> )
CMV	Cytomegalovirus
coC3	Kobra C3
CR	Komplementrezeptor
CVF	Cobra Venom Factor
DAF	Zerfalls-Beschleunigungs-Faktor ( <i>Decay accelerating factor</i> )
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Mod Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbentassay
EK	Enterokinase
Fab	Antigenbindendes Fragment
Fc	Kristallisierbares Fragment
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
G418	Geneticin 418
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMEM	Glasgow Mod Eagle Medium
$\mathrm{GVBS}^{++}$	Veronalpuffer mit Gelatine
hC3	Humaner Komplementfaktor C3
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethylsulfonsäure
Her2/Neu	Heregulin2/Neuregulin
His	Histidin
Ig	Immunglobulin

IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	B-Galaktosidase kodierendes Gen
LB	Luria-Bertani
MAC	Membranangriffskomplex (Membrane attack complex)
MASP	MBI -assozijerte Serinprotease
MRL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	Membran-K of aktor-Protein
MCS	Multiple Klopierungsstelle (Multiple cloping site)
MWCO	Maluple Klonerungsseine (Maluple cloning site) Molecular weight cut off
Na A c	Natriumacetat
NDT	Nitroplay Tatrazoliymahlarid
	Nicht assentialle Aminosöuren (Nen assential amino acida)
NEAA	Normalas human Samum
NIIS/EDC	N Hydroxy maninimid/Ethyl dimathyl aminanyanyl aarhadiimid
NHS/EDC	N-Hydroxy-succinimid/Etnyi-aimetnyi-aminopropyi-carboanmid
NMWL	Normal molecular weight limit
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (Origin of replication)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pelB	Pectyl-Lyase B
Penstrep	Penicillin/ Streptomycin
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
ŘТ	Raumtemperatur
RU	Resonance unit
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
St	Strep-tagII
Т	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tag	Thermus aquaticus
TBS	Tris-Puffer (Tris huffered saline)
TEMED	N.N.N'.N'-Tetramethyelthylendiamin
TES	Tris EDTA Saccharose
TPBS	PBS mit Tween
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transformation and storage solution
Tween	Polyoyyethylensorbitan Monolaurat
I	I oryoxyotiiyionsoronan wionolaurat
VBS	Veronalnuffer (Veronal huffered saline)
VBS <sup>++</sup>	Veronalputfer mit MaCl, und CaCl.
у ЦО 1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/	Volume ner volume
V / V	volume per volume Weight per volume
W/V	Mahrfachas dar Gravitation
лу	meninacines del Gravitation

## 1 Einleitung

## **1.1 Das Komplementsystem**

Der Begriff Komplement wurde im Jahre 1899 von Paul Ehrlich geprägt und bezeichnet einen hitzelabilen Bestandteil des Serums, der die antibakterielle Aktivität der Antikörper komplementiert (Ehrlich und Morgenroth, 1899). Mittlerweile sind über 30 verschiedene Komplementproteine identifiziert, zu denen Proteasen, regulatorische Membranproteine und Rezeptoren zählen. Diese bilden zusammen ein komplexes System, welches in allen höheren Vertebraten vorliegt und als Teil der angeborenen und erworbenen Immunität eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und der Immunabwehr spielt (Dodds und Day, 1993). Die physiologischen Funktionen des Komplementsystems sind im wesentlichen die Lyse von Zielzellen durch Insertion hydrophober polymerer Moleküle, die zielgerichtete Chemotaxis von basophilen Granulozyten und Makrophagen durch die Markierung mit Abbauprodukten der Komplementproteine, sowie die Opsonisierung von Pathogenen zur Phagozytose (Frank und Fries, 1991).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen, dem klassischen Antikörper-abhängigen Aktivierungsweg, dem alternativen Aktivierungsweg und dem erst seit ca. zehn Jahren bekannten Lektin-Aktivierungsweg, wobei die letzten zwei Antikörper-unabhängig sind. Alle drei Wege gleichen sich in ihrer kaskadenartigen Organisation, wobei eine Protease auf Zymogene einer nachfolgenden Protease wirkt. Diese Kaskade resultiert in einer Amplifikation des Initiationssignals. Der zentrale Schritt der Komplementkaskade ist die Bildung einer C3-Konvertase, die C3 zu C3b und C3a spaltet (Abb. 1). Das gebildete C3b kann anschließend als ein Teil einer C5-Konvertase wirken, welche C5 in C5b und C5a spaltet. Im terminalen Weg wird nach sukzessiver Anlagerung von C6, C7, C8 und mehreren Molekülen C9 unter Bildung des Membranangriffskomplexes in der Membran der Zielzelle eine Pore ausgebildet und die Zelle lysiert.



## Abb. 1. Komplementaktivierung über den alternativen, klassischen und Lektin-Aktivierungsweg.

Die drei verschiedenen Aktivierungswege treffen in der zentralen Bildung der C3-Konvertase zusammen. Die Amplifikationsschleife ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet. C3b und C4b sind über ihren Thioester auf der Oberfläche der Zielzelle gebunden.

#### 1.1.1 Der klassische Aktivierungsweg

Die klassische Aktivierung gehört zur adaptiven, humoralen Immunantwort und wird durch die Bindung eines Antigens durch seine spezifischen Antikörper initiiert. Bei Bindung eines IgM oder mehrerer IgG-Moleküle an ein Antigen lagert sich die erste Komplementkomponente, C1, an die  $F_c$ -Region der Antikörper an (Schumaker, 1987). C1 besteht aus mehreren Untereinheiten, einer Einheit C1q und je zwei Untereinheiten C1r und C1s. Durch Bindung von C1q an die  $F_c$ -Region wird C1r als Enzym aktiviert und spaltet die assoziierte Untereinheit C1s, wodurch eine aktive Serinprotease gebildet wird. Diese entstandene Protease spaltet C4 in C4b und C4a, wodurch in C4b ein reaktiver Thioester exponiert wird, der kovalent auf der Oberfläche von Zellen bindet. Dies erlaubt die Anlagerung von C2, welches hierdurch für die Spaltung durch C1s zugänglich und in C2b und C2a gespalten wird. Das aus der Spaltung resultierende C4b2b ist die C3-Konvertase des klassischen Weges und kann C3 in C3b und das Anaphylatoxin C3a spalten. Durch Anlagerung eines weiteren Moleküls C3b an die C3-Konvertase entsteht die C5-Konvertase C4b2b3b (Kim *et al.*, 1992) des klassischen Weges, die C5 in C5b und das Anaphylatoxin C5a spaltet (Porter und Reid, 1978). Das Spaltprodukt C5b ist die erste Komponente des terminalen lytischen Weges.

#### 1.1.2 Der alternative Aktivierungsweg

Der alternative Aktivierungsweg ist Antikörper-unabhängig (Götze und Müller-Eberhard, 1971) und daher Teil des angeborenen Immunsystems. Die Initiation erfolgt durch die spontane nicht-enzymatische Hydrolyse der intramolekularen Thioesterbindung in der Komplementkomponente C3 zu C3(H<sub>2</sub>O) (Isenman *et al.*, 1981). Faktor B bindet an C3(H<sub>2</sub>O) und wird anschließend durch die Protease Faktor D in Bb und Ba gespalten. Das aus der Spaltung resultierende C3(H<sub>2</sub>O)Bb-Molekül hat C3-Konvertase-Aktivität und spaltet weitere C3-Moleküle in C3b und C3a. Die entstehenden C3b-Moleküle können wie im klassischen Aktivierungsweg über ihren freigesetzten reaktiven Thioester auf der Oberfläche von pathogenen Zellen binden und Faktor B anlagern, der durch Faktor D gespalten wird. Der daraus entstehende Komplex C3bBb ist die C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges. Die alternative C3-Konvertase wird durch die Anlagerung von Properdin stabilisiert (Fearon *et al.*, 1975; Medicus *et al.*, 1976). Die Anlagerung eines weiteren Moleküls C3b resultiert in der Bildung der alternativen C5-Konvertase C3bBbPC3b.

### 1.1.3 Der Lektin-Aktivierungsweg

Der Lektin-Aktivierungsweg wird durch die Bindung eines Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Mannose-haltige Kohlenhydratstrukturen der Membranglykoproteine auf der Oberfläche von Viren, Hefen und Bakterien initiiert (Thomson, 1995). In höheren Vertebraten ist die Zugänglichkeit dieser Mannose-haltigen Zielstruktur durch andere Zuckerreste blockiert, so dass körpereigene Zellen von MBL nicht gebunden werden.

Zwischen den Komponenten des Lektin-Aktivierungsweges und des klassischen Aktivierungsweges gibt es strukturelle Ähnlichkeiten, so ist MBL strukturell verwandt mit C1q und liegt analog zu C1q assoziiert mit weiteren Komponenten vor, die als MASP1 und MASP2 (MBL-assoziierte Serinprotease) bezeichnet werden (Matsushita und Fujita, 1992; Thiel *et al.*, 1997). Diese beiden Serinproteasen weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu C1s und C1r auf. Durch die Bindung von MBL an Mannose-Reste werden MASP1 und MASP2 aktiviert und können C4 in C4b und C4a spalten. Eine dritte Serinprotease (MASP3) und ein weiteres Protein (sMAP; *small MBL-associated protein*) liegen mit dem MBL-Komplex assoziiert vor, ihre Funktionen sind jedoch noch nicht geklärt (Stover *et al.*, 1999; Dahl *et al.*, 2001).

Der weitere Verlauf des Lektin-Weges entspricht dem des klassischen Aktivierungsweges. Der Lektin-Aktivierungsweg bietet eine sofortige Möglichkeit, Pathogene zu erkennen und zu neutralisieren, wohingegen die Synthese von Antikörpern zur Aktivierung des klassischen Weges mehrere Tage in Anspruch nimmt.

## 1.1.4 Die Bildung des Membranangriffskomplexes

Der terminale lytische Weg, der von dem enzymatischen Spaltprodukt der C5-Konvertase C5b initiiert wird, läuft über Anlagerung und Konformationsänderung mehrerer Proteine und resultiert in der Bildung des Membranangriffskomplexes (Abb. 2). Zunächst bindet C6 an C5b, welches jedoch weiterhin über den Thioester des C3b-Moleküls der C5-Konvertase auf der Zelloberfläche gebunden bleibt. Anschließend kommt es zu einer Anlagerung von C7, das eine Konformationsänderung erfährt und dabei eine hydrophobe Region exponiert, die mit den Phospholipiden der Membran interagieren kann (DiScipio, 1992). Durch die nachfolgende Bindung von C8 an den gebildeten Komplex wird die

Membran vollständig durchspannt. Die Anlagerung von bis zu 18 Molekülen C9 resultiert in einer Membranpore von maximal 100 Å (Müller-Eberhard, 1986). Die Pore führt zum Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten und zur Zerstörung der Zelle.



#### Abb. 2. Bildung des Membranangriffskomplexes.

Der Bildung der klassischen oder alternativen C5-Konvertasen und der damit verbundenen Spaltung von C5 folgt die sukzessive Anlagerung von C6, C7, C8 und bis zu 18 Molekülen C9. Der sich formende Membranangriffkomplex bildet in der Membran eine Pore aus, welche zur Lyse der Zelle führt.

## 1.1.5 Die Komplementkomponente C3

Das Komplementprotein C3 ist die zentrale Komponente aller Aktivierungswege und wird als 1663 Aminosäurereste langes Vorläuferprotein überwiegend in der Leber exprimiert (Alper *et al.*, 1969). Nach der Abspaltung der 22 Aminosäurereste langen Signalsequenz wird das Vorläuferprotein proteolytisch durch die Entfernung von vier Argininresten in zwei Ketten gespalten, die  $\alpha$ -Kette mit 115 kDa und die  $\beta$ -Kette mit 73 kDa (DeBruijn und Fey, 1985). Die Ketten sind über eine Disulfidbrücke und über starke nicht-kovalente Wechselwirkungen verknüpft (Dolmer und Sottrup-Jensen, 1993; Janatova, 1986). Das resultierende Protein mit 188 kDa trägt außerdem an jeder Kette eine Kohlenhydratkette aus 5-9 Mannoseresten und zwei N-Acetylglucosaminresten (Hirani *et al.*, 1986).

Durch die C3-Konvertasen wird C3 zwischen den Aminosäuren Arg<sup>726</sup> und Ser<sup>727</sup> gespalten. Das hierbei entstehende C3a mit 9 kDa ist ein Anaphylatoxin und bewirkt eine Steigerung der Chemotaxis sowie eine Erhöhung der Permeabilität der Blutkapillaren. Im C3b mit 179 kDa wird durch die Spaltung ein hochreaktiver Thioester zwischen den Aminosäureresten Cys<sup>988</sup> und Glu<sup>991</sup> frei, über den C3b durch Transacetylierung auf Zelloberflächen bindet (Tack *et al.*, 1980). Darüber hinaus werden durch die Spaltung mehrere Bindungsstellen für verschiedene Komplementproteine exponiert, die die zahlreichen Interaktionen des C3b-Moleküls ermöglichen (Abb. 3).

Mehrere regulatorische Komplementproteine interagieren mit C3b, welches Bindungsstellen für den CR1 oder Faktor H, die als Kofaktor für die Spaltung durch die Protease I wirken, besitzt. Faktor I spaltet C3b zwischen Arg<sup>1281</sup> und Ser<sup>1282</sup> und Arg<sup>1298</sup> und Ser<sup>1299</sup>, wobei das Fragment C3f entsteht, sowie C3bi, welches inaktiv ist und weder Faktor B noch C5 binden kann (Lachmann *et al.*, 1982; Davis *et al.*, 1982). C3bi kann jedoch weiterhin auf der Oberfläche von Pathogenen verbleiben und wird dort von CR3, der auf Makrophagen und Killerzellen vorkommt, erkannt. Anschließend mediiert CR3 die Zerstörung des Pathogens (Newman *et al.*, 1984).

Wirkt CR1 als Kofaktor für die Protease, kann Faktor I zusätzlich zwischen den Aminosäuren Arg<sup>932</sup> und Glu<sup>933</sup> spalten, so dass C3dg und C3c gebildet werden (Ross *et al.*, 1982). C3dg kann ebenfalls auf der Oberfläche gebunden bleiben und wird von CR2 (CD21), der auf B-Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird, erkannt (Law und Dodds, 1997). Die Bindung von C3dg an den Komplementrezeptor CR2 führt zu einer Aktivierung der B-Zellen (Bohnsack und Cooper, 1988).

Durch den Einsatz kompetitiv wirkender homologer synthetischer Oligopeptide oder monoklonaler Antikörper gegen diese Peptide konnten die Bindungsstellen für Faktor H und Faktor B den Aminosäuren 727-768 zugeordnet werden (Ganu und Müller-Eberhard, 1985). Genauere Untersuchungen unter Verwendung radioaktiv markierter überlappender Hexa- und Heptapeptide zeigten, dass die Aminosäuren 730-739 (<sup>730</sup>DEDIIAEENI) für die Bindung an Faktor B entscheidend sind, während bei der Bindung von Faktor H die Aminosäuren 745-754 (<sup>745</sup>FPESWLWNVE) und die Aminosäuren 1187-1249 involviert sind (Fishelson, 1991). Dabei sind insbesondere die negativ geladenen Aminosäuren (Glu<sup>736</sup>, Glu<sup>737</sup> und Glu<sup>744</sup>, Glu<sup>747</sup>) an der Bindung von Faktor B bzw. Faktor H beteiligt (Oran und Isenman, 1999; Fishelson, 1991).



**Abb. 3. Schematische Darstellung der Bindungs- und Spaltungsstellen in humanem C3.** Dargestellt sind die Bindungsstellen und die Spaltungsstellen für Proteasen, die durch Pfeile markiert sind. Die entstehenden Fragmente der Spaltungen werden mit C3a, C3d, etc. bezeichnet. B: Faktor B; H: Faktor H; CR: Komplementrezeptor (nach Lambris, 1988).

Nach dem Abbau von C3 durch eine Protease aus dem Gift der Kobra *Naja siamensis* entsteht das Fragment C3o, das die Aminosäuren 730-739 nicht mehr enthält, aber dennoch in der Lage ist, Faktor B zu binden (O'Keefe *et al.*, 1988). Im Gegensatz dazu kann das Spaltprodukt der Faktor I-Proteolyse C3c keine Konvertase mehr bilden. Vergleicht man die C3c und C3o Moleküle (Abb. 4), kann nur ein allein in C3o enthaltener Bereich der

Aminosäuresequenz <sup>933</sup>EGVQKEDIPP für die Bindung an Faktor B verantwortlich sein. In weiteren Untersuchungen wurden die Aminosäuren <sup>937</sup>KED in Alanine mutiert, dabei konnte keine Veränderung der Bindungseigenschaften von Faktor B zu C3b gezeigt werden (Taniguchi-Sidle und Isenman, 1994). Diese Region wird daher als postulierte zweite Faktor B-Bindungsstelle bezeichnet (Fishelson, 1991).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Strukturen der C3b, C3c und C3o Moleküle.** C3b resultiert aus der Spaltung von C3 durch die C3-Konvertase, C3c entsteht durch Faktor I-Proteolyse von C3 und C3o resultiert aus der Spaltung von C3 durch eine Protease aus dem Gift der Kobra *Naja siamensis*. Hervorgehoben sind die Faktor B-Bindungsstellen (727-739 und 933-942). Die Termini des Fragmentes C3p sind unbekannt (nach Taniguchi-Sidle und Isenman, 1994).

#### 1.1.6 Regulationsmechanismen des Komplementsystems

Aktivierte Komplementproteine können nicht zwischen körpereigen und fremd diskriminieren. Dies soll gewährleisten, dass z.B. selbst-reaktive B-Zellen eliminiert werden können. Aus diesem Grunde bedarf es einer Vielzahl von Regulationsmechanismen, um die gesunden körpereigenen Zellen vor einem Angriff zu schützen.

Die Regulation erfolgt wie im Falle der C3-Konvertasen einerseits durch eine geringe Halbwertszeit der aktivierten Komplementproteine, andererseits gibt es Plasmaproteine wie den C1-Inhibitor (C1-Inh), Faktor H und Faktor I und Membran-gebundene Proteine, wie den *Decay-accelerating-factor* (DAF, CD55), das *Membran-cofactor-protein* (MCP, CD46) und den Komplementrezeptor 1 (*Complement receptor 1*, CR1, CD35), die die Komplementkaskade auf spezifischen Ebenen regulieren.

C1-Inh kontrolliert die Aktivierung von C1 durch Bindung an aktiviertes C1r und C1s, was die Dissoziation von C1q bedingt. Die Zeitspanne für die Spaltung von C2 und C4 durch aktiviertes C1 wird durch C1-Inh auf wenige Minuten begrenzt (Mollnes und Lachmann, 1988). Das C4-bindende Protein (C4bp) bindet an C4b und trennt dieses von C2b ab. Es fungiert zusätzlich als Kofaktor für die Spaltung von C4b und C3b durch die Protease Faktor I (Scharfstein *et al.*, 1978). Die C3-Konvertase des klassischen Weges wird auf die gleiche Art von DAF inaktiviert, der auf allen peripheren Blut-, Epithel- und Endothelzellen vorkommt (Lublin und Atkinson, 1989, Lublin und Atkinson, 1990).

Ein wichtiger Angriffspunkt der Regulation ist C3b, die zentrale Komponente aller drei Aktivierungswege. C3b wird sowohl von Faktor H, CR1, DAF als auch von MCP reguliert. Dabei wird durch CR1, Faktor H und DAF aus dem Komplex der C3-Konvertase C3bBb jeweils Bb kompetitiv verdrängt (Makrides *et al.*, 1992) und anschließend C3b durch Faktor I geschnitten und inaktiviert (Pangburn und Müller-Eberhard, 1984). MCP greift C3b direkt an und ist ebenfalls ein Kofaktor für die Spaltung durch Faktor I. Protectin (CD95) ist ein weiteres Membran-gebundenes Regulatorprotein. Es inhibiert die Polymerisation von C9 durch Bindung an C8 und C9 (Mollnes und Lachmann, 1988).

Neben einer Regulation zur gerichteten Aktivierung existiert zusätzlich eine transkriptionelle Kontrolle der Komplementgene; so werden z.B. nach einer Gewebeverletzung einige Gene der Komplementproteine durch Cytokin- und IFNγ-aktivierte Transkriptionsfaktoren hochreguliert (Volanakis, 1995).

## **1.2 Therapeutische Bedeutung des Komplementsystems**

#### **1.2.1 Komplement-assoziierte Erkrankungen**

Die strengen Regulationsmechanismen verhindern einen Angriff des Komplementsystems auf körpereigene Zellen. Ausgelöst durch unterschiedlichste Krankheiten kann körpereigenes Gewebe jedoch durch unregulierte Aktivierung stark geschädigt werden. Dabei ist die Komplementaktivierung nicht die primäre Ursache der Krankheit, die auftretenden Gewebeschäden sind jedoch Komplement-mediiert.

Krankheiten, die mit Komplementaktivierung verbunden sind, können in drei Gruppen eingeteilt werden: in chronische Krankheiten, akute Krankheiten und in die Inkompatibilitäten gegenüber Biomaterialien.

Zur Gruppe der akuten Krankheiten zählen z.B. Asthma (Regal et al., 1993; Regal und Fraser, 1996), Sepsis (Hack et al., 1989; Hack et al., 1992), eine hyperakute Abstoßung bei Transplantationen oder Xenotransplantationen (Bach et al., 1995; Baldwin et al., 1995), Lungenentzündung (Eppinger et al., 1997) und Herzinfarkt (Kilgore et al., 1997), sowie eine massive C3a-Anreicherung, die bei einer cardiopulmonalen Bypass-Operation auftritt (Kriklin et al., 1983; Homeister et al., 1992). Zu den chronischen Krankheiten gehören Systemischer Lupus Erythematodes (SLE) (Belmont et al., 1986; Buyon et al., 1992), Glomerulonephritis (Couser et al., 1985; Couser et al., 1995), Rheumatoide Arthritis (Kemp et al., 1992; Wang et al., 1995), Alzheimer (Rogers et al., 1992; Morgan et al., 1997), Myastenia gravis (Lennon et al., 1978; Piddlesden et al., 1996) und Multiple Sklerose (Piddlesden et al., 1994; Williams et al., 1994) sowie Organabstoßungen bei Transplantationen oder Xenotransplantationen (Baldwin et al., 1995; Dalmasso, 1997). Die Gruppe der Inkompatibilitäten gegenüber Biomaterialien wurde beschrieben gegenüber Operationsmaterial bei einem cardiopulmonalen Bypass (Craddock et al., 1977; Mollnes, 1997), bei Ablagerungen von Blutplättchen (Gyongyossy-Issa et al., 1994) und bei Durchführung einer Hämodialyse (Cheung et al., 1994; Mollnes, 1997).

Eine reduzierte Proteinkonzentration eines Komplementproteins oder Mutationen, die zu einem völligen Verlust des Proteins führen, sind ursächlich für viele Komplementassoziierte Krankheiten. Bei Faktor I-Defizienz resultiert ein sehr niedriger Gehalt an C3 und der in der Kaskade folgenden Komplementproteine im Blut. Dieses führt zu diversen Krankheiten, wie z.B. zu einer monatlichen Meningitis, die assoziiert mit der Menstruation auftritt (Gonzalez-Rubio *et al.*, 2001). Faktor H-Defizienz durch Gen-Mutation ist mit dem hämolytisch-urämischen Syndrom assoziiert (Zipfel *et al.*, 2001). Eine eingeschränkte Aktivität in der klassischen Aktivierung durch Mangel an C1, C2 oder C4 führt z.B. zur erhöhten Disposition gegenüber Systemischem Lupus Erythematodes (Morgan und Walport, 1991). Bei Mangel einer Komponente aus der alternativen Aktivierung, wie z.B. Faktor B oder Faktor D, tritt eine erhöhte Infektionsanfälligkeit auf (Morgan und Walport, 1991).

## 1.2.2 Komplement-Inhibitoren

Komplement-assoziierte Krankheiten treten sowohl bei einer gesteigerten als auch einer verringerten Komplementaktivierung auf. Ist die Regulation gestört oder die Aktivierung verhindert, werden effektive Komplementmodulatoren benötigt.

Die Gruppe der Komplement-Inhibitoren zur therapeutischen Anwendung umfasst Proteine, wie den C1-Inhibitor und die löslichen Komplementregulatoren, sCR1 (*soluble* CR1), sMCP oder sDAF, Antikörper gegen C5 oder C3, und kleinere Moleküle, wie das Peptid Compstatin oder RNA-Aptamere. Einige Komplement-Inhibitoren werden in den klinischen Phasen I, II oder III getestet, wie z.B. der C5-Inhibitor Pexelizumab, ein monoklonaler Antikörper, der bei cardiopulmonalem Bypass eingesetzt wird (Whiss, 2002) oder der lösliche Komplementrezeptor sCR1 (Zimmerman *et al.*, 2000).

Der C1-Inhibitor ist das einzige Plasmaprotein, das in *in vivo*-Studien getestet wurde (Struber *et al.*, 1999; Horstick, 2002). Die Serinprotease ist ein Suizid-Inhibitor der Serpin-Familie, der aktiviertes C1s und C1q durch Bindung an das aktive Zentrum inhibiert (Sim *et al.*, 1979). Die Nachteile dieses Moleküls liegen in der alleinigen Inhibition des klassischen Aktivierungsweges und in der Suszeptibilität des Proteins gegenüber der Inaktivierung durch Elastase, weshalb Elastase-resistente C1-Inhibitor- Mutanten generiert wurden (Eldering *et al.*, 1993).

Zu den rekombinanten Komplement-Inhibitoren gehören die löslichen Regulatoren wie sCR1, sMCP und sDAF (Christiansen *et al.*, 1996). Dabei fungiert der lösliche Komplementrezeptor sCR1 als C3- und C5-Konvertase-Inhibitor und wurde in diversen Tiermodellen wie z.B. für Myastenia gravis (Piddlesden *et al.*, 1996), Multiple Sklerose (Piddlesden *et al.*, 1994) oder Asthma (Regal *et al.*, 1993) erfolgreich getestet. Die relativ kurze Halbwertszeit von ca. 8 h *in vivo* konnte durch veränderte Expressionsbedingungen auf bis zu 70 h erhöht werden, wobei die erhöhte Halbwertszeit vermutlich auf ein anderes Glykosylierungsmuster zurückzuführen ist (Weismann *et al.*, 1990; Zimmerman *et al.*, 2000).

Die Komplementrezeptoren MCP und DAF, deren eigentliche Aufgabe es ist, Zellen, auf denen sie exprimiert sind, durch Regulation der Aktivierung des Komplementsystems zu schützen, wirken als lösliche Proteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Komplement-Inhibitoren, z.B. im Modell der reversen passiven Arthus-Reaktion (Moran *et al.*, 1992; Christiansen *et al.*, 1996). Dabei beschleunigt sDAF den Zerfall sowohl der klassischen als

auch der alternativen C3- und der C5-Konvertasen, wirkt jedoch nicht als Kofaktor für die Spaltung durch Faktor I (Kinoshita *et al.*, 1985). Dagegen wirkt sMCP als Kofaktor für die Spaltung von C3b und C4b durch Faktor I, jedoch nicht auf die Konvertasen (Liszewski und Atkinson, 1992).

Ein effektiverer Inhibitor konnte durch eine Fusion aus MCP und DAF erhalten werden. Das Fusionsprotein, bezeichnet als *Complement activation blocker–2* (CAB-2), vereint beide inhibitorische Eigenschaften und verhindert besser als die einzelnen Proteine die passive Arthus-Reaktion (Higgins *et al.*, 1997). Ein großer Nachteil des Fusionsproteins ist die Generierung neuer Epitope, die eine Immunantwort auslösen könnten und daher nur eine einmalige Anwendung ermöglichen.

Protectin (CD59) ist ein weiteres Membranprotein, welches körpereigene Zellen vor MACmediierter Schädigung schützt. Es bindet an C5b-8 und verhindert, dass durch die Bindung von C9 in der Membran eine Pore ausgebildet wird (Davies, 1996). Sein lösliches Pendant, sCD59, zeigte Inhibition *in vitro* (Sugita *et al.*, 1994).

Eine weitere große Gruppe der Komplement-Inhibitoren setzt sich aus Antikörpern zusammen, wobei besonders C5 ein attraktives Zielprotein ist, da es in deutlich geringeren Konzentrationen im Serum vorliegt als C3. Monoklonale Antikörper verbinden die Vorteile von Spezifität und hoher Affinität mit einer relativ langen Halbwertszeit und einer einfachen Produktion größerer Mengen. Eine Vorraussetzung für die therapeutische Applikation ist der humane Ursprung der Antikörper, um eine Immunantwort, z.B. die humane anti-Maus-Antikörper-Antwort (HAMA), zu verhindern. Diverse monoklonale Antikörper wurden in verschiedenen Tiermodellen, wie z.B. für Nephritis (Wang *et al.*, 1996), kollagen-induzierte Arthritis (Wang *et al.*, 1995), myocardiale Ischämie und Reperfusion (Vakeva *et al.*, 1998) getestet. Des weiteren wurden Antikörper gegen C3 (Kemp *et al.*, 1994), C3a (Burger *et al.*, 1988; Elsner *et al.*, 1994) oder gegen C5a (Ames *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1999) identifiziert.

Anaphylatoxin-Rezeptor-Antagonisten (Konteatis *et al.*, 1994; Pellas *et al.*, 1998; Heller *et al.*, 1999) und RNA-Aptamere, die die C5-Spaltung inhibieren (Biesecker *et al.*, 1999), gehören zu der Gruppe der Komplement-Inhibitoren mit geringem Molekulargewicht. Sie sind meist kosteneffizient und gut gewebegängig. Compstatin, ein C3-Inhibitor, bindet an natives C3 und verhindert seine Spaltung in C3b. Durch Applikation von Compstatin konnte die hyperakute Abstoßung des Transplantats in einer *ex-vivo* Schwein-zu-Mensch-Lebertransplantation verhindert werden (Fiane *et al.*, 1999a; Fiane *et al.*, 1999b).

## 1.3 Der Cobra Venom Factor

Cobra Venom Factor (CVF) ist ein potenter Komplementmodulator natürlichen Ursprungs. Er ist ein 149 kDa schweres Glykoprotein aus dem Gift der Kobra-Spezies *Naja, Ophiophagus* und *Hemachatus* (Müller-Eberhard und Fjellström, 1971). Das nicht-toxische Protein besteht aus drei Ketten, der  $\alpha$ -Kette mit 68 kDa, der  $\beta$ -Kette mit 48 kDa und der  $\gamma$ -Kette mit 32 kDa, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Zusätzlich gibt es im nativen CVF noch eine intramolekulare Disulfidbrücke in der  $\alpha$ -Kette und sechs weitere intramolekulare Disulfidbrücken in der  $\beta$ -Kette (Vogel *et al.*, 1996). Die  $\gamma$ -Kette kann aufgrund unterschiedlicher Prozessierung am C-Terminus unterschiedliche Größen aufweisen (Vogel und Müller-Eberhard, 1984). In Form von komplexen, N-gebundenen Oligosaccharidketten sind zwei Kohlenhydratreste an die  $\alpha$ -Kette und einer an die  $\beta$ -Kette gebunden (Vogel und Müller-Eberhard, 1984; Grier *et al.*, 1987).

Die prozentuale Zusammensetzung der Sekundärstruktur von CVF konnte durch Circulardichroismus bestimmt werden. Sie weist hohe Analogie zu der Zusammensetzung der Sekundärstrukturen des dreikettigen humanen C3-Derivat C3c auf. Für CVF wurden 11% Helices, 47%  $\beta$ -Faltblattstrukturen und 18%  $\beta$ -Schleifen bestimmt. Im C3c-Molekül liegen ebenfalls 11% Helices und 47%  $\beta$ -Faltblattstrukturen vor, dagegen besteht human C3 aus 24% Helices und 32%  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Vogel *et al.*, 1984).

In der Primärstruktur des prä-pro-CVF wird zuerst die  $\alpha$ -Kette, dann die  $\gamma$ -Kette und anschließend die  $\beta$ -Kette codiert (Abb. 5). Am C-Terminus der  $\alpha$ -Kette befinden sich 4 Argininreste, gefolgt von einer C3a-homologen Region. Nach den  $\gamma$ -Kette folgt eine C3d-homologe Region. Posttranslational werden neben dem Signalpeptid auch die Argininreste und die C3a- und C3d-homologen Regionen entfernt, wodurch dann die dreikettige Struktur entsteht. Die *Venom*-Protease, die vermutlich für diese Modifikation verantwortlich ist, spaltet auch C3 in eine CVF-ähnliche Struktur (O'Keefe *et al.*, 1988).



Abb. 5. Schematische Darstellung des prä-pro-CVF-Proteins.

CVF weist auf Proteinebene zu Kobra C3 (coC3) eine Identität von 85% und eine Ähnlichkeit von 92% auf, zu humanem C3 besteht immerhin noch eine Identität von 51% und eine Ähnlichkeit von 70% (Fritzinger *et al.*, 1992; Fritzinger *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1996). Die beiden Proteine weisen zudem gleichartige Kettenstrukturen auf (Abb. 6).



Abb. 6. Vergleichende Darstellung der Kettenstrukturen von humanen C3 und CVF. Die dargestellten C3-Domänen C3a und C3d sind in der dreikettigen Struktur von nativem CVF nicht mehr vorhanden.

Diese hohe Ähnlichkeit zeigt sich auch darin, dass CVF, genau wie C3b, an Faktor B binden kann und durch die Faktor D-initiierte Spaltung von B in Bb und Ba eine Konvertase bildet (Abb. 7). Im Gegensatz zu C3Bb ist die CVF-abhängige Konvertase CVFBb jedoch eine C3- und C5-Konvertase. Durch die Resistenz von CVFBb gegenüber Faktor H und Faktor I entsteht eine Konvertase mit einer unter physiologischen Bedingungen viel höheren Halbwertszeit von 7 h (Vogel und Müller-Eberhard, 1982). C3bBb besitzt dagegen eine Halbwertzeit von 1,5 min (Medicus *et al.*, 1976).

Die C3a- und C3d-homologen Bereiche werden im Laufe der posttranslationalen Modifikation in der Giftdrüse der Kobra entfernt.



#### Abb. 7. Bildung der CVF- und C3-abhängigen Konvertasen.

Durch Bindung von Faktor B an CVF oder C3 entstehen nach Abspaltung von Ba durch Faktor D in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  die C3-Konvertasen, die C3 zu C3b und C3a spalten können (nach Vogel *et al.*, 1996).

Ergänzend zu der erhöhten Stabilität spaltet die CVF-abhängige Konvertase CVFBb C3 und C5 auch in Flüssigphase, während die C3-abhängige Konvertase C3bBb nur gebunden an der Zelloberfläche aktiv ist (Vogel *et al.*, 1996). All diese Eigenschaften vereinend führt CVF im humanen Serum zu einer permanenten Aktivierung des Komplementsystems und zu der daraus resultierenden Dekomplementierung.

#### 1.3.1 Anwendungen von Cobra Venom Factor

Aufgrund der dekomplementierenden Eigenschaft von CVF eröffnet sich ein breites Anwendungsspektrum. Nach einer Dekomplementierung nimmt die Synthese der Komplementproteine ca. 7 Tage in Anspruch; während dieser Zeit kann z.B. die Funktion des Komplementsystems bei der Immunantwort *in vivo* und bei der Pathogenese von Krankheiten untersucht werden (Cochrane *et al.*, 1970; Ryan *et al.*, 1986).

Als nicht-humanes Protein ist CVF immunogen. Es besitzt Glykostrukturen mit terminalen Galaktosylresten, die eine starke Immunantwort auslösen (Taniguchi *et al.*, 1996). Für eine repetitive Applikation ist CVF daher nicht geeignet und wurde in Tiermodellen nur temporär eingesetzt. Beispiele hierfür sind Lebertransplantationen von Meerschweinchen zu Ratten (Chrupcala *et al.*, 1994; Chrupcala *et al.*, 1996), Herztransplantationen von Ratten zu Mäusen (Lin *et al.*, 2000), oder Inselzellen-Transplantationen von Ratten zu

Mäusen (Oberholzer *et al.*, 1999). In allen drei Fällen konnte die hyperakute Abstoßung des Transplantates durch CVF verhindert werden.

Ein weiterer Ansatz ist die Fusion von CVF mit monoklonalen Antikörpern, die gegen Tumorzellen-Oberflächenantigene gerichtet sind, um so in Proximität der Zellen eine starke Komplementaktivierung zu erreichen, die Resistenz der Tumorzellen zu überwinden und diese zu lysieren (Vogel *et al.*, 1985; Petrella *et al.*, 1987; Vogel, 1988).

#### 1.3.2 Struktur-Funktionsanalyen des rekombinanten CVF

Der rekombinant in Insektenzellen exprimierte CVF hat im Gegensatz zum nativen CVF (nCVF) neben einer einkettigen Struktur überwiegend eine zweikettige C3-ähnliche Struktur (Abb. 8), weist jedoch eine vergleichbare Aktivität auf (Kock, 1996).



**Abb. 8. Strukturelle Gegenüberstellung von nativen und rekombinanten CVF.** Schematische Abbildung der nativen dreikettigen Struktur und der zweikettigen C3ähnlichen Struktur des rekombinanten CVF.

Für das Design eines therapeutisch einsetzbaren CVF durch Austausch funktionell nicht relevanter Bereiche gegen humanes C3 werden Informationen über Struktur-Funktionsbeziehungen des Moleküls benötigt.

Erste Untersuchungen des CVF-Moleküls wurden durch den Austausch von Segmenten gegen coC3 durchgeführt. Dazu wurden fünf Hybride generiert, in Insektenzellen

exprimiert und chromatografisch gereinigt (Wehrhahn, 2000). Die anschließende Charakterisierung zeigte, dass die CVF- $\alpha$ -Kette ohne Aktivitätsverlust gegen coC3 ausgetauscht werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass der C-Terminus in die C5-Bindung involviert ist (Wehrhahn, 2000). Diese Ergebnisse bestätigten, dass der C-Terminus des Moleküls für die C5-Bindung entscheidend ist, zumal eine Fusion mit einem C-terminalen His-tag zu einem Verlust der C5-Konvertase-Aktivität führt (Kock, 1996).

## **1.4 Humanisierung von Proteinen**

Beim therapeutischen Einsatz nicht-humaner Proteine resultiert eine Immunantwort (Schroff *et al.*, 1985; Shawler *et al.*, 1985). Eine repetitive Applikation kann infolgedessen schwere allergische Reaktionen auslösen. Daher wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, therapeutisch relevante murine oder rodente Antikörper zu humanisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass vollständige Antikörper mit einem murinen  $F_c$ -Teil immunogener sind als  $F(_{ab'})_2$  alleine. Ein Großteil der Immunantwort wird somit von dem  $F_c$ -Teil ausgelöst (Kuus-Reichel *et al.*, 1994). Chimäre Antikörper, die murine Fab-Fragmente mit humanen  $F_c$ -Regionen verknüpfen, wurden generiert (Morrison *et al.*, 1984; Boulianne *et al.*, 1984). Solche Antiköper sind zu ca. 65-75% human, beinhalten zudem ausgeprägtere Effektorfunktionen und sind leicht darzustellen. Appliziert man chimäre Antikörper in höheren Dosen, resultiert eine reduzierte, aber noch relevante Immunantwort (Bruggemann *et al.*, 1989), die gegen die variable Region gerichtet ist (LoBuglio *et al.*, 1989). Verschiedene chimäre Antikörper werden therapeutisch eingesetzt; unter anderem findet zur Verhinderung einer Abstoßung bei Transplantationen ein anti-CD25-Antikörper Antwendung und ein anti-TNF $\alpha$ -Antikörper wird bei rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn eingesetzt.

Da eine Vielzahl von Antikörpern sehr gut charakterisiert ist und auch strukturelle Informationen zur Verfügung stehen, wurden bessere Methoden der Humanisierung entwickelt. Dazu gehört das *Grafting*, die Verpflanzung der nicht-humanen hypervariablen Regionen in ein vollständig humanes Gerüst (Riechmann *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1986) und das *Resurfacing*, die Veränderung mehrerer Aminosäurereste auf der Oberfläche (Roguska *et al.*, 1994). CDR-Grafting ist durchführbar, da die Dömanenstruktur der Antikörper zwischen den Spezies konserviert ist und ermöglicht ebenfalls die Auswahl der Effektorfunktionen, z.B. IgG1 oder IgG3. Die Affinität zum Antigen bleibt weitgehend erhalten, wenn man ein humanes *Framework* mit einer großen Identität zu dem nicht-humanen Antikörper wählt, wie an einem anti-CD4-Antikörper gezeigt werden konnte (Gorman *et al.*, 1991). Ein durch *Grafting* humanisierter Antikörper ist ca. 90-95% human und löst keine detektierbare Immunantwort aus (Riechmann *et al.*, 1988; Hale *et al.*, 1988). Mehrere humanisierte monoklonale Antikörper sind in den USA therapeutisch zugelassen, darunter ein anti-CD25-Antikörper und ein Antikörper gegen den Her2/Neu-Rezeptor, welcher in der Therapie bei metastasierendem Mammakarzinom eingesetzt wird.

Durch den Vergleich von mehreren Kristallstrukturen und Sequenzdaten vieler Antikörper wurde ein humanes Aminosäure-Muster auf der Oberfläche von Antikörpern gefunden, welches sich von einem murinen Muster unterscheidet. Aus diesen Informationen entwickelte sich ein Prozess, das *Resurfacing*, bei dem äußere Aminosäurereste mutiert werden, um einem humanen Muster zu genügen. Die so humanisierten Antikörper, z.B. anti-CD19- und anti-CD56-Antikörper oder der Karzinom-spezifische Antikörper B3 zeigen gleiche Affinität (Roguska *et al.*, 1994) und einen Verlust der immunogenen Epitope (Benhar *et al.*, 1994).

Die Generierung transgener Mäuse mit humanen Keimbahngenen (Bruggemann *et al.*, 1991; Mendez *et al.*, 1997) und die Etablierung humaner Antikörper-Fragment-Bibliotheken und deren Selektion mit Hilfe des *Phage Display*-Systems erlauben den Erhalt vollständig humaner Antikörper.

Die Humanisierung von Enzymen ist komplizierter und nur durchführbar, wenn ein humanes Homolog zur Verfügung steht. Die für die Funktion relevanten Bereiche eines Proteins müssen identifiziert sein, so dass ein Austausch dieser Regionen in einem humanen Protein mit hoher Identität möglich ist.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Entwicklung humanisierter Komplementverbrauchender Proteine auf der Grundlage des Komplementmodulators *Cobra Venom Factor* angestrebt werden. Voraussetzung für eine solche Humanisierung ist jedoch eine detaillierte Kenntnis der Struktur-Funktionsbeziehungen des CVF- und des humanen C3-Moleküls, die durch einen Austausch von Proteinbereichen im CVF gegen homologe humane C3-Regionen erhalten werden sollte. Hierfür sollten verschiedene hybride Konstrukte aus CVF und humanem C3 generiert und in geeigneten Systemen exprimiert werden. Die rekombinanten Proteine sollten dargestellt und auf ihre C3-Konvertase-Aktivität untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Hybride sollten dann für die Entwicklung neuer Konstrukte eingesetzt werden, wobei der Anteil von CVF weiter reduziert werden sollte. Resultierend aus diesen Daten sollte ein humanisiertes CVF generiert werden, welches therapeutischen Applikationen zugänglich gemacht werden kann.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien und Reagenzien wurden bei Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Leek, Niederlande), Biomol Feinchemikalien (Hamburg), Gibco BRL (Eggenstein), Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Millipore (Eschborn), Calbiochem (Schwalbach) und Peqlab (Erlangen) bezogen.

### 2.1.2 Enzyme, Proteine und Antikörper

Restriktionsenzyme, *Mung Bean* Nuklease, T4-Ligase, *Calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) und die dazugehörigen Puffer wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und von NEB (Frankfurt) bezogen. *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase wurde von AGS (Heidelberg) oder von Roche (Mannheim) bezogen. Lysozym wurde ebenfalls von Roche (Mannheim) gekauft. RNase wurde von Sigma bezogen (Taufkirchen).

*Cobra Venom Factor* (CVF), der aus dem Gift der indischen Kobra (*Naja kaouthia*) gereinigt wurde und gereinigter Faktor B wurden von Patrick Ziegelmüller zur Verfügung gestellt. Gereinigter Faktor H war im Arbeitskreis vorhanden. Gereinigtes humanes C3 wurde von Calbiochem (Schwalbach) erworben. Faktor D wurde bei Sigma (Taufkirchen) bezogen. Strep-Tactin wurde bei IBA (Göttingen) gekauft.

Antiseren gegen C3, CVF, Faktor H und Faktor B aus Kaninchen bzw. Ziege waren vorhanden, sie wurden vor ihrem Gebrauch mit Ammoniumsulfat gefällt. Außerdem wurde ein Antiserum gegen C3 aus Ziege von Cappel (Eschwege) gekauft. Ein monoklonaler Antikörper gegen C3d wurde von Quidel (Heidelberg) erworben. Ketten-spezifische

polyklonale Antiseren gegen die CVF  $\alpha$ -,  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Kette wurden von Patrick Ziegelmüller zur Verfügung gestellt. Anti-human IgG ( $\gamma$ -Ketten spezifisch)-Antikörper wurde von Sigma (Taufkirchen), anti-Myc-Antikörper (9E10) von Invitrogen (Karlsruhe) und anti-M13-Antikörper von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Der monoklonale anti-Strep-tagII Antikörper wurde von IBA (Göttingen) bezogen. Die sekundären Antikörper anti-Kaninchen, anti-Maus oder anti-Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase, wurden ebenfalls bei Sigma (Taufkirchen) oder Cappel (Eschwege) erworben.

## 2.1.3 Affinitätsmatrices und Partikel

Ni-NTA-Agarose wurde von Qiagen (Hilden) bezogen. Strep-Tactin-Sepharose wurde von IBA (Göttingen) und Protein A/G-Agarose von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Kalifornien, USA) bezogen.

## 2.1.4 Bakterien- und Hefestämme

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  (Promega, Mannheim) wurde für die Amplifikation von Plasmiden verwendet. HB2151 und TG1 wurden für die Arbeiten mit Antikörper-Bibliotheken, sowie für die rekombinante Expression der Antikörper verwendet. In Tabelle 1 sind die Genotypen der Stämme aufgelistet. Die verwendete Hefe *Pichia pastoris* (Stamm GS115) wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

<b>DH5</b> α	F <sup>-</sup> , endA1, gryA96, thi-1 hsdR17 ( $r_{K}$ , $m_{K}$ <sup>+</sup> ), supE44, relA1. Φ80ΔlacZΔM15, Δ
	(lacZYA-argF), U169
HB2151	Nalr thi-1 ara (lac-proAB(F <sup>-</sup> proAB+laciq lacZ(M15)))
TG1	SupE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK-mK-) [F' traD36 proAB
	LacIqZ $\Delta$ M15

Tabelle 1. Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.

## 2.1.5 Vektoren

Die verwendeten kommerziell erworbenen Vektoren sind aufgelistet. Die im Arbeitskreis vorhandenen und nicht kommerziell erhältlichen Vektoren sind in den Abb. 9-12 dargestellt.

### pUC18

Der Vektor pUC18 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurde für die Klonierung verwendet.

### pEGFP-N1

Der Vektor pEGFP-N1 (Clontech, Heidelberg) wurde bei der Transfektion von mammalen Zelllinien verwendet, um die Transfektionseffizienz zu bestimmen.

### pcDNA3

Der Vektor pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande) wurde für die eukaryontische Expression von Proteinen verwendet.

## pUC18CVF\* /pcDNA3CVF

Die Plasmide pUC18CVF\* und pcDNA3CVF enthalten die cDNA von CVF (Genbank Eingangsnummer U09969). In pUC18CVF\* wurde eine BglII-Schnittstelle an der Position 1793 (Mutation A1797C) eingeführt und eine HindIII-Schnittstelle an der Position 2380 (A2380T, G2381C) deletiert. Das Plasmid pcDNA3CVF wurde von Patrick Ziegelmüller zur Verfügung gestellt (Abb. 9).



Abb. 9. Vereinfachte Vektorkarten von pUC18CVF\*und pcDNACVF

## pUC18hC3/pcDNA3hC3

Die Plasmide enthalten die cDNA von humanem C3 (Abb. 10).



Abb. 10. Vereinfachte Vektorkarten von pUC18hC3 und pcDNA3hC3

pHen2

Der Vektor pHen2 wurde von dem Center of Protein Engineering (MRC, Cambridge, Großbritannien) zur Verfügung gestellt (Abb. 11).



Abb. 11. Vereinfachte Vektorkarte von pHen2

 $pcDNA3IgGFc-scFv/\ pPiCZ\alpha AIgGFc-scFv$ 

Die Vektoren pcDNA3IgGFc-scFv und pPiCZαAIgGFc-scFv enthalten eine geeignete Signalsequenz, anschließend folgt eine Expressionskassette, bestehend aus scFv und den

konstanten Regionen des IgG-Fc-Fragmentes (Spillner, 2002). Sie wurden von Edzard Spillner zur Verfügung gestellt (Abb. 12).



Abb. 12. Vereinfachte Vektorkarten von pcDNA3IgGFc-scFv und pPiCZaCIgGFc-scFv

#### 2.1.6 Bibliotheken und Helfer-Phagen

Die verwendete synthetische humane scFv-Bibliothek Griffin-1 wurde von dem Center of Protein Engineering (MRC Cambridge, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

Der für die Selektion verwendete Helfer-Phage M13K07 wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) erworben. Der Helfer-Phage pKM13 wurde vom Center of Protein Engineering (MRC Cambridge, Großbritannien) zu Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten und eingestellten Helfer-Phagen wurden von Susanne Deckers und Edzard Spillner zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Zelllinien und Kultur

GMEM-, DMEM-Medium, Penicillin G, Streptomycin, Geneticin und Trypsin/EDTA wurden von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Adenosin, Guanosin, Cytosin, Uracil, Thymidin, L-Asparaginsäure, und L-Glutaminsäure wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Zellkulturflaschen wurden bei Greiner (Frickenhausen), Nunc (Wiesbaden) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Fötales Kälberserum wurde bei Biochrom (Berlin) gekauft.

Die Zelllinien CHO, COS-7 und HEK293 wurden für die Expression verwendet. CHO-Zellen wurden in GMEM mit 10% FKS und anderen Zusätzen kultiviert. HEK293 und COS-7-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS kultiviert.

## 2.1.8 Lösungen

10x D	$\begin{array}{c} 200 \ g \\ ad \ 1 \ l \ ddH_2O \end{array}$	D-Glucose
10x YNB	34 g 100 g ad 1 l ddH <sub>2</sub> O,	YNB ( <i>Yeast nitrogen base</i> ) Ammoniumsulfat steril filtrieren
500x B	20 mg ad 100 ml steril filtrierer	Biotin ddH <sub>2</sub> O
ACD-Lösung	23 mM 45 mM 74 mM	Natriumcitrat Trinatriumcitrat Glucose
Breaking Buffer	50 mM 1 M 5%	Natriumphosphat (monobasisch), pH 7,4 EDTA Glycerin
BCIP-Stocklösung	0,5 % (w/v)	BCIP in DMF
CAPS-Puffer	20 mM 10%	CAPS, pH 11,0 Methanol
Citratpuffer	50 mM	Citronensäure, pH 4,0
Coomassie-Entfärber	45% (v/v) 10% (v/v)	Methanol Eisessig
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) 45% (v/v) 10% (v/v)	Coomassie Brillant Blue R-250 Methanol Eisessig

Detektionspuffer (für AP)	0.1 M 4 mM pH 9,5	Tris-HCl MgCl <sub>2</sub>	
Detektionspuffer (für POD)	3,3 mg 15 ml 26,5 μl	ABTS Citratpuffer, pH 4,0 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	0,26 M 0,6% (v/v)	Natriumcarbonat Formaldehyd (37%ig)	
Färbelösung (Silberfärbung)	6 mM 0,6% (v/v)	Silbernitrat Formaldehyd (37%ig)	
Fixierlösung (Silberfärbung)	30% (v/v) 10% (v/v)	Ethanol Eisessig	
FKS	30 min bei 56° C hitzeinaktivieren, Lagerung in 50 ml Aliquots bei –20° C		
G418-Stocklösung (40 mg/ml)	0,4 % (w/v) steril filtrieren	0,4 % (w/v) G418 in HEPES (100 mM), pH 7,4 steril filtrieren, Lagerung bei –20° C	
G+A	600 mg 600 mg ad 100 ml ddH steril filtrieren	L-Asparagin L-Glutaminsäure I <sub>2</sub> O n, Lagerung bei 4° C	
Glucose (20%)	20% steril filtrieren	Glucose	
Glycin-Elutionspuffer	50 mM	Glycin, pH 3,0	
GVBS <sup>++</sup>	0,1% in VBS <sup>++</sup> , bei	Gelatine 50° C lösen, Lagerung bei 4° C	
Inkubationslösung (Silberfärbung)	25% (v/v) 14 mM 0,5 M 0,5% (v/v)	Ethanol Natriumthiosulfat Natriumacetat Glutardialdehyd (25%)	
Inkubationspuffer	0,1 M	NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5	
Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6,0)	132 ml 868 ml	1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

Loading Dye (6x)	20% (w/v) 100 mM 0,025% (w/v) 0,025% (w/v)	Ficoll 400 EDTA Bromphenol-Blau Xylenxyanol FF
Lösung I	50 mM 25 mM 10 mM autoklavieren,	Glucose Tris-HCl, pH 8,0 EDTA Lagerung bei 4° C
Lösung II	0,2 M 1%	NaOH SDS
Lösung III	3 M 11,5% autoklavieren,	Kaliumacetat Essigsäure Lagerung bei 4° C
NBT-Stocklösung	0,1% (w/v)	NBT in 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5
Nukleoside	175 mg 175 mg 175 mg 175 mg 60 mg ad 500 ml dH <sub>2</sub> steril filtrieren	Adenosin Guanosin Cytosin Uracil Thymidin O
PBS (5x)	68,4 mM 13,4 mM 7,3 mM 40 mM pH 7,4	NaCl KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,
PEG/NaCl-Lösung	20% 2,5 M	PEG 6000 NaCl
Phenol/Chloroform	50% (v/v) 50% (v/v)	Phenol (Tris gesättigt) Chloroform
Probenpuffer (4x)	250 mM 8% (w/v) 40% (v/v) 0,004% (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin Bromphenolblau
Puffer E	100 mM 150 mM 2,5 mM	Tris NaCl, pH 8,0 Desthiobiotin

Puffer W	100 mM 150 mM	Tris NaCl, pH 8,0
Puffer R	100 mM 150 mM 1 mM	Tris NaCl, pH 8,0 4-Hydroxyazobenzen-2-carboxylsäure
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M 0,4% pH 6,8	Tris-HCl SDS
SDS-Stocklösung	10% (w/v)	SDS
Stoplösung (Silberfärbung)	50 mM	EDTA
TAE-Puffer (50x)	2 M 20% pH 8,0	Tris-Acetat 0,5 M EDTA
Tankpuffer (1x)	25 mM 192 mM 0,1%	Tris-HCl Glycin SDS
TBS (5x)	100 mM 250 mM pH 7,5	Tris Natriumchlorid
TBST	0,05% (v/v)	Tween 20 in TBS
TES-Puffer	0,2 M 0,5 mM 0,5 M	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA Saccharose
Trenngelpuffer (4x)	150 mM 0,4% pH 8,8	Tris-HCl SDS
Tris-HCl pH 9,5	100 mM 4 mM pH 9,5	Tris MgCl <sub>2</sub>
VBS	2,5 mM 143 mM pH 7,4	Natrium-5,5-Diethylbarbitursäure NaCl
VBS <sup>++</sup>	0,15 mM 0,75 mM in VBS, pH 7,	CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub> 4

Waschnuffer	0.1% (y/y)	Tween 20 in PBS
waschpuller	0,1/0(v/v)	I ween 20 m F DS

## 2.1.9 Medien

BMGY-, BMMY-Medium	10 g	Hefe-Extrakt	
	20 g	Pepton	
	ad 700 ml	ddH <sub>2</sub> O	
	autoklavieren		
	100 ml	1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0	
	100 ml	10x YNB	
	2 ml	500x B	
(BMMG:	100 ml	10% Glycerol, steril filtriert)	
(BMMY:	100 ml	10% Methanol, steril filriert)	
GMEM-Medium	50 ml	BHK21 Medium 10x (Glasgow MEM)	
(ohne FKS)	18,1 ml	Natrium-Bicarbonat, 7,5%ig	
	5 ml	G+A	
	10 ml	Nukleoside	
	5 ml	Natriumpyruvat, 100 mM	
	5 ml	NEAA (Non-essential amino acids, 100x)	
	450 ml	ddH <sub>2</sub> O	
	steril filtrierer	(0.2 um. Surfactant-free cellulose acetate-	
	Filtereinheiter	n. Nunc. Wiesbaden)	
		_, _ , _ , _ , _ , _ , _ , _ , _ , _ ,	
GMEM-Medium	50 ml	BHK21 Medium 10x	
(mit FKS)	18,1 ml	Natrium-Bicarbonat, 7,5%ig	
,	5 ml	G+A	
	10 ml	Nukleoside	
	5 ml	Natriumpyruvat, 100 mM	
	5 ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung	
	5 ml	NEAA (100x)	
	400 ml	ddH <sub>2</sub> O	
	50 ml	FKS	
	steril filtrierer	n (0.2 µm, Surfactant-free cellulose acetate-	
	Filtereinheiten, Nunc, Wiesbaden)		
		, , , ,	
LB-Medium	10 g	NaCl	
	5 g	Hefe-Extrakt	
	10 g	Bacto-Trypton	
	ad 1 l dd $H_2O$ ,	autoklavieren	
LB-Agar	10 g	NaCl	
č	5 g	Hefe-Extrakt	
	10 g	Bacto-Trypton	
	15 g	Agar	
	ad $11 ddH_2O$ ,	autoklavieren	
TSS-Lösung		85% (v/v) 10% (w/v) 5% (v/v) 50 mM autoklavieren	LB-Medium PEG 8000 DMSO MgCl <sub>2</sub> , pH 6,5
-------------	------	--	---
YPD-Medium		10 g 20 g ad 900 ml ddF 100 ml 10x D	Hefe-Extrakt Pepton I <sub>2</sub> O, autoklavieren
YDP-Platten		10 g 20 g 20 g ad 900 ml ddF 100 ml 10x D	Hefe-Extrakt Pepton Agar I <sub>2</sub> O, autoklavieren
2YT-Medium		5 g 10 g 16 g ad 1 1 ddH2O	NaCl Hefe-Extrakt Bacto-Trypton autoklavieren
	(AK:	100 μg/ml	Ampicillin
	(AG:	50 μg/ml 100 μg/ml 0,1%	Kanamycin) Ampicillin Glucose)
TYE-Platten	(1.5	5 g 10 g 16 g 15 g ad 1 1 ddH <sub>2</sub> O,	NaCl Hefe-Extrakt Bacto-Trypton Agar autoklavieren
	(AG:	100 μg/ml 0,1%	Ampicillin Glucose)

## 2.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert (Tabelle 2).

Name	Sequenz 5'-3'	Zielsequenz	Mutationen/ Überhänge/ Schnittstellen
AJS01	GGATCCAGGTGCTCGGGTTGG	CVF (1710-1736)	Seminitistenen
AJAS04	CATAAATATCCTCGTTAACGTAGTTG	CVF (2539-2511)	
S01	CTGCTGACTAGTGCGGCCGCTATAAA	hC3 (1-20)	Kozak-Sequenz, Notl Spel
AS03	AGTACCTTCCGGCTCAGCACAACCTC	hC3 (920-894)	Noti, Sper
S08/HpaI	GCACAACTACGTTAACGAGGATATTT	CVF (2511-2539)	
AS09/	TTTTGCTCGAGGGTCCAGTTTAACAA	CVF (2808-2781)	A2799T,A2800C,
XhoI	ТА	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	G2802A
S10/XhoI	TATTGTTAAACTGGACCCTCGAGCAA AA	CVF (2781-2808)	A2799T,A2800C, G2802A
AS11/ MupI	TCCATCAATTGAGTTTTCAATAATCTG	CVF (2943-2902)	T2904G
S12/	TCAGATTATTGAAAACTCAATTGATG	CVF (2916-2943)	
MunI	GA		
AS13b/ SacII	GGTCCGCGGCAGCCAAAGCATAGGCT GTGAGGGC	CVF (3553-3520)	T3546C
S14b/	GCCCTCACAGCCTATGCTTTGGCTGC	CVF (3520-3553)	T3546C
SacII	CGCGGACC		
AS15II/	CATTGTTGCTTTTCCATCACCGCTAGC	CVF (3972-3940)	A3948T,T3949A,
NheI	TGTCAC		C3950G,A3951C
S16II/NheI	GTGACAGCTAGCGGTGATGGAAAAG CAACAATG	CVF (3940-3972)	A3948T,T3949A, C3950G.A3951C
AS17/	TATTCGAAGCAGCTTGGTTTTGTAG	CVF (4596-4572)	,
BstBI			
S18/XhoI/	GGACCTCGAGCAAAAGGAGTTGAAG	hC3 (2901-2943)	XhoI
hC3	GAGTGCAGAAAGAG		
AS19II/Psp	CACAGGGTCCCCTTGCAGGAGAATTC	hC3 (3021-2990)	Psp5II
S23StrepI	CGGAGGTACCATGGAGAGGATGGCT	CVF (2-24)	Kpn I
	CTCTAT		
AS24Strep11	AGAAGACCCTGGAAA	CVF (69-49)	Strep-tag11
S25StrepIII	AGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGCTCT	CVF (70-92)	Strep-tagII
1526		CVE(744,717)	
AS20 StrenIV	CG	CVF(744-717)	
AS32Strep	TCGAACTGCGGGTGGCTCCACCCCAG	hC3(66-48)	Stren-tagII
hC3II	AGCCAGGGGGAGG		Shop agn
S33Strep	AGCCACCCGCAGTTCGAAAAAAGTCC	hC3 (67-90)	Strep-tagII
hC3III	CATGTACTCTATCATCACC		
AS34StrepV	GICTITIICGAACIGCGGGIGGCICC	CVF (69-49)	Strep-tagII, EK
S25Stron VI		CVE (70.02)	Strop togU EV
ssssuepvi	CGATAAAGCTCTCTACACCCTCATCA	(10-92)	Suep-tagii, EK
	CCCC		
AS36StrepV hC3	TCGAACTGCGGGTGGCTCCACCCCAG AGCCAGGGGGGAGG	hC3 (66-48)	Strep-tagII, EK

S37StrepVI	ACCCGCAGTTCGAAAAAGACGATGA	hC3 (67-90)	Strep-tagII, EK
hC3	CGATAAAAGTCCCATGTACTCTATCA		
CATLLAG II	TCACC	1.02 (2(57.2(00))	C II
S47H4SacII	IGGCIGCCGCGGGCAGGCIGAAGGG	hC3 (365/-3680)	Sacii
A \$ 18U1		hC3 (1062 1030)	Nhal
Nhel	GGAGTAA	IIC3(4002-4039)	INIT
S50H8for	TATGTGTACAAAACCAAGCTGCTTCG	CVF (4567-4592)	
AS51H8	TTCTTCTAGATTAAGTAGGGCAGCCA	CVF (4932-4909)	XbaI
back	AACTCAGT		Tiour
AS61His5'	ATGATGATGATGATGATGCCCCAGAG	hC3 (126-108)	6x His-tag, EK
hC3	CCAGGGGGAGG		
S62his5'	CATCATCATCATCATCATGACGATGA	hC3 (151-173)	6x His-tag, EK
hC3	CGATAAAAGTCCCAT		
Lmb3	CAGGAAACAGCTATGAC	pHen vor scFv	
Fdseq	GAATTTTCTGTATGAGG	pHen nach scFv	
S63CvfsfiI	GATCGGCCCAGCCGGCCTTCAGGTAC	5'-Terminus von	SfiI
	AGCTGCAGCAGTC	CVF-44	
S64Cvf1	GATCCGTACGTGTGGGGCAGGTACAGC	5'-Terminus von	BsiWI
BsiWI	TGCAGC	CVF-44	
AS65scFv	GATCGGCGCGCCACCCAGGACGGTCA	3'-Terminus von	AscI
ascI	GCTTG	scFv	
S66C31stop	CAAGAGAGATGAGTGTGTGGGGGCCA	C3-1	Amber-Codon zu
weg	AGGT		Gln
AS67C31	CCCCACACACTCATCTCTCTTGCACA	C3-1	Amber-Codon zu
stopweg	GTAATACAC		Gln
S68C31bsi	GATCCGTACGTGTGGGGCAGGTGCAGC	C3-1	BsiWI
	TGGGGCAG	CLUE 0	
S69CVF8	CGTGTATTACTGTGCAAGACAGGCGA	CVF-8	Amber-Codon zu
stopweg	GGIC	CUT 0	Gin
AS/0CVF8	GICAAAAGCAGACCICGCCIGICCII	CVF-8	Amber-Codon zu
stopweg	GUAUA	2 <sup>2</sup>	GIN
S/ICVF6	GAILLGIALGIGIGGGCAGGIGLAGC	3 - Terminus von	BSIWI
DS1		CVF-29	Steven leve ExcDI
AS/2SCFV	GATUGAATICICATGUGUUUUATIC	5 - Terminus von	Supcodon, EcoRI
stopeco		SUFV	
3 AOA		AUX-Gen	
3 AUX	GCAAAIGGCAIICIGACAICC	AUX-Gen	

Tabelle 2. Liste der verwendeten Oligonukleotide.

## 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt.

#### 2.2.1.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

LB-Medium oder 2YT-Medium (3 ml) mit Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) oder Zeocin (20 µg/ml) wurde mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert (New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen), InnovaTM 4330 refrigerated incubator shaker). Davon wurden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4 min, 15.800 xg, RT). Der Überstand wurde vorsichtig abgesogen und das Pellet durch Vortexen in 100 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben, das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wurde wiederum mehrfach invertiert, für 10 min bei 4° C inkubiert und zentrifugiert (4 min, 20.800 xg, 4° C). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 96% Ethanol gefällt. Nach der Inkubation für 30 min bei 4° C wurde zentrifugiert (30 min, 20.800 xg, 4° C), der Überstand vorsichtig abgesogen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 20.800 xg, 4° C) wurde der Überstand vorsichtig abgesogen und das Pellet für 15 bis 45 min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde dann in 40 µl ddH<sub>2</sub>O mit RNase (6 µl RNase (10 mg/ml) pro ml) aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20° C.

#### 2.2.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit käuflichen Kits

Plasmid-DNA für Klonierungen, Transfektionen oder Sequenzierungen wurde mittels des *NucleoBond*<sup>®</sup> *PC 100 Kits* (Macherey-Nagel, Düren) oder des *E.Z.N.A.*<sup>®</sup> *Plasmid Miniprep II Kits* (Peqlab, Erlangen) aufgereinigt. Die Präparation erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Lagerung der DNA erfolgte bei –20° C.

#### 2.2.1.2 Quantifizierung von DNA

Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde 1:10-1:100 in  $ddH_2O$  verdünnt. In einer Quarz-Küvette wurden 100 µl dieser Verdünnung bei 260/280 nm im Photometer (Ultrospec 3000-Photometer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) vermessen. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 bei 260 nm dem empirischen Wert von 50 µg DNA/ml. Reine DNA sollte ein Verhältnis der OD<sub>260/280</sub> von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

#### 2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Bereichen, die zwischen zwei bekannten Sequenzen liegen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet (Saiki *et al.*, 1988). Zwei zu den bekannten Sequenzen komplementäre DNA-Fragmente dienen als Oligonukleotide. Die Synthese der DNA erfolgte durch die Taq-DNA-Polymerase (AGS Gold-Polymerase, AGS, Heidelberg), eine thermostabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Die PCR-Ansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

1-5 μl	Template
1 μl	Sense-Oligonukleotid (100 µM)
1 μl	Antisense-Oligonukleotid (100 µM)
2,5 μl	dNTPs (12,5 mM)
5 μ <i>l</i>	Enhancer
5 μ <i>l</i>	10x PCR-Puffer komplett mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
<i>0,25</i> μ <i>l</i>	Taq-DNA-Polymerase (1 $U/\mu l$ )
mit $ddH_2O$	$auf 50 \mu l auffüllen$
gegebenen	falls mit 50 µl Mineralöl überschichten (je nach Thermocycler)

Das nachfolgende Programm (Tabelle 3) wurde im Thermocycler (Omnigen HB TR 3, Hybaid, Heidelberg) oder Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Charakterisierung des Amplifikats erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Primärdenaturierung	30 s-1 min	94° C
2. Denaturierung	30 s	94° C
3. Hybridisierung	1-2 min	Von 45° C bis 67° C <sup>*</sup>
4. Elongation	1-2 min	72° C
25-35 Zyklen (Schritt 24.)		
5. Terminale Elongation	5-10 min	72° C

#### Tabelle 3. PCR-Programm.

\* Hybridisierungstemperatur entsprechend 5-10° C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide.

## 2.2.1.4 Hybridisierung-Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Hybridisierungs-PCR wurden Amplifikate mit überlappenden Bereichen miteinander hybridisiert. Nach 4 Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, die eine Hybridisierung und Vervollständigung der beiden Amplifikate ermöglichen, wurde nach der Zugabe der Oligonukleotide eine *Touchdown*-PCR angeschlossen. Die Ansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

3-5 μl	Amplifikat 1
<i>3-5</i> μ <i>l</i>	Amplifikat 2
2,5 μl	dNTPs (12,5 mM)
5 μ <i>l</i>	Enhancer
5 μ <i>l</i>	10x PCR-Puffer komplett mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
<i>0,25</i> μ <i>l</i>	Taq-DNA-Polymerase
mit $ddH_2O$ au	f 48 µl auffüllen
mit 50 µl Mine	eralöl überschichten

Es wurde das nachfolgende Programm im Thermocycler (Omnigen HB TR 3, Hybaid, Heidelberg) durchgeführt (Tabelle 4).

Je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurden die Hybridisierungstemperaturen der *Touchdown*-PCR variiert. Die Charakterisierung des Amplifikats erfolgte mittels der Agarose-Gelelektrophorese.

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	2 min	94° C
2. Hybridisierung der Amplifikate	5 min	37° C
3. Elongation	10 min	72° C
4 Zyklen (Schritt 13.)		
Zugabe von: 1 µl Sense-Oligonukleotid		
1 μl Antisense-Oligonukleotid		
4. Denaturierung	30 s	96° C
5. Hybridisierung	1-2 min	59-55° C
6. Elongation	1-2 min	72° C
5 Zyklen (Schritt 46.) mit in 1° C-Schritten sinkenden		
Hybridisierungstemperaturen		
25 Zyklen (Schritt 46.) bei 55° C		
7. Terminale Elongation	10 min	72° C

Tabelle 4. Programm der überlappenden PCR.

#### 2.2.1.5 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsansätze unterschiedlicher Größe (10 bis 100  $\mu$ l) enthielten ein variables Volumen DNA-Lösung, maximal 10% Restriktionsenzym und 10% des jeweiligen Puffers. Auf das Endvolumen wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Bei einigen Enzymen wurde zusätzlich BSA in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugegeben. Die Reaktion erfolgte mindestens für 1 h, in der Regel jedoch über Nacht bei der optimalen Temperatur des verwendeten Enzyms. Gestoppt wurde die Restriktion durch Zugabe von Loading Dye (6x) oder durch Hitzeinaktivierung.

## 2.2.1.6 Abbau kohäsiver Enden von DNA-Fragmenten

Die bei der Restriktion mit den meisten Enzymen entstehenden kohäsiven Enden können durch die *Mung Bean* Nuklease (New England BioLabs, Frankfurt), die spezifisch einzelsträngige DNA und RNA abbaut, zu stumpfen Enden verkürzt werden. Es wurde 1  $\mu$ l *Mung Bean* Nuklease zur Restriktionsanalyse zugegeben und für 30 min bei 30° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gestoppt.

#### 2.2.1.7 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung endständiger Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten wurden zum Restriktionsansatz 1  $\mu$ l CIAP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei 37° C inkubiert. Nach 30 min wurde erneut 1  $\mu$ l CIAP zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6x Loading Dye oder durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

#### 2.2.1.8 Alkoholpräzipitation der DNA

Zur Restriktionsanalyse wurden 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 200  $\mu$ l eiskaltes 96% iges Ethanol zugegeben und 20 min bei 4° C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (20 min, 20.800 xg, 4° C), der Überstand abgesogen und das Pellet mit 500  $\mu$ l eiskaltem 70% igem Ethanol versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert (15 min, 20.800 xg, 4° C), der Überstand abgesogen und das Pellet für 30 min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde dann in dem gewünschten Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Restriktionsanalyse, Analyse von PCR-Ansätzen und zur präparativen Isolation von DNA-Fragmenten genutzt. Es wurden 1% ige Agarose-Gele (Qualex Gold Agarose, AGS Heidelberg) zur Auftrennung von Fragmenten von 500 bis 12.000 bp Größe sowie 2% ige Agarose-Gele zur Auftrennung von Fragmenten unter 500 bp verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und mit 5  $\mu$ l Ethidiumbromid (1  $\mu$ g/ml) versetzt. Die Proben wurden mit 6x Loading Dye (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Als Standard wurde  $\lambda$ -DNA/Eco130I oder pUC19/MspI (alle MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden bei 90-130 V in einer Elektrophoresekammer in TAE-Puffer aufgetrennt, mittels des Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (302 nm, 90 W, Steiner, Hamburg) sichtbar gemacht und mit einem Videosystem (Intas, Göttingen) dokumentiert.

#### 2.2.1.10 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem *QiaexII Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

#### 2.2.1.11 Ligation

Der für die Ligation verwendete Vektor wurde im Verhältnis 1:1 bis 1:5 zum Insert eingesetzt, wobei das Verhältnis im Agarose-Gel abgeschätzt wurde. Folgende Komponenten wurden für die Ligation zusammen gegeben:

Xμl	Vektor
Yμl	Insert
1 µl	T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
2 µl	10x Ligationspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
	ad 20 $\mu$ lddH <sub>2</sub> O

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16° C im Savant Temperature Cycler (Modell TC49, Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA), anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Reaktion (65° C, 15 min).

#### 2.2.1.12 Herstellung kompetenter DH5α-Zellen

LB-Medium (3 ml) wurde mit DH5 $\alpha$ -Zellen angeimpft und über Nacht bei 37° C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Hiervon wurde 1 ml abgenommen und zu 100 ml LB-Medium gegeben. Diese Kultur wurde unter o. g. Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt, in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation (1° C, 2.000 xg, 10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in je 5 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots (500 µl) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

#### 2.2.1.13 Transformation

Ein Aliquot (500 µl) kompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen wurde 30 min auf Eis aufgetaut und 100 µl davon mit 10-20 µl des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Gemäß der Hitzeschockmethode wurde das Reaktionsgefäß dann für 90 s auf 42° C erhitzt und nachfolgend 2 min auf Eis inkubiert. Zum Ansatz wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, das Wachstum der Zellen erfolgte im Inkubator (220 rpm, 37° C) für 1 h. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1.000 xg, RT). Dem Überstand wurde 1 ml entnommen, das Pellet in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) ausgestrichen. Die Platte wurde invertiert über Nacht bei 37° C inkubiert.

#### 2.2.1.14 Wachstum und Lagerung von Bakterienstämmen

Das Wachstum der Bakterienzellen erfolgte entweder in flüssigem Medium bei 220 rpm und 37° C oder auf LB-Agar-Platten bei 37° C. Die Flüssigkulturen wurden max. 2 Wochen bei 4° C gelagert, die Kulturen auf LB-Agar-Platten wurden abgedichtet max. 4 Wochen bei 4° C gelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien wurden zu 1 ml einer Flüssigkultur 300 µl Glycerin (80%) zugegeben und der Ansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei –80° C.

#### 2.2.1.15 Cycle-Sequenzierung

Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde über das *E.Z.N.A.*<sup>®</sup> *Plasmid Miniprep II Kit* (Peqlab, Erlangen) aufgereinigt und photometrisch quantifiziert. Etwa 700 bis 1.000 ng DNA wurden in 10 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Zur Plasmid-DNA wurden dann ca. 15 pmol des entsprechenden Oligonukleotids gegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Weiterhin wurden 6 µl Half Term-Puffer und 2 µl *Big Dye Terminator Ready Reaction Mix* hinzugegeben. Die für die Sequenzierung verwendeten Reagentien sind Bestandteil des *Big Dye Terminator Ready Reaction Kits* (Applied Biosystems, Weiterstadt). Mit dem Ansatz wurde das folgendem Programm im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt (Tabelle 5).

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	10 s	96° C
2. Hybridisierung	5 s	48-50° C <sup>*</sup>
3. Elongation	4 min	60° C
25 Zyklen (Schritt 13.)		

#### Tabelle. 5. Sequenzierprogramm

\* Hybridisierungstemperatur entsprechend 5-10° C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide.

Anschließend wurde die DNA mit 8 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 300 µl 96%igem Ethanol gefällt (30 min, 4° C) und zentrifugiert (30 min, 20.800 xg, 4° C). Nach Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol wurde zentrifugiert (15 min, 20.800 xg, 4° C), der Überstand abgesogen und die DNA für 1 h an der Luft getrocknet. Die Auftrennung und Auswertung der sequenzierten DNA erfolgte durch das Institut für Zellbiochemie am Universitätskrankenhaus Eppendorf, Arbeitskreis Richter, mittels des Programms ABI PRISM 3.3 (Applied Biosystems, Weiterstadt).

#### 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (5 Stück) ist in Tabelle 6 gezeigt. Die Lösung für das Trenngel wurde in einem Multi-Cast-Gießstand (Modell SE200, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegossen und jedes Gel mit 250 µl Isopropanol überschichtet. Das Auspolymerisieren erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen, die Lösung für das Sammelgel hinzugegeben und der Gießstand mit Kämmen bestückt. Das Sammelgel polymerisierte über Nacht bei 4° C aus. Die Protein-Proben wurden mit 4x Probenpuffer für 5 min aufgekocht und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit Tankpuffer gefüllten Minigel-Elektrophoresekammer (Modell SE250, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 20 mA. Zur Molekulargewichtsbestimmung der

	7,5%	10%	12%	3%
	Trenngele	Trenngele	Trenngele	Sammelgele
30% Acrylamid	7,5 ml	10 ml	12 ml	2 ml
Trenngelpuffer (4x)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer (4x)	-	-	-	3,75 ml
dH <sub>2</sub> O	15,9 ml	13,4 ml	11,4 ml	9,2 ml
10% APS	90 µl	90 µl	90 µl	60 µl
TEMED	24 µl	24 µl	24 µl	12 µl

aufgetrennten Proteine wurde der Precision Protein Standard (Biorad, München) aufgetragen.

Tabelle 6. Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

#### 2.2.2.2 Coomassie-Färbung

Das Polyacrylamidgel wurde für 45-60 min in Coomassie-Färbelösung gegeben und anschließend bis zur gewünschten Farbintensität im Coomassie-Entfärber entfärbt.

## 2.2.2.3 Silberfärbung

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese für 30 min in Fixierlösung inkubiert, anschließend für 1 h bis maximal über Nacht in Inkubationslösung gelegt. Nach dreifachem fünfminütigem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel für weitere 30 min in die Färbelösung gelegt. Nach erneutem kurzem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel in die Entwicklerlösung gegeben. Nach Sicht wurde die Entwicklung abgebrochen und das Gel in Stoplösung überführt. Alle Schritte wurden unter Schütteln bei RT durchgeführt.

#### 2.2.2.4 Westernblot

## 2.2.2.4.1 Nassblot-Verfahren

Das Nassblot-Verfahren diente dem Transfer aufgetrennter Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn). Es wurden pro Gel zwei Stapel mit je einem Schwamm und drei Filterpapieren in einen Gelträger gelegt und in CAPS-Puffer äquilibriert. Zur Aktivierung wurde die PVDF-Membran für einige Sekunden in Methanol äquilibriert und anschließend auf das Filterpapier eines Stapels in CAPS-Puffer gelegt. Sobald die Polyacrylamid-Gelelektrophorese beendet war, wurde das Gel auf die PVDF-Membran transferiert und der zweite äqulibrierte Stapel darauf gelegt. Der Gelträger wurde geschlossen und in eine mit kaltem CAPS-Puffer gefüllte Nassblot-Kammer (Modell TE22, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) überführt. Während des Transfers wurde die Kammer in einem Behälter mit Eis gekühlt und der CAPS-Puffer gerührt. Der Transfer erfolgte bei 50 V für 3 h, wobei die Membran zur Anode wies. Anschließend wurde die Membran einem Immunprinting unterzogen.

#### 2.2.2.4.2 Semidry-Blot-Verfahren

Die zugeschnittene Nitrocellulose-Membran (Protran, Schleicher & Schüll, Dassel) (9x6 cm) wurde zusammen mit den zugeschnittenen Filterpapieren (9x6 cm) im Transferpuffer äquilibriert. Dann wurden in der Trans-Blot<sup>®</sup>-SD-Apparatur von Biorad (München) 5-6 Filterpapiere, die Membran, das SDS-Gel und wiederum 5-6 Filterpapiere aufeinander gestapelt. Der Transfer erfolgte je nach Molekulargewicht der Proteine für 1,5-3 h bei 75 mA pro Gel. Im Anschluss an den Transfer wurden die Proteine mittels Immunprinting nachgewiesen.

#### 2.2.2.5 Immunprinting

Mit Hilfe des Immunprintings wurden auf einer Membran immobilisierte Proteine spezifisch nachgewiesen. Nach Beendigung des Transfers der Proteine auf die Membran wurde diese für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS geblockt. Danach wurde mit dem primären Antikörper in 2,5% Milchpulver in TBS für 2 h über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreifach 5 min mit TBS gewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, erfolgte in 2,5% Milchpulver in TBS für 1-2 h bei RT. Für die Entwicklung mit NBT/BCIP wurde die Membran zweifach 5 min mit TBS und für weitere 5 min mit Detektionspuffer für AP gewaschen. Die Entwicklung fand in einer frisch hergestellten Entwicklerlösung unter Lichtausschluss nach Sichtprobe statt.

Entwicklerlösung:	11,25 ml	Detektionspuffer für AP
	1,25 ml	NBT-Stocklösung
	<i>125 μl</i>	BCIP-Stocklösung

#### 2.2.2.6 Densitometrische Konzentrationsbestimmung

Zur densitometrischen Konzentrationsbestimmung wurden neben verschiedenen Volumina der zu bestimmenden Protein-haltigen Probe 4-5 Verdünnungen bekannter Konzentration von nativem CVF oder humanem C3 (je nach Probe) aufgetragen. Dabei wurden die Konzentrationen der Proteine der Eichreihe so gewählt, dass sie im Bereich der in der Probe zu erwartenden Proteinmenge lagen. Das Gel wurde dem Nassblot- oder *Semidry*-Blot-Verfahren unterzogen und die Proteine nachfolgend über Immunprinting angefärbt. Die Membran wurde anschließend eingescannt und die Konzentration der Probe mit dem Programm *Imagemaster 1D Elite Version 2.01* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit Hilfe der Eichreihe bestimmt.

#### 2.2.2.7 ELISA

Zum Nachweis von Proteinen in einem Überstand wurde ein ELISA durchgeführt. Dazu wurde in den Vertiefungen einer ELISA-Platte (Greiner, Frickenhausen) 1  $\mu$ g eines Proteins verdünnt in 100  $\mu$ l Inkubationslösung über Nacht bei 4° C an die Oberfläche immobilisiert. Anschließend wurden die Plattenvertiefungen dreifach mit jeweils 200  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und danach mit 200  $\mu$ l 5% Milchpulver in PBS 5 h bei RT blockiert. Nach erneutem dreifachem Waschen wurden je 200  $\mu$ l der zu untersuchenden Überstände der transienten Expression oder in PBS verdünnte gereinigte Proteine in eine Vertiefung gegeben und über Nacht bei 4° C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde dreifach mit Waschpuffer gewaschen und 2 h mit 100  $\mu$ l einer 1:1000 Verdünnung eines entsprechenden Antikörpers in 2,5% Milchpulver in PBS bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreifach gewaschen und für 1 h mit 100  $\mu$ l einer 1:1000 Verdünnung eines

entsprechenden Peroxidase-Konjugates in einer 2,5% Milchpulver in PBS bei RT inkubiert. Schließlich wurde dreifach gewaschen und danach mit 100 µl Detektionspuffer (für POD) versetzt. Nach Färbung der Vertiefungen wurde die Extinktion bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer vermessen (ELISA-Reader, SLT-Instruments, Grödingen, Österreich, Easy Reader EAR 400AT).

#### 2.2.2.8 Ammoniumsulfat-Fällung von Antikörpern

Antikörper wurden durch Ammoniumsulfat-Fällung aus polyklonalen Seren angereichert. Zur Fraktionierung von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) wurde das Antiserum (2 ml) innerhalb von ca. 30 min mit 3,9 ml einer kaltgesättigten Lösung von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Dann wurde für 1 h bei 4° C gerührt und zentrifugiert (1.300 xg, 10 min, 4° C). Das Präzipitat wurde verworfen und die im Überstand enthaltenen IgG nun durch Zugabe von 1,22 ml gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gefällt. Nach Rühren bei 4° C für 1 h wurde wieder zentrifugiert (1.300 xg, 10 min, 4° C), das Pellet in 2 ml PBS aufgenommen, erneut mit 2 ml Ammoniumsulfat-Lösung gefällt, für 1 h gerührt und zentrifugiert (1.300 xg, 10 min, 4° C). Das so gewonnene Präzipitat wurde in 2,5 ml PBS aufgenommen, nach Angaben des Herstellers über eine PD-10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gereinigt und mit 0,05% (w/v) Natriumazid konserviert.

#### 2.2.2.9 Ultrafiltration

Zur Konzentrierung von rekombinanten Proteinen in Zellüberständen wurde die Ultrafiltration verwendet. Dazu wurde in die Filtrationsapparatur (Millipore, Eschborn) eine Membran (44,5 mm, YM100, Millipore, Eschborn) mit dem gewünschten *Normal molecular weight limit* (NMWL) eingelegt und der Überstand in die Apparatur eingefüllt. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte mit Stickstoff bei einem Druck von 1,5 bar. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Membran für 5 min mit 3-5 ml PBS inkubiert. Das PBS wurde abgenommen und mit dem Konzentrat vereint.

#### 2.2.2.10 Biosensor-Messungen

Das Prinzip der Surface plasmon-Resonanz (SPR) bietet unter Verwendung des Biacore-Systems die Möglichkeit zur Messung von Molekül-Interaktionen in Lösung in *real time* und beruht auf der Anregung von Wellen an der Grenze zwischen fester und flüssiger Phase. Diese Anregung resultiert in der Reduktion der Intensität eines reflektierten Lichtstrahles und wirkt sich in einer spezifischen Änderung der Wellenlänge und des Reflexionswinkels aus. Bindet ein Ligand oder der Analyt auf der Oberfläche der Messzelle, wird der Brechungsindex modifiziert, was sich in einer Änderung des SPR-Signales auswirkt. Diese Änderung ist proportional zur Konzentrationsänderung von Proteinen oder Interaktionspartnern auf der Oberfläche.

Die Liganden, hier die löslichen Antikörper-Fragmente, werden dabei kovalent auf der CM5-Oberfläche (Carboxy-methyl-Dextran) immobilisiert. Zur Aktivierung der Oberfläche wurden 0,2 M EDC-Lösung und 50 mM NHS-Lösung vermischt (1:2) und für 15 min bei einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min injiziert. Anschließend wurde manuell mit den Antikörper-Fragmenten belegt. Für den scFv CVF-29 ergab sich dabei ein Wert von 2000 RU, während bei dem C3-22 bis 580 RU immobilisiert wurde. Anschließend wurde die Oberfläche für 15 min mit Ethanolamin gesättigt.

Zur Messung der Äffinitäten wurde das jeweilige Antigen in Konzentrationen von ca. 10-500 nM mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min über den Liganden geleitet. Hierbei wurde bei dem scFv CVF-29 die Flussgeschwindigkeit variiert, um den Einfluss von Massentransport-Phänomenen ausschließen zu können. Die Analyse der Bindungscharakteristika erfolgte mittels der entsprechenden Evaluationssoftware.

## 2.2.3 Phagentechniken

## 2.2.3.1 Phage Display

Das *Phage Display*-System ist ein Selektionsprozess zur Identifikation von Bindungspartnern. In einem zyklischen Prozess aus Transkription/Translation und Affinitätsselektion werden Bindungspartner angereichert (Abb. 13).



Abb. 13. Schematische Darstellung des Phage Display-Systems

Durch den Bakteriophagen können die Proteine auf der Oberfläche als Fusionspartner des Hüllproteins des GenIII exprimiert werden und sind direkt mit der genetischen Information verknüpft. Durch eine nachfolgende Infektion von *E. coli* mit dem filamentösen Bakteriophagen M13 kann die genetische Information zurückgewonnen werden. Selektionen mit Phagemidvektoren benötigen zusätzlich die genetische Information des Phagen, die durch eine Superinfektion mit den Helfer-Phagen erhalten wird.

Die verwendete Griffin-1 Bibliothek enthält scFv aus synthetischen V-Gensegmenten in dem Phagemidvektor pHen2. Sie wurde aus einer Bibliothek im Fab-Format mit einer Größe von  $6,5x10^{10}$  Klonen (Griffith *et al.*, 1994) erhalten und hat eine Größe von ca.

 $1,2x10^9$  Klonen. Die CDR3-Sequenzen wurden dabei durch PCR randomisiert, wobei es jedoch zu einem Einbau von Stopcodons kommen kann. Die leichten und schweren Ketten sind über einen Glycin-Serin-Linker verbunden. Zur Reinigung und Detektion sind die scFv mit einem 6x His-tag und einem Myc-Epitop versehen. Die Phagemidvektoren erlauben die nachfolgende Expression in *E. coli* ohne eine Klonierung der scFv in einen Expressionsvektor.

# 2.2.3.2 Wachstum und Replikation von Bibliotheken und Darstellung rekombinanter Phagen

Ein Aliquot der Bibliothek wurde in ein Kulturvolumen von 250 ml 2YT-AG-Medium gegeben. Bei 37° C und 250 rpm wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 inkubiert. Von dieser Kultur wurden 25 ml zur Darstellung der rekombinanten Phagen verwendet, wobei die verwendete Zellzahl von  $1 \times 10^{10}$  die Diversität der Griffin-1-Bibliothek gewährleistet.

Für die Replikation der Bibliothek wurde die Kultur für weitere 2 h bei 37° C und 250 rpm inkubiert, zentrifugiert (2.500 xg, 4° C, 30 min) und in 2YT-Medium mit 15% Glycerol resuspendiert. Aliquots (1 ml) wurden bei –80° C gelagert.

Phagemid-tragende Zellen des Supressor-Stammes *E. coli* TG1 wurden in 10 ml 2YT-AG-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 kultiviert. Dieser Wert entspricht einer Zellzahl von  $4x10^8$  Zellen/ml und stellt die Grundlage für die Infektion und ihre Infektionsmultiplizität dar. Die Multiplizität der Infektion wurde je nach Ansatz zwischen 5 und 20 variiert. Höhere Werte entsprechen einem monovalenten Display, während niedrigere ein multivalentes Display ermöglichen. Nach der Zugabe der Helfer-Phagen zu einer geeigneten Zellzahl wurden diese bei 37° C ohne Schütteln für 30 min inkubiert, zentrifugiert (2.500 xg, 10 min) und in 50 ml 2YT-AK-Medium resuspendiert. Sekretion der Phagen erfolgte über Nacht für maximal 16 h bei 30° C und 250 rpm.

Die Kultur wurde zentrifugiert (4.000 xg, 30 min, 4° C) und die Phagen aus dem Überstand nach Zugabe von 1/5 Volumenanteil PEG/NaCl-Lösung für 2 h auf Eis präzipitiert. Nach Zentrifugation (3.000 xg, 30 min, 4° C) wurde der Überstand entfernt, das Präzipitat erneut zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation (10.000 xg, 4° C, 10 min) wurde der Überstand, der die Phagen enthielt, aliquotiert und bei 4° C gelagert. Abschließend wurde der Titer der Phagensuspensionen ermittelt.

#### 2.2.3.3 Selektion der Antikörperbibliothek

Die Selektion wurde aufgrund der hohen Protein-Bindungskapazität auf Polystyrol-Oberflächen in ELISA-Platten oder in Immuno-Röhrchen durchgeführt. Für die Selektion im Immuno-Röhrchen wurde ein Röhrchen mit 1-4 ml einer Antigen-haltigen Lösung in PBS, mit einer Konzentration von 50-100 µg Antigen je ml, bei Raumtemperatur für maximal 6 h oder über Nacht bei 4° C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Immuno-Röhrchen dreifach mit PBS gewaschen und mit 2% Milchpulver in PBS für 2 h blockiert, um unspezifische Bindung der rekombinanten Phagen zu minimieren. Darauf folgte erneut dreifaches Waschen mit PBS. Anschließend wurde mit  $10^{12}$  bis  $10^{13}$  Phagen, die ebenfalls für 30 min in 2% Milchpulver in PBS blockiert worden waren, in 4 ml 2% Milchpulver in PBS für 30 min auf einem Rollbrett und für weitere 90 min vertikal inkubiert. Nach je 10-50fachem Waschen mit TPBS und PBS, wobei bei fortschreitender Selektion die Zahl der Waschschritte erhöht wurde, wurden die Phagen eluiert. Die Elution wurde bei der ersten Selektionsrunden basisch, durch Zugabe von 1 ml 100 mM Triethylamin, durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 9 min wurde die basische Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch 500 µl einer vorgelegten 1 M Tris/HCl-Lösung, pH 7,5 neutralisiert. Die verbliebene Lösung im Immuno-Röhrchen wurden durch Zugabe von 250 µl Tris/HCl-Lösung, pH 7,5 neutralisiert und mit dem ersten Eluat vereint. Das vereinte Eluat und das Immuno-Röhrchen wurden dann bei 4°C gelagert und der Reinfektion zugeführt. Bei der zweiten und dritten Selektionsrunde erfolgte die Elution unter der Verwendung der pKM13-Helfer Phagen mit 1 ml Trypsin/EDTA. Nach einer maximalen Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde die Lösung abgenommen und das Trypsin mit 0,5 ml Serum-haltigem Medium gestoppt. Das Eluat wurde dann bei 4° C gelagert und der Reinfektion zugeführt.

#### 2.2.3.4 Reinfektion

Nach jeder Selektionsrunde wurden die rekombinanten Phagen des Eluates zur Reinfektion der F-pilus-positiven TG1-Zellen genutzt.

Dazu wurden 5 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur der TG1-Zellen in 2YT-Medium in das Immuno-Röhrchen gegeben. Zu dem Eluat wurden ebenfalls 10 ml der Kultur gegeben, beide Ansätze für 30 min bei 37° C inkubiert und anschließend vereint. Diese Durchführung ermöglicht auch nicht-eluierten Phagen die Reinfektion. Von der Zellsuspension wurden 100  $\mu$ l für die Titerbestimmung des Eluates genutzt, der Rest zentrifugiert (2.500 xg, 10 min) und in 1 ml 2YT-Medium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen auf 2 großen (145/20 mm) TYE-AG-Platten ausgebracht und über Nacht bei 30° C inkubiert.

#### 2.2.3.5 Amplifikation der selektierten Phagen

Die angereicherte Bibliothek, die von den Klonen auf den TYE-Platten repräsentiert wird, wurde mit einem Zellschaber unter Zugabe von 2YT-Medium abgeschabt. Anschließend wurde für 15 min bei RT auf dem Rollbrett inkubiert, um die Zellverbände zu lösen und eine repräsentative Verteilung der Klone sicherzustellen. Danach wurden 100 ml 2YT-AG-Medium so mit den Zellen versetzt, dass die OD<sub>600</sub> nicht größer als 0,1 war. Dieses gewährleistet eine ausreichende Zeitspanne zur Ausbildung der F-Pili. Der Ansatz wurde bei 37° C und 250 rpm inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Der verbliebene Rest der Zellen wurde nach Zugabe von Glycerol (Endkonzentration 15%) zu je 1 ml aliquotiert und bei -80° C gelagert.

Von der Kultur wurden dann 10 ml zur Superinfektion mit Helfer-Phagen wie beschrieben verwendet und schließlich 50 ml 2YT-AK-Medium zur Sekretion der neuen Generation rekombinanter Phagen genutzt. Die Präzipitation der rekombinanten Phagen erfolgte wie beschrieben.

#### 2.2.3.6 Titerbestimmung des Selektionseluates

Mit den nach der Reinfektion abgenommenen  $100 \,\mu$ l des Eluates wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich zwischen  $10^{-1}$  und  $10^{-4}$  in 2YT-Medium angesetzt und je  $100 \,\mu$ l dieser Verdünnungen und eine entsprechende Kontrolle auf TYE-AG-Platten ausgebracht. Nach der Inkubation über Nacht bei 37° C wurden die resultierenden Klone ausgezählt und der Titer errechnet.

#### 2.2.3.7 Titerbestimmung der amplifizierten Phagen

Verdünnungen der amplifizierten Phagen (200  $\mu$ l) in 2YT-Medium im Bereich zwischen 10<sup>-6</sup> und 10<sup>-10</sup> sowie eine Negativkontrolle wurden mit je 200  $\mu$ l einer logarithmisch bei 37° C wachsenden TG1-Kultur versetzt, kurz durchmischt und zur Infektion bei 37° C für 30 min inkubiert. Dann wurden je 100  $\mu$ l auf TYE-AG-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37° C inkubiert, die resultierenden Klone ausgezählt und der Titer errechnet. Dabei wurden üblicherweise Titer von 10<sup>12</sup> bis 10<sup>13</sup> *Colony forming units* erhalten.

#### 2.2.3.8 Polyklonale ELISA-Analyse

Um den Verlauf der Selektion auf eine mögliche Anreicherung spezifischer Phagen hin zu verfolgen, wurden die Reaktivitäten der amplifizierten Phagen charakterisiert. Dazu wurde das Antigen über Nacht bei 4° C in 40  $\mu$ l PBS in den Vertiefungen einer ELISA-Platte inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreifach mit PBS gewaschen und mit 300  $\mu$ l 2% Milchpulver in PBS für 2 h bei RT blockiert. Inkubation mit 50-100  $\mu$ l der Phagen (1:2 in 4% Milchpulver in PBS verdünnt) erfolgte bei RT für 1,5-2 h, anschließend wurde mit 100  $\mu$ l eines anti-M13-POD-Konjugates (1:5000 in 2% Milchpulver in PBS) für 1 h inkubiert. Nach drei- bis fünffachem Waschen mit TPBS und PBS wurde die Farbentwicklung mit Detektionlösung für POD durchgeführt und bei 405 nm vermessen.

#### 2.2.3.9 Monoklonale ELISA-Analyse

Zur Charakterisierung der Reaktivität singulärer Klone gegenüber CVF oder C3 beziehungsweise auf Kreuzreaktivität wurde analog zu der polyklonalen Analyse verfahren.

Nach der zweiten oder dritten Selektionsrunde wurden singuläre Kolonien in Kulturvolumina von 3 ml bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bei 37° C und 250 rpm inkubiert. Von dieser Kultur wurde 1 ml mit Helfer-Phagen in einer Multiplizität von 5 bis 10 versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37° C wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem Kulturvolumen von 3-10 ml 2YT-AK-Medium resuspendiert und über Nacht bei 30° C und 250 rpm inkubiert. Aus dem Überstand der Kultur wurden die rekombinanten Phagen mit 1/5 Volumenanteil PEG/NaCl-Lösung präzipitiert und nach Zentrifugation (10.000 xg, 10 min, 4° C) in 100 µl PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und für die ELISA-Analyse eingesetzt.

#### 2.2.3.10 Infektion von Non-Supressor-Stämmen

Für die rekombinante Expression der löslichen Antikörper-Fragmente wurde der Phagemid-Vektor pHen2 verwendet. Er verfügt über ein Amber-Codon, welches, zwischen scFv und GenIII lokalisiert, Antikörper-Fragment und gIII je nach Expressionsstamm fusioniert oder die Translation stoppt. In Supressor-Stämmen wie TG1 wird an dieser Stelle ein Glutamat eingefügt.

Zur Infektion wurde der *E. coli*-Stamm HB2151 in 2YT-Medium bei 37° C und 250 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 wachsen gelassen, je 200 µl der Kultur mit einer geeigneten Verdünnung der rekombinanten Phagen versetzt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl dieser Lösung auf TYE-AG-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Zellen konnten anschließend zur PCR-Analyse oder Expression der löslichen Antikörper eingesetzt werden.

#### 2.2.3.11 DNA-Fingerprint

Für die primäre Charakterisierung der selektierten Antikörper wurde eine Restriktionsmuster-Analyse eingesetzt. Dazu wurden von unterschiedlichen Klonen DNA isoliert und die scFv-DNA-Sequenzen mittels PCR bei 48° C amplifiziert. Verwendet wurden dabei die Oligonukleotide Lmb3 und Fdseq, die den Bereich der Antikörper und zusätzlich 250 bp des 5'- und des 3'-Bereiches amplifizieren, was in einer Länge des Amplifikates von ca. 950 bp resultiert. Anschließend wurde die DNA über *QiaexII* aufgereinigt und 3 h mit einem Restriktionsenzym inkubiert. Um eine repräsentative Fragmentierung zu erreichen, wurde ein Enzym mit einer tetrameren Erkennungssequenz wie z.B. MvaI gewählt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Dieses Verfahren ermöglicht eine Analyse der vorliegenden *Framework*-Regionen.

## 2.2.4 Eukaryontische und prokaryontische Expression von Antikörpern

#### 2.2.4.1 Expression der scFv in E. coli

Die Verwendung von Phagemid-basierten Systemen zur Selektion ermöglicht die direkte Expression von rekombinanten Antikörpern durch die Infektion von HB2151-Zellen. Dieser Non-Supressor-Stamm translatiert das Amber-Codon zwischen scFv und GenIII als Stopcodon, so dass lösliche Antikörper-Fragmente erhalten werden. Durch die vorhandene pelB-Signalsequenz werden die scFv in das Periplasma sekretiert. Das oxidierende Milieu im Periplasma erlaubt die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken und die richtige Faltung der Antikörperketten.

#### 2.2.4.1.1 Periplasmatische Expression in E. coli

Kulturvolumina von 3-50 ml 2YT-AG-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden Klones inokuliert und über Nacht bei 37° C und 220 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 50-1000 ml 2YT-Medium mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) oder Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) versetzt und die Zellen bei 37° C und 220 rpm bis zur OD<sub>600</sub> von 1 kultiviert. Daraufhin wurde durch Zugabe von IPTG in einer finalen Konzentration von 1 mM die Proteinexpression induziert und die Kultur über Nacht bei 30° C und 220 rpm inkubiert.

Expressionen mit Kulturvolumina von 2-3 l wurden in einer 5 l Flasche in einem Wasserbad (37° C) kultiviert. Eine kontinuierliche Belüftung wurde durch eine Pumpe gewährleistet. Nachfolgend wurde wie beschrieben verfahren.

#### 2.2.4.1.2 Präparation des periplasmatischen Extraktes

Der Expressionsansatz wurde auf 4° C abgekühlt, zentrifugiert (15 min, 4° C, 5.000 xg), der Überstand verworfen, das Pellet in eiskaltem TES-Puffer (1 ml pro 50 ml Kulturvolumen) resuspendiert und nach 1-3 min mit eiskaltem <sup>1</sup>/<sub>4</sub> TES-Puffer (25% (v/v) TES in ddH<sub>2</sub>O; 1,5 ml pro 50 ml Kulturvolumen) versetzt, mehrfach invertiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Der zelluläre Restbestandteil wurde dann abzentrifugiert (15 min, 6.000 xg, 4° C) und der Überstand in Slide-A-Lyzer-Kassetten (Pierce, Rockford, CA, USA) überführt. Da EDTA die Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose durch Komplexierung des Ni<sup>2+</sup> inhibieren könnte, wurde der periplasmatische Extrakt dann bei 4° C gegen 1-5 l PBS über Nacht dialysiert.

#### 2.2.4.1.3 IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography)

Das Dialysat des periplasmatischen Extraktes wurde mit Ni-NTA-Matrix aus einem Volumen von 0,5-5 ml (je nach Kulturvolumen) und Imidazol in einer finalen Konzentration von 20 mM versetzt und über Nacht bei 4° C auf dem Rollbrett inkubiert. Die Matrix wurde dann abzentrifugiert (700 xg, 10 min, 4° C), der Überstand abgenommen und die Matrix in 50 ml PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation (700 xg, 10 min, 4° C) wurde erneut in 10 ml PBS aufgenommen und die Matrix in eine Durchflusssäule gegeben. Der Durchlauf wurde mit der Waschfraktion vereint und anschließend wurden die gebundenen Proteine sukzessiv mit 300 mM Imidazol in PBS in 1 ml Fraktionen von der Matrix eluiert. Im Anschluss wurden die Fraktionen wurden vereint, gegen PBS dialysiert und in weiteren Untersuchungen verwendet.

#### 2.2.4.1.4 Präzipitation mit rekombinanten Antikörper-Fragmenten

Zur Präzipitation von CVF, C3 oder den Chimären wurden die rekombinanten scFv verwendet. Dazu wurden 100-500  $\mu$ l Ni-NTA-Agarose in 1 ml PBS mit 1-10  $\mu$ g des Antikörper-Fragmentes versetzt und für 3 h bei 4° C unter Rollen vertikal inkubiert. Anschließend wurde die Matrix abzentrifugiert (700 xg, 4° C, 7 min). Der Überstand mit den nicht gebundenen Antikörpern wurde verworfen und die Matrix mit dem zu präzipitierenden Protein im Überstand der transienten Expression oder verdünnt in PBS versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 4° C unter Rollen wurde abermals zentrifugiert (700 xg, 4° C, 7 min), mit 5 ml PBS gewaschen, zentrifugiert (700 xg, 4° C, 7 min) und die in 1 ml PBS aufgenommene Matrix in eine Micro-Spin-Säule (Biorad, München) überführt. Durch Zentrifugation (80 xg, 1 min, RT) wurde der Puffer entfernt. Danach wurden die Proteine durch Zugabe von 300 µl 300 mM Imidazol in PBS eluiert und zentrifugiert (80 xg, 1 min, RT). Das Eluat wurde gegen PBS über Nacht bei 4° C in Slide-A-Lyzer-Kassetten (0,5 ml, Pierce, Rockford, CA, USA) dialysiert und durch SDS-PAGE mit anschließendem Immunprinting, anschließender Coomassie- oder Silberfärbung auf Reinheit und Konzentration überprüft.

## 2.2.4.2 Expression der Antikörper in Pichia pastoris

Das Expressionssystem der Hefen verbindet die eukaryontische Faltung und posttranslationale Modifikationen mit einer einfachen Kultivierung. Der methylotrophe Hefestamm *Pichia pastoris* ist in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren und besitzt die Möglichkeit der Sekretion und Prozessierung der rekombinanten Proteine. Zudem können hohe Ausbeuten erzielt werden. Rekombination am Alkohol-Oxidase-Locus reguliert die Proteinexpression über den starken Promotor der Alkohol-Oxidase. Das Enzym Alkohol-Oxidase katalysiert den ersten Schritt der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd. Die Sekretion wird mittels des  $\alpha$ -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* erzielt. In Gegenwart von Glucose wird die Transkription des AOX1-Genes unterdrückt, wohingegen Glycerol zu einer Derepression führt, für die anschließende Induktion wird Methanol verwendet.

Für die Expression von rekombinanten Antikörpern in *Pichia pastoris* stand der Vektor pPICZIgGScFv-Fc zur Verfügung, der eine Expressionskassette enthält (Abb. 14). Als Signalsequenz diente der  $\alpha$ -Faktor. Über die Schnittstellen SfiI und AscI können beliebige scFv in die Kassette kloniert werden. Die Expression erfolgt dann mit den konstanten F<sub>C</sub>-Regionen C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 als IgG $\Delta$ C1-Dimer.



## Abb. 14. Schematische Darstellung der Expressionskassette für IgG△C1-Konstrukte in *Pichia*.

Aufgeführt sind die einzelnen Domänen und Schnittstellen. Der scFv kann über Schnittstellen ausgetauscht werden. Als Signalsequenz dient der für *Pichia pastoris* übliche  $\alpha$ -Faktor. Die konstanten humanen IgG Regionen C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 werden an den scFv fusioniert.

#### 2.2.4.2.1 Kultivierung und Lagerung von Hefe

Die Kultivierung der Hefen erfolgte bei 29-30° C auf den entsprechenden Agar-Platten im Brutschrank bzw. in Flüssigkultur bei 230-250 rpm im Schüttelinkubator.

Auf Agar-Platten bleiben *Pichia pastoris* Kulturen bei 4° C mehrere Monate lebensfähig. Für die Langzeitlagerung wurden Zellen bei  $-80^{\circ}$  C gelagert. Dazu wurde eine 10 ml YPD-Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 5-10 kultiviert und die Zellen anschließend abzentrifugiert (1.500 xg, 4° C, 5 min). Die Hefen wurden in 1 ml YPD-Medium mit einem Glycerolgehalt von 15% resuspendiert und in sterilen Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 2.2.4.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Pichia pastoris-Zellen

YPD-Medium (3 ml) wurde mit *Pichia pastoris* GS 115 inokuliert und über Nacht bei 29,5° C und 230 rpm inkubiert. Zu 100 ml YPD-Medium wurden dann 500  $\mu$ l dieser Vorkultur gegeben und für ca. 20 h in einem 11 Erlenmeyerkolben bei 29,5° C und 230 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation (1.500 xg, 5 min, 4° C) wurden die Zellen in 100 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Dann wurde erneut zentrifugiert (1.500 xg, 5 min, 4° C) und in 250 ml eiskaltem Wasser aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (1.500 xg, 5 min, 4° C) wurden die Zellen in 20 ml eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung aufgenommen. Nach einer finalen Zentrifugation (1.500 xg, 5 min, 4° C) wurden die Zellen in

1,5 ml eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert. So präpariert sind die kompetenten Hefezellen auf Eis gekühlt 24 h haltbar.

Zur Transformation wurden 40-70 µg SacI-linearisierter Plasmid-DNA mit 100 µl der Zellen versetzt, in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und für 2 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Easy Ject Elektroporator (Eurogentec, Seraing, Belgien) bei 1.500 V, 481  $\Omega$ , 25 µF und einer daraus resultierenden Zeitkonstante von 12 ms. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml 1 M Sorbitol-Lösung zugegeben und die Zellsuspension in ein Rundbodenröhrchen überführt und für 1 h bei 30° C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl auf YPDS-Platten mit 100 µg/ml Zeocin ausgebracht. Die restlichen Zellen wurden mit 500 µl YPD-Medium versetzt, für 1 h bei 30° C inkubiert und abermals 200 µl auf YPDS-Platten mit 100 µg/ml Zeocin ausgebracht. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30° C im Brutschrank wurden positive Klone sichtbar, die mit einer Impföse auf Zeocin-haltigen YPDS-Platten ausgebracht und erneut über Nacht bei 30° C inkubiert wurden.

#### 2.2.4.2.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe

Die erhaltenen Zeocin-resistenten Klone wurden vor der Expression auf Integration überprüft, um sicherzustellen, dass das intakte scFv-Gen vorhanden ist.

Bei dem Verfahren der Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe (Hoffman und Winston, 1987) werden die Zellen mechanisch mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen.

Dazu wurden 10 ml YPD-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Zeocin mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2 kultiviert. Die Kultur wurde zentrifugiert (1.500 xg, 4° C, 5 min) und das Pellet in 500  $\mu$ l sterilem Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (1.500 xg, 4° C, 5 min) und das Pellet in 200  $\mu$ l Breaking Buffer aufgenommen. Nach Zugabe von 300 mg sterilen Glasperlen und 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform wurde für 3 min gevortext und anschließend mit 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O versetzt und kurz gevortext. Nach Zentrifugation (10.000 xg, 5 min, 4° C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 1 ml eiskaltes Ethanol zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die gefällte DNA wurde zentrifugiert (14.000 xg, 4° C, 20 min), der Überstand abgesaugt und die DNA in 400  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Im Anschluss wurden 3  $\mu$ l RNase (10 mg/ml) zugefügt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Die nachfolgende zweifache Phenol/Chloroform-Extraktion wurde nur durch Schütteln des Ansatzes durchgeführt. Anschließend wurde die DNA erneut präzipitiert, das Präzipitat an der Luft getrocknet und in 80  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4° C. Für die genomische PCR-Analyse wurden jeweils 2  $\mu$ l DNA eingesetzt. Außerdem wurde die Konzentration der Magnesium-Ionen im PCR-Ansatz auf 3 mM erhöht.

#### 2.2.4.2.4 Expression in Pichia pastoris

Ein Kulturvolumen von 25 ml BMGY wurde mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3-6 bei 30° C und 230-250 rpm kultiviert. Nach Zentrifugation (1.500 xg, RT, 5 min) wurden die Zellen in BMMY resuspendiert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 verdünnt. Die Proteinexpression erfolgte dann für 3 Tage bei 29,5° C und 230 rpm. Dabei wurde alle 24 h Methanol (0,5%) zur Kultur gegeben, um Verluste des verdunsteten Methanol auszugleichen.

Zur Analyse der Expression wurde der Expressionsansatz zentrifugiert (1500 xg, 30 min, 4° C), der Überstand mittels Ultrafiltration (NMWL 100.000) 50fach konzentriert und durch Zugabe von 1/5 Volumen 1 M Tris pH 9,1 neutralisiert. Nach Zugabe von 200 µl Protein A/G-Agarose wurde über Nacht unter Rollen bei 4° C inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit 50 mM Glycin-Puffer pH 3 für 1-2 min eluiert und sofort durch 1 M Tris pH 9,1 neutralisiert. Die Analyse der Expression erfolgte durch Auftrennung über eine SDS-PAGE mit anschließender Westernblot und einem Immunprinting.

#### 2.2.4.3 Expression der Antikörper in Mammalia

Für die Expression von IgG $\Delta$ C1-Dimeren in Mammalia stand eine Expressionskassette zur Verfügung (Abb. 15). Dabei wird die Signalsequenz aus der Ratte zur Sekretion der rekombinanten Antikörper verwendet. Der scFv kann über BsiWI bzw. Acc65I und AscI ausgetauscht werden; als Fusionspartner werden die IgG-Domänen C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 exprimiert.



## Abb. 15. Schematische Darstellung der Expressionskassette für IgG∆C1-Konstrukte in Säugern.

Aufgeführt sind die einzelnen Domänen und Schnittstellen. Das scFv-codierende Gen kann über Schnittstellen ausgetauscht werden. Die Signalsequenz einer  $\kappa$ -leichten Kette wurde aus der Ratte amplifiziert. Die konstanten humanen IgG Regionen C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 werden an den scFv fusioniert.

Der Vektor pCDNA3.1/Zeo, der neben einem CMV-Promotor ein Zeocin-Resistenzgen enthält, ermöglicht die Generierung stabiler Zelllinien. Die Expression erfolgte wie unter zellbiologischen Methoden beschrieben. Die Reinigung über Protein A/G-Agarose erfolgte wie bei Expression der Antikörper in *Pichia pastoris* beschrieben.

## 2.2.5 Expression von CVF, C3 und den Hybriden in Mammalia

Für die Expression von rekombinantem CVF, C3 und den Hybriden standen verschiedene Zelllinien zur Verfügung.

COS-7-Zellen wurden ursprünglich aus der Niere von Affen gewonnen und besitzen den SV-40 Replikationsursprung. Sie exprimieren das große T-Antigen des SV-40 Virus, welches für eine effiziente Replikation sorgt. Dies hat zur Folge, dass die Plasmide in einer hohen Kopienanzahl in der Zelle vorliegen. Die Zellen eignen sich daher nur für eine transiente Expression. CHO-Zellen aus den Ovarien eines chinesischen Hamsters enthalten ein RNA-Polymerasegen, welches mit einem Kernlokalisationssignal versehen wurde. Sie können daher für die Herstellung stabil transfizierter Zelllinien verwendet werden. HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, sie sind für eine transiente oder stabile Expression verwendbar. Die verwendeten HEK.EBNA-Zellen exprimieren konstitutiv das Epstein-Barr-Virus (EBV) Kernantigen 1 (EBNA-1, EBV *nuclear antigen 1*). EBNA-1 wurde als das Gen identifiziert, welches hauptsächlich für die Immortalisierung von Zellen durch das EBV verantwortlich zeichnet (Lupton und Levine, 1985).

Für die Expression stand der Vektor pcDNA3 zur Verfügung, der über den CMV-Promoter eine effiziente Expression in Säugern liefert. Als Resistenz steht für die Expression unter Selektionsdruck das Neomycingen zur Verfügung. Die Expression wurde wie unter zellbiologischen Methoden beschrieben durchgeführt.

## 2.2.5.1 Partielle Reinigung des rekombinanten CVF aus Überstand der transienten Expression

Zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile aus den Kulturüberständen bzw. Säulenfraktionen wurden diese in Dialyseschläuche (SpectraPor CE 100, MWCO 100 kDa, Roth, Karlsruhe) überführt und gegen PBS über Nacht dialysiert.

Die Konzentrierung dialysierter Proben erfolgte mit Centricon-Einheiten (MWCO 100 kDa, Millipore, Eschborn). Dazu wurde bei 1.000 xg (4° C) bis zu dem gewünschten Endvolumen zentrifugiert.

Zur partiellen Reinigung bzw. zur Abtrennung interferierender sowie niedermolekularer Komponenten wurden säulenchromatografische Methoden angewendet. Überstand (2,5 ml) der transienten Expression wurde nach Angaben des Herstellers auf eine PD-10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben, wobei als Laufpuffer PBS verwendet wurde. Die Fraktionen wurden im Westernblot mit anschließendem Immunprinting auf rekombinantes Protein untersucht. Zur partiellen Reinigung wurden 2 ml Überstand der transienten Expression auf eine 1 ml EconoPac-Säule (Biorad, München) unter Verwendung eines Tris-Puffer (50 mM, pH 7,5) gegeben und mit dem selben Puffer unter Zusatz von 500 mM NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden ebenfalls auf Proteingehalt untersucht und gegen PBS dialysiert.

Zur Kontrolle wurde mit nicht-transfiziertem Überstand identisch verfahren.

#### 2.2.5.2 Reinigung und Detektion von Proteinen über Affinitätstag-Systeme

#### 2.2.5.2.1 Das Strep-tag-System

Zur Reinigung und Immobilisierung der rekombinanten Proteine wurden CVF, C3 und die Hybride aus CVF und C3 mit einem Strep-tag-Fusionspeptid versehen. Der Strep-tag ist ein synthetisches Peptid aus 9 Aminosäuren (AWRHPQFGG), welches mit einer Affinität von  $2,7x10^4$  an Streptavidin bindet (Schmidt *et al.*, 1996). Er nutzt dabei die Bindungstasche für Biotin. Als C-terminaler Fusionspartner für Proteine kann er zur Reinigung und Detektion eingesetzt werden. Eine N-terminale Fusion ist erst durch eine Verbesserung des Systems möglich gemacht worden. Der resultierende Strep-tagII (WSHPQFEK) bindet mit geringerer Affinität an Streptavidin (Schmidt *et al.*, 1996), jedoch konnte durch eine Selektionsrunde mit randomisiert mutagenisiertem Streptavidin ein Derivat gefunden werden, welches wiederum eine genügend hohe Affinität besitzt (Skerra und Schmidt, 2000). Mit einer Dissoziationskonstante von 1  $\mu$ M eignet sich das an Agarose immobilisierte Streptavidin-Derivat Strep-Tactin, zur Reinigung. Strep-Tactin-Konjugate oder anti-Strep-tagII-Antikörper können zur Detektion im Immunprinting oder in einer ELISA-Analyse eingesetzt werden.

#### 2.2.5.2.2 Reinigung von Proteinen über den Strep-tag

Der Überstand von stabil transfizierten Zellen wurde vereinigt und über Ultrafiltration 20fach konzentriert. Anschließend wurde der Überstand 1:2 mit Puffer W verdünnt. Eine *Ready-to-use*-Strep-Tactin-Sepharose-Säule (1 ml, IBA, Göttingen) wurde mit 5 ml Puffer W äquilibriert. Dann wurde der konzentrierte Überstand 3-4 mal über die Säule gegeben. Nach einem Waschschritt mit 2-4 ml Puffer W erfolgte die Elution in 500 µl Fraktionen mit Puffer E. Die Fraktionen wurden dann über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung und Immunprinting auf rekombinantes Protein untersucht.

#### 2.2.5.2.3 Detektion von Strep-tag-Fusionsproteinen

Zur Detektion von Strep-tagII-Fusionsproteinen im Überstand der transienten Expression wurde ein ELISA durchgeführt. Dazu wurden in den Vertiefungen einer ELISA-Platte (Greiner, Frickenhausen) 3  $\mu$ g Strep-Tactin, in 40  $\mu$ l Inkubationslösung verdünnt, über Nacht bei 4° C an die Plattenoberfläche immobilisiert. Anschließend wurden wie unter ELISA beschrieben verfahren.

#### 2.2.5.2.4 Reinigung des Hybrides His-H6

Zur Reinigung von His-H6 mittels IMAC wurden 50 ml stabiler Überstand mit Imidazol in einer finalen Konzentration von 20 mM versetzt und über Nacht bei 4° C auf einem Rollbrett inkubiert. Die Matrix wurde dann abzentrifugiert (700 xg, 10 min, 4° C), der Überstand entfernt und die Matrix in 50 ml PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation (700 xg, 10 min, 4° C) wurde erneut in 5 ml PBS aufgenommen und die Matrix in eine Durchflusssäule gegeben. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit 3 ml 300 mM Imidazol in PBS in 1 ml Fraktionen von der Matrix eluiert. Im Anschluss wurden die Fraktionen durch eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot und einem Immunprinting auf ihren Proteingehalt überprüft. Die geeigneten Fraktionen wurden vereint, gegen PBS dialysiert und in weiteren Untersuchungen verwendet.

## 2.2.6 Komplementmethoden

#### 2.2.6.1 Gewinnung und Sensitivierung von Schaf-Erythrozyten

Vollblut aus Schafen (1 ml, Behringwerke, Marburg) wurde in 13 ml kaltem GVBS<sup>++</sup> resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 1.000 xg, 4° C). Der Überstand wurde entfernt und die Erythrozyten erneut in 14 ml GVBS<sup>++</sup> resuspendiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis der Überstand klar war. Anschließend wurden die Erythrozyten in ca. 5 ml GVBS<sup>++</sup> resuspendiert. Durch Verdünnung mit GVBS<sup>++</sup> wurden die Erythrozyten so eingestellt, dass 30 µl der Erythrozytensuspension in 1 ml ddH<sub>2</sub>O bei 412 nm eine Absorption von 1,9 ergaben (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml). Von den eingestellten Erythrozyten wurde je 1 ml mit 2 µl Antiserum gegen Schaf-Erythrozyten (*anti-sheep red blood cell stroma*, Sigma, Taufkirchen) versetzt. Die Sensitivierung erfolgte für 1 h im Wasserbad bei 37° C, dabei wurde das Reaktionsgefäß alle 10 min invertiert. Die sensitivierten Erythrozyten wurden dreifach mit 2 ml GVBS<sup>++</sup> gewaschen und zentrifugiert (3 min, 1.000 xg, 4° C) und konnten so bis zu drei Tage aufbewahrt werden. Vor jeder Verwendung wurde die OD<sub>412</sub> erneut auf 1,9 eingestellt.

#### 2.2.6.2 Gewinnung von Meerschweinchen-Erythrozyten

Meerschweinchen-Erythrozyten wurden aus Vollblut isoliert, das von mit Isofluoran betäubten Meerschweinchen durch Augenpunktion gewonnen wurde. Die Punktion wurde in der Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg durchgeführt. Etwa 1 ml Blut wurde entnommen und sofort in ein mit 1 ml eiskalter ACD-Lösung gefülltes Gefäß überführt. Die ACD-Lösung diente dabei als Antikoagulanz. Die Erythrozyten wurden durch Zentrifugation (1.000 xg, 10 min, 4° C) abgetrennt, in 14 ml GVBS<sup>++</sup> resuspendiert und erneut zentrifugiert (1.000 xg, 10 min, 4° C). Diese Prozedur wurde insgesamt 3–4fach wiederholt, bis der Überstand klar blieb. Schließlich wurden die Erythrozyten in ca. 5 ml GVBS<sup>++</sup> resuspendiert. Durch Verdünnung mit GVBS<sup>++</sup> wurden die Erythrozyten so eingestellt, dass 30  $\mu$ l der Erythrozytensuspension in 1 ml ddH<sub>2</sub>O bei 412 nm eine Absorption von 1,9 ergaben (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml).

#### 2.2.6.3 Komplementverbrauchsassay

Dieser Test beruht auf der Komplement-verbrauchenden Wirkung des CVF. Wird eine CVF-haltige Probe zusammen mit humanem Serum inkubiert, werden die Komplementproteine in Abhängigkeit der CVF-Aktivität verbraucht (Ballow und Cochrane, 1969; Cochrane *et al.*, 1970). Die verbleibende Komplementaktivität des Serums kann anschließend mit sensitivierten Schaf-Erythrozyten nachgewiesen werden (Abb. 16).



\* sensitivierte Schaf-Erythrozyten

#### Abb. 16. Schematische Darstellung des Komplementverbrauchsassays.

Dargestellt sind Ansätze ohne Probe (A) oder mit Komplement-aktivierender Probe (B). Nach der Präinkubation werden sensitivierte Erythrozyten zugegeben, diese werden in einer weiteren Inkubation vom verbleibenden Serum lysiert. Freigesetztes Hämoglobin kann anschließend photometrisch vermessen werden.

Zunächst erfolgte in einer Serumtitration eine Mengenbestimmung des humanen Serums, die zu einer Hämolyse der verwendeten Schaf-Erythrozyten von 70 bis 90% führte. Dazu wurden verschiedene Serumkonzentrationen (Serumwert) in 2 ml Reaktionsgefäße (jeweils Doppelbestimmungen) gegeben und auf 40 µl mit GVBS<sup>++</sup> aufgefüllt. Zusätzlich wurden Kontrollen hergestellt, die nur 40 µl GVBS<sup>++</sup> (Pufferkontrolle) bzw. nur 40 µl ddH<sub>2</sub>O (vollständige Lyse) enthielten. Alle Ansätze wurden für 30 min bei 37° C unter Schütteln (Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Dann wurden 100 µl kaltes GVBS<sup>++</sup> bzw. 100 µl ddH<sub>2</sub>O bei vollständiger Lyse und jeweils 30 µl eingestellter sensitivierter Schaf-Erythrozyten zugegeben. Es wurde für weitere 30 min wie oben beschrieben inkubiert. Dann wurden die Proben auf Eis gestellt, 850 µl kaltes VBS<sup>++</sup> bzw. 850 µl ddH<sub>2</sub>O bei vollständiger Lyse zugegeben und zentrifugiert (2 min, 2.000 xg, 4° C). Die Überstände wurden in Küvetten überführt und die optische Dichte bei 412 nm vermessen. Die Hämolyse wurde dann nach der folgenden Formel berechnet:

$$\% H \ddot{a}molyse = \frac{OD_{412} Serum wert - OD_{412} Pufferkontrolle}{OD_{412} vollst \ddot{a}ndige Lyse - OD_{412} Pufferkontrolle} \times 100\%$$

Im Komplementverbrauchsassay wurden die im Vortest ermittelte Menge Serum und die Proben (max. 20  $\mu$ l) in ein 2 ml Reaktionsgefäß (jeweils Doppelwerte) gegeben und auf 40  $\mu$ l mit GVBS<sup>++</sup> aufgefüllt. Zusätzlich wurden Ansätze der folgenden Kontrollen hergestellt: ermittelte Menge Serum mit GVBS<sup>++</sup> auf 40  $\mu$ l aufgefüllt (Serumkontrolle, 4-5 Proben), 40  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> (Pufferkontrolle) und 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (vollständige Lyse). Alle Ansätze wurden für 3 h bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden 100  $\mu$ l kaltes GVBS<sup>++</sup> bzw. 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O bei vollständiger Lyse und 30  $\mu$ l eingestellte sensitivierte Schaf-Erythrozyten zugegeben und für 30 bis 40 min weiter wie oben beschrieben inkubiert. Dabei wurden nach 15 min eine Serumkontrolle sowie ein Ansatz der vollständigen Lyse nach dem folgenden Prinzip vermessen: Die Proben wurden auf Eis gestellt, 850  $\mu$ l kaltes VBS<sup>++</sup> bzw. 850  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O bei vollständiger Lyse zugegeben und zentrifugiert (4° C, 2.000 xg, 2 min). Die Überstände wurden in Küvetten überführt und die optische Dichte bei 412 nm vermessen. Die Lyse wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\% H \ddot{a}molyse = \frac{OD_{412} Serum kontrolle - OD_{412} Puffer kontrolle}{OD_{412} vollst \ddot{a}ndige Lyse - OD_{412} Puffer kontrolle} \times 100\%$$

Lag der Wert der Serumkontrolle deutlich unter 80% des vollständigen Lyse-Wertes, wurde nach weiteren 10 min Inkubation eine zweite Serumkontrolle entnommen und wie oben beschrieben vermessen. Wurde ein Wert von 70 bis 80% Hämolyse erreicht, wurden alle Ansätze nach dem selben Prinzip vermessen und ausgewertet. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Messreihen wurden die Werte auf die jeweiligen Serumkontrollen bezogen.

#### 2.2.6.4 Festphasen-Komplementverbrauchsassay

#### 2.2.6.4.1 Immobilisierung über Strep-Tactin

Zur Charakterisierung der Komplement-verbrauchenden Aktivität der rekombinanten Strep-tagII-C3/CVF-Hybride wurde ein Festphasen-Assay durchgeführt. Dabei wurden die Proteine über ihren Strep-tag an eine mit Strep-Tactin beschichtete ELISA-Platte gebunden. Anschließend kann durch Zugabe von Serum die Aktivität bestimmt werden.

Dazu wurden in den Vertiefungen einer ELISA-Platte (Greiner, Frickenhausen) 3  $\mu$ g Strep-Tactin, in 40  $\mu$ l Inkubationslösung verdünnt, über Nacht bei 4° C an die Plattenoberfläche immobilisiert. Anschließend wurden die Plattenvertiefungen dreifach mit jeweils 200  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und danach mit 200  $\mu$ l 3% BSA in PBS für 5 h bei RT blockiert. Nach erneutem dreifachem Waschen wurden verschiedene Volumina der Überstände oder Proben in eine Vertiefung gegeben. Die Proteinkonzentrationen in den Überständen wurden vorher densitometrisch quantifiziert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4° C unter Schütteln wurde dreifach mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden GVBS<sup>++</sup> und die in der Serumtitration ermittelte Menge Serum zugegeben, so dass ein Volumen von 60  $\mu$ l erreicht wurde. Die ELISA-Platte wurde mit einem Parafilm abgedichtet und auf dem Boden eines Inkubationsschüttlers befestigt. Anschließend wurde 3 h bei 37° C bei 150 rpm inkubiert. Die Überstände wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, und nach Zugabe von 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierter Erythrozyten wurde wie im Komplementverbrauchsassay beschrieben verfahren.

#### 2.2.6.4.2 Immobilisierung über scFv

Zur Charakterisierung der Komplement-verbrauchenden Aktivität des CVF wurde ein Festphasen-Assay durchgeführt, bei dem CVF über die rekombinanten Antikörper-Fragmente immobilisiert wurde. Dazu wurde in den Vertiefungen einer ELISA-Platte (Greiner, Frickenhausen) 1 µg scFv, in 100 µl Inkubationslösung verdünnt, über Nacht bei 4° C auf der Plattenoberfläche immobilisiert. Anschließend wurde CVF gebunden und der Komplementverbrauchsassay wie bei der Immobilisierung über Strep-Tactin beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.6.5 Bystander Lysis-Assay

Dieser Test zum Nachweis der hämolytischen Aktivität basiert auf der Flüssigphasen-C5-Aktivierung und kann durch die Lyse von nicht-sensitivierten Meerschweinchen-Erythrozyten bestimmt werden (Vogel, 1985). Das Ausmaß der Komplement-Aktivierung wird dabei durch die photometrische Bestimmung des freigesetzten Hämoglobins bestimmt.
Hierzu wurden verschiedene Mengen eines zu untersuchenden Proteins in 20  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> verdünnt, mit 20  $\mu$ l Meerschweinchenserum (Sigma, Taufkirchen) und 20  $\mu$ l Meerschweinchen-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 3 h bei 37° C unter Schütteln inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem VBS<sup>++</sup>-Puffer gestoppt, die Erythrozyten abzentrifugiert (2000 xg, 4° C, 2 min) und das freigesetzte Hämoglobin im Überstand durch Messung der Extinktion bei 412 nm bestimmt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit 20  $\mu$ l Erythrozyten und 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (vollständige Lyse) bzw. 20  $\mu$ l Meerschweinchenserum, 20  $\mu$ l Erythrozyten und 20  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> (Serumkontrolle).

#### 2.2.6.6 Faktor B-Bindungsanalyse

Zur quantitativen Bestimmung der Bindung von Faktor B an CVF, hC3 und das Hybrid H6 wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt. Dazu wurde in den Vertiefungen einer ELISA-Platte 1 µg anti-Strep-tagII-Antikörper, in 40 µl Inkubationslösung verdünnt, über Nacht bei 4° C auf der Plattenoberfläche immobilisiert. Anschließend wurde mit 150 ng St-CVF, St-C3 und St-H6 inkubiert. Nachfolgend wurden die Plattenvertiefungen dreifach mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen und danach mit 100 µl 3% BSA in PBS für 1 h bei RT blockiert. Nach erneutem dreifachem Waschen wurden die immobilisierten Proteine mit verschiedenen Verdünnungen von Faktor B (12 µg/ml-3 µg/ml) in PBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub>, denen auch 0,5 µg/ml Faktor D (Sigma, Taufkirchen) zugefügt wurde, für 2 h bei 37° C inkubiert. Danach wurde dreifach gewaschen und mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung anti-Faktor B-Antikörper in 1,5% BSA in PBS bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder dreifach gewaschen und mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung anti-Ziege-POD-Konjugat in 1,5% BSA in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100 µl Detektionslösung (für POD) entwickelt. Nach der Farbreaktion wurde die Extinktion bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer vermessen.

#### 2.2.6.7 Faktor H-Bindungsanalyse

Zur quantitativen Bestimmung der Bindung von Faktor H an CVF, hC3 und das Hybrid H6 wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt. Dazu wurde in den Vertiefungen einer ELISA-Platte 1  $\mu$ g anti-Strep-tagII-Antikörper, in 40  $\mu$ l Inkubationslösung verdünnt, über Nacht bei 4° C auf der Plattenoberfläche immobilisiert. Anschließend wurde mit 150 ng St-CVF, St-C3 und St-H6 inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreifach mit jeweils 200  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und danach mit 100  $\mu$ l 3% BSA in PBS für 1 h bei RT blockiert. Nach erneutem dreifachem Waschen wurden die immobilisierten Proteine mit verschiedenen Verdünnungen von Faktor H (3  $\mu$ g/ml-0,3  $\mu$ g/ml) in PBS für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer 1:1000 Verdünnung anti-Faktor H-Antikörper in 1,5% BSA in PBS bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer 1:1000 Verdünnung anti-Kaninchen-POD-Konjugat in 1,5% BSA in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Farbreaktion wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l einer Schließlich wurde dreifach gewaschen und mit 100  $\mu$ l Detektionslösung (für POD) entwickelt. Nach der Farbreaktion wurde die Extinktion bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer vermessen.

### 2.2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.2.7.1 Kultivieren und Passagieren von COS-7- und HEK293-Zellen

Die COS-7-Zellen oder HEK293-Zellen wurden im Inkubator (Heraeus Instruments Begasungsbrutschrank 6060) in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37° C kultiviert. Das Wachstum erfolgte in DMEM-Medium (Gibco/BRL, Eggenstein), dem 10% FKS (Biochrom, Berlin) zugesetzt wurden.

Sobald die Zellen konfluent in den Gewebekulturflaschen (75 cm<sup>3</sup>, Cellstar, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) gewachsen waren, wurden sie in eine neue Kulturflasche passagiert (ca. alle drei Tage). Der Zellüberstand wurde hierfür abgesogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurde 4 ml Trypsin/EDTA (Gibco BRL, Eggenstein) gegeben und für 5 min im Inkubator inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden wurde dann durch leichtes Klopfen unterstützt und unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei nahezu vollständiger Ablösung wurde der Vorgang durch Zugabe von 8 ml Serum-haltigem Medium gestoppt, die Suspension wurde in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1.000 xg, RT) pellettiert. Der Überstand wurde abgesogen, das Pellet in 10 ml Serum-haltigem Medium resuspendiert und 1 bis 3 ml der Zellsuspension in eine neue Gewebekulturflasche gegeben und mit Serum-haltigem Medium bis zu einem Endvolumen von 13 ml aufgefüllt.

### 2.2.7.2 Kultivieren und Passagieren von CHO-Zellen

Das Wachstum der Zellen erfolgte in Serum-haltigem GMEM-Medium (10% FKS). Das Kultivieren und Passagieren der CHO-Zellen erfolgte analog zu der Passage der COS-7-Zellen.

### 2.2.7.3 Kryokonservieren und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, nach der Zentrifugation (5 min, 1.000 xg) jedoch in FKS mit 10% DMSO resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml in ein Kryoröhrchen (Cryo Tube Vials, Nunc, Wiesbaden) überführt, zunächst für 2 h bei –20° C, dann über Nacht bei -80° C eingefroren und schließlich mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Nach dem Auftauen des Zellaliquots wurde die Zellsuspension in 10 ml Serum-haltigem Medium für den entsprechenden Zelltyp aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 1.000 xg, RT). Der Überstand wurde abgesogen, die Zellen in 13 ml Serum-haltigem Medium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>3</sup> Kulturflasche überführt.

### 2.2.7.4 Transfektion

Zur Expression in mammalen Systemen wurde der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande) mit den entsprechenen Genen durch das Geneporter-Reagenz (Peqlab, Erlangen) in die Zellen eingebracht.

Die DNA (1 bis 4  $\mu$ g) und 10-15  $\mu$ l GenePorter Transfektionsreagenz wurden jeweils in 500  $\mu$ l Serum-freiem Medium verdünnt und dann vereint. Der Ansatz wurde bei RT für

45 min inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen, die ca. 24 h vorher in eine 6-Well-Platte passagiert wurden (300 bis 500 μl Zellsuspension mit 2 ml Serum-haltigem Medium pro Well; TC-Plate, 6-Well, Greiner Labortechnik, Frickenhausen), mit PBS gewaschen. Dann wurde das DNA-GenePorter-Gemisch vorsichtig auf die Zellen getropft und die Sechs-Well-Platte in den Inkubator gestellt. Nach 3 h wurde das Medium gegen 2 ml Serum-haltiges Medium ausgetauscht und das Wachstum erfolgte für 2-3 Tage im Inkubator.

Bei der Nutzung von Nutridoma HU (100x; Roche Diagnostics, Mannheim) wurden die Zellen nach der Transfektion in Serum-freien Medium mit Nutridoma HU versetzt und ebenfalls 2-3 Tage im Inkubator wachsen gelassen.

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA und gegebenenfalls als Positivkontrolle ein Ansatz mit 1  $\mu$ g pEGFP-N1 angesetzt. Das Plasmid pEGFP-N1 kodiert für das grünfluoreszierende Protein (GFP) und kann zur Bestimmung der Transfektionseffizienz genutzt werden, da GFP-exprimierende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Der Überstand der mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen wurde bereits nach 24 h abgenommen, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 500  $\mu$ l Trypsin/EDTA versetzt. Das Ablösen der Zellen erfolgte für 5 min im Inkubator. Dann wurden 2 ml PBS zugegeben und die Zellsuspension zur Zentrifugation (5 min, 1000 xg, RT) in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Davon wurden 10  $\mu$ l in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zahl der fluoreszierenden Zellen und die Gesamtzahl aller Zellen in den vier äußeren Quadraten gezählt.

Berechnung der Zellzahl pro Milliliter:

 $Zellen / ml = \frac{Zellzahl \ aller \ Quadrate}{4} \times 10^{4}$ 

Berechnung der Transfektionseffizienz:

Effizienz (%) =  $\frac{Zahl \ der \ fluorenzierenden \ Zellen}{Zellzahl \ aller \ Quadrate} \times 100\%$ 

#### 2.2.7.5 Expression unter Selektionsdruck

Zur Erhöhung der Ausbeuten wurde die Generierung stabil exprimierender Linien angestrebt, wobei die Ansätze der transienten Expression durch Zugabe von Antibiotikum in Kultur gehalten und subkultiviert wurden. Je nach Resistenz wurden 10  $\mu$ l/ml Kultur-medium einer Stammlösung des Antibiotikums G418 oder 5  $\mu$ l/ml Kulturmedium Zeocin zugegeben.

#### 2.2.7.6 Expression in Serum- oder Protein-freiem Medium

Zur Kultivierung im Serum- oder Protein-freiem Medium wurden die Zellen schrittweise mit SCF30- bzw. Mampf3-Medium (Promocell, Heidelberg) mit 1 mM L-Glutamin adaptiert. Bei jeder zweiten Passage wurde dabei der prozentuale Anteil der Serum- bzw. Protein-freien Medien um 25% erhöht. Ansonsten wurde wie beschrieben passagiert.

### 2.2.7.7 Monoklonalisierung

Um eine einheitliche Zellpopulation zu erhalten, wurde eine Monoklonalisierung durchgeführt, wobei die verschiedenen Zellen monoklonalisiert, expandiert und anschließend durch Westernblot und Immunprinting auf ihren Expressionslevel untersucht wurden.

Dazu wurden nach der Transfektion die gesamten Zellen 3-4 Passagen unter Selektionsdruck inkubiert, um zu gewährleisten, dass ein großer Teil der Zellen die Resistenz enthält und somit das Zielprotein exprimiert. Diese Prozedur erlaubt die Zellzahl pro ml, die anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurde, ungefähr mit der Anzahl an Zellen gleich zu setzen, die das Zielprotein exprimieren. Anschließend wurde die Zellendichte auf 1 Zelle pro 100 µl Medium mit 10% FKS eingestellt und je 100 µl dieser Verdünnung in 48-96 Vertiefungen einer 96-Well-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) eingebracht. Nach ca. 1 Woche wurde das Medium abgesaugt und 100 µl Medium mit 10% FKS dazugegeben. Nach ca. 2 Wochen wurden die Vertiefungen unter dem Mikroskop auf 1 Kolonie pro Vertiefung untersucht. Einige davon wurden ausgewählt und die Zellen mit 25 µl Trypsin für 5 min bei 37° C abgelöst und vollständig in eine mit 500 µl Medium mit 10% FKS gefüllte Vertiefung einer 24-Well-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) gegeben. Nach einer Woche wurde dieses mit 100 µl Trypsin wiederholt und die Zellen wurden zur Gänze in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben. Nach abermals 3-4 Tagen wurden je Vertiefung 100 µl Überstand entnommen und im Westernblot mit anschließendem Immunprinting auf Expression untersucht. Die Zellpopulation, die letztendlich die stärkste Bande zeigte, wurde weiter unter Selektionsdruck exprimiert und gegebenenfalls kryokonserviert.

### 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression und Charakterisierung von CVF und C3

### 3.1.1 Expression von CVF und C3 in Mammalia

Als Expressionssystem für CVF, humanes C3 und die Hybride sollten im Rahmen dieser Arbeit Säugerzellen etabliert werden. Die nachfolgende Charakterisierung der Komplement-verbrauchenden Aktivität der Proteine im Überstand der transienten Expression sollte langwierige Reinigungsprozeduren umgehen und die Generierung und Charakterisierung diverser Hybride ermöglichen.

Zur Expression des rekombinanten CVF und humanen C3 standen verschiedene Säugerzelllinien zur Verfügung. Um einen Vergleich möglicher Ausbeuten führen zu können, wurde CVF in CHO-, COS-7- und HEK293-Zellen exprimiert und die Ausbeuten an rCVF im Immunoblot detektiert (Abb. 18). Die auf der Grundlage eines Immunoblots durchgeführte densitometrische Quantifizierung ergab Ausbeuten an CVF im Überstand der COS-7-Zellen von 1-3 mg/l, bei der Verwendung von HEK293-Zellen von 0,5-1,5 mg/l und im Überstand der CHO-Zellen von 1-1,5 mg/l.

Humanes C3 wurde ebenfalls in allen drei Zelllinien erfolgreich exprimiert, dabei lagen die Ausbeuten mit 1-4 mg/l etwas höher und bestätigten die Literaturwerte (Fecke *et al.*, 1998) (Abb. 17). Beide rekombinanten Proteine zeigten ein apparentes Molekulargewicht von 210 kDa.

Für alle weiteren Expressionen wurden CHO-Zellen verwendet, da sie gegenüber COS-7-Zellen die Möglichkeit der stabilen Integration bieten und bessere Ausbeuten an CVF und C3 als HEK293-Zellen aufwiesen. Da sowohl für CVF als auch für humanes C3 Expression gezeigt werden konnte, wurden CHO-Zellen als Expressionssystem für alle Hybride aus CVF und humanem C3 verwendet.



# Abb. 17. Immunoblot der Expression von rCVF und humanem C3 in verschiedenen Säugerzelllinien.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem Nassblot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurden polyklonale Seren gegen nCVF (1:1.000) oder hC3 (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

### 3.1.2 Kettenstruktur des rekombinanten CVF

Um die Prozessierung des in CHO-Zellen exprimierten CVF zu analysieren, wurde das Protein unter reduzierenden Bedingungen im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Ketten des CVF-Moleküls analysiert. Der rekombinante CVF wird offensichtlich in eine zweikettige Struktur prozessiert, wobei die  $\gamma$ - und die  $\beta$ -Kette sowie die zu den "C3d"- und "C3a"-homologen Regionen als eine singuläre Kette vorliegen. Die  $\alpha$ -Kette mit einem Molekulargewicht von 68 kDa zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 70 kDa, wobei die  $\gamma$ - und die  $\beta$ -Kette mit 32 kDa bzw. 48 kDa als eine Kette prozessiert werden und mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 kDa der  $\alpha$ -Kette von humanem C3 entsprechen (Abb. 18).

Die Analyse zeigte, dass die Prozessierung des rekombinanten CVF in Säugerzellen der bereits gezeigten Prozessierung in Insektenzellen entspricht (Kock, 1996; Wehrhahn, 2000).



#### Abb. 18. Immunoblot der Kettenstruktur des rCVF.

Die Proben wurden durch eine 10% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem Nassblot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurden spezifische polyklonale Antiseren gegen die CVF  $\alpha$ - (1:100), $\beta$ - (1:50) oder  $\gamma$ -Kette (1:100) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

### 3.1.3 Aktivitätsuntersuchungen des rCVF im Überstand

Zur Charakterisierung der Komplement-verbrauchenden Aktivität des rekombinanten CVF wurde der Überstand zusammen mit Kontrollüberstand ohne rekombinantes Protein in einem Komplementverbrauchsassay analysiert (Abb. 20).

In einem Komplementverbrauchsassay werden die Proben mit einer bestimmten Menge an humanem Serum (NHS) inkubiert, welches je nach Aktivität in unterschiedlichem Maße verbraucht wird. Nach Zugabe von Antiköper-belegten Erythrozyten kann das unverbrauchte Serum diese Erythrozyten lysieren und anschließend die Menge des freigesetzten Hämoglobins im Überstand photometrisch vermessen werden. Um eine Reproduzierbarkeit des Assays zu gewährleisten, muss das Volumen des Serums bestimmt werden, das nach der Inkubation in der Lage ist, ca. 80% der eingesetzten Erythrozyten zu lysieren. Dazu wurde eine Serumeinstellung durchgeführt, die Ergebnisse graphisch aufgetragen (Abb. 19) und anschließend das ermittelte Volumen des Serums in den Komplementverbrauchsassays eingesetzt.

Von dem aus Vollblut isolierten Serum ergaben sich dabei je nach Aktivität Volumina von 8-13 µl.



#### Abb.19. Lyse von sensitivierten Erythrozyten mit humanem Serum.

Verschiedene Mengen des humanen Serums wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen.





Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serum-kontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Der Komplementverbrauchsassay mit rCVF im Überstand der transienten Expression ergab keine nachweisbare Aktivität für Reduktion der Hämolyse gegenüber dem Kontrollüberstand. Die Komplement-verbrauchende Aktivität des rCVF im Überstand der transienten Expression konnte nicht nachgewiesen werden, was auf eine zu geringe Konzentration des rekombinanten Proteins im Überstand oder auf interferierende Komponenten zurückzuführen ist.

### 3.1.4 Partielle Reinigung und Konzentrierung des rCVF

Zur Evaluierung, inwiefern niedermolekulare Bestandteile des Überstandes eine Analyse der Komplement-verbrauchenden Aktivität verhindern oder die Proteinkonzentration des rekombinanten CVF im Überstand zu gering war, wurden verschiedene Reinigungs- und Konzentrierungsprozeduren mit dem CVF-haltigen Überstand der Expression durch-geführt. Zur Abtrennung der interferierenden Komponenten wurde der Überstand von CHO-Zellen mit rCVF und der Überstand ohne rCVF gegen PBS dialysiert, das Protein 10fach konzentriert, die niedermolekularen Bestandteile unter Verwendung einer PD-10 Säule abgetrennt oder die Überstände über eine EconoPac High S-Säule gereinigt. Die Proben und die einzelnen Elutionsfraktionen wurden anschließend in einem Immunoblot analysiert (Abb. 21). Anschließend wurden die Proben und die entsprechenden Kontrollfraktionen in einem Komplementverbrauchsassay analysiert (Abb. 23).

Trotz der verschiedenen Reinigungsprozeduren zeigte sich im anschließenden Komplementverbrauchsassay keine signifikante Reduktion der Hämolyse der rCVF-enthaltenden Proben gegenüber den Kontrollen. Selbst das konzentrierte Protein zeigte keine Komplement-verbrauchende Aktivität.

Die Resultate zeigten, dass eine Charakterisierung der Komplement-verbrauchenden Aktivität des rekombinanten CVF im Überstand der transienten Expression nicht möglich ist, da im Überstand Komponenten vorliegen, die die Aktivitätsmessungen störend beeinflussen.



# Abb. 21. Immunoblot der partiellen Reinigungsprozeduren des Überstandes der transienten Expression mit rCVF.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem Nassblot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurde polyklonales Serum gegen CVF (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.





Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.5 Transiente Expression von rCVF im Serum- oder Protein-freien Medium

Um zu untersuchen, inwiefern das fötale Kälberserum interferierende Komponenten beinhaltet, wurden CHO-Zellen transfiziert und anschließend in Serum-freiem Medium unter der Verwendung von Nutridoma als Serumersatzstoff kultiviert. Zusätzlich wurde eine stabile Zelllinie generiert und schrittweise an Serum-freies bzw. Protein-freies Medium adaptiert. Die Expression von rCVF in den verschiedenen Überständen wurde in einem Immunoblot densitometrisch analysiert. Dabei wurden vergleichbare Ausbeuten unter Verwendung von Nutridoma sowie bei einer Kultivierung in Serum-freiem Medium ermittelt, während die Kultivierung der Zellen in Protein-freiem Medium eine Reduktion in der Ausbeute aufwies (Abb. 23).



**Abb. 23. Immunoblot der Expression von rCVF in Serum- bzw. Protein-freien Medien.** Die Proben wurden durch eine 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem Nassblot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurde ein polyklonales Serum gegen CVF (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

Die Proben wurden anschließend in einem Komplementverbrauchsassay untersucht (Abb. 24). Auch hier konnte jedoch keine signifikante Reduktion der Hämolyse durch rCVF gegenüber den entsprechenden Kontrollen nachgewiesen werden.



Abb. 24. Komplementverbrauchsassay von rCVF in Serum- bzw. Protein-freien Medien.

Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serum-kontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

An den Verhältnissen der Hämolyse der rCVF-haltigen Proben im Vergleich zur Kontrolle lässt sich verdeutlichen, dass keine der Strategien der Reinigung oder Konzentrierung eine verwendbare Methode darstellt (Tabelle 7). Offensichtlicht beinhaltet das Serum nicht die interferierenden Bestandteile und es handelt sich dabei auch nicht um niedermolekulare Komponenten.

	Verhältnis rCVF/Kontrolle
rCVF	0,98
rCVF, dialysiert	0,95
rCVF, konzentriert	0,82
rCVF, PD-10	0,90
rCVF, EconoPac	0,82
rCVF, Nutridoma	1,02
rCVF, Serum-frei	0,98
rCVF, Protein-frei	0,98

Tabelle 7. Verhältnis der Hämolyse des rCVF und des partiell gereinigten rCVF zur Kontrolle.

Eine spezifische Immobilisierung der rekombinanten Proteine und die resultierende selektive Abtrennung der höhermolekularen inhibierenden Bestandteile könnte eine Charakterisierung der Proteine ermöglichen.

### 3.2 Konzeption und Etablierung eines Festphasen-Assays

Der entwickelte Assay beinhaltet die Immobilisierung der Hybride als Strep-tagII-Fusionsproteine an Strep-Tactin, welches auf der Oberfläche von ELISA-Platten gebunden ist. Die anschließende Zugabe von Puffer und Serum sollte eine Durchführung des Komplementverbrauchsassays in der ELISA-Platte ermöglichen.

Zur Immobilisierung wurde der Strep-tagII gewählt, ein Peptid aus 8 Aminosäuren (WSHPQFEK). Mit einer Dissoziationskonstante von 1  $\mu$ M zu Strep-Tactin eignet sich der Strep-tag zur gerichteten Immobilisierung, sowie zur Reinigung und Detektion von Proteinen.

### 3.2.1 Fusion eines Affinitätstags an CVF und C3

Für die Durchführung des entwickelten Festphasen-Assays ist die Präsenz des Affinitätstags essentiell. Die zu untersuchenden Proteine benötigen einen Fusionstag, daher wurden in der cDNA von CVF und C3 zwischen Signalsequenz und N-Terminus der Strep-tagII und die Enterokinase-Schnittstelle insertiert, die eine spätere Abspaltung des Affinitätstags erlaubt.

Unter Verwendung der CVF-cDNA wurden durch zwei PCR-Ansätze mit den Oligonukleotiden S35 und AS26 und mit den Oligonukleotiden S23 und AS34 zwei Amplifikate generiert und diese mittels einer PCR hybridisiert. Durch einen anschließenden Restriktionsverdau und eine Ligation wurde das Amplifikat über die Schnittstellen KpnI und Eco72I in einen analog geschnittenen pcDNA3CVF-Vektor insertiert.

Analog dazu wurde mit der cDNA von humanem C3 verfahren. Mit den Oligonukleotiden S01 und AS36 und S37 und AS03 wurden Amplifikate generiert und hybridisiert. Zur Insertion wurden dabei die Schnittstellen NotI und Bpu1102I verwendet.

Anschließend wurden St-CVF und St-C3 erfolgreich in CHO-Zellen exprimiert. Die auf der Grundlage eines Immunoblots durchgeführte densitometrische Quantifizierung ergab hierbei Ausbeuten, die in dem Bereich der entsprechenden Ausbeuten der Wildtyp-Proteine lagen (Abb. 25).



#### Abb. 25. Immunoblot der Expression von St-CVF und St-C3.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurde ein polyklonales Serum gegen CVF (1:1.000) oder gegen C3 (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

### 3.2.2 Evaluierung der Assaybedingungen

Zur Etablierung dieses Festphasen-Assays, der die Möglichkeit bieten soll, Proteine direkt nach der transienten Expression zu charakterisieren, wurde eine Evaluierung der Bedingungen durchgeführt. Die Basis der Evaluierung ist die Adaption des Komplementverbrauchsassays an ein Festphasen-Format. Um die geeignetsten Bedingungen zu bestimmen, wurde nativer CVF unter Variation verschiedener Parameter in einem Komplementverbrauchsassay in einer ELISA-Platte eingesetzt.

Zur Inkubation der Proben in der ELISA-Platte unter Schütteln bei 37°C stand ein herkömmlicher Inkubationsschüttler zur Verfügung. Um die Bedingungen zu optimieren, wurden die Ansätze bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten vermessen, um eine ausreichende Durchmischung der Proben sicherzustellen, die für den Assay notwendig ist.

Weitere Ansätze wurden mit unterschiedlich langen Präinkubationszeiten analysiert, um repräsentative Messwerte für den erwarteten Proteinkonzentrationsbereich von 20-200 ng Protein zu erhalten.

Die Messwerte der durchgeführten Komplementverbrauchsassays mit nCVF bei jeweils 100, 150 und 200 rpm und mit unterschiedlichen Präinkubationszeiten sind in Abb. 26-28 grafisch dargestellt.

Die besten Ergebnisse konnten bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 150 rpm und einer Präinkubationszeit von 3 Stunden erzielt werden, da die Proben mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen signifikant unterscheidbare Werte repräsentierten.

Die Mittelwerte der Hämolyse mehrerer Proben der Inkubation bei 200 rpm wurden nicht angegeben, da die Werte auf Grund der offensichtlich ungünstigen Assaybedingungen große Standardabweichungen aufzeigten.





Der Komplementverbrauchsassay wurde in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 1 h, 3 h und 5 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 100 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und unter Schütteln im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2.000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.



#### Abb. 27. Komplementverbrauchsassay bei 150 rpm.

Der Komplementverbrauchsassay wurde in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 1 h, 3 h und 5 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und unter Schütteln im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2.000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.





Der Komplementverbrauchsassay wurde in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 1 h, 3 h und 5 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 200 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und unter Schütteln im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2.000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte für 200 ng und 80 ng CVF bei 5 h Inkubation und alle Werte für 1 h und 3 h konnten nicht ausgewertet werden, da sie große Abweichungen aufzeigten.

### 3.2.3 Aktivitätsuntersuchungen der Strep-tag-Fusionsproteine

Eine Voraussetzung des Festphasen-Assays ist die Zugänglichkeit des Strep-tag-Fusionspeptids, die in einer ELISA-Analyse überprüft wurde. Die Fusionsproteine St-CVF und St-C3 wurden selektiv an Strep-Tactin auf der Oberfläche einer ELISA-Platte immobilisiert, wobei der Nachweis der Zielproteine mit den polyklonalen Seren erfolgte. Beide Proteine konnten immobilisiert und nachgewiesen werden, hiermit konnte die Zugänglichkeit des Strep-tags gezeigt werden (Abb. 29).



**Abb. 29. Strep-Tactin-ELISA der Expression von St-CVF und St-C3.** Nach der Immobilisierung von Strep-Tactin auf der ELISA-Platte wurden die rekombinanten Proteine gebunden und mit einem polyklonalen Seren gegen CVF (1:1.000) bzw. C3 (1:1.000) und einem anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:1.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

Die Konzentration der beiden Proteine im Überstand der transienten Expression wurde auf der Grundlage eines Immunoblots densitometrisch quantifiziert, wobei jeweils die polyklonalen Seren gegen C3 und CVF eingesetzt wurden. Die quantifizierten rekombinanten Proteine wurden dann in vergleichbaren Konzentrationen an Strep-Tactin immobilisiert und unter den evaluierten Bedingungen in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt (Abb. 30).

Dabei konnte erstmalig die Aktivität des rekombinanten, in Mammalia exprimierten CVF durch eine signifikante Reduktion der Hämolyse gegenüber humanem C3 bewiesen werden.



#### Abb. 30. Festphasen-Assay mit St-CVF und St-C3.

Über auf der ELISA-Platte immobilisiertes Strep-Tactin wurden die rekombinanten Proteine gebunden. Anschließend wurde ein Festphasen-Assay in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und unter Schütteln im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2.000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die hierbei erhaltenen positiven Ergebnisse belegen dabei auch, dass der etablierte Festphasen-Komplementverbrauchsassay als effektive Methode für die Charakterisierung der Hybride aus CVF und humanem C3 zur Verfügung steht.

## **3.3 Generierung und Charakterisierung der Hybride aus CVF und C3**

Durch die Konstruktion von Hybriden aus CVF und humanem C3 sollten funktionell nicht relevante Proteinbereiche in CVF identifiziert werden. Ein Kassettenaustausch größerer Bereiche zwischen CVF und humanem C3 ist durch die Generierung einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle in CVF möglich. Die cDNA von humanem C3 wird durch das Restriktionsenzym BglII zweifach geschnitten, so dass drei größere Fragmente entstehen.

In beiden Molekülen können diese Fragmente dann gegen die homologen Fragmente des jeweils anderen Moleküls ausgetauscht werden.

In einem weiteren Ansatz sollten die Bindungsstellen von Faktor B, Faktor H, CR1 und die Spaltungsstellen der Protease Faktor I von humanem C3 gegen die homologen Regionen in einem CVF-Molekül ersetzt werden.

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die gesamte CVF- $\alpha$ -Kette ohne einen Verlust der Aktivität des Moleküls gegen coC3 ausgetauscht werden kann (Wehrhahn, 2000). Um zu analysieren, inwiefern sich diese Resultate auf einen Austausch gegen humanes C3 übertragen lassen, wurden die Konstrukte H1 und H2 (für Hybrid 1 und 2) entwickelt. Hierbei sollte die  $\alpha$ -Kette von CVF gegen die analoge homologe C3- $\beta$ -Kette ausgetauscht werden. Zusätzlich sollte im Konstrukt H1 ein weiterer Bereich am 3'-Terminus des CVF-Moleküls gegen C3 ersetzt werden (Abb. 31).



Abb. 31. Schematische Abbildung der Konstrukte H1 und H2A: Kettenstrukturen von C3 und pro-CVFB: Aufbau der cDNA von CVF, H1, H2 und C3. Die Positionen der BglII-Restriktionsschnittstellen sind gezeigt.

Zur Klonierung dieser Konstrukte wurde die im C3-Molekül zweifach vorkommende BglII-Schnittstelle genutzt. An den homologen Regionen in CVF liegt nur an einer dieser Positionen eine BglII-Schnittstellen vor, weshalb in vorherigen Arbeiten in der cDNA von CVF an der zweiten homologen Position mit Hilfe von Oligonukleotiden ebenfalls eine BglII-Schnittstelle eingeführt wurde, resultierend wurde der Vektor pUC18CVF\* erhalten. Die Insertion der Schnittstelle ermöglicht einen Kassettenaustausch zur Generierung hybride Konstrukte aus CVF und humanem C3.

### 3.3.1 Klonierung der Konstrukte H1 und H2

Aus dem Vektor pUC18CVF\* und dem vorliegenden pUC18hC3, der die cDNA von C3 in voller Länge beinhaltet, wurden durch Kassettenaustausch die Konstrukte H1 und H2 erzeugt. Dazu wurde für die Klonierung von H1 aus dem C3-Klon durch BglII-Restriktion die mittlere Region der C3-cDNA herausgeschnitten, aus pUC18CVF\* mit Hilfe der neuen BglII-Schnittstelle die homologe Region isoliert und mit den Vektor ligiert. Anschließend wurde das Konstrukt über Restriktion mit XbaI, einem nachfolgenden Abbau der kohäsiven Überhänge mit *Mung Bean* Nuklease und einer Restriktion mit NotI in einen analog geschnittenen pcDNA3-Vektor insertiert (Abb.32).

Zur Klonierung von H2 wurde aus pUC18CVF\* mittels Ecl136I- und BgIII-Restriktion ein Fragment bestehend aus pUC18 und dem 3'-Terminus von CVF gewonnen und mit einem Fragment aus C3 ligiert, welches aus pcDNA3hC3 mittels einer Restriktion mit EcoRI, einem nachfolgenden Abbau mit *Mung Bean* Nuklease und einer BgIII-Restriktion gewonnen wurde. Dieses Fragment mit einer Größe von 1870 bp enthielt den 5'-Terminus von der C3-cDNA. Der in dieser Art ligierte Vektor (bezeichnet als H2Δ2307 bp) enthält 1800 bp des C3 5'-Terminus und 1000 bp des CVF 3'-Terminus. Um das Konstrukt H2 zu vervollständigen wurde das Plasmid pUC18CVF\* und der Vektor H2Δ2307 bp mit BgIII geschnitten und die mittlere Region der CVF-cDNA in den Vektor H2Δ2307 bp insertiert (Abb. 33). Das entstehende Konstrukt H2 wurde anschließend über die EagI-Schnittstellen in einen analog geschnittenen pcDNA3-Vektor insertiert.

Analog zur Klonierung des Strep-tags wurde ebenfalls bei den Hybriden zwischen die Signalsequenz und den N-Terminus der Strep-tag sowie die Enterokinase-Schnittstelle insertiert.



Abb. 32. Schematische Abbildung der Klonierung von H1.



Abb. 33. Schematische Abbildung der Klonierung von H2.

### 3.3.2 Konstruktion weiterer Hybride

Für die Klonierung der Konstrukte mit humanen Bindungsstellen für verschiedene Komplementproteine wurden in der CVF-cDNA sechs mögliche Schnittstellen identifiziert, die stromabwärts und stromaufwärts der relevanten Bindungsstellen liegen würden, zusätzlich sind die Schnittstellen durch stille Mutationen generierbar.

In Abb. 34 sind neben den zu untersuchenden Bindungsstellen (A) die möglichen Konstrukte dargestellt (B). Die Lage der Schnittstellen ermöglicht es, sowohl die Bindungsstellen zu humanisieren, um Hybride zu generieren, die eine möglicherweise modulierte Bindungsaffinität oder eine veränderte Komplement-verbrauchende Aktivität besitzen als auch die Bereiche zwischen den Bindungsstellen gegen humanes C3 auszutauschen. Die gewählten Schnittstellen Pfl23II und PpuMI fassen dabei die Faktor B- und Faktor H-Bindungsstelle ein, während die Schnittstellen XhoI und Psp5II die zweite Faktor B-Bindungsstelle umgrenzen. Die Schnittstellen SacII und NheI umfassen den Bereich der Faktor H-Bindung und die Spaltungsstellen für die Protease Faktor I.



### Abb. 34. Schematische Abbildung der möglichen Konstrukte.

A: Kettenstrukturen von C3 und pro-CVF. Dargestellt sind die Bindungsregionen und Spaltungsstellen für einige Komplementproteine, wie Faktor B, Faktor H, Faktor I und CR1. B: Aufbau der cDNA der Konstrukte, die eine Charakterisierung der gegenüber C3 veränderten Bindungseigenschaften von CVF ermöglichen sollten. Gezeigt sind die durch spezifische Mutation eingeführten Schnittstellen vor und hinter den Bindungsstellen und die Regionen in der CVF-cDNA, die gegen homologe humane Bereiche austauschbar sind.

### 3.3.2.1 Klonierung der Konstrukte H3 und H4

Zur Humanisierung der zweiten Faktor B-Bindungsstelle wurde über die Schnittstellen XhoI und Psp5II die zweite Faktor B-Bindungsstelle aus humanem C3 in die CVF-cDNA insertiert. Über die Schnittstellen SacII und NheI wurde die Region, die die Faktor H-Bindungsstelle und die drei Spaltungsstellen für Faktor I sowie die Bindungsstelle für den CR1 beinhaltet, humanisiert. Die resultierenden Konstrukte wurde als H3 und H4 bezeichnet (Abb. 35).



Abb. 35. Schematische Abbildung der Konstrukte H3 und H4.

A: Kettenstrukturen von C3 und pro-CVF. Dargestellt sind die Bindungsregionen und Spaltungsstellen für entscheidende Komplementproteine, wie Faktor B, Faktor H, Faktor I und CR1.

**B:** Aufbau der cDNA von H3 und H4. Dabei sind jeweils die zweite Faktor B-Bindungsstelle und die Bindungsstellen von Faktor H, CR1 und Spaltungsstellen von Faktor I mit den humanen homologen Regionen versehen.

Die Generierung der beiden weiteren Schnittstellen für die Humanisierung der ersten Faktor B-Bindungsstelle wurde zunächst nicht weiter verfolgt, da parallel durchgeführte Arbeiten zeigten, das keine Veränderung der Aktivität durch die Humanisierung dieser Region der Faktor B-Bindungsstelle beobachtet werden konnte. Die Humanisierung erfolgte jedoch mittels Insertion einer Schnittstelle durch einen Aminosäureaustausch. Eine Verifizierung dieses Ergebnisses ohne Aminosäuremutagenese ist durch das Einfügen der Schnittstellen BsiWI und AfIII und anschließende Humanisierung der Region möglich.

Zur Klonierung der Konstrukte H3 und H4 musste im Vorfeld die CVF-cDNA mit den vier zusätzlichen Schnittstellen versehen werden. Diese wurden, wie in Abb. 36 schematisch

dargestellt, jeweils durch spezifische Mutagenese über eine Hybridisierungs-PCR mit zwei Oligonukleotiden eingefügt.



### Abb. 35. Schematische Abbildung der Insertion der Schnittstellen in die CVF-cDNA.

Zur Insertion der Schnittstellen in der CVF-cDNA wurde zunächst aus pUC18CVF\* mit den Oligonukleotiden S08 und AS09 und mit S10 und AS11 zwei Amplifikate erzeugt, die die Mutationen für die neue Schnittstelle beinhalten. Diese wurden dann in einer PCR hybridisiert und über die Schnittstellen HpaI und MunI in einen analog geschnittenen pUC18CVF\*-Vektor insertiert. Analog dazu wurde mit den Oligonukleotide S12 und AS13b und S14b und AS15II zwei Amplifikate erzeugt. Diese wurden dann in einer PCR hybridisiert und über die Schnittstellen MunI und BstBI in den schon mit zwei zusätzlichen Schnittstellen versehenen pUC18CVF\*A-Vektor insertiert. Die CVF-cDNA in dem resultierenden Vektor beinhaltet vier durch die folgenden Mutationen eingeführte Schnittstellen: XhoI (A2799T, A2800C, G2802A), Psp5II (T2904G), SacII (T3546C) sowie NheI (A3948T, T3949A, C3950G, A3951C). Der Vektor pUC18CVF\*AB wurde anschließend für die Klonierung von H3 und H4 verwendet.

In der mutierten CVF-cDNA wurden die zu den Bindungsstellen homologen Regionen gegen die über PCR amplifizierten humanen Fragmente ersetzt. , wobei die Amplifikate über Oligonukleotidüberhänge mit den für die Klonierung benötigten Schnittstellen versehen wurden. Ein Schema der Klonierung von H3 und H4 ist in Abb. 37 dargestellt.

Zur Klonierung von H3 wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden S18 und AS19 aus der humanen C3-cDNA der analoge Bereich amplifiziert. Über die Schnittstellen XhoI und Psp5II wurde das Fragment anschließend in den Vektor pUC18CVF\*AB insertiert und das Konstrukt über die Schnittstellen KpnI und NotI mit einem analog geschnittenen pcDNA3-Vektor ligiert.

Für die Klonierung von H4 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden S47 und AS48 durchgeführt und in pUC18CVF\*AB und anschließend in pcDNA3 kloniert, wobei die Klonierung des Amplifikates in die CVF-cDNA über die Restriktionsschnittstellen NheI und SacII durchgeführt wurde.

Nachfolgend wurde ein Strep-tag zwischen die Signalsequenz und den N-Terminus insertiert.



Abb. 37. Schematische Abbildung der Klonierung von H3 und H4.

### 3.3.3 Transiente Expression der Hybride H1-H4

Die generierten Hybride wurden in Säugerzellen exprimiert und anschließend erfolgreich in einem Immunoblot detektiert (Abb. 38). Dabei wurde für die Detektion von H1 das polyklonale Serum gegen C3 verwendet, während die anderen Proteine mit dem polyklonalen Serum gegen CVF detektiert wurden. Die Ausbeuten an H1 und H2 konnten nicht eindeutig beurteilt werden, da die Reaktivität der polyklonalen Seren gegenüber den Hybriden H1 und H2 nicht vergleichbar zu der Reaktivität gegenüber den nativen Proteinen ist.

Eine auf Grundlage des Immunoblot durchgeführte densitometrische Quantifizierung der Ausbeute an H3 ergab 0,5-1 mg/l. Das Hybrid H4 konnte im Immunoblot nur durch eine vorherige 25fache Konzentrierung mittels Ultrafiltration nachgewiesen werden. Die Ausbeute an H4 liegt bei ca. 0,02 mg/l, was deutlich unterhalb der Ausbeute der anderen Proteine anzusiedeln ist.



Abb. 38. Immunoblot der Expression von St-H1, St-H2, St-H3 und St-H4.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurde ein polyklonales Serum gegen CVF (1:1.000) bzw. für H1 gegen C3 (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

In einem anschließenden Strep-Tactin-ELISA (Abb. 39) konnten nur die Proteine H1, H2 und H3 erfolgreich nachgewiesen werden.

Für die nachfolgende Charakterisierung wurden die Hybride H1, H2 und H3 in vergleichbaren Konzentrationen an Strep-Tactin immobilisiert und in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt, dabei wurden CVF und humanes C3 als Vergleich ebenfalls charakterisiert (Abb. 40).



**Abb. 39. Strep-Tactin-ELISA der Expressionen von St-H1, St-H2, St-H3 und St-H4**. Nach der Immobilisierung von Strep-Tactin an die ELISA-Platte, wurden die rekombinanten Proteine gebunden und mit den polyklonalen Seren gegen CVF (St-CVF, St-H2, St-H3 und St-H4; 1:1.0000) oder C3 (St-H1 und St-C3; 1:1.000) und einem anti-Kaninchen-POD-Konjugat detektiert (1:1.000). Die Farbentwicklung mit ABTS wurde 405 nm entwickelt.





Über auf der ELISA-Platte immobilisiertes Strep-Tactin wurden die rekombinanten Proteine gebunden. Anschließend wurde ein Festphasen-Assay in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und unter Schütteln im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Proben mit Serum allein eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2.000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dabei zeigte das Hybrid H1 keine dekomplementierende Aktivität, während die Hybride H2 und H3 zu CVF vergleichbare deutliche Aktivitäten zeigten.

Die Ergebnisse belegen, dass die CVF- $\alpha$ -Kette ohne einen Verlust der Komplementverbrauchenden Aktivität gegen humanes C3 ersetzt werden kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die CVF- $\beta$ -Kette nicht durch humanes C3 ausgetauscht werden kann; ihre Humanisierung resultiert in dem inaktiven Hybrid H1. Die Komplementverbrauchende Aktivität des Hybrides H3 zeigte, dass die Insertion der zweiten Faktor B-Bindungsstelle keinen funktionellen Einfluss auf das CVF-Molekül ausübt.

Die Komplement-verbrauchenden Aktivitäten der Hybride, die unter Verwendung des Festphasen-Assays analysiert wurden, sind nur bedingt in Relation zueinander zu setzen, da die densitometrische Quantifizierung der Hybride mit einer hohen Varianz behaftet ist. Die Hybride setzen sich aus zwei verschiedenen Proteinen zusammen, die identische Erkennung durch die polyklonalen Antikörper ist dadurch nicht mehr gewährleistet. H1 weist ca. 75% ige Identität zu humanem C3 auf und wurde mit dem C3-Antiserum detektiert, da das CVF-Antiserum vornehmlich die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette erkennt, während die  $\gamma$ -Kette nur schwach detektiert wird (Wehrhahn, 2000). H2 mit einer Identität von ca. 80% zu CVF wurde entsprechend mit dem CVF-Antiserum detektiert. Von einer Vereinigung von den beiden polyklonalen Seren wurde abgeschen; die Problematik würde dadurch nicht behoben werden, da die Seren unterschiedliche Reaktivitäten gegen die verschiedenen Ketten aufweisen.

# 3.4 Selektion, Expression und Verwendung löslicher Antikörper-Fragmente

Zur Generierung monoklonaler Antikörper-Fragmente gegen CVF und C3, die eine Quantifizierung, eine Reinigung oder eine Detektion der Hybride ermöglichen sollten, wurde mittels *Phage Display* eine humane scFv-Bibliothek gegen CVF und humanes C3 selektiert. Die selektierten Antikörper-Fragmente können anschließend der Expression in *E. coli* zugänglich gemacht werden. Durch Fusion mit einem humanen Fc-Fragment und anschließende Expression als IgG $\Delta$ C1-Konstrukt in Säugerzellen oder Hefe stehen

etablierte Methoden wie Detektion und Reinigung für Immunglobulin-Moleküle zur Verfügung (Abb. 41).



Abb. 41. Schematische Darstellungen von IgG, IgGAC1 und scFv.

# 3.4.1 Selektion und Charakterisierung von Antikörper-Fragmenten gegen C3 und CVF

Für die Selektion wurde die synthetische humane scFv-Bibliothek Griffin-1 eingesetzt, die eine Diversität von 1,9x10<sup>9</sup> Klonen besitzt. Die scFv liegen in dem Vektor pHen2 vor, in dem die Expression über den lac-Promotor reguliert wird. Ein Amber-Stopcodon zwischen scFv und GenIII ermöglicht durch den Wechsel von Supressor- zu Non-Supressor-Zelllinie die Expression als lösliches Antikörper-Fragment. Zur Sekretion steht die pelB-Signal-sequenz zur Verfügung. His-tag und Myc-Epitop ermöglichen Reinigung und Detektion.

Nach drei Selektionsrunden gegen natives CVF und humanes C3 unter Verwendung etablierter Methodiken wurde der Erfolg der Selektion im ELISA verifiziert. In der ersten Selektionsrunde wurden die Phagen basisch mit Triethylamin eluiert, in der zweiten und dritten Selektionsrunde erfolgte unter Verwendung von pKM13-Helferphagen eine spezifische tryptische Elution. Zur polyklonalen ELISA-Analyse wurden CVF und C3 immobilisiert und mit Eluaten aus den verschiedenen Selektionsrunden versetzt. Die Detektion erfolgte mit einem anti-M13-POD-Konjugat (Abb. 42, Abb. 43). Beide Ansätze zeigen eine deutliche Anreicherung der bindenden Phagen über die drei verschiedenen Selektionsrunden.



Abb. 42. Polyklonaler ELISA der Selektion gegen natives CVF.

Nach der Immobilisierung des nativen CVF auf der ELISA-Platte wurden die angereicherten Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Als Kontrolle wurde Milchpulver auf der Polystyrol-Oberfläche immobilisiert.





Nach der Immobilisierung des humanen C3 auf der ELISA-Platte wurden die angereicherten Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Als Kontrolle wurde Milchpulver auf der Polystyrol-Oberfläche immobilisiert.

Nach zwei Selektionen gegen CVF mit jeweils drei Runden wurden die angereicherten Bibliotheken monoklonalisiert und im ganzen 48 einzelne Phagen im ELISA auf Bindung analysiert (Abb. 44). Insgesamt konnten hierbei 18 reaktive Phagen identifiziert werden.



Abb. 44. Monoklonaler Phagen-ELISA der Selektion gegen CVF.

Nach der Immobilisierung des CVF auf der ELISA-Platte wurden die monoklonalen Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Gezeigt sind die Daten einer zweiten Selektionsrunde (Klone CVF-1 bis CVF-23) und zweier verschiedener dritter Selektionsrunden (Klone CVF-24 bis CVF-43 und CVF-44 bis CVF-48). Als Kontrolle wurde Milchpulver auf der Polystyrol-Oberfläche immobilisiert.

Bei den Klonen CVF-44 bis CVF-48 wurde außerdem die Kreuzreaktivität gegen C3 analysiert. Keiner der Phagen aus der Selektion gegen CVF zeigte Reaktivität gegenüber C3 (Abb. 45).

Nach einer Selektion gegen C3 über drei Selektionsrunden wurde die angereicherte Bibliothek monoklonalisiert und insgesamt 5 Phagen im ELISA auf Reaktivität gegen C3 und Kreuzreaktivität gegen CVF getestet (Abb. 46).



Abb. 45. Monoklonaler Phagen-ELISA der Selektion gegen CVF auf Kreuzreaktivität gegen C3.

Nach der Immobilisierung des CVF bzw. des C3 auf der ELISA-Platte wurden die monoklonalen Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Gezeigt sind die Bindung an CVF und die Kreuzreaktivitäten gegen C3 der Phagen der dritten Selektionsrunde (Klone CVF-44 bis CVF-47). Als Kontrolle wurde Milchpulver auf der Polystyrol-Oberfläche immobilisiert.





CVF und C3 wurden auf der ELISA-Platte immobilisiert. Anschließend wurden die monoklonalen Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Gezeigt sind die Bindung an C3 und die Kreuzreaktivitäten mit CVF der Phagen der dritten Selektionsrunde (Klone C3-1 bis C3-5). Als Kontrolle wurde Milchpulver auf der Polystyrol-Oberfläche immobilisiert.
Einige reaktive Phagen gegen CVF und gegen C3 wurden detaillierter analysiert, indem ihre Sequenzidentitäten über eine Analyse ihrer Restriktionsmuster verglichen wurden. Zur Restriktionsmusteranalyse wurden die entsprechenden Phagen verwendet, um HB2151-Zellen zu infizieren. Aus einer 10 ml Kultur der infizierten Zellen wurde dann DNA isoliert und mit den Oligonukleotiden Lmb3 und Fdseq eine PCR durchgeführt. Die amplifizierten scFv-Bereiche wurden einer Restriktionsanalyse unterworfen (Abb. 47).

Die MvaI-Restriktionsanalyse gibt einen Hinweis auf identische *Framework*-Regionen der Klone. Die Analyse belegt die Anreicherung eines spezifischen CVF-Klones, so besitzen die Klone 8, 19, 23, 24, 39, 44, 45, 46 und 48 vermutlich dieselben *Framework*-Regionen. Genauso lassen sich bei C3-1 und C3-3 sowie bei C3-2 und C3-4 identische *Framework*-Regionen vermuten.



#### Abb. 47. DNA-Fingerprint einzelner scFv gegen CVF und C3.

Ein 2% iges Agarose-Gel der MvaI-Restriktionsanalyse der amplifizierten DNA-Sequenzen. Die gereinigten Amplifikate der scFv exemplarischer Klone wurden für 3 h mit MvaI verdaut. M: pUC19/MspI.

Klone mit unterschiedlichen *Framework*-Regionen wurden mit den oben genannten Oligonukleotiden sequenziert. Dabei bestätigte sich die Anreicherung eines dominanten Klones bei der Selektion gegen CVF. Anschließend wurden die hypervariablen Regionen bestimmt (MacCallum *et al.*, 1996).

In Abb. 48 ist für den Klon CVF-44 die vollständige Primärstruktur des scFv mit hervorgehobenen hypervariablen Regionen der leichten und schweren Kette und dem Glycin-Serin-Linker, der die beiden Ketten verbindet, dargestellt.

# CDR1 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSGLEWL CDR2 GRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC CDR3 ARGSSSTFDYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGGGGGGAG LQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYPNWFQQKGQAPRALI CDR2 YSTSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAYYCLLYYGGAVFGG GTKLTVLG

Abb. 48: Analyse der hypervariablen Regionen des Klones CVF-44. Die Zuordnung erfolgte anhand charakteristischer Positionen vor und nach den jeweiligen CDR. Nach der variablen Region der schweren Kette ist der 15 Aminosäuren lange Glycin-Serin-Linker getrennt dargestellt. Anschließend ist die variable Region der leichten Kette dargestellt.

Die semisynthetische Natur der Griffin-1 Bibliothek kann zu einer Präsenz von Amber-Stopcodons in den selektierten Antikörper-Fragmenten führen; so beinhalten alle Antikörper-Fragmente gegen C3 mindestens ein Amber-Stopcodon.

Daher wurde eine alternative Strategie entwickelt, scFv ohne Amber-Stopcodons zu selektieren. Nach der zweiten Selektionsrunde wurde die angereicherte Bibliothek verwendet, um HB2151-Zellen zu infizieren. Von diesen Klonen wurden dann 17 ausgewählt und in einem Kulturvolumen von 15 ml zur Expression gebracht. Nach einer Reinigung über IMAC wurde die Expression in einem Immunoblot analysiert. Durch diese Strategie konnten drei weitere Antikörper (C3-14, C3-19, C3-22) selektiert werden (Abb. 49).



Abb. 49. Immunoblot der Expression verschiedener HB2151-Klone.

Die Proben wurden durch eine 12% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem anti-9E10-Antikörper (1:5.000) und einem anti-Maus-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

Die Sequenzen der hypervariablen Regionen der schweren und der leichten Ketten aller resultierenden unterschiedlichen Antikörper-Fragmente gegen CVF und C3 sind tabellarisch aufgelistet (Tabelle 8 und 9).

Klon	CDR1	CDR2	CDR3
		V <sub>H</sub>	
CVF-8	GDSVSSNSAAWN	GRTYYRSKWYNDYAVSVKS	*ARSAFDY
CVF-23	GDSVSSNSAAWN	GRTYYRSKWYNDYAVSVKS	S*SSSFDY
CVF-24	GDSVSSNSDAWN	GRTYYRAKWYNDYAQSVKS	<b>SHWST</b> FDY
<b>CVF-29</b>	<b>GFTFSDYYMS</b>	YISSSGSTIYYADSVKG	<b>GGPPGHR</b> Y
<b>CVF-37</b>	<b>GFSLRTSGMRVS</b>	ARIDWDDDKFYSTSLKT	SVCR
<b>CVF-39</b>	GDSVSSNSAAWN	GRTYYRSKWYNDYAVSVKS	*AKSAFDY
CVF-44	GDSVSSNSAAWN	GRTYYRSKWYNDYAVSVKS	<b>GSS</b> STFDY
C3-1	GGTFSYAIS	GGIIPIFGTANYAQKFQG	*MSV
C3-2	GFNIKDSYMH	<b>RIDPANGNTEYDP</b> KFQG	DYGYGGFAY
C3-5	GGTFSSYAIS	GGIIPIFGTANYAQKFQG	SDRK
C3-19	GFTFSSYGID	VISYDGSNKYYADSVKG	MAGFSS
C3-22	GGTFSSYAIS	GGIIPIFGTANYAQKFQG	TFGGK

# Tabelle8. SequenzenderhypervariablenRegionenderschwerenKettenderselektierten scFvgegenCVFundC3.

Die Bestimmung erfolgte anhand der charakteristischen Reste vor und hinter den hypervariablen Regionen. Markierte Aminosäurereste zeigen abweichende Sequenz zu jeweils dem ersten Klon der Tabelle (CVF-8 oder C3-1).

Klon	CDR1	CDR2	CDR3
		VL	
CVF-8	ASSTGAVTSGYYPN	STSNKHS	LLYYGGAV
CVF-23	ASSTGAVTSGYYPN	STSNKHS	LLYYGGAV
CVF-24	ASSTGAVTSGYYPN	STSNKHS	LLYYGGAV
<b>CVF-29</b>	SGSSNIGSNYVY	RNNQRPS	AAWDDSLQHV
<b>CVF-37</b>	<b>KSSQSLLHSDGKTYY</b>	STSNKHS	MESIQILFYK
<b>CVF-39</b>	ASSTGAVTSGYYPN	STSNKHS	LLYYGDTV
CVF-44	ASSTGAVTSGYYPN	STSNKHS	LLYYGGAV
C3-1	TGSSSNIGAGYDAH	GNSNRPS	QSYDSNLSV
C3-2	SASSSVSF*H	<b>DTSGLAS</b>	QQWSSNPLT
C3-5	TGSSSNIGAGYDVH	GNSNRPS	QSYDS <mark>S</mark> LSV
C3-19	TGTSSDVGSYNLVS	EGSKRPS	<b>C</b> SY <b>AGSSF</b> V
C3-22	TGSSSNIGAGYDVH	GNSNRPS	QSYDS <mark>SQSATV</mark>

# Tabelle 9. Sequenzen der hypervariablen Regionen der leichten Ketten der selektierten scFv gegen CVF und C3.

Die Bestimmung erfolgte anhand der charakteristischen Reste vor und hinter den hypervariablen Regionen. Markierte Aminosäurereste zeigen abweichende Sequenz zu jeweils dem ersten Klon der Tabelle (CVF-8 oder C3-1).

### 3.4.2 Expression der löslichen Antikörper-Fragmente in E. coli

In dem Vektor pHen2, in dem die selektierten Antikörper-Fragmente vorliegen, befindet sich ein Amber-Stopcodon zwischen den scFv-Sequenzen und der GenIII-Sequenz. Nach Infektion der Non-Supressor-Zellen HB2151 mit den entsprechenden Phagen können die löslichen Antikörper-Fragmente ohne weitere Klonierung exprimiert werden. Im Falle von Amber-Stopcodons in der scFv-Sequenz, müssen diese Klone jedoch vor der Expression mutiert werden. Um eine spezifische Mutagenese der scFv mit unterschiedlichen Sequenzen zu umgehen, die eine Generierung mehrerer Oligonukleotide erfordert, wurde das Amber-Stopcodon zwischen dem scFv und dem GenIII in ein Vollstop-Codon mutiert. Durch diese Strategie können für alle scFv die selben Oligonukleotidpaare verwendet werden. Die nachfolgende Expression in dem Supressor-Stamm TG1 ermöglicht dann die Generierung löslicher Antikörper-Fragmente.

Zur Klonierung wurde mit dem pHen2-Vektor der scFv CVF-8, C3-1, C3-2 und C3-5 eine PCR mit den Oligonukleotiden Lmb3 und AS72 durchgeführt. Durch die Oligonukleotide wurden hinter dem scFv, dem Myc-Epitop, sowie dem His-tag ein Stopcodon und eine

EcoRI-Schnittstelle eingeführt. Der Ursprungsvektor wurde mit SfiI und EcoRI geschnitten, wobei SfiI vor dem scFv und EcoRI nach der GenIII-Fragment schneidet. Das herausgeschnittene Fragment von ca. 2000 bp wurde jeweils durch die verschiedenen ebenfalls mit EcoRI und SfiI geschnittenen Amplifikate (ca. 800 bp) ersetzt. Die resultierenden Vektoren wurden zur Transformation der Supressor-Zelllinie TG1 genutzt.

Die Phagen der Antikörper-Fragmente ohne Amber-Codons wurden verwendet, um HB2151-Zellen zu infizieren. Die Zellen wurden anschließend zur Expression der scFv verwendet. Nach der Präparation des periplasmatischen Extraktes wurden die Antikörper-Fragmente aus den verschiedenen Zelllinien unter Verwendung von IMAC gereinigt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte in einem SDS-Gel, welches einer Coomassie-Färbung unterzogen wurde. Die positiven Fraktionen wurden vereint, dialysiert und anschließend das Expressionsniveau der verschiedenen erhaltenen Antikörper-Fragmente im SDS-Gel und im Immunoblot verglichen (Abb. 50, Abb. 51).

Rekombinante Antikörper-Fragmente mit einem guten Expressionsniveau, wie die scFv CVF-29 und C3-22, wurden in einem Kulturvolumen von 31 exprimiert und gereinigt (Abb. 52). Dabei wurden Ausbeuten von bis zu 0,5 mg erhalten.



#### Abb. 50. SDS-Gel der Expressionsniveaus der Antikörper-Fragmente in E. coli.

Die gereinigten rekombinanten Antikörper-Fragmente wurden über ein 12% iges SDS-Gel aufgetrennt und einer Coomassie-Färbung unterzogen. In einem Kulturvolumen von 500 ml wurden die Antikörper-Fragmente exprimiert und ein periplasmatischer Extrakt angefertigt. Nach der Dialyse wurde das Dialysat mit einer finalen Konzentration von 20 mM Imidazol versetzt und mit Ni-NTA-Matrix inkubiert. Anschließend wurde mit 300 mM Imidazol eluiert und die Elutionsfraktionen analysiert, vereint und dialysiert.



#### Abb. 51. Immunoblot der Expressionsniveaus der Antikörper-Fragmente in E. coli.

Die gereinigten rekombinanten Antikörper-Fragmente wurden über ein 12% iges SDS-Gel aufgetrennt und das Gel einem Semidry-Blot mit anschließendem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurde der monoklonale anti-9E10-Antikörper (1:5.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein anti-Maus-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP. In einem Kulturvolumen von 15-100 ml wurden die Antikörper-Fragmente exprimiert und ein periplasmatischer Extrakt angefertigt. Nach der Dialyse wurde das Dialysat mit einer finalen Konzentration von 20 mM Imidazol versetzt und mit Ni-NTA-Matrix inkubiert. Anschließend wurde mit 300 mM Imidazol eluiert und die Elutionsfraktionen analysiert, vereint und dialysiert.



#### Abb. 52. SDS-Gel der IMAC-Reinigung des scFv CVF-29.

Die Elutionsfraktionen (1 bis 8) wurden in einem 12% igem SDS-Gel aufgetrennt und einer Coomassie-Färbung unterzogen. In einem Kulturvolumen von 31 wurde das Antikörper-Fragment exprimiert und ein periplasmatischer Extrakt angefertigt. Nach der Dialyse wurde das Dialysat mit einer finalen Konzentration von 20 mM Imidazol versetzt und mit Ni-NTA-Matrix inkubiert. Anschließend wurde mit 300 mM Imidazol eluiert und die Elutionsfraktionen analysiert, vereint und dialysiert.

# 3.4.3 Präzipitationen mit den löslichen Antikörper-Fragmenten

Die rekombinanten Antikörper wurden verwendet, um nCVF bzw. humanes C3 aus verdünnten Lösungen zu präzipitieren. Dabei sollte im Hinblick auf eine gerichtete Immobilisierung in einem Festphasen-Assay evaluiert werden, inwiefern die Aktivität von CVF durch die Bindung des Antikörper-Fragmentes inhibiert wird und inwieweit eine Immunpräzipitation zur Konzentrierung und Reinigung verwendet werden kann.

Zur Präzipitation wurden CVF und humanes C3 in PBS verdünnt und mit an Ni-NTAimmobilisiertem spezifischen scFv inkubiert. Nach Elution wurden die Fraktionen im SDS-Gel und Immunoblot analysiert. Auf Grundlage des Immunoblots wurde eine densitometrische Quantifizierung der Menge an CVF in den Immunpräzipitaten durchgeführt.

In Abb. 53 ist exemplarisch je eine Immunpräzipitation von CVF und humanem C3 in einem SDS-Gel und einem Immunoblot gezeigt. Alle exprimierten Antikörper-Fragmente gegen CVF waren in der Lage, nCVF aus einer verdünnten Lösung zu präzipitieren (Abb. 54).



#### Abb. 53. Immunoblot und SDS-Gel der Immunpräzipitate von nCVF und hC3.

Die Immunpräzipitate wurden über ein 10% iges SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt oder nach einem *Semidry*-Blot einem Immunprinting unterzogen. Die Antikörper-Fragmente CVF-44 und C3-1 wurden an Ni-NTA immobilisiert. Anschließend wurde die Matrix mit einer verdünnten Lösung von CVF oder C3 (5  $\mu$ g/ml) in PBS inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit 300-500  $\mu$ l 300 mM Imidazol eluiert. Als Antikörper wurde das polyklonale Serum gegen CVF (1:1.000) bzw. gegen C3 (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.



#### Abb. 54. Immunoblot der Immunpräzipitate von nCVF.

Die Immunpräzipitate wurden über ein 7,5% iges SDS-Gel aufgetrennt und nach einem *Semidry*-Blot einem Immunprinting unterzogen. Die Antikörper-Fragmente wurden an Ni-NTA immobilisiert. Anschließend wurde die Matrix mit einer verdünnten Lösung von nCVF in PBS inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit 300-500 µl 300 mM Imidazol eluiert. Als Antikörper wurde das polyklonale Serum gegen CVF (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1.10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

Die Präzipitate von nCVF mit den verschiedenen Antikörper-Fragmenten wurden im

Anschluss an die Dialyse in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt (Abb. 55).

Obwohl durch die Präzipitation in einem molaren Überschuss vorhanden, beeinträchtigte die Präsenz der Antikörper nicht die Aktivität des CVF-Moleküls.

Die löslichen Antikörper-Fragmente können daher für eine Reinigung und Konzentrierung von CVF und den Hybriden durch eine Immunpräzipitation eingesetzt werden.





**A-E:** Komplementverbrauchsassay mit nCVF und den Immunpräzipitaten von CVF-8 (A), CVF-24 (B), CVF-29 (C), CVF-37 (D) und CVF 44 (E) mit nCVF.

Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Proben der Serumkontrolle eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

# 3.4.4 Immobilisierung von CVF und C3 über die Antikörper-Fragmente

Die Bindung der Antikörper-Fragmente an nCVF beeinträchtigte nicht die Aktivität des Moleküls. Um zu analysieren, inwieweit sich die Antikörper-Fragmente für eine Immobilisierung von CVF und humanem C3 mit einer anschließenden Aktivitätsuntersuchung der immobilisierten Proteine eignen, wurden die löslichen Antikörper-Fragmenten in einem *Sandwich*-ELISA eingesetzt. Dabei wurden die Antikörper-Fragmente auf der Oberfläche der ELISA-Platte gebunden, im Anschluss rekombinantes CVF bzw. C3 immobilisiert und mit dem entsprechenden polyklonalen Serum detektiert (Abb. 56).

Die Antikörper-Fragmente CVF-8, CVF-29, CVF-37 und C3-22, die in größeren Mengen exprimiert werden konnten, wurden in der ELISA-Analyse eingesetzt; als Vergleich wurden monoklonale Antikörper gegen den Strep-tag und gegen C3d genutzt.



#### Abb. 56. Sandwich-ELISA der löslichen Antikörper-Fragmente.

Über die immobilisierten Antikörper (scFv CVF-8, scFv CVF-29, scFv CVF-37, scFv C3-22, Strep-tag-Antikörper oder C3d-Antikörper) wurden CVF bzw. C3 gebunden. Zur Detektion wurden die polyklonalen Antiseren gegen CVF (1:1.000) bzw. C3 (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:1.000) eingesetzt. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

Für alle rekombinanten Antikörper konnte, analog zu den kommerziell erhältlichen Antikörpern, eine Immobilisierung von CVF und humanem C3 gezeigt werden.

Anschließend wurden vergleichbare Konzentrationen von CVF bzw. St-CVF an die unterschiedlichen Antikörper-Fragmente bzw. Antikörper immobilisiert und in einem Festphasen-Assay eingesetzt (Abb. 57). Dabei zeigte sich, dass eine Immobilisierung von CVF an die rekombinanten Antikörper-Fragmente die Komplement-verbrauchende Aktivität nahezu vollständig inhibiert. Auch eine Immobilisierung über den Strep-tag-Antikörper führt zu einer geringfügigen Inhibierung der Aktivität des St-CVF, im Gegensatz zu einer Immobilisierung über den Strep-tagII an Strep-Tactin.





Über die immobilisierten Antikörper-Fragmente (CVF-8, CVF-29, CVF-37, Strep-tag-Antikörper) bzw. über Strep-Tactin wurden CVF bzw. St-CVF gebunden. Anschließend wurde ein Festphasen-Assay in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei  $37^{\circ}$  C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 100 µl GVBS<sup>++</sup> und 30 µl sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben. Danach wurde im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850 µl GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Als Kontrolle wurde 100 ng CVF in Lösung angesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

# 3.4.5 Immunpräzipitation mit rekombinanten CVF

Das rekombinante Antikörper-Fragment CVF-29 wurden nach der erfolgreichen Präzipitation von nCVF eingesetzt, um rekombinantes CVF aus Überstand der transienten Expression zu präzipitieren. Dazu wurde das Antikörper-Fragment an Ni-NTA-Agarose immobilisiert und mit CVF-haltigen Überstand versetzt, der zuvor 1:2 in PBS verdünnt wurde. Nach der Elution mit Imidazol wurden die Fraktionen in einem Immunoblot analysiert, vereint und dialysiert. Auf Grundlage eines Immunoblots wurde eine densitometrische Quantifizierung durchgeführt (Abb. 58), dabei zeigte sich, dass durch die Präzipitation keine Konzentrierung des Proteins erreicht werden konnte, jedoch im SDS-Gel ein deutlicher Reinigungseffekt zu beobachten ist.





A: Immunpräzipitation von rCVF, Immunoblot.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als primärer Antikörper wurde ein anti-CVF-Antikörper (1:1.000) und als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) verwendet. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

B: Immunpräzipitation von rCVF, SDS-Gel.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel einer Silberfärbung unterzogen. Das Präzipitat wurde nach der Dialyse in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt (Abb. 59), in dem die Komplement-verbrauchende Aktivität des rekombinanten CVF bestätigt werden konnte.

Durch die Immunpräzipitation konnten die interferierenden Komponenten erfolgreich abgetrennt werden. Zudem konnte erstmalig die dekomplementierende Aktivität des rCVF mit der des nCVF verglichen werden, dabei wurde bestätigt, dass beide Proteine vergleichbare Komplement-verbrauchende Aktivität aufweisen.



Abb. 59. Komplementverbrauchsassay des Immunpräzipitates von rCVF. Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zuggegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4.6 Immunpräzipitation des Hybrides H4

Nach der Etablierung wurde auch das bisher nicht charakterisierte Hybrid H4 unter Verwendung der löslichen Antikörper-Fragmente aus dem Überstand der transienten Expression präzipitiert. Dazu wurde das Antikörper-Fragment CVF-29 an Ni-NTA-Agarose immobilisiert und mit dem 25fach konzentrierten H4-haltigen Überstand versetzt, der zuvor 1:2 in PBS verdünnt wurde. Nach der Elution mit Imidazol wurden die Fraktionen im Immunoblot analysiert, vereint und dialysiert. Auf Grundlage eines Immunoblots wurde eine densitometrische Quantifizierung durchgeführt (Abb. 60). Hierbei zeigte sich, dass durch die Präzipitation eine deutliche Konzentrierung des Proteins erreicht werden konnte. Anschließend wurde ein Komplementverbrauchsassay mit dem Präzipitat durchgeführt (Abb. 61).

Die Komplement-verbrauchende Aktivität des Hybrides konnte bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass das Hybrid H4 vergleichbare Aktivität zu CVF aufweist.

Die Ergebnisse beweisen, dass neben der Insertion der zweiten Faktor B-Bindungsstelle aus humanem C3 auch die Insertion der Faktor I-Spaltungsstellen ohne einen Verlust der Komplement-verbrauchenden Aktivität erfolgen kann.



#### Abb. 60. Immunoblot der Immunpräzipitation des Hybrides H4.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als primärer Antikörper wurde ein anti-CVF-Antikörper (1:1.000) und als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) verwendet. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.



Abb. 61. Komplementverbrauchsassay des Immunpräzipitates von rCVF und von H4. Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serum-kontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4.7 Affinitätsmessungen der Antikörper-Fragmente

Im Biacore-System können biomolekulare Interaktionen in Echtzeit mit Hilfe der *Surface plasmon*-Resonanz vermessen werden. Dabei werden Massenänderung durch Bindung oder Dissoziation an der Oberfläche detektiert. Die Methodik eignet sich auch zur Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten von Antikörpern und Antikörper-Fragmenten. Um diese für zwei der verwendeten Antikörper-Fragmente, CVF-29 und C3-22, zu bestimmen, wurde die Antikörper auf einem CM5-Chip immobilisiert. Anschließend wurde das jeweilige Antigen in verschiedenen Konzentrationen über den Chip geleitet. Regenerierung der Oberfläche konnte dabei durch 12,5 mM NaOH erreicht werden. Die Auswertung ergab für das Antikörper-Fragment CVF-29 einen K<sub>A</sub>-Wert von 3,3x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> und einen K<sub>D</sub>-Wert von 3,1x10<sup>-7</sup> M und für das Antikörper-Fragment C3-22 einen K<sub>A</sub>-Wert von 1,8x10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> und einen K<sub>D</sub>-Wert von 5,5x10<sup>-8</sup> M (Abb. 62, Abb. 63).





Das in *E. coli* exprimierte Antikörper-Fragment CVF-29 wurde über IMAC gereinigt und dialysiert. Anschließend wurde das Bindungsverhalten des CVF an den über EDC/NHSimmobilisierten Antikörper unter Verwendung eines Biacore3000-Systems analysiert. Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurden Konzentrationen zwischen 500 und 25 nM vermessen. Regenerierung wurde durch drei Pulse mit 12,5 mM NaOH für je 30 s erhalten.



**Abb. 63. Analyse des Bindungsverhaltens des Antikörper-Fragments C3-22.** Das in *E. coli* exprimierte Antikörper-Fragment C3-22 wurde über IMAC gereinigt und dialysiert. Anschließend wurde das Bindungsverhalten des C3 an den über EDC/NHS-immobilisierten Antikörper unter Verwendung eines Biacore3000-Systems analysiert. Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurden Konzentrationen zwischen 455 und 9 nM vermessen. Regenerierung wurde durch drei Pulse mit 12,5 mM NaOH für je 30 s erhalten.

# 3.5 Expression von Antikörpern im IgG-Format

### 3.5.1 Mutation der Amber-Stopcodons

Da die scFv CVF-8 und C3-1 in TG1-Zellen eine hohes Expressionsniveau zeigten, wurde eine Expression im IgG-Format in höheren Expressionssystemen angestrebt, um eine Nutzung der für IgG-Antikörper etablierten Methoden wie eine Immobilisierung oder Detektion, zu ermöglichen.

Für die Expression in eukaryontischen Systemen musste jedoch das Amber-Stopcodon durch eine Hybridisierungs-PCR mit Oligonukleotiden mutiert werden. Die ursprüngliche DNA-Sequenz *tag* codiert für ein Amber-Stopcodon, welches in dem Supressor-Stamm TG1 als Glutamin translatiert wird. Das resultierende *cag* wird in Non-Supressor-Stämmen oder in eukaryontischen Systemen als Glutamin gelesen und ermöglicht eine vollständige Translation der Antikörper. Die Amplifikate für CVF-8 mit den Oligonukleotiden S64 für Säugerzellen oder S63 für Hefe und AS70 sowie den Oligonukleotiden S69 und AS65 für Säugerzellen und Hefe wurden unter Verwendung der äußeren Oligonukleotide hybridisiert. Ebenso wurden die Amplifikate für C3-1 mit den Oligonukleotiden S68 und AS67 sowie AS63 und AS65 durch eine PCR mit den beiden äußeren Oligonukleotiden hybridisiert. Dabei wurden die Amplifikate durch die Oligonukleotide mit den Schnittstellen BsiWI und AscI für die Klonierung in den Vektor pcDNA3.1ZeoscFv-Fc und mit SfiI und AscI für den Vektor pPICZ $\alpha$ AscFv-Fc versehen. Die erhaltenen Amplifikate wurden mit den analogen Enzymen geschnitten und mit den analog geschnittenen Vektoren ligiert.

Die resultierenden Vektoren wurden anschließend zur Transfektion von CHO-Zellen oder zur Transformation kompetenter Hefe-Zellen eingesetzt.

# 3.5.2 Expression in Mammalia und Hefe

Für die Expression in Säugerzellen wurde ebenfalls der Klon CVF-29 mit den Oligonukleotiden S71 und AS65 amplifiziert und nach der gleichen Art und Weise in den Vektor pcDNA3.1ZeoscFv-Fc kloniert. Für die Expression in der Hefe *Pichia pastoris* wurde das Antikörper-Fragment CVF-8 in dem Vektor pPICZαAscFv-Fc mit SacI liniearisiert und zur Transformation kompetenter Hefen eingesetzt. Zur Überprüfung der genomischen Insertion wurde genomische DNA isoliert und mit verschiedenen Oligonukleotiden überprüft. Die Amplifikate mit den Oligonukleotiden 3'-AOX und 5'-AOX und mit jeweils einem AOX-Oligonukleotid und scFv-spezifischen Oligonukleotiden zeigten jeweils die erwarteten Größen (Abb. 64).



Abb. 64. Agarose-Gel der genomische PCR von scFv-Fc CVF-8. Die Amplifikate wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Bahn1: PCR mit 3'und 5'-AOX; ca. 2100 bp. Bahn 2: PCR mit 5'-AOX und AS65; ca. 1100 bp. Bahn 3: PCR mit S64 und 3'-AOX; ca. 1900 bp. K: Kontrolle. M:  $\lambda$ -DNA/Eco130I.

Nach einer Expression von 72 h wurde der Überstand durch Ultrafiltration 20fach konzentriert, anschließend über Protein A/G-Agarose gereinigt und der rekombinante Antikörper konnte im Immunoblot detektiert werden (Abb. 65A).

Für die Expression in Säugerzellen wurden die Plasmide der Antikörper-Fragmente CVF-8, CVF-29 und C3-1 in pcDNA3.1scFv-Fc zur Transfektion von CHO-Zellen eingesetzt. Die rekombinanten Antikörper wurden nach drei Tagen mittels Protein A/G-Agarose aus dem Überstand gereinigt und konnten im Immunoblot erfolgreich detektiert werden (Abb. 65B). Dabei wurden das Antikörper-Homodimer mit ca. 130 kDa nachgewiesen, wobei auch geringe Anteile des monomeren Antikörpers detektiert werden konnten. Die Funktionalität der Antikörper sowohl aus Hefe als auch aus Säugerzellen konnte in einer ELISA-Analyse aufgezeigt werden. Dazu konnten sowohl der Überstand der transienten Expression als auch der konzentrierte Hefe-Überstand oder die gereinigten Antikörper aus Hefe erfolgreich zur Detektion des immobilisierten Antigens eingesetzt (Abb. 66).



# Abb. 65. Immunoblot der Expression von scFv-Fc-Fusionsproteinen in Hefe und Säugerzellen.

A: Expression von CVF-8 in Pichia pastoris.

B: Expression von C3-1, CVF-8 und CVF-29 in Mammalia.

Die Proben wurden durch eine 10% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als Antikörper wurde ein antihuman IgG-Antikörper (1:5.000) und als sekundärer Antikörper ein anti-Maus-AP-Konjugat (1:10.000) verwendet. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP. Aufgetragen wurde jeweils die über Protein A/G-Agarose gereinigten Antikörper.



#### Abb. 66. ELISA mit rekombinanten IgG-Derivaten.

Die immobilisierten Antigene CVF und C3 konnten über die rekombinanten Antikörper detektiert werden. Dazu wurde ein anti-human IgG-Antikörper ( $\gamma$ -Ketten spezifisch) (1:5.000) und ein anti-Maus-POD-Konjugat (1:2.500) verwendet. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

# 3.6 Generierung und Expression von H5

### 3.6.1 Klonierung und Expression des Konstruktes H5

Nach der Etablierung des Festphasen-Assays sowie der Immunpräzipitation unter Verwendung der selektierten Antikörper-Fragmente konnten erstmals Hybride aus CVF und humanem C3 charakterisiert werden. Dabei konnte die dekomplementierende Aktivität der Hybride H2, H3 und H4 gezeigt und die analogen Regionen als funktionell nicht relevant identifiziert werden. In parallel durchgeführten Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass auch die erste Faktor B-Bindungsstelle funktionell nicht relevant ist. Diese Ergebnisse führten zu der Konstruktion eines neuen Hybrides, welches analog zu H2 die humane  $\beta$ -Kette und zusätzlich die humanisierten Faktor B- und Faktor H-Bindungsstellen sowie die Spaltungsstellen für die Protease Faktor I enthalten sollte. Für die Generierung des Konstruktes boten sich die verwendeten BglII-Schnittstellen an. Das Konstrukt H5 ist in Abb. 67 dargestellt. Neben der  $\alpha$ -Kette sind die  $\gamma$ -Kette sowie die C3a und die C3d-Regionen humanisiert.



Abb. 67. Schematische Abbildung des Konstruktes H5.A: Kettenstrukturen von C3 und pro-CVF.B: Aufbau der cDNA von H5.

Zur Klonierung des Konstruktes H5 wurde der Vektor H2∆2307 bp mit BglII geschnitten und aus dem Plasmid pUC18hC3 wurden über die BglII-Schnittstellen die mittlere Region

der C3-cDNA isoliert und in den Vektor insertiert. Das entstehende Konstrukt H5 konnte anschließend über die EagI-Schnittstellen in einen analog geschnittenen pcDNA3-Vektor insertiert werden (Abb. 68). Nachfolgend wurde ein Strep-tag zwischen die Signalsequenz und den N-Terminus insertiert.



Abb. 68. Schematische Abbildung der Klonierung von H5.

Die Expression in CHO-Zellen konnte im ELISA über Strep-Tactin (Abb. 69A) und im Immunoblot (Abb. 69B) erfolgreich nachgewiesen werden. Die auf Grundlage eines Immunoblots durchgeführte Quantifizierung ergab hier Ausbeuten von 1-2 mg/l, wobei das polyklonale Serum gegen C3 eingesetzt wurde. Da das Hybrid H5 eine Identität von 90% zu humanem C3 besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass das polyklonale Serum beide Proteine mit einer Varianz detektiert, die geringer ist als die der densitometrischen Quantifizierung.





A: ELISA der Expression von St-H5-und St-C3.

Zum Nachweis der Expression mittels ELISA wurde Strep-Tactin auf der Oberfläche der ELISA-Platte immobilisiert, anschließend wurden die rekombinanten Proteine daran gebunden und mit einem anti-C3-Antikörper (1:1.000) und einem anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:1.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. **B:** Immunoblot der Expression von St-H5-und St-C3.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Anschließend erfolgte die Detektion über einen anti-C3-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:1.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

Durch einen *Sandwich*-ELISA wurde die densitometrische Konzentrationsbestimmung bestätigt. Hierbei wurde ein monoklonaler C3d-Antikörper bzw. das Antikörper-Fragment C3-1 auf der Oberfläche einer ELISA-Platte immobilisiert und anschließend mit den rekombinanten Proteinen inkubiert. Die Detektion erfolgte über polyklonales C3-Antiserum. Neben den Proben wurde verschiedene Konzentrationen des humanen C3 eingesetzt. Die Auswertung der ELISA-Analyse bestätigte die erhaltenen Konzentrationen aus der densitometrischen Quantifizierung.

# 3.6.2 Charakterisierung des Hybrides H5

Nach erfolgreicher transienter Expression wurde das Hybrid H5 in einem Festphasen-Assay eingesetzt, wobei CVF und humanes C3 als Kontrollen dienten (Abb. 70). Dabei zeigte das Hybrid H5 deutliche zu CVF vergleichbare Komplement-verbrauchende Aktivität. Das Hybrid H5 weist damit trotz einer 90% igen Humanisierung einen vollständigen Erhalt der Komplement-verbrauchenden Aktivität auf.

Die Ergebnisse beweisen, dass neben der CVF- $\alpha$ -Kette auch die CVF- $\gamma$ -Kette sowie die C3a- und C3d-homologen Regionen ohne einen Verlust der Komplement-verbrauchenden Aktivität gegen humanes C3 ersetzt werden können.





Der Komplementverbrauchsassay wurde in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die an Strep-Tactin immobilisierten Proteine wurden für 3 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden in Ansätze in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben. Danach wurde im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Proben mit Serum allein eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

# 3.7 Expression und Charakterisierung des Hybrides H6

# 3.7.1 Klonierung und Expression des Hybrides H6

Aufgrund der Tatsache, dass die Komplement-verbrauchende Aktivität des Hybrides H5 erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde eine weitere Minimierung des CVF-Bereiches angestrebt.

Vergleicht man die C-Termini von CVF und humanem C3, wird deutlich, dass in dem dargestellten Bereich vor der Bsp1407I-Schnittstelle eine 56%ige Identität zwischen humanem C3 und CVF vorliegt, während die C-Termini der beiden Proteine lediglich eine Identität von 44% aufweisen (Abb. 71).

	BglII	
C3 CVF	-TCNKFDLKVTIKPAPETEKRPQDAKNTMILEI NVCNKFHLNVSVENIHLNAMGAKGALMLKI .****.*:::::::::::::::::::::::::::::::	1415 1394
C3 CVF	DDLKQLANGVDRYISKYELDKAFSDRNTLIIYLDKVSHSEDDCLAFKVHQYFNVELIQPG EDLTRLSKGVDRYISRYEVDNNMAQKVAVIIYLNKVSHSEDECLHFKILKHFEVGFIQPG :**.:*::*******:**:*:::::::::**********	1475 1454
C3 CVF	AVKVYAYYNLEESCTRFYHPEKEDGKLNKLCRDELCRCAEENCFIQKSDDKVTLEERLDK SVKVYSYYNLDEKCTKFYHPDKGTGLLNKICIGNVCRCAGETCSSLNHQERIDVPLQIEK :****:****:**************************	1535 1514
C3 CVF	ACEPGVDYVYKTRLVKVQLSNDFDEYIMAIEQTIKSGSDEVQVGQQRTFISPIKCREALK ACETNVDYVYKTKLLRIEEQDGNDIYVMDVLEVIKQGTDENPRAKTHQYISQRKCQEALN ***********************************	1595 1574
C3 CVF	LEEKKHYLMWGLSSDFWGEKPNLSYIIGKDTWVEHWPEEDECQDEENQKQCQDLGAFTES LKVNDDYLIWGSRSDLLPTKDKISYIITKNTWIERWPHEDECQEEEFQKLCDDFAQFSYT *:.:**:** **: * ::**** *:**:**********	1655 1634
C3 CVF	MVVFGCPN- 1663 LTEFGCPT- 1642 :. ****.	

# Abb. 71. Grafische Darstellung eines Vergleiches der C-terminalen Regionen von humanem C3 und CVF.

Vergleich der Aminosäurereste von humanem C3 und CVF. Die Schnittstellen für die Klonierung von H5 (BglII) und H6 (Bsp1407I) sind eingezeichnet. (\* identische Aminosäuren, : konservativer Aminosäureaustausch, . semi-konservativer Aminosäureaustausch; Einteilung nach ClustalW)

Zur Konstruktion des neuen Hybrides H6 wurde die Bsp1407I-Schnittstelle genutzt. Dabei wurde unter Berücksichtigung der Identitätsverhältnisse die C-terminale Region von CVF gewählt, während der Bereich vor der Bsp1407I-Schnittstelle humanisiert wurde. Das Hybrid H6 weist eine Identität von 96,3% zu humanen C3 auf (Abb 72).

Für die Klonierung des Konstruktes H6 wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden S50 und AS51 ein 350 bp-großes Fragment aus pUC18CVF\* amplifiziert, welches den 3'-Terminus des CVF enthält. Das Amplifikat und der Vektor pcDNASt-hC3 wurden mit Bsp1407I und XbaI geschnitten und ligiert (Abb. 73).



Abb. 72. Schematische Abbildung des Konstruktes H6.A: Kettenstrukturen von C3 und pro-CVF.B: Aufbau der cDNA von H6.



Abb. 73. Schematische Abbildung der Klonierung von H6.

Die Expression des Hybrides H6 konnte erfolgreich im ELISA über Strep-Tactin (Abb. 74A) und im Immunoblot (Abb. 74B) nachgewiesen werden.

Die Konzentration des Hybrides H6 im Überstand der transienten Expression wurde auf Grundlage eines Immunoblots densitometrisch quantifiziert, wobei polyklonales Serum gegen C3 verwendet wurde. Dabei ergaben sich Konzentrationen von ca. 1-2 mg/l Überstand.





A: ELISA der Expression von St-H6-und St-C3.

Zum Nachweis der Expression mittels ELISA wurde Strep-Tactin auf der Oberfläche der ELISA-Platte immobilisiert. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine daran gebunden und durch einen anti-C3-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:1.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. **B:** Immunoblot der Expression der St-H6-und St-C3.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Anschließend erfolgte die Detektion über einen anti-C3-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

# 3.7.2 Charakterisierung des Hybrides H6

Neben der densitometrischen Bestimmung wurde ein *Sandwich*-ELISA zur Quantifizierung des rekombinanten C3 und des Hybrides H6 durchgeführt, wobei sich gleiche Konzentrationen ergaben.

Anschließend wurde das Hybrid H6 in einem Festphasen-Assay auf Komplementverbrauchende Aktivität untersucht (Abb. 75).



#### Abb. 75. Festphasen-Assay mit St-H6, St-CVF und St-C3.

Über auf der ELISA-Platte immobilisiertes Strep-Tactin wurden die rekombinanten Proteine gebunden. Anschließend wurde ein Festphasen-Assay in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben. Danach wurde im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Verifizierung der Daten wurden von den rekombinanten Hybriden H5 und H6 sowie von rekombinantem C3 und CVF Immunpräzipitationen mit den selektierten Antikörper-Fragmenten CVF-29 und C3-1 durchgeführt (Abb. 76). Die Präzipitate wurden auf Grundlage eines Immunoblots densitometrisch quantifiziert und anschließend vergleichbare Konzentrationen der verschiedenen Proteine in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt (Abb. 77).

Der durchgeführte Komplementverbrauchsassay mit den Immunpräzipitaten bestätigte, dass das Hybrid H5 Komplement-verbrauchende Aktivität besitzt. Die Aktivität des Hybrides H6 konnte sowohl im Festphasen-Assay als auch im Komplementverbrauchsassay mit dem Immunpräzipitat gezeigt werden. Die Humanisierung des CVF-Moleküls unter Erhalt der Komplement-verbrauchende Aktivität wurde infolgedessen erfolgreich durchgeführt.

Für weitere Charakterisierungen sollte das Hybrid H6 gereinigt werden.



#### Abb.76. Immunoblot der Immunpräzipitate von CVF, H5, H6 und C3.

Die Proben wurden durch eine 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem *Semidry*-Blot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Anschließend erfolgte die Detektion über einen anti-C3-Antikörper (1:1.000) bzw. einen anti-CVF-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.



# Abb. 77. Komplementverbrauchsassay der Immunpräzipitate von CVF, H5, H6 und C3.

Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serum-kontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

# 3.7.3 Reinigung des Hybrides H6

Um eine detailliertere Charakterisierung des Hybrides H6 zu ermöglichen, sollte unter Verwendung von affinitätschromatografischen Methoden auf Grundlage des Strep-tag-Systems eine Reinigung nach etablierten Methodiken durchgeführt werden. Dazu wurden die transfizierten CHO-Zellen selektiert und monoklonalisiert. Anschließend wurde der Überstand mittels Ultrafiltration 10fach konzentriert und auf eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach der Elution wurden die Fraktionen in einem Immunoblot analysiert (Abb. 78). Das Hybrid konnte trotz diverser Modifikationen der Reinigungsprozedur wie Änderungen der Pufferkomponenten oder pH-Werte nicht über Strep-Tactin-Sepharose gereinigt werden. In den Elutionsfraktionen konnte lediglich eine singuläre Kette detektiert werden.





Da für die Charakterisierung eine Reinigung jedoch grundsätzlich notwendig ist, sollte auf etablierte Reinigungsprozeduren zurückgegriffen werden. Als alternative Strategie wurde ein His-tag zwischen die Signalsequenz und den N-Terminus insertiert.

# 3.7.4 Klonierung und Expression des Hybrides His-H6

Die Insertion des His-tag erfolgte analog zur Insertion des Strep-tags zwischen Signalsequenz und N-Terminus.

Dazu wurde unter Verwendung von St-hC3 mit den Oligonukleotiden S01 und AS61 und mit den Oligonukleotiden S62 und AS03 zwei Amplifikate generiert und diese durch eine PCR hybridisiert. Anschließend wurde das Amplifikat über die Schnittstellen NotI und Bpu1102I in einen analog geschnittenen Vektor pcDNA3H6 insertiert.

Der Erfolg der transienten Expression des Hybrides His-H6 wurde im *Sandwich*-ELISA und im Immunoblot verifiziert (Abb. 79A, Abb. 79B).

Die auf Grundlage des Immunoblots durchgeführte densitometrische Quantifizierung ergab dabei Ausbeuten von 1-2 mg/l.





A: ELISA der Expression von His-H6 und St-H6.

Zum Nachweis der Expression mittels ELISA wurde ein monoklonaler C3d-Antikörper auf die Platte immobilisiert. Anschließend wurde das Hybrid daran gebunden und durch einen anti-C3-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:1.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

**B:** Immunoblot der Expression von His-H6- und St-H6.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem Nassblot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Anschließend erfolgte die Detektion über einen anti-C3-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:1.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

# 3.7.5 Reinigung und Charakterisierung des Hybrides H6

Zur Reinigung des Hybrides wurden stabil exprimierende CHO-Zellen monoklonalisiert und expandiert. Anschließend wurde der Überstand der CHO-Zellen mit Imidazol in einer finalen Konzentration von 20 mM versetzt und mit Ni-NTA-Matrix inkubiert. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend in einem Immunoblot analysiert (Abb. 80). Die Fraktionen wurden vereint, dialysiert und in einem *Sandwich*-ELISA unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers quantifiziert. Eine auf Grundlage eines Immunoblots durchgeführte densitometrische Bestimmung bestätigte die Quantifizierung im ELISA (Abb. 81). Dabei konnten Proteinkonzentrationen von 3-4  $\mu$ g/ml erhalten werden. Zur Untersuchung der Reinheit wurden die Proben durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend das Gel einer Silberfärbung unterzogen (Abb. 81).

Dabei zeigte sich, dass die Reinigungsprozedur über den His-tag einen limitierten Reinigungseffekt aufwies, da ein Teil des Proteins nicht an die Matrix gebunden wurde und die Fraktionen außerdem mit einem starken Proteinhintergrund belastet waren.

Für die anschließenden Untersuchungen konnten jedoch ausreichende Konzentrationen des Hybrides erhalten werden.



#### Abb. 80. Immunoblot der Reinigung des Hybrides His-H6 mit Ni-NTA-Agarose.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach einem Nassblot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Als primärer Antikörper wurde ein anti-C3-Antikörper (1:1.000) und als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) verwendet. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.



#### Abb. 81. Immunoblot und SDS-Gel des gereinigten Hybrides His-H6.

Die Proben wurden durch eine 7,5% ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel einer Silberfärbung oder nach einem Nassblot-Verfahren einem Immunprinting unterzogen. Anschließend erfolgte die Detektion über einen anti-C3-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

Zur weiteren Charakterisierung des Hybrides H6 wurde zunächst die C3-Konvertase-Aktivität in einem Komplementverbrauchsassay in Lösung untersucht (Abb. 82), wobei die Aktivität des Hybrid H6 in Relation zur Aktivität von CVF gesetzt werden kann. Dabei spiegelten sich die Aktivitäten der Proteine durch eine signifikante Reduktion der Hämolyse wider und eine Auswertung ergab ein Wert von 68% Komplement-verbrauchender Aktivität gegenüber der Aktivität von CVF (Abb. 83).





Der Komplementverbrauchsassay wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben und im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.



Abb. 83. Auswertung des Komplementverbrauchsassays mit CVF, His-H6 und C3. Die Steigungen der einzelnen linearen Regressionen sind angegeben.

In einem *Bystander Lysis*-Test wurde untersucht, inwieweit das Hybrid H6 im Vergleich zu CVF die Fähigkeit besitzt, das Komplementsystem über eine C5-Konvertase-Aktivität auch in Flüssigphase zu aktivieren. Dabei wird das verwendete Meerschweinchenserum durch CVF aktiviert und die Meerschweinchen-Erythrozyten werden durch die anschließende Bildung des Membranangriffkomplexes lysiert. Nachfolgend kann das freigesetzte Hämoglobin im Überstand bei 412 nm vermessen werden (Abb. 84).

Hier zeigte sich, dass das Hybrid H6 so wie C3 keine Flüssigphasen-C5-Konvertase-Aktivität besitzt.





Der *Bystander Lysis*-Test wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Thermomixer unter Schütteln mit 20  $\mu$ l Meerschweinchenserum und 20  $\mu$ l Meerschweinchen-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml VBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Charakterisierung der Bindung an Faktor B sowie an Faktor H sollte analysiert werden, inwiefern die erhöhte Konvertase-Stabililtät von CVF bzw. H6 auf einer affineren Bindung an Faktor B resultiert und ob das Regulatorprotein Faktor H an das Hybrid H6 bindet. Zur Analyse der Bindungsverhältnisse wurde in einer ELISA-Analyse St-CVF, St-C3 und St-H6 über einen monoklonalen Antikörper gegen den Strep-tagII immobilisiert. Anschließend wurde mit verschiedenen Verdünnungen von Faktor B unter Zugabe von Faktor D inkubiert und mit einem anti-Faktor B-Antikörper detektiert (Abb. 85). Der Faktor B-Bindungs-ELISA zeigte eine höhere Affinität von Faktor B zu CVF gegenüber C3. Das Hybrid H6 zeigte dabei gegenüber C3 höher Affinität zu Faktor B. Eine analoge ELISA-Analyse mit seriellen Verdünnungen von Faktor H und Detektion mit einem anti-Faktor H-Antikörper zeigte eine hohe Affinität von Faktor H zu humanem C3, jedoch keine Affinität gegenüber CVF. Das Hydrid H6 weist eine Bindung an Faktor H auf, die jedoch gegenüber C3 deutlich reduziert ist (Abb. 86).





Zur Analyse der Faktor B-Bindung von CVF, H6 und C3 wurden ein monoklonaler anti-Strep-tag-Antikörper auf der Platte immobilisiert, anschließend wurde die Fusionsproteine daran gebunden. Nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Faktor B (0-12  $\mu$ g/ml) unter Zusatz von Faktor D (0,5  $\mu$ g/ml) und MgCl<sub>2</sub> wurde durch einen anti-Faktor B-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Ziege-POD-Konjugat (1:1.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.


#### Abb. 86. Faktor H-Bindungs-ELISA.

Zur Analyse der Faktor H-Bindung von CVF, H6 und C3 wurden ein monoklonaler anti-Strep-tag-Antikörper auf der Platte immobilisiert, anschließend wurde die Fusionsproteine daran gebunden. Nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Faktor H (0- $3 \mu g/ml$ ) wurde durch einen anti-Faktor H-Antikörper (1:1.000) und ein anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:1.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

### 3.8 Vergleichende Analyse der Aktivitäten der Hybride

Zu vergleichenden Charakterisierung wurden in einem Komplementverbrauchsassay alle Hybride sowie CVF und humanes C3 nebeneinander eingesetzt. Eine Übersicht über alle generierten Hybride ist in Abb. 87 dargestellt.

Der Komplementverbrauchsassay zeigte, dass die Aktivitäten des CVF, sowie der Hybride H2 und H3 vergleichbar sind. Auch das Hybrid H5 mit einer Identität zu humanem C3 von 90,7% zeigte eine zum CVF-Molekül vergleichbare Komplement-verbrauchende Aktivität. Die Aktivität des Hybrides H6 mit einer Identität zu humanem C3 von 96% konnte ebenfalls gezeigt werden, wobei jedoch ein Aktivitätsverlust beobachtet werden konnte (Abb. 88).

Die Humanisierung des CVF-Molekül konnte daher erfolgreich durchgeführt werden.









Über auf der ELISA-Platte immobilisiertes Strep-Tactin wurden die rekombinanten Proteine gebunden. Anschließend wurde ein Festphasen-Assay in einer ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm mit humanem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, 100  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> und 30  $\mu$ l sensitivierte Schaf-Erythrozyten (5x10<sup>8</sup> Zellen/ml) zugegeben. Danach wurde im Thermomixer solange weiter inkubiert, bis die Serumkontrollen eine Hämolyse von ca. 80% gegenüber der Kontrolle mit ddH<sub>2</sub>O erreicht hatten. Nach Zugabe von 850  $\mu$ l GVBS<sup>++</sup> wurde zentrifugiert (4° C, 2000 xg, 2 min) und die Überstände bei 412 nm vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Komplementmodulator *Cobra Venom Factor* durch sukzessiven Austausch von funktionell nicht relevanten Regionen gegen homologe human C3-Bereiche humanisiert werden. Mehrere Hybride wurden dargestellt und neben CVF und humanem C3 erfolgreich in Säugerzellen exprimiert. Ein Festphasen-Assay wurde entwickelt, der eine Analyse der dekomplementierenden Aktivität der Hybride erlaubt. Der Kassettenaustausch resultierte in der erfolgreichen Generierung eines humanisierten CVF-Moleküls, welches neue Therapieansätze bei Komplement-assoziierten Krankheiten zur Verfügung stellt.

### 4.1 Das Komplementsystem und seine Modulation

Die physiologischen Funktionen des Komplementsystems, wie die bakterielle Abwehr und die Auflösung von Immunkomplexen, können an einem angeborenen oder erworbenen Mangel an Komplementproteinen verdeutlicht werden; rezidivierende bakterielle Infekte und diverse Autoimmunerkrankungen sind die Folge (Morgan und Walport, 1991; Sahu und Lambris, 2000). Diverse akute und chronische Komplement-assoziierte Krankheiten sind beschrieben, darunter Systemischer Lupus Erythematodes oder die hyperakute Abstoßung und Abstoßung bei Transplantationen. Therapeutische Inhibition der Komplementaktivierung durch verschiedene Komplement-Inhibitoren konnte *in vivo* gezeigt werden. In den klinischen Untersuchungen befinden sich der lösliche Komplement-rezeptor (sCR1) und ein inhibierender Antikörper gegen C5.

Ein effektivere Methode als die Verwendung eines Komplementinhibitors ergibt sich durch die Applikation eines Komplement-modulierenden Enzyms, welches durch seinen katalytischen Mechanismus große Mengen an Substrat umsetzen kann.

### 4.1.1 Der Komplementmodulator Cobra Venom Factor

Der *Cobra Venom Factor* ist ein Komplement-modulierendes Enzym aus dem Gift einiger Kobra-Spezies und besitzt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu humanem C3. Die sich im humanen Serum bildende CVF-abhängige C3-Konvertase wird nicht von den regulatorisch wirkenden Proteinen inhibiert und führt zu einer therapeutisch nutzbaren Dekomplementierung. In verschiedenen Xenotransplantationsmodellen wie z.B. Leber-transplantationen von Meerschweinchen zu Ratten, Herztransplantationen von Hamstern zu Mäusen, sowie Inselzellen-Transplantationen von Ratten zu Mäusen wurde CVF erfolgreich eingesetzt (Chrupcala *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2000; Oberholzer *et al.*, 1999). Unterschiedlichste Studien zeigten, dass auch bei Erkrankungen wie Arthritis (Lens *et al.*, 1984), Arteriosklerose (Pang und Minta, 1980), Enzephalomylitis (Morariu und Dalmasso, 1978), sowie Gingivitis (Kahnberg *et al.*, 1976) CVF therapeutisch einsetzbar ist.

Das Problem für die therapeutische Applikation liegt dabei vor allem in der starken Immunogenität des CVF begründet. CVF besitzt komplexe, N-gebundene Oligosaccharidketten mit terminalen Galaktosylresten, welche ein großes immunogenes Potential aufweisen (Taniguchi *et al.*, 1996). Mit einem relativ hohen Anteil an Kohlenhydratstrukturen von 7,4% (Vogel und Müller-Eberhardt, 1984) unterscheidet sich CVF dabei erheblich von humanem C3 mit nur 1,7% (Hirani *et al.*, 1986).

Aktivitätsanalysen in Komplementverbrauchsassays und *Bystander Lysis*-Assays des mittels N-Glykanase deglykosyliertem nCVF zeigten, dass die Oligosaccharidketten von CVF sowohl für C3-Konvertase-, wie auch für die C5-Konvertase-Aktivität essentiell sind, da keine dekomplementierende Aktivität nachgewiesen werden konnte (Grier und Vogel, 1989). Widersprüchlich dazu wurde später beschrieben, dass bei der Deglykosylierung von CVF die volle C3- und C5-Konvertase-Aktivität erhalten bleibt und es sich bei den vorherigen Studien um eine partiell denaturierte und inaktive CVF-Fraktion gehandelt hat (Gowda *et al.*, 1994). Eine Verminderung der Immunogenität kann jedoch nicht durch eine Deglykosylierung des CVF erreicht werden, da gerade deglykosyliertes CVF stark immunogen sein wird.

Die einer Applikation entgegenstehende Immunogenität des CVF-Moleküls sollte im Rahmen dieser Arbeit durch eine Humanisierung des *Cobra Venom Factors* reduziert werden. Unter Verwendung einer Kassettenmutagenese mit dem humanen Homolog C3 könnten Struktur-Funktionsbeziehungen des Moleküls analysiert und somit funktionell nicht relevante Proteinbereiche identifiziert werden. Eine Austausch der funktionell nicht relevanten Bereiche könnte dann zu einem humanisierten CVF führen.

# 4.2 Expression und Charakterisierung des rekombinanten CVF und humanen C3

### 4.2.1 Überlegungen zur Auswahl des Expressionssystems

Bislang konnte aktiver rekombinanter CVF nur in Insektenzellen exprimiert werden, wobei hier bestätigt wurde, dass eine authentische Glykosylierung keinen Einfluss ausübt, denn Insektenzellen neigen zu einer von höheren Eukaryonten abweichenden Glykosylierung (O'Reilly *et al.*, 1995, Jarvis *et al.*, 1990). Zudem ist die Expression mittels des Baculovirus-Systems durch die Amplifikation von Virenstocks aufwendig und kostenintensiv. Zusätzlich sind in Insektenzellen exprimierte Proteine für eine therapeutische Anwendung ungeeignet, da die verschiedenartige Glykosylierung eine Immunogenität bedingt, die wiederum eine kürzere Halbwertzeit unter physiologischen Bedingungen bewirkt (Thotakura *et al.*, 1991).

Dagegen werden diverse Antikörper, die therapeutisch genutzt werden, in Säugerzellen exprimiert, wie z.B. CAMPATH-1H, ein anti-CD52-Antikörper, der bei Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen oder Rheumatoider Arthritis eingesetzt wird (Sheeley *et al.*, 1997) oder ein bispezifisches anti-CD3-Antikörper-Fragment, welches bei Kolorektalkrebs Verwendung findet (Kufer *et al.*, 1997). Säugerzellen ermöglichen neben der guten Kultivierbarkeit und der hohen Transfektionseffizienz ebenfalls eine Kultivierung in Serum-freiem Medium. Üblicherweise werden CHO-, COS-7- oder HEK293-Zellen verwendet, die bekannt dafür sind, dass sie Proteine mit sialylierten Oligosaccharidketten versehen. Untersuchungen mit sialyliertem CVF zeigten keine Unterschiede in der Funktion gegenüber nativem CVF (Gowda *et al.*, 1994). Dieses bestätigte eine frühere Untersuchung, wobei eine natürlich vorkommende Subspezies von sialyliertem CVF die gleiche Aktivität aufzeigte (Johnson und Kucich, 1977).

Aus den genannten Gründen wurden in dieser Arbeit Säugerzellen als Expressionssystem gewählt. Eine etablierte Expression eines humanisierten CVF kann zur therapeutischen Anwendung ohne weiteres auf eine humane Zelllinie übertragen werden, um eine vollständig authentische Glykosylierung zu gewährleisten.

### 4.2.2 Expression von CVF und humanem C3

Rekombinanter CVF konnte in allen drei verwendeten mammalen Zelllinien, CHO, COS-7 und HEK293, im Zellüberstand nachgewiesen werden. Die densitometrisch quantifizierten Ausbeuten lagen dabei bei ca. 0,5-3 mg/l.

Der rekombinante CVF mit einem apparenten Molekulargewicht von 210 kDa zeigte eine zweikettige Struktur. Dabei liegt die CVF- $\alpha$ -Kette wie auch im nativen Protein singulär vor, während die  $\gamma$ - und die  $\beta$ -Kette zusammen mit den zu den C3-Fragmenten C3d und C3a homologen Regionen als eine Kette exprimiert werden. Die Prozessierung ist dabei analog zu der des zweikettigen humanen C3, nur die 4 Argininreste werden bei beiden Proteinen herausgeschnitten. Die weitere Prozessierung von CVF in der Kobra durch eine *Venom* Protease (O'Keefe *et al.*, 1988) findet in Säugerzellen übereinstimmend mit der Prozessierung in Insektenzellen nicht statt. Rekombinanter zweikettiger CVF aus Insektenzellen weist jedoch eine zu nativem CVF vergleichbare Aktivität auf (Kock, 1996).

Die angestrebte Modifikation von CVF durch die Generierung und Charakterisierung verschiedener Hybride aus CVF und humanem C3 sollte zu einer Expression von Hybriden führen, die zum Großteil aus humanem C3 bestehen. Um zu analysieren, inwiefern sich das Expressionssystem auch für solche Hybride eignet, wurde neben CVF auch humanes C3 in CHO-, HEK293- und COS-7-Zellen exprimiert. Dabei konnte das rekombinante Protein ebenfalls im Zellüberstand detektiert werden. Rekombinantes C3 zeigte ein apparentes Molekulargewicht von 210 kDa und die erhaltenen Ausbeuten von 1-3 mg/l bestätigten die Literaturwerte (Fecke *et al.*, 1998).

Für die sekretorische Expression der Proteine wurden die nativen Signalsequenzen von CVF und humanem C3 verwendet.

Aufgrund der Tatsache, dass CHO-Zellen die Möglichkeit einer stabilen Integration bieten und zudem höhere Ausbeuten als HEK293-Zellen aufwiesen, wurden für weitere Studien CHO-Zellen gewählt.

Die erfolgreiche Expression von CVF und humanem C3 in Säugerzellen kann unter Berücksichtigung der erhaltenen Ausbeuten als vielversprechende Basis für nachfolgende Expressionen von Hybriden aus CVF und humanem C3 gelten.

#### 4.2.3 Aktivitätsuntersuchungen des rekombinanten CVF

Nach der erfolgreichen Expression von CVF und humanem C3, konnten Säugerzellen als Expressionssystem für die Hybride etabliert werden. Nachfolgend musste eine Methode entwickelt werden, die Komplement-verbrauchende Aktivität der Hybride zu analysieren. Dazu wurde rekombinantes CVF im Überstand der transienten Expression auf seine dekomplementierende Aktivität in Komplementverbrauchsassays untersucht, wobei jedoch kein Unterschied zu einem Kontrollüberstand ohne CVF nachgewiesen werden konnte. Weder durch eine transiente Expression mit dem Serumersatzstoff Nutridoma, noch durch eine Kultivierung der Zellen in Serum-freiem Medium oder durch eine Kultivierung in Protein-freiem Medium konnte die Aktivität des rekombinanten CVF nachgewiesen werden. Die densitometrisch quantifizierten Ausbeuten der Expression mit den unterschiedlichen Ersatzstoffen lagen dabei mit 0,3-1,5 mg/l etwas niedriger als die Ausbeuten bei Verwendung von Serum-haltigen Medium.

Die Ergebnisse zeigten, dass die direkte Charakterisierung des rCVF im Überstand nicht durchführbar ist. Daher wurden weitere Strategien hinsichtlich ihrer Möglichkeit analysiert, CVF und diverse Hybride nach transienter Expression zu charakterisieren, um eine zeit- und aufwandintensive Reinigungsprozedur von mehreren Hybriden zu vermeiden.

Verschiedene Konzentrierungs- und Reinigungstechniken wurden untersucht, um eine Abtrennung der Komponenten zu erreichen, die einer Charakterisierung aus dem Überstand entgegenstehen. Die Proben wurden anschließend in Komplementverbrauchsassays eingesetzt, wobei rCVF bei keinem Ansatz signifikant von der Kontrolle zu unterscheiden war. Die erhaltenen Ergebnissen zeigten, dass es sich bei den interferierenden Komponenten nicht um niedermolekulare Moleküle handelt, auch eine zu niedrige Konzentration des CVF kann ausgeschlossen werden, da vergleichbare Mengen an nativem CVF deutliche Aktivitäten aufzeigten.

Zwei alternativ entwickelte Strategien sollte eine Charakterisierung der Hybride nach einer Immobilisierung ermöglichen. In einem Festphasen-Assay können die rekombinanten Hybride über einen Affinitätstag oder ohne mögliche funktionelle Beeinflussung durch eine Fusionspeptid über rekombinante Antikörper-Fragmente immobilisiert und anschließend charakterisiert werden.

### 4.2.4 Etablierung eines Festphasen-Assays

Der zu entwickelnde Festphasen-Assay sollte die Bindung des CVF und der Hybride über einen Affinitätstag an ein Protein ermöglichen, welches zuvor auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert werden sollte. Auf diese Art könnten die interferierenden Komponenten abgetrennt werden und ein anschließender Komplementverbrauchsassay mit den immobilisierten Proteinen sollte eine Charakterisierung der Hybride ermöglichen.

Zur Auswahl des Affinitätstags wurden verschiedene Systeme auf ihre Eignung geprüft. Eine Möglichkeit zur Immobilisierung und Reinigung ist die Fusion eines His-tags, dabei erschienen jedoch seine niedrige Affinität und eventuell auftretende Ladungseffekte nachteilig. Auf die Fusion mit der Glutathion-S-transferase wurde wegen der zusätzlichen 220 Aminosäuren ebenfalls verzichtet. Die Expression von CVF bzw. C3 mit einem 25 kDa schweren Fusionsprotein würde sicherlich in einer Reduktion der Ausbeute resultieren.

Als System wurde der Strep-tagII gewählt, ein Fusionspeptid aus 8 Aminosäuren (WSHPQFEK), welcher eine Dissoziationskonstante von 1 µM zu Strep-Tactin, einem Strepavidinderivat aufweist (Schmidt *et al.*, 1996, Schmidt und Skerra, 2000). Strep-Tactin ist als Protein verfügbar und kann funktionell auf ELISA-Platten immobilisiert werden. Darüber hinaus sind Reinigungsprozeduren und Detektionssysteme über Strep-tagII-Anti-körper etabliert. Zudem ist die Verwendung des Strep-tag-Systems bei Biacore-Messungen

145

(Busch *et al.*, 2000) und die Expression von Strep-tag-Fusionsproteinen in Mammalia beschrieben (Smyth *et al.*, 2000).

Es wurde eine N-terminale Fusion angestrebt, da ein C-teminaler His-tag die C5-Konvertase-Aktivität von rekombinant in Insektenzellen exprimierten CVF vermindert (Kock, 1996). Dabei ist jedoch unklar, inwiefern der Aktivitätsverlust auf elektrostatische Effekte des His-tags zurückzuführen ist oder eine Fusion von mehreren Aminosäuren an den C-Terminus eine Bindung von C5 aus sterischen Gründen verhindert.

Zur Fusion wurde der Strep-tagII über Oligonukleotide zwischen die Signalsequenz und den N-Terminus von CVF bzw. C3 eingeführt. Zudem wurde eine Enterokinase-Schnittstelle insertiert, die eine spätere Abspaltung des Strep-tagII ermöglichen sollte.

Alle Fusionsproteine konnten in CHO-Zellen erfolgreich exprimiert und mittels ELISA-Analyse die Zugänglichkeit des Fusionspeptides nachgewiesen werden. Wie auf Grundlage einer densitometrischen Quantifizierung gezeigt, wurden durch die Fusion des Strep-tags weder die Sekretion noch die Expressionsausbeute beeinflusst.

Die Durchführung eines Komplementverbrauchsassay in einem Festphasen-System erfordert eine Adaption der Assaybedingungen, daher wurde eine Evaluation verschiedener Parameter durchgeführt. Unterschiedliche Konzentrationen an nCVF wurden unter verschiedenen Bedingungen in einer ELISA-Platte einem Komplementverbrauchsassay unterworfen. Dabei wurde sowohl die Rotationsgeschwindigkeit als auch die Zeitspanne der Vorinkubation variiert. Nachfolgende Untersuchungen unten den optimierten Bedingungen bei 150 rpm und einer 3stündigen Vorinkubation mit St-CVF bestätigten die generelle Durchführbarkeit dieses Assaysystems. Eine signifikante Komplementverbrauchende Aktivität konnte für St-CVF gezeigt werden. St-C3 als Kontrollprotein wies dagegen keine Aktivität auf.

Die Etablierung des Festphasen-Assays eröffnet somit erstmals die Möglichkeit einer effizienten Charakterisierung von transient exprimierten Proteinen, die mit einem Streptag-Fusionspeptid versehen sind.

Die erfolgreiche Charakterisierung des rekombinanten CVF bestätigte, dass eine weitere Prozessierung des zweikettigen CVF für seine Aktivität nicht notwendig ist.

146

# 4.3 Selektion, Expression und Verwendung löslicher Antikörper-Fragmente

### 4.3.1 Selektion und Expression der Antikörper-Fragmente

Eine weitere Strategie zur Immobilisierung und Reinigung der rekombinanten Proteine ist die Immobilisierung über monoklonale Antikörper. Dabei kann auf einen Affinitätstag verzichtet und damit ein möglicher funktioneller Einfluss eines Fusionspeptids vermieden werden.

Zur Generierung monoklonaler Antikörper stehen prinzipiell verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine Immunisierung und nachfolgende Isolierung monoklonaler Antikörper über die Hybridomtechnologie wurde verworfen, da ein hoher Bedarf an Proteinen mit einem hohen Aufwand verbunden ist.

Als alternative Strategie steht die Nutzung rekombinanter Antikörper-Bibliotheken zu Verfügung. Synthetische scFv-Bibiotheken weisen durch die vollständig oder partiell synthetische Natur ihrer hypervariablen Regionen eine hohe Diversität auf. Die Diversität kann mit der Affinität der resultierenden Antikörper korreliert werden (Perelson und Oster, 1979). Zusätzlich ist eine Expression der selektierten Antikörper-Fragmente in unterschiedlichen Formaten, z.B. als scFv-F<sub>C</sub>-Fragment möglich. Die synthetische Natur der Bibliothek bringt jedoch auch Nachteile mit sich, da die hypervariablen Regionen Amber-Stopcodons aufweisen können.

Die verwendete synthetische scFv-Bibliothek Griffin-1 mit einer Größe von 2x10<sup>9</sup> Klonen liegt in dem Vektor pHen2 vor. Neben dem Myc-Detektionsepitop, einem sechsfach Histag und einer pelB-Signalsequenz für die Sekretion ins Periplasma, befindet sich in dem Vektor zwischen scFv und GenIII ein Amber-Stopcodon, welches bei der Expression in Non-Supressor-Zellen zur Sekretion von löslichen Antikörpern führt.

Nach zwei Selektionsrunden gegen humanes C3 und natives CVF konnte eine signifikante Anreicherung bindender Phagen im polyklonalen ELISA detektiert werden, die sich in der dritten Runde noch steigerte. Aus der zweiten und dritten Runde wurden jeweils mehrere Klone in einem monoklonalen ELISA untersucht, wobei insgesamt 17 CVF-bindende Klone identifiziert werden konnten. Bei humanem C3 wurden nach der dritten Selektionsrunde fünf Phagen im monoklonalen ELISA gegen C3 als reaktiv detektiert. Die Klone wurden anschließend einem *Fingerprint* unterzogen und Klone mit unterschiedlichem Restriktionsmuster sequenziert. Die Bestimmung der hypervariablen Regionen (MacCallum *et al.*, 1996) ergab letztlich 7 verschiedene scFv gegen CVF, wobei aus den Sequenzen deutlich wird, dass fünf Klone hohe Identität aufweisen.

Durch den synthetischen Charakter der Bibliothek bedingt, befinden sich in einer Anzahl von Klonen Amber-Stopcodons. Eine alternative Strategie sollte zur Identifizierung von C3-Klonen führen, die keine Amber-Codons aufweisen. Dazu wurden die angereicherte Bibliothek in HB2151 auf die Expressionsfähigkeit singulärer Klone analysiert. Dadurch konnten drei weitere Antikörper-Fragmente gegen C3 identifiziert werden.

Unter Verwendung unterschiedlicher Mutagenesestudien konnten auch scFv mit Amber-Codons einer Expression in TG1-Zellen zugänglich gemacht werden. Weitere Klone wurden in HB2151-Zellen als lösliche Antikörper-Fragmente exprimiert. Die Ausbeute der Expression variierte dabei je nach scFv von 30-150  $\mu$ g/l. Eine verbesserte Expressionsstrategie in einem Fermenter mit 31 Kulturvolumen konnte die Ausbeuten an einzelnen Antikörper-Fragmenten auf 0,5 mg deutlich erhöhen.

#### 4.3.1.1 Generierung und Expression bivalenter Antikörper

Eine Erhöhung der Valenz resultiert generell in einer effektiveren Bindung, wobei die IgG-Grundstruktur die für die meisten Anwendungen ausreichende Bivalenz bietet. Einfachere Expression und bessere Sekretion kann durch eine Reduzierung des IgG-Heterotetramer auf ein Homodimer erhalten werden. Die beiden Affinitätsdomänen werden dazu über Assoziationsdomänen verbunden. Dabei können die scFv durch die C<sub>H</sub>2- und C<sub>H</sub>3-Regionen der schwere  $\gamma$ -Kette des IgG verknüpft werden (Wang *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2000). Die Assoziation der beiden scFv über die konstanten Regionen erlaubt zudem die Expression des Homodimeres ohne aufwendige doppelte Selektion. Die Deletion der C<sub>H</sub>1-Region bietet dabei den Vorteil eines niedrigeren Molekulargewichtes, welches zu einer gesteigerten Sekretion beitragen kann. Ein wichtiger Vorteil der Fc-Fusion ist die Verwendung der Protein A/G-Agarose-Affinitätschromatographie. Zur Expression der scFv mit Fc-Assoziationsdomäne standen Expressionskassetten für Mammalia und *Pichia pastoris* zur Verfügung. Die Kassette für Mammalia bestand neben der rodenten Signalsequenz der  $\kappa$ -leichten Kette aus Schnittstellen für die Klonierung des scFv und der konstanten Regionen. Die Kassette für die Expression in der Hefe verfügt über die Signalsequenz des  $\alpha$ -Faktors aus *S. cerevisiae*.

CHO-Zellen bieten eine stabile Integration durch einfache Transfektionsmethoden und gute Ausbeuten. Allerdings kann die Reinigung durch die im Medium vorhandenen bovinen Antikörper erschwert werden. Die Hefe *Pichia pastoris* als einfach zu handhabendes eukaryontisches System ermöglicht die Kultivierung auch größerer Volumina und ein leichte Aufarbeitung aus dem Überstand.

Ein Antikörper-Fragment gegen C3 und drei verschiedene gegen CVF wurden gewählt und über die vorgegebenen Schnittstellen in die Expressionskassette für Mammalia insertiert.

Nach Expression in Mammalia wurde der Überstand über Protein A/G-Agarose gereinigt und die Proteine im Immunoblot nachgewiesen. Ein scFv gegen CVF wurde in die Hefe-Expressionskassette insertiert und der Antikörper in *Pichia pastoris* exprimiert. Im Anschluss an die Expression wurde der Überstand über Protein A/G-Agarose gereinigt und das scFv-F<sub>C</sub>-Derivat ebenfalls im Immunoblot nachgewiesen. Die Bindung an CVF bzw. humanes C3 der scFv-F<sub>C</sub> sowohl aus Säugerzellen als auch aus Hefe konnte im ELISA erfolgreich gezeigt werden.

### 4.3.2 Verwendungen der Antikörper-Fragmente

Eine Analyse der Fähigkeiten der verschiedenen Antikörper-Fragmente sollte zeigen, inwieweit die Antikörper in der Lage sind, eine Detektion, eine Immobilisierung sowie eine Reinigung von CVF bzw. C3 zu ermöglichen.

Die löslichen Antikörper-Fragmente wurden für Immunpräzipitationen von CVF und humanem C3 erfolgreich verwendet. Dabei konnte eine Konzentrierung der Proteine erreicht werden. Die nCVF-Präzipitate der verschiedenen scFv gegen CVF wurden densitometrisch quantifiziert und in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass alle fünf Antikörper-Fragmente, obwohl sie in einem molaren Überschuss vorliegen, die Aktivität von CVF nicht vermindern. Mit den selektierten Antikörper-Fragmenten und den bivalenten IgG-Derivaten stehen weitere Methoden zur Verfügung, die Hybride zu immobilisieren und zu reinigen. Hierbei erfolgt eine spezifische, gerichtete Immobilisierung der Proteine, wobei kein Einfluss eines Affinitätstags auftreten kann.

Eine Immobilisierung von CVF und C3 im ELISA über die Antikörper-Fragmente konnte erzielt werden. Das Antikörper-Fragment C3-22 zeigte hierbei vergleichbare Affinität wie ein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen C3d.

Der immobilisierte CVF wurde im Anschluss in einem Festphasen-Assay eingesetzt, dabei zeigte sich, dass die Komplement-verbrauchende Aktivität von CVF durch die Immobilisierung nahezu vollständig inhibiert wird. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den vorherigen Befunden, dass die scFv bei einer Immunpräzipitation die Aktivität nicht inhibieren.

Verwendet man für die Immobilisierung einen Strep-tag-spezifischen Antikörper, tritt nur eine leichte Inhibition der Aktivität gegenüber der Immobilisierung an Strep-Tactin auf. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Immobilisierung über den Strep-tag und über einen Antikörper gegen den Strep-tag eine nötige Flexibilität bietet, die für eine Bindung der Komplementproteine entscheidend ist. Diese Flexibilität ist möglicherweise auf den kurzen Linker zurückzuführen, der durch die Insertion der Enterokinase-Schnittstelle in dem Fusionsprotein vorhanden ist. In einer ELISA-Platte immobilisiert behindern die scFv die Aktivität des CVF-Moleküls eventuell durch eine ungünstiger gerichtete Bindung. Die bessere Zugänglichkeit des Protein-Komplex könnte der Grund für die nicht auftretende Inhibition während des Komplementverbrauchsassays in Lösung sein.

Parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Analysen mit einem 5-10fachen Überschuss an scFv zeigten jedoch, dass die Antikörper-Fragmente auch in Lösung inhibierend wirken können. Durch einen hohen Überschuss an scFv CVF-29 konnte im Gegensatz zu einem Kontrollantikörper-Fragment die Aktivität fast vollständig inhibiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Antikörper-Fragmente eine Bindung von Faktor B inhibieren. Vermutlich ist die Affinität der Antikörper niedrig genug, um einen Komplement-verbrauchsassay durchzuführen. Liegt das Antikörper-Fragment jedoch in einer höheren Konzentration vor verschiebt sich das Gleichgewicht und die Faktor B-Bindung wird inhibiert. Bei der Durchführung des Festphasen-Assays mit den immobilisierten Anti-körper-Fragmenten ist ebenfalls ein Überschuss an scFv in dem System vorhanden.

150

Von zwei gewählten Antikörper-Fragmenten CVF-29 bzw. C3-22 wurden die Bindungscharakteristika mit Hilfe von auf *Surface plasmon*-Resonanz basierenden Techniken unter Verwendung eines Biacore-Gerätes analysiert. Die Bindungen an die jeweiligen Antigene konnten bestätigt und Bindungskonstanten im Bereich von 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-8</sup> M erhalten werden. Diese Werte liegen in einem durch die Diversität der verwendeten Bibliothek erwarteten Bereich (Perelson und Oster, 1979). Die ermittelten Bindungskonstanten zeigen, dass die Inhibition der Komplement-verbrauchenden Aktivität von CVF durch die Antikörper-Fragmente auf die Konzentrationsverhältnisse während des Assays zurückzuführen ist.

Für einen Festphasen-Assay ist nur die Immobilisierung über den Strep-tag möglich, die selektierten Antikörper-Fragmente eignen sich nicht für eine Immobilisierung während eines Assays. Jedoch können mit den Antikörper-Fragmente Präzipitationen durchgeführt werden, wobei eine Konzentrierung der Proteine erreicht werden kann. Die Präzipitate können anschließend in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt werden. Eine Immobilisierung über die scFv-F<sub>C</sub>-Antikörper könnte eventuell eine Analyse der Komplement-verbrauchenden Aktivität in einem Festphasen-Assay ermöglichen.

# 4.4 Generierung, Expression und Charakterisierung der Hybride

### 4.4.1 Konstruktion der CVF/C3-Hybride H1-H4

Zur Struktur-Funktions-Analyse des CVF-Moleküls wurde ein Kassettenaustausch als empirisches Verfahren entwickelt; dabei sollten durch den Austausch von Proteinbereichen aus CVF gegen humanes C3 funktionell nicht relevante Bereiche von CVF identifiziert werden.

Andere Ansätze, die die strukturellen Parameter als Kriterien zur Grundlage haben, wie ein Vergleich von Röntgenstrukturdaten und eine daraus resultierende Identifizierung der funktionell relevanten Bereiche von CVF konnten nicht durchgeführt werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte von nativem CVF lediglich ein Diffraktogramm erhalten werden (Sharma et al., 2000), während es noch nicht gelungen ist, humanes C3 zu kristallisieren.

Im Rahmen diese Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit es möglich ist, die CVF- $\alpha$ -Kette ohne Verlust der C3-Konvertase-Aktivität gegen humanes C3 auszutauschen. In vorherigen Arbeiten konnte ein Austausch der CVF- $\alpha$ -Kette gegen coC3 ohne Aktivitäts-verlust gezeigt werden (Wehrhahn, 2000).

Zum Austausch der CVF-α-Kette wurden ein Restriktionsenzym gewählt, das die cDNA von C3 zweimal schneidet. In der CVF-cDNA existiert an einer der homologen Positionen ebenfalls diese Schnittstelle, daher wurde in vorhergegangenen Arbeiten die zweite Schnittstelle durch eine stille Mutation in CVF generiert.

Nun war es möglich, durch relativ einfache Klonierungenstrategien Hybride zu erzeugen. In diesen zunächst generierten Hybriden wurden große Bereiche von CVF gegen humanes C3 ausgetauscht, resultierend in den Hydriden H1 und H2. In dem Hybrid H2 wurde die CVF- $\alpha$ -Kette durch die homologe C3- $\beta$ -Kette ersetzt, wodurch eine Identität zu humanen C3 von 36% resultiert. Das Hybrid H1 enthält zusätzlich noch einen humanen Bereich am 3'-Terminus, der die CVF- $\beta$ -Kette umfasst und damit eine Identität von 53% auf weist.

In einem zweiten Ansatz sollten putative Bindungsstellen für Komplementproteine wie Faktor B, das Regulatorprotein Faktor H oder die Spaltungsstellen der Protease Faktor I detaillierter untersucht werden. Faktor B bindet an C3b und wird dann durch Faktor D in Bb und Ba gespalten, wodurch die C3-Konvertase C3bBb resultiert. Im C3b-Molekül wird ein Bereich der Aminosäuren 730-739 für die Bindung an Faktor B verantwortlich gemacht, während die Aminosäuren 745-754 und 1187-1249 in die Faktor H-Bindung involviert sind (Fishelson, 1991). Dabei ist nicht bekannt, inwieweit im CVF-Molekül die analogen Bereiche für die Bindung an Faktor B bzw. die Resistenz gegenüber Faktor H verantwortlich sind. Da C3 und CVF strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und eine Identität von 50% besitzen (Vogel *et al.*, 1996), ist eine diesbezügliche Vermutung jedoch gerechtfertigt.

Zur Analyse der Relevanz der Bindungsregionen und Spaltungsstellen wurden Hybride generiert, die in den homologen Bereichen im CVF-Molekül die Bindungsstellen aus humanem C3 besitzen. Parallel zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein CVF-Molekül mit der humanen Faktor B-Bindungsstelle der Aminosäuren 730-739 keinen Verlust der Aktivität aufweist. Daher sollte analysiert werden, inwiefern auch die zweite postulierte Faktor B-Bindungsstelle oder die Faktor H-Bindungsstelle sowie Faktor I-Spaltungsstellen ebenfalls ohne einen Aktivitätsverlust ausgetauscht werden können.

Eine zweite Faktor B-Bindungsstelle wird im C3b-Molekül bei den Aminosäuren 933-942 vermutet. Ein proteolytischer Verdau von C3 mit einer Venom Protease, führte zu einem dreikettigen C3-Derivat, das als C3o bezeichnet wird. Dieses Fragment ist in der Lage, Faktor B zu binden, obwohl die Aminosäuren 730-736, die einen Großteil der Faktor B-Bindungsstelle ausmachen, nicht vorhanden sind. Hieraus konnte geschlossen werden, dass eine weitere Region an der Bindung beteiligt ist, dabei wurden die Aminosäuren 933-942 für die Bindung verantwortlich gemacht (O'Keefe et al., 1988). Von den Bindungsstellen von Faktor B (730-739) und Faktor H (745-754) konnte gezeigt werden, dass jeweils zwei negativ geladene Glutamatreste in die Bindung involviert sind (Oran und Isenman, 1999; Fishelson, 1991). In weiteren Studien wurden ebenfalls Mutationen in der zweiten Faktor B-Bindungsstelle analysiert, wobei aber eine Beeinflussung der Faktor B-Bindung nicht bestätigt werden konnte. Hieraus wurde geschlossen, dass diese zweite Bindungsstelle redundanten Charakter besitzt. Eine Möglichkeit wäre auch eine Bindung, die nicht auf den mutierten negativ geladenen Resten basiert (Taniguchi-Sidle und Isenman, 1994). Daher bleibt unklar, inwieweit Faktor B mittels eines multi-attachments von C3b gebunden sein könnte.

Zur Analyse der Relevanz der zweite Faktor B-Bindungsstelle wurde die humane zweite Faktor B-Bindungsstelle im CVF-Molekül in die analoge Region insertiert. Des weiteren wurde die homologen Regionen der drei Spaltungsstellen von Faktor I und die zweite Region der Bindungsstelle von Faktor H im CVF-Molekül humanisiert.

Die Klonierung der Hybride erfolgte durch die Insertion von vier Schnittstellen in der CVF-cDNA, die jeweils möglichst dicht vor und hinter den auszutauschenden Regionen liegen. Alle vier Schnittstellen wurden durch stille Mutationen unter Verwendung von Oligonukleotiden insertiert. Anschließend wurden die gewünschten Bereiche aus humanem C3 amplifiziert und über die Schnittstellen in die CVF-cDNA integriert. Die resultierenden Hybride H3 und H4 weisen zu CVF eine Identität von 99,2 % und 96,2% auf.

### 4.4.2 Expression und Charakterisierung der CVF/C3-Hybride

Sämtliche Hybride wurden mit dem Strep-tag fusioniert und anschließend in CHO-Zellen exprimiert. Die Ausbeuten an den Hybriden H1 und H2 konnten nicht beurteilt werden, da die Hybride sich aus beiden Proteinen zusammensetzen und die Reaktivität der polyklonalen Antiseren gegenüber den Hybriden nicht mehr der Reaktivität gegenüber CVF bzw. C3 entsprechen muss.

Die Ausbeute an Hybrid H3 entsprach der Ausbeute an CVF. Das Hybrid H4 hingegen wies niedrige Ausbeuten von 0,04 mg/l auf. Die Ursache der reduzierten Expression wurde hier jedoch nicht näher untersucht.

Alle Hybride sowie CVF und humanes C3 zeigten unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein gleiches Laufverhalten in einer SDS-PAGE. Dieses analoge Laufverhalten lässt auf eine vergleichbare Glykosylierung schließen, die auch zu erwarten ist, da alle Proteine mindestens zwei potentielle Glykosylierungsstellen aufweisen.

Die Hybride H1 und H2 konnten erfolgreich an Strep-Tactin immobilisiert und in einem Festphasen-Assay charakterisiert werden. Dabei wies das Hybrid H2 Komplement-verbrauchende Aktivität auf, die sich in einer deutlichen Reduktion der Hämolyse gegenüber C3 zeigte. Bei dem Hybrid H1 konnte keine Komplement-verbrauchende Aktivität nachgewiesen werden.

Diese Daten verifizierten die Ergebnisse der coC3/CVF-Hybride, wonach die CVF-α-Kette ohne Verlust der dekomplementierenden Aktivität ersetzt werden kann. Die Ergebnisse aus der Charakterisierung der coC3-Hybride lassen sich erfolgreich auf human C3-Hybride übertragen. CVF und Kobra C3 sind zu 85% identisch, während CVF und humanes C3 nur noch eine 50% ige Identität aufweisen (Fritzinger *et al.*, 1992; Fritzinger *et al.*, 1994). Dagegen wird durch einen Austausch des C-Terminus die dekomplementierende Eigenschaft stark vermindert oder vollständig inhibiert. Auch dies bestätigte die Ergebnisse aus der vorangegangenen Charakterisierungen der CVF/coC3-Hybride (Wehrhahn, 2000). Hierbei bleibt unklar, inwiefern sich die Inaktivität des Hybrides einzig aus dem Austausch eines möglicherweise funktionell relevanten 3'-Terminus von CVF ergibt oder die Faltung des Proteins durch die Kassettenmutagenese entscheidende Beeinträchtigungen erfahren hat. Ein erhebliches Problem bei der Durchführung des Festphasen-Assays war die Frage nach dem Einsatz vergleichbarer Konzentrationen der hybriden Proteine gegenüber CVF.

Eine densitometrische Bestimmung des rekombinanten CVF und humanen C3 gegenüber den nativen Proteinen ist möglich, jedoch ist die Reaktivität der polyklonalen Seren gegenüber den Hybriden deutlich vermindert, zumal bei den verwendeten Antiseren keine Kreuzreaktivität beobachtet werden konnte. Bei weiteren Antikörpern gegen CVF sind Kreuzreaktivitäten jedoch beschrieben (Grier *et al.*, 1987).

Eine Quantifizierung konnte nur mit hoher Varianz vorgenommen werden. Zudem ist es auch fraglich, inwieweit alle Proteine über den Affinitätstag gleich gut an Strep-Tactin immobilisiert werden. Die aus dem Festphasen-Assay erhaltenen Daten können daher nur bedingt in Relation zueinander gesetzt werden. Das etablierte System ist jedoch eine effektive Methode, mehrere Hybride zu charakterisieren; potentiell interessante Hybride können nachfolgend in größeren Mengen exprimiert und charakterisiert werden.

Eine Detektion der Strep-tag-Fusionsproteine von H3 und H4 im ELISA über Strep-Tactin konnte nur von H3 erfolgreich gezeigt werden. Eine Analyse der Komplementverbrauchenden Aktivität von H3 zeigte, dass die Aktivität im Bereich der Aktivität des rekombinanten CVF liegt.

Die vergleichbare dekomplementierende Aktivität von H3 und CVF zeigte, dass die Humanisierung der zweiten Region der Faktor B-Bindungsstelle analog zu den Daten, die über die Humanisierung der ersten Region gewonnen wurden, keinen Einfluss auf die Bildung und Stabilität der Konvertase ausübt. Dabei bleibt unklar, inwieweit dies darauf beruht, dass CVF und C3 Faktor B mit der selben Affinität binden oder CVF nicht die homologen Bindungsstellen aufweist.

Die Problematik der Bindung von H4 an Tactin bzw. der Detektion beruht vermutlich darauf, dass das Hybrid im Vergleich zu den anderen Proteinen trotz der Konzentrierung in zu geringeren Konzentrationen. Zusätzlich kommt es bei der Konzentrierung ebenfalls zu einer Anreicherung anderer Proteinkomponenten im Überstand, die womöglich die Bindung durch ihre massive Präsenz inhibieren.

#### 4.4.2.1 Immunpräzipitation des rCVF und des Hybrides H4

Es konnte gezeigt werden, dass nativer CVF erfolgreich präzipitiert werden konnte und die Präzipitate erfolgreich in Komplementverbrauchsassays eingesetzt werden können. Diese etablierte Methode wurde nun eingesetzt, um rekombinantes CVF und das Hybrid H4 erfolgreich aus dem Überstand der Expression zu präzipitieren. Die Präzipitate wurden durch das polyklonale CVF-Antiserum densitometrisch quantifiziert, wobei sich keine Anreicherung bei rCVF, jedoch ein guter Reinigungseffekt zeigte. Bei H4 dagegen konnte eine Anreicherung erhalten werden. Die Präzipitate wurden anschließend in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt. Bei beiden Proteinen konnten deutliche und vergleichbare Reduktionen der Hämolyse gezeigt werden.

Dies ist der erste Nachweis für eine Komplement-verbrauchende Aktivität des rekombinanten, in Mammalia exprimierten CVF in Lösung. Durch die Reinigung konnten die inhibierenden Komponenten erfolgreich abgetrennt werden.

Damit konnte erstmalig auch die Charakterisierung des Hybrides H4, welches sich wegen seiner niedrigen Expressionsrate vorherigen Analysen entzogen hatte, durchgeführt werden. Die dekomplementierende Aktivität von H4 zeigte, dass auch die Insertion der humanen Faktor H-Bindungsstellen und der Faktor I-Spaltungsstellen ohne einen Aktivitätsverlust durchgeführt werden kann.

### 4.4.3 Expression und Charakterisierung des Hybrides H5

Unter Verwendung des etablierten Festphasen-Assay und der Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die Hybride H2 und H3, sowie H4 eine zu CVF vergleichbare Komplement-verbrauchende Aktivität aufweisen. In parallel durchgeführten Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass auch die erste Faktor B-Bindungsstelle von humanem C3 in das CVF-Molekül insertiert werden kann, ohne einen Aktivitätsverlust zu bewirken.

Die erhaltenen Ergebnisse über die Struktur-Funktionsbeziehungen führen zur Konstruktion eines neuen Hybrides, welches die humanisierten Regionen aller Komplement-aktiven Hybride vereint. Die schon verwendeten Schnittstellen können für die Klonierung des Konstruktes H5 genutzt werden. Die fortschreitende Humanisierung von CVF resultiert in dem Hybrid H5, welches nur die funktionell relevante β-Kette von CVF beinhaltet und eine Identität zu humanem C3 von 90,7% aufweist. Ausgehend von den für humanes C3 bekannten Daten beinhaltet es sowohl die Faktor B- und Faktor H-Bindungsstellen als auch die Spaltungsstellen von Faktor I.

Das Hybrid wurde generiert, mit einem Strep-tag fusioniert und konnte erfolgreich in CHO-Zellen exprimiert werden.

Anschließend wurde in einem Festphasen-Assay die Komplement-verbrauchende Aktivität charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass H5 zu CVF vergleichbare Aktivität aufweist.

Damit konnte erstmalig unter Beibehaltung der Aktivität der CVF-Anteil auf 9% reduziert werden. Das Hybrid enthält nur noch die CVF-β-Kette und zeigt dekomplementierende Aktivität.

Die dekomplementierende Aktivität konnte für das Immunpräzipitat des Hybrides H5, welches in einem Komplementverbrauchsassay eingesetzt wurde, verifiziert werden.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde die zur CVF-β-Kette homologe C3-Region nur wenig untersucht, Bindungsstellen sind daher kaum identifiziert. Eine bekannte Bindungsstelle für den Komplementrezeptor CR3 liegt im Bereich der Aminosäuren 1361-1381 (Wright *et al.*, 1987). CR3, der auf Makrophagen und Killerzellen vorkommt, bindet an auf der Oberfläche von Pathogenen gebundenes C3bi und mediiert die Zerstörung des Pathogens (Newman *et al.*, 1984). In dem durchgeführten *in vitro*-Assay kann die Bindung von CR3 jedoch keinen Einfluss ausüben. Neben der CR3-Region liegt zusätzlich noch die Bindungsstelle für Properdin mit den Aminosäuren 1424-1432 in der analogen C3- Region (Daoudaki *et al.*, 1988). Properdin bindet und stabilisiert die alternative C3-Konvertase C3bBb (Fearon *et al.*, 1976). Im CVF-Molekül wird ebenfalls eine Properdin-Bindungsstelle vermutet, die Identität der Bindungsstellen von C3 und CVF liegt mit 70% deutlich über der Identität der gesamten Proteine (Fritzinger *et al.*, 1994). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch nicht bekannt, ob CVF Properdin tatsächlich bindet.

CVF könnte Properdin mit einer höhere Affinität binden als C3 und daher H5 durch Properdin stärker binden und eine stabilere C3-Konvertase bilden; eine andere mögliche Erklärung wäre ein entscheidender struktureller Unterschied, der im Bereich der CVF-β-Kette vorliegt.

Ausgehend von den für human C3 bekannten Daten, müsste H5 inaktiv sein. Es beinhaltet die humanen Spaltungsstellen von Faktor I und zusätzlich noch eine Bindungsstelle für

Faktor H. Zusätzlich wäre es denkbar, dass die erhöhte Stabilität der CVF-abhängigen Konvertase darauf beruht, dass CVF Faktor B stärker bindet. Wären im CVF-Molekül die homologen Regionen in die Faktor B-Bindung involviert, müsste dieser Vorteil durch die Humanisierung in H5 verloren gehen, denn anders als in H3 befinden sich alle bekannten Bindungsregionen für Faktor B in dem Molekül. Da jedoch kein Aktivitätsverlust beobachtet werden konnte, ist es möglich, dass strukturelle Unterschiede zwischen H5 und C3 das Hybrid H5 vor einer Regulation durch Faktor H und Faktor I schützen. Ferner wäre denkbar, dass in CVF eine zusätzliche Region für eine stärkere Bindung an Faktor B verantwortlich ist, die in dem Bereich der CVF-β-Kette liegt.

Zusätzlich zu der angestrebten Humanisierung von CVF löst sich bei dem Hybrid H5 das Problem der Quantifizierung. Bei einer Identität von ca. 91% kann davon ausgegangen werden, dass das polyklonale Serum gegen C3 das Hybrid H5 mit einem Reaktivitätsunterschied erkennt, der innerhalb der Varianz der densitometrischen Bestimmung nicht mehr relevant ist. Daher sollte eine Quantifizierung auf Grundlage eines Immunoblots oder im ELISA mittels der polyklonalen Seren möglich sein.

Dieses neuartige Molekül ist von therapeutischer Relevanz, da es eine gegenüber CVF deutliche verringerte Immunogenität aufweisen sollte und dennoch gleiche Komplementverbrauchende Aktivität zeigt, also auch in geringen Konzentrationen appliziert werden könnte.

### 4.4.4 Expression und Charakterisierung des Hybrides H6

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Hybrid H5 Komplement-aktiv ist, wurde der analoge Bereich der humanen C3-cDNA mit der homologen Region aus der CVF-cDNA verglichen. Nach genauerer Analyse der Identitäten von CVF und humanem C3 in den analogen terminalen Bereichen, wurde ein weiteres Konstrukts generiert. Das Hybrid H6 entspricht dem humanen C3 bis zu der Aminosäure 1527, der C-Terminus des Proteins ist CVF-Sequenz und weist damit eine Identität zu humanem C3 von 96,3% auf.

Nach der Klonierung wurde das Hybrid transient mit Ausbeuten von 1-2 mg/l in CHO-Zellen exprimiert. Die Aktivität des Hybrides H6 wurde im Anschluss in einem Festphasen-Assay bestimmt, wobei eine deutliche Komplement-verbrauchende Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Führt man eine Quantifizierung durch und setzt im Festphasen-Assay vergleichbare Quantitäten an H6 und CVF ein, wird deutlich, dass die Aktivität nur ca. 50% verringert wird.

Aus der Aktivität des Hybrides ergibt sich auch die Schlussfolgerung, dass die diskutierten Bindungsstellen für Properdin und CR3 keinen funktionellen Einfluss haben, da sie in dem nun humanisierten Bereich liegen.

Mit den Hybriden H5 und H6 wurden in dieser Arbeit damit erfolgreich zwei humanisierte CVF-Moleküle generiert, die einer therapeutischen Applikation zugänglich gemacht werden könnten. Das Hybrid H5 weist dabei zu CVF vergleichbare Komplement-verbrauchende Aktivität auf, könnte jedoch noch immunogenes Potential besitzen. Das Hybrid H6 mit einer 96% Identität zu humanem C3 weist vermutlich keine Immunogenität mehr auf, dafür jedoch einen Aktivitätsverlust gegenüber dem CVF-Molekül.

Da das Hybrid H6 als humanisiertes CVF-Molekül identifiziert werden konnte, wurden weitere Analysen angestrebt. Dazu sollte das Protein unter Verwendung von affinitätschromatografischen Methoden gereingt werden.

### 4.4.5 Reinigung und Charakterisierung des Hybrides H6

Das Hybrid H6 wurde nun zur genaueren Untersuchung stabil in CHO-Zellen exprimiert. Anschließend wurde affinitätschromatographisch eine Reinigung über Strep-Tactin-Sepharose durchgeführt, die sich aber als nicht geeignet erwies. In den Elutionsfraktionen konnte nur die humane  $\beta$ -Kette detektiert werden. Aus welchen Gründen die Disulfidbrücken in dem Molekül gespalten und auch die starken nicht-kovalenten Wechselwirkungen unterbunden wurden, konnte bislang nicht geklärt werden.

Alternativ wurde ein His-tag-Fusionsprotein generiert. Für eine Immobilisierung erschien der His-tag nicht geeignet, jedoch sollten die etablierten Reinigungsmethoden genutzt werden. Dazu wurde das Hybrid H6 wie schon bei der Klonierung des Strep-tags durch Oligonukleotide mit einem His-tag versehen. Das His-tag Fusionsprotein konnte mit Ausbeuten von 1-3 mg/l erfolgreich in CHO-Zellen exprimiert werden. Nach Generierung einer stabilen Zelllinie wurde das Hybrid His-H6 über IMAC angereichert. Dabei traten ebenfalls Reinigungsprobleme auf, da ein Großteil des Proteins nicht immobilisiert und daher im Durchlauf detektiert wurde. Zusätzlich sind die Elutionsfraktionen durch einen starken Proteinhintergrund verunreinigt. Die Reinigungseffizienz war vergleichbar zu der, die durch die Immunpräzipitation erhalten werden konnte. Für die weiteren Analysen konnten jedoch ausreichende Konzentrationen des Proteins erhalten werden.

Das Protein wurde im Immunoblot densitometrisch bestimmt und die Quantifizierung mittels eines *Sandwich*-ELISA über immobilisierten C3d-Antikörper verifiziert. Dabei konnten Konzentrationen von 3-4 mg/l bestimmt werden.

In einem anschließenden Komplementverbrauchsassay, in dem bis zu 80 ng Protein eingesetzt werden konnten, wurde ein Aktivitätsverlust von nur 32% gegenüber nativem CVF gezeigt. Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll, dass trotz der 96% igen Humanisierung ein Molekül generiert wurde, welches eine deutliche Komplement-verbrauchende Aktivität aufweist und damit hinreichend die Bedingungen der Applikation von geringen Dosen erfüllt, die CVF zu einem solch attraktiven Komplement-Modulator machen.

Ein *Bystander Lysis*-Assay auf Flüssigphasen-C5-Konvertase-Aktivität wurde mit dem gereinigten Protein ebenfalls durchgeführt. Im Gegensatz zu CVF zeigt das Hybrid H6 hier keine Aktivität. Die *Bystander Lysis*-Aktivität von CVF führt zu einer schnellen massiven Anreicherung von C5a, die starke Gewebeschädigungen auslösen kann (Till *et al.*, 1982; Schmidt *et al.*, 1997). Ein Verlust der Aktivität durch die Humanisierung ist daher vermutlich sogar ein Vorteil, wobei weitere Untersuchungen *in vivo* dieses Postulat erst bestätigen müssen.

Für weitere Analysen wurden die Strep-tag-Fusionsproteine von CVF, C3 und H6 über einen monoklonalen Strep-tag-Antikörper auf der ELISA-Platte immobilisiert und anschließend auf Faktor B- bzw. Faktor H-Bindung untersucht. Dabei zeigte sich ein Konzentrations-abhängiger Anstieg der Bindung von Faktor B bei CVF und H6, während bei humanem C3 kein Anstieg verzeichnet werden konnte. Die Analyse der Faktor H-Bindung zeigt, dass CVF nicht an Faktor H bindet, während das Hybrid H6 eine weniger effiziente Bindung als C3 zeigt, wobei jedoch bei beiden Proteinen keine Konzentrations-Abhängigkeit beobachtet werden kann.

Die erhaltenen Daten von C3 und H6 können in Relation zueinander gesetzt werden, da ein parallel durchgeführter ELISA unter Verwendung eines polyklonalen Antiserum gegen C3 zeigte, dass von C3 und von dem Hybrid H6 gleiche Konzentrationen immobilisiert wurden. Die Auswertung ergibt eine gegenüber C3 um ca. 70% verringerte Bindungsaffinität von Faktor H an H6. Die Analyse der Faktor B-Bindung ist schwierig, da nur geringe Differenzen detektiert wurden, dabei zeigt das Hybrid H6 eine höhere Affinität zu Faktor B als C3.

Die Charakterisierungen des Hybrides H6 ergaben eine gegenüber dem C3-Molekül stärkere Faktor B-Bindung und deutlich verminderte Bindungsaffinität zu Faktor H. Da die bekannten Bindungsstellen des C3-Moleküls in dem Bereich liegen, der auch in H6 vorhanden ist, können die Ergebnisse mit einer unterschiedliche Faltung des C-terminalen Bereiches des Moleküls interpretiert werden. Der vorhandene CVF-C-Terminus muss die humanen Bindungsstellen für Faktor B unterstützen, möglicherweise durch einen weiteren attachment-Punkt in der Region. Eine festere oder sich über mehrere Regionen erstreckende Bindung von Faktor B verhindert möglicherweise die Regulation durch Faktor H. Das Postulat, dass der C-terminale Bereich von CVF eine Faktor B-Bindungsstelle besitzt, wird zudem durch die Daten über die Hybride aus CVF und coC3 gefestigt. Kobra C3-Region die Faktor B-Bindung fast vollständig verhindert wird (Wehrhahn, 2000). Diese Daten müssen durch weitere Experimente verifiziert werden. In humanem C3 werden besonders vicinale saure Aminosäuren wie Glutamat für die Faktor B-Bindung verantwortlich gemacht (Oran und Isenman, 1999; Fishelson, 1991). Mutagenesestudien des C-terminalen Bereiches von CVF besonders der Glutamatreste könnten eventuell die Bindungsregion näher eingrenzen. Ein Vergleich der C-Termini zeigt einige Glutamatreste, die in C3-Molekül nicht vorliegen (Abb. 89). Dabei sind besonders die Aminosäuren Glu<sup>1533</sup> und Glu<sup>1535</sup> zu berücksichtigen, denn in der Region befinden sich zudem noch Aspartatreste, die ebenfalls im C3-Molekül in die Faktor B-Bindung (<sup>730</sup>DEDIIAEENI) involviert sind.

```
C3 ACEPGVDYVYKTRLVKVQLSNDFDEYIMAIEQTIKSGSDEVQVGQQRTFISPIKCREALK 1595
CVF ACETNVDYVYKTKLLRIEEQDGNDIYVMDVLEVIKQGTDENPRAKTHQYISQRKCQEALN 1574
C3 LEEKKHYLMWGLSSDFWGEKPNLSYIIGKDTWVEHWPEEDECQDEENQKQCQDLGAFTES 1655
CVF LKVNDDYLIWGSRSDLLPTKDKISYIITKNTWIERWPHEDECQEEEFQKLCDDFAQFSYT 1634
C3 MVVFGCPN- 1663
CVF LTEFGCPT- 1642
```

Abb. 89. Grafische Darstellung eines Vergleiches der C-terminalen Regionen aus human C3 und CVF. Die Glutamatreste sind hinterlegt.

# 4.5 Generelle Erwägungen zu Komplementmodulationen *in vivo*

Die therapeutische Applikation eines Komplement-Modulators oder Inhibitors bietet sich bei diversen Komplement-assoziierte Krankheiten an, wie Asthma (Regal *et al.* 1993), Systemischem Lupus Erythematodes (Belmont *et al.*, 1996), Glomerulonephritis (Couser *et al.*, 1985), Rheumatoider Arthritis (Kemp *et al.*, 1992), Alzheimer (Rogers *et al.*, 1992), Multipler Sklerose (Piddlesden *et al.*, 1996), Sepsis (Hack *et al.*, 1989) sowie bei einer hyperakuten Abstoßung und Abstoßung bei Transplantationen (Bach *et al.*, 1995, Baldwin *et al.*, 1995). Zudem wird auch bei HIV-Infektionen eine erhöhte C3-Ablagerung auf der viralen Oberfläche beschreiben. Das Virus schützt sich jedoch vor der Komplement-vermittelten Lyse durch die Anlagerung von Faktor H an seine Oberflächenproteine gp120 und gp41 (Stoiber *et al.*, 1995; Pintér *et al.*, 1995). Auch bei der Therapie von Krebserkrankung ist eine Aktivierung des alternativen Weges ein immuntherapeutischer Ansatz (Cooper, 1985, Cooper und Sim, 1984).

Die Komplement-Inhibition konnte *in vivo* durch den löslichen Komplementrezeptor (sCR1) bei Myastenia gravis, multipler Sklerose und Asthma erfolgreich bewirkt werden (Piddlesden *et al.*, 1994; Piddlesden *et al.*, 1996; Regal *et al.*, 1993). Der inhibierende anti-C5-Antikörper wurde bei Nephritis, Arthritis und bei myocardialer Ischämie und Reperfusion eingesetzt (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995; Vakeda *et al.*, 1998).

Zur erfolgreichen Applikation werden an die Komplement-Modulatoren verschiedene Anforderungen gestellt, wie die benötigte Konzentration und die Halbwertszeit des Moleküls *in vivo*. Zudem ist die Ebene der Regulation endscheidend; eine Inhibition aller Aktivierungswege resultiert möglicherweise in bakteriellen Infekten. Eine Abschätzung und ein Vergleich der verschiedenen Komplement-Inhibitoren ist im Detail nachfolgend dargestellt.

Den Komplement-Inhibitoren ist gemeinsam, dass sie äquimolar eingesetzt werden müssen, was bei rekombinanten Proteinen mit hohen Kosten für die Expression und Reinigung verbunden ist. Dabei wird vom sCR1 für die Inhibition von C3 eine Konzentrationen von 20-30 mg/kg benötigt, da die C3-Konzentration im Serum 1,4 mg/ml beträgt. C5 mit nur 80 µg/ml Serum wird von den applizierten Antikörpern in einer Dosis von 5-15 mg/kg inhibiert (Thomas *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1996). Unter diesem Aspekt betrachtet ist das synthetische Compstatin ein besonders interessanter Komplement-Inhibitor. Compstatin inhibiert die Spaltung von C3 in C3b und C3a. Durch Applikation in einer Konzentration von 0,09 mg/ml Blut konnte die hyperakute Abstoßung des Transplantats in einer *ex-vivo* Schwein-zu-Mensch-Lebertransplantation verhindert werden (Fiane *et al.*, 1999a; Fiane *et al.*, 1999b). In einer durch Heparin-induzierten Komplementaktivierung wurden 21 mg/kg appliziert (Soulika *et al.*, 2000). Trotz der benötigten großen Konzentration ist der entscheidende Vorteil eines solchen cyclischen Peptids die deutlich kostengünstiger Herstellung und eine mögliche orale Applikation.

CVF wurde trotz seiner Immunogenität bis zum heutigen Zeitpunkt *in vivo* in verschieden Tier-Modellstudien eingesetzt; darunter diverse Xenotransplantationsmodelle, Arthritis, und Arteriosklerose. Auch eine Applikation von CVF zur Aktivierung des alternativen Aktivierungsweges bei der Behandlung von Melanomzellen ist beschrieben. Mit einem  $k_{cat}/k_{M}$ -Wert von  $4x10^4$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (Vogel und Müller-Eberhardt, 1982) kann der katalytisch wirkende CVF in der geringen Konzentration von 300 µg/kg appliziert werden und dabei eine effektive und beständige Dekomplementierung bewirken.

Die Komplement-Inhibitoren müssen zudem eine hohe Halbwertzeit *in vivo* aufweisen. Der lösliche Komplementrezeptor sCR1 weist eine Halbwertszeit von 70 h auf (Weismann *et al.*, 1990; Zimmerman *et al.*, 2000), während das humanisierte anti-C5-Antikörper-Fragment nur 14 h–17 h lang eine 50% Dekomplementierung aufrecht erhalten kann (Evans *et al.*, 1995). Die durchschnittliche Halbwertzeit von humanisierten Antikörpern liegt mit bis zu 24 Tagen deutlich höher (Benincosa *et al.*, 2000; Kalofonos *et al.*, 1994; Subramanian *et al.*, 1998). Eine Expression im IgG-Format sollte daher die Halbwertzeit des Antikörpers deutlich erhöhen. Für Compstatin ist bis zum dem heutigen Zeitpunkt keine Halbwertzeit ermittelt. Durchgeführte Biotransformationsstudien durch Inkubation mit Serum zeigten jedoch nur geringfügige Degradation nach 24 h (Sahu *et al.*, 2000).

An die Applikation von CVF werden andere Anforderungen gestellt. Hierbei resultiert eine Dekomplementierung, wobei die Wiederherstellung des Komplementsystems Tage dauert. Mit einer Halbwertszeit der CVF-abhängigen C3-Konvertase von 7 h wird eine effektive Dekomplementierung erreicht. Wird jedoch nur eine partielle Dekomplementierung angestrebt, ist die Halbwertszeit von entscheidender Bedeutung. Für das Molekül wurde jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt keine Halbwertszeit ermittelt.

Ferner ist die Ebene der Komplementkaskade, auf der die Inhibition erfolgen soll entscheidend. Hier kann selektiv z.B. durch C1-Inhibitor nur ein Weg oder alle drei Aktivierungswege durch C3-Blockierung inhibiert werden. Es wird beschrieben, dass eine C3-Spaltung notwendig ist, da das entstehende C3a essentiell für eine bakterielle Abwehr ist (Ross und Densen, 1984). Dagegen gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass bei Applikation von sCR1, der alle Aktivierungswege vor der C3-Spaltung blockiert, eine bakterielle Abwehr gefährdet (Makrides, 1998). Ein erhöhtes Auftreten von Infektionen ist zudem nicht beschrieben (Zimmerman *et al.*, 2000).

Eine Inhibition durch anti-C5-Antikörper ist vorteilhaft, da die Antikörper eine Spaltung und daraus resultierende Aktivierung von C5 durch Sauerstoff-Radikale oder durch Enzyme, die von verletztem Gewebe freigesetzt werden, ebenfalls inhibieren (Vogt *et al.*, 1989; Wetsel und Kolb, 1982; Wetsel und Kolb, 1983). Es wurde ferner gezeigt, dass eine 60%ige Komplementinhibierung ausreicht, um eine Kollagen-induzierte Arthritis zu verhindern (Wang *et al.*, 1995). Lassen sich diese Daten auf andere Situationen übertragen, scheinen die bakteriellen Risiken vernachlässigbar.

Die durch eine Dekomplementierung unter Verwendung von CVF auftretende massive Anreicherung des Anaphylatoxins C5a stellt jedoch ein erhebliches Problem dar. Anaphylatoxine bewirken Degranulation von Mastzellen und Schädigung von Endothelzellen. Die Effekte werden durch die Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt. Nach Bindung an den Rezeptor wird C5a internalisiert und abgebaut, was eine Regulation der Aktivität beinhaltet. C5a besitzt außerdem eine 10fach höhere Aktivität als C3a (Wetsel, 1995). Die Anaphylatoxine werden schnell durch Carboxypeptidase N zu ihren inaktiven desArg-Formen gespalten (Bokisch *et al.*, 1969). Ein C5a-inaktivierendes Enzym wurde aus humaner Peritoneal-Flüssigkeit isoliert (Ayesh *et al.*, 1995). Tritt durch die Applikation von CVF bzw. des humanisierten CVF eine massive Gewebeschädigung auf, könnte eine Koapplikation eines solchen Enzyms möglicherweise Kompensation bewirken.

Ein Vergleich der Komplement-Inhibitoren betont besonders durch die katalytische Aktivität einen Vorzug des CVF-Moleküls. Dieses lässt sich auch durch direkte Vergleiche verifizieren. In einem Tiermodell für Allergische Neuritis wurde die sCR1-vermittelte Blockierung und die Dekomplementierung durch CVF untersucht. Dabei zeigte sich, dass CVF deutlich effektiver wirkte (Vriesendorp *et al.*, 1997). In einer Herztransplantationsstudie von Meerschweinchen zu Ratten wurde die Abstoßung des Transplantates durch sCR1 auf 22 h, bei Applikation von CVF auf 67 h erhöht. Bei Anwendung von sCR1 wurden, im Gegensatz zur Dekomplementierung mit CVF, C3-Ablagerungen und Infiltration von Neutrophilen beobachtet (Candinas *et al.*, 1996).

Die hohe Identität von 96% zu humanem C3 sollte für eine repetitive therapeutische Anwendung ausreichen. Humanisierte Antikörper sind zu 90-95% human und lösen keine detektierbare Immunantwort mehr aus. Der Verlust der immunogenen Epitope bei einer Humanisierung konnte bei einem anti-CD14-Antikörper, einem anti-CD56-Antikörper, einem anti-CD19-Antikörper und bei dem Karzinom-spezifischen Antikörper B3 gezeigt werden (Riechmann *et al.*, 1988; Hale *et al.*, 1988; Benhar *et al.*, 1994). Humanisierte Antikörper gegen den Her2/Neu-Rezeptor oder ein anti-CD25-Antikörper werden therapeutisch eingesetzt.

Das generierte humanisierte CVF ist als Enzym anderen Komplement-Inhibitoren überlegen. Der 32% ige Aktivitätsverlust resultiert vermutlich in einer höheren Applikationsdosis von ca. 400  $\mu$ g/kg, was jedoch im Bezug auf die anderen Inhibitoren immer noch gering ist, denn sie werden in bis zu achtzigfach höheren Dosen appliziert.

Das Hauptproblem der Applikation von CVF ist seine Immunogenität (Makrides, 1998), die durch die erfolgreiche Humanisierung des Moleküls in dieser Arbeit gelöst worden sein sollte. Dabei stehen *in vivo*-Studien noch aus, die zeigen können, inwieweit sich die *in* 

*vitro*-ermittelten Daten in einem deutlich komplexeren System mit weiteren Komplementregulatoren wie den Komplementrezeptoren verifizieren lassen.

### 4.6 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Humanisierung des *Cobra Venom Factors*. Die Generierung von Hybriden und deren Charakterisierung, sowie die logische Umsetzung der erhaltenen Daten, resultierte in einer erfolgreichen Humanisierung des CVF-Moleküls. Das Hybrid H6 zeigt mit einer 96% Identität zu humanem C3 eine Aktivität von 68% im Vergleich zu CVF. Eine weitere Eingrenzung des CVF-Anteils könnte durchgeführt werden, wobei analysiert werden müsste, inwieweit Aktivitätsverluste resultieren. Zumal die Daten aus der therapeutischen Applikation humanisierter Antikörper nicht unbedingt auf alle Proteine übertragbar sind und somit durchaus möglich sein könnte, dass das Hybrid H6 dennoch eine Immunantwort auslöst.

In dieser Arbeit wurden Antikörper-Fragmente gegen CVF und humanes C3 selektiert und exprimiert. Diese können für weitere Studien hervorragend eingesetzt werden. Eine effektive Reinigung über die Fc-scFv Fragmente könnte etabliert werden. Zudem erlauben die scFv möglicherweise eine Kristallisation von nativem CVF oder C3. Kokristallisation mit Antikörper-Fragmenten die Konformationsepitope erkennen vermindert die Flexibilität der Proteine und führt gegebenenfalls zu einer Kristallisation. Könnte man von beiden Proteinen Röntgenstrukturdaten erhalten, wäre eine Vergleich der C-Termini interessant. Möglicherweise könnte die Relevanz des C-Terminus durch eine zum C3-Molekül unterschiedliche Faltung gezeigt werden.

Nachdem die Komplementmodulation mit dem humanisierten CVF-Molekül *in vitro* erfolgreich gezeigt wurde, müssen umfangreiche *in vivo*-Studien diese Daten verifizieren. Wird in Tierstudien eine effektive Dekomplementierung und ein Verlust der immunogenen Epitope bestätigt, steht ein neues Molekül zur Verfügung, welches sich bei der Therapie der Komplement-assoziierten Krankheiten als außerordentlich bedeutend erweisen könnte.

## 5 Zusammenfassung

Der Komplementmodulator *Cobra Venom Factor* aus dem Gift einiger Kobra-Spezies bewirkt eine effektive Dekomplementierung humanen Serums. Dieser Effekt könnte therapeutisch von Interesse sein, würde nicht die starke Immunogenität des Moleküls eine repetitive Applikation verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher *Cobra Venom Factor* durch einen Kassettenaustausch gegen analoge Regionen des homologen Komplementproteins C3 humanisiert werden. Diese Humanisierung sollte auf der Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen des CVF-Moleküls basieren.

CVF, humanes C3 sowie mehrere Hybride wurden dargestellt und in Säugerzellen zur Expression gebracht. Durch die Fusion eines geeigneten Affinitätstags konnte zusätzlich eine spezifische Immobilisierung und eine Abtrennung interferierender Komponenten erzielt werden. In einem nachfolgenden Festphasen-Assay konnte die Analyse der Komplement-verbrauchenden Aktivität ermöglicht werden.

Mittels der *Phage Display*-Technologie wurden rekombinante Antikörper gegen CVF und humanes C3 selektiert. Durch die Expression dieser Antikörper-Fragmente in Prokaryonten und von scFv-F<sub>C</sub>-Derivaten in Eukaryonten konnten erstmalig Reinigungen von CVF und einigen Hybriden über Immunpräzipitationen durchgeführt werden.

Die Charakterisierung der unterschiedlichen Hybride erlaubte die Identifizierung funktionell nicht relevanter Regionen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die CVF- $\alpha$ -Kette, die  $\gamma$ -Kette sowie die C3a- und C3d-homologen Regionen ohne einen Aktivitätsverlust gegen C3 ausgetauscht werden können. Ein Austausch des C-terminalen Bereiches hingegen resultiert in einem vollständigen Aktivitätsverlust. Die Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen erbrachte Hinweise, dass nicht homologe Bereiche des CVF- und humanen C3-Moleküls für die Faktor B-Bindung verantwortlich zeichnen. Die funktionelle Relevanz des C-terminalen Bereiches des CVF-Moleküls indiziert die Existenz einer entscheidenden Faktor B-Bindungsstelle in diesem Bereich.

Eines der Hybride verfügt über eine 90% ige Identität zu humanem C3 unter vollständigem Erhalt der Komplement-verbrauchenden Aktivität. Auf der Grundlage dieser Informationen konnte eine weitere Reduzierung des nichthumanen Anteils in einem Molekül realisiert werden, das über eine Identität von 96% zu humanem C3 verfügt und somit für eine repetitive therapeutische Applikation geeignet erscheint. Das Hybrid weist dabei eine Aktivität von 68% im Vergleich zu CVF auf.

Die in dieser Arbeit generierten, nahezu humanen Komplementmodulatoren könnten nicht nur bei der differenzierteren Analyse der Mechanismen der C3-Konvertasen Anwendung finden, sondern sich bei therapeutischen Applikationen im Bereich unterschiedlichster Komplement-assoziierter Krankheiten als außerordentlich bedeutend erweisen.

### Abstract

Cobra venom factor, the complement-modulating enzyme of the venom of various species of cobra, effects an efficient consumption of complement in human serum. This effect could be of therapeutical interest, despite a repetitive application is hindered by its high immunogenicity. Therefore, the aim of this study was the humanisation of the cobra venom factor by a cassette exchange for analogue regions of the human homologue complement component C3. The basis of this humanisation should be an analysis of the structure-function relationship.

CVF, human C3 and various hybrids were expressed in CHO cells. Additionally, the fusion of a suitable affinity-tag resulted in specific immobilisation and removal of interfering components. Subsequently the analysis of the complement consumption activity was performed as a solid phase assay.

Using phage display technology, recombinant antibodies were selected against CVF and human C3. Expression of these antibody-fragments in procaryotes and scFv- $F_C$ -derivatives in eukaryotes yielded tools for purification of CVF and some hybrids, whose activity could be shown.

Characterising different hybrids led to the identification of functionally non-relevant regions in the CVF-molecule. Thereby evidence was provided that the CVF- $\alpha$ -chain,  $\gamma$ -chain, and also the C3a- and C3d-analogue regions can be substituted for human C3 without effecting activity. Exchanging the C-terminal region, however, results in a complete loss of activity. The analysis of the structure-function relationship indicates that non-homologous regions are involved in factor B-binding. Furthermore, the functional relevance of the C-terminal regions reveals that a factor B-binding site exsist in this region. One of the generated hybrids shares an identity of 90% with human C3 and thereby fully retains CVF-activity. Based on these results a further reduction of the non-human region could be realised in a molecule, which shares a 96% identity to human C3 and therefore appears as a suitable candidate for a repetitive application. This molecule retains 68% of activity compared to CVF.

The almost human complement modulators generated in this study could not only contribute to a more detailed analysis of the mechanisms of the C3-convertases, but can be of relevance in the therapy of various complement-associated diseases.

## 6 Literatur

Alper, C. A.; Johnson, A. M.; Birtch, A. G. und Moore, F. D. (1969) Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science*, **163**, 286-288.

Ames, R. S.; Li, Y.; Sarau, H. M.; Nuthulaganti, P.; Foley, J. J.; Ellis, C.; Zeng, Z.; Su, K.; Jurewicz, A. J.; Hertzberg, R. P.; Bergsma, D. J. und Kumar, C. (1996) Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *J Biol Chem*, **271**, 20231-20234.

Andrade, E. V.; Albuquerque, F. C.; Moraes, L. M.; Brigido, M. M. und Santos-Silva, M. A. (2000) Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, Pichia pastoris expression and antigen binding characterization. *J Biochem (Tokyo)*, **128**, 891-895.

Ayesh, S. K.; Azar, Y.; Barghouti, II; Ruedi, J. M.; Babior, B. M. und Matzner, Y. (1995) Purification and characterization of a C5a-inactivating enzyme from human peritoneal fluid. *Blood*, **85**, 3503-3509.

Bach, F. H.; Robson, S. C.; Winkler, H.; Ferran, C.; Stuhlmeier, K. M.; Wrighton, C. J. und Hancock, W. W. (1995) Barriers to xenotransplantation. *Nat Med*, **1**, 869-873.

Baldwin, W. M., 3rd; Pruitt, S. K.; Brauer, R. B.; Daha, M. R. und Sanfilippo, F. (1995) Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation*, **59**, 797-808.

Ballow, M. und Cochrane, C. G. (1969) Two anticomplementary factors in cobra venom: hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them. *J Immunol*, **103**, 944-952.

Becherer, J. D.; Alsenz, J.; Servis, C.; Myones, B. L. und Lambris, J. D. (1989) Cell surface proteins reacting with activated complement components. *Complement Inflamm*, **6**, 142-165.

Belmont, H. M.; Hopkins, P.; Edelson, H. S.; Kaplan, H. B.; Ludewig, R.; Weissmann, G. und Abramson, S. (1986) Complement activation during systemic lupus erythematosus. C3a and C5a anaphylatoxins circulate during exacerbations of disease. *Arthritis Rheum*, **29**, 1085-1089.

Benhar, I.; Padlan, E. A.; Jung, S. H.; Lee, B. und Pastan, I. (1994) Rapid humanization of the Fv of monoclonal antibody B3 by using framework exchange of the recombinant immunotoxin B3(Fv)-PE38. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12051-12055.

Benincosa, L. J.; Chow, F. S.; Tobia, L. P.; Kwok, D. C.; Davis, C. B. und Jusko, W. J. (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a humanized monoclonal antibody to factor IX in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, **292**, 810-816.

Biesecker, G.; Dihel, L.; Enney, K. und Bendele, R. A. (1999) Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology*, **42**, 219-230.

Birnboim, H. C. und Doly., J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res*, 1513-1514.

Bohnsack, J. F. und Cooper, N. R. (1988) CR2 ligands modulate human B cell activation. J Immunol, 141, 2569-2576.

Bokisch, V. A.; Müller-Eberhard, H. J. und Cochrane, C. G. (1969) Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum. *J Exp Med*, **129**, 1109-1130.

Boulianne, G. L.; Hozumi, N. und Shulman, M. J. (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, **312**, 643-646.

Bruggemann, M.; Winter, G.; Waldmann, H. und Neuberger, M. S. (1989) The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med*, **170**, 2153-2157.

Bruggemann, M.; Spicer, C.; Buluwela, L.; Rosewell, I.; Barton, S.; Surani, M. A. und Rabbitts, T. H. (1991) Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus. *Eur J Immunol*, **21**, 1323-1326.

Burger, R.; Zilow, G.; Bader, A.; Friedlein, A. und Naser, W. (1988) The C terminus of the anaphylatoxin C3a generated upon complement activation represents a neoantigenic determinant with diagnostic potential. *J Immunol*, **141**, 553-558.

Busch, K.; Piehler, J. und Fromm, H. (2000) Plant succinic semialdehyde dehydrogenase: dissection of nucleotide binding by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, **39**, 10110-10117.

Buyon, J. P.; Tamerius, J.; Ordorica, S.; Young, B. und Abramson, S. B. (1992) Activation of the alternative complement pathway accompanies disease flares in systemic lupus erythematosus during pregnancy. *Arthritis Rheum*, **35**, 55-61.

Candinas, D.; Lesnikoski, B. A.; Robson, S. C.; Scesney, S. M.; Otsu, I.; Myiatake, T.; Marsh, H. C., Jr.; Ryan, U. S.; Hancock, W. W. und Bach, F. H. (1996) Soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor in discordant xenotransplantation. *Transplant Proc*, **28**, 581.

Cheung, A. K.; Parker, C. J. und Hohnholt, M. (1994) Soluble complement receptor type 1 inhibits complement activation induced by hemodialysis membranes in vitro. *Kidney Int*, **46**, 1680-1687.

Christiansen, D.; Milland, J.; Thorley, B. R.; McKenzie, I. F. und Loveland, B. E. (1996) A functional analysis of recombinant soluble CD46 in vivo and a comparison with recombinant soluble forms of CD55 and CD35 in vitro. *Eur J Immunol*, **26**, 578-585.

Chrupcala, M.; Pomer, S.; Staehler, G.; Waldherr, R. und Kirschfink, C. (1994) Prolongation of discordant renal xenograft survival by depletion of complement. Comparative effects of systemically administered cobra venom factor and soluble complement receptor type 1 in a guinea-pig to rat model. *Transpl Int*, **7 Suppl 1**, S650-653.

Chrupcala, M.; Pomer, S.; Waldherr, R.; Staehler, G. und Kirschfink, M. (1996) [Effect of complement modulation with the soluble complement receptor sCR1 on survival and function of kidney xenotransplant. An experimental study with a new guinea pig to rate transplant model]. *Urologe A*, **35**, 478-484.

Cochrane, C. G.; Müller-Eberhard, H. J. und Aikin, B. S. (1970) Depletion of plasma complement in vivo by a protein of cobra venom: its effect on various immunologic reactions. *J Immunol*, **105**, 55-69.

Cooper, P. D. (1985) Complement and cancer: activation of the alternative pathway as a theoretical base for immunotherapy. *Adv Immun Cancer Ther*, **1**, 125-166.

Cooper, P. D. und Sim, R. B. (1984) Substances that can trigger activation of the alternative pathway of complement have anti-melanoma activity in mice. *Int J Cancer*, **33**, 683-687.

Couser, W. G.; Baker, P. J. und Adler, S. (1985) Complement and the direct mediation of immune glomerular injury: a new perspective. *Kidney Int*, **28**, 879-890.

Couser, W. G.; Johnson, R. J.; Young, B. A.; Yeh, C. G.; Toth, C. A. und Rudolph, A. R. (1995) The effects of soluble recombinant complement receptor 1 on complement-mediated experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, **5**, 1888-1894.

Craddock, P. R.; Fehr, J.; Dalmasso, A. P.; Brighan, K. L. und Jacob, H. S. (1977) Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest*, **59**, 879-888.

Dahl, M. R.; Thiel, S.; Matsushita, M.; Fujita, T.; Willis, A. C.; Christensen, T.; Vorup-Jensen, T. und Jensenius, J. C. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, **15**, 127-135.

Dalmasso, A. P. (1997) Role of complement in xenografts rejection, in *Xenotransplantation: The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*, Vol. 2nd ed (Cooper, D. K.;Kemp, E.;Platt, J. L.undWhite, D. J., eds), pp 33-60. Springer, Berlin.

Daoudaki, M. E.; Becherer, J. D. und Lambris, J. D. (1988) A 34-amino acid peptide of the third component of complement mediates properdin binding. *J Immunol*, **140**, 1577-1580.

Davies, A. (1996) Policing the membrane: cell surface proteins which regulate complement. *Res Immunol*, 147, 82-87.

Davis, A. E., 3rd und Harrison, R. A. (1982) Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry*, **21**, 5745-5749.

DeBruijn, M. H. L. und Fey., G. H (1985) Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 708-712.

DiScipio, R. G. (1992) Formation and structure of the C5b-7 complex of the lytic pathway of complement. *J. Biol. Chem.*, 17087-17094.

Dodds, A. W. und Day, A. J. (1993) Complement in Health and Disease (Whaley, K.;Loos, M.undWeiler, J. M., eds), pp 39-88. Kluwer, Boston.

Dolmer, K. und Sottrup-Jensen, L. (1993) Disulfide bridges in human complement component C3b. *FEBS Lett*, **315**, 85-90.

Ehrlich, P. und Morgenroth., J. (1899) Zur Theorie der Lysinwirkung. *Berl. Klin. Woschr.*, **36**, 6-9.

Eldering, E.; Huijbregts, C. C.; Nuijens, J. H.; Verhoeven, A. J. und Hack, C. E. (1993) Recombinant C1 inhibitor P5/P3 variants display resistance to catalytic inactivation by stimulated neutrophils. *J Clin Invest*, **91**, 1035-1043.

Elsner, J.; Oppermann, M.; Czech, W.; Dobos, G.; Schopf, E.; Norgauer, J. und Kapp, A. (1994) C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur J Immunol*, **24**, 518-522.

Eppinger, M. J.; Deeb, G. M.; Bolling, S. F. und Ward, P. A. (1997) Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*, **150**, 1773-1784.

Evans, M. J.; Rollins, S. A.; Wolff, D. W.; Rother, R. P.; Norin, A. J.; Therrien, D. M.; Grijalva, G. A.; Mueller, J. P.; Nye, S. H.; Squinto, S. P. und et al. (1995) In vitro and in vivo inhibition of complement activity by a single-chain Fv fragment recognizing human C5. *Mol Immunol*, **32**, 1183-1195.

Fearon, D. T. und Austen, K. F. (1975) Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*, **142**, 856-863.

Fecke, W.; Farries, T. C.; D'Cruz, L. G.; Napper, C. M. und Harrison, R. A. (1998) Expression of factor I-resistant mutants of the human complement component C3 in heterologous systems. *Xenotransplantation*, **5**, 29-34.

Fiane, A. E.; Mollnes, T. E.; Videm, V.; Hovig, T.; Hogasen, K.; Mellbye, O. J.; Spruce, L.; Moore, W. T.; Sahu, A. und Lambris, J. D. (1999a) Prolongation of ex vivo-perfused pig xenograft survival by the complement inhibitor Compstatin. *Transplant Proc*, **31**, 934-935.

Fiane, A. E.; Mollnes, T. E.; Videm, V.; Hovig, T.; Hogasen, K.; Mellbye, O. J.; Spruce, L.; Moore, W. T.; Sahu, A. und Lambris, J. D. (1999b) Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of ex vivo perfused pig xenografts. *Xenotransplantation*, **6**, 52-65.
Fishelson, Z. (1991) Complement C3: a molecular mosaic of binding sites. *Mol Immunol*, **28**, 545-552.

Frank, M. M. und Fries, L. F. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, **12**, 322-326.

Fritzinger, D. C.; Bredehorst, R. und Vogel, C. W. (1994) Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12775-12779.

Fritzinger, D. C.; Petrella, E. C.; Connelly, M. B.; Bredehorst, R. und Vogel, C. W. (1992) Primary structure of cobra complement component C3. *J Immunol*, **149**, 3554-3562.

Ganu, V. S. und Müller-Eberhard, H.-J. (1985) Inhibition of the factor B and factor H binding to C3b by synthetic peptid corresponding to residues 749-789 of human C3. *Complement*, **2**, 27.

Gonzalez-Rubio, C.; Ferreira-Cerdan, A.; Ponce, I. M.; Arpa, J.; Fontan, G. und Lopez-Trascasa, M. (2001) Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol*, **58**, 1923-1928.

Gorman, S. D.; Clark, M. R.; Routledge, E. G.; Cobbold, S. P. und Waldmann, H. (1991) Reshaping a therapeutic CD4 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4181-4185.

Götze, O. und Müller-Eberhard, H. J. (1971) The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation. *J Exp Med*, **134**, Suppl:90s-108s.

Gowda, D. C.; Petrella, E. C.; Raj, T. T.; Bredehorst, R. und Vogel, C. W. (1994) Immunoreactivity and function of oligosaccharides in cobra venom factor. *J Immunol*, **152**, 2977-2986.

Grier, A. H. und Vogel, C. W. (1989) The oligosaccharide chains of cobra venom factor are required for complement activation. *Mol Immunol*, **26**, 563-574.

Grier, A. H.; Schultz, M. und Vogel, C. W. (1987) Cobra venom factor and human C3 share carbohydrate antigenic determinants. *J Immunol*, **139**, 1245-1252.

Griffiths, A. D.; Williams, S. C.; Hartley, O.; Tomlinson, I. M.; Waterhouse, P.; Crosby, W. L.; Kontermann, R. E.; Jones, P. T.; Low, N. M.; Allison, T. J. und et al. (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J*, **13**, 3245-3260.

Gyongyossy-Issa, M. I.; McLeod, E. und Devine, D. V. (1994) Complement activation in platelet concentrates is surface-dependent and modulated by the platelets. *J Lab Clin Med*, **123**, 859-868.

Hack, C. E.; Nuijens, J. H.; Felt-Bersma, R. J.; Schreuder, W. O.; Eerenberg-Belmer, A. J.; Paardekooper, J.; Bronsveld, W. und Thijs, L. G. (1989) Elevated plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis. *Am J Med*, **86**, 20-26.

Hack, C. E.; Voerman, H. J.; Eisele, B.; Keinecke, H. O.; Nuijens, J. H.; Eerenberg, A. J.; Ogilvie, A.; Strack van Schijndel, R. J.; Delvos, U. und Thijs, L. G. (1992) C1-esterase inhibitor substitution in sepsis. *Lancet*, **339**, 378.

Hale, G.; Dyer, M. J.; Clark, M. R.; Phillips, J. M.; Marcus, R.; Riechmann, L.; Winter, G. und Waldmann, H. (1988) Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet*, **2**, 1394-1399.

Heller, T.; Hennecke, M.; Baumann, U.; Gessner, J. E.; zu Vilsendorf, A. M.; Baensch, M.; Boulay, F.; Kola, A.; Klos, A.; Bautsch, W. und Kohl, J. (1999) Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury. *J Immunol*, **163**, 985-994.

Higgins, P. J.; Ko, J. L.; Lobell, R.; Sardonini, C.; Alessi, M. K. und Yeh, C. G. (1997) A soluble chimeric complement inhibitory protein that possesses both decay-accelerating and factor I cofactor activities. *J Immunol*, **158**, 2872-2881.

Hirani, S.; Lambris, J. D. und Müller-Eberhard, H. J. (1986) Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides of human complement component C3. *Biochem J*, **233**, 613-616.

Hoffman, C. S. und Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene*, **57**, 267-272.

Homeister, J. W.; Satoh, P. und Lucchesi, B. R. (1992) Effects of complement activation in the isolated heart. Role of the terminal complement components. *Circ Res*, **71**, 303-319.

Horstick, G. (2002) C1-esterase inhibitor in ischemia and reperfusion. *Immunobiology*, **205**, 552-562.

Isenman, D. E.; Kells, D. I.; Cooper, N. R.; Müller-Eberhard, H. J. und Pangburn, M. K. (1981) Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry*, **20**, 4458-4467.

Janatova, J. (1986) Detection of disulphide bonds and localization of interchain linkages in the third (C3) and the fourth (C4) components of human complement. *Biochem J*, **233**, 819-825.

Jarvis, D. L. und Finn, E. E. (1996) Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nat Biotechnol*, **14**, 1288-1292.

Johnson, B. J. und Kucich, U. N. (1977) Interrelation between two anticomplement cobra venom factors isolated from crude Naja naja cobra venom. *J Pharm Sci*, **66**, 947-949.

Jones, P. T.; Dear, P. H.; Foote, J.; Neuberger, M. S. und Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, **321**, 522-525.

Kahnberg, K. E.; Lindhe, J. und Attstrom, R. (1976) The role of complement in initial gingivitis. I. The effect of decomplementation by cobra venom factor. *J Periodontal Res*, **11**, 269-278.

Kalofonos, H. P.; Kosmas, C.; Hird, V.; Snook, D. E. und Epenetos, A. A. (1994) Targeting of tumours with murine and reshaped human monoclonal antibodies against placental alkaline phosphatase: immunolocalisation, pharmacokinetics and immune response. *Eur J Cancer*, **30A**, 1842-1850.

Kemp, E.; Dieperink, H.; Leth, P.; Jensenius, J. C.; Nielsen, B.; Lillevang, S. T.; Salomon, S.; Steinbruchel, D.; Larsen, S.; Koch, C. und et al. (1994) Monoclonal antibodies to complement C3 prolong survival of discordant xenografts: guinea pig heart to rat transplantation. *Transplant Proc*, **26**, 1011-1015.

Kemp, P. A.; Spragg, J. H.; Brown, J. C.; Morgan, B. P.; Gunn, C. A. und Taylor, P. W. (1992) Immunohistochemical determination of complement activation in joint tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis using neoantigen-specific monoclonal antibodies. *J Clin Lab Immunol*, **37**, 147-162.

Kilgore, K. S.; Friedrichs, G. S.; Homeister, J. W. und Lucchesi, B. R. (1994) The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, **28**, 437-444.

Kim, Y. U.; Carroll, M. C.; Isenman, D. E.; Nonaka, M.; Pramoonjago, P.; Takeda, J.; Inoue, K. und Kinoshita, T. (1992) Covalent binding of C3b to C4b within the classical complement pathway C5 convertase. Determination of amino acid residues involved in ester linkage formation. *J Biol Chem*, **267**, 4171-4176.

Kinoshita, T.; Medof, M. E.; Silber, R. und Nussenzweig, V. (1985) Distribution of decayaccelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med*, **162**, 75-92.

Kirklin, J. K.; Westaby, S.; Blackstone, E. H.; Kirklin, J. W.; Chenoweth, D. E. und Pacifico, A. D. (1983) Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **86**, 845-857.

Kock, M. A. (1996) Expression and characterization of recombinant cobra venom factor, Dissertation, Fachbereich Chemie. Universität Hamburg, Hamburg.

Konteatis, Z. D.; Siciliano, S. J.; Van Riper, G.; Molineaux, C. J.; Pandya, S.; Fischer, P.; Rosen, H.; Mumford, R. A. und Springer, M. S. (1994) Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses. *J Immunol*, **153**, 4200-4205.

Kufer, P.; Mack, M.; Gruber, R.; Lutterbuse, R.; Zettl, F. und RiethMüller, G. (1997) Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, **45**, 193-197. Kuus-Reichel, K.; Grauer, L. S.; Karavodin, L. M.; Knott, C.; Krusemeier, M. und Kay, N. E. (1994) Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin Diagn Lab Immunol*, **1**, 365-372.

Lachmann, P. J.; Pangburn, M. K. und Oldroyd, R. G. (1982) Breakdown of C3 after complement activation. Identification of a new fragment C3g, using monoclonal antibodies. *J Exp Med*, **156**, 205-216.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lambris, J. D. (1988) The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today*, **9**, 387-393.

Law, S. K. und Dodds, A. W. (1997) The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci*, **6**, 263-274.

Lennon, V. A.; Seybold, M. E.; Lindstrom, J. M.; Cochrane, C. und Ulevitch, R. (1978) Role of complement in the pathogenesis of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Exp Med*, **147**, 973-983.

Lens, J. W.; van den Berg, W. B.; van de Putte, L. B.; Berden, J. H. und Lems, S. P. (1984) Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with intravenous antigen: effects of pre-treatment with cobra venom factor and anti-lymphocyte serum. *Clin Exp Immunol*, **57**, 520-528.

Lin, Y.; Soares, M. P.; Sato, K.; Csizmadia, E.; Robson, S. C.; Smith, N. und Bach, F. H. (2000) Long-term survival of hamster hearts in presensitized rats. *J Immunol*, **164**, 4883-4892.

Liszewski, M. K. und Atkinson, J. P. (1992) Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol*, **178**, 45-60.

LoBuglio, A. F.; Wheeler, R. H.; Trang, J.; Haynes, A.; Rogers, K.; Harvey, E. B.; Sun, L.; Ghrayeb, J. und Khazaeli, M. B. (1989) Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 4220-4224.

Lublin, D. M. und Atkinson, J. P. (1989) Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol*, **7**, 35-58.

Lublin, D. M. und Atkinson, J. P. (1990) Decay-accelerating factor and membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol*, **153**, 123-145.

Lupton, S. und Levine, A. J. (1985) Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol Cell Biol*, **5**, 2533-2542.

MacCallum, R. M.; Martin, A. C. und Thornton, J. M. (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol*, **262**, 732-745.

Makrides, S. C. (1998) Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev*, **50**, 59-87.

Makrides, S. C.; Scesney, S. M.; Ford, P. J.; Evans, K. S.; Carson, G. R. und Marsh, H. C., Jr. (1992) Cell surface expression of the C3b/C4b receptor (CR1) protects Chinese hamster ovary cells from lysis by human complement. *J Biol Chem*, **267**, 24754-24761.

Matsushita, M. und Fujita, T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med*, **176**, 1497-1502.

Medicus, R. G.; Götze, O. und Müller-Eberhard, H. J. (1976) Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med*, **144**, 1076-1093.

Mendez, M. J.; Green, L. L.; Corvalan, J. R.; Jia, X. C.; Maynard-Currie, C. E.; Yang, X. D.; Gallo, M. L.; Louie, D. M.; Lee, D. V.; Erickson, K. L.; Luna, J.; Roy, C. M.; Abderrahim, H.; Kirschenbaum, F.; Noguchi, M.; Smith, D. H.; Fukushima, A.; Hales, J. F.; Klapholz, S.; Finer, M. H.; Davis, C. G.; Zsebo, K. M. und Jakobovits, A. (1997) Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet*, **15**, 146-156.

Mollnes, T. E. (1997) Biocompatibility: complement as mediator of tissue damage and as indicator of incompatibility. *Exp Clin Immunogenet*, **14**, 24-29.

Mollnes, T. E. und Lachmann, P. J. (1988) Regulation of complement. *Scand J Immunol*, **27**, 127-142.

Moran, P.; Beasley, H.; Gorrell, A.; Martin, E.; Gribling, P.; Fuchs, H.; Gillett, N.; Burton, L. E. und Caras, I. W. (1992) Human recombinant soluble decay accelerating factor inhibits complement activation in vitro and in vivo. *J Immunol*, **149**, 1736-1743.

Morariu, M. A. und Dalmasso, A. P. (1978) Experimental allergic encephalomyelitis in cobra venom factor-treated and C4-deficient guinea pigs. *Ann Neurol*, **4**, 427-430.

Morgan, B. P. und Walport, M. J. (1991) Complement deficiency and disease. *Immunol Today*, **12**, 301-306.

Morgan, B. P.; Gasque, P.; Singhrao, S. K. und Piddlesden, S. J. (1997) Role of complement in inflammation and injury in the nervous system. *Exp Clin Immunogenet*, **14**, 19-23.

Morrison, S. L.; Johnson, M. J.; Herzenberg, L. A. und Oi, V. T. (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 6851-6855.

Müller-Eberhard, H. J. (1986) The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol*, **4**, 503-528.

Müller-Eberhard, H. J. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*, **57**, 321-347.

Müller-Eberhard, H. J. und Fjellstrom, K. E. (1971) Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. *J Immunol*, **107**, 1666-1672.

Newman, S. L.; Devery-Pocius, J. E.; Ross, G. D. und Henson, P. M. (1984) Phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. Independent function of receptors for C3b (CR1) and iC3b (CR3). *Complement*, **1**, 213-227.

Oberholzer, J.; Yu, D.; Triponez, F.; Cretin, N.; Andereggen, E.; Mentha, G.; White, D.; Buehler, L.; Morel, P. und Lou, J. (1999) Decomplementation with cobra venom factor prolongs survival of xenografted islets in a rat to mouse model. *Immunology*, **97**, 173-180.

O'Keefe, M. C.; Caporale, L. H. und Vogel, C. W. (1988) A novel cleavage product of human complement component C3 with structural and functional properties of cobra venom factor. *J Biol Chem*, **263**, 12690-12697.

Oran, A. E. und Isenman, D. E. (1999) Identification of residues within the 727-767 segment of human complement component C3 important for its interaction with factor H and with complement receptor 1 (CR1, CD35). *J Biol Chem*, **274**, 5120-5130.

O'Reilly, D. R.; Kelly, T. J.; Masler, E. P.; Thyagaraja, B. S.; Robson, R. M.; Shaw, T. C. und Miller, L. K. (1995) Overexpression of Bombyx mori prothoracicotropic hormone using baculovirus vectors. *Insect Biochem Mol Biol*, **25**, 475-485.

Pang, A. S. und Minta, J. O. (1980) Inhibition of vitamin D2-induced arteriosclerosis in rats by depletion of complement with cobra venom factor. *Artery*, **7**, 109-122.

Pangburn, M. K. und Müller-Eberhard, H. J. (1984) The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol*, 7, 163-192.

Park, K. W.; Tofukuji, M.; Metais, C.; Comunale, M. E.; Dai, H. B.; Simons, M.; Stahl, G. L.; Agah, A. und Sellke, F. W. (1999) Attenuation of endothelium-dependent dilation of pig pulmonary arterioles after cardiopulmonary bypass is prevented by monoclonal antibody to complement C5a. *Anesth Analg*, **89**, 42-48.

Pellas, T. C.; Boyar, W.; van Oostrum, J.; Wasvary, J.; Fryer, L. R.; Pastor, G.; Sills, M.; Braunwalder, A.; Yarwood, D. R.; Kramer, R.; Kimble, E.; Hadala, J.; Haston, W.; Moreira-Ludewig, R.; Uziel-Fusi, S.; Peters, P.; Bill, K. und Wennogle, L. P. (1998) Novel C5a receptor antagonists regulate neutrophil functions in vitro and in vivo. *J Immunol*, **160**, 5616-5621.

Perelson, A. S. und Oster, G. F. (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol*, **81**, 645-670.

Petrella, E. C.; Wilkie, S. D.; Smith, C. A.; Morgan, A. C., Jr. und Vogel, C. W. (1987) Antibody conjugates with cobra venom factor. Synthesis and biochemical characterization. *J Immunol Methods*, **104**, 159-172.

Piddlesden, S. J.; Jiang, S.; Levin, J. L.; Vincent, A. und Morgan, B. P. (1996) Soluble complement receptor 1 (sCR1) protects against experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, **71**, 173-177.

Piddlesden, S. J.; Storch, M. K.; Hibbs, M.; Freeman, A. M.; Lassmann, H. und Morgan, B. P. (1994) Soluble recombinant complement receptor 1 inhibits inflammation and demyelination in antibody-mediated demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*, **152**, 5477-5484.

Pinter, C.; Siccardi, A. G.; Lopalco, L.; Longhi, R. und Clivio, A. (1995) HIV glycoprotein 41 and complement factor H interact with each other and share functional as well as antigenic homology. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **11**, 971-980.

Porter, R. R. und Reid, K. B. (1978) The biochemistry of complement. *Nature*, **275**, 699-704.

Regal, J. F. und Fraser, D. G. (1996) Systemic complement system depletion does not inhibit cellular accumulation in antihistamine pretreated allergic guinea pig lung. *Int Arch Allergy Immunol*, **109**, 150-160.

Regal, J. F.; Fraser, D. G. und Toth, C. A. (1993) Role of the complement system in antigen-induced bronchoconstriction and changes in blood pressure in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther*, **267**, 979-988.

Riechmann, L.; Clark, M.; Waldmann, H. und Winter, G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, **332**, 323-327.

Rogers, J.; Cooper, N. R.; Webster, S.; Schultz, J.; McGeer, P. L.; Styren, S. D.; Civin, W. H.; Brachova, L.; Bradt, B.; Ward, P. und et al. (1992) Complement activation by betaamyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10016-10020.

Roguska, M. A.; Pedersen, J. T.; Keddy, C. A.; Henry, A. H.; Searle, S. J.; Lambert, J. M.; Goldmacher, V. S.; Blattler, W. A.; Rees, A. R. und Guild, B. C. (1994) Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 969-973.

Ross, G. D.; Lambris, J. D.; Cain, J. A. und Newman, S. L. (1982) Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol*, **129**, 2051-2060.

Ross, S. C. und Densen, P. (1984) Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)*, **63**, 243-273.

Ryan, A. F.; Catanzaro, A.; Wasserman, S. I.; Harris, J. P. und Vogel, C. W. (1986) The effect of complement depletion on immunologically mediated middle ear effusion and inflammation. *Clin Immunol Immunopathol*, **40**, 410-421.

Sahu, A. und Lambris, J. D. (2000) Complement inhibitors: a resurgent concept in antiinflammatory therapeutics. *Immunopharmacology*, **49**, 133-148.

Sahu, A.; Soulika, A. M.; Morikis, D.; Spruce, L.; Moore, W. T. und Lambris, J. D. (2000) Binding kinetics, structure-activity relationship, and biotransformation of the complement inhibitor compstatin. *J Immunol*, **165**, 2491-2499.

Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

Scharfstein, J.; Ferreira, A.; Gigli, I. und Nussenzweig, V. (1978) Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J Exp Med*, **148**, 207-222.

Schmid, E.; Warner, R. L.; Crouch, L. D.; Friedl, H. P.; Till, G. O.; Hugli, T. E. und Ward, P. A. (1997) Neutrophil chemotactic activity and C5a following systemic activation of complement in rats. *Inflammation*, **21**, 325-333.

Schmidt, T. G.; Koepke, J.; Frank, R. und Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, **255**, 753-766.

Schroff, R. W.; Foon, K. A.; Beatty, S. M.; Oldham, R. K. und Morgan, A. C., Jr. (1985) Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, **45**, 879-885.

Schumaker, V. N.; Zavodszky, P. und Poon, P. H. (1987) Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol*, **5**, 21-42.

Sharma, S.; Jabeen, T.; Singh, R. K.; Bredhorst, R.; Vogel, C. W.; Betzel, C. und Singh, T. P. (2001) Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 596-598.

Shawler, D. L.; Bartholomew, R. M.; Smith, L. M. und Dillman, R. O. (1985) Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol*, **135**, 1530-1535.

Sheeley, D. M.; Merrill, B. M. und Taylor, L. C. (1997) Characterization of monoclonal antibody glycosylation: comparison of expression systems and identification of terminal alpha-linked galactose. *Anal Biochem*, **247**, 102-110.

Sim, R. B.; Reboul, A.; Arlaud, G. J.; Villiers, C. L. und Colomb, M. G. (1979) Interaction of 125I-labelled complement subcomponents C-1r and C-1s with protease inhibitors in plasma. *FEBS Lett*, **97**, 111-115.

Skerra, A. und Schmidt, T. G. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol*, **326**, 271-304.

Smyth, N.; Odenthal, U.; Merkl, B. und Paulsson, M. (2000) Eukaryotic expression and purification of recombinant extracellular matrix proteins carrying the Strep II tag. *Methods Mol Biol*, **139**, 49-57.

Soulika, A. M.; Khan, M. M.; Hattori, T.; Bowen, F. W.; Richardson, B. A.; Hack, C. E.; Sahu, A.; Edmunds, L. H., Jr. und Lambris, J. D. (2000) Inhibition of heparin/protamine complex-induced complement activation by Compstatin in baboons. *Clin Immunol*, **96**, 212-221.

Spillner, E. (2002) Selektion und Expression von rekombinanten Antikörpern für analytische und therapeutische Applikationen, in *Fachbereich Chemie*. Universität Hamburg, Hamburg.

Stoiber, H.; Schneider, R.; Janatova, J. und Dierich, M. P. (1995) Human complement proteins C3b, C4b, factor H and properdin react with specific sites in gp120 and gp41, the envelope proteins of HIV-1. *Immunobiology*, **193**, 98-113.

Stover, C. M.; Thiel, S.; Thelen, M.; Lynch, N. J.; Vorup-Jensen, T.; Jensenius, J. C. und Schwaeble, W. J. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol*, **162**, 3481-3490.

Struber, M.; Hagl, C.; Hirt, S. W.; Cremer, J.; Harringer, W. und Haverich, A. (1999) C1esterase inhibitor in graft failure after lung transplantation. *Intensive Care Med*, **25**, 1315-1318.

Subramanian, K. N.; Weisman, L. E.; Rhodes, T.; Ariagno, R.; Sanchez, P. J.; Steichen, J.; Givner, L. B.; Jennings, T. L.; Top, F. H., Jr.; Carlin, D. und Connor, E. (1998) Safety, tolerance and pharmacokinetics of a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. MEDI-493 Study Group. *Pediatr Infect Dis J*, **17**, 110-115.

Sugita, Y.; Ito, K.; Shiozuka, K.; Suzuki, H.; Gushima, H.; Tomita, M. und Masuho, Y. (1994) Recombinant soluble CD59 inhibits reactive haemolysis with complement. *Immunology*, **82**, 34-41.

Tack, B. F.; Harrison, R. A.; Janatova, J.; Thomas, M. L. und Prahl, J. W. (1980) Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 5764-5768.

Taniguchi, S.; Kobayashi, T.; Neethling, F. A.; Ye, Y.; Niekrasz, M.; White, D. J. und Cooper, D. K. (1996) Cobra venom factor stimulates anti-alpha-galactose antibody production in baboons. Implications for pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation*, **62**, 678-681.

Taniguchi-Sidle, A. und Isenman, D. E. (1994) Interactions of human complement component C3 with factor B and with complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 3 (CR3, CD11b/CD18) involve an acidic sequence at the N-terminus of C3 alpha'-chain. *J Immunol*, **153**, 5285-5302.

Thiel, S.; Vorup-Jensen, T.; Stover, C. M.; Schwaeble, W.; Laursen, S. B.; Poulsen, K.; Willis, A. C.; Eggleton, P.; Hansen, S.; Holmskov, U.; Reid, K. B. und Jensenius, J. C. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*, **386**, 506-510.

Thomas, T. C.; Rollins, S. A.; Rother, R. P.; Giannoni, M. A.; Hartman, S. L.; Elliott, E. A.; Nye, S. H.; Matis, L. A.; Squinto, S. P. und Evans, M. J. (1996) Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol*, **33**, 1389-1401.

Thompson, C. (1995) Protein proves to be a key link in innate immunity. *Science*, **269**, 301-302.

Thotakura, N. R.; Desai, R. K.; Bates, L. G.; Cole, E. S.; Pratt, B. M. und Weintraub, B. D. (1991) Biological activity and metabolic clearance of a recombinant human thyrotropin produced in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, **128**, 341-348.

Till, G. O.; Johnson, K. J.; Kunkel, R. und Ward, P. A. (1982) Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest*, **69**, 1126-1135.

Vakeva, A. P.; Agah, A.; Rollins, S. A.; Matis, L. A.; Li, L. und Stahl, G. L. (1998) Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation*, **97**, 2259-2267.

Vogel, C. W. (1985) Untersuchungen zur Strukturhomologie von Kobrafaktor mit dem menschlichen Komplementprotein C3 sowie Synthese kovalenter Hybridproteine aus Kobrafaktor und monoklonalen Antikörpern als selektiv-zytolytisches Prinzip, Dissertation, Fachbereich Chemie. Universität Hamburg, Hamburg.

Vogel, C. W. (1988) Synthesis of antibody conjugates with cobra venom factor using heterobifunctional cross-linking reagents. *Targeted Diagn Ther*, **1**, 191-224.

Vogel, C. W. und Müller-Eberhard, H. J. (1982) The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. *J Biol Chem*, **257**, 8292-8299.

Vogel, C. W. und Müller-Eberhard, H. J. (1984) Cobra venom factor: improved method for purification and biochemical characterization. *J Immunol Methods*, **73**, 203-220.

Vogel, C. W.; Smith, C. A. und Müller-Eberhard, H. J. (1984) Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. *J Immunol*, **133**, 3235-3241.

Vogel, C. W.; Wilkie, S. D. und Morgan, A. C. (1985) In vivo studies with covalent conjugates of cobra venom factor and monoclonal antibodies to human tumors. *Haematol Blood Transfus*, **29**, 514-517.

Vogel, C. W.; Bredehorst, R.; Fritzinger, D. C.; Grunwald, T.; ZiegelMüller, P. und Kock, M. A. (1996) Structure and function of cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. *Adv Exp Med Biol*, **391**, 97-114.

Vogt, W.; Damerau, B.; von Zabern, I.; Nolte, R. und Brunahl, D. (1989) Non-enzymic activation of the fifth component of human complement, by oxygen radicals. Some properties of the activation product, C5b-like C5. *Mol Immunol*, **26**, 1133-1142.

Volanakis, J. E. (1995) Transcriptional regulation of complement genes. Annu Rev Immunol, 13, 277-305.

Vriesendorp, F. J.; Flynn, R. E.; Pappolla, M. A. und Koski, C. L. (1997) Soluble complement receptor 1 (sCR1) is not as effective as cobra venom factor in the treatment of experimental allergic neuritis. *Int J Neurosci*, **92**, 287-298.

Wang, B.; Chen, Y. B.; Ayalon, O.; Bender, J. und Garen, A. (1999) Human single-chain Fv immunoconjugates targeted to a melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan mediate specific lysis of human melanoma cells by natural killer cells and complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1627-1632.

Wang, Y.; Rollins, S. A.; Madri, J. A. und Matis, L. A. (1995) Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8955-8959.

Wang, Y.; Hu, Q.; Madri, J. A.; Rollins, S. A.; Chodera, A. und Matis, L. A. (1996) Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci US A*, **93**, 8563-8568.

Wehrhahn, D. (2000) Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehungen von Kobra Venom Faktor- Konstruktion und rekombinante Expression von Kobra Venom Faktor/Kobra C3 Hybriden, Dissertation, Fachbereich Chemie. Universität Hamburg, Hamburg.

Weisman, H. F.; Bartow, T.; Leppo, M. K.; Marsh, H. C., Jr.; Carson, G. R.; Concino, M. F.; Boyle, M. P.; Roux, K. H.; Weisfeldt, M. L. und Fearon, D. T. (1990) Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*, **249**, 146-151.

Wetsel, R. A. (1995) Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Curr Opin Immunol*, 7, 48-53.

Wetsel, R. A. und Kolb, W. P. (1982) Complement-independent activation of the fifth component (C5) of human complement: limited trypsin digestion resulting in the expression of biological activity. *J Immunol*, **128**, 2209-2216.

Wetsel, R. A. und Kolb, W. P. (1983) Expression of C5a-like biological activities by the fifth component of human complement (C5) upon limited digestion with noncomplement enzymes without release of polypeptide fragments. *J Exp Med*, **157**, 2029-2048.

Whiss, P. A. (2002) Pexelizumab Alexion. Curr Opin Investig Drugs, 3, 870-877.

Williams, K. C.; Ulvestad, E. und Hickey, W. F. (1994) Immunology of multiple sclerosis. *Clin Neurosci*, **2**, 229-245.

Zimmerman, J. L.; Dellinger, R. P.; Straube, R. C. und Levin, J. L. (2000) Phase I trial of the recombinant soluble complement receptor 1 in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, **28**, 3149-3154.

Zipfel, P. F.; Skerka, C.; Caprioli, J.; Manuelian, T.; Neumann, H. H.; Noris, M. und Remuzzi, G. (2001) Complement factor H and hemolytic uremic syndrome. *Int Immunopharmacol*, **1**, 461-468.

# 7 Anhang

## Sequenzausschnitt H3

Gezeigt sind Bereiche aus der Nukleotidsequenz (2794-2910) und der Aminosäuresequenz von CVF (932-970), H3 und C3 (926-964). Unterschiedliche Aminosäurereste sind hinterlegt.

GAC CCT CGA GCA AAA GGA GTT GAA GGA GTG CAG AAA GAG GAC ATC CCA CCT GCA GAC CTC AGT GAC CAA GTC CCG GAC ACC GAG TCT GAG ACC AGA ATT CTC CTG CAA GGG GAC CCT

HЗ	DPRAKGVEGVQKEDIPPADLSDQVPDTESETRILLQGDP
С3	DPERLGREGVQKEDIPPADLSDQVPDTESETRILLQGTP
CVF	DPRAKGVGGTQLEVIKARKLDDRVPDTEIETKIIIQGDP

#### Sequenzausschnitt H4

Gezeigt sind Bereiche aus der Nukleotidsequenz (3511-4005) und der Aminosäuresequenz von CVF (1171-1327), H4 und C3 (1165-1325). Unterschiedliche Aminosäurereste sind hinterlegt.

TAC ACT ACA GCC CTC ACA GCC TAT GCT TTG GCT GCC GCG GGC AGG CTG AAG GGG CCT CTT CTT AAC AAA TTT CTG ACC ACA GCC AAA GAT AAG AAC CGC TGG GAG GAC CCT GGT AAG CAG CTC TAC AAC GTG GAG GCC ACA TCC TAT GCC CTC TTG GCC CTA CTG CAG CTA AAA GAC TTT GAC TTT GTG CCT CCC GTC GTG CGT TGG CTC AAT GAA CAG AGA TAC TAC GGT GGT GGC TAT GGC TCT ACC CAG GCC ACC TTC ATG GTG TTC CAA GCC TTG GCT CAA TAC CAA AAG GAC GCC CCT GAC CAC CAG GAA CTG AAC CTT GAT GTG TCC CTC CAA CTG CCC AGC CGC AGC TCC AAG ATC ACC CAC CGT ATC CAC TGG GAA TCT GCC AGC CTC CTG CGA TCA GAA GAG ACC AAG GAA AAT GAG GGT TTC ACA GTC ACA GCT AGC GGT GAT GGA AAA GCA ACA ATG ACC ATT TTG ACA TTC TAT AAC GCA CAG

H4	YTTALTAYALAAAGRLKGPLLNKFLTTAKD-KNRWEDPGKQLYNVEATSYALLA
C3	YTVAIAGYALAQMGRLKGPLLNKFLTTAKD-KNRWEDPGKQLYNVEATSYALLA
CVF	YTTALTAYALAAADQLNDDRVLMAASTGRDHWEEYNAHTHNIEGTSYALLA
H4	LLQLKDFDFVPPVVRWLNEQRYQALAQYQKDAPDHQELN
C3	LLQLKDFDFVPPVVRWLNEQRYQALAQYQKDAPDHQELN
CVF	LLKMKKFDQTGPIVRWLTDQNFYGETYGQTQATVMAFQALAEYEIQMPTHKDLN
H4	LDVSLQLPSRSSKITHRIHWESASLLRSEETKENEGFTVTASGDGKATM-ILTF
C3	LDVSLQLPSRSSKITHRIHWESASLLRSEETKENEGFTVTAEGKGQGTLSVVTM
CVF	LDITIELPDREVPIRYRIMYENALLARTVETKLNQDITVTASGDGKATM-ILTF

## Sequenzen der selektierten Antikörper-Fragmente

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der schweren und leichten Ketten der scFv gegen CVF und humanes C3. Die hypervariablen Regionen sind hinterlegt.

CVF-8

Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S R I T I N P D T S K N Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A R \*A R S A F D Y W G Q G T L V T V

L Q A V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C A S S T G A V T S G Y Y P N W F Q Q K P G Q A P R A L I Y S T S N K H S W T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C L L Y Y G G A V F G G G T K L T V L G

CVF-23

Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S R I T I N P D T S K N Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A R S \* S S S F D Y W G Q G T L V T V

L Q A V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C A S S T G A V T S G Y Y P N W F Q Q K P G Q A P R A L I Y S T S N K H S W T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C L L Y Y G G A V F G G G T K L T V L G

CVF-24

Q V Q L Q Q S G P G L V K P S H T L S L T C A I S G D S V S S N S D A W N W I R H A P S I G L E W L G R T Y Y R A K W Y N D Y A Q S V K S L I T I Q P K H T S K N Q F S L Q L N S E T P E D T D G Y Y C A R S H W S T F D Y W G Q G T L G T V

L Q A V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C A S S T G A V T S G Y Y P N W F Q Q K P G Q A P R A L I Y S T S N K H S W T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C L L Y Y G G A V F G G G T K L T V L G

CVF-29

E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y Y M S W I R Q A P G K G L E W V S Y I S S G S T I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G G P P G H R Y W G Q G T L V T V

A L Q S V L T Q P P S A S G T P G Q R V T Ì S C S G S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L L I Y R N N Q R P S G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D D S L Q H V F G G G T K L T V L G

CVF-37

Q V N \* G S L G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L R T S G M R V S W I R Q P P G K A L E W L A R I D W D D D K F Y S T S L K T R L T I S K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A V Y Y C A R S V C R W G Q G T L V T V L E I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C K S S Q S L L H S D G K T Y L Y W Y L Q K P G Q P P Q L L I Y E V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R L E A E D V G

V Y Y C M E S I Q I L F Y K F G Q G T K V E I K R

188

E D T A V Y Y C A R M A G F S S W G Q G T L V T V G S A L Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S D V G S Y N L V S W Y Q Q H P G K A P K L M I Y E G S K R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C C S Y A G S S F V F G G G T K L T V L G

V Q L V E S G G G X V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G I D W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A

C3-19

D T A V Y Y C A R S D R K W G O G T L V T V G S A L Q S V L T Q P P S V S G A P G Q R V T I S C T G S S S N I G A G Y D V H W Y Q Q LPGTAPKLLIYGNSNRPSGDPDR FSGSKSGTSASLAITGLQAEDE A D Y Y C Q S Y D S S L S V F G G G T K L T V L G

C3-5 Q V Q L V \* S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A O K F O G R V T I T A D E S T S T A Y M E L S S L R S E

C Q Q W S S N P L T F G G G T K L E L K R

E D T A V Y Y C A R D Y G Y G G F A Y W G Q G T L V T V V D G K C A H P V S S N Q S A S P G E K V T M T C S A S S S V S F \* H W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S G L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y

C3-2 E V Q L E R S G A E L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D S Y M H W V K Q R P E Q GLE\*IGRIDPANGNTEYDPKFQGKAHITADTSSNTAYLQLSSLTS

D T A V Y Y C A R \* M S V W G Q G T L V T V L Q S V L T Q P P S V S G A P G Q R V T I S C T G S S S N I G A G Y D A H W Y Q Q L P G T A P K L L I Y G N S N R P S G V P D R F S G S K S G T S A S L A I T G L Q A E D E A D Y Y C Q S Y D S N L S V F G G G T K L T V L G

C3-1 O V O L G O S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S Y A I S W V R O A P G O G L E W M G G I I P I F G T A N Y A O K F O G R V T I T A D E S T S T A Y ME L S S L R S E

Y Y C L L Y Y G G A V F G G G T K L T V L G

V T P E D T A V Y Y C A R G S S S T F D Y W G Q G T L V T V L Q A V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C A S S T G A V T S G Y Y P N W F Q Q K P G Q A P R A L I Y S T S N K H S W T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V O P E D E A E

CVF-44 Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S R I T I N P D T S K N Q F S L Q L N S

Y Y C L L Y Y G D T V F G G G T K L T V L G

V T P E D T X V Y Y C A R \* A K S A F D Y W G Q G T L V T V L Q A V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C A S S T G A V T S G Y Y P N W F Q Q K P G Q A P R A L I Y S T S N K H S W T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E

**CVF-39** O A V O L O S G P G L V K X S O T L S L T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R O S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S R I T I N P D T S K N Q F S L Q L N S C3-22

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R T F G G K W G Q G T L V T V

G S A L Q S V V T Q P P S V S G A P G Q R V T I S C T G S S S N I G A G Y D V H W Y Q Q L P G T A P K L L I Y G N S N R P S G V P D R F S G S K S G A S A S L A I T G L Q A E D E A D Y Y C Q S Y D S S Q S A T V F G G G T K L T V L

### Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Bredehorst für das Überlassen des interessanten Themas und die stete Diskussionsbereitschaft danken. Prof. Dr. Gercken danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Edzard Spillner für seine konstruktive Unterstützung in allen wissenschaftlichen und weniger-wissenschaftlichen Bereichen und natürlich auch für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Mein Dank für die Unterstützung im Labor gilt Ilka Schneider, Katrin Klensang, Mark Matzas, Nathalie Jänner und Thorsten Mix. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Mitstreitern für die gute Freundschaft und die schöne Zeit: Susanne Deckers, Benjamin Bockisch, Alexander Paul, Holger Bammert, Daniel Wehrhahn, Kerstin Greunke, Ingke Braren, Amir Sabri und Mladen Simonovic.

Und natürlich möchte ich mich auch bei meinem langjährigen Laborpartner Lars Redecke für seine Freundschaft und die gute Stimmung in unserem kleinen Labor bedanken.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich außerdem bei Simone Kubik und bei Heike Kölln-Prisner.