Herstellung und Charakterisierung von Antikörper-Fragmenten zum Nachweis von Mitgliedern der CEACAM-Familie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Department Biologie

vorgelegt von
Dipl.-Biochem. Christoph Maßlo
geboren in Hamburg am 05.03.1980

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. C. WAGENER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. BURMESTER
Tag der Disputation: 18. Oktober 2013

Hamburg, den 02. Oktober 2013

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation an der Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Department Biologie, wurde in der Zeit von September 2009 bis Mai 2013 unter der Anleitung von Prof. Dr. Christoph Wagener am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Versuche mit genveränderten Organismen wurden gemäß den entsprechenden Anträgen in den behördlich registrierten Laboren des Instituts durchgeführt. Ermöglicht wurde diese Arbeit durch die finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums f. Bildung und Forschung (BMBF) / der Deutschen Luft- und Raumfahrtgesellschaft (DLR) unter dem Förderkennzeichen 01EZ0824; Konsortiumsprojekt TOMCAT (*Tailored Magnetic Nanoparticles for Cancer Targeting*).

Erstgutachter:
Prof. Dr. Christoph Wagener
Institut für Klinische Chemie
Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Zweitgutachter:
Prof. Dr. Thorsten Burmester
Biozentrum Grindel
Universität Hamburg

Tag der Disputation: 18.10.2013

- Korrigierte Fassung -

Einige Ergebnisse in Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

MARKUS HEINE, PETER NOLLAU, CHRISTOPH MASSLO, PETER NIELSEN, BARBARA FREUND, OLIVER T. BRUNS, RUDOLPH REIMER, HEINRICH HOHENBERG, KERSTEN PELDSCHUS, HARALD ITTRICH, UDO SCHUMACHER. Investigations on the usefulness of CEACAMs as potential imaging targets for molecular imaging purposes. *PloS one*. 01/2011; **6**(12):e28030.

ELMAR HENNING POESELT, HAUKE KLOUST, ULRICH TROMSDORF, MARKUS JANTSCHEL, CHRISTOPH HAHN, CHRISTOPH MAßLO, HORST WELLER. Relaxivity-Optimization of a PEGylated Iron Oxide-Based Negative Magnetic Resonance Contrast Agent for T2-Weighted Spin Echo Imaging. *ACS Nano*, 2012, **6** (2), pp. 1619–1624

Publizierte Posterbeiträge auf Kongressen

E. PÖSELT, C. MAßLO, P. NOLLAU, C. SCHMIDTKE, S. FISCHER, H. KLOUST, K. PELDSCHUS, M. HEINE, H. WELLER. Biofunctionalization of nanoparticles for theragnostics. (NSTI Nanotech Convention & Expo 2010, Anaheim, CA, USA)

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Tumorantigene der CEACAM-Familie 1

1.1.1 Arten von Zelladhäsionsmolekülen 1

1.1.2 Die CEACAM-Familie der Zelladhäsionsmoleküle 3

1.1.3 Die Rolle von CEACAM-Mitgliedern in malignen Tumorerkrankungen 6

1.2 Antikörper als Teil des Immunsystems und rekombinante Antikörper-Fragmente 8

1.2.1 Grundlegende Merkmale des Immunsystems von Vertebraten 8

1.2.2 Die Rolle der Antikörper in der humoralen Immunantwort 9

1.2.3 Aufbau und Wirkungsweise konventioneller IgG-Antikörper 10

1.2.4 Schwerketten-Antikörper der Camelidae 13

1.2.5 Hybridom-Technologie zur Produktion monoklonaler Antikörper 14

1.2.6 Rekombinante Antikörper und Antikörper-Fragmente 15

1.2.7 Antikörper als zielgerichtetes Diagnostikum / Therapeutikum 19

1.3 Zielsetzung 21

2 Material und Methoden 22

2.1 Material 22

2.1.1 Antikörper / Detektionsreagenzien 22

2.1.2 Bakterienstämme 23

2.1.3 Chemikalien 23

2.1.4 Enzyme 23

2.1.5 Geräte 24

2.1.6 Medien 26

2.1.7 Kits 26

2.1.8 Primer 27

2.1.9 Puffer und Lösungen 28

2.1.10 Sonstige Verbrauchsmaterialien 29

2.1.11 Vektoren 31

2.1.12 Zelllinien und kultivierte Zellen 31

2.2 Methoden 31

2.2.1 Molekularbiologische Methoden 31

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen 31

2.2.1.2 Cryokonservierung von Bakterienkulturen 32

2.2.1.3 Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien 32
2.2.1.4 Bakterielle Proteinexpression und Aufreinigung 33
2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA 33
2.2.1.6 Quantifizierung von (Plasmid-)DNA 33
2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 34
2.2.1.8 Restriktion von (Plasmid-)DNA 34
2.2.1.9 DNA-Agarose-Gelelektrophorese 35
2.2.1.10 CsCl-Präparation von Plasmid-DNA 35
2.2.1.11 Aufreinigung und Konzentration von DNA-Proben 35
2.2.1.12 Ligation von DNA-Molekülen 36
2.2.1.13 Sequenzierung von DNA-Proben 36
2.2.1.14 RNA-Gesamtextraktion aus Hybridom-Zellen und Lama-Leukozyten 36
2.2.1.15 Quantifizierung von RNA 36
2.2.1.16 Reverse Transkription von RNA 36
2.2.1.17 Konstruktion von V_HH-Immunbibliotheken für *phage display* 37
2.2.1.18 Festphasen-*biopanning* mit CEACAM-Proteinen und *phage rescue* 38
2.2.2 Zellbiologische Methoden 39
2.2.2.1 Kultivierung und Lyse humaner (Tumor-)Zelllinien 39
2.2.2.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen und eukaryotische Expression 40
2.2.2.3 Immunhistochemische Färbung CEACAM-positiver Zelllinien 40
2.2.3 Immunologische Methoden 41
2.2.3.1 Lama-Immunisierung / Gewinnung von Immunseren aus Lama-Vollblut 41
2.2.3.2 Isolierung von Lama-Leukozyten aus Vollblut 41
2.2.3.3 Fraktionierung der cIgG-Subtypen aus Lamaseren 41
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden 42
2.2.4.1 Konzentrieren und Pufferwechsel von Expressionsüberständen 42
2.2.4.2 Bestimmung von Proteingesamtmengen durch Bradford-Lowry-Assay 42
2.2.4.3 SDS-PAGE von Proteinproben und Zelllysaten 42
2.2.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen 43
2.2.4.5 Western Blot-Analysen 43
2.2.4.6 *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) 44
2.2.4.7 Biotinylierung bzw. FITC-Markierung monoklonaler Antikörper 44
2.2.4.8 Immunpräzipitation von CEACAM-Molekülen aus Zelllysaten 44

2.2.4.9 Pulldown von biotinylierten Proteinen mit HiCapacity Streptavidin-Agarose 45
2.2.4.10 Deglykosylierung von Proteinen 45
2.2.4.11 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem CEACAM1 über Con A-Sepharose 45
2.2.4.12 Affinitätschromatographische Aufreinigung für biotinylierte Proteine über Monomeric Avidin-Agarose 46
2.2.4.13 Affinitätschromatographische Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern über Protein G 46

3 Ergebnisse 47

3.1 Produktion und Charakterisierung der monoklonalen anti-CEACAM Antikörper T84.1 und T84.66 aus Hybridom-Kulturen 47
3.1.1 Darstellung der monoklonalen Antikörper nach Expression und Aufreinigung 47
3.1.2 Nachweis der Funktionalität und Spezifität der anti-CEACAM mAk im Western Blot mit unterschiedlichen Zelllysaten 48
3.1.3 Etablierung eines indirekten ELISA zum Nachweis der spezifischen Bindung für monoklonale anti-CEACAM Antikörper 49
3.1.4 Etablierung eines kompetitiven ELISA und Untersuchung der Verdrängung von FITC-markierten anti-CEACAM mAk 52
3.2 Herstellung von Einzelketten-Fragmenten (scFv) auf Basis der monoklonalen anti-CEACAM Antikörper T84.1 und T84.66 53
3.2.1 Klonierung und bakterielle Expression eines monovalenten scFv-Fragments für T84.66 mAk 53
3.2.2 Klonierung von T84.66 scFv für die eukaryotische Expression in HEK293-Zellen 57
3.2.3 Generierung eines Einzelketten-Fragments (scFv) auf Basis des monoklonalen anti-CEACAM Antikörpers T84.1 58
3.2.4 Charakterisierung von T84.1 und T84.66 scFv-Konstrukten nach eukaryotischer Transfektion und Expression in HEK293-Zellen 63
3.2.5 Funktionalisierung von T84.1 und T84.66 scFv-Fragmenten über enzymatische Biotinylierung 65
3.2.6 Optimierung der enzymatischen Biotinylierung bei eukaryotischer Expression 69
3.2.7 Charakterisierung der eukaryotisch exprimierten scFv-Fragmente nach Optimierung der Biotinylierungseffizienz und Biotin-abhängiger Aufreinigung 72

3.2.8 Vergleichender Einsatz der scFv-Fragmente und korrespondierenden mAk für Immunfluoreszenz-Färbung von CEACAM-positiven HT29-Tumorzellen 75
3.3 Generierung CEACAM-reaktiver Einzeldomänen-Fragmente (V_HH) von Schwerketten-Antikörpern aus *L.glama* 76
3.3.1 Immunisierung von *L. glama* mit rCEACAM1 und rCEACAM5 76
3.3.2 Charakterisierung der Seren CEACAM-immunisierter Lamas 80
3.3.2.1 Bestimmung der differenziellen CEACAM-Spezifität für Lamaseren nach Immunisierung 80
3.3.2.2 Trennung der cIgG-Subfraktionen in Lamaseren durch kombinierte Protein G/Protein A-Affinitätschromatographie 82
3.3.2.3 Charakterisierung der isolierten cIgG-Subtypen hinsichtlich CEACAM-Spezifität 84
3.3.3 Phagemid-Vektor-Klonierung und *phage display* für cIgG3 (*short hinge*) anti-CEACAM V_HH-Domänen 86
3.3.3.1 Klonierung des *short hinge* V_HH-Repertoires in den Phagemid-Vektor pCANTAB 86
3.3.3.2 Generierung und Untersuchung von V_HH-Primärbibliotheken in TG1 *E.coli* 87
3.3.3.3 *Phage Display* für CEACAM-reaktive V_HH-Phagen-Fusionsproteine 91
3.3.3.4 *Screening* potentieller anti-CEACAM1 V_HH-Phagen-Fusionsproteine im indirekten ELISA 92

4 Diskussion 95
4.1 Charakterisierung und Einsatz von monoklonalen anti-CEACAM Antikörpern 95
4.1.1 Charakterisierung der CEACAM-Bindung für monoklonale Antikörper 95
4.1.2 Einsatz von T84.1 mAk zum Nachweis von CEACAM-Proteinen auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* 96
4.2 Generierung, Expression und enzymatische Biotinylierung von CEACAM-spezifischen scFv-Fragmenten 98
4.2.1 Bakterielle Expression des anti-CEACAM5 scFv-Fragments T84.66 98
4.2.2 Generierung eines rekombinanten scFv-Fragments für den CEACAM *pan*-spezifischen mAk T84.1 99
4.2.3 Eukaryotische Expression und Optimierung der enzymatischen Biotinylierungseffizienz für CEACAM-spezifische scFv-Fragmente 100

4.2.4 Charakterisierung struktureller Unterschiede der eukaryotisch exprimierten scFv-Fragmente 104
4.3 Generierung von CEACAM-reaktiven V_HH-Fragmenten durch Lama-Immunisierung und *phage display* 109
4.3.1 Immunisierung von *L. glama* mit rekombinanten CEACAM-Proteinen 109
4.3.2 Klonierung von Immunbibliotheken für CEACAM-immunisierte Lamas und Selektion CEACAM-spezifischer V_HH-Phagenfusionsproteine durch *phage display* 112
4.3.3 Vergleich theoretischer 3D-Strukturen für verschiedene V_HH-Spezies mit CEACAM1-Reaktivität 114
4.4 Ausblick 117

5 Zusammenfassung 118
5.1 Abstract 119

6 Literaturverzeichnis 120

7 Anhang 133
7.1 Abkürzungsverzeichnis 133
7.2 Untersuchung von bakteriell exprimierten T84.66 scFv-Fragmenten auf CEACAM5-spezifische Bindung 136
7.3 pBLAST-*alignment* für Segmente variabler Ig-Domänen auf Basis von RNA aus T84.1 Hybridom-Zellen 137
7.4 Parameter für 3D-Modellierung von Antikörper-Fragmenten 138
7.4.1 ModWeb-Log und Anolea/Qmean-Protokoll für T84.1 scFv 138
7.4.2 ModWeb-Log und Anolea/Qmean-Protokoll für CEACAM1-spezifischen V_HH-Klon No.10 139
7.4.3 ModWeb-Log und Anolea/Qmean-Protokoll für CEACAM1-spezifischen V_HH-Klon No.17 140
7.5 Schematische Darstellung der Arbeitsschritte in einem *phage display*-Verfahren 141

8 Danksagung 142

9 Eidesstattliche Versicherung 143

1 Einleitung

1.1 Tumorantigene der CEACAM-Familie

1.1.1 Arten von Zelladhäsionsmolekülen

Die Fähigkeit zur Ausbildung zusammenhängender Gewebestrukturen mit bestimmten Funktionen verdanken die Zellen vielzelliger Lebewesen dem Oberflächenbesatz mit verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen (CAMs, *cell adhesion molecules*). Bei diesen handelt es sich um Proteinmoleküle mit unterschiedlicher Struktur bzw. posttranslationaler Modifikation, die entweder durch eine transmembranöse Domäne oder einen sogenannten GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker mit der Membran verbunden sind (Bütikofer *et al.*, 2001; Wedepohl *et al.*, 2012). Die extrazelluläre Domäne der Zelladhäsionsmoleküle vermittelt dabei je nach Art und Beschaffenheit Kontakte zu den Oberflächen anderer Zellen oder zu Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM). Bei Vorhandensein einer zytoplasmatischen Domäne, die in der Regel mit assoziierten Proteinen bzw. dem Zytoskelett in Verbindung steht, besteht zudem die Möglichkeit, dass Ereignisse an den Zelloberflächenmolekülen ausserhalb der Zelle (z.B. Ligandenbindung, Modifikation, Degradation) Einfluss auf die inneren Abläufe bzw. das Verhalten der betreffenden Zelle nehmen hinsichtlich deren Morphologie, Motilität, Proliferation bzw. Überleben (Aplin *et al.*, 1998).

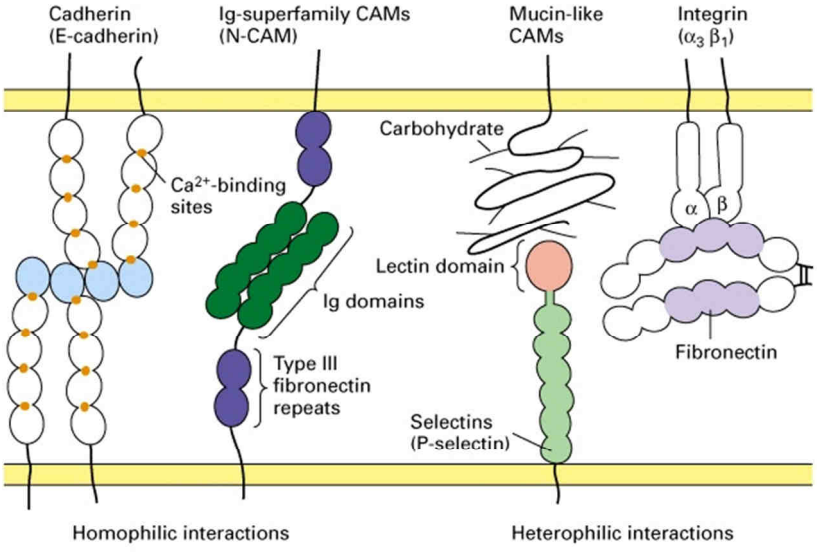


Abb. 1.1:
Schematische Darstellung der vier wesentlichen Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen, die in vielzelligen Organismen Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte vermitteln (Abb. aus Lodish *et al.*, 2000).

Wie in Abb.1.1 gezeigt ist, unterscheidet man vier wesentliche Homologie-Gruppen von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen: Cadherine, Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, Selektine und Integrine.

Die Cadherine sind transmembranöse Glykoproteine mit in der Regel fünf Untereinheiten in der extrazellulären Domäne, deren Adhäsionsfähigkeit in wesentlichem Maße von gebundenen Ca^{2+}-Ionen abhängt. Man unterscheidet dabei weiter die Untergruppen der E-Cadherine (epithelial), N-Cadherine (neuronal), P-Cadherine (plazental) und VE-Cadherine (vaskulär-endothelial). Die Funktionen von Cadherinen liegen neben der Vermittlung und Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten in der Erhaltung der Zellpolarität, der Signaltransduktion und der Morphogenese während der Embryonalentwicklung. Die Signaltransduktion für Cadherine wird auf intrazellulärer Ebene durch die sogenannten Catenine vermittelt, die auch als Transkriptionsfaktoren auftreten können (Takeichi, 1988; Nollet *et al.*, 2000; Gumbiner, 2005).

Die Familie der Selektine (oder CD62) besteht aus einzelkettigen, transmembranösen Glykoproteinen, die wie C-Typ Lektine eine N-terminale CRD (*carbohydrate recognition domain*) besitzen, welche in Abhängigkeit von Calcium-Ionen verschiedene Glykostrukturen bindet. Man unterscheidet E-Selektine (endothelial), L-Selektine (leukozytär) und P-Selektine (von *platelets*, thrombozytär und endothelial). Selektine sind involviert in das Andocken von Lymphozyten an Zielstrukturen wie Mucine bzw. die Bewegung von Leukozyten auf den Innenwänden von Gefäßen (*leukocyte rolling*) sowie in die Vermittlung von akuten und chronischen Entzündungsprozessen (Cotran, 1999; Ley, 2003; Nimrichter *et al.*, 2008).

Die Integrine sind Transmembranproteine, die auf allen tierischen Zellen außer Erythrozyten vorkommen. Sie treten stets als Heterodimere in der Kombination von je einer von verschiedenen α- und β-Untereinheiten auf. Je nach Kombination binden die Integrine extrazellulär u.a. Fibrinogen, Fibronectin, Laminin sowie Kollagene und vermitteln damit einen bedeutenden Teil der Zell-Matrix-Kontakte. Über Rekrutierung von Talin, Paxillin und FAK (*focal adhesion kinase*) sowie weiterer Effektoren an der intrazellulären Domäne von β1-Integrinen lässt sich für die Zelle eine nach innen wie außen gerichtete Signaltransduktion beobachten (Humphries, 2000; Hynes, 2002).

Die Immunglobulin-Superfamilie stellt eine große Gruppe von Zelloberflächen- sowie löslichen Proteinen dar, die im Wesentlichen in Erkennung und Bindung von Zielstrukturen sowie in Zelladhäsionen involviert sind. Charakteristisch für diese Gruppe sind die gemeinsamen Strukturmotive von Immunglobulinen, aus denen sich die Mitglieder zusammensetzen. Diese sogenannten Ig-*like* Domänen bestehen aus mehreren Varianten von zwei antiparallelen β-Faltblattstrukturen, die durch hydrophobe Interaktionen und Disulfidbrücken stabilisiert werden (Barclay, 2003). Die Gruppe der Ig-*like* Domänen lässt sich weiter in IgV (*variable),* IgC1 und 2 (*constant*) sowie IgI (*intermediate*) unterteilen (Harpaz und Chothia, 1994). Auch die CEACAM-Familie (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*), die wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit ist, gehört zu den Mitgliedern der Ig-Superfamilie.

1.1.2 Die CEACAM-Familie der Zelladhäsionsmoleküle

Die CEACAM-Familie der Zelladhäsionsmoleküle leitet sich von CEA (*carcinoembryonic antigen*; auch CD66e oder CEACAM5) ab, welches als erster Vertreter dieser Gruppe entdeckt und als Tumorantigen in kolorektalen Karzinomen beschrieben wurde (Gold und Freedman, 1965[a+b]). Der Name leitet sich von der Annahme ab, dass es sich um ein Antigen aus dem Zusammenhang der Embryogenese handelt, welches in gesunden adulten Organismen nicht mehr exprimiert wird bzw. nur im Rahmen maligner neoplastischer Erkrankungen wieder auftritt.
Inzwischen ist jedoch bekannt, dass sowohl CEA als auch nachfolgend entdeckte Mitglieder der CEACAM-Familie auch in gesunden adulten Geweben verschiedener Natur vorkommen und dort unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben (Öbrink, 1997). 1999 kam es zu einer Neuordnung der Nomenklatur für die bis dahin entdeckten CEACAM-Varianten, aus der die Verwendung der einheitlichen Bezeichnung „CEACAM“ mit einer entsprechenden Nummerierung hervorging (Beauchemin *et al.*, 1999). Parallel existiert eine sich auf Zelloberflächenproteine beziehende CD-Nomenklatur für einige CEACAM-Mitglieder (*cluster of differentiation*), nach der sie der CD66-Gruppe zugeordnet werden.
Die Genfamilie der CEACAM-Mitglieder wird entsprechend ihrer Nukleotid-Sequenzen in drei Subgruppen mit insgesamt 29 bekannten Genen eingeteilt; zwei der Subgruppen befinden sich in der Region q13.2 von Chromosom 19 (Hammarström, 1999).

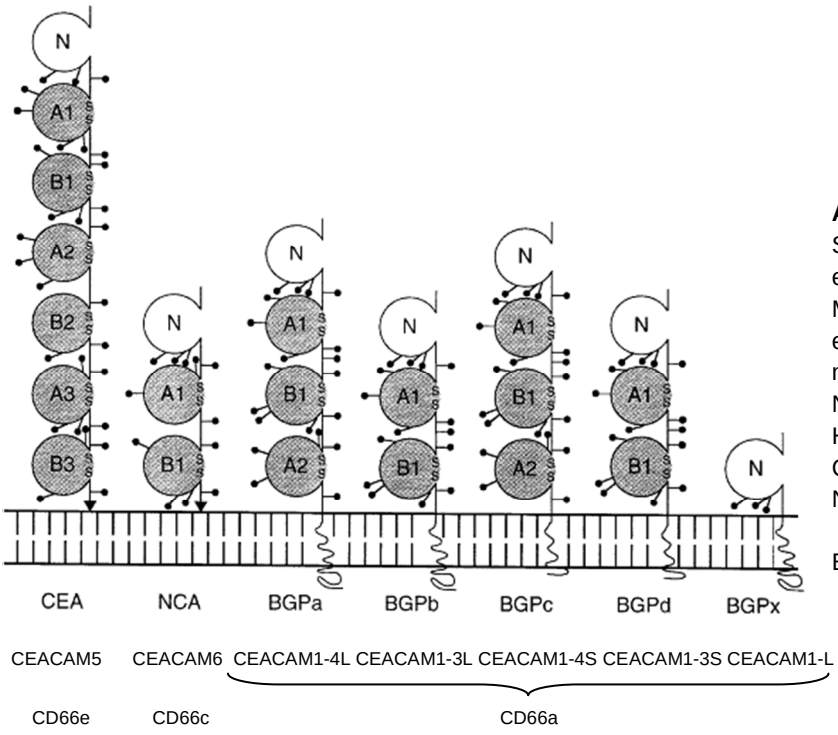


Abb. 1.2:
Schematische Darstellung von einigen membranständigen Mitgliedern der CEACAM-Familie einschließlich der Benennung nach verschiedenen Nomenklaturen (Abb. mod. nach Hammarström, 1999);
CEA = Carcinoembryonic Antigen
NCA = Non-specific cross reacting Antigen
BGP = Biliary Glycoprotein

Während CEACAM5 und CEACAM6 (CEA, NCA) über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden sind, besitzen die CEACAM1-Isoformen (BGP) eine transmembranöse sowie eine daran anschließende zytoplasmatische Domäne auf der Zellinnenseite. Diese kann für verschiedene Isoformen entweder in einer langen oder kurzen Form vorliegen. Insgesamt sind für CEACAM1 11 unterschiedlich gespleißte Isoformen bekannt, die über verschieden lange zytoplasmatische Domänen sowie eine unterschiedliche Anzahl an extrazellulären Domänen verfügen (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Zusätzlich zu diesen Variationen können Gewebe-spezifische Glykosylierungsunterschiede auftreten, selbst bei sonst gleichen Isoformen (Kannicht *et al*., 1999; Lucka *et al.*, 2004).
Die Expression von CEACAM-Mitgliedern erfolgt überwiegend in epithelialen Geweben, darüber hinaus jedoch auch auf Endothel- und Blutzellen und für einzelne Isoformen in zahlreichen weiteren Geweben (Öbrink, 1997; Hammarström, 1999; Singer *et al.*, 2002; Singer und Lucka, 2005). Für einige CEACAM-Vertreter sind homologe Moleküle in der Maus, Ratte sowie in anderen Primaten bekannt (Zhou *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2002).
Neben den für CEACAMs bekannten homophilen Interaktionen in trans zur Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten treten mit vermeintlich regulatorischer Funktion auch cis-Interaktionen zwischen CEACAM-Molekülen auf der Oberfläche ein und derselben Zelle auf (Öbrink, 1997).

CEACAM1

CEACAM1 (BGP, CD66a) stellt die wohl phylogenetisch älteste CEACAM-Variante dar; diese Theorie basiert auf Sequenzanalysen sowie der Tatsache, dass nur CEACAM1 außer beim Menschen auch bei Ratte und Maus vorliegt (Öbrink, 1997; Zebhauser *et al.*, 2005). Insofern wird angenommen, dass die anderen CEACAM-Vertreter vermutlich durch Gendiversifikation aus *CEACAM1* hervorgegangen sind. Im Gegensatz zum Menschen sind bei der Maus zwei Allele für CEACAM1 bekannt, die als *Ceacam1a* und *Ceacam1b* bezeichnet werden (Nakajima *et al.*, 2002). CEACAM1 verzeichnet eine ausgedehnte Expression in verschiedenen humanen Geweben, darunter Epithelien des Magens, Dünndarms, Pankreas, Ösophagus und Cervix sowie der Leber, Gallenblase, Harnblase, Prostata und Nieren als auch auf einigen Endothelien (Prall *et al.*, 1996; Öbrink, 1997; Hammarström, 1999). Innerhalb des hämatopoetischen Systems ist CEACAM1 auf der Oberfläche von Monozyten, Granulozyten als auch auf T- und B-Lymphozyten (Kammerer *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2002) sowie dendritischen Zellen zu finden (Kammerer *et al.*, 2001). Zudem zeigen Trophoblasten der Plazenta einen Besatz mit CEACAM1 (Bamberger *et al.*, 2000).
Wie auch bei Nagern existieren beim Menschen für CEACAM1 zwei wesentliche mRNA-Spleißformen, die sich in der Länge der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden und entsprechend die CEACAM1-4L und 1-4S Isoformen hervorbringen, welche in den meisten Geweben co-exprimiert werden (Öbrink, 1997). Lediglich auf Granulozyten sowie Lymphozyten scheint ausschließlich die CEACAM1-4L Isoform exprimiert zu werden (Singer *et al.*, 2002). Obwohl die Molekülmasse des Proteins theoretisch bei ca. 55 kDa liegt, zeigt CEACAM1 in der Gelelektrophorese aufgrund der mitunter massiven Glykosylierungen meist Laufweiten, die deutlich höheren Molekülmassen zwischen 110-160 kDa entsprechen.

Für CEACAM1 wurden in der Vergangenheit zahlreiche Funktionen unterschiedlichster Art in Studien aufgedeckt und beschrieben. Zum einen vermittelt CEACAM1, wie die anderen CEACAM-Mitglieder, Zelladhäsionsfunktionen durch homophile Interaktionen, die durch cis-Dimerisierung, Phosphorylierung und die zytoplasmatische Bindung von Calmodulin reguliert werden (Edlund *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1996). Über die intrazelluläre Domäne sind CEACAM1-Isoformen zudem an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt, welche u.a. Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle regulieren. CEACAM1 cis-Dimere können wie erwähnt zytoplasmatisch von Calmodulin gebunden werden als auch mit u.a. Aktin, Tropomyosin, Tallin und Paxillin interagieren (Izzi *et al.*, 1999; Ebrahimnejad *et al.*, 2000; Schumann *et al.*, 2001; Öbrink *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2005). Konservierte Ser/Thr-Reste der zytoplasmatischen Domäne werden in verschiedenen Zelltypen durch Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert wie auch Tyrosinreste durch die Kinasedomäne des Insulinrezeptors, durch EGFR und die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Src, Hck und Lyn (Brümmer *et al.*, 1995; Abou-Rjaily *et al.*, 2004; Chen und Shively, 2004). Die Tyrosinreste sind dabei Bestandteil zweier ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), deren Phosphorylierung wiederum Tyrosinkinasen sowie -phosphatasen wie SHP-1 und SHP-2 aktiviert (Hauck *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001). Neben komplexen Funktionen immunmodulatorischer Natur tritt CEACAM1 auch als Pathogen-Rezeptor für z.B. Neisserien, Salmonellen, *H. influenzae* als auch *E.Coli* auf (Leusch *et al.*, 1991; Virji *et al.*, 1996; Virji *et al.*, 2000; Greicius *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2004).
Eine wichtige Funktion von CEACAM1 ist die Involvierung in Prozesse zur Neuausbildung von Blutgefäßen aus bereits bestehender Vaskularisierung (Angiogenese) in Hinblick auf seine Beteiligung als Zelladhäsionsmolekül sowie als Regulator der erforderlichen Signaltransduktion; dabei zeigt CEACAM1 eine positive, d.h. verstärkende, gegenseitige Wirkung mit angiogenen Faktoren wie etwa VEGF, Angiopoietin und Angiogenin (Wagener und Ergün, 2000; Horst und Wagener, 2004; Kilic *et al.*, 2005; Horst, 2006).

CEACAM5 und CEACAM6

CEACAM5 (CEA) stellt das erste beschriebene Mitglied und den Namensgeber der CEACAM-Familie dar. CEACAM6 (NCA) wurde erstmals als Interaktionspartner von CEA mit ähnlichen Eigenschaften beschrieben, der weder Gewebe- noch Tumor-spezifisch zu sein schien (*nonspecific cross-reacting antigen*; von Kleist *et al.*, 1972). CEA und NCA sind Zelladhäsionsmoleküle mit starker Sequenzhomologie, die sich jedoch in der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen unterscheiden. NCA besteht aus einer N-terminalen IgV-Domäne sowie einer IgC1 (A1)- und IgC2 (B1)-Domäne, welche mit CEACAM5 weitgehend übereinstimmen, gefolgt von einem GPI-Anker zur Verankerung auf der Zellmembran. CEA weist dagegen noch zwei weitere Paare von IgC-Domänen (A2/B2 und A3/B3) vor dem GPI-Anker auf und besitzt somit insgesamt 7 extrazelluläre Domänen, was es zum größten unter den CEACAM-Mitgliedern macht. Der GPI-Anker bindet die Adhäsionsmoleküle an Mikrodomänen, sogenannte *lipid rafts*, auf der apikalen Zellmembran polarisierter Zellen (Kammerer *et al.*, 2004; Kolla *et al.*, 2009).
Die Expression von CEA ist weitgehend begrenzt auf das Kolonepithel, die Zellen der Magenschleimhäute, Plattenepithelzellen des Ösophagus und der Cervix, auf

Prostataepithel, sekretorisches Epithel sowie Duktuszellen der Schweißdrüsen (Hammarström, 1999). Transgene Mäuse mit humanem CEA unter einem humanen Promoter zeigen interessanterweise das gleiche Expressionsmuster wie beim Menschen, obwohl Rodentia selbst kein CEA-Homolog besitzen (Eades-Perner *et al.*, 1994). Für NCA wird ein breiteres Expressionsschema, ähnlich wie für CEACAM1 angenommen. Definitiv nachgewiesen wurde eine zusätzliche Expression in Lunge, Testis sowie auf Monozyten und Granulozyten. CEA ist als stark verzuckertes Glykoprotein (bis zu 50% Zuckeranteil an der Gesamtmolekülmasse) an der Ausbildung der apikalen Glykokalyx auf ausdifferenzierten Enterozyten beteiligt (Hammarström, 1999; Schölzel, *et al.*, 2000; Kolla *et al.*, 2009; Kurio *et al.*, 2012).
Für NCA und CEA wurde nachgewiesen, dass sie eine Reihe von Gram-negativen Bakterien binden können und zumindest im Fall von NCA an Internalisierung/Phagozytose beteiligt sind (Bos *et al.*, 1997; Billker *et al.*, 2002). Bereits seit längerem wird für CEA und NCA diskutiert, dass sie möglicherweise über Erkennungsstrukturen für PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), sogenannte PRRs (*pattern recognition receptors*), verfügen und eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr spielen könnten (Hammarström und Baranov, 2001; Virji, 2001).

1.1.3 Die Rolle von CEACAM-Mitgliedern in malignen Tumorerkrankungen

Für alle der drei oben näher beschriebenen Mitglieder der CEACAM-Familie gilt eine Expression auf den Zellen humaner maligner Tumore verschiedener Gewebe als sichergestellt, meist in Zusammenhang mit einer einhergehenden Dysregulierung des Expressionsmusters, jedoch ohne das Auftreten von strukturellen Mutationen, wie es beispielsweise für Onkogene bekannt ist. So tritt bei Kolonkarzinomen eine Überexpression von CEA und NCA auf, während für CEACAM1 in der Regel eine Verminderung der Expression im Vergleich zu Normalgewebe zu beobachten ist (Neumaier *et al.*, 1993; Nollau *et al.*, 1997). In Zusammenhang mit der Überexpression von CEA und NCA in kolorektalen Karzinomen konnte eine erhöhte Proliferation von Kolonozyten bei gleichzeitigem Rückgang des Differenzierungsgrades sowie der Anoikis-/Apoptoserate gezeigt werden, was einen kausalen Zusammenhang zwischen der Änderung von CEACAM-Expressionsmustern und der Tumorprogression vermuten lässt (Chan *et al.*, 2007).
Auch für andere von Lunge, Endometrium, Prostata, Pankreas und Brustdrüsen abgeleitete Tumore sowie für Leukämien konnten bei maligner Transformation Änderungen des Expressionsmusters für CEACAM-Mitglieder bzw. Zusammenhänge mit der Tumorprogression nachgewiesen werden (Laack, 2002; Blumenthal *et al.*, 2007; Lasa *et al.*, 2008). Für NCA konnte beim Kolonkarzinom eine vorwiegende Expression auf Zellen mit geringem Differenzierungsgrad festgestellt werden; eine siRNA-induzierte Unterdrückung der Expression von NCA lieferte hierbei eine drastische Reduzierung des Tumorwachstums *in vitro* als auch *in vivo* (Gemei *et al.*, 2013). Für Kopf-Hals-Karzinome konnte zudem erhöhtes Tumorwachstum durch verringerte Apoptose in Zusammenhang mit der Expression von NCA nachgewiesen werden (Cameron *et al.*, 2012). CEA und NCA stehen somit in Zusammenhang mit einer erhöhten Tumorprogression.

Die Rolle von CEACAM1 bei der Entstehung maligner Tumore dagegen erscheint deutlich vielschichtiger: Einerseits wird *CEACAM1* in Bezug auf den Rückgang seiner Expression bei gleichzeitiger Verminderung der Apoptoserate und damit erhöhtem Tumorwachstum insbesondere bei Kolonkarzinomen als mögliches Tumorsuppressorgen diskutiert (Kunath *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 2006). Zudem konnte eine Regulation des *CEACAM1*-Gens durch die bekannten Tumorsuppressorproteine p53 und ATM nachgewiesen werden, welche als essentiell für die Induktion der Seneszenz einer Zelle als Reaktion auf Schäden in der DNA angesehen wird (Sappino *et al.*, 2012). In Mammakarzinomzellen wurde beobachtet, dass speziell die CEACAM1-4S Isoform sowohl an der Vermittlung von Apoptose beteiligt ist, als auch bei Re-Expression eine Rückwandlung der maligne transformierten Zellen zu einem hinsichtlich der Morphologie mit Normalgewebe vergleichbaren Phänotyp bewirkt (Kirshner *et al.*, 2003).

Studien zu anderen Tumorentitäten bzw. zu anderen Merkmalen der Tumorprogression zeichnen dagegen ein Tumor-förderndes Bild für CEACAM1 auf. In malignen Melanomen z.B. konnte gegenüber gesunder Epidermis eine verstärkte CEACAM1-Expression ermittelt werden, die unmittelbar mit einem erhöhten Metastasierungspotential korellierte, insofern dass CEACAM1 maßgeblich an der invasiven Front disseminierender Tumorzellen gefunden wurde (Thies *et al.*, 2002; Ebrahimnejad *et al.*, 2004). Ähnliche Befunde konnten auch für Schilddrüsenkarzinome erhalten werden, in denen CEACAM1-Expression erst in Einklang zu fortgeschrittener Neoplasie und beginnender Invasivität von Tumorzellen gegenüber Normalgewebe beobachtet werden konnte (Liu *et al.*, 2007). Von besonderer Bedeutung für die invasivitätsfördernde Komponente von CEACAM1 scheint eine spezielle cis-Wechselwirkung mit Integrinen vom Typ $\alpha_v\beta_3$ zu sein, die vermutlich zu Interaktionen mit der ECM führt, welche die Invasivität begünstigen (Brümmer *et al.*, 2001). Vor allem auch die pro-angiogenen Eigenschaften von CEACAM1 schreiben diesem Molekül eine Tumor-fördernde Funktion zu: Da Tumore in der Regel eine schnell proliferierende Zellpopulation darstellen, benötigt die neu entstandene Zellmasse ab einer gewissen Größe zusätzliche Anbindungen an das Blutgefäßsystem, um die Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen zu können. Die fehlende Versorgung führt besonders im Kern des Tumors zu massivem Zelluntergang (Nekrose). Mit zunehmender Hypoxie treten komplexe Wechselwirkungen zwischen den Tumorzellen und seiner Umgebung, dem sogenannten Tumorstroma auf, bei denen u.a. pro-angiogene Mediatoren freigesetzt werden, welche zu einer aberranten Neoangiogenese führen. Die neu aus bestehender Vaskularisierung gebildeten Mikrogefäße wandern in den Tumor ein, was neben der benötigten Versorgung der neugebildeten Zellen auch die angiogene Metastasierung begünstigt (Weinberg, 2007). Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass CEACAM1 eine pro-angiogene Wirkung auf das unmittelbare Umfeld eines Tumors zeigt und die Reifung neugebildeter Tumor-Mikrogefäße unterstützt, während diese Effekte in CEACAM1-defizienten Mäusen nicht beobachtet wurden (Gerstel *et al.*, 2011). Die beschriebene Wechselwirkung von CEACAM1 mit $\alpha_v\beta_3$-Integrinen unterstützt die Hypothese einer Beteiligung an der Neubildung von Tumorgefäßen, da auch $\alpha_v\beta_3$-Integrin eine regulatorische Funktion in der Neoangiogenese zugewiesen wird (Brooks *et al.*, 1994; Rehn *et al.*, 2001).

Durch die Anwesenheit bzw. die Beteiligung an verschiedenen Prozessen der Tumorprogression finden die besagten CEACAM-Mitglieder bereits seit Jahrzehnten klinische Anwendung als diagnostische/prognostische Marker für verschiedene Tumorerkrankungen aufgrund ihrer ausschließlichen oder erhöhten Expression. CEACAM-Konzentrationen in Faeces, Serum und Biopsieproben werden durch Immunodetektion sowie in jüngerer Zeit auch über mRNA-Level z.B. für die Diagnose/Prognose bzw. Verlaufskontrolle der Behandlung von Kolon- und Pankreaskarzinomen sowie für Krebserkrankungen von Magen, Brustdrüsen und Lunge bestimmt (Hammarström, 1999; Ohlsson *et al.*, 2006; Simeone *et al.*, 2007; Fiori *et al.*, 2012; Haas *et al.*, 2013; Hermunen *et al.*, 2013; Huh *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Okamura *et al.*, 2013). Mindestens ebenso lange werden Strategien entwickelt und getestet, bei denen spezifische CEACAM-Antigene als Zielstrukturen für therapeutische Zwecke dienen sollen (Hammarström, 1999; Strickland *et al.*, 2009; Sapoznik *et al.*, 2012). Mit der zunehmenden Aufklärung der Funktionen von CEACAMs in der malignen Tumorentwicklung in Einklang mit neuen technischen und methodischen Kenntnissen findet dieses klinische Feld zunehmend breitere und tiefere Anwendung.

1.2 Antikörper als Teil des Immunsystems und rekombinante Antikörper-Fragmente

1.2.1 Grundlegende Merkmale des Immunsystems von Vertebraten

Das Immunsystem der höheren Wirbeltiere bzw. Kiefermäuler (Gnathostomata) als komplexes System zur Abwehr pathogener Mikroorganismen und Viren setzt sich zusammen aus den evolutionär divergenten Teilen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Zum angeborenen Immunsystem zählen verschiedene phagozytotische Zelltypen, Proteinmoleküle sowie mechanische Barrieren, die eine weitgehend unspezifische Immunabwehr ausüben. Das adaptive Immunsystem ergänzt diese Komponenten mit weiteren Zellen, die auf Kontakt mit Antigenen und Stimulation spezifische Abwehrmaßnahmen gegen unterschiedliche Pathogene entwickeln und speichern können. Beide Formen sind in mitunter eng verknüpfter Weise in der Lage, auf das Eindringen von Erregern hin eine Immunantwort zum Schutz des vielzelligen Organismus auszulösen (Janeway, 2002).

Auf der Ebene der erfolgenden Abwehrmaßnahmen unterscheidet man die zelluläre und die humorale Immunantwort. Die zelluläre Immunantwort wird vermittelt durch verschiedene phagozytotische und Antigen-präsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems. Diese sind in der Lage, Erreger direkt duch Phagozytose zu eliminieren (Janeway und Medzhitov, 2002). Aus dem adaptiven Immunsystem wirken außerdem die T-Lymphozyten an der zellulären Immunantwort mit, die aus Vorläuferzellen im Thymus reifen. $CD4^+$ T-Helfer-Lymphozyten vom Typ 1 und 2 vermitteln eine breite immunstimulatorische Wirkung durch zahlreiche Zytokine, während $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten oder CTL fremdartige und infizierte körpereigene Zellen eliminieren. (Zinkernagel und Doherty, 1974; Zhu und Paul, 2008).

Die humorale Immunantwort bezieht sich auf das flüssige Milieu des vielzelligen Körpers, dass sich aus Blut und Lymphe zusammensetzt (lat. *[h]umor* = Flüssigkeit, Feuchtigkeit). Der effektive Teil dieser Immunantwort beruht nicht auf Zellen, sondern auf Plasmaproteinen, die in der Lage sind, Pathogene wie Viren und Bakterien im Extrazellularraum zu erkennen und zu neutralisieren. Zu den Komponenten der humoralen Immunantwort zählen die Komplement-Faktoren (angeborene Immunität), die Antikörper sowie einige Interleukine aus der Gruppe der Zytokine von immunologischen Botenstoffen (adaptive Immunantwort). Die Urheber der Antikörper sind dabei die B-Lymphozyten, die nach Antigen-Erkennung durch bestimmte Oberflächenrezeptoren in Antikörper-produzierende Plasmazellen und in B-Gedächtniszellen differenzieren (Janeway, 2002).

1.2.2 Die Rolle der Antikörper in der humoralen Immunantwort

Antikörper oder Immunglobuline sind sekretorische Plasmaproteine, die immunologische Funktionen vermitteln und den Namensgeber der Immunglobulin-Superfamilie von Proteinen darstellen. Sie selbst gehören zur Obergruppe der Globuline, die etwa 40% der Proteine des Blutplasmas ausmachen. Innerhalb der Globuline stellen die Antikörper die sogenannten γ-Globuline dar mit einen Anteil von etwa 16% an der Summe aller Plasmaproteine (Löffler *et al.*, 2007), wovon der IgG-Subtyp wiederum den größten Anteil der Antikörpergesamtmenge mit etwa 70% ausmacht (Busch, 2004).
Die Ausbildung und Sezernierung spezifischer Antikörper setzt eine Aktivierung der B-Lymphozyten in zwei Schritten voraus. Hierbei werden zuerst eingedrungene Fremdkörper-Antigene ähnlich wie bei phagozytierenden Zellen über den Antigen-Rezeptor des B-Lymphozyten (B-Zell-Rezeptor oder BCR) erkannt und gebunden. Nach Internalisierung und Degradation werden Fragmente über die MHC-Klasse-II-Komplexe auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert (Malhotra *et al.*, 2009). In einem zweiten Schritt der B-Zell-Aktivierung erfolgt die spezifische Wechselwirkung des T-Zell-Rezeptors (TCR) eines $CD4^+$ T_H2-Lymphozyten mit dem Antigen-präsentierenden MHC-Klasse-II-Komplex der B-Zelle. Nach Ausbildung einer zusätzlichen Interaktion über CD40 (B-Zelle) und CD40L (T_H2-Zelle) produziert die T-Helfer-Zelle zuerst Interleukin vom Typ IL-4, welches als immunstimulatorisches Zytokin den B-Lymphozyt zur klonalen Expansion bewegt. Weitere Stimulation der B-Zelle mit IL-5 und IL-6 bringt aus ihr eine aktivierte B-Zelle oder Plasmablast hervor, die sich im Weiteren auf die Produktion von Antikörpern fokussiert. T-Zell-aktivierte B-Lymphozyten wandern in die Lymphfollikel ein, wo sie sogenannte Keimzentren bilden. In diesem Stadium durchlaufen die B-Zellen eine Affinitätsreifung, die mit einem Isotypwechsel der produzierten Antikörper einhergeht. Dabei erfolgt eine somatische Hypermutation, bei der unter Beteiligung der *activation-induced Cytidin-Deaminase* (AICD) mit einer um Faktor 10^6 erhöhten Mutationsrate die Antigen-Bindungsstellen ungerichtet variiert werden, wobei letztendlich die optimal affinen Spezies selektiert werden und erhalten bleiben (s. Abb. 1.3B). Am Ende dieses Prozesses differenzieren selektierte B-Lymphozyten entweder zu Plasmazellen aus, die massiv Immunglobuline vom Typ IgG produzieren, oder werden zu B-Gedächtniszellen, die in Milz und Knochenmark einwandern und dort mit der Information für passend gereifte Antikörpermoleküle überdauern (Janeway, 2002; Teng und Papavasiliou, 2007).

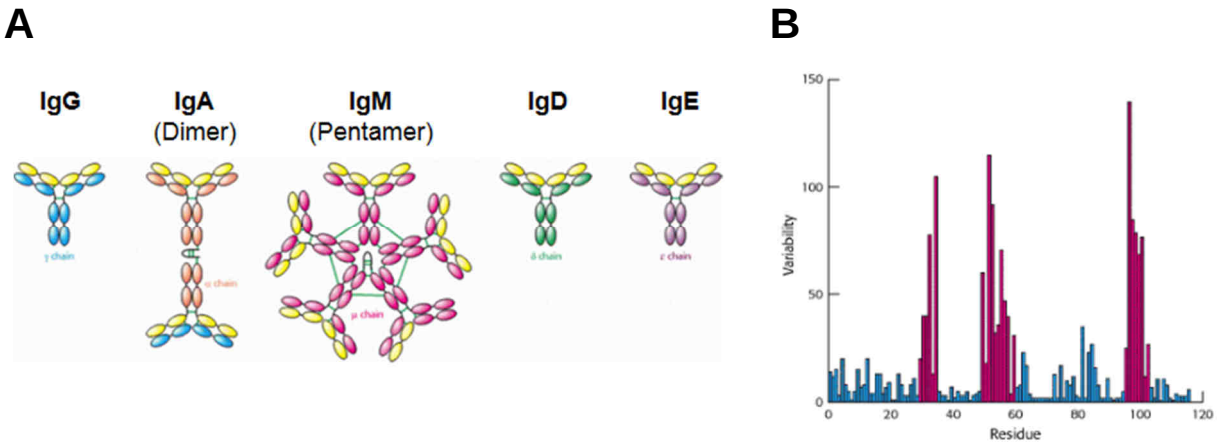


Abb. 1.3:
A: Verschiedene Isoformen von konventionellen Immunglobulinen des Immunsystems höherer Vertebraten (ab den Gnathostomata), die während des Klassen- oder Isotyp-Wechsels von B-Lymphozyten gebildet werden und unterschiedliche Funktionen ausüben: IgG – Spät ausgereifte Ig-Form, aktiviert u.a. Komplement-System, Fc-Teil vermittelt Phagozytose; IgA – Homo-dimerisierte Form durch *joining*-Peptid, Pathogen-Abwehr auf Schleimhäuten; IgM – pentamere Form durch *joining*-Peptid, Ausbildung bei erstem Antigen-Kontakt (frühe Infektionsphase). Aktiviert Komplementsystem und bewirkt Agglutination; IgD – kaum sezernierte Form, membranständige Expression mit IgM als B-Zell-Rezeptor (BCR); IgE – Durch Fc-Rezeptor auf Mastzellen gebunden, vermittelt Schutz vor Parasiten. Antigen-Kontakt bewirkt Quervernetzung mit nachfolgender Degranulation von Mastzellen und Granulozyten (Ausschüttung von Histaminen, Granzymen); an Allergien beteiligt.
B: Diagramm-Schaubild zur ungerichteten Hypermutation. Der Plot zeigt die relative Sequenzvariabilität in Abhängigkeit der Position bestimmter AS-Reste über die Sequenzabfolge der schweren Immunglobulin-Ketten in B-Zellen während der Affinitätsreifung. Die in Rot dargestellten Positionen zeigen eine außergewöhnlich hohe Variabilität in Relation zur Gesamtsequenz: Diese hypervariablen Regionen beziehen sich auf drei Schleifen in der Domänenstruktur der Immunglobuline, die an der Ausbildung der Antigen-bindenden CDRs beteiligt sind (beide Abb. mod. nach Berg, Stryer *et al.*, 2002).

1.2.3 Aufbau und Wirkungsweise konventioneller IgG-Antikörper

Antikörper der IgG-Klasse sind das effektorische Endprodukt einer B-Zell-vermittelten humoralen Immunantwort. Ihre Funktion besteht in der nicht-kovalenten, jedoch hoch-affinen Bindung molekularer Strukturen, welche von anderen Elementen des Immunsystems zuvor pathogenen Fremdkörpern zugeordnet wurden. Durch die starke, spezifische Bindung solcher Substanzen ermöglichen IgG-Antikörper verschiedene Wege der Neutralisation bzw. Beseitigung von in den Organismus eingedrungenen Noxen, wie in Abb. 1.4 als Übersicht zusammengefasst ist.

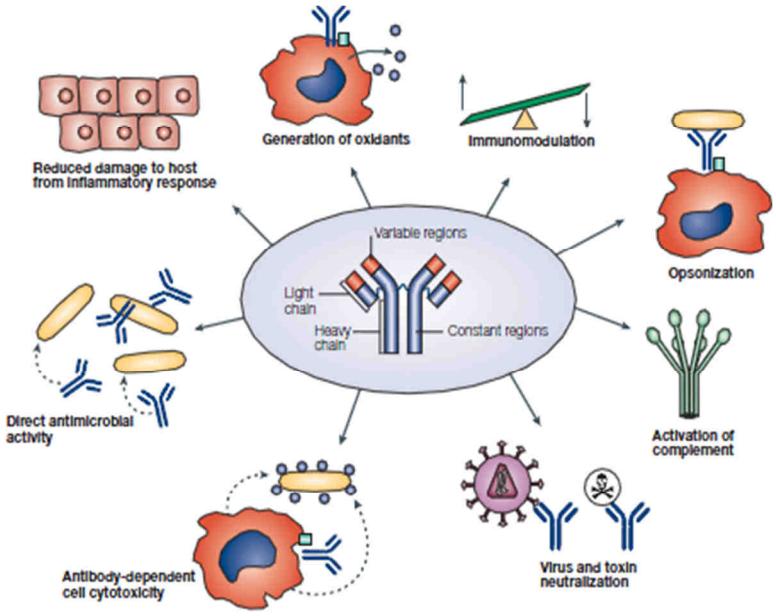


Abb. 1.4:
Schematische Übersicht der von Antikörpern (hier: IgG) vermittelten Möglichkeiten zur Neutralisierung bzw. Bekämpfung eingedrungener Pathogene im Rahmen der humoralen Immunantwort; dazu zählen die Bindung mit direkter antimikrobieller Wirkung, die Antikörper-vermittelte Zelltoxizität, Neutralisierung von z.B. Viren oder Toxinen, Komplement-aktivierung, Osponierung (Verhinderung pathogener Aktivität durch Fixierung bzw. Blockierung der Oberfläche), Modulation anderer Komponenten des Immunsystems, Auslösen von ROS-Freisetzung (*reactive oxygen species*) und Schutz/Entlastung von Geweben bei Entzündungsreaktionen. (Abb. aus Casadevall *et al.*, 2004).

Das IgG-Molekül ist im Prinzip ein Heterotetramer aus zwei identischen schweren Peptidketten sowie zwei identischen leichten Ketten, wobei die schweren Ketten in der sogenannten Scharnier-Region (engl.: *hinge region*) miteinander sowie jede schwere Kette mit einer der leichten Ketten über Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Die Substruktur der Ketten setzt sich aus verschiedenen Immunglobulin-Domänen zusammen, die sich in Anzahl und Beschaffenheit unterscheiden. Am N-Terminus der leichten und schweren Ketten befindet sich jeweils eine IgV- oder variable Domäne (V_L bzw. V_H). Diese variablen Domänen beherbergen die Bereiche, welche einer Hypermutation unterliegen; diese werden auch als hypervariable Regionen oder CDRs (*complementarity determining regions*) bezeichnet und beinhalten die Antigen-Bindungsstellen bzw. vermitteln die Spezifität für ein bestimmtes Antigen. Die auf dem Antigen tatsächlich gebundenen Bereiche werden auch Epitop genannt, die AS-Reste des Antikörpermoleküls, welche das Epitop binden, heißen in Analogie dazu Paratop. Während die leichten Ketten neben der variablen Domäne nur eine IgC- oder konstante Domäne besitzen (C_L), verfügen die schweren Ketten eines IgG-Antikörpers über insgesamt drei konstante Domänen (C_H1-3).
Wie in Abb. 1.5 dargestellt ist, entspricht das IgG-Molekül in der dreidimensionalen Ausprägung vereinfacht einer Y-Form, die sich in zwei wesentliche funktionale Bereiche unterteilt: Die variablen Domänen zusammen mit der ersten konstanten Domäne aller vier Ketten entspricht dem sogenannten Fab-Teil (engl.: F = *fragment*; ab = *antigen binding*) mit zwei Antigen-Bindungsstellen, die restlichen konstanten Domänen der schweren Ketten werden als Fc-Teil bezeichnet (engl.: c = *cristallizable*).

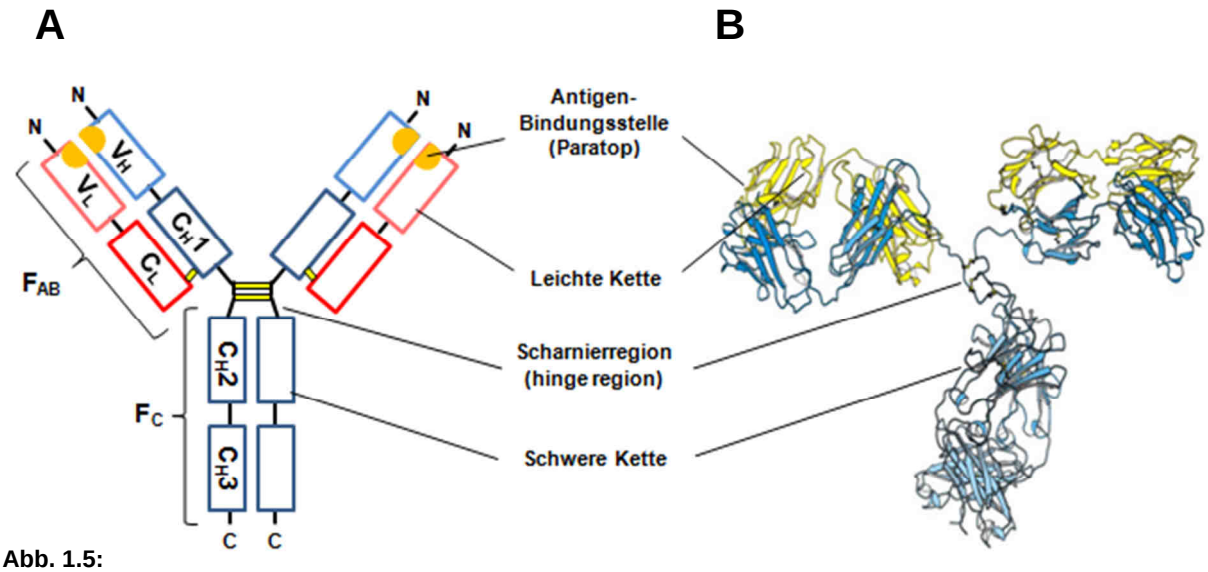


Abb. 1.5:
A: Schematische Darstellung der strukturellen Elemente eines IgG-Antikörpermoleküls als Heterotetramer aus zwei schweren Ig-Ketten (blau) und und zwei leichten Ig-Ketten (rot); beide schwere Ketten sind in der *hinge region* zw. C_H1 und C_H2 kovalent über zwei Disulfidbrücken verbunden (gelb), ebenso sind die schweren und leichten Ketten zw. C_H1 und C_L verknüpft. Die Antigenbindungsstellen befinden sich am N-Terminus der variablen Domänen beider Ketten (orange)
B: 3D-Bändermodell gemäß Kristallstruktur eines IgG-Moleküls (Abb. mod. nach Berg, Stryer *et al.*, 2002)

Die variablen Domänen V_H und V_L stehen nicht-kovalent über hydrophobe Wechselwirkungen konservierter Reste in Verbindung. Die drei hypervariablen Regionen bzw. CDRs befinden sich auf den nach außen gerichteten Peptidschleifen, welche die β-Faltblätter der variablen Domänen verbinden. An jeder CDR sind für IgG-Antikörper Reste von beiden variablen Domänen, also auf der leichten und der schweren Kette beteiligt. Die davor, dahinter und dazwischen liegenden Peptidabschnitte werden als *framework regions* (FR1-4) mit konservierten Strukturmotiven bezeichnet. Die konservierten Reste für hydrophobe V_H-V_L-Wechselwirkungen sind in FR2 zu finden (Kabat und Wu, 1991). Die Bindung des Antigens basiert auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen bestimmter CDR-Reste mit dem Epitop, dazu zählen ionische Bindungen, van der Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Das sogenannte *rearrangement* von Gensegmenten für die betreffenden Bereiche, welches während der Reifung von B-Lymphozyten erfolgt, bringt die enorme Diversität von Erkennungsmöglichkeiten für das Antikörper-Repertoire hervor. Man geht davon aus, dass durch Kombination der unterschiedlichen Gensegmente eine Antikörpervielfalt für mehr als 10^{12} spezifisch passende Strukturen innerhalb des Immunsystems erzeugt wird (Alberts, 2002).
Für die Kodierung der variablen Region in den leichten Ketten existieren zwei Gensegmente, V (*variable*) und J (*joining*), die durch somatische Rekombination zu einem Exon vereinigt werden. Beim Spleißen wird dem V-J-Abschnitt ein weiteres Exon für die konstante Region der leichten Kette zugefügt. Es liegen insgesamt zwei Genorte für kodierende Segmente der leichten Ketten im menschlichen Genom vor, die zwei Typen von leichten Ketten hervorbringen. Diese werden mit Lambda (λ) und Kappa (ƙ) bezeichnet. Für die variable Region der schweren Ketten existiert neben V und J noch ein weiteres D-Segment

(*diversity*). Hier werden zuerst ein D- und ein J-Segment durch Rekombination zusammengefügt und anschließend durch ein V-Segment für ein vollständiges Exon ergänzt. Das so entstandene Exon aus V-D-J-Segmenten wird beim Spleißen ebenfalls mit dem Exon einer C-Region für schwere Ketten verbunden.
Insgesamt sind die Gruppen von Genabschnitten, die für Immunglobuline kodieren, beim Menschen über drei Genloci auf verschiedenen Chromosomen verteilt. Darin existieren für die leichten λ-Ketten 29 unterschiedliche V-Segmente, die mit vier Paaren von J-Segmenten und Exons für C-Regionen verbunden werden können. Für leichte ƙ-Ketten gibt es 40 V-Segmente, fünf verschiedene J-Segmente, jedoch nur ein einziges Exon für die C-Region. Für die Bildung von schweren Ketten bestehen im entsprechenden Genlocus 51 V-Segmente, 27 D-Segmente sowie sechs verschiedene J-Segmente. Für die fünf Isoformen aus dem Prozess des Klassenwechsels von Immunglobulinen während der B-Zell-Reifung stehen insgesamt neun C-Abschnitte, vier für C_γ (IgG), zwei für C_α (IgA) und je einer für C_δ (IgD), C_μ (IgM) und C_ε (IgE), zur Verfügung (Janeway, 2002). Vollständige IgG-Moleküle besitzen eine Molekülmasse von etwa 150 kDa; eine schwere Kette weist dabei entsprechend ca. 50 kDa und eine leichte Kette 25 kDa auf.

1.2.4 Schwerketten-Antikörper der Camelidae

Die Familie der Camelidae gliedert sich in die ein- bzw. zweihöckrigen Altweltkamele (*C. dromedarius* und *C. bactrianus*) des asiatischen und afrikanischen Raums und die in Südamerika ansässigen Neuweltkamele mit den Gattungen *Lama* (*L. glama* und *L. guanicoe*) sowie *Vicugna* (*V. vicugna* und *V. pacos*). Diese Gattungen stammen von einem gemeinsamen, inzwischen ausgestorbenen Vorfahren ab, dessen Lebensraum ursprünglich das heutige Nordamerika darstellte.
1993 publizierten Hamers-Casterman *et al.*, dass ihnen nach Untersuchung der Serumkomponenten von *C. dromedarius* durch kombinierte Affinitätschromatographie mittels Protein G/Protein A zusätzlich zu den bekannten Immunglobulin-Formen die Isolierung und Identifikation einer neuen Antikörperspezies gelungen war. Diese verfügte über keine leichten Ketten und bestand außerdem im Antigen-bindenden Fab-Teil nur aus einer (variablen) Domäne, welche komplett die Funktion von V_H und V_L aus konventionellen IgG-Antikörpern in sich zu vereinen schien. Das Fehlen einer C_H1-Domäne in der schweren Kette lässt sich auf eine Mutation des Donor-Spleiß-Signals für das entsprechende Exon zurückführen (Nguyen *et al.*, 1999). Da die kovalente Verbindung der leichten mit der schweren Kette in Antikörpern über die C_H1-Domäne erfolgt, ist das Fehlen der C_H1-Domäne gleichzeitig Ursache für die Abwesenheit von leichten Ketten in dieser Antikörperform. Um dennoch eine Antigen-bindende Funktion ausüben zu können, weisen diese Schwerketten-Antikörper weitere strukturelle Unterschiede zu den konventionellen Immunglobulinen auf. Dazu zählen im Wesentlichen das Auftreten einer verlängerten CDR3 mit einer durchschnittlichen Länge von 16 AS-Resten und der Austausch von Resten aus dem eigentlich hydrophoben Dimerisierungsmotiv in FR2 gegen hydrophile Aminosäuren, um die Löslichkeit zu erhöhen bzw. Aggregation zu unterbinden sowie die Anwesenheit zusätzlicher Cysteine zur möglichen Ausbildung einer weiteren Disulfidbrücke (Muyldermans *et al.*, 1994;

Koch-Nolte *et al.*, 2007). Die Antigen-bindende Domäne dieser Schwerketten-Antikörper wird als V_HH-Domäne zur Unterscheidung von V_H und V_L bezeichnet (Abb. 1.6).

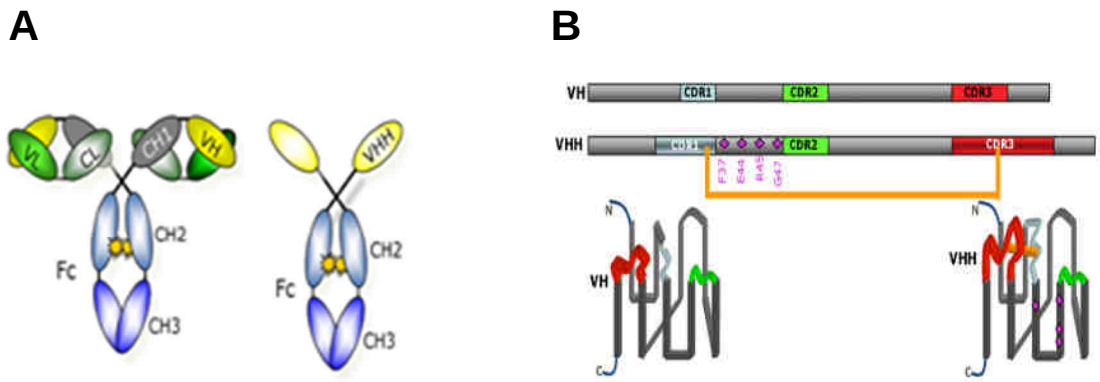


Abb. 1.6:
A: Schematische Darstellung der strukturellen Unterschiede zwischen konventionellen IgG-Antikörpern der Gnathostomata (links) und den speziellen Schwerketten-Antikörpern der Cameliden (rechts) mit F_{AB}-Teil, der pro schwerer Kette nur aus einer Domäne (V_HH) besteht.
B: Schematische Darstellung der strukturellen Unterschiede zwischen der variablen Domäne (V_H) von schweren Ketten konventioneller IgG-Antikörper und der variablen Domäne von Schwerketten-Antikörpern aus Cameliden. Letztere verfügen über verlängerte CDRs (blaue, grüne und rote Bereiche) hydrophil substituierte Reste im Bereich des eigentlich hydrophoben Dimerisierungsmotivs in FR2 (lila Markierungen) und eine zusätzliche Disulfidbrücke (oranger Balken; beide Abb. mod. nach Muyldermans *et al.*, 2009).

Für das Lama wurden verschiedene Subklassen von Schwerketten-Antikörpern mit unterschiedlich langen Scharnierregionen gefunden; diese werden als „cIgG“ mit einer entsprechenden Nummerierung bezeichnet, um von den konventionellen IgG-Subtypen unterschieden werden zu können. Die cIgG3-Form besitzt eine kurze Scharnierregion (*short hinge*), während cIgG2 eine längere prolinreiche Scharnierregion (*long hinge*) besitzen. Zusätzlich treten in Lamas und Kamelen IgG-Antikörper der konventionellen Form mit schweren und leichten Ketten auf, die hier als cIgG1 bezeichnet werden (Vu *et al.*, 1997; van der Linden *et al.*, 2000; Reyelt, 2008).

1.2.5 Hybridom-Technologie zur Produktion monoklonaler Antikörper

Die sogenannte Hybridom-Technik zum Erhalt monoklonaler Antikörper wurde 1975 von Milstein und Köhler entwickelt und beschrieben; für diese Arbeiten wurden beide 1984 gemeinsam mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Bei dieser Technik werden Mäuse der BALB/c-Linie mit einem Antigen der Wahl immunisiert und anschließend B-Lymphozyten aus der Milz präpariert. Die präparierten B-Zellen werden weiter in einem Verhältnis von 5:1 mit einer murinen $HGPRT^{-/-}$-Myelomzelllinie fusioniert unter Einsatz von Polyethylenglykol (PEG), welches durch Bindung von Wasser die Membranen beider Zellarten sehr nahe bringt, so dass es zu spontanen Fusionen kommt. Die Fusion mit den Myelom-Zellen führt zur Immortalisierung der resultierenden Hybridoma-Zellen, da das

Myelom maligne transformierte Gene in die fusionierte Zelle mit einbringt, so dass diese nicht mehr der Seneszenz und Apoptose unterliegen. Zudem haben diese die Gene eines B-Zell-Klons für eine bestimmte Antikörper-Spezies übernommen, so dass die Hybridom-Zelle in der Lage ist, ohne biologische Limitationen große Mengen eines monoklonalen Antikörpers zu produzieren und sezernieren. Notwendig ist allerdings die vorherige Selektion von Hybridom-Zellen, die auch tatsächlich (einen bestimmten) monoklonalen Antikörper produzieren. Hierfür werden die fusionierten Zellen in HAT-Medium kultiviert, welches Hypoxanthin, Aminopterin sowie Thymidin enthält. Hypoxanthin ist ein Substrat der essentiellen Purin-Biosynthese, welches durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) umgesetzt wird. Nicht-fusionierte, HGPRT-defiziente Myelomzellen sind unter diesen Bedingungen nicht lebensfähig. Aminopterin ist ein Folsäure-Antagonist, der hier die Purin-Synthese über alternative Wege verhindert. Da hierdurch auch die *de novo*-Synthese von Pyrimidinen unterbunden wird, muss dem Medium zusätzlich Thymidin beigefügt werden. Durch weiteres ELISA-*Screening* mit dem passenden Antigen können letztendlich die Klone selektiert werden, die den gewünschten Antikörper produzieren (Köhler und Milstein, 1975; Shirahata *et al.*, 1998).
Die immense Bedeutung dieser Technologie ist begründet durch den Bedarf an großen Mengen monoklonaler Antikörper für diagnostische, therapeutische sowie für Forschungszwecke. Auch die monoklonalen anti-CEACAM Antikörper T84.1 und T84.66, die in dieser Arbeit exprimiert und eingesetzt wurden, leiten sich von entsprechend erzeugten murinen Hybridom-Linien ab (Wagener *et al.*, 1983[a+b]).

1.2.6 Rekombinante Antikörper und Antikörper-Fragmente

Wie zuvor erwähnt ist das klassische Vorgehen zum Erhalt gewünschter Antikörper die Immunisierung geeigneter Versuchstiere, die jedoch mit zahlreichen Limitationen und einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden ist. Die oben beschriebene Hybridom-Technik stellte diesbezüglich einen entscheidenden Durchbruch für die Herstellung monoklonaler Antikörper dar. Gleichzeitig ergab sich hieraus in Zusammenhang mit rekombinanten DNA/RNA-Techniken die Möglichkeit der Isolierung und Rekombination der entsprechenden Nukleinsäuresequenzen, welche für den monoklonalen Antikörper kodieren. Diese konnten nun fast beliebig manipuliert und in einem geeigneten Wirtssystem zur Expression gebracht werden. Hierfür eignen sich besonders bakterielle, aber auch eukaryotische Systeme wie Hefen, Insekten-, Säuger- oder sogar Pflanzenzellen (Vaquero *et al.*, 1999; Albrecht und DeNardo, 2006).
Ein großer Vorteil rekombinanter Antikörper ist die Möglichkeit der Erzeugung chimärer Konstrukte, bei denen nur die erforderlichen Stellen (z.B. Paratop in Antikörpern) mit der für die Wirtsspezies charakteristischen Sequenz belassen werden, während andere Molekülteile durch geeignete Sequenzen entsprechend den genetischen Anforderungen ausgetauscht werden. Dies ermöglicht z.B. die „Humanisierung“ muriner monoklonaler Antikörper, die zu therapeutischen Zwecken im Menschen appliziert werden sollen, ohne dass deren Wirkung durch eine unerwünschte Immunreaktion kompromittiert wird (HAMA, *human-anti-mouse-antibodies*; Yazaki *et al.*, 2004).

Zumeist finden diese Techniken Anwendung für die Generierung und Expression von verschiedenen Antikörper-Fragmenten, die hinsichtlich ihrer Molekülgesamtgröße mehr oder weniger auf die eigentliche Antigenbindungsstelle reduziert sind. Abb. 1.7 liefert eine Übersicht über die gängigsten rekombinanten Antikörper-Fragmente bzw. -Derivate in Anlehnung an konventionelle IgG-Antikörper.

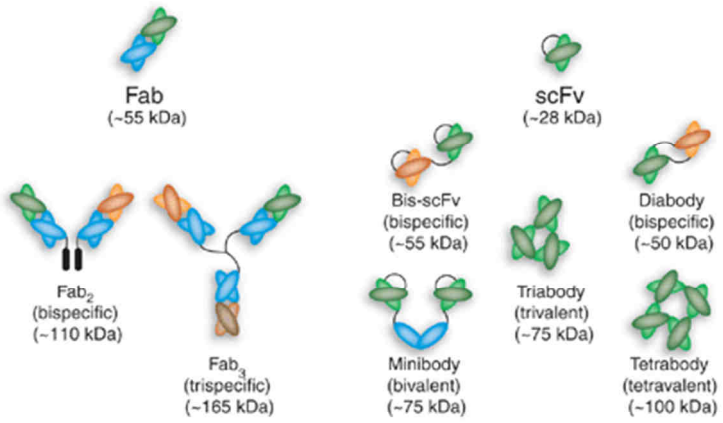


Abb. 1.7:
Schematische Übersicht der gängigen rekombinanten Antikörperderivate bzw. -fragmente in Anlehnung an konventionelle IgG; neben den monovalenten Konstrukten (Fab, scFv) besteht die Möglichkeit der Generierung oligovalenter bzw. oligospezifischer Antikörperfragmente durch rekombinante Verknüpfung gleicher/verschiedener Fragmente (Abb. mod. nach Holliger u. Hudson, 2005).

scFv-Fragmente

Die scFv-Fragmente (*single chain variable fragment*) oder Einzelketten-Antikörper setzen sich aus den rekombinant fusionierten Gensegmenten für die variablen Domänen der schweren und leichten Kette eines monoklonalen Antikörpers zusammen. Die Verbindung der Domänen wird durch eine Nukleotidsequenz bewirkt, die für ein Glycin/Serin-reiches Linkerpeptid, meist vom Typ $(G_4S)_3$, kodiert. Dieses verbindet den C-Terminus der ersten Domäne mit dem N-Terminus der zweiten und ist dabei lang genug, um eine parallele Ausrichtung der N-Termini beider Domänen zu ermöglichen, so dass deren Reste gemeinsam die drei CDRs ausbilden können. Die scFv-Fragmente ähneln somit strukturell einer leichten IgG-Kette, deren Domänen jedoch beide variabel sind und sich zu einer einzelnen Antigen-Bindungsstelle eines monoklonalen Antikörpers zusammenlagern, ohne dessen restliche Struktur zu besitzen bzw. zu benötigen (s. Abb. 1.8). Sie sind somit monovalent. Bei der Wahl eines kürzeren Linkerpeptids werden die beiden Domänen sterisch in eine gewinkelte Konformation gezwungen, welche die Zusammenlegung der N-Termini verhindert. Jedoch dimerisiert ein solches Konstrukt mit einem zweiten Molekül dieser Art über die hydrophoben Motive in FR2, wobei ein bivalentes scFv-Dimer ($[scFv]_2$) oder auch *diabody* entsteht (Ahmad *et al.*, 2012).
Für die beiden variablen Domänen eines scFv-Fragments bestehen zwei mögliche Orientierungen, V_L-zu-V_H und V_H-zu-V_L, die letztendlich durch die Abfolge der jeweiligen Segmente in dem rekombinanten Gen festgelegt sind. Beide Formen ergeben in der Regel ein funktionales Fragment mit spezifischer Antigen-Bindungsfähigkeit. Die Molekülmasse der scFv-Fragmente liegt bei etwa 25 kDa.

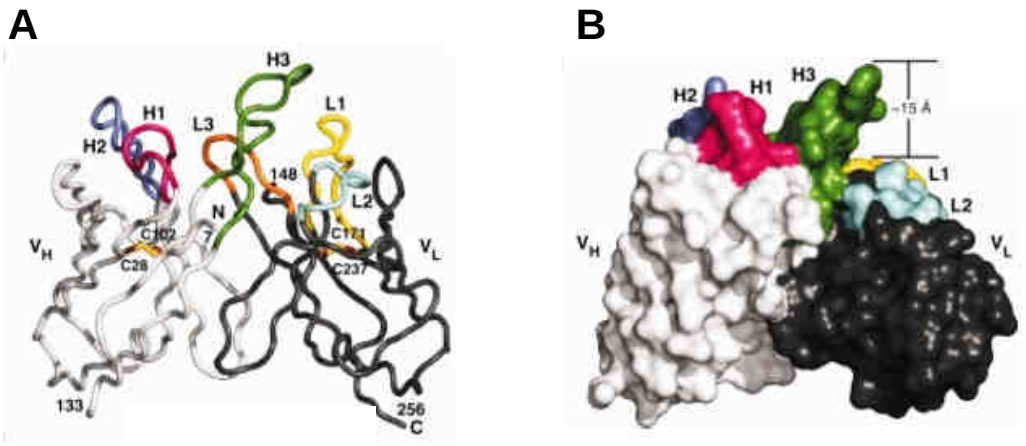


Abb. 1.8:
A: Cartoon-Darstellung des strukturellen Aufbaus für das 3B3 anti-HIV gp120 scFv-Fragment in VH-zu-VL-Orientierung, abgeleitet vom monoklonalen Antikörper b12. Farbig abgegrenzt sind die beiden variablen Domänen der schweren und leichten Kette, V_H (weiß) und V_L (schwarz) sowie deren hypervariable Regionen H1-3 (lila, blau, grün) und L1-3 (gelb, hellblau, orange), welche zusammen die CDRs 1-3 ausbilden.
B: Darstellung der Molekülоberfläche des 3B3 scFv-Fragments mit farbiger Hervorhebung und Maßstab-Angabe in Analogie zu A (beide Abb. mod. nach Clark und Walsh, 2009).

Eines der wesentlichen Ziele dieser Arbeit bestand in der Generierung, Expression und Charakterisierung von scFv-Fragmenten in Anlehnung an die monoklonalen anti-CEACAM-Antikörper T84.1 und T84.66 für einen potentiellen Einsatz zu diagnostischen bzw. therapeutischen Zwecken.

V_HH Einzeldomänenantikörper / Phagen-Display

Zu den kleinsten funktionalen Antikörperderivaten zählen die sogenannten Einzeldomänen-Antikörper oder V_HH-Fragmente, die sich von den Schwerkettenantikörpern der Cameliden ableiten. Wie zuvor erwähnt, besteht bei diesen der Antigen-bindende Fab-Teil pro Kette aus lediglich einer Domäne (V_HH) aufgrund des Fehlens einer C_H1-Domäne und der daraus resultierenden Abwesenheit von leichten Ketten. Die Molekülmasse der rekombinant isolierten V_HH-Domänen liegt bei nur 12-15 kDa, der durchschnittliche Moleküldurchmesser beträgt ca. 3 nm (Muyldermans *et al.*, 2009). Hinsichtlich der Bindungsfähigkeit wird für die V_HH-Domäne das Fehlen einer leichten Kette durch einige strukturelle Besonderheiten ausgeglichen wie das Auftreten verlängerter CDRs sowie teilweise einer zusätzlichen Disulfidbrücke; diese Modifikationen bewirken, dass in diesem Fall die Ausbildung funktionaler CDRs durch die Reste von nur einer variablen Domäne erfolgen kann (s Abb. 1.9).

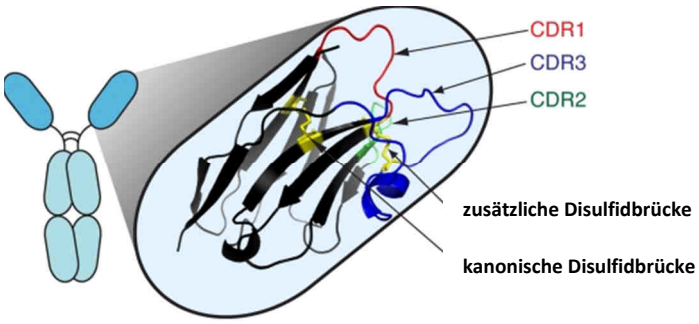


Abb. 1.9:
Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur einer V_HH-Domäne im Bändermodell bzw. der Ausbildung vollständiger CDRs durch die Reste einer einzelnen IgV-Domäne über teilweise verlängerte CDRs (rot, grün, blau) und eine zusätzliche Disulfidbrücke (gelb; Abb. mod. nach Wesolowski *et al.*, 2009).

Der Erhalt von neuen Einzeldomänen-Antikörpern bzw. V_HH-Domänen gegen bestimmte Zielstrukturen erfordert die Immunisierung von Spezies aus der Gattung der Camelidae (z.B. *C. dromedarius, L. glama*) mit dem entsprechenden Antigen und weiter die Isolierung der kodierenden Nukleinsäuren aus den Leukozyten. Da diese nur als polyklonales Gemisch isoliert werden können, ist die Klonierung des V_HH-Pools und die Anwendung eines geeigneten Selektionsverfahrens notwendig. Die inzwischen gebräuchlichste Form eines solchen Selektionsverfahrens ist das von G. P. Smith entwickelte und beschriebene *phage display* (Smith, 1985; s. Anhang, Kap. 7.5). Dieses Verfahren beinhaltet die Klonierung eines bestimmten Repertoires an Genen bzw. kodierenden Segmenten in einen Phagen-Vektor, in welchem die eingebrachten Segmente fusioniert in einem Leserahmen mit der Sequenz für ein Hüllprotein eines bestimmten Bakteriophagen vorliegen. Neben den filamentösen Phagen (fd, M13, f1) werden auch T4-, T7- und λ-Bakteriophagen verwendet.
Transformiert man den Vektor in einen geeigneten Bakterienstamm und co-infiziert diese anschließend mit einem sog. „Helferphagen“, produzieren die Bakterien entsprechende Phagenpartikel, welche die kodierten Segmente als Fusionsproteine mit dem Hüllprotein, meist pIII oder pVIII, auf ihrer Oberfläche tragen und im Inneren gleichzeitig die kodierende DNA aufweisen. Derartige „Immunbibliotheken“ oder *phage libraries* können eine nominelle Komplexität von bis zu 10^{11} verschiedenen Varianten erreichen. Deren Konstrukte erlauben die Selektion durch spezifische Bindung der Fusionsproteine an eine Zielstruktur. Dieses sogenannte *biopanning* wird meist in mehreren Runden durchgeführt, wobei mit den selektierten Phagen erneut Bakterien infiziert werden, welche wieder entsprechende rekombinante Phagen bilden (*phage rescue*). Die häufigste Form ist das sogenannte Festphasen-*panning*, bei dem das Antigen auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert ist. Daneben existieren weitere Möglichkeiten der Selektion wie z.B. ein *biopanning* an lebenden Zellen, welche die Zielstruktur auf ihrer Zellmembran tragen (Reyelt, 2008). Durch ein entsprechendes *screening*, z.B. im ELISA, lässt sich anschließend nachweisen, ob in den Selektionsrunden spezifische Phagenfusionsproteine angereichert wurden. Diese können nach Vereinzelung und rekombinanter Modifikation als lösliche Proteine ohne den Phagen exprimiert und für die gewünschten Zwecke eingesetzt werden.
Eines der wesentlichen Ziele dieser Arbeit bestand in der Immunisierung von Individuen der Spezies *L. glama* mit Proteinmolekülen der CEACAM-Familie von Zelloberflächenproteinen, um eine Immunantwort bezüglich der Schwerkettenantikörper zu provozieren und aus dem polyklonalen Repertoire durch Phagen-Display CEACAM-spezifische V_HH-Phagenfusions-proteine isolieren zu können.

1.2.7 Antikörper als zielgerichtetes Diagnostikum / Therapeutikum

Die Idee spezifischer bzw. maßgeschneiderter Therapiemöglichkeiten für bestimmte Erkrankungen des Menschen hat bereits eine über hundertjährige Geschichte. Zu den bedeutendsten Vordenkern dieser Theorien gehörte der deutsche Arzt und Immunologe Paul Ehrlich mit seinen Beiträgen zur Erforschung verschiedener Heilseren gegen u.a. Diphtherie sowie der allgemeinen Wertbestimmung von Immunseren. Auch geht der Begriff der Chemotherapie zurück auf die Arbeiten von Paul Ehrlich, in denen er versuchte, mit organischen Arsenverbindungen wie Arsphenamin (Salvarsan®) als eine „*Chemotherapia specifica*“ human-pathogene Erreger wie Typanosomen (u.a. Schlafkrankheit) und Spirochäten (u.a. Syphilis) gezielt zu therapieren. Zudem entwickelte er das Konzept der „Seitenkettentheorie“, nach der Erreger über Oberflächenstrukturen nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip an passende Strukturen der menschlichen Zellen binden. Dieses Konzept führte nach Abwandlungen zum heutigen Verständnis der Funktionsweise von Immunorezeptoren und Antikörpern (Silverstein, 2002; Strebhardt und Ullrich, 2008).
Bis heute wurden unter dem Hintergrund dieser historischen Theorien und dem wissenschaftlichen Fortschritt der letzten Jahrzehnte zahlreiche therapeutische, monoklonale bzw. rekombinante Antikörper für verschiedene Indikationen, u.a. bei Tumorerkrankungen, Infektionen, Entzündungsreaktionen sowie Autoimmun- und kardiovaskulären Erkrankungen entwickelt. Zu den bekanntesten Vertretern etablierter therapeutischer Antikörper zählen Bevacizumab (Avastin®) gegen VEGF bei der Indikation von Darmkrebs, Brustkrebs, NSCLC und Makuladegeneration, die gegen unterschiedliche EGF-Rezeptoren gerichteten Cetuximab (Erbitux®) und Trastuzumab (Herceptin®) bei verschiedenen malignen Tumoren und Infliximab (Remicade®) gegen TNFα bei Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, rheumatoider Arthritis und Psoriasis (Majidi *et al.*, 2009).
Neben der physiologischen Wirkung eines alleinigen mAk zu therapeutischen Zwecken wurden auch Antikörper-Konjugate mit bestimmten Agenzien wie Radionukliden, Toxinen, Chemotherapeutika und immunoregulatorischen Stimulantien entwickelt, die der Therapie und Diagnostik vor allem bei Tumorerkrankungen dienen sollen (Schrama *et al.*, 2006). Arcitumomab (CEA-Scan®) bezeichnet ein mit ^{99m}Tc-konjugiertes F(ab‘)$_2$-Fragment gegen CEACAM5 (CEA), zugelassen für die in *vivo*-Diagnostik des kolorektalen Karzinoms (Moffat *et al.*, 1996). Peldschus *et al.* konnten in einer 2010 publizierten Arbeit zeigen, dass ein mit SPIO (*superparamagnetic iron oxide*)-Nanopartikeln konjugierter mAk T84.1, der auch Gegenstand dieser Arbeit ist, auf *in vitro* behandelten Zellen der CEA-positiven Kolonkarzinomzelllinie HT29 eine spezifische CEA-abhängige MRT-Bildgebung erlaubt.
Therapeutisch bzw. diagnostisch verwendete Antikörper waren nicht von Beginn ihrer Entwicklung an erfolgreich einsetzbar bzw. unterliegen auch heute noch gewissen Problemen und Limitationen. Die ersten Antikörper zu diesen Zwecken zeigten nur begrenzte Wirksamkeit sowie unerwünschte Nebenwirkungen, die meist auf das Auslösen einer Immunantwort des Zielorganismus gegen die aus einer anderen Spezies stammenden Antikörper zurückzuführen waren. Erst Technologien zur Herstellung chimärer sowie humanisierter Antikörper ermöglichten überhaupt den effektiven Einsatz (Yazaki *et al.*, 2004). 2006 traten bei einer Phase-I-Studie des mAk TGN1412 gegen das CD28-Antigen auf T-Lymphozyten, der gegen Leukämien, Multiple Sklerose und Rheuma eingesetzt werden

sollte, bei Probanden massive Nebenwirkungen durch Zytokinstürme auf, worauf die Studie eingestellt werden musste (Suntharalingam *et al.*, 2006).

Aus derartigen Gründen sind besonders scFv-Fragmente und ihre Derivate das Objekt zahlreicher Studien für einen möglichen diagnostischen/therapeutischen Einsatz, da sie gegenüber den vollständigen monoklonalen Antikörpern verschiedene Vorteile aufweisen. Hierzu zählen eine sehr geringe Immunogenität durch Fehlen des Fc-Teils, eine höhere Internalisierungsrate in Tumorzellen sowie stärkere Retention nach Internalisierung. Gleichzeitig bleiben die positiven Aspekte der monoklonalen Antikörper wie hohe Spezifität und Affiniät für die scFv-Fragmente erhalten (Ahmad *et al.*, 2012). Oportuzumab monatox beispielsweise ist ein gegen EpCAM gerichtetes scFv-Fragment mit konjugiertem Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* und zeigte bei Patienten mit Harnblasenkrebs in Phase-II-Studien eine vorteilhafte Wirkung (Kowalski *et al.*, 2012). Ein weiteres therapeutisch in der Erprobung befindliches scFv-Konstrukt ist Blinatumomab, ein sogenanntes BiTE-Konstrukt (*bispecific T-cell engager*). Dieses verbindet maligne entartete B-Lymphozyten bei Patienten mit ALL und Non-Hodgkin-Lymphomen sowie im Rahmen der MRD (*minimal residual disease*) mit zytotoxischen T-Lymphozyten über CD3 und CD19, worauf die aktivierte T-Zelle die maligne B-Zelle zerstört (Topp *et al.*, 2011).

Auch V_HH-Domänen stehen als kleinste spezifische Antikörperderivate besonders im Fokus der diagnostischen und therapeutischen Forschung. Vaneycken *et al.* beschrieben 2011 ein V_HH-Fragment, das spezifisch das Mitglied der EGF-Rezeptor-Familie ERBB2 (Her2/Neu) bindet und sich für die bildgebende Diagnostik bei Brustkrebs eignet. V_HH-Domänen haben zudem eine besondere Eignung als spezifische Inhibitoren aufgrund ihrer geringen Größe bei gleichzeitig langen CDR-Schleifen, welche z.B. effektiv die aktiven Zentren bestimmter Enzyme blockieren können. Koch-Nolte *et al.* generierten 2007 eine V_HH-Domäne mit der Fähigkeit, die ekto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 in *vivo* spezifisch zu inhibieren, welche u.a. auch als bakterielles Toxin auftritt. Eine kürzlich publizierte Arbeit stellte ein Modell für transgene GFP-Organismen vor, in dem V_HH-Domänen als GBPs (*GFP binding proteins*) eingesetzt wurden (Tang *et al.*, 2013). Die Funktionalisierung der V_HH-Domänen mit weiteren Effektorproteinen ermöglichte hierbei den intrazellulären Aufbau von vielseitigen, biologisch aktiven Komplexen mit GFP als zentrales Gerüst, welche u.a. den Aufbau Zell-spezifischer Sonden sowie die gezielte Manipulation GFP-exprimierender Zellen durch sogenannte T-DDOGs (*transcription devices dependent on GFP*; s. Abb. 1.10) erlaubten. Diese ausgewählten Beispiele liefern einen Einblick in die überaus komplexen Einsatzmöglichkeiten von Antikörpern und rekombinanten Antikörper-Fragmenten, insbesondere für diagnostische und therapeutische Zwecke.

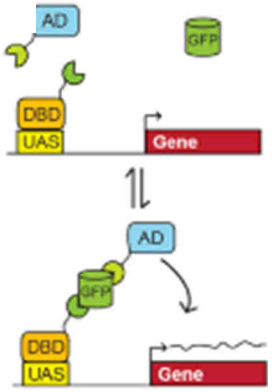


Abb. 1.10:
Schematische Darstellung des Aufbaus eines T-DDOGs (*transcription device dependent on GFP*) zur gezielten Manipulation GFP-transgener Zellen eines vielzelligen Organismus: Gegen verschiedene GFP-Epitope gerichtete V_HH-Fusionsproteine ermöglichen über einen GFP-basierten Komplex die Kontrolle der Genaktivität in einer Zielzelle. UAS = *upstream activating sequence*; DBD = *DNA binding domain*; AD = *activation domain* (Abb. aus Tang *et al.*, 2013).

1.3 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Generierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten bzw. -derivaten gegen Zelloberflächenproteine der CEACAM-Familie von Adhäsionsmolekülen. Verschiedene CEACAM-Moleküle stellen beim Menschen und einigen Primaten u.a. Tumor-assoziierte Antigene dar bzw. sind an komplexen biologischen Funktionen wie Zelladhäsion, Signaltransduktion, Angiogenese, Zellmigration und Immunmodulation beteiligt. In diesem Zusammenhang spielen Mitglieder der CEACAM-Familie eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen Krankheitsbildern wie z.B. malignen Tumorerkrankungen, Infektionen, akuten Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen.
Vor allem in der Funktion als Tumormarker und damit als Zielstruktur für diagnostische und therapeutische Ansätze in der Krebstherapie kommt den Molekülen CEACAM1 (BGP) und seinen Isoformen sowie CEACAM5 (CEA) eine besondere Bedeutung zu. Die Expression von CEACAM5 wird seit mehreren Jahrzehnten in Zusammenhang mit immunologischen Nachweisverfahren für die Diagnose und Verlaufskontrolle bei Krebserkrankungen von Kolon, Pankreas, Mamma und der Lunge bestimmt (Hammarström, 1999; Maxwell, 1999). Zudem wurde in verschiedenen, kürzlich veröffentlichten Arbeiten die Bedeutsamkeit von CEACAM1 für Diagnose und Therapie verschiedener maligner und anderer Erkrankungen herausgestellt und in diesem Zusammenhang für deren Umsetzung die Erforderlichkeit von spezifischen Antikörperfragmenten betont (Cianfriglia *et al.*, 2012; Fiori *et al.*, 2012).
In Anlehnung an diese Erkenntnisse bestand das wesentliche Ziel dieser Arbeit in der Herstellung und vergleichenden Charakterisierung von spezifischen monoklonalen Antikörpern sowie von Antikörperfragmenten gegen CEACAM1 und CEACAM5. Als CEACAM-spezifische monoklonale Antikörper wurden T84.1 (CEACAM *pan*-spezifisch) und T84.66 mAk (ausschließlich spezifisch für CEACAM5) aus den entsprechenden Hybridoma-Zelllinien exprimiert und hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit für verschiedene CEACAM-Moleküle und Isoformen untersucht. Für diese beiden mAk wurden weiter Antikörperfragmente in Form von Einzelketten-Antikörpern bzw. scFv-Fragmenten hergestellt; für ein von T84.66 mAk abgeleitetes scFv-Fragment lag ein entsprechender cDNA-Klon vor, der als Vorlage für die weitere rekombinante Erzeugung eines scFv-Fragments von T84.1 mAk auf Basis isolierter Gesamt-RNA der entsprechenden Hybridom-Zellen diente. Für die scFv-Fragmente sollte nun ein geeignetes Expressionssystem etabliert sowie deren Funktionalisierung durch eine nutzbare Modifikation erreicht werden, um ihre Bindungsfähigkeit für CEACAM-Moleküle im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern untersuchen zu können.
Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, nach CEACAM-Immunisierung von Cameliden (*L. glama*), die ein immunologisches Repertoire für spezielle Schwerketten-Antikörper besitzen, eine entsprechende Immunbibliothek zu erzeugen und mittels *phage display*-Technologie CEACAM-spezifische Einzeldomänen-Antikörper oder V_HH-Fragmente zu isolieren und zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper / Detektionsreagenzien

Primärantikörper

Antikörper:	Antigen:	Subklasse/ Spezies:	Bezogen von/ etabliert durch:
T84.1 mAb	CEACAM *pan*-spezifisch; bindet N-terminale Domäne versch. Mitglieder (GOLD5)	IgG1/ Murine (BALB/c) Hybridomzelllinie	C. Wagener / J.E. Shively (1983); Hybridomzelllinie von AG Nollau
T84.66 mAb	CEA (CEACAM5), Epitop auf A3/B3, nur in CEACAM5 (GOLD1)	IgG1/ Murine (BALB/c) Hybridomzelllinie	C. Wagener / J.E. Shively (1983); Hybridomzelllinie von AG Nollau
Anti c-Myc Antibody (9E10)	c-Myc-Epitop EQKLISEEDL (Myc-Tag)	IgG1/ Murine (BALB/c) Hybridomzelllinie	Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA
M13 bacterio-phage Polyclonal Antibody	M13 bacteriophage protein	Rabbit (Polyclonal)	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper/-reagenzien

Sekundärantikörper/-reagenz

Antikörper/Serum:	Hersteller:
Rabbit-Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	DAKO, Hamburg, Deutschland
HRP-Conjugated Streptavidin	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Monoclonal M13 Antibody (HRP), Mouse IgG1	Sino Biological Inc., Beijing, P.R. China
FITC (Fluorescein Isothiocyanate) Antibody, HRP conjugate, Host Species: Rabbit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
E-Tag Epitope Tag Antibody [HRP], Host Species: Goat (Bindungsepitop GAPVPYPDPLEPR)	Novus Biologicals, LLC., Littleton, CO, USA
GST Antibody, HRP Conjugate, Host Species: Goat	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Goat-anti-Llama IgG-heavy and light chain Antibody/HRP	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper/-reagenzien

2.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Bezugsquelle
AVB100 *E.coli* K12 strain	[MC1061 araD139 delta *(ara-leu)7696 delta(lac)l74 galU galK hsdR2(rK-mK+) mcrB1 rpsL(StrR)*]	Expression von bakt. scFv- u. Antigen-Konstrukten als biotinyliertes GST-Fusionsprotein	Avidity, Aurora, CO, USA
AVB101 *E.coli* strain	*hsdR, lon11, sulA1*	Isolation von p*BirAcm* mit *BirA* Biotin Ligase	Avidity, Aurora, CO, USA
One Shot® INVαF' Chemically Competent *E. coli*	F´ *end*A1 *rec*A1 *hsd*R17 (r_k^-, m_k^+) *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 φ80 *lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZY A-*arg*F) U169 λ^-	Klonierung/ Transformation von u.a. bakt. scFv- u. Antigen-Konstrukten	Invitrogen, Carlsbad, CA ,USA
TG1 Electroporation-Competent Cells	*sup*E *thi*-1 Δ(*lac-pro*AB) Δ(*mcrB-hsdSM*)5 (r_K^- m_K^-) [F´ *traD36 proAB lacI*^{q} *Z*Δ*M15*]	Generierung von Phagenbibliotheken u. Gewinnung rekombinanter Phagenpartikel	Stratagene, La Jolla, CA, USA

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders benannt, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), und Sigma Aldrich (München) mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.A.) bezogen und verwendet.
Das zum Ansetzen der verwendeten Nährmedien genutzte Wasser wurde aus einer Aufbereitungsanlage (Milli-Q Water System, Millipore, Billerica, MA, USA) in der Qualität von *Aqua bidest* bezogen. Pufferlösungen für proteinbiochemische/molekularbiologische Arbeiten wurden mit *Aqua ad injectabilia* (Baxter, Deerfield, IL, USA) zubereitet, ebenso wie Ansätze für Polymerase-Kettenreaktionen, Ligationen, Restriktionen und Primer-Verdünnungen.

2.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNA-abhängige DNA-Polymerasen:	
Hot Start Taq DNA Polymerase, 250 U	Qiagen, Hilden, Deutschland
PfuTurbo Hot Start DNA Polymerase, 500 U	Stratagene, La Jolla, CA, USA
DNA-Ligasen:	
T4 DNA Ligase, HC, 250 U	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

DNA-Restriktionsendonukleasen:	
Fast Digest BamHI	Fermentas/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Fast Digest EcoRI	Fermentas/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Fast Digest EcoRV	Fermentas/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Fast Digest NotI	Fermentas/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Fast Digest SalI	Fermentas/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Fast Digest SfiI	Fermentas/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Fast Digest XbaI	Fermentas/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Ribonukleasen:	
RNase A, 100 mg/mL	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA-abhängige DNA-Polymerasen:	
Superscript III Reverse Transkriptase, 10,000 U	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Glykosidasen:	
EndoH N-Glycosidase	New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA
PNGaseF N-Glycosidase	New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA
O-Glycosidase	New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA
Remove-iT PNGaseF mit Chitin-Bindedomäne	New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA
Sonstige Enzyme:	
bakt. Biotin-Ligase BirA	rekombinant exprimiert in *E. coli* / HEK293

Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Enzyme

2.1.5 Geräte

Gerätetyp:	**Gerätebezeichnung:**	**Hersteller:**
Analysenwaage:	AE 160	Mettler
Autoklav:	VARIOCLAV 135 S	HP Medizintechnik
Brutschrank:	Function Line	Heraeus
Blotting/Transferanlage:	TE 22 Mini Transfer Tank	Hoefer
	Power Pac 300	BioRad
CO_2-Inkubator:	NCO-17AIC	Sanyo
Digitalkamera:	EOS D30	Canon
Elektrophoreseanlage		
Agarosegele:	PerfectBlue Gelsystem Mini M+L	Peqlab
	GPS 200/400 Power Supply	Pharmacia
Elektrophoreseanlage		
SDS-PAGE-Gele:	XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen
	PowerEase 500 Power Supply	Invitrogen
Elektroporator:	Gene Pulser I System	BioRad
ELISA-Reader	GENios	Tecan Group

Filmkassetten Röntgenfilm:	Hypercassette	Amersham
Folienschweißgerät:	C-320	Hacona
Glasgeräte, diverse:	DURAN Flaschen, Gläser, Kolben	Schott
Heizblock:	Dri-Block DB-1	Techne Inc.
HPLC-Anlage:	Äkta prime	Amersham
Inkubationsbad:	GFL-1008	Ges. f. Labortechnik
Kippschüttler:	Duomax 1030	Heidolph
Kreisschüttler (Vortex):	Certomat MW	B. Braun Biotech
Laborwaagen:	MMX-612 u. MMX-2001	Denver Instruments
Lichtmikroskop:	Axiovert 135	Zeiss
Magnetrührer:	MR O	Heidolph
Mikropipetten:	Research plus	Eppendorf
	Multipette	Eppendorf
	Mehrkanalpipette 8-Kanal	Eppendorf
Mikrotiterplatten-Washer:	Model 1575 Immunowash	BioRad
Mikrozentrifuge:	Pico17	Heraeus/Thermo Scientific
Molecular Imager:	GelDoc™ XR+	BioRad
Neubauer Zählkammer	Auszählen von Zellen	Roth
Orbitalschüttler:	GFL-3005	Ges. f. Labortechnik
pH-Meter:	Inolab pH Level 1	WTW Messtechnik
Röntgenfilmentwickler:	Curix 60	AGFA/Siemens
Schüttelinkubator:	Orbital Shaker Incubator	TEQ
Spektrophotometer:	UV-160	Shimadzu
	ND-1000	Nanodrop
Sterilwerkbänke:	LaminAir HB 2448	Heraeus
	HERAsafe HS	Heraeus
Thermocycler (PCR):	PTC-200	MJ Research
Überkopfschüttler:	Reax 2	Heidolph
Ultraschall-Homogenisator:	Sonopuls HD2200	Bandelin
Ultrazentrifuge:	Sorvall RC5C	DuPont
	Optima LE-80K	Beckman
UV-Illuminator:	UVT2035	Herolab
Zellzähler:	Cedex XS	Innovatis
Zentrifuge Mehrzweck:	Megafuge 1.0R	Heraeus/Thermo Scientific

2.1.6 Medien

Für Kultivierung von Bakterienstämmen:

2-YT Medium	1.6% Trypton, 1% Hefeextrakt, 0.5% NaCl in H_2O bidest.
LB Medium (Miller)	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl in H_2O bidest.
Minimal Plate Medium	nach gemeinsamen Autoklavieren von 500 mL M9 Salt Solution und 500 mL H_2O bidest. mit 15 g Bacto-Agar wurden beide Flaschen nach Abkühlen vereint und 1 mL von 1 M $MgCl_2 \cdot 6H_20$, 1 mL von 1 M $CaCl_2 \cdot 2H_20$, 1 mL von 1 M Thiamin Hydrochlorid sowie 5 mL von 20% Glucose-Lösung zugegeben (alle steril filtriert); die Platten wurden sofort gegossen und bei 4°C gelagert
SOC Medium	kommerziell bezogen (Invitrogen)

Sofern nicht anders angegeben, wurde den Flüssigmedien für Bakterienkulturen bei Bedarf von entsprechenden Nährböden vor Autoklavieren pro Liter 15 g Bacto-Agar (1,5% w/v) zugesetzt.

Für eukaryotische Zelllinien:

DMEM (Dulbecco‘s modified Eagle Medium)	kommerziell bezogen (Invitrogen)
RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	kommerziell bezogen (Invitrogen)
Hybridoma Express Medium	kommerziell bezogen (PAA)

2.1.7 Kits

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
Montage Antibody Purification PROSEP-G Kit	Aufreinigung mAk aus Hybridoma-Überstand	Millipore
Pierce® Monomeric Avidin Kit	Affinitätschromatograph. Auf-reinigung biotinylierter Proteine	Thermo Scientific, ehemals Pierce
Pierce® EZ-Link NHS-PEG12-Biotin	*in vitro* Biotinylierung monoklonaler Antikörper	Thermo Scientific, ehemals Pierce
Pierce® FITC Antibody Labeling Kit	*in vitro* FITC-Markierung monoklonaler Antikörper	Thermo Scientific, ehemals Pierce
PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Extraktion großer Mengen Plasmid-DNA für z.B. Transfektion	Invitrogen
PureLink Quick Gel Extraction Kit	Aufreinigung von gewonnener/ behandelter DNA aus Agarosegel	Invitrogen

PureLink Quick Plasmid 250 Miniprep Kit	Extraktion kleinerer Mengen Plasmid-DNA für z.B. Klonierung	Invitrogen
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Aufreinigung von DNA aus PCR, Ligationen, Restriktionen etc.	Qiagen
Rneasy Mini Kit	Extraktion von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	Qiagen

Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten Kits

2.1.8 Primer

Klonierung bakt. T84.66 scFv

t84.66for (BglII): 5′- AAGATCTGGAGGAGAGACAGACACACTCCTGCTA -3′
t84.66rev (EcoRI): 5′- TGAATTCCTCCTGAGGAGACGGTGACTGA -3′

Klonierung eukaryot. T84.66 scFv:

IgkSalfor: 5′- AGTCGACACCATGGAGACAGACACACTCCTG -3′
mycCNotrev: 5′- AGCGGCCGCTCACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTC
TCCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCTT -3′

Generierung/Klonierung T84.1 scFv

a)
Mouse IgG Library Primer Set (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg)

b)
Q1for (BamHI): 5′- AGGATCCGACATTGTGCTGACCCAATCTC -3′
spacerrev: 5′- CGGAACCGCCCCCGGAGCCACCGCCGCTAGTACTGCCAT
TTATTTCCAACTTTGTC -3′
spacerfor: 5′- GGCTCCGGGGGCGGTTCCGGTGGGGGCGGCAGCAGCGAG
GTCCAGCTGCAGCAGTC -3′
E2rev (NotI): 5′- AGCGGCCGCCTATGAGGAGACGGTGACTGAGGTTC -3′

Klonierung scFv für optimierte enzymatische Biotinylierung (BAP-Tag)

IgkSalfor (s. oben)
BAPNotrev: 5′- AGCGGCCGCTTATTCGTGCCATTCGATTTTCTGAGCCTCGAA
GATGTCGTTCAGACCACCCCCGATCTTGATGAGACCCTG -3′

Klonierung Biotin-Protein-Ligase BirA aus AVB101 *E.coli* f. eukaryot. Co-Expression:

BirABamfor: 5′- AGGATCCGGAAAGGATAACACCGTGCCACTGAAATTG -3′
BirANotrev: 5′- AGCGGCCGCTCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTAT
GGGTATCCTTTTTCTGCACTACGCAGGGATAT -3′

Phage Diplay / Amplifikation VHH-Repertoire:

unifor (SfiI):	5′- AGGCCCAGCCGGCCCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG -3′
shortrev (NotI):	5′- AGCGGCCGCGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3′
longrev (NotI):	5′- AGCGGCCGCTGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3′

(S = C oder G; M = A oder C; R = A oder G; W = A oder T)

Sequenzierprimer:

T7 (pCR2.1):	5′- TAATACGACTCACTATAGGG -3′
M13rev (pCR2.1):	5′- GGAAACAGCTATGACCATG -3′
EBBfor (pEBB):	5′- TCGACGCCACCATGGAGA -3′
EBBrev (pEBB):	5′- CAGGGTCCACCCCTGGGA -3′
CNTBseqfor (pCANTAB):	5′- CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC -3′

2.1.9 Puffer und Lösungen

Blockierlösung

10% Magermilchpulver, 0.02% NaN_3 in DPBS

Cell Dissociation Buffer

kommerziell (Gibco)

ConA-Puffer (1x)

20 mM Tris pH 7, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ und 500 mM NaCl in H_2O bidest.

GSH-Puffer

0.31 g Glutathion (GSH) und 5 mL von 1 M Tris pH 8 ad 50 mL H_2O bidest.

KLB Lysis-Puffer

1 mM DTT, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, 10 mM β-Glycerolphosphat, 150 mM NaCl,
10 mM NaF, 1 mM Natriumorthovanadat, 0.2 mM Natriumpervanandat,
10 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM PMSF, 25 mM Tris/HCl pH 7.4,
1% Triton X-100 (BioRad) in H_2O bidest.

Lysis-Puffer (bakt. Expression)

DPBS mit 100 mM EDTA, 1% Triton, 1% Aprotinin, 1 mM PMSF und 1 mM DTT

M9 Salt Solution

42 mM Na_2HPO_4, 22 mM KH_2PO_4,18 mM NH_4Cl in H_2O bidest, pH 7.4

Probenpuffer (Elutionspuffer für Pulldown und anschl. SDS-PAGE)

65% (v/v) KLB, 10% (v/v) DTT-Lösung 1 M, 25% NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)

PBS-T (0,1%)

0.1% Tween® 20 in DPBS

TAE 1x Laufpuffer f. Agarosegele

2% 50x TAE Puffer (Merck) in H_2O bidest.

TBS-T (0,1%)

154 mM NaCl, 0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 0,1% Tween® 20 (Sigma Aldrich) in H_2O bidest.

TE-Dialysepuffer

1 M Tris pH 8 und 0.5 M EDTA pH 8 in H_20 bidest.

TES-Lösung

1 M Tris pH 8, 0.25 M EDTA pH 8, 5 M NaCl in H_20 bidest.

TN-Puffer

500 µL von 1 M Tris/HCl pH 7.4 und 3 mL 0.5 M EDTA pH 8 ad 10 mL H_20 bidest.

Transferpuffer Western Blots

5% 20x Transfer Buffer (Invitrogen), 20% Methanol, 1 mL Antioxidant (mit DMF, Invitrogen) in H_2O bidest.

2.1.10 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Nähere Bezeichung / Verwendung	Hersteller
ABTS Tabletten/Puffer	ELISA Farbsubstrat	Roche
Aqua ad injectabilia	H_2O f. sterile Pufferlösungen	Baxter
Bacto Agar	für Nährboden Bakterienkultur	BD Bioscience
Bacto Tryptone	für Bakterienkultur-Medien	BD Bioscience
Bacto Yeast Extract	für Bakterienkultur-Medien	BD Bioscience
Blotting-Pappe	Chromatographiepapier, 195 g/cm^2	Hartenstein
Bradford-Reagenz	Färbung/Quantifizierung von Proteinen	BioRad
Chitin Resin	Affinitätsmatrix f. Fusionsproteine mit Chitin-Bindedomäne	NEB
Chromatographiesäulen	Poly-Prep Chromatography Columns	BioRad
Colloidal Coomassie	Brilliant Blue, concentrated	Sigma
Combitips f. Multipette	div. Größen	Eppendorf
Cryotube Vials	1,8 mL	Nunc
DNA Detection Dye	EZ-Vision one	Amresco
DPBS, 500 mL	Dulbecco's phosphate buffered saline	Invitrogen
Drigalskyspatel, PP	Ausplattieren von Bakterien	Hartenstein

Einwegspritzen	div. Größen	B. Braun
Elektroporationsküvetten	LE, 1 mm gap	Peqlab
FACS-Röhrchen	Immuno Tube Maxisorp 70x11	Nunc
Fetal Bovine Serum	Zusatz für Zellkulturmedium	PAA
Ficoll Paque PLUS	Polymer f. Leukozytenextraktion	GE Healthcare
Glaskammereinschübe f. Zellmikroskopie	Millicell EZ SLIDE 8-*well* glass, sterile	Millipore
GSH-Sepharose	Resin, 5 mL	GE Healthcare
Größenausschluss-chromatographiesäulen	PD10 Desalting Columns	GE Healthcare
	Zeba Spin Desalt. Columns, 40K MWCO	Pierce
Kanülen, steril	Edelstahl, div. Größen	B. Braun
Kulturflaschen PS	75 cm^2, 175 cm^2	Sarstedt
	CELLine^{TM} CL-1000 f. Hybridoma	BD Bioscience
Kulturschalen PS	Nunclon delta, 245x245x25 mm	Nunc
	Rundschalen, 100x15 mm u. 150x20 mm	Sarstedt
M13KO7 Helper Phage	1mL; >10^{11} pfu/mL	Invitrogen
Magermilchpulver	Protein-Gemisch f. Blockierlösungen	Spinnrad
Mikrotiterplatten	F8 Maxisorp-Streifen plus Rahmen	Nunc
Mikrozentrifugen-Reaktionsgefäße, PP	0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf
Parafilm „M“	Laborfilm zum Versiegeln	Pechiney Plastic
Pasteurpipetten, Glas	230 mm	Carl Roth
Pipettenspitzen	div. Größen	Sarstedt
PVDF-Membran	Immobilon P	Boehringer
Reagenzröhrchen, PP	15 mL, 50 mL	Greiner bio-one
Röntgenfilme	Hyperfilm ECL 18x24 cm	GE Healthcare
Schutzhandschuhe, nitril	Protégé, L	Aurelia
SDS-PAGE Fertiggele plus Zubehör	NuPage Bis-Tris Gele, 1.0mm x 10 *wells*	Invitrogen
Stabpipetten, serologisch	5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt
Sterilfiltrationseinheiten	Filtropur, f. Spritzen, 0,2 µm	Sarstedt
	Filtropur, 500 mL, bottle top, 0,2 µm	Sarstedt
Zentrifugen-Filtrationssäulen	Micro-Spin Columns, 400 µL	Pierce
	Spin Columns, 5 mL	Pierce
Zentrifugen-Konzentrationsfilter	Amicon Ultra-15, 10k MWCO	Millipore

2.1.11 Vektoren

Vektor	Verwendung	Bezugsquelle
pAC4 BirA	bakt. Klonierung u. Expression in AVB100	Avidity
pBirAcm	Ursprungsvektor der BirA Biotin Ligase	Avidity
pCANTAB 5E	Vektor mit Amber Stop-Codon vor pIII-Gen f. Phage Display	Amersham
pCR2.1	Vektor mit T-Überhängen f. TA-Cloning	Invitrogen
pEBB Myc	f. eukaryot. Klonierung/Expression mit Myc-Tag	B.J. Mayer, Conneticut University Health Center

Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Klonierungs-, Expressions- u. sontigen Vektoren

2.1.12 Zelllinien und kultivierte Zellen

Bezeichnung	Organismus	Gewebe/Zelltyp	Referenz
HEK293	*Homo sapiens*	Nierenepithel, embryonal	Graham *et al.*, 1977 ATCC No. CRL-1573
HT29	*Homo sapiens*	Kolorektales Adenokarzinom	Fogh J, *et al.,* 1977 ATCC No. HTB-38
T84.1	*Mus musculus*	Murine Hybridom-zelllinie	Wagener *et al.*, 1989
T84.66A3. 1A.1F2	*Mus musculus*	Murine Hybridom-zelllinie	Wagener *et al.,*1983[a+b] ATCC No. HB-8747

Tab. 2.7: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zell- und Hybridoma-Linien

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Grundlegend erfolgte die Kultivierung von Bakterien je nach methodischen Erforderlichkeiten in Flüssigkulturen mit LB-Medium, 2YT-Medium, SOB- oder SOC-Medium. Als Selektionsantibiotikum wurden dabei 100 µg/mL Ampicillin und/oder 50 µg/mL Kanamycin eingesetzt, im Falle der mit Chaperon-Plasmiden co-transformierten AVB100 *E.coli* wurden zudem 20 µg/mL Chloramphenicol als zusätzliches Selektionsantibiotikum und 10 µg/mL Tetracyclin zur Induktion der Chaperon-Expression eingesetzt. In den Arbeitsschritten zum *phage display*-Verfahren wurde den Kulturen, die keine Phagen produzieren und freisetzen sollten, zusätzlich 2% (w/v) kristalline D-(+)-Glucose für den Induktorausschluss zugesetzt.

Standardmäßig wurden die Bakterien im Schüttelinkubator (160-220 rpm) bei 37°C kultiviert; bei Bedarf wie für einige Schritte des *phage display*-Verfahrens, z.B. Phagenproduktion, erfolgte die Kultivierung bei 30°C. Für die Kultivierung auf Nährböden wurde den o.g. Flüssigmedien 1,5% (w/v) Bacto-Agar (BD Bioscience) zugesetzt und nach gemeinsamen Autoklavieren/Erhitzen bei Wiederabkühlung auf ca. 55°C mit entsprechenden Zusätzen in Petrischalen gegossen, um dort bei vollständiger Abkühlung auszuhärten.
Mit rekombinanten Phagen zu infizierende, naive TG1 *E.coli* wurden im *phage display*-Ablauf auf Platten mit Minimalnährboden ohne Antibiotika über Nacht bei 37°C inkubiert und vereinzelte Klone weiter in 2YT-Medium ebenfalls ohne Selektionsantibiotikum kultiviert. Die Konzentration von Bakterienkulturen wurde über die optische Dichte bei 595 nm über ein UV/vis-Photospektrometer (Shimadzu) bestimmt; eine OD von 1.0 entspricht dabei einer Konzentration von $8 \cdot 10^8$ Bakterien pro mL.

2.2.1.2 Cryokonservierung von Bakterienkulturen

Für die Langzeitlagerung von Bakterienstämmen wurden Aliquots der entsprechenden Flüssigkulturen mit reinem, sterilen Glycerol (Sigma Aldrich, ≥99,9%) bis zu einer Endkonzentration von 20% (w/v) versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Transformation von kompetenten *E.Coli*-Bakterien

Für die gängigen Klonierungen wurden chemisch kompetente *E.coli*-Stämme durch Hitzeschock transformiert. Dabei wurden 100 µL-Aliquots der chemisch kompetenten Zellen von -80°C entnommen und auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µL (Konz. 100 ng/µL) der zu transformierenden rekombinanten Plasmid-DNA wurden die Zellen für 30 min auf Eis belassen und anschließend in ein vorgeheiztes Wasserbad bei 42°C überführt. Nach 40 s wurden die Zellen sofort wieder auf Eis umgesetzt, um nach etwa 5 min Abkühlzeit auf entsprechend gegossenen Nährböden mit einem Drigalskispatel ausgestrichen zu werden.
Für die Erzeugung der Primärbibliotheken im Rahmen des Phage Display wurden Aliquots von 40 µL elektrokompetenten TG1 *E.coli* (Stratagene) auf Eis aufgetaut, mit 2 µL (Konz. 100 ng/µL) zu transformierender Plasmid-DNA versetzt und anschließend mit dem Gene Pulser I System von Biorad bei 4°C und Einstellungen von 200 Ω, 25 µF und 17 kV/cm elektroporiert. Die so transformierten Zellen wurden sofort mit auf 37°C vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Rotation kultiviert, bevor sie auf Nährböden in 245x245x25 mm Platten ausgestrichen wurden. Statt einem Elektroporationsansatz wurden dabei 4 Ansätze nacheinander in 1 mL SOC aufgenommen und nach Inkubation ausplattiert, um die Komplexität der Bibliotheken nach Transformation zu erhöhen.

2.2.1.4 Bakterielle Proteinexpression und Aufreinigung

Für die bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen stand ein Expressionssystem in der AG Nollau zur Verfügung, in welchem die transformierten Kontrukte über den pAC4/BirA-Vektor in BirA-positiven AVB100 *E.coli* als biotinylierte GST-Fusionsproteine exprimiert wurden. Die bakterielle Expression von T84.66 scFv-Fragmenten und anderen rekombinanten Proteinen wurde aus 400 mL Großkulturen von transformierten AVB100 *E.coli* in LB-Amp vorgenommen. Diese wurde mit 20 mL einer über Nacht gewachsenen 40 mL-Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD von 0.5 bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden 40 µL einer 1M IPTG-Lösung und 15 min später 1,2 g kristalline L-Arabinose zur Induktion sowie D-(+)-Biotin in einer Endkonzentration von 50 µM zugegeben. Danach erfolgte die weitere Inkubation für 3 h. Die Kultur wurde auf Zentrifugenbecher aufgeteilt und für 10 min bei 4°C und 5000xg zentrifugiert (Sorvall). Die Bakterienpellets wurden auf Eis in 8 mL Lysis-Puffer resuspendiert und in einem Eis-Ethanol-Bad sonifiziert (2x 2,5 min, Einstellungen: 5 cycles, 40% Power) und die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 2500xg abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine Chromatographiesäule mit 1,5 mL GSH-Sepharose 4B pipettiert und in der geschlossenen Säule 30 min bei RT unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Nach Waschen mit 10 ml TN-Puffer wurden gebundene GST-Fusionsproteine mit 2,5 mL GSH-Puffer eluiert und das Eluat über eine PD-10 Säule in DPBS mit 20% Glycerol überführt. Die aufgereinigten Proteinproben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde auschließlich über Plasmid-Präparations-Kits vorgenommen. Je nach Bedarf wurde dabei das PureLink® HiPure Plasmid Miniprep oder Maxiprep Kit von Invitrogen verwendet. Die Präparation erfolgte dabei nach Angaben bzw. Protokoll des Herstellers.

2.2.1.6 Quantifizierung von (Plasmid-)DNA

Für DNA-Proben wurde die Konzentration am NanoDrop 1000 Spektrophotometer bestimmt. Die gemessene Absorption bei 260 nm wurde dabei in eine Konzentration umgerechnet und direkt durch die Software angegeben. Für weitere Arbeiten wurden nur DNA-Proben verwendet, die Quotienten für A_{260}/A_{280} von ≥1.8 und für A_{260}/A_{230} von 2.0-2.3 aufwiesen und daher als hinreichend qualitativ bzw. rein angesehen werden konnten.

2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in diesen Arbeiten vorgenommenen Amplifikationen von DNA durch PCR wurden mit *PfuTurbo* HotStart DNA-Polymerase (Agilent) nach u.g. Pipettieransatz und Reaktionsschema in den vorhandenen Thermocyclern durchgeführt.

Pipettieransatz Standard-PCR:

5 µL	10x *Pfu* Polymerase Puffer
5 µL	dNTP-Mix 4 mM (1 mM pro dNTP)
2,5 µL	*forward*-Primer (1:10-Verdünnung von 100 µM)
2,5 µL	*reverse*-Primer (1:10-Verdünnung von 100 µM)
2 µL	DNA-Matrize (pur oder vorverdünnt in dH_20)
1 µL	DMSO
1 µL	*PfuTurbo* Hotstart DNA-Polymerase
31 µL	dH_2O
50 µL	

PCR-Reaktionsschema:

96°C, 2 min	initiale Denaturierung/Strangtrennung
96°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, 45 s	} 40 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation
72°C, 10 min	finale Elongation
4°C, 5 min	

Falls das Amplicon in pCR2.1 ligiert werden sollte, wurden die benötigten A-Überhänge durch Zugabe von 1 µL Taq-Polymerase (1:10 in dH_20) und weitere Inkubation der Probe für 10 min bei 72°C generiert.

2.2.1.8 Restriktion von (Plasmid-)DNA

Für die Restriktion von DNA-Molekülen wurde in einem Gesamtvolumen von 20-30 µL pro µg DNA jeweils 1 U der benötigten Restriktionsenzyme zusammen mit dem vom Hersteller bereitgestellten Reaktionspuffer in entsprechender Konzentration eingesetzt. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte im Inkubator bei den vom Hersteller empfohlenen Temperaturen für 2-3 h.
Falls in einer Doppelrestriktion die benötigten Enzyme verschiedene optimale Reaktionstemperaturen und/oder ein unterschiedliches Reaktionsmilieu benötigten, wurde eine serielle Restriktion in zwei Schritten vorgenommen.

2.2.1.9 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Proben erfolgte in 1.0-1.5%-igen horizontalen Agarosegelen mit der hierfür vorhandenen Apparatur. Die DNA wurde dabei mit EZvision® one DNA dye (6x, Amresco) in dH_20 zusammen auf das Gel geladen und für 1 h mit 60-120 V aufgetrennt, weshalb der Einsatz von Ethidiumbromid nicht erforderlich war. Als Längenstandard wurden 1 kb DNA Ladder sowie 1 kb plus DNA Ladder von Invitrogen eingesetzt. Die Analyse und Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde über das GelDoc™ XR+ System von BioRad vorgenommen.
Die Aufreinigung von DNA-Spezies erfolgte durch Exzision der betreffenden Banden mit dem Skalpell unter UV-Licht und anschließende Aufarbeitung über das PureLink® Quick Gel Extraction Kit von Invitrogen nach zugehörigem Protokoll.

2.2.1.10 CsCl-Präparation von Plasmid-DNA

Mittels PureLink Hi-Pure Filter DNA Maxiprep Kit isolierte Plasmid-DNA wurde im Volumen von 1 mL (~ 4 mg) mit 2 mL TES-Lösung vermischt und 3 g CsCl zugesetzt. Pro mL Lösung wurden 80 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) zupipettiert und der Ansatz in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Mit einem entsprechenden Tara-Röhrchen wurde die Probe bei Raumtemperatur im 70.1 Ti-Rotor 48 h mit 41.100 rpm zentrifugiert. Von den zwei entstandenen Banden enthielt die untere das entsprechende Plasmid in *supercoil*-Konformation. Diese Fraktion wurde mit Hilfe einer Kanüle aus dem CsCl-Gradienten entnommen. Die DNA wurde zur Entfernung des EtBr mit 1x Vol. TE und 2x Vol. Isoamylalkohol versetzt und invertiert. Nach Phasenbildung wurde die obere Phase mit EtBr verworfen und die Prozedur wiederholt, bis die DNA farblos war.
Anschließend wurde die DNA-Lösung mittels Micro Dialysis Capsules QuixSep (Roth) gegen 1,5 L TE-Puffer pro mL DNA-Lösung bei 4°C über Nacht und am nächsten Tag erneut bei 4°C für 6 h dialysiert. Mit 2.5x Vol. EtOH abs. und 1/10x Vol. 3 M NaOAc pH 5.2 sowie 1 µL Glycogen pro mL wurde die DNA durch Inkubation bei -80°C für 30 min und Zentrifugation (20 min 13.000 rpm, 4°C) gefällt. Nach Waschen mit 70% EtOH wurde die pelletierte DNA bei 37°C getrocknet, in 100 µL TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.1.11 Aufreinigung und Konzentration von DNA-Proben

Sofern nach PCR, Restriktion o.a. Prozessierungen eine Aufreinigung oder Konzentration der entsprechenden DNA erforderlich war, wurde diese über das PCR Purification Kit von Qiagen nach Herstellerangaben vorgenommen. Eine Konzentration erfolgte dabei durch Elution mit einem um Faktor 5 kleineren Volumen als das der ursprünglich eingesetzten, vereinigten Ausgangsproben.

2.2.1.12 Ligation von DNA-Molekülen

Die Ligationsreaktionen für das kovalente Verknüpfen kompatibler DNA-Fragmente mit kohäsiven Enden wurden mit der T4 DNA Ligase von Invitrogen durchgeführt. Dazu wurden die DNA, T4 Ligase und der 5x konzentrierte Ligase-Puffer mit dH_2O auf ein Volumen von 10-20 µL gebracht und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.2.1.13 Sequenzierung von DNA-Proben

Für die Sequenzierung von DNA-Proben wurden Dienstleistungen der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) in Anspruch genommen. Die zu sequenzierenden Proben wurden als DNA-Primer-Mix entsprechend den *sample submission guides* übersendet. Die darauf erhaltenen digitalen Elektropherogramme wurden mit der Software FinchTV 1.4.0 betrachtet und ausgewertet.
Für eine weitere Prozessierung der Sequenzen (*in silico* Translation, Überführung der Sequenzen in revers komplementären Strang, Sequenzvergleich durch Alignment usw.) wurde auf die Funktionen der Datenbanken bzw. Webtools NCBI/BLAST, SMS2 (*sequence manipulation suite* Version 2) und ClustalW2 (EMBL-EBI) zurückgegriffen.

2.2.1.14 RNA-Gesamtextraktion aus Hybridom-Zellen und Lama-Leukozyten

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Hybridom-Zellen sowie isolierten Lama-Leukozyten erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden $1x10^7$ Hybridom-Zellen bzw. aus Lama-Vollblut präparierte Leukozyten nach Präparation aus frischem Vollblut eingesetzt. Diese wurden zur Homogenisierung mehrfach durch eine Kanüle (0.9 mm Ø) aufgezogen. Die extrahierte RNA wurde in 100 µL RNase-freiem H_2O aufgenommen und nach photometrischer Quantifizierung bei -80°C gelagert.

2.2.1.15 Quantifizierung von RNA

Die Quantifizierung extrahierter RNA wurde ebenso wie für DNA mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer durchgeführt. Über die Absorption A_{260} und den Extinktionskoeffizienten für RNA wurde die Konzentration bestimmt.

2.2.1.16 Reverse Transkription von RNA

Um aus der extrahierten RNA für weitere Arbeiten eine cDNA (*complementary* DNA) zu synthetisieren, wurde eine RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) für die RNA mit SuperScript® III Reverser Transkriptase von Invitrogen nach unten genanntem Schema in autoklavierten, RNase-freien Eppendorf-Tubes (0.1 mL) vorgenommen:

Pipettierschema RT-PCR:

1 µL randomisierte Oligonukleotid-Hexamere (eingestellt auf 150 ng/µL)
1 µL 10 mM dNTP-Mix (Invitrogen)
x µL Gesamt-RNA (~ 5 µg)
ad 13 µL dH_2O

Erhitzen auf 65°C für 5 min (Wasserbad; Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen), Abkühlen auf Eis, dann weitere Zugabe von:

4 µL 5x *first strand* (FS)-Puffer
1 µL DTT (0.1 M)
1 µL *RNase out*-Inhibitor
1 µL SuperScript® III RT
20 µL

RT-PCR-Reaktionsschema:

25°C, 5 min (Raumtemperatur)
50°C, 60 min
70°C, 15 min
anschließend Lagerung bei -20°C

Die RT-PCR wurde bei Raumtemperatur (25°C) und in entsprechend eingestellten Heizblöcken vorgenommen. Die anschließende Amplifikation mit V_HH- bzw. scFv-spezifischen Primern erfolgte wie die o.g. Standard-PCR, nur dass hier Taq-Polymerase (statt Pfu-Polymerase) verwendet wurde mit dem entsprechenden Puffer unter Zugabe von 1,5 µL $MgCl_2$ (50 mM) in einem Gesamtvolumen von 50 µL.

2.2.1.17 Konstruktion von V_HH-Immunbibliotheken für *phage display*

Nachdem von den immunisierten Lamas aus Vollblut Leukozyten und aus diesen wiederum die Gesamt-RNA isoliert worden war, wurden reverse Transkriptionen zu cDNA vorgenommen und hieraus das jeweilige V_HH-Repertoire spezifisch ampliziert. Über die kohäsiven Enden der Restriktionsschnittstellen von SfiI/NotI wurde der polyklonale V_HH-Pool anschließend in den Phagemid-Vektor pCANTAB 5E ligiert und durch Elektroporation in kompetente TG1 *E.coli* transformiert. Die transformierten TG1 wurden anschließend auf 2YT-Agar mit Ampicillin und Glucose in 245x245x25 mm-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Für beide Ansätze wurden von zufällig gewählten Klonen nach Plasmidpräparation DNA-Sequenzierungen angefertigt, um die Komplexität und Qualität der so erzeugten Primärbibliotheken zu bemessen. Nach mehreren Durchführungen der

Transformation und des Ausplattierens auf Selektionsnährboden wurden die Platten für jeden Ansatz im Weiteren mit 2YT (Ampicillin, Glucose) Flüssigmedium unter Verwendung eines Drigalskispatels abgespült und nach Bestimmung der Bakterienkonzentration und Zusatz von 20% Glycerol als Ausgangsmaterial für die Primärbibliotheken bei -80°C gelagert. Für die Produktion rekombinanter Phagen wurden 50 mL 2YT (Ampicillin, Glucose) mit 10^9 Bakterien der Primärbibliothek inokuliert und bei 30°C bis zu einer OD_{595} = 0.5 kultiviert. Bei Erreichen dieser OD wurde die Kultur in einem 1:1-Verhältnis mit $2 \cdot 10^{10}$ pfu M13KO7 Helferphage infiziert; hierzu wurde sie 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend abzentrifugiert (4.000xg, 10 min, RT) und in 500 mL 2YT (Ampicillin, Kanamycin) resuspendiert. Die Produktion der Phagen erfolgte bei 30°C über Nacht. Nach erneuter Zentrifugation der Kultur wurde der geklärte Überstand mit 100 mL einer Lösung aus PEG8000/NaCl versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation (10.000xg, 20 min, 4°C) wurden die Phagen pelletiert und nach Aspirieren und Trocknen mit 6 mL DPBS resuspendiert und sterilfiltriert (0.45 µm Filter). Die so gewonnene Phagenbibliothek wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.1.18 Festphasen-*biopanning* mit CEACAM-Proteinen und *phage rescue*

Für eine spezifische Selektion gegen CEACAM-reaktive Phagen-V_HH-Fusionsproteine wurden 100 µg rekombinantes CEACAM1 bzw. CEACAM5 in 3 mL PBS bei 4°C über Nacht an der Polystyrol-Oberfläche von Nunc-Immuno MaxiSorp StarTubes (75 x 12 mm) immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden mit 2% Milchpulver in DPBS für 2 h bei 37°C blockiert. Anschließend wurden ca. 10^{12} Phagen der Bibliotheken einer Negativselektion unterzogen. Dazu wurden diese in 3 mL DPBS mit 2% Milchpulver in einem nicht mit CEACAM beschichteten MaxiSorp Star Tube für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das CEACAM-beschichtete Reagenzgefäß mit DPBS gewaschen worden war, wurde die Phagenlösung in dieses überführt und 2 h bei RT unter Rotation inkubiert. Nach Entfernen nicht gebundener Phagenpartikel durch Waschen (25x PBS-T, 25x DPBS) wurden naive TG1 *E.coli* mit den verbliebenen Phagen infiziert. Dazu wurden 3 mL einer naiven TG1-Kultur, die parallel ohne Selektionsantibiotikum bis zu einer OD_{595} = 0.3 gewachsen war, direkt im *panning*-Gefäß für 1 h bei 37°C unter Rotation inkubiert.
Nach Infektion wurden die Bakterien auf 2YT-Agar mit Ampicillin und Glucose ausplattiert und über Nacht bei 30°C kultiviert. Die erhaltenen Kolonien wurden erneut abgespült, in Aliquots cryokonserviert und als entsprechende Kultur wie oben beschrieben wieder mit M13KO7 Helferphagen infiziert, um die anschließend produzierten V_HH-Phagen-Partikel einer weiteren Selektionsrunde durch Festphasen-*panning* zu unterziehen. Insgesamt wurden drei Selektionsrunden mit einer fortlaufenden Minimierung des präsentierten CEACAM-Antigens (1. Runde: 100 µg; 2. Runde: 50 µg; 3. Runde: 20 µg) durchgeführt. Von den Platten nach der dritten Runde wurden Kolonien mit selektierten Klonen isoliert und ihre Plasmid-DNA sequenziert. Für V_HH-tragende selektierte Klone wurden erneut Phagen-Fusionspartikel wie oben beschrieben produziert und auf mögliche CEACAM-Spezifität im ELISA vermessen.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und Lyse humaner (Tumor-)Zelllinien

Aliquots von Langzeitkulturen der genannten Zelllinien wurden aus einem N_2-Lagertank entnommen und auf Eis langsam aufgetaut, um anschließend in 8 mL DMEM (mit 10% FCS, Penicillin/Streptamycin, für Hybridoma mit 4 mM L-Glutamin) aufgenommen, in eine Polystyrol-Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert zu werden. Nach ca. 3 h wurden die Zellen in neues Medium überführt, um das DMSO zu entfernen. Für einige Tage wurden die Zellen unter regelmäßiger Beobachtung durch das Lichtmikroskop im Inkubator belassen. Bei ausreichend konfluentem Wachstum wurden diese unter Verdünnung auf mehrere Kulturschalen (Polystyrol, d = 15 cm) überführt. Dazu wurden 20 mL auf 37°C erwärmtes DMEM in jede neue Schale vorgelegt und das Medium aus der alten Flasche abgesaugt. Letztere wurde nun mit 5 mL PBS (ebenfalls 37°C) gespült, um die Trypsin-hemmenden Faktoren des Serums zu entfernen. Nach Absaugen des PBS wurden 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben und die Zellen unter Schwenken vom Boden der Flasche abgelöst. Zu den gelösten Zellen wurden 8 mL DMEM gegeben und nach Durchmischen der Lösung davon 1 mL in das vorgelegte Medium auf 15 cm-Kulturschalen oder in frische Kulturflaschen überführt. Neben laufender Beobachtung am Lichtmikroskop und weiterer Subkultivierung nach dem gleichen Verfahren wurde für die Zellen in Kultur alle 3-5 Tage das Medium gewechselt, je nach Farbumschlag des alten Mediums und optischem Zustand der Zellen.
Für die Lyse wurden die auf 15 cm-Schalen kultivierten Zellen nach Erreichen einer optisch ermittelt ausreichenden Zellzahl 2-fach mit 4°C kaltem PBS gespült und die Schalen anschließend sofort auf Eis gestellt. Auf den Zellrasen jeder Schale wurde 1 mL eisgekühlter KLB-Lysispuffer pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Schale gelöst. Die gelösten Zellen von gleicher Art aus mehreren Kulturen wurden in einem 15 mL Polypropylen-Reagenzgefäß gesammelt und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Tubes mit den lysierten Zellen für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Hieraus wurde eine Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels eines spektrometrischen Bradford-Lowry-Assays für die Lysate vorgenommen und diese als 1 mL-Aliquots in Mikroreagenzgefäßen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.
Die Hybridoma-Zellen wurden für die Produktion von monoklonalen Antikörpern in CELLine™ CL-1000 Bioreaktoren unter Adaption an Hybridoma Express Medium nach Angaben der Anbieter/Hersteller kultiviert. Alle an den Zellen durchgeführten Arbeiten bis zur Zugabe des Lysis-Puffers wurden ausschließlich unter der Sterilbank sowie mit sterilen Arbeitsmitteln vorgenommen.

2.2.2.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen und eukaryotische Expression

Die wie oben beschrieben kultivierten HEK293-Zellen wurden für eine transiente Transfektion und die anschließende sekretorische Expression bei einer lichtmikroskopisch bestimmten Konfluenz von etwa 70% auf 9 mL frisches DMEM-Medium ohne Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin umgesetzt, um eine Störung der Transfektion durch diese Komponenten zu vermeiden. Parallel wurden in 20 mL reinem DMEM in einem PP-Reagenzgefäß 500 µL des Transfektionsreagenzes TurboFect (Thermo Scientific) sowie 300 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA gelöst und nach Mischen durch Invertieren 30 min bei RT inkubiert, um die Komplexierung der DNA mit dem kationischen Polymer zu ermöglichen. Von dieser Lösung wurde je 1 mL auf 20 Schalen mit HEK-Zellen und 9 mL vorgelegtem DMEM gegeben und diese für 4 h bei 37°C und 5% CO2 im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurde die Transfektionslösung aspiriert und die transfizierten Zellen auf 10 mL frisches DMEM ohne FCS umgesetzt. Die sekretorische Expression des Transfektionsprodukts über den SV40-Promoter in pEBB erfolgte über 60 h im Brutschrank (37°C, 5% CO_2), anschließend wurden die Überstände gesammelt und sterilfiltriert (Filtropur, 500 mL) sowie mit 0,02% NaN_3 versetzt und bis zu weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert.
Bei Co-Transfektion mit BirA/pEBB wurde entsprechend mit einem Gemisch der Plasmid-DNA für die scFv-Fragmente und für die Biotinligase BirA im Verhältnis 4:1 transfiziert. Zudem wurde für alle Ansätze, bei denen während/nach Transfektion eine enzymatische Biotinylierung erfolgen sollte, über den Expressionszeitraum das vorliegende Medium mit D-(+)-Biotin in einer Endkonzentration von 100 µM ergänzt.

2.2.2.3 Immunhistochemische Färbung CEACAM-positiver Zelllinien

Für die vergleichende IHC-Fluoreszenzfärbung mit anti-CEACAM mAk und scFv-Fragmenten wurden Zellen der CEACAM-positiven Kolonkarzinomzelllinie HT29 nach Umsetzen auf Glaskammereinschübe für Zellmikroskopie (Millipore) bis zur Semikonfluenz in DMEM mit FCS und Penicillin/Streptomycin kultiviert und nach Aspirieren des Mediums mit 4 µg/mL biotinylierten mAk (T84.1, T84.66 und polyklonalem Maus IgG) bzw. mit 5 µg/mL der biotinylierten scFv-Fragmente T84.1 und T84.66-BAP/BirA in frischem DMEM für 1 h bei RT inkubiert. Als Kontrollen für die spezifische Bindung der scFv-Fragmente wurden zusätzlich Zellen mit 5 µg/mL nicht biotinylierten mAk T84.1 und T84.66 für 15 min bei RT behandelt, bevor für diese Ansätze die scFv-Fragmente zugegeben wurden.
Nach dreifachem Waschen der Zellen mit DPBS wurden diese in 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert und nachfolgend mit 2% BSA und 5% FCS in DPBS 1 h bei RT blockiert. Der Bindungsnachweis erfolgte durch FITC-konjugiertes Streptavidin (1:10.000 in DPBS, 1 h bei RT). Nach Waschen der Zellen wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit 4,6-Diamino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) vorgenommen. Die Detektion der Immunhistochemie wurde am Fluoreszenzmikroskop am Institut für Klinische Chemie (AG Horst) unter identischen Einstellungen (Fluoreszenzintensitäten, Detektorempfindlichkeit) vorgenommen. Das Überlagern der Signale von FITC und DAPI identischer Zellareale erfolgte in *Adobe Photoshop*.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Lama-Immunisierung / Gewinnung von Immunseren aus Lama-Vollblut

Für das Hervorrufen einer CEACAM-spezifischen Immunantwort wurden je einem Individuum der Gattung *L. glama* innerhalb des Departments für Nutztierwissenschaften (Universität Göttingen) in 7 Schritten über einen Zeitraum von 26 Wochen stets 500 µg aufgereinigtes rekombinantes CEACAM1 bzw. CEACAM5 injiziert. Dazu wurde das Antigen in 675 µL sterilem DPBS aufgenommen und vor der Immunisierung mit 875 µL des Adjuvans Stimune (Fa. Prionics, Zürich, Schweiz) versetzt, so dass ein effektives Immunisierungsendvolumen von 1.5 mL vorlag. Die Immunisierungen wurden durch Frau Dr. med. vet. Eva Moors (Universität Göttingen) vorgenommen.
Die Blutentnahme zur Aufbereitung von Immunseren erfolgte 14 bis 18 Tage nach jedem Immunisierungsschritt. Aus der *v. jugularis externa* entnommenes Blut wurde nach Koagulation bei Raumtemperatur zur Abtrennung des Blutkuchens zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm). Die Blutabnahme wurde ebenfalls durch Frau Dr. Eva Moors vorgenommen. Die Seren wurden in 2 mL Mikroreagenzgefäße aliquotiert und tiefgekühlt (-20°C) in die Labore des Instituts für Klinische Chemie (UKE) verschickt. Hier wurden die Seren weiter bei -20°C bzw. für die unmittelbare Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.3.2 Isolierung von Lama-Leukozyten aus Vollblut

Nach Entnahme aus der Halsvene wurde dem heparinisierten Lamablut ein gleiches Volumen an DMEM-Medium zugesetzt, die Mischung auf 10 mL Ficoll-Paque PLUS in einem 50 mL PP-Reagenzröhrchen geschichtet und für 40 min bei Raumtemperatur mit 500 xg zentrifugiert. Während die Erythrozyten am Boden des Röhrchens unter dem Ficoll pelletiert wurden, setzten sich die Leukozyten oberhalb der Ficoll-Schicht ab. Der Leukozytenring wurde durch Pipettieren aufgenommen, die enthaltenen Leukozyten in DPBS gewaschen und direkt für die RNA-Präparation eingesetzt (s. Kap. 2.2.1.14).

2.2.3.3 Fraktionierung der cIgG-Subtypen aus Lamaseren

Die Fraktionierung der cIgG-Subtypen aus Lamaseren wurden nach den Arbeiten von Hamers-Casterman *et al.* (1993) bzw. van der Linden *et al.* (2000) durch kombinierte serielle Affinitätschromatographie mit Protein G/Protein A vorgenommen. Dabei erfolgte die Affinitätschromatographie an Protein G über eine HiTrap Protein G HP-Säule (GE Healthcare) mittels HPLC (Äkta Prime). Die cIgG-Subtypen cIgG2 (*long hinge*) und cIgG1 (conv.) wurden mit 0.15 M NaCl und 0.58% AcOH bei einem pH von 3.5 bzw. mit 0.1 M Glycin bei pH 2.7 eluiert. Der dabei erhaltene Durchlauf wurde weiter in einer mit Protein A-Agarose (Thermo Scientific) beladenen Säule inkubiert und die gesamte cIgG3-Fraktion (*short hinge*) mit 0.1 M Glycin bei pH 2.7 eluiert. Die Eluate wurden mit 1 M Tris pH 8.9 neutralisiert und bei 4°C gelagert.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Konzentrieren und Pufferwechsel von Expressionsüberständen

Von 20 Platten nach oben beschriebener Transfektion und Expression in HEK293-Zellen wurden nach Sammeln und Sterilfiltration ca. 200 mL an Zellkulturüberstand erhalten. Diese wurden durch Zentrifugationsfiltration in Amicon Ultra-15 (MWCO: 10k) Filtrationseinheiten um ca. Faktor 20 aufkonzentriert. Weiter wurden für den Austausch des Zellkulturmediums gegen DPBS/0,02% NaN_3 je 2,5 mL Konzentrat auf zuvor 5x mit DPBS äquilibrierte PD-10 Säulen gegeben und der Durchlauf verworfen, um anschließend die auf der Säule verbliebenen Proteinbestandteile mit 3,5 mL DPBS/NaN_3 in einem 15 mL PP-Reaktionsgefäß aufzufangen. Die so aufgearbeiteten Proben wurden bei 4°C gelagert.

2.2.4.2 Bestimmung von Proteingesamtmengen durch Bradford-Lowry-Assay

Um eine Vergleichbarkeit der einzusetzenden Zellextrakte sowie der Proteinpräparationen nach prokaryotischer/eukaryotischer Expression und Aufreinigung zu erreichen, wurde die Proteingesamtkonzentration in einem spektrometrischen Bradford-Lowry-Assay bestimmt. Dazu wurde zuerst ein BSA-Standard von 10 µg/µL (1 g in 100 mL PBS) erstellt und in einer Doppelbestimmung als Verdünnungsreihe in PBS (15 µg; 7,5 µg; 3,75 µg; 1,875 µg; 0,9375 µg; je in 1 mL mit 20% Bradfordreagenz) photometrisch gegen PBS/Bradford-Reagenz als Leerwert vermessen. Ebenso wurden 1 µL, 2 µL und 5 µL (auch je in 1 mL PBS mit 20%Bradford-Reagenz), unverdünnt oder aus 1:10-Vorverdünnungen in PBS, der jeweiligen Proben als Doppelbestimmung vermessen und der Mittelwert der über die Standard-Eichkurve errechneten Werte als durchschnittliche Protein-Gesamtkonzentration für die Probe angegeben.

2.2.4.3 SDS-PAGE von Proteinproben und Zelllysaten

Um Proteinproben für weitere Behandlung/Analyse gelelektrophoretisch auftrennen zu können, wurden entsprechende Probenvolumina zusammen mit Endkonzentrationen von 25% NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x, Invitrogen) und 10% einer 0,5M DTT-Lösung letztendlich mit KLB-Puffer auf ein Endvolumen von 40 µL gebracht und im Wasserbad bei 96°C für 5 min denaturiert. Nach kurzem Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit dem NuPAGE®-System von Invitrogen (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele, denaturierender MES SDS Running Buffer, 200 V const. für 55 min bei RT, mit den Längenstandards PageRuler™ von Fermentas bzw. Novex™ Prestained Protein Ladder von Invitrogen) aufgetrennt.

2.2.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Für eine Färbung der Proteinfraktionen nach SDS-PAGE wurden die Gele in PS-Schalen mit einer wässrigen Lösung aus 40% Methanol und 7% Eisessig für 1 h bei RT fixiert. Anschließend wurden 40 mL Brilliant Blue Colloidal Coomassie (Sigma Aldrich) zusammen mit 10 mL Methanol auf das Gel gegeben und dieses so für 1 h bei RT angefärbt. Nach Waschen mit einer Lösung aus 10% Eisessig und 25% Ethanol für ca. 30 s wurde das Gel in 25% Methanol entfärbt. Die Gele wurden per Flachbettscanner (CanoScan) digitalisiert und über *Adobe Photoshop* als *JPEG*-Bilddateien archiviert.

2.2.4.5 Western Blot-Analysen

Für die Western Blotting-Experimente in diesen Arbeiten wurden die aufgetrennten Proteinfraktionen in einem Elektrotransfer (400 mA const. für 3 h bei 4°C in Transferpuffer) auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für mind. 1 h oder über Nacht bei 4°C in 50 mL TBS-T mit 10% (w/v) Milchpulver unter Schütteln blockiert. Nach der Blockierung wurden die Membran in TBS-T gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper (sofern nicht anders angegeben, eingestellt auf 1 µg/mL in 1 mL TBS-T) behandelt, in dem sie in Folie eingeschweißt mit der Antikörper-Lösung für 1-3 h bei RT unter Rotation inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran für 15 min 5x in TBS-T gewaschen. Von einer gleichzeitig angesetzten Verdünnung des gegen die jeweilige Spezies gerichteten, mit dem Enzym HRP (*horse raddish peroxidase*) konjugierten Sekundärantikörpers oder anderen Detektionsreagenzes (zwischen 1:20.000 und 1:100.000 in TBS-T; s. Tab. 2.2) wurden 20 mL zusammen mit 2 mL einer 10% Milchpulver/TBS-T-Lösung (außer bei Streptavidin-HRP) in eine 15 cm-Polystyrolschale vorgelegt und die Membran für 1 h bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert.
Nach Waschen (insgesamt 12 Waschschritte mit TBS-T über 2 h) wurde die Membran für 1 min mit einem 1:1-Gemisch der Komponenten 1 und 2 aus dem ECL-Kit von GE Healthcare überschichtet. Die ECL-Lösung wurde verworfen und die Membran in eine Film-Kassette für die Detektion mit Röntgenfilmen (GE Healthcare) überführt. In einem Dunkelraum wurden die Filme für verschiedene Belichtungszeiten - abhängig von der Ausprägung der Signalstärke – auf die Membranen in der Kasette gelegt und anschließend mit einem Entwicklungsgerät für Röntgenfilme der Firma AGFA entwickelt. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden mit einem CanoScan Flachbettscanner digitalisiert und nach Import in Adobe Photoshop als *JPEG*-Bilddateien gespeichert. Digitalisierte Western Blot-Ergebnisse wurden auch zur Semiquantifizierung von Proteinen genutzt, in dem der Schwärzungsgrad ihrer Signale durch das Programm *ImageJ* (NIH) erfasst und mit denen eines entsprechenden Standards auf der gleichen Membran verglichen wurden.

2.2.4.6 *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA)

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten ELISA-Experimenten wurden in den Vertiefungen der verwendeten Mikrotiterstreifen bzw. -platten (MaxiSorp Nunc Immuno Module) in 100 µL Carbonat-Puffer (pH 9.3) die betreffenden Protein-Proben bei 4°C über Nacht auf einem Orbitalschüttler immobilisiert; für direkte ELISA wurde der jeweilige Primär- oder *capture*-Antikörper (z.B. bei M13 Phagentiterbestimmung), für indirekte ELISA das betreffende Antigen (z.B. in Bindungsassays für anti-CEACAM Antikörperspezies) an die Polystyrol-Oberfläche immobilisiert. Nach 3x Waschen mit 250 µL TBS-T wurde bei direkten ELISA das Antigen und bei indirekten ELISA der Primärantikörper in verschiedenen Konzentrationen in PBS mit 0,01% (w/v) BSA im Endvolumen von 100 µL für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach Waschen wurde der HRP-konjugierte Sekundär- oder Nachweisantikörper mit 100 µL einer entsprechenden Vorverdünnung in TBS-T ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert. Die mit TBS-T erneut 5x gewaschenen Platten wurden mit 200 µL ATBS-Fertiglösung (Sigma Aldrich) pro Vertiefung belegt und bei Lichtausschluss und 37°C in einem entsprechenden Schüttelinkubator platziert. Zu verschiedenen Messzeitpunkten wurde die Absorption bei 405 nm im GENios ELISA Reader (Tecan) detektiert und in EXCEL-Dateien aufgezeichnet bzw. die Daten graphisch ausgewertet.
Die kompetitiven Experimente liefen auf Basis eines indirekten ELISA ab, bei dem im Gesamtvolumen von 100 µL neben dem Primärantikörper auch ein entsprechender Kompetitor inkubiert wurde. Der Sekundärantikörper wies dabei den Kompetitor in konstanter Konzentration bzw. dessen Verdrängung nach. Die Ausgleichskurven für die Messwerte basieren auf nicht-linearer Regression mit Hilfe des in MS EXCEL integrierten Add-Ins SOLVER.

2.2.4.7 Biotinylierung bzw. FITC-Markierung monoklonaler Antikörper

Die Biotinylierung von Aliquots der Antikörperpräparationen wurde mit EZ-link NHS-PEG12-Biotin (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben vorgenommen. Die biotinylierten mAk wurden anschließend über Monomeric Avidin-Agarose (Thermo Scientific) aufgereinigt, mit Biotin eluiert und die Eluate mit ZEBA Spin Columns (Thermo Scientific) in DPBS überführt.
In gleicher Form erfolgte die FITC-Markierung der mAk mit dem Pierce® FITC Antibody Labeling Kit (Thermo Scientific). Die FITC-markierten mAk wurden über eine Ausschlusschromatographiesäule gereinigt und anschließend in DPBS überführt.

2.2.4.8 Immunpräzipitation von CEACAM-Molekülen aus Zelllysaten

Für die Immunpräzipitation von CEACAM-Molekülen wurden 50 µL des jeweiligen HEK293-Zelllysats mit 2.5 µg T84.1 mAk versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Daraufhin wurden der Reaktionslösung 20 µL der Protein G plus-Agarosesuspension (Santa Cruz) zugesetzt und für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach wurden die Ansätze bei 500xg für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und das Präzipitat 4x mit 200 µL DPBS gewaschen und zur Elution von einer Pierce® Spin Column nach

Erhitzen bei 96°C für 4 min in 50 µL Probenpuffer durch Zentrifugation in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Eluate der Immunpräzipitationen wurden bis zur Verwendung für SDS-PAGE und Western Blot-Analysen bei -20°C gelagert.

2.2.4.9 Pulldown von biotinylierten Proteinen mit HiCapacity Streptavidin-Agarose

Ähnlich der Immunpräzipitation wurden auch Pulldowns mit HiCapacity Streptavidin-Agarose (Thermo Scientific) auf biotinylierte Proteine wie die scFv-Fragmente aus Expression mit enzymatischer Biotinylierung vorgenommen. Hierbei wurden 50 µL der scFv-Probe mit 50 µL DPBS auf ein Volumen von 100 µL gebracht, von dem 10 µL als Referenzprobe entnommen wurden. Zu den verbleibenden 90 µL wurden 10 µL Streptavidin-Agarose-Suspension gegeben und die Lösung 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet aus Streptavidin-Agarose mit gebundenen biotinylierten Proteinen in 40 µL Probenpuffer bei 96°C für 4 min erhitzt und der Überstand in einem frischen Reaktionsgefäß erneut mit 10 µL Streptavidin-Agarose versetzt sowie 2 h bei 4°C inkubiert. 10 µL des verbliebenen Überstands wurden nach Zentrifugation (10 min, 500xg, 4°C) als weitere Referenzprobe entnommen und die abgekochten Probenpuffer-Eluate von den Agarose-Partikeln durch Zentrifugation über eine Pierce® Micro Spin Column getrennt. Auch hier wurden die gewonnenen Fraktionen bis zum weiteren Einsatz bei -20°C gelagert.

2.2.4.10 Deglykosylierung von Proteinen

Der Abbau von glykosidischen Modifikationen an Proteinen wurde in diesen Arbeiten mit den angegebenen Glycosidasen (NEB, s. Tab. 2.4, Kap. 2.1.4) sowie dem Remove-iT™ PNGaseF-System in Zusammenhang mit Chitin-konjugierter Affinitätsmatrix von NEB nach Angaben des Herstellers vorgenommen.

2.2.4.11 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem CEACAM1 über ConA-Sepharose

Der Überstand von HEK293-Zellen nach transienter Transfektion und Expression von rCEACAM1 wurde über Amicon Ultra-15 (MWCO: 10.000) aufkonzentriert und die enthaltenen Proteine über PD-10 Säulen in ConA-Puffer überführt. In einer Poly Prep Column (BioRad) wurde 1 mL ConA-Sepharose 4B (GE Healthcare) 20x mit ConA-Puffer gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C unter Rotation mit den Glykoproteinen inkubiert. Nach Auffangen des Durchlaufs wurde die ConA-Sepharose 3x mit ConA-Puffer gewaschen und anschließend mit je 1 mL 1 M Methyl-α-D-Mannopyranosid eluiert. Nach Charakterisierung der Eluatfraktionen im Western Blot wurde die Eluate vereinigt, durch Größenausschlussfiltration konzentriert und über PD-10 in DPBS überführt. Die Konzentration wurde durch Bradford-Assay bestimmt und die Reinheit des Endprodukts per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Anschließend wurde die Probe bei 4°C gelagert.

2.2.4.12 Affinitätschromatographische Aufreinigung für biotinylierte Proteine über Monomeric Avidin-Agarose

Die Aufreinigung durch Biotinylierung modifizierter Proteine erfolgte über das Monomeric Avidin Kit (Pierce®, Thermo Scientific) in unterschiedlichen Maßstäben nach Angaben des Herstellers. Je nach Maßstab der Aufreinigung erfolgte eine Elution in 6-12 Schritten mit einzelnen Elutionsvolumina zwischen 300 µL und 1.2 mL des Biotin Blocking & Elution Buffers.

2.2.4.13 Affinitätschromatographische Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern über Protein G

Die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern erfolgte über das Montage Antibody Purification PROSEP-G Kit (Millipore) nach Angaben des Herstellers.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion und Charakterisierung der monoklonalen anti-CEACAM Antikörper T84.1 und T84.66 aus Hybridom-Kulturen

3.1.1 Darstellung der monoklonalen Antikörper nach Expression und Aufreinigung

Eine wichtige Voraussetzung dieser Arbeit war es, konventionelle monoklonale Antikörper gegen CEACAM1 (CC1) und CEACAM5 (CC5) zu generieren sowie deren Bindungsfähigkeit zu validieren, um im Weiteren mit diesen Antikörpern quantitative Messplattformen aufzubauen. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper (mAk) wurden die entsprechenden Hybridom-Zelllinien innerhalb des Instituts für Klinische Chemie (AG Nollau) langzeitkultiviert, dabei laufend die gesammelten Zellkulturüberstände durch Größenausschlussfiltration aufkonzentriert und die monoklonalen Antikörper T84.1 als auch T84.66 affinitätschromatographisch über Protein G aufgereinigt sowie anschließend in DPBS/0,02% NaN_3 umgepuffert. Die so erhaltenen Antikörperpräparationen wurden einer photometrischen Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay unterzogen. Zur Charakterisierung wurden die exprimierten Antikörper durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt sowie mittels Western Blot-Analyse durch HRP-konjugiertes, polyklonales Kaninchen-anti-Maus Serum nachgewiesen (s. Abb. 3.1).

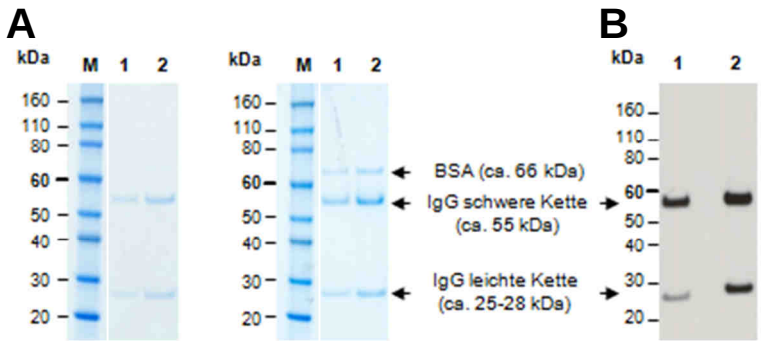


Abb. 3.1:
Charakterisierung der aus entsprechenden Hybridom-Kulturen exprimierten monoklonalen Antikörper T84.1 und T84.66 durch Coomassie-Färbung und Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE.
A: Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE für die präparierten mAk T84.1 (links) und T84.66 (rechts). Geladen wurden je 0,5 µg (Spur 1) und 1 µg (Spur 2). Eine Färbung konnte für die schweren (ca. 55 kDa) sowie leichten Ketten (ca. 25-28 kDa) der Immunglobuline sowie in der Präparation von T84.66 (rechts) für BSA (ca. 66 kDa) beobachtet werden. (M) Marker: Novex Prestained Protein Ladder.
B: Western Blotting nach SDS-PAGE der präparierten mAk T84.1 (Spur 1) u. T84.66 (Spur 2), geladen wurde je 1 µg der mAk, der Nachweis erfolgte mit HRP-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:40.000). Die Expositionszeit des gezeigten Exponats betrug 1 min.

Hierbei konnten unter denaturierenden Bedingungen die schweren und leichten Ketten mit den für Immunglobuline typischen Laufweiten dargestellt werden. Im Western Blot zeigten beide mAk einen Größenunterschied von ca. 2-3 kDa für sowohl die leichten als auch die schweren Ketten. Die affinitätschromatographische Aufreinigung führte nicht in jedem Fall zu einer vollständigen Depletion der Proteine aus dem Kulturüberstand: Die zusätzliche Bande in der Präparation von T84.66 mAk bei ca. 65 kDa entspricht sehr wahrscheinlich BSA aus Kälberserum.

3.1.2 Nachweis der Funktionalität und Spezifität der anti-CEACAM mAk im Western Blot mit unterschiedlichen Zelllysaten

Zum Funktionsnachweis als auch zur Validierung der Antigen-Spezifität für die gewonnenen anti-CEACAM mAk T84.1 und T84.66 wurden diese nach SDS-PAGE und Western Blotting auf Gesamtzellextrakten von humanen Granulozyten, HT29-Zellen und HEK293-Transfektomen mit CEACAM1 und CEACAM5 inkubiert (s. Abb. 3.2). Der Nachweis erfolgte durch weitere Inkubation mit HRP-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus Serum.

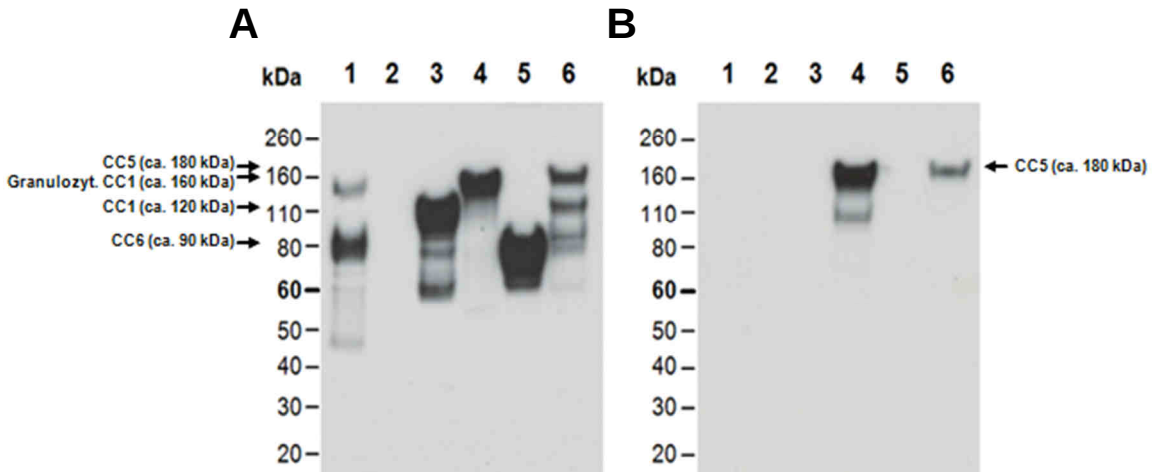


Abb. 3.2:
Western Blot-Analyse verschiedener Gesamtproteinextrakte CEACAM-exprimierender Zellen durch Inkubation mit CEACAM-spezifischen monoklonalen Antikörpern nach SDS-PAGE. Geladen wurde je eine Proteingesamtmenge von 50 µg pro Spur aus humanen Granulozyten (1), untransfizierten HEK293 (2), HEK293-Transfektomen mit CC1 (3), CC5 (4) und CC6 (5) sowie aus HT29-Zellen (6).
(A) Inkubation der Membran mit dem monoklonalen Antikörper T84.1 (Konzentration:1 µg/mL).
(B) Inkubation der Membran mit dem monoklonalen Antikörper T84.66 mAk (Konzentration: 1 µg/mL).
Detektiert wurde mit HRP-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:40.000). Die Expositionszeit der dargestellten Exponate betrug je 3 min. Die jeweils erkannten CEACAM-Spezies sind bei entsprechender Laufweite durch Pfeile markiert und benannt: CC5 (ca. 180 kDa, Spur 4 und 6), granulozytäres CC1 (ca. 160 kDa, Spur 1), CC1 (120 kDa, Spur 3 und 6), CC6 (ca. 90 kDa, Spur 1, 5 und 6)

In Übereinstimmung mit publizierten Daten erkannte der für CEACAM-Mitglieder *pan*-spezifische T84.1 mAk (Abb. 3.2 A) alle vorhandenen CEACAM-Spezies, darunter verschiedene Isoformen von CEACAM1 sowie die Proteine CEACAM5 u. CEACAM6 (Wagener *et al.*, 1983[a]; Wagener *et al.*, 1989; Bogoevska *et al.*, 2005). In untransfiziertem HEK293-Zellen (Abb. 3.2, Spur 2), in denen Mitglieder der CEACAM-Familie nicht exprimiert wurden, waren keine Signale nachweisbar. T84.66 mAk (Abb. 3.2 B) besitzt eine ausschließliche Spezifität für CEACAM5 und zeigte entsprechend nur Signale in den Lysaten von CC5-transfizierten HEK293-Zellen (Abb. 3.2, Spur 4) und der CC5-positiven Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Abb. 3.2, Spur 6; Wagener *et al.*, 1983[a]).
In weiterer Übereinstimmung mit publizierten Daten zeigte sich, dass in humanen Granulozyten neben der ausschließlichen Expression einer besonders stark glykosylierten Isoform mit langer zytoplasmatischer Domäne für CEACAM1 (~160 kDa; Singer *et al.*, 2002; Bogoevska *et al.*, 2005) auch in hohem Maße CEACAM6 exprimiert wurde (Abb. 3.2 A, Spur 1; Blumenthal *et al.*, 2007). In HT29-Lysat wurde erwartungsgemäß neben CEACAM5 auch

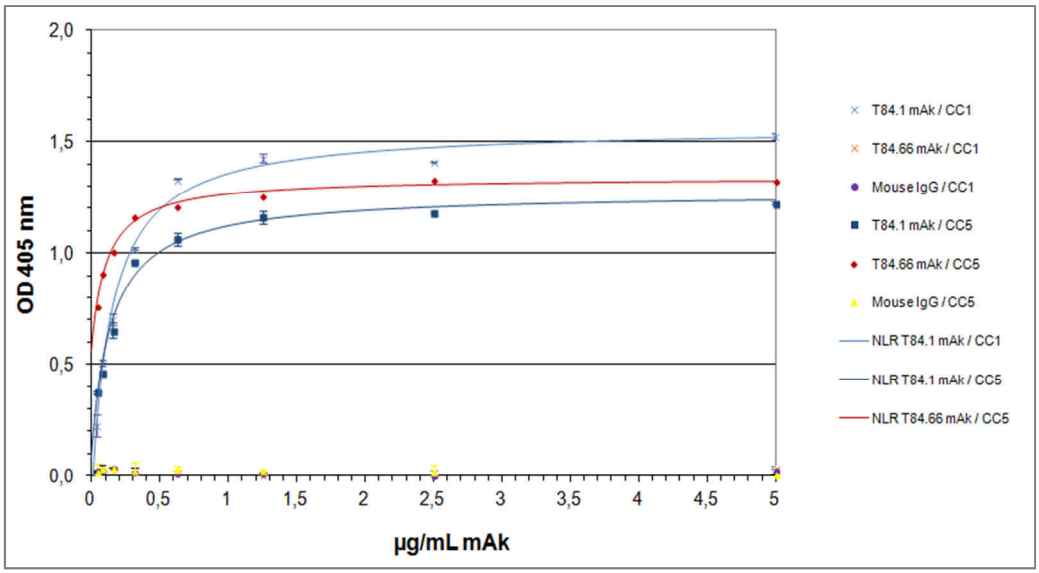
die Expression von CEACAM1 und CEACAM6 (Abb. 3.2 A, Spur 6; Kirshner *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Glas *et al.*, 2011) nachgewiesen.
Von den in dieser Arbeit exprimierten und charakterisierten monoklonalen Antikörpern mit CEACAM-Spezifität wurde T84.1 mAk in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Heine (Institut für Anatomie, UKE) weiter eingesetzt, um die diagnostische Relevanz von CEACAM-Antigenen anhand von Modellen für verschiedene Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Die Resultate aus diesen Arbeiten wurden bereits publiziert (Heine *et al.*, 2011).

3.1.3 Etablierung eines indirekten ELISA zum Nachweis der spezifischen Bindung für monoklonale anti-CEACAM Antikörper

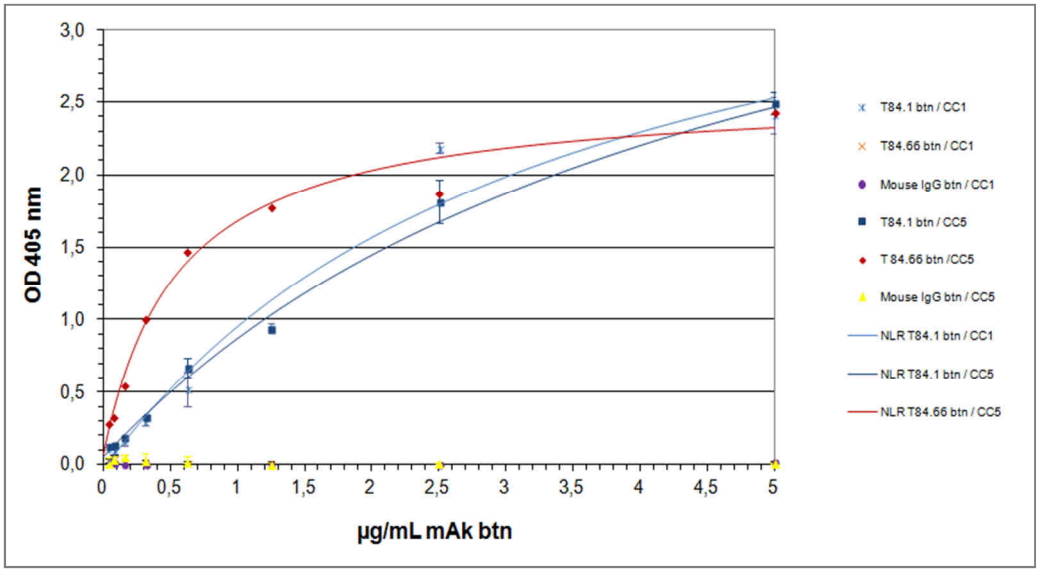
Zur Quantifizierung von Wechselwirkungen zwischen den hier generierten Antikörpern und den zur Verfügung stehenden, rekombinanten CEACAM-Antigenen wurde die konzentrationsabhängige Bindung für beide mAk an CC1 und CC5 in einem indirekten ELISA vermessen. Die Absorption bei 405 nm wurde anschließend gegen die eingesetzte Menge des jeweiligen mAk graphisch aufgetragen (Abb. 3.3).
Dabei wurden zum einen die nicht-markierten mAk eingesetzt und über HRP-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper nachgewiesen. Parallel wurden zuvor mit Biotin (btn) und FITC markierte Antikörper verwendet, wobei der Nachweis ihrer Bindung über die jeweilige Modifikation erfolgte. Die btn- und FITC-markierten Antikörper wurden aus der AG Nollau zur Verfügung gestellt. Sowohl für die unmarkierten als auch die markierten mAk konnten Bindungskurven mit Sättigung bei steigender Antikörperkonzentration erhalten werden. Auf Basis der Bindungskurven wurde beobachtet, dass T84.66 mAk an CC5 bei geringen Konzentrationen stets einen stärkeren Anstieg der Bindungssignale verzeichnete als T84.1 mAk, was sehr wahrscheinlich auf die verschiedenen Epitope und damit verbundenen unterschiedlichen Bindungsaffinitäten bzw. -kinetiken der beiden mAk zurückzuführen ist. Zudem fand für keines der CEACAM-Antigene eine Bindung durch polyklonale Maus-Immunglobuline statt, welche als Kontrolle eingesetzt wurden, unabhängig vom Vorhandensein bzw. der Art einer Modifizierung. Die über ihre Modifikation nachgewiesenen mAk waren unter vergleichbaren Bedingungen mit deutlich höherer Sensitivität detektierbar, was sich in höheren Absorptionswerten bei vergleichbaren Detektionszeiten widerspiegelte.

Abb. 3.3:
Quantitative Vermessung der Bindung von mAK T84.1 und T84.66 sowie von polyklonalem Maus-Immunglobulin als Kontrolle an CEACAM-Antigene im indirekten ELISA. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 0.04 µg/mL bis 5 µg/mL (A u. B) sowie 0.02 µg/mL bis 2.5 µg/mL (C) eingesetzt. Der Nachweis wurde mit HRP-markierten anti-Maus (A) sowie anti-FITC (C) Sekundärantikörpern bzw. Streptavidin-HRP (B) vorgenommen (Verdünnung: je 1:5.000). Nach Inkubation mit ABTS erfolgte nach 50 min (A) bzw. nach 10 min (B u. C) die photometrische Auswertung bei 405 nm. Pro *well* der Mikrotiterplatte wurden 0.5 µg/mL rekombinantes CC1 bzw. CC5 immobilisiert. In (C) dienten zusätzlich 0.5 µg/mL BSA als Kontrolle, da kein FITC-markiertes polyklonales Maus-Immunglobulin zur Verfügung stand. Alle Messungen wurden im Duplikat durchgeführt, die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.
(A) Nachweis nicht markierter Antikörper mit HRP-konjugiertem polyklonalen Kanichen anti-Maus Immunglobulin
(B) Nachweis biotinylierter Antikörper über HRP-markiertes Streptavidin
(C) Nachweis FITC-markierter Antikörper über HRP-markierten anti-FITC-Sekundärantikörper
Für die Absorptionswerte der Kontrollen trat eine weitgehende Überlappung auf; die jeweils anderen Kontrollen zeigten einen vergleichbaren Verlauf wie polyklonales Maus-IgG1 an CC5 (A u. B) bzw. T84.66-FITC an CC1 (C).

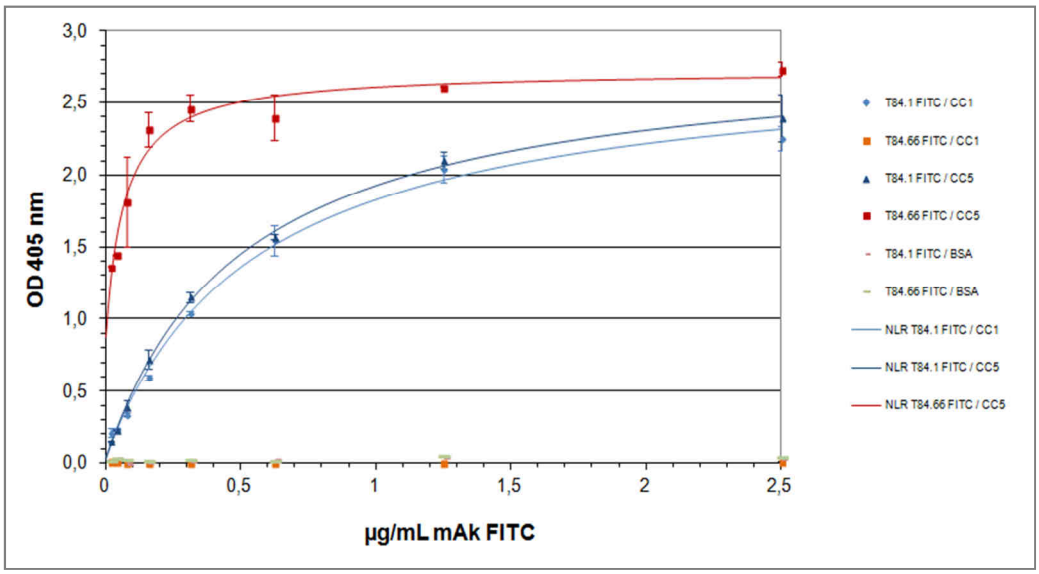
A


OD 405 nm
µg/mL mAk
T84.1 mAk / CC1
T84.66 mAk / CC1
Mouse IgG / CC1
T84.1 mAk / CC5
T84.66 mAk / CC5
Mouse IgG / CC5
NLR T84.1 mAk / CC1
NLR T84.1 mAk / CC5
NLR T84.66 mAk / CC5

B


OD 405 nm
µg/mL mAk btn
T84.1 btn / CC1
T84.66 btn / CC1
Mouse IgG btn / CC1
T84.1 btn / CC5
T 84.66 btn /CC5
Mouse IgG btn / CC5
NLR T84.1 btn / CC1
NLR T84.1 btn / CC5
NLR T84.66 btn / CC5

C


OD 405 nm
µg/mL mAk FITC
T84.1 FITC / CC1
T84.66 FITC / CC1
T84.1 FITC / CC5
T84.66 FITC / CC5
T84.1 FITC / BSA
T84.66 FITC / BSA
NLR T84.1 FITC / CC1
NLR T84.1 FITC / CC5
NLR T84.66 FITC / CC5

Für einen direkten Vergleich des Einflusses der verschiedenen Nachweissysteme, Sekundärantikörper bzw. Streptavidin, auf das Detektionsverhalten eines Antikörpers wurde in einem weiteren indirekten ELISA exemplarisch T84.1 mAk mit und ohne Biotinylierung auf CEACAM1 inkubiert und anschließend vergleichend über HRP-konjugiertes Streptavidin bzw. Kaninchen-anti-Maus Serum nachgewiesen (Abb. 3.4).

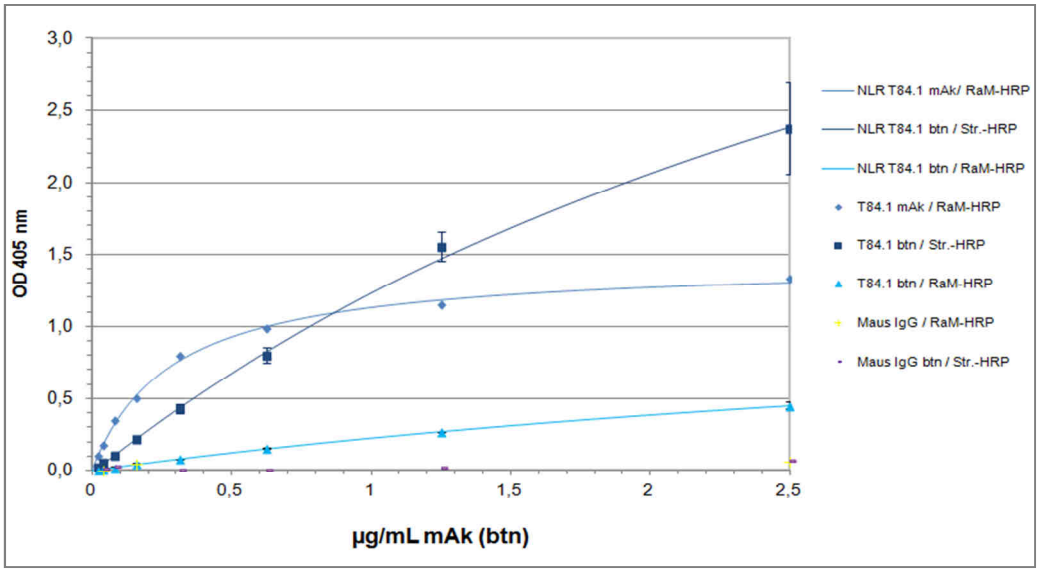


Abb. 3.4:
Quantitative Vermessung von mAk T84.1 sowie von polyklonalem Maus-Immunglobulin als Kontrolle, beide mit und ohne Biotinylierung (btn), im indirekten ELISA. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 0.02 µg/mL bis 2.5 µg/mL eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit HRP-markierten Kaninchen-anti-Maus Sekundärantikörper (RaM-HRP) sowie mit HRP-konjugiertem Streptavidin (Str.-HRP) bei Verdünnungen von je 1:5.000. Pro *well* der Mikrotiterplatte wurden 0.5 µg/mL CC1 immobilisiert. Nach Inkubation mit ABTS erfolgte nach 20 min die photometrische Auswertung bei 405 nm. Alle Messungen wurden im Duplikat durchgeführt, die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.
Hellblaue Bindungskurve: Bindung von T84.1 mAk an CC1 im Nachweis mit polyklonalem anti-Maus Sekundärantikörper.
Dunkelblaue Bindungskurve: Bindung von biotinyliertem T84.1 mAk an CC1 im Nachweis über HRP-markiertes Streptavidin.
Türkisfarbene Bindungskurve: Bindung von biotinyliertem T84.1 mAk an CC1 im Nachweis mit polyklonalem anti-Maus Sekundärantikörper.
Für die Absorptionswerte der Kontrollen mit biotinyliertem und nicht markiertem polyklonalen Maus IgG trat eine weitgehende Überlappung auf.

Das Experiment bestätigte in Einklang mit den vorigen Assays (vgl. Abb. 3.3 A u. B) die unterschiedliche Entwicklung der Absorptionswerte für den Nachweis von nicht-biotinyliertem T84.1 mAk an CC1 durch anti-Maus Sekundärantikörper (Abb. 3.4, hellblaue Bindungskurve) bzw. von biotinyliertem T84.1 mAk mit HRP-konjugiertem Streptavidin (dunkelblaue Bindungskurve) bei gleichen Antikörperkonzentrationen. Die Detektion von biotinyliertem T84.1 mAk mittels anti-Maus Sekundärantikörper wurde gegenüber nicht markiertem mAk bei gleichen Konzentrationen durch die Markierung mit Biotin offenbar beeinträchtigt, wie der Verlauf der türkisfarbenen Bindungskurve mit deutlich niedrigeren Absorptionswerten zeigte.

3.1.4 Etablierung eines kompetitiven ELISA und Untersuchung der Verdrängung von FITC-markierten anti-CEACAM mAk

Auf den Grundlagen der indirekten ELISA-Experimente wurde eine kompetitive Assay-Plattform zur späteren Vermessung der in dieser Arbeit hergestellten Antikörper-Fragmente aufgebaut. Hierbei konkurrierte eine konstante Konzentration von FITC-markiertem mAk an immobilisiertem CEACAM-Antigen mit variablen Konzentrationen des nicht markierten mAk bzw. eines entsprechenden Antikörperderivats. Die Bindung eines nicht markierten Antikörpers konnte so aus der Änderung des Absorptionssignals für den FITC-markiertem mAk abgeleitet werden. Die konstanten Konzentrationen an FITC-markiertem mAk waren hierbei so eingestellt, dass eine möglichst große Änderung der Absorption bei Änderung der Konzentration von effektiv gebundenem mAk in einer gut detektierbaren Größenordnung beobachtet werden konnte: Für T84.1 mAk-FITC wurden in Anlehnung an die indirekten ELISA-Experimente (s. Abb. 3.3 C) entsprechend 0.5 µg/mL und für T84.66 mAk-FITC 0.1 µg/mL als konstante Konzentration eingesetzt.

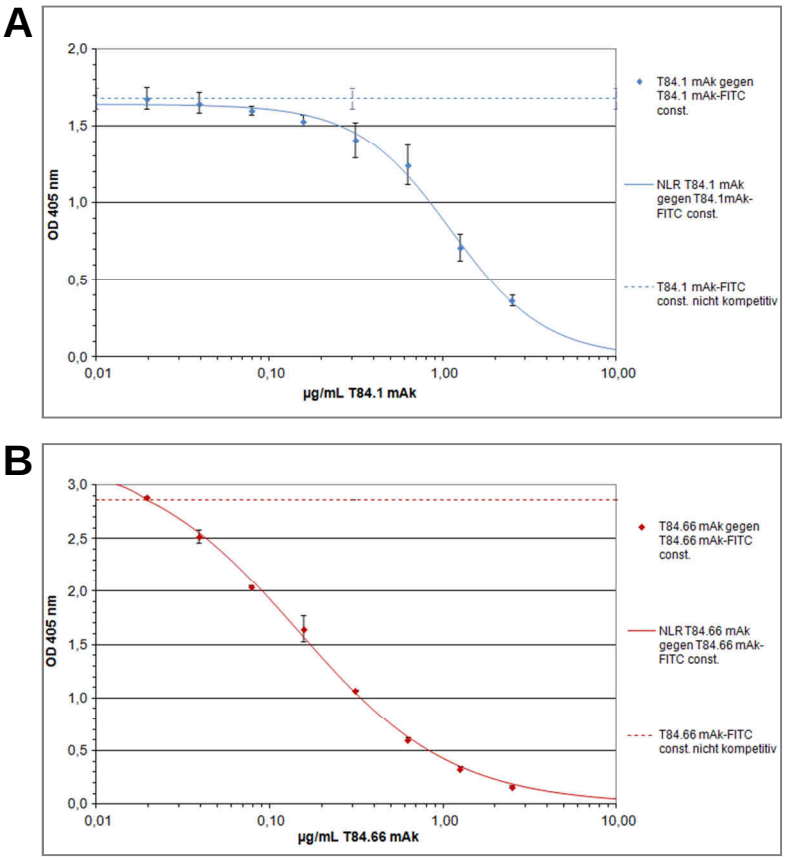


Abb. 3.5:
Quantitative Vermessung der Verdrängung einer konstanten Konzentration der FITC-markierten mAk T84.1 und T84.66 durch ansteigende Konz. von nicht markierten mAk T84.1 und T84.66 im kompetitiven ELISA. Die nicht markierten Antikörper wurden in Konzentrationen von 0.02 µg/mL bis 2.5 µg/mL eingesetzt. Pro *well* der Mikrotiterplatte wurden 0.5 µg/mL CC1 (A) bzw. CC5 (B) immobilisiert. Der Nachweis wurde mit HRP-markiertem anti-FITC Sekundär-antikörper (Verdünnung: 1:5.000) vorgenommen. Nach Inkubation mit ABTS erfolgte nach 15 min die photometrische Auswertung bei 405 nm. Alle Messungen wurden im Duplikat durchgeführt, die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.
(A) Verdrängung von 0.5 µg/mL FITC-markiertem T84.1 mAk durch steigende Konzentrationen von nicht markiertem T84.1 mAk an CC1
(B) Verdrängung von 0.1 µg/mL FITC-markiertem T84.66 mAk durch steigende Konzentrationen von nicht markiertem T84.66 mAk an CC5
Die gestrichelten Linien geben die Absorptionswerte für die konstante Konzentration FITC-markierter mAk unter nicht kompetitiven Bedingungen einschließlich Standardabweichung wieder.

Wie Abb. 3.5 zeigt, konnte für beide monoklonale Antikörper ein kompetitives ELISA-System etabliert werden. Erwartungsgemäß erfolgte die halbmaximale Verdrängung FITC-markierter mAk für beide Systeme ungefähr im Bereich äquivalenter Konzentrationen der konkurrierenden Antikörperspezies. Somit lag eine geeignete, kompetitive ELISA-Plattform für die Vermessung von Antikörperderivaten vor, deren Bindung nicht durch indirekte Nachweisverfahren wie z.B. über Sekundärantikörper detektiert werden konnte.

3.2 Herstellung von Einzelketten-Fragmenten (scFv) auf Basis der monoklonalen anti-CEACAM Antikörper T84.1 und T84.66

3.2.1 Klonierung und bakterielle Expression eines monovalenten scFv-Fragments für T84.66 mAk

Als Ausgangsmaterial für ein monovalentes T84.66 scFv-Fragment diente eine von Dr. John E. Shively (City of Hope, Duarte, USA) zur Verfügung gestellte pCR4BLUNT Plasmid-DNA. Diese enthielt die kodierenden DNA-Segmente für die variablen Domänen der schweren und leichten Kette des murinen mAk T84.66 einschließlich eines Ig kappa Signalpeptids. Die Segmente der variablen Domänen waren in V_L-zu-V_H Orientierung über einen Poly G/S-Linkers miteinander verbunden (Abb. 3.6).

```
        -50       -40       -30       -20       -10         1        10
ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACAGGTGACATTGTGCTGACC
M  E  T  D  T  L  L  L  W  V  L  L  L  W  V  P  G  S  T  G  D  I  V  L  T

    20        30        40        50        60        70        80        90
CAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTTGGGCAGAGGGCCACCATGTCCTGCAGAGCCGGTGAAAGTGTTGAT
Q  S  P  A  S  L  A  V  S  L  G  Q  R  A  T  M  S  C  R  A  G  E  S  V  D

        100       110       120       130       140       150       160
ATTTTTGGCGTTGGGTTTTTGCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCGTGCA
I  F  G  V  G  F  L  H  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L  L  I  Y  R  A

    170       180       190       200       210       220       230       240
TCCAACCTAGAATCTGGGATCCCTGTCAGGTTCAGTGGCACTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTCATCATTGAT
S  N  L  E  S  G  I  P  V  R  F  S  G  T  G  S  R  T  D  F  T  L  I  I  D

        250       260       270       280       290       300       310
CCTGTGGAGGCTGATGATGTTGCCACCTATTACTGTCAGCAAACTAATGAGGATCCGTACACGTTCGGAGGGGGG
P  V  E  A  D  D  V  A  T  Y  Y  C  Q  Q  T  N  E  D  P  Y  T  F  G  G  G

    320       330       340       350       360       370       380       390
ACCAAGCTGGAAATAAAAGGCAGTACTAGCGGCGGTGGCTCCGGGGGCGGTTCCGGTGGGGGCGGCAGCAGCGAG
T  K  L  E  I  K  G  S  T  S  G  G  G  S  G  G  G  S  G  G  G  G  S  S  E

        400       410       420       430       440       450       460
GTTCAGCTACAACAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGC
V  Q  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V  E  P  G  A  S  V  K  L  S  C  T  A  S  G

    470       480       490       500       510       520       530       540
TTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATT
F  N  I  K  D  T  Y  M  H  W  V  K  Q  R  P  E  Q  G  L  E  W  I  G  R  I

        550       560       570       580       590       600       610
GATCCTGCGAATGGTAATAGTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCC
D  P  A  N  G  N  S  K  Y  V  P  K  F  Q  G  K  A  T  I  T  A  D  T  S  S

    620       630       640       650       660       670       680       690
AACACAGCCTACCTGCAGCTCACCAGCCTGACATCCGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCCGTTTGGTTAC
N  T  A  Y  L  Q  L  T  S  L  T  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  P  F  G  Y

        700       710       720       730       740       750
TACGTGTCTGACTATGCTATGGCCTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCATGA
Y  V  S  D  Y  A  M  A  Y  W  G  Q  G  T  S  V  T  V  S  S  *
```

Abb. 3.6: DNA- und Peptidsequenz des für T84.66 scFv kodierenden DNA-Segments in pCR4BLUNT (J.E. Shively, Duarte, USA). Folgende Elemente sind farbig hervorgehoben:

- = Start-Codon
- = Ig kappa Signalpeptid
- GST = Peptid-Linker
- = Stop-Codon

DIV…EIK = T84.66 V_L

EVQ…VSS = T84.66 V_H

Das Konstrukt diente hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit als Vorlage bzw. Prototyp für die Generierung und Expression von scFv-Fragmenten. Ein bakterielles Expressionssystem zur Produktion der scFv-Fragmente stand in der AG Nollau bereits zur Verfügung. Über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme BamHI/EcoRI in den ORF eines modifizierten pAC4/BirA-Vektors klonierte Gensegmente ließen sich dabei als Fusionsproteine mit N-terminalem GST-Tag und C-terminalen BAP-Tag (*biotin acceptor peptide*) in AVB100 *E. coli* exprimieren. Die Modifikation mit Biotin sollte im Weiteren als universeller Anker für eine Funktionalisierung durch Streptavidin-Konjugate dienen sowie gleichzeitig Aufreinigung und Nachweis der Proteine ermöglichen. Um das scFv-kodierende Segment in den pAC4/BirA-Vektor zu klonieren, wurde es mit den Primern *t84.66for* und *t84.66rev* (s. Kap. 2.1.8) ausgehend von pCR4BLUNT-Plasmid als Matrize durch PCR amplifiziert und über die Primer mit den Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen BglII und EcoRI versehen (Abb. 3.7 A). Durch zusätzliche A-Überhänge wurde das Amplifikat für die weitere Transformation chemisch kompetenter INVαF‘ *E.coli* in den Vektor pCR2.1 ligiert. Aus den transformierten *E. coli* wurde das Plasmid im mg-Maßstab gewonnen und präparativ mit den Restriktionsenzymen BglII und EcoRI verdaut. Nach Auftrennung der Restriktionsansätze durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion des Inserts (Abb. 3.7 B), wurde dieses in den BamHI/EcoRI geschnittenen Vektor pAC4/BirA ligiert.
Da das scFv-Segment zwei interne Schnittstellen für BamHI im Bereich der leichten Kette (Abb. 3.6; Nukleotide 182-187 und 291-296) aufwies, wurde für die Ligation in den BamHI/EcoRI geschnittenen pAC4/BirA hier mit einer BglII-Schnittstelle gearbeitet: BamHI und BglII liefern bei Restriktion verschiedener DNA-Moleküle die gleichen kohäsiven Enden, so dass diese in einer Ligationsreaktion verbunden werden konnten. Durch die Änderung der Sequenz an dieser (nicht kodierenden) Position wurde die ursprüngliche Schnittstelle jedoch für die beiden Restriktionsenzyme unbrauchbar (Abb. 3.7 C).

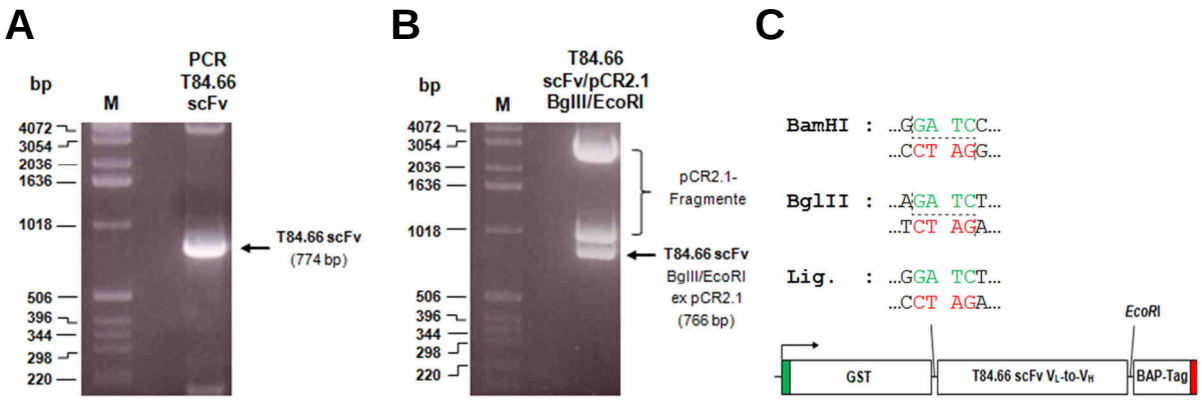


Abb. 3.7:
Präparation des T84.66 scFv-Segments für Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pAC4/BirA.
(A) In einem präparativen Agarosegel (1,2%) wurde der PCR-Ansatz für T84.66 scFv, amplifiziert von pCR4BLUNT mit den Primern *t84.66for/rev*, aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt.
(B) In einem weiteren präparativen Agarosegel (1,2%) wurde der Restriktionsverdau von pCR2.1-Plasmid mit dem ligierten T84.66 scFv-Segment über die Enzyme BglII/EcoRI aufgetrennt, um das Insert nach Aufreinigung in den Expressionsvektor pAC4/BirA klonieren zu können. Durch eine BglII-Schnittstelle im pCR2.1-Vektor wurde dieser in zwei Fragmente von ca. 2,9 und 1 kb geschnitten; für die Restriktion wurden 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt, der Ansatz wurde komplett auf das Gel geladen. (M) Marker: 1kb DNA ladder.
(C) Schematische Darstellung der Restriktion mit BamHI (pAC4-Vektor) und BglII (T84.66 scFv-Segment) sowie des Ligationsprodukts über die entsprechenden kompatiblen Enden.

Nach Ligation des T84.66 scFv-Fragments in den pAC4/BirA-Vektor wurden mit dem Produkt chemisch kompetente AVB100 *E. coli* transformiert. Der Transformationserfolg wurde durch Restriktionsverdau präparierter Plasmide und anschließende Gelanalyse (Abb. 3.8) sowie durch DNA-Sequenzierung sichergestellt.
Die Transformation von AVB100 *E.coli* erfolgte dabei mit sowie ohne die Co-Transformation eines pG-KJE8 Plasmids aus dem kommerziellen *Chaperone Plasmid Set*, das für die faltungsunterstützenden Chaperone bzw. Chaperonine DnaJ, DnaK, GrpE, GroES und GroEL kodierte. Hierüber sollte in Bezug auf den Erhalt von korrekt gefaltetem und funktionalem scFv-Fragment der Effekt bzw. die mögliche Notwendigkeit einer Co-Expression von Chaperonen untersucht werden.

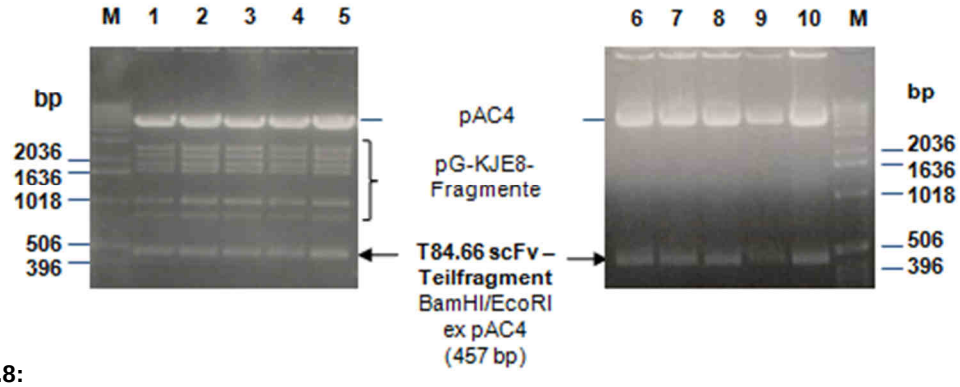


Abb. 3.8:
Restriktionsanalyse des Expressionsvektors pAC4/BirA mit kloniertem T84.66 scFv-Segment nach Transformation in AVB100 *E. coli* mit und ohne pG-KJE8 Co-Transformation.
Gezeigt sind die analytischen Agarosegele (1,5%) mit den kompletten Restriktionsansätzen von T84.66 scFv/pAC4 durch die Enzyme *BamH*I/*EcoR*I nach Plasmidpräparation aus je 5 Klonen mit (linke Seite, Spur 1-5) und ohne co-transformierten pG-KJE8 (rechte Seite, Spur 6-10). Aufgrund der bei Ligation am 5'-Ende unbrauchbar gewordenen bzw. der scFv-internen *BamH*I-Schnittstellen entstand bei Restriktion mit *BamH*I/*EcoR*I ein charakteristisches Teilfragment aus den letzten 457 Basenpaaren des scFv-Segments sowie ein linearisierter pAC-Vektor mit den restlichen Basenpaaren des scFv; (M) Marker.

Kloniert in pAC4/BirA konnte T84.66 scFv nun in AVB100 *E. coli* über das beschriebene Expressionssystem als Fusionsprotein mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) und C-terminaler Biotin-Modifikation am BAP-Tag erzeugt werden. Letztere wurde dabei *in vivo* durch die in AVB100 chromosomal integrierte Biotin-Protein-Ligase BirA bewirkt. Die Expressionsausbeuten aus 400 mL-Kulturen von transformierten AVB100 in mehreren Durchführungen lagen für T84.66 scFv ohne co-exprimierte Chaperone bei Gesamtproteinmengen zwischen 455 µg - 2,1 mg pro Kultur und zwischen 385 - 910 µg bei Expression mit Chaperonen. Zur Charakterisierung der Expressionsansätze wurden verschiedene Mengen Gesamtprotein per SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt bzw. durch Western Blot-Analyse über verschiedene Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.9).

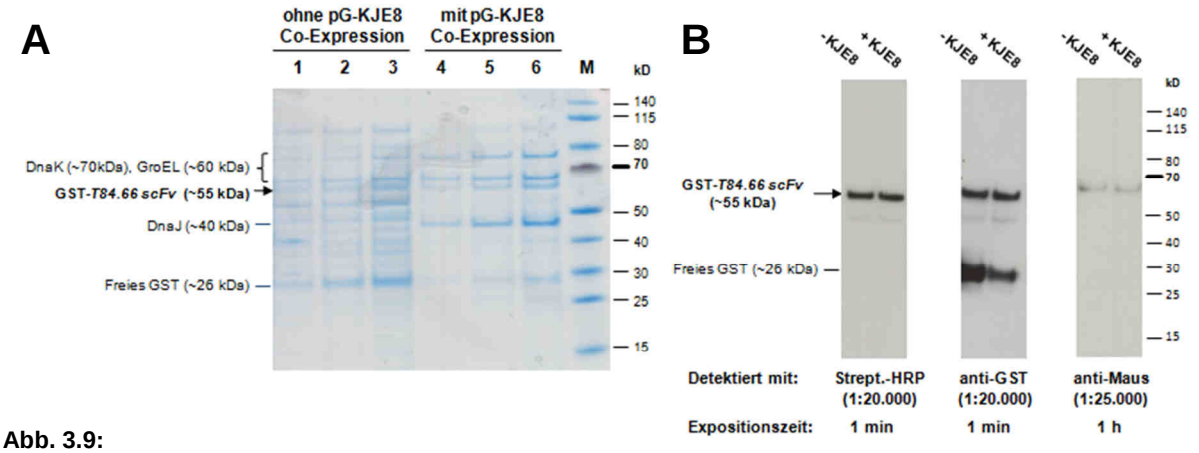


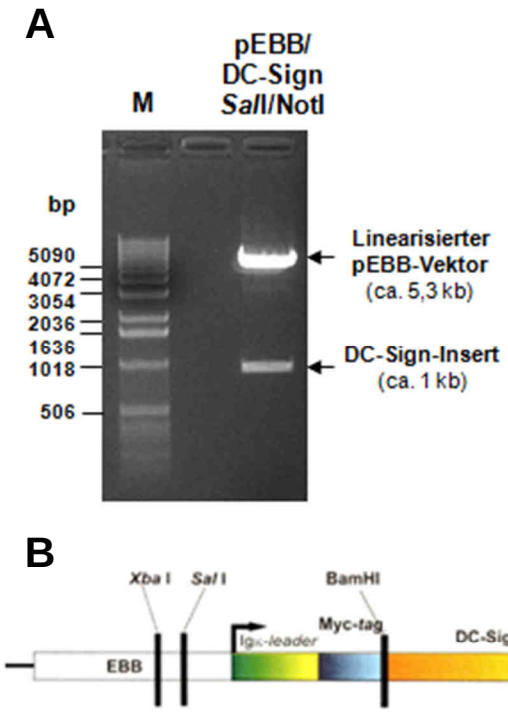
Abb. 3.9:
Charakterisierung von bakteriell exprimiertem T84.66 scFv als biotinyliertes GST-Fusionsprotein mit und ohne Co-Expression von Chaperonen durch Coomassie-Färbung und Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE.
(A) Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE: Aufgetrennt wurden 1 µg (Spur 1/Spur 4), 2 µg (Spur 2/Spur 5) und 4 µg (Spur 3/Spur 6) Gesamtprotein aus bakterieller Expression von GST-T84.66 scFv ohne (Spur 1-3) und mit Co-Expression (Spur 4-6) der auf pG-KJE8 enthaltenen Chaperone.
(B) Western Blot-Analyse von je 2 µg Gesamtprotein aus bakt. Expression von GST-T84.66 scFv ohne (jew. linke Spur) und mit (rechte Spur) Co-Expression der auf pG-KJE8 kodierten Chaperone. Der Nachweis erfolgte über HRP-konjugiertes Streptavidin, anti-GST- sowie Kaninchen-anti-Maus Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnungen bzw. Expositionszeiten. (M) Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Bei Charakterisierung der Expressionsansätze durch Coomassie-Färbung wurden neben den Zielproteinen (GST-T84.66 scFv; MW: ca. 55 kDa) nach Aufreinigung über GSH-Sepharose zusätzliche Proteinbanden in den Proben meist schwach, z.T. auch mit vergleichbarer Intensität, angefärbt. Bei Expression mit Chaperonen traten insgesamt weniger Proteinbanden auf. Diese ließen sich über die Molekülmasse den Chaperonen DnaK (ca. 70 kDa), GroEL (ca. 60 kDa) und DnaJ (ca. 40 kDa) zuordnen (s. Abb. 3.9 A). Ohne Co-Expression von Chaperonen wurde ein breiteres Muster von schwach gefärbten Banden erhalten. Zudem wurde ohne Chaperone eine höhere Menge an freiem GST-Protein angefärbt, was sich im Western Blot mit anti-GST Antikörper bestätigte (Abb. 3.9 B). Die bei ca. 60 kDa in beiden Expressionsansätzen vorliegende Bande konnte dem Fusionsprotein GST-T84.66 scFv zugeordnet werden. In Einklang hierzu konnte auch in den Western Blot-Analysen (Abb. 3.9 B) eine entsprechende Bande detektiert werden. Dies bestätigte den Erhalt eines vollständigen Fusionsproteins aus GST und murinem scFv mit spezifischer Biotinylierung. Für alle Detektionsformen wurden gleichmäßige Bandenintensitäten des Zielproteins in den Expressionsansätzen mit und ohne Chaperone erhalten, daher konnte von einem ungefähr gleichen Anteil des GST-T84.66 scFv in beiden Expressionsformen ausgegangen werden. Die Detektion mit anti-Maus Sekundärantikörper lieferte äußerst schwache Signale im Vergleich zum Nachweis über anti-GST Antikörper und Streptavidin-HRP, was möglicherweise auf eine geringere Bindungsfähigkeit des polyklonalen Kaninchen anti-Maus Antikörpers gegenüber den variablen Domänen zurückzuführen war. Die Bindungsfähigkeit des scFv-Fragments wurde anschließend im Western Blot sowie im indirekten und kompetitiven ELISA getestet. Dabei konnte unter den in dieser Arbeit angewandten Bedingungen für die durchgeführten, bakteriellen Expressionsansätze zum Erhalt eines T84.66 scFv-Fragments, unabhängig vom Vorhandensein faltungsunterstützender Chaperone, im Western Blot und ELISA keine spezifische Bindung des Fragments für CC5 oder andere CEACAM-Proteine nachgewiesen werden (s. Anhang,

Kap. 7.2). Dementsprechend erwies sich das hier getestete bakterielle Expressionssystem für die Herstellung von scFv-Fragmenten im Rahmen der Fragestellung als nicht geeignet.

3.2.2 Klonierung von T84.66 scFv für die eukaryotische Expression in HEK293-Zellen

Aufgrund der fehlenden Bindungsfähigkeit der bakteriell exprimierten T84.66 scFv-Fragmente wurde angestrebt, das scFv-Fragment über ein eukaryotisches Expressionssystem zu gewinnen, um mögliche Probleme hinsichtlich korrekter Faltung und Prozessierung bei bakterieller Expression zu umgehen. Hierfür wurde ein auf HEK293 Zellen basierendes, in der AG Nollau bereits etabliertes Expressionssystem verwendet. Als geeigneter Expressionsvektor wurde der von Dr. Bruce Mayer (University of Conneticut Health Center, USA) zur Verfügung gestellte pEBB eingesetzt, ein modifiziertes Derivat des pEF-BOS-Plasmids, welches in der vorliegenden Form rekombinante DNA für einen Teil des humanen C-Typ Lektins DC-Sign enthielt. Der Plasmid-Vektor wurde durch Restriktionsverdau mit den Enzymen SalI und NotI sowie anschließende Aufreinigung für die Integration in pEBB vorbereitet (Abb. 3.10 A).



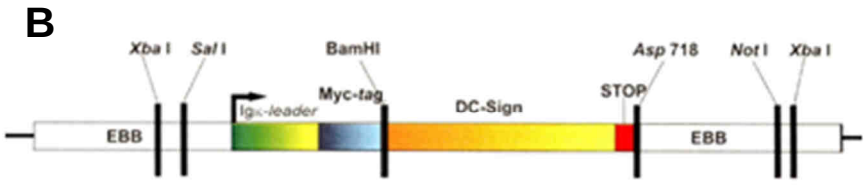


Abb. 3.10:
Präparation des pEBB-Plasmids für die Ligation mit T84.66 scFv zur weiteren Transfektion von HEK293-Zellen.
(A) Präparatives Agarosegel (1%) für die Isolation des mit den Restriktionsenzymen SalI/NotI inkubierten pEBB-Vektors. Geladen wurde der vollständige Restriktionsansatz mit 2 µg Plasmid-DNA. (M) Marker: 1kb DNA ladder.
(B) Schematische Darstellung des für eukaryotische Transfektion/Expression vorliegenden Vektor-Konstrukts pEBB mit integrierten Elementen (sektretorisches Ig kappa Signalpeptid und Myc-Tag) und Restriktionsschnittstellen (Abb. mod. nach Samsen, 2010).

Unter Einsatz der Primer *IgkSalfor* und *mycCNotrev* (s. Kap. 2.1.8) wurde das Segment für T84.66 scFv von pCR4BLUNT mittels PCR amplifiziert (Abb. 3.11 A). Aufgrund der internen BamHI- und Asp718-Schnittstellen in T84.66 scFv wurde hier über SalI und NotI kloniert. Dabei wurde sowohl das Ig kappa Signalpeptid als auch das N-terminale Myc-Tag aus pEBB entfernt (s. Abb. 3.10 B). Das Ausgangskonstrukt für T84.66 scFv in pCR4BLUNT besaß bereits ein entsprechendes Signalpeptid, welches zusammen mit dem Insert über den *forward*-Primer wieder eingefügt wurde (s. Abb. 3.6). Durch den *reverse*-Primer wurde außerdem C-terminal wieder ein Myc-Tag zugefügt. Nach Transformation von INVaF‘ *E.coli* wurde das Plasmid im mg-Maßstab gewonnen und für eine eukaryotische Transfektion

eingesetzt. Die richtige Beschaffenheit des Konstrukts wurde durch Restriktions- bzw. Sequenzanalyse sichergestellt (s. Abb. 3.11 B).

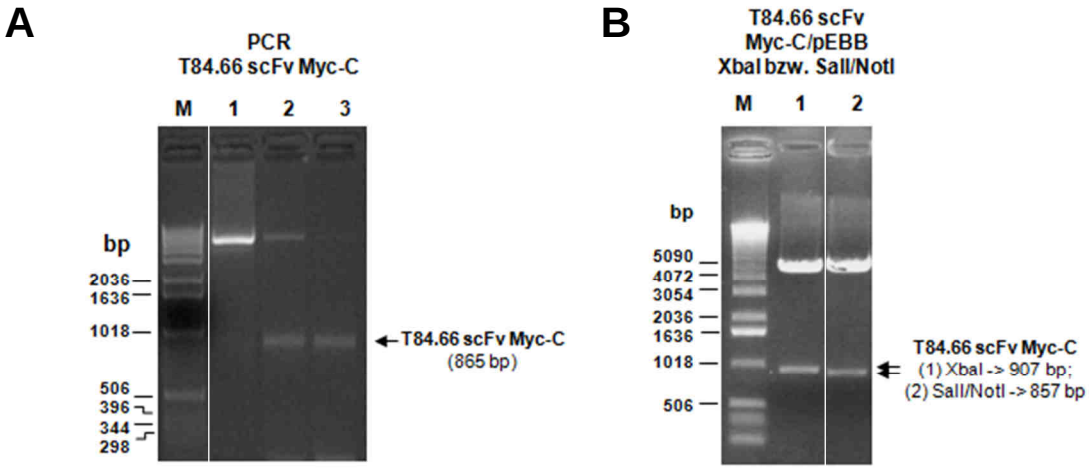


Abb. 3.11:
Klonierung des T84.66 scFv-Segments in den eukaryotischen Expressionsvektor pEBB.
(A) Präparatives Agarosegel (1,2%) mit dem aufgetrennten Amplifikat für T84.66 scFv Myc-C über die Primer *IgKSalfor/mycCNotrev*. Als Matrize diente das Ausgangskonstrukt mit T84.66 scFv in pCR4BLUNT (s. Abb. 3.6); eingesetzt wurden 2 µL unverdünnte Plasmid-DNA (Spur 1) sowie 2 µL von 1:10- (Spur 2) und 1:50-Vorverdünnungen (Spur 3). (M) Marker: 1 kb DNA ladder.
(B) Analytisches Agarosegel (1,2%) mit dem kompletten Ansatz des Restriktionsverdaus von 2 µg pEBB Plasmid-DNA mit T84.66 scFv Myc-C über die Enzyme XbaI (Spur 1) sowie SalI/NotI (Spur 2). (M) Marker: 1 kb DNA ladder.

3.2.3 Generierung eines Einzelketten-Fragments (scFv) auf Basis des monoklonalen anti-CEACAM Antikörpers T84.1

Neben der Klonierung eines CEACAM5-spezifischen T84.66 scFv-Fragments wurde parallel ein neues *pan*-CEACAM spezifisches, von T84.1 abgeleitetes scFv-Fragment generiert. Als Basis hierfür diente die entsprechende Hybridom-Zelllinie, aus der bereits der monoklonale Antikörper gewonnen wurde. Für diesen war bekannt, dass T84.1 mAk ein Epitop auf der bei CEACAM-Proteinen N-terminal gelegenen IgV-*like* Domäne erkennt, welche in verschiedenen CEACAM-Mitgliedern weitgehend homolog ist. Entsprechend war der mAk T84.1 in der Lage, nicht eines, sondern mehrere Mitglieder der CEACAM-Familie von Zelloberflächenproteinen zu erkennen, darunter CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6. (Schwarz *et al.*, 1989; Wagener *et al.*, 1989; Jessup *et al.*, 1993; Bogoevska *et al.*, 2005).
Die DNA- bzw. Aminosäuresequenz für T84.1 mAk war bisher nicht bekannt. Da entsprechend kein cDNA-Klon zur Verfügung stand, wurde aus Zellen der Hybridom-Kultur T84.1 eine Isolierung von Gesamt-RNA vorgenommen und diese mittels randomisierten Oligonukleotid-Hexameren durch reverse Transkription zu einer cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Matrize mit den verschiedenen Primern aus Satz 1 des kommerziellen *Mouse IgG Library Primer Sets* zur gezielten Amplifikation von murinen Immunglobulin-Genen in weiteren PCR-Reaktionen eingesetzt (Zhou *et al.*, 1994). Dabei konnten spezifische PCR-Amplifikate mit den eingesetzten Primern C, E und F im Längenbereich von etwa 440 bp für die variablen Domänen von schweren Ketten erhalten werden. Gleichzeitig lieferten die Primer Q, R und V Amplifikate für die variablen Domänen von leichten Ketten kodierter Immunglobuline mit einer Länge von ca. 400 bp (Abb. 3.12).

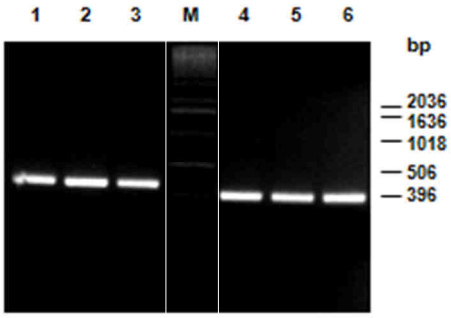


Abb. 3.12:
PCR-Amplifikate der Segmente für variable Domänen von schweren und leichten Immunglobulin-Ketten aus für T84.1 erzeugter cDNA nach Auftrennung im 1.2%-igen Agarosegel. Zu sehen sind die Amplifikate für variable Domänen der schweren Ketten mit den Primern C (Spur 1), E (Spur 2) u. F (Spur 3) und der leichten Ketten mit den Primern Q (Spur 4), R (Spur 5) und V (Spur 6). (M) Marker: 1kb DNA ladder.

Die aus dem Gel aufgereinigten Fragmente wurden mittels A-Überhängen in den Zwischenvektor pCR2.1 ligiert und mit den erhaltenen Ligationsprodukten anschließend INVαF‘ *E. coli* transformiert. Von den auf LB-Agar mit Ampicillin und X-Gal ausplattierten, transformierten Bakterien wurden für einzelne positive Klone Plasmidpräparationen und Restriktionsanalysen mit der Endonuklease EcoRI durchgeführt (s. Abb. 3.13). Das Plasmid pCR2.1 besaß für EcoRI zwei Schnittstellen, welche die *multiple cloning site* (MCS) flankierten. Für die PCR-Ansätze C, E und F (variable Domänen der schweren Ketten) wurden auch hier weitgehend Fragmente mit Längen von ca. 440 bp detektiert. Lediglich für den Klon F1 wurde ein kleineres Fragment von etwa 380 bp beobachtet. Die Ansätze Q, R und V (variable Domänen der leichten Ketten) lieferten ausschließlich Banden bei ~400 bp.

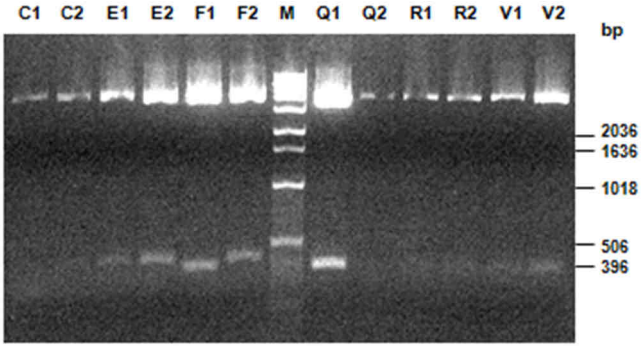


Abb. 3.13:
Restriktionsanalyse der aus *E. coli* isolierten pCR2.1-Plasmide mit Segmenten für variable Immunglobulin-Domänen durch EcoRI-Verdau. Das analytische Agarosegel (1,5%) wurde beladen mit den vollständigen Restriktionsansätzen für die Plasmide von je zwei mal drei Klonen mit Gensegmenten für variable Domänen von schweren (C1-F2) und leichten Ketten (Q1-V2) auf Basis revers transkribierter RNA aus T84.1-Hybridomzellen. (M) Marker.

Für die Klone C2, E2 und F2 sowie Q1, R2 und V2 wurden anschließend Sequenzanalysen durchgeführt und die jeweils zutreffenden Leserahmen für die resultierenden Aminosäuresequenzen miteinander verglichen (Abb. 3.14). Diese enthielten typische Merkmale für entsprechende variable Domänen von Immunglobulinen der Klasse IgG in Bezug auf Länge und Aminosäurehomologie (s. Anhang, Kap. 7.3).
Für die Klone der leichten Ketten (Q1, R2, V2) wurden nahezu identische Proteinsequenzen erhalten (Homologie >99%). Lediglich in zwei Positionen im Bereich der nicht an Antigen-Wechselwirkungen beteiligten *framework region 1* am N-Terminus lagen konservative Austausche vor (s. magentafarbene Markierungen); für V2 wurde an Position 1 ein Glutamin-Rest (Q) vorgefunden, während die Klone Q1 und R2 an dieser Stelle einen ebenfalls hydrophilen Aspartat-Rest aufwiesen (D). An Postion 3 wiederum wies R2 einen konservativ substituierten Methionin-Rest (M) auf, die anderen beiden Klone besaßen an dieser Stelle einen gleichermaßen hydrophoben Leucin-Rest (L). Auch für die Klone der schweren Ketten (C2, E2, F2) lag eine weitgehende Homologie von über 90% vor. In der *framework region 1*

gab es ebenfalls Variationen an zwei Positionen; der Klon C2 zeigte an Position 1 ein Glutamin (Q) im Gegensatz zu E2 und F2, die hier einen Glutamat-Rest (E) besaßen. Zudem war Position 4 in C2 mit einem Lysin-Rest (K) besetzt, in E2 und F2 dagegen mit Glutamin (Q). Für Klon F2 trat zudem eine komplett unterschiedliche AS-Abfolge in der *framework region 4* am C-Terminus ab Position 111 auf. Die beschriebenen Sequenzvariationen der einzelnen Klone für variable Domänen der schweren und leichten Ketten wurden durch unabhängige Sequenzierung mit den Primern *T7* und *M13rev* bestätigt (s. Kap. 2.1.8). Möglicherweise waren diese auf die Verwendung degenerierter, oligospezifischer Primer des *Mouse IgG Library Primer Sets* zurückzuführen. Der Längenunterschied der erhaltenen Peptidsequenzen für leichte und schwere Ketten stand dabei in guter Übereinstimmung mit den Längenunterschieden der entsprechenden DNA-Fragmente im Agarosegel (s. Abb. 3.13); die DNA-Fragmente der um 13 kodierte AS-Reste kürzeren Leichtkettenabschnitte wiesen entsprechend etwa 40 Nukleotide weniger auf als die der schweren Ketten.

Abb. 3.14:
Alignment der Leserahmen für Aminosäuresequenzen variabler IgG-Domänen nach spezifischer Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte auf Basis der aus T84.1 Hybridom-Zellen erzeugten cDNA.
(A) Proteinsequenzen für drei Klone mit den variablen Domänen der leichten Ketten (Q1, V2 u. R2)
(B) Proteinsequenzen für drei Klone mit den variablen Domänen der schweren Ketten (C2, E2 u. F2)
Farbig unterlegt sind die *complementarity determining regions* (CDR) der jeweiligen Domäne, deren AS-Reste die spezifische Wechselwirkung mit dem Antigen vermitteln: CDR1 CDR2 CDR3;
Unterschiede in der AS-Sequenz zwischen den einzelnen Klonen sind magentafarben markiert.

Basierend auf den Nummerierungsschemata nach Kabat und Chothia konnten die *complementarity determining regions* (CDR) oder hypervariablen Regionen bestimmt werden, in denen die Seitenketten bestimmter AS-Reste über spezifische, nicht-kovalente Wechselwirkungen die Antigenbindung vermitteln (Chothia *et al.*, 1987; Kabat *et al.*, 1991; Johnson und Wu, 2013). Die Sequenzabschnitte der CDRs (Abb. 3.14, grün, rot und grau) waren für die einzelnen Klone der jeweiligen Kette untereinander vollständig identisch. Zur Generierung eines T84.1 scFv-Fragments wurden diejenigen Klone für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette gewählt, in denen eine Übereinstimmung der AS-Sequenz für zwei der drei Klone hinsichtlich der variierenden Positionen vorlag: Dies waren Klon Q1 für die leichte Kette und Klon E2 für die schwere Kette.

Für das Zusammenfügen der ausgewählten Klone mit Leicht- und Schwerkettensegmenten wurde eine o*verlap*-PCR in zwei Schritten durchgeführt: Zuerst erfolgte eine separate Amplifikation von Q1 (leichte Kette) mit den Primern *Q1for* und *spacerrev* sowie von E2 (schwere Kette) mit *spacerfor* und *E2rev* (Abb. 3.15 A**;** s. auch Kap. 2.1.8). Dabei wurden die PCR-Produkte mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen (*Q1for*: BamHI; *E2rev*: NotI) und für jedes Amplifikat mit Hilfe der *spacer*-Primer ein Bereich erzeugt, der für Teile eines Linker-Peptids kodierte und in einem überlappenden Abschnitt komplementär zum jeweils anderen Amplifikat war. In einem zweiten PCR-Schritt wurden die zuvor einzeln amplifizierten Fragmente nach Aufreinigung in gleichen Mengen zusammen als Matrize eingesetzt und mit den Primern *Q1for* und *E2rev* durch den überlappenden Bereich als zusammenhängendes Konstrukt amplifiziert (Abb. 3.15 B).

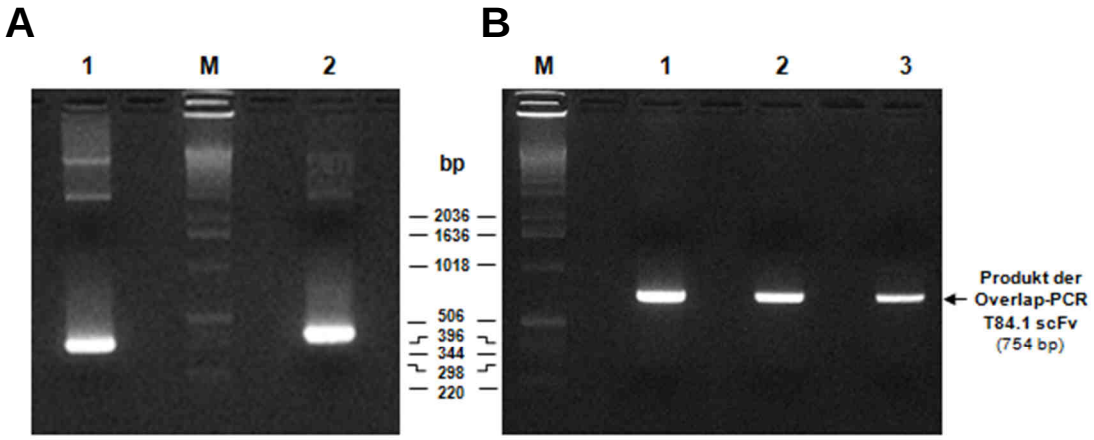


Abb. 3.15:
Overlap-PCR zur Generierung eines rekombinanten Gensegments für ein T84.1-abgeleitetes scFv-Fragment.
(A) Separat amplifizierte Segmente für die variable Leichtketten-Domäne (Spur 1) von T84.1 mit den Primern *Q1for*/*spacerrev* und pCR2.1-Plasmid mit Q1 als Matrize sowie für variable Schwerketten-Domäne (Spur 2) mit den Primern *spacerfor/E2rev* und pCR2.1-Plasmid mit E2 als Matrize nach Auftrennung im Agarosegel (1.2%).
(B) Zusammenhängende PCR-Amplifikation der aufgereinigten Fragmente aus (A) nach Auftrennung in einem 1.2%-igem Agarosegel. Von einem 1:1-Gemisch beider DNA-Fragmente wurden 2 µL pur (Spur 1), 2 µL einer 1:10-Vorverdünnung (Spur 2) und 2 µL einer 1:50-Vorverdünnung (Spur 3) als Matrize eingesetzt bei Verwendung der Primerkombination *Q1for*/*E2rev*. (M) Marker: 1 kb DNA ladder.

Dass Endprodukt aus der *overlap*-PCR wurde in pCR2.1 ligiert. Nach Transformation chemisch kompetenter INVaF‘ *E.Coli* sowie anschließender Plasmidpräparation aus entsprechenden Kulturen wurden für fünf ausgewählte Klone Restriktionsanalysen durchgeführt. Alle fünf Klone zeigten dabei erwartungsgemäße Fragmentlängen nach Restriktionsverdau mit BamHI/NotI (Abb. 3.16).

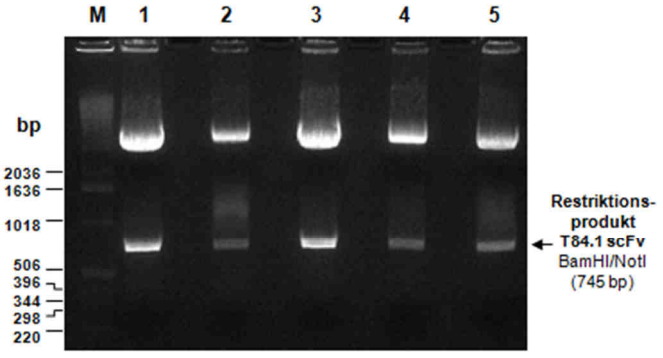


Abb. 3.16:
Restriktionsanalyse mit den Enzymen BamHI/NotI für präparierte pCR2.1-Plasmide mit T84.1 scFv-Segment aus transformierten *E. coli*.
Die kompletten Restriktionsansätze für fünf Klone (Spur 1-5) wurden im analytischen Agarosegel (1.2%) aufgetrennt und durch UV-Licht detektiert. (M) Marker: 1kb DNA ladder.

Nach Umklonierung des Restriktionsprodukts von Klon 1 in pEBB über die Schnittstellen BamHI/NotI zeigten aus transformierten INVaF‘ gewonnene Plasmide in drei von drei Fällen identische DNA-Sequenzen, die auf Proteinebene exakt dem erwarteten Konstrukt entsprachen. Dessen vollständiger Leserahmen für das Zielprotein T84.1 scFv ist als Sequenzausschnitt in Abb. 3.17 dargestellt.

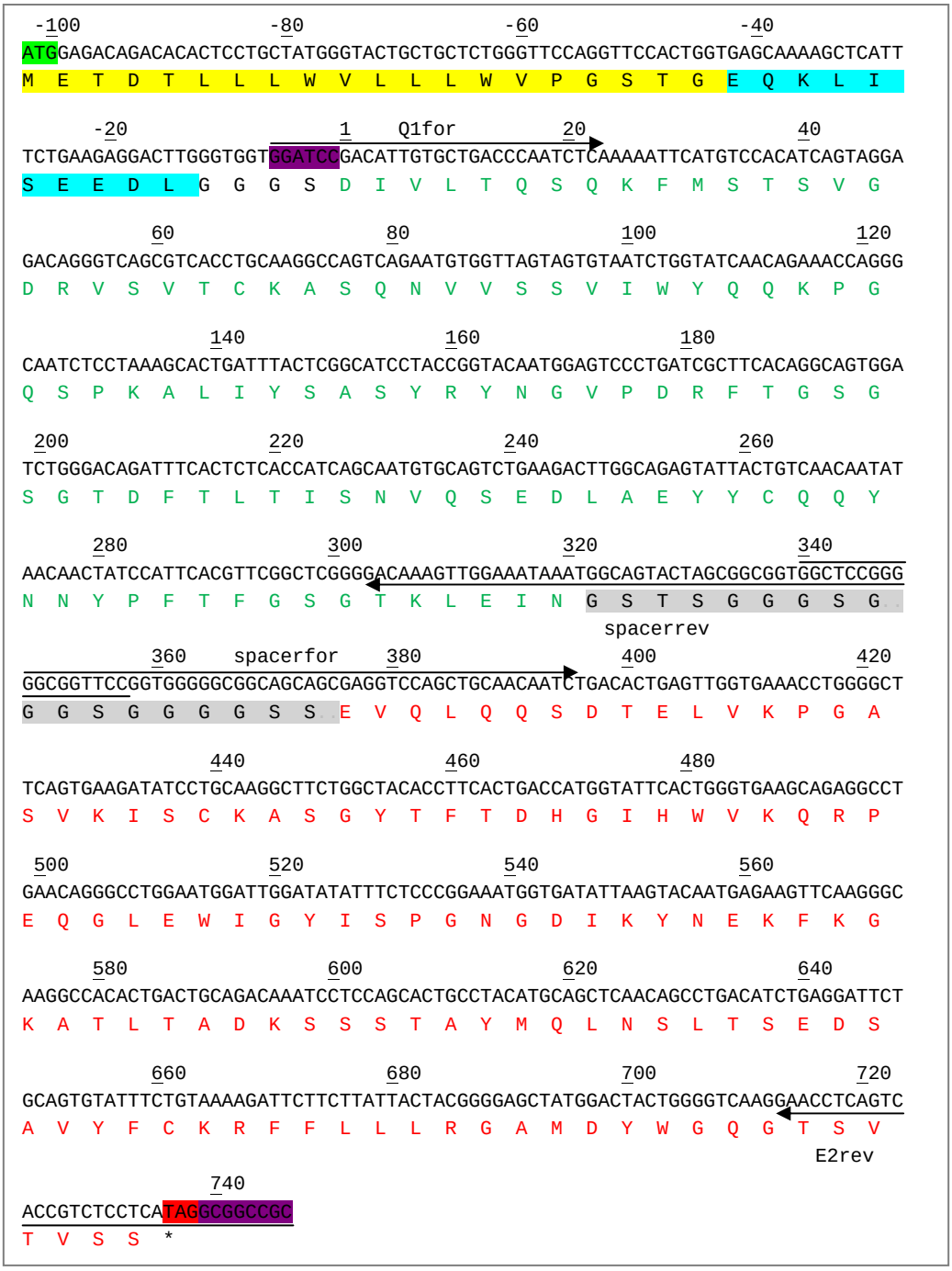


Abb. 3.17:
DNA-Sequenzausschnitt mit zugehöriger Proteinsequenz des vollständigen Leserahmens eines nach *overlap*-PCR in pEBB klonierten T84.1 scFv-Fragments in V_L-zu-V_H Orientierung. Die Pfeile stellen die durch in den PCR-Reaktionen verwendete Primer abgedeckten Sequenzbereiche dar.

= Start-Codon
= Ig kappa leader Peptid
= Myc-Tag
= Stop-Codon
GST = Peptid-Linker
= Restr.-Schnittstellen
DIV…EIN = T84.1 V_L
EVQ…VSS = T84.1 V_H

3.2.4 Charakterisierung von T84.1 und T84.66 scFv-Konstrukten nach eukaryotischer Transfektion und Expression in HEK293-Zellen

Mit den klonierten pEBB-Plasmiden, die rekombinante T84.1 und T84.66 scFv-Segmente enthielten, wurden Kulturen von HEK293-Zellen transient transfiziert. Durch die Fusion mit dem Ig kappa-Signalpeptid erfolgte eine gerichtete Produktion des Zielproteins in das Kulturmedium. Nach Sammeln und ca. 20-facher Konzentration der Kulturüberstände wurden 10 µL des Konzentrats für beide Ansätze im Western Blot auf die Anwesenheit von Myc-Tag tragenden Zielproteinen überprüft (Abb. 3.18).

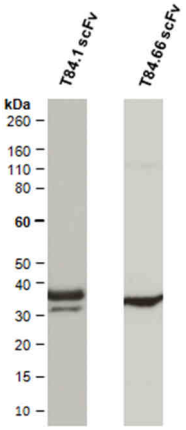
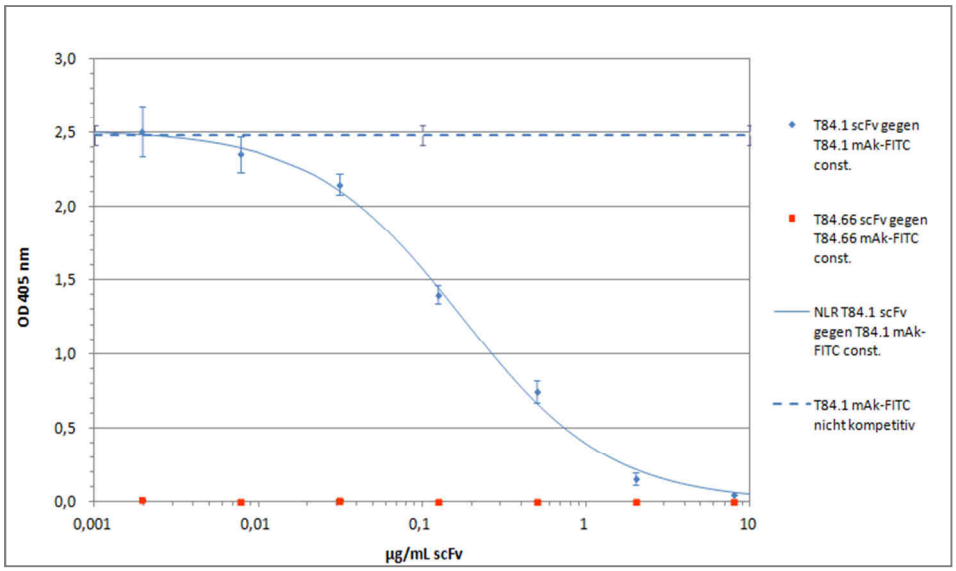


Abb. 3.18:
Western Blot-Analyse von Kulturüberständen aus transienter Expression der scFv-Fragmente T84.1 (links) und T84.66 (rechts) in HEK293-Zellen. Aufgetrennt wurden je 10 µL der gesammelten, konzentrierten Zellkulturüberstände durch SDS-PAGE. Nach Transfer wurden die Membranen mit 9E10 Anti-Myc Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/mL und mit HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:40.000) inkubiert; die Expositionszeit der dargestellten Exponate betrug je 1 min

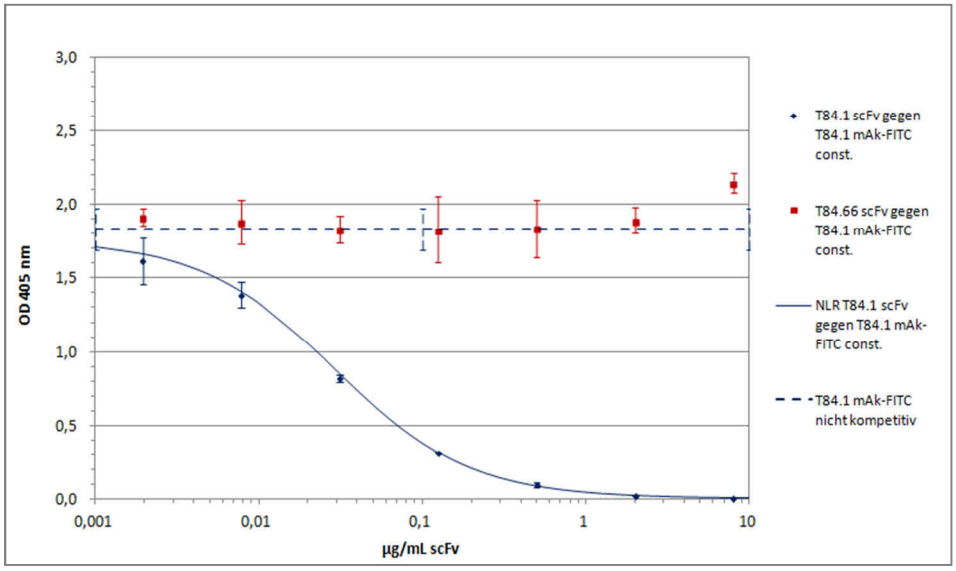
Die aus der Sequenz errechnete, theoretische Molekülmasse für beide scFv-Konstrukte lag bei 27.8 kDa. Für T84.66 scFv wurde in der Western Blot-Analyse eine entsprechende Bande bei ca. 34 kDa beobachtet (Abb. 3.18, rechts). T84.1 scFv zeigte dagegen eine Doppelbande bei Laufweiten, die ca. 32 und 36 kDa entsprachen, wobei die Bande bei höherer Molekülmasse eine deutlich stärkere Intensität aufwies als die niedrigere (Abb. 3.18, links). Nach rekombinanter Herstellung von T84.1 und T84.66 scFv wurde der Nachweis der Bindungsfähigkeit für die Konstrukte durch die quantitative Vermessung im zuvor etablierten, kompetitiven ELISA erbracht über die spezifische Verdrängung der korrespondierenden, FITC-markierten mAk T84.1 und T84.66 bei steigenden eingesetzten Konzentrationen der scFv-Fragmente (Abb. 3.19).

Abb. 3.19:
Kompetitiver ELISA zum Nachweis der spezifischen Bindungsfähigkeit in HEK293 exprimierter scFv-Fragmente. Die scFv-Fragmente wurden in Konzentrationen von 0.002 µg/mL bis 8 µg/mL eingesetzt. Pro *well* der Mikrotiterplatte wurden 0.5 µg/mL CC1 (A) bzw. CC5 (B u. C) immobilisiert. Der Nachweis wurde mit HRP-markiertem anti-FITC Sekundärantikörper vorgenommen, Durchführung und Auswertung erfolgten wie zuvor (s. Abb. 3.5, Kap. 3.1.4).
(A) Kompetition variierender Konzentrationen von T84.1 scFv (hellblau) mit 0.5 µg/mL FITC-markiertem T84.1 mAk sowie von T84.66 scFv (orange) mit 0.1 µg/mL FITC-markiertem T84.66 mAk an CC1
(B) Kompetition variierender Konzentrationen von T84.1 scFv (dunkelblau) und T84.66 scFv (rot) mit 0.5 µg/mL FITC-markiertem T84.1 mAk an CC5
(C) Kompetition variierender Konzentrationen von T84.1 scFv (dunkelblau) und T84.66 scFv (rot) mit 0.1 µg/mL FITC-markiertem T84.66 mAk an CC5
Die gestrichelten Linien geben die Absorptionswerte für die konstante Konzentration FITC-markierter mAk unter nicht kompetitiven Bedingungen einschließlich Standardabweichung wieder. Die unterschiedlichen Farbnuancen weisen auf die Verwendung des jeweiligen Antigens hin (hellblau/orange -> CC1; dunkelblau/rot -> CC5).

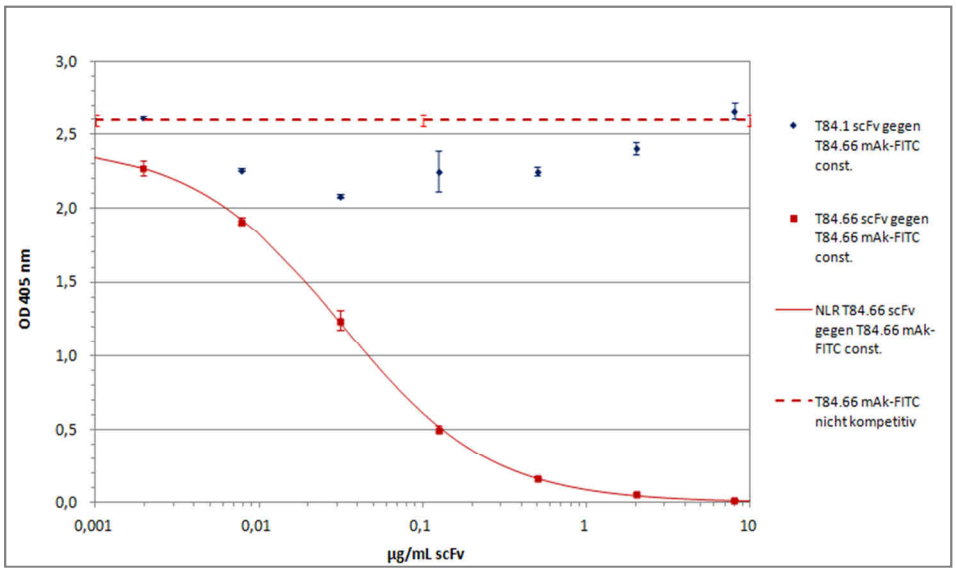
A


3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
OD 405 nm
0,001
0,01
0,1
1
10
µg/mL scFv
T84.1 scFv gegen T84.1 mAk-FITC const.
T84.66 scFv gegen T84.66 mAk-FITC const.
NLR T84.1 scFv gegen T84.1 mAk-FITC const.
T84.1 mAk-FITC nicht kompetitiv

B


3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
OD 405 nm
0,001
0,01
0,1
1
10
µg/mL scFv
T84.1 scFv gegen T84.1 mAk-FITC const.
T84.66 scFv gegen T84.1 mAk-FITC const.
NLR T84.1 scFv gegen T84.1 mAk-FITC const.
T84.1 mAk-FITC nicht kompetitiv

C


3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
OD 405 nm
0,001
0,01
0,1
1
10
µg/mL scFv
T84.1 scFv gegen T84.66 mAk-FITC const.
T84.66 scFv gegen T84.66 mAk-FITC const.
NLR T84.66 scFv gegen T84.66 mAk-FITC const.
T84.66 mAk-FITC nicht kompetitiv

Die kompetitiven Bindungsstudien zeigten, dass aus eukaryotischer Expression von T84.1 bzw. T84.66 scFv funktionale Einzelkettenfragmente hervorgegangen waren. In Übereinstimmung mit den Resultaten für die monoklonalen Antikörper trat für T84.1 scFv mit steigender Konzentration an eingesetztem scFv-Fragment eine zunehmende Verdrängung von T84.1 FITC-mAk an CEACAM1 auf (hellblaue Bindungskurve; Abb. 3.19 A). Hier wurden etwa 180 ng/mL (6.5 nM) von T84.1 scFv benötigt, um 500 ng/mL (3.125 nM) T84.1 mAk-FITC zur Hälfte zu verdrängen. Für die Kompetition von T84.66 scFv und T84.66 mAk-FITC an CEACAM1 (orange Markierungen; Abb. 3.19 A) wurden Signale auf Hintergrundniveau erhalten, da wie erwartet keine der beiden Spezies an CEACAM1 gebunden hatte.
Der Einsatz von T84.1 scFv zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Verdrängung von T84.1 mAk-FITC (dunkelblaue Bindungskurve; Abb. 3.19 B) an CEACAM5, allerdings mit einer etwa 6-fach höheren Verdrängungseffizienz als an CEACAM1 (Abb. 3.19 A); hier verdrängten bereits 30 ng/mL (1.08 nM) von T84.1 scFv die 500 ng/mL (3.125 nM) des FITC-markierten T84.1 mAk zur Hälfte. T84.66 mAk-FITC (rote Markierungen; Abb. 3.19 B) dagegen wurde an CEACAM5 nicht durch steigende Konzentrationen von T84.1 scFv verdrängt, da beide Spezies unterschiedliche Epitope erkennen. Die detektierten Absorptionswerte entsprachen dem Niveau für T84.66 mAk-FITC unter nicht-kompetitiven Bedingungen (blaue gestrichelte Linie; Abb. 3.19 B).
Ebenso unterdrückte das T84.66 scFv-Fragment an CC5 bei steigender Konzentration die Bindung von T84.66 mAk-FITC zunehmend (rote Bindungskurve; Abb. 3.19 C), die halbmaximale Verdrängung von 100 ng/mL (625 pM) T84.66 mAk-FITC wurde durch etwa 30 ng/mL (1.08 nM) von T84.66 scFv erreicht. Für T84.1 mAk-FITC (dunkelblaue Markierungen; Abb. 3.19 C) wurde dagegen keine Verdrängung durch T84.66 scFv an CC5 beobachtet, so dass auch hier von einer spezifischen Kompetition ausgegangen werden konnte.
Zusammen mit den korrekten Restriktions- und Sequenzanalysen der Plasmid-DNA von rekombinanten Klonen und dem Nachweis entsprechender Proteine im Western Blot über das Myc-Tag konnte in kompetitiven Assays im ELISA-Format die spezifische Bindungsfähigkeit der eukaryotisch exprimierten scFv-Fragmente in Analogie zu den monoklonalen anti-CEACAM Antikörpern T84.1 und T84.66 bestätigt werden.

3.2.5 Funktionalisierung von T84.1 und T84.66 scFv-Fragmenten über enzymatische Biotinylierung

Obwohl die Bindungsfähigkeit für die scFv-Fragmente durch spezifische Verdrängung FITC-markierter mAk im kompetitiven ELISA nachgewiesen wurde, konnte im Weiteren kein Nachweis für die Bindung unter nicht-kompetitiven Bedingungen im Western Blot und indirekten ELISA über anti-Myc Antikörper erbracht werden. Eine affinitätschromatographische Aufreinigung mit nachfolgender Markierung zum verbesserten Nachweis dieser Konstrukte wurde ebenfalls nicht weiter verfolgt, da orientierende Bindungsstudien zur Aufreinigung der scFv-Fragmente über rCEACAM-konjugierte Matrices sowie die Präzipitation der scFv's mit an Agarose gekoppelten anti-myc Antikörpern keine eindeutigen und damit richtungsweisenden Ergebnisse lieferten (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Gründen wurde eine veränderte Klonierungs- bzw. Expressionsstrategie gewählt, mit der analog zu dem hier verwendeten bakteriellen Expressionssystem die spezifische enzymatische Biotinylierung der eukaryotisch exprimierten scFv-Fragmente erreicht werden sollte. Die Markierung der Einzelkettenfragmente mit einer spezifischen Biotinylierung an definierter Position bietet die Möglichkeit des direkten Nachweises mit hoher Sensitivität sowie der Aufreinigung bei pH-neutraler Elution mit Biotin und einer weitergehenden Funktionalisierung über Avidin/Streptavidin. Für diesen Zweck wurde in der AG Nollau eine Umklonierung der beiden scFv-Konstrukte vorgenommen, wodurch diese mit einem C-terminalen *Biotin Carboxyl Carrier Protein* (BCCP; Abb. 3.20 C; s. auch Kap. 4.2.3) vorlagen. Dieses sollte durch HEK293-endogene Biotin-Protein-Ligasen (BPL) bei der Expression an spezifischer Stelle kovalent mit Biotin verknüpft werden.
In diesem Zusammenhang wurden HEK293-Zellen transient mit den entsprechenden scFv-Konstrukten im pEBB-Vektor transfiziert und diese in Anwesenheit von D-(+)-Biotin exprimiert. In der Charakterisierung der konzentrierten Kulturüberstände nach SDS-PAGE wurden Proteine bei erwartungsgemäßer Laufweite detektiert, deren Molekülmasse sich durch Fusion mit dem BCCP-Tag um ca. 10 kDa erhöht hatte (Abb. 3.20 A u. B im Vgl. zu Abb. 3.18). Den Nachweis einer erfolgten Biotinylierung erbrachte die Western Blot-Analyse mit HRP-konjugiertem Streptavidin in Übereinstimmung zur Detektion mit anti-Myc Antikörper.

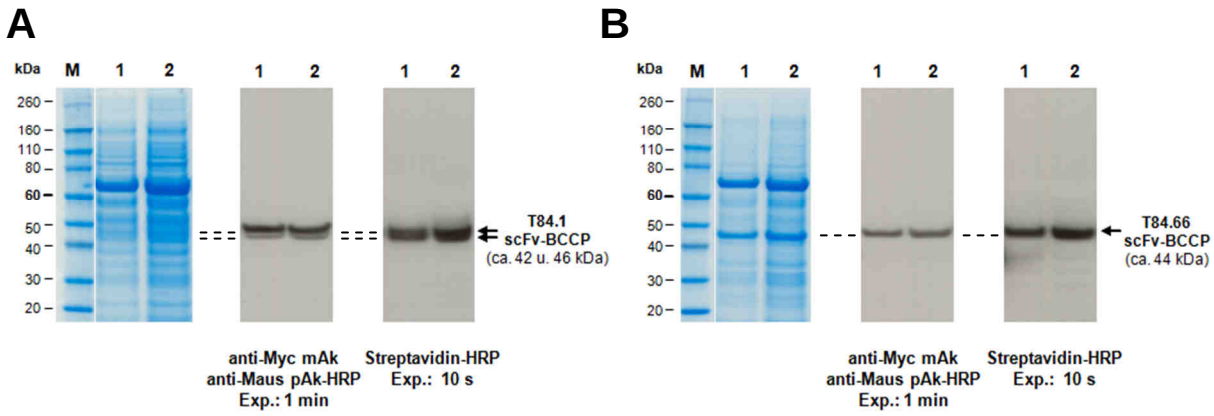


Abb. 3.20:
Charakterisierung der scFv-Fragmente mit BCCP-Tag durch Coomassie-Färbung (links) und Western Blot-Analyse (Mitte, rechts) nach SDS-PAGE. Geladen wurden jeweils 0.25 µg (Spur 1) und 0.5 µg (Spur 2) der scFv-Fragmente aus konzentriertem Kulturüberstand. Der Nachweis im Western Blot erfolgte durch Inkubation mit anti-Myc Antikörper (Mitte) in einer Konzentration von 1 µg/mL und HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:40.000) bzw. mit HRP-konjugiertem Streptavidin (rechts; Verdünnung: 1:100.000). Die gestrichelten Linien in (A) und (B) markieren die Laufhöhe der Zielproteine zwischen den einzelnen Nachweisverfahren.
(A) Nachweise für die durch SDS-PAGE aufgetrennten T84.1 scFv-BCCP-Fragmente.
(B) Nachweise für die durch SDS-PAGE aufgetrennten T84.66 scFv-BCCP-Fragmente.
(C) Proteinsequenz des C-terminal fusionierten BCCP-Tags (theoret. Molekülmasse: 9.32 kDa) aus Carboxytransferase von *P. shermanii* bis zum Stop-Codon (Stern); der magentafarbene Lysinrest stellt die spezifische Biotinylierungsstelle für Biotin-Protein-Ligasen (BPL) dar.

Die Doppelbanden von T84.1 scFv-BCCP (Abb. 3.20 A) waren im Vergleich zu T84.66 scFv-BCCP (Abb. 3.20 B) mit kolloidalem Coomassie relativ schwach anfärbbar, während in den Western Blots dagegen beide Konstrukte mit ähnlicher Signalstärke detektiert wurden (Abb. 3.20 A u. B, Mitte bzw. rechts).
Zur Überprüfung des Einflusses von Biotin im Kulturmedium auf den Biotinylierungsgrad wurden in einem weiteren Experiment exemplarisch gleiche Mengen von T84.66 scFv-BCCP aus Expression mit bzw. ohne Zusatz von Biotin sowie von T84.66 scFv ohne BCCP-Tag durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit Streptavidin-HRP nachgewiesen. Nach *stripping* wurde die Membran erneut mit anti-Myc Antikörper inkubiert. Während mit anti-Myc Antikörper nach *stripping* alle scFv-Konstrukte nachgewiesen wurden, zeigte der vorherige Nachweis mit Streptavidin-HRP nur Signale für T84.66 scFv-BCCP bei Expression mit Biotin im Kulturmedium (s. Abb 3.21).

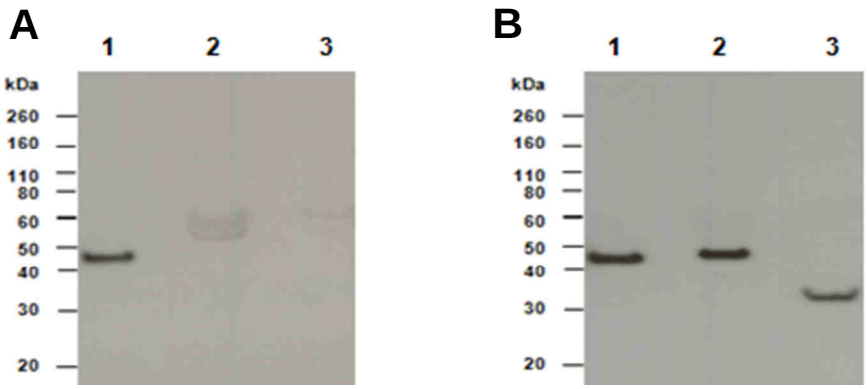


Abb. 3.21:
Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE für verschiedenen Formen von eukaryotisch in HEK293 exprimierten T84.66 scFv: Aufgetrennt wurden je 100 ng T84.66 scFv-BCCP aus Expression mit Biotin (Spur 1), T84.66 scFv-BCCP aus Expression ohne Biotin (Spur 2) sowie T84.66 scFv ohne BCCP-Tag (Spur 3).
(A) Der Nachweis der scFv-Fragmente erfolgte über Behandlung mit Streptavidin-HRP
(Verdünnung: 1:100.000; Expositionszeit: 10 s).
(B) Nach *stripping* wurde die Membran erneut mit anti-Myc Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/mL sowie HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper inkubiert (Verdünnung: 1:40.000; Expositionszeit: 1 min).

Obwohl die Biotinylierung der scFv-Fragmente mit BCCP-Tag aus Expression in HEK293-Zellen bei Kultivierung mit Biotin qualitativ nachgewiesen wurde, konnte analog zu den Vorexperimenten mit anti-Myc bzw. anti-Maus Antikörper keine spezifische Bindung der scFv's im Western Blot bzw. im indirekten ELISA beobachtet werden (s. Abb. 3.27, Kap. 3.2.7). Der Funktionsnachweis konnte erneut nur im kompetitiven ELISA durch Verdrängung FITC-markierter mAk erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Als Ursache wurde eine wenig effiziente Biotinylierung vermutet und entsprechend weiter untersucht. Dazu wurden eine Biotin-abhängige Affinitätschromatographie mit Monomeric Avidin-Agarose sowie ein Pulldown mit Streptavidin-Agarose für die BCCP-scFv-Fragmente vorgenommen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sprachen ebenfalls für eine geringe Biotinylierungseffizienz (s. Abb. 3.22 A u. B).

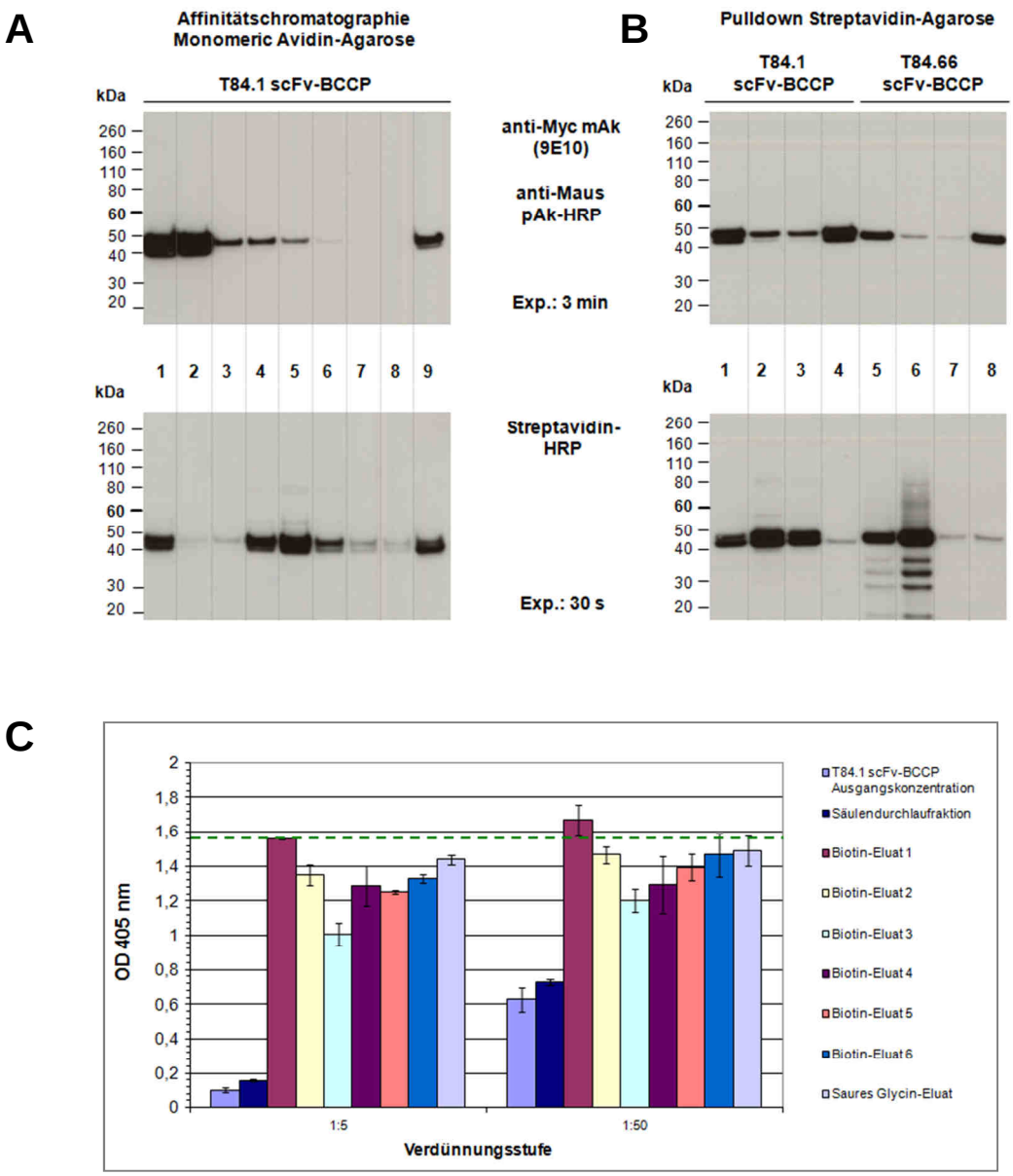


Abb. 3.22:
Charakterisierung der Fraktionen aus Affinitätschromatographie von T84.1 scFv-BCCP mit Monomeric Avidin-Agarose sowie aus Pulldown von T84.1 und T84.66 scFv-BCCP mit Streptavidin-Agarose durch Western Blot-Analyse und kompetitiven ELISA.
(A) Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE für Affinitätschromatographie-Fraktionen von T84.1 scFv-BCCP. Geladen wurden je 10 µL von Proben vor Affinitätschromatographie (Ausgangskonzentration: 25 µg/mL; Spur 1), der Säulendurchlauffraktion (Spur 2), den Biotin-Eluaten 1-6 (Spur 3-8) und eines sauren Glycin-Eluats (Spur 9); der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit anti-Myc Antikörper gefolgt von HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper (oben) sowie mit HRP-konjugiertem Streptavidin (unten) unter den gleichen Bedingungen wie in den vorherigen Assays (s. Abb. 3.20).
(B) Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE für Pulldown-Fraktionen von T84.1 und T84.66 scFv-BCCP. Geladen wurden je 10 µL von Proben vor Affinitätschromatographie (Ausgangskonzentration: 25 µg/mL; Spur 1/Spur 5), den durch Abkochen der *beads* erhaltenen Eluatfraktionen 1 und 2 (Spur 2-3/Spur 6-7) und dem Reaktionsüberstand nach Pulldown (Spur 4/Spur 8); der Nachweis erfolgte wie bei (A).
(C) Kompetitiver ELISA zur Bemessung der Verdrängung von FITC-markiertem T84.1 mAk durch Verdünnungen (1:5 sowie 1:50) der Affinitätschromatographie-Fraktionen von T84.1 scFv-BCCP (s. Abb. 3.27 A). Pro *well* der Mikrotiterplatte wurden 0.5 µg/mL CC1 immobilisiert. Der zu verdrängende, FITC-markierte T84.1 mAk wurde in einer konstanten Konzentration von 0.5 µg/mL eingesetzt. Der Nachweis über HRP-konjugierten anti-FITC mAk sowie Durchführung und Auswertung erfolgten wie in den vorherigen kompetitiven ELISA-Experimenten (s. Abb. 3.5, Kap. 3.1.4). Die gestrichelte grüne Linie zeigt die Absorptionswerte für die konstante Konzentration von FITC-markiertem T84.1 mAk unter nicht-kompetitiven Bedingungen.

Für die Fraktionen aus Affinitätschromatographie (Abb. 3.22 A) und Pulldown (Abb. 3.22 B) wurde im Western Blot bei Nachweis mit anti-Myc Antikörper keine effiziente Retention bzw. Elution der biotinylierten scFv-Fusionsproteine beobachtet. Dagegen zeigte der Nachweis mit Streptavidin-HRP eine so gut wie vollständige Depletion der biotinylierten Fraktion aus der Reaktionslösung sowie eine effiziente Elution. Während jedes scFv-Molekül mit einem Myc-Tag exprimiert wurde, hing der Biotinylierungsgrad wesentlich von der Effizienz verschiedener Faktoren ab. Entsprechend legte der Nachweis mit anti-Myc Antikörper hier ein nur äußerst geringes Maß an Biotinylierung für die eingesetzte scFv-Gesamtmenge nahe. Die Detektion des biotinylierten Anteils mit Streptavidin-HRP bei vergleichbaren Intensitäten war hierbei auf die relativ hohe Sensitivität von Streptavidin zurückzuführen.
Ein kompetitiver ELISA, in dem Verdünnungen der Affinitätschromatographie-Fraktionen von T84.1 scFv-BCCP zur Verdrängung von FITC-markiertem T84.1 mAk eingesetzt wurden, bestärkte diese Befunde (Abb. 3.22 C). Die Verdrängung durch die Eluatfraktionen spiegelte die Signalverteilung im Western Blot mit Streptavidin-HRP wider, mit mengenbedingt jedoch sehr begrenzter Kompetition. Die Fraktion des Säulendurchlaufs und die Probe mit Ausgangskonzentration übten dagegen ein hohes Maß an Kompetition in Einklang zu den starken Signalintensitäten im Western Blot mit anti-Myc Antikörper (s. Abb. 3.22 A, oben).

3.2.6 Optimierung der enzymatischen Biotinylierung bei eukaryotischer Expression

Um eine effizientere enzymatische Biotinylierung der scFv-Fragmente innerhalb des eukaryotischen Expressionssystems in HEK293-Zellen zu erzielen, wurde eine veränderte Klonierungs- bzw. Expressionsstrategie angewendet. Dabei wurden die scFv-Fragmente rekombinant mit Hilfe der Primer *IgkSalfor*/*BAPNotrev* verändert (s. Kap. 2.1.8), so dass sie am C-Terminus eine weitere kurze Peptidsequenz mit der AS-Abfolge GLNDIFEAQKIEWHE (sog. *biotin acceptor peptide;* ca. 1,8 kDa) trugen. Für diese Sequenz galt als sichergestellt, dass sie von der bakteriellen Biotin-Ligase BirA aus *E.coli* erkannt und am Lysinrest (K) mit hoher Effizienz biotinyliert wird (Beckett *et al.*, 1999). Die so amplifizierten Konstrukte wurden über die Schnittstellen SalI/NotI zurück in pEBB kloniert. Für eine vergleichbare Handhabung bei den Klonierungsschritten wurde das BCCP-Tag in den scFv-Konstrukten belassen.
Parallel wurde aus AVB101 *E.coli*-Kulturen das Plasmid pBirAcm isoliert, welches ein rekombinantes Gen für die Biotin-Ligase BirA beinhaltete. Dieses wurde über die Primer *BirABamfor*/*BirANotrev* mittels PCR amplifiziert und anhand der Überhänge aus den Schnittstellen BamHI/NotI nach Restriktionsverdau ebenfalls in den pEBB-Vektor ligiert (s. Abb. 3.23).

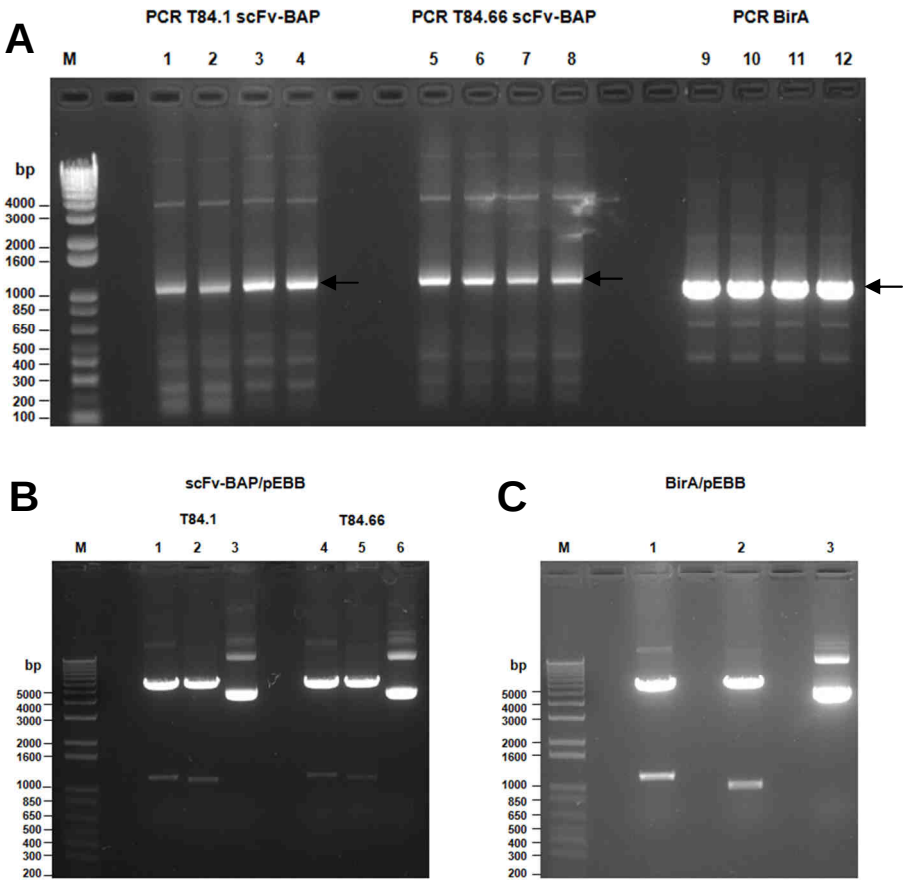


Abb. 3.23:
Anwendung einer alternativen Klonierungsstrategie für den Erhalt einer effizienten enzymatischen Biotinylierung von scFv-Fragmenten aus eukaryotischer Expression durch Einbringen eines *biotin acceptor peptide* (BAP) sowie Klonierung einer rekombinanten Biotinligase (BirA) für die Co-Transfektion.
(A) In einem präparativen Agarosegel (1,2%) wurden die PCR-Ansätze für scFv-BAP-Fragmente von T84.1 (Spur 1-4; 1.136 bp) und T84.66 (Spur 5-8; 1.151 bp) sowie für BirA Biotin-Ligase (Spur 9-12; 1.013 bp) aufgetrennt. Die scFv-Fragmente wurden mit den Primern *IgkSalfor*/*BAPNotrev* amplifiziert unter Verwendung der jeweiligem pC2.1-Konstrukte aus vorherigen Klonierungsschritten als Matrize. Die Amplifikation von BirA erfolgte mit den Primern *BirABamfor*/*BirANotrev* und pBirAcm-Plasmid aus AVB101 als Matrize.
(B) Analytisches Agarosegel (1,2%) zur Bemessung des Klonierungserfolgs für scFv-Fragmente. Geladen wurden die aus transformierten INVaF‘ *E.coli* isolierten pEBB-Plasmide mit T84.1 (Spur 1-3) und T84.66 scFv-BAP (Spur 4-6) nach Restriktionsverdau mit den Enzymen XbaI (Spur 1/Spur 4), SalI/NotI (Spur 2/ Spur 5) sowie unverdautes Plasmid (Spur 3/Spur 6).
(C) Analytisches Agarosegel (1,2%) zur Bemessung des Klonierungserfolgs für die Biotinligase BirA. Geladen wurden die aus transformierten INVaF‘ *E.coli* isolierten pEBB-Plasmide mit BirA nach Restriktionsverdau mit den Enzymen XbaI (Spur 1), BamHI/NotI (Spur 2) sowie unverdautes Plasmid (Spur 3); (M) Marker: 1 kb DNA ladder Plus.

Nach Überprüfung der korrekten Basenabfolge durch Sequenzierung der präparierten Plasmid-DNA wurden HEK293-Zellen mit den pEBB-Plasmiden für die scFv-BAP-Fragmente sowie für das Enzym BirA in einem molaren Verhältnis von 4:1 co-transfiziert. In einem Western Blot-Experiment mit Kulturüberständen aus der Co-Expression zusammen mit gleichen Volumina der zuvor erzeugten BCCP-Konstrukte wurde durch vergleichende Detektion mit anti-Myc Antikörper und HRP-konjugiertem Streptavidin überprüft, ob die neue Strategie für die mit BAP-Sequenz exprimierten scFv-Fragmente bei Co-Expression mit rekombinanter Biotinligase eine Steigerung der enzymatischen Biotinylierungseffizienz erbrachte (Abb. 3.24).

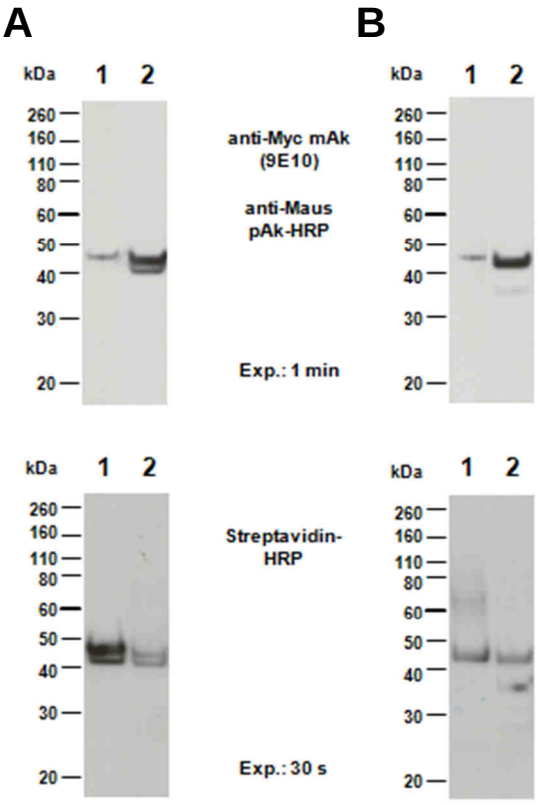


Abb. 3.24:
Western Blot-Analyse zur Abschätzung der enzymatischen Biotinylierungseffizienz für scFv-BAP-Fragmente bei Co-Transfektion von BirA aus eukaryotischer Expression. Geladen wurden 5 µL der Kulturüberstände aus eukaryotischer Expression mit scFv-BAP-Fragmenten bei Co-Expression von BirA (Spur 1) und 5 µL der konzentrierten, umgepufferten scFv-BCCP-Fragmente (enthaltene Menge: 250 ng; Spur 2). Der Nachweis erfolgte über anti-Myc Antikörper (oben) bzw. HRP-konjugiertes Streptavidin (unten) unter den gleichen Bedingungen wie in den vorherigen Experimenten (s. Abb. 3.20)
(A) Nachweis der BAP- und BCCP-Varianten für T84.1 scFv.
(B) Nachweis der BAP- und BCCP-Varianten für T84.66 scFv.

Der Nachweis über anti-Myc Antikörper lieferte stärkere Signale für die scFv-BCCP-Fragmente im Vergleich zu den scFv-BAP-Fragmenten aus Co-Expression mit BirA, wobei hier um ca. Faktor 20 konzentrierte (BCCP) mit nicht konzentrierten Proben (BAP) verglichen wurden. Bei Nachweis mit HRP-konjugiertem Streptavidin allerdings zeigten die scFv-BAP-Fragmente aus Co-Expression mit BirA die stärkeren Signale, was für eine erheblich höhere Biotinylierungseffizienz gegenüber den scFv-BCCP-Fragmenten sprach. Zudem war durch die zusätzliche Fusion mit der BAP-Sequenz für die entsprechenden Fragmente ein geringer Molekülmassenzuwachs zu beobachten, welcher etwa der theoretisch berechneten Größenänderung von 1.8 kDa entsprach.
Nach Bestätigung einer offenbar deutlich erhöhten Biotinylierungseffizienz wurden die scFv-BAP-Fragmente affinitätschromatographisch mittels Monomeric Avidin-Agarose in Analogie zu den Experimenten mit BCCP-scFv-Fragmenten aufgereinigt. Die Charakterisierung der gewonnenen Eluatfraktionen für T84.66 scFv-BAP zusammen mit gleichen Volumina von Ausgangsmaterial und Säulendurchlauf im Western Blot zeigte übereinstimmende Signalverhältnisse zwischen dem Nachweis über anti-Myc Antikörper und HRP-konjugiertes Streptavidin (Abb. 3.25 A). Für T84.1 scFv-BAP wurden vergleichbare Resultate erhalten (Abb. 3.25 B). Auch hier war eine gesteigerte Biotinylierungseffizienz gegenüber den BCCP-Fragmenten zu erkennen, für die in einem analog durchgeführten Experiment unterschiedliche Ergebnisse aus den einzelnen Nachweisverfahren erhalten worden waren (s. Abb. 3.22 A).

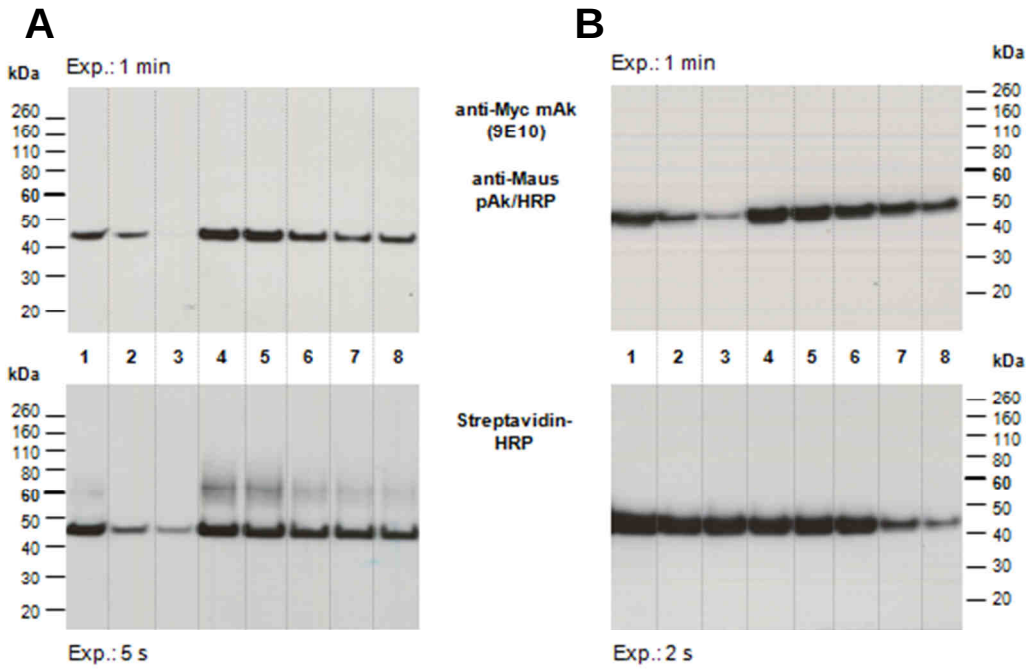


Abb. 3.25:
Western Blot-Analyse der Fraktionen aus Affinitätschromatographie über Monomeric Avidin-Agarose mit eukaryotisch exprimierten scFv-BAP-Fragmenten bei Co-Expression der Biotinligase BirA nach SDS-PAGE. Geladen wurden jeweils 10 µL von konzentriertem Kulturüberstand vor Chromatographie (Spur 1), der Säulendurchlauffraktion (Spur 2) sowie den Biotin-Eluaten 1-6 (Spur 3-8). Der Nachweis mit anti-Myc Antikörper (oben) und HRP-konjugiertem Streptavidin (unten) erfolgte unter gleichen Bedingungen wie in den vorherigen Experimenten (s Abb. 3.20).
(A) Nachweis für die Affinitätschromatographie-Fraktionen von T84.66 scFv-BAP.
(B) Nachweis für die Affinitätschromatographie-Fraktionen von T84.1 scFv-BAP.

3.2.7 Charakterisierung der eukaryotisch exprimierten scFv-Fragmente nach Optimierung der Biotinylierungseffizienz und Biotin-abhängiger Aufreinigung

Für die nach optimierter Klonierungs-/Expressionsstrategie biotinylierten scFv-BAP-Fragmente wurde eine Expression im Großmaßstab vorgenommen. Insgesamt wurden pro scFv-Konstrukt 2 L angereicherter Kulturüberstand gewonnen. Dieser wurde durch Größenausschlussfiltration um ca. Faktor 20 konzentriert und nach Umpufferung vollständig mittels Affinitätschromatographie über Monomeric Avidin-Agarose aufgereinigt. Die vereinigten Eluate wurden erneut aufkonzentriert und zur Entfernung des freien Biotins aus der Elution umgepuffert. Nach semiquantitativer Mengenabschätzung der scFv-Proben durch Vergleich des Schwärzungsgrads mit einem Standardprotein (biotinylierte SH2-Domäne; AG Nollau) im Western Blot (Daten nicht gezeigt) konnte eine gewonnene Gesamtmasse von 350 µg für biotinylierten T84.1 scFv-BAP und 280 µg für biotinylierten T84.66 scFv-BAP bestimmt werden. Die Ausbeuten pro Liter nach Aufreinigung lagen entsprechend bei 175 µg für T84.1 scFv und 140 µg für T84.66 scFv. Die scFv-BAP-Konstrukte wurden als Primärantikörper in einem Western Blot-Experiment mit den rekombinanten Antigenen CC1 und CC5 eingesetzt, um zu testen, ob die durch effizientere Biotinylierung erhöhte Sensitivität bei Dektektion mit HRP-konjugiertem Streptavidin den direkten Nachweis der Antigenbindung für die scFv-Fragmente ermöglichte (Abb. 3.26).

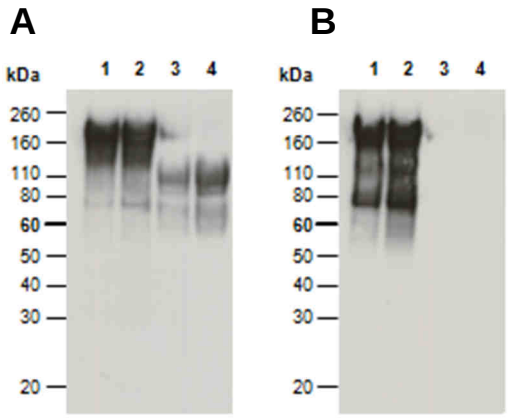


Abb. 3.26:
Western Blot-Analyse zum Nachweis der spezifischen Bindung von scFv-BAP-Fragmenten an die rekombinanten Antigene CEACAM5 (Spur 1-2) und CEACAM1 (Spur 3-4) nach SDS-PAGE. Geladen wurden jeweils 100 ng (Spur 1/Spur 3) sowie 200 ng (Spur 2/Spur 4) der rekombinanten Antigene. Nach Transfer wurden die Membranen mit den scFv-BAP-Fragmenten in einer Konzentration von 1 µg/mL inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit HRP-konjugiertem Streptavidin in einer Verdünnung von 1:100.000.
(A) Inkubation der Membran mit T84.1 scFv-BAP.
(B) Inkubation der Membran mit T84.66 scFv-BAP.
Die Expositionszeit der gezeigten Exponate betrug 10 s.

Die Ergebnisse in Abb. 3.26 A zeigten, dass für T84.1 scFv-BAP eine spezifische Bindung an CC1 bzw. CC5 nachgewiesen werden konnte. Entsprechend der Spezifität von T84.66 mAk wurde bei Inkubation mit T84.66 scFv-BAP ausschließlich CC5 erkannt (Abb. 3.26 B, Spur 1-2).
In einem indirekten ELISA-Assay, bei dem die mit BirA co-exprimierten scFv-BAP-Fragmente ebenfalls als Primärantikörper auf immobilisiertem CC1 bzw. CC5 zusammen mit den zuvor erzeugten scFv-BCCP-Fragmenten eingesetzt wurden, konnten entsprechende Sättigungskurven für die scFv-Antigenbindung erhalten werden (s. Abb. 3.27, blaue und rote Bindungskurve). Für die ebenfalls eingesetzten BCCP-Fragmente (grüne und lilafarbene Markierungen) konnte bei gleichen Bedingungen keine Bindung an die entsprechenden CEACAM-Antigene nachgewiesen werden, obwohl deren Bindungsfähigkeit in kompetitiven Assays bestätigt worden war; wie bereits angenommen, war der Grad der Biotinylierung für die Detektion einer Bindung an die immobilisierten Antigene offenbar unzureichend.

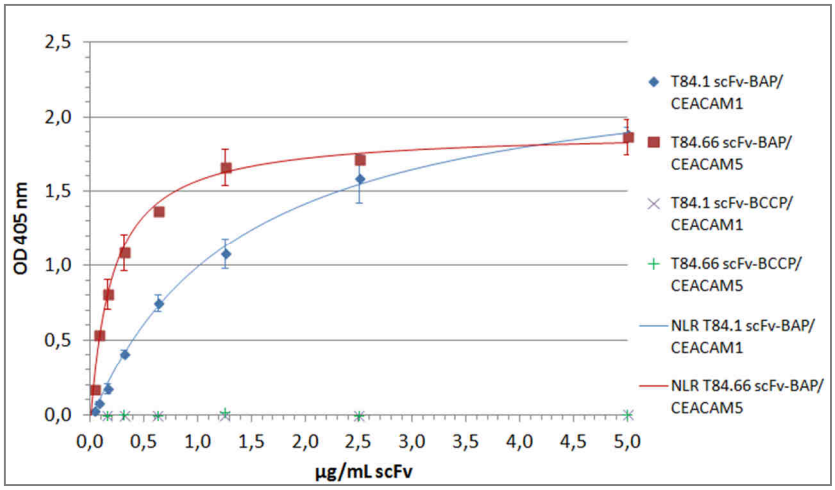


Abb. 3.27:
Vergleichender Einsatz der mit BirA in HEK293 co-exprimierten scFv-BAP-Fragmente sowie der in HEK293 endogen biotinylierten scFv-BCCP-Fragmente als Primärantikörper im indirekten ELISA. Pro *well* der Mikrotiterplatte wurden die rekombinanten CEACAM-Antigene CC1 bzw. CC5 in einer Konzentration von 0.5 µg/mL immobilisiert. Die Inkubation der scFv-Fragmente erfolgte in verschiedenen Konzentrationen über einen Bereich von 0.04 µg/mL bis 5 µg/mL. Der Nachweis wurde mit HRP-konjugiertem Streptavidin in einer Verdünnung von 1:5.000 vorgenommen. Nach Inkubation mit ABTS erfolgte nach 10 min die photometrische Auswertung bei 405 nm. Alle Messungen wurden im Duplikat durchgeführt, die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.

Aufgrund des auffälligen Wanderungsverhaltens von T84.1 scFv hinsichtlich des Doppelbandenmusters wurden die scFv-Fragmente vergleichend auf eine mögliche posttranslationale Modifikation hin untersucht. Dazu wurden Proben der Fragmente u.a. mit verschiedenen Glycosidasen behandelt und anschließend einer Western Blot-Analyse unterzogen (s. Abb. 3.28 A). Nach Inkubation mit der N-Glycosidase PNGase F war für T84.1 scFv die obere der zwei Banden im Western Blot nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.28 A, Spur 2), gleichzeitig war die Intensität der sonst nur schwach aufgeprägten, unteren Bande deutlich erhöht. Bei Behandlung mit der N-Glycosidase EndoH (Spur 3) sowie mit O-Glycosidase (Spur 4) trat dagegen keine Änderung des Bandenmusters im Vergleich zur unbehandelten Probe auf (Spur 1). Das Auftreten einer Doppelbande für T84.1 scFv im Nachweis nach SDS-PAGE war dementsprechend auf die Glykosylierung bei eukaryotischer Expression in HEK293 zurückzuführen. Dabei entstand eine mengenmäßig dominierende Fraktion mit N-glykosyliertem Protein bei einer Molekülmasse von etwa 46 kDa sowie eine nicht glykosylierte Form von ca. 42 kDa, die scheinbar mengenmäßig unterrepräsentiert war. Für T84.66 scFv dagegen trat bei keiner der vorgenommenen Deglykosylierungen eine Änderung des Bandenmusters auf, so dass hier nicht von einer glykosidischen Modifikation auszugehen war (Abb. 3.28 A, Spur 5-8).
Bei Behandlung von T84.1 scFv mit Remove-IT PNGaseF und anschließender Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE wurde ebenfalls beobachtet, dass ausschließlich eine gut färbbare Bande bei ca. 42 kDa vorlag (Abb. 3.28 B, Spur 1), während die unbehandelte Probe zwei schwächer gefärbte Banden bei ca. 42 kDa und 46 kDa zeigte (Abb 3.28 B, Spur 2).

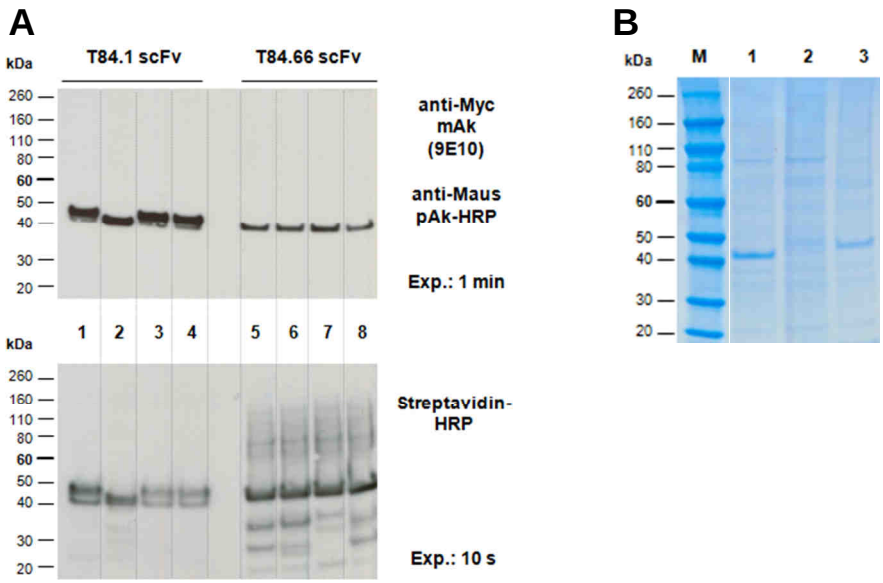


Abb. 3.28:
Charakterisierung der Deglykosylierungsexperimente für T84.1 und T84.66 scFv-BAP-Fragmente nach SDS-PAGE. Geladen wurden jeweils 0.5 µg der scFv-Fragmente aus Inkubation mit verschiedenen Glycosidasen bzw. einer unbehandelten Kontrollprobe. Der Nachweis im Western Blot erfolgte unter gleichen Bedingungen wie in den vorherigen Experimenten (s. Abb. 3.20)
(A) Western Blot-Analyse von Membranen mit unbehandeltem T84.1 bzw. T84.66 scFv-BAP (Spur 1/Spur 5) sowie nach Inkubation mit der N-Glycosidase PNGaseF (Spur 2/Spur 6), EndoH (Spur 3/Spur 7) sowie mit O-Glycosidase (Spur 4**/**Spur 8).
(B) Coomassie-Färbung nach Auftrennung von T84.1 scFv-BAP nach (Spur 1) und vor Inkubation (Spur 2) mit Remove-IT PNGaseF sowie unbehandeltem, nicht glykosylierten T84.66 scFv-BAP-Fragment (Spur 3).

3.2.8 Vergleichender Einsatz der scFv-Fragmente und korrespondierenden mAk für Immunfluoreszenz-Färbung von CEACAM-positiven HT29-Tumorzellen

Nach Bestätigung einer spezifischen und effektiven Bindung der scFv-Fragmente im kompetitiven und indirekten ELISA sowie im Western Blot wurde zusätzlich die Bindung an CEACAM-positiven Zelllinien *in vitro* untersucht. Hierzu wurden semikonfluente, CEACAM1 und CEACAM5 exprimierende HT29-Zellen mit den scFv-Fragmenten sowie mit den biotinylierten mAk T84.1 und T84.66 inkubiert und die Bindung an CEACAM-Proteine auf der Zelloberfläche mittels FITC-markiertem Streptavidin nachgewiesen. Die Spezifität der Bindung wurde zudem durch Vorblockierung der Zellen mit nicht biotinylierten mAk und anschließender Inkubation der analogen scFv-Fragmente überprüft. Als Kontrolle für unspezifische Bindung wurde zusätzlich Bindungsuntersuchungen in parallelen Ansätzen mit biotinyliertem, polyklonalen Maus-IgG durchgeführt.

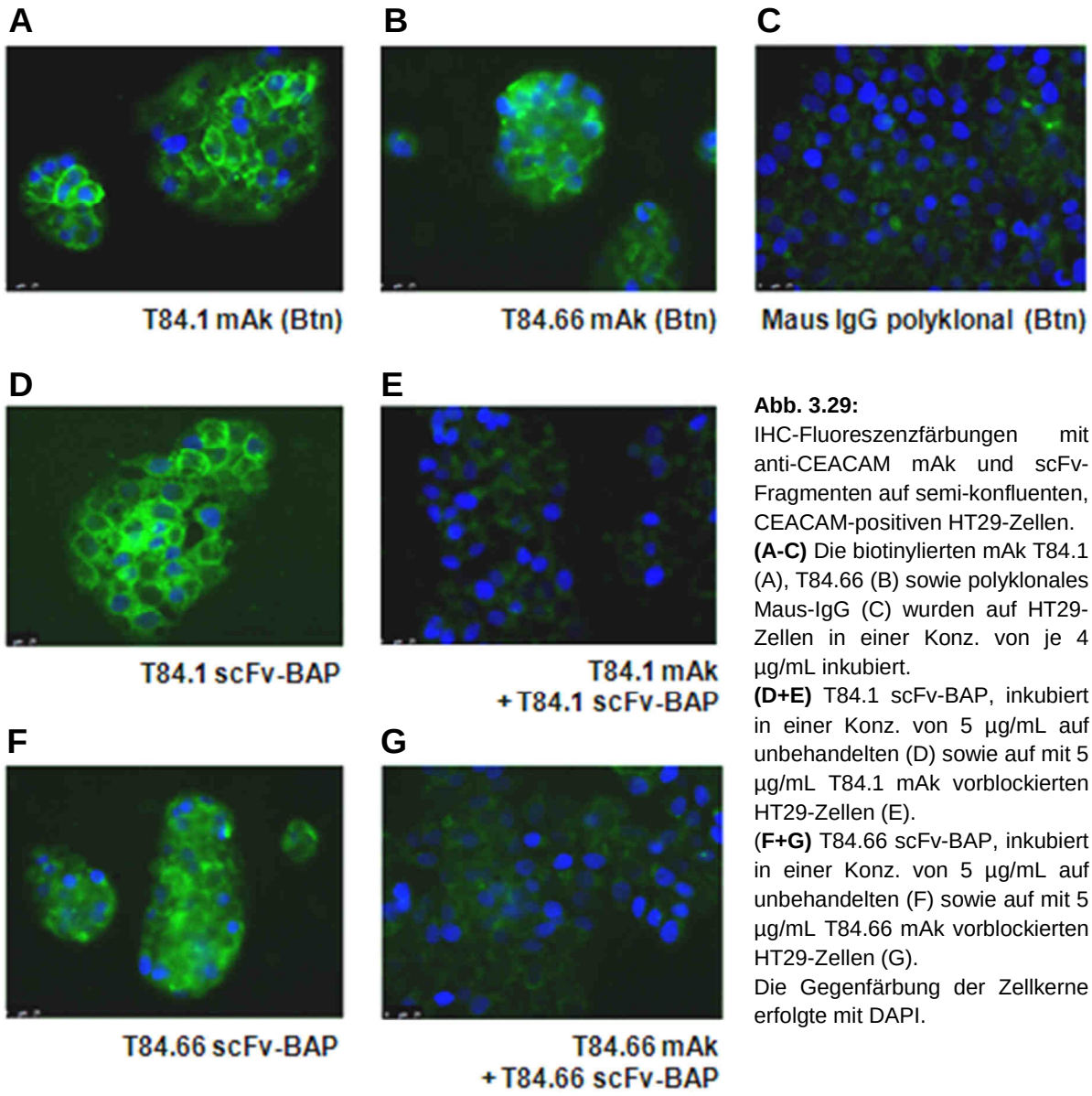


Abb. 3.29:
IHC-Fluoreszenzfärbungen mit anti-CEACAM mAk und scFv-Fragmenten auf semi-konfluenten, CEACAM-positiven HT29-Zellen.
(A-C) Die biotinylierten mAk T84.1 (A), T84.66 (B) sowie polyklonales Maus-IgG (C) wurden auf HT29-Zellen in einer Konz. von je 4 µg/mL inkubiert.
(D+E) T84.1 scFv-BAP, inkubiert in einer Konz. von 5 µg/mL auf unbehandelten (D) sowie auf mit 5 µg/mL T84.1 mAk vorblockierten HT29-Zellen (E).
(**F+G)** T84.66 scFv-BAP, inkubiert in einer Konz. von 5 µg/mL auf unbehandelten (F) sowie auf mit 5 µg/mL T84.66 mAk vorblockierten HT29-Zellen (G).
Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

Die IHC-Färbungen in Abb. 3.29 zeigten spezifische, Membran-lokalisierte Fluoreszenzsignale für biotinylierte T84.1 mAk (Abb. 3.29 A) ebenso wie für die T84.1 scFv-Fragmente (Abb. 3.29 D) und eine membranös-diffuse Fluoreszenz für biotinylierte T84.66 mAk (Abb. 3.29 B) sowie für T84.66 scFv-Fragmente (Abb. 3.29 F) an der CEACAM-positiven Kolonkarzinomzelllinie HT29. Eine Kontrolle mit polyklonalem biotinylierten IgG ergab dagegen keine spezifische Färbung (Abb. 3.29 C). Qualitativ und quantitativ lieferten die scFv-Fragmente dabei eine mindestens ebenso starke Fluoreszenz-Färbung wie die monoklonalen Antikörper. Bei Vorblockierung der CEACAM-Antigene mit nicht-biotinylierten mAk T84.1 und T84.66 konnte das Fluoreszenzsignal für entsprechende biotinylierte scFv-Fragmente nahezu vollständig unterdrückt werden (Abb. 3.29 E u. G), was die Spezifität der Bindung für die scFv-Fragmente zweifellos bestätigte.
Durch diese Experimente konnte die Eignung der erzeugten anti-CEACAM scFv-Fragmente mit enzymatischer Biotinylierung für den hochspezifischen Nachweis von zellulären CEACAM-Antigenen auf (Tumor-)Zellen gezeigt werden. Die Optimierung der enzymatischen Biotinylierungseffizienz durch die gewählte Expressionsstrategie ermöglichte zudem den direkten Nachweis der gebundenen Konstrukte ohne die Notwendigkeit kompetitiver Bedingungen und lieferte weiter den Ausgangspunkt für eine mögliche Funktionalisierung.

3.3 Generierung CEACAM-reaktiver Einzeldomänen-Fragmente (V_HH) von Schwerketten-Antikörpern aus *L. glama*

3.3.1 Immunisierung von *L. glama* mit rCEACAM1 und CEACAM5

Nach Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von monoklonalen Antikörpern sowie scFv-Fragmenten mit CEACAM-Spezifität wurden zusätzlich CEACAM-reaktive V_HH-Fragmente (auch Einzeldomänen-Antikörper oder *nanobodies*) generiert. Hierfür wurde eine Immunisierung von Cameliden (*L. glama*) mit CEACAM-Antigenen vorgenommen, um nach erfolgreicher Immunisierung die Antikörper-kodierenden Nukleinsäuresequenzen aus den Lymphozyten in einen Phagenvektor zu klonieren und mittels *phage display* CEACAM-spezifische V_HH-Phagen zu selektieren. Für die Immunisierung wurden im Vorfeld die Antigene CEACAM1 und CEACAM5 in ausreichender Reinheit und Menge benötigt.
Rekombinantes CEACAM1 wurde durch Expression in HEK293 Zellen hergestellt. Hierfür wurde eine stabil rCEACAM1 exprimierende Zelllinie von der AG Nollau zur Verfügung gestellt. CEACAM5 wurde kommerziell als eukaryotisch exprimiertes Protein von der Fa. Dianova bezogen. Für die Herstellung von rCEACAM1 im Großmaßstab wurden im Rahmen dieser Arbeit gesammelte Zellkulturüberstände von entsprechenden Expressionskulturen um ca. Faktor 20 konzentriert und nach Umpufferung mit Concanavalin A (Con A; aus *C. ensiformis*) konjugierter Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt. CEACAM1 wurde dabei aufgrund seines starken Glykosylierungsgrads selektiv durch das Lectin Con A gebunden. Die anschließende Elution erfolgte mit Methyl-α-D-Mannopyranosid. Die verschiedenen Fraktionen wurden im Western Blot mit T84.1 mAk auf die erfolgreiche Anreicherung von rCEACAM1 in den Eluatfraktionen untersucht (Abb. 3.30 A). Nach deren Bestätigung wurden für die vereinigten, konzentrierten und in steriles DPBS überführten

Eluate 1-5 eine photometrische Konzentrationsbestimmung als auch eine Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE vorgenommen, um die Reinheit des Immunogens zu überprüfen (s. Abb. 3.30 B).

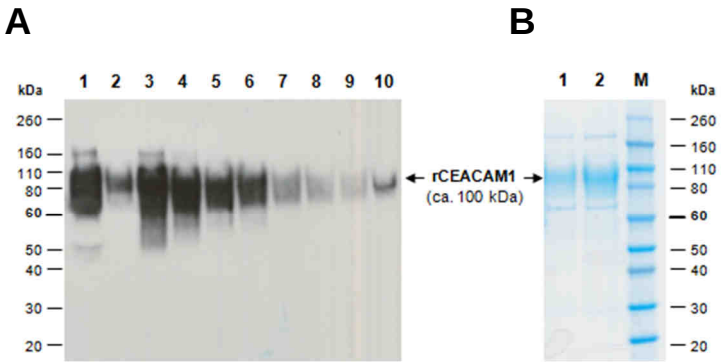


Abb. 3.30:
Charakterisierung der affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinantem CEACAM1 mit Con A-Agarose durch Western Blot-Analyse und Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE.
(A) Für die Western Blot-Analyse wurden je 2 µL von einer Probe vor Affinitätschromatographie (Spur 1), von der Durchlauffraktion der Säule (Spur 2) sowie von den Eluatfraktionen 1-8 (Spur 3-10) geladen. Für den Nachweis erfolgte die Inkubation der Membran mit T84.1 mAk in einer Konz. von 1 µg/mL sowie mit HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:40.000). Die Expositionszeit betrug 20 s.
(B) Für die Coomassie-Färbung zur Abschätzung der Reinheit wurden 2 µg (Spur 1) und 4 µg (Spur 2) des Endprodukts nach Aufreinigung sowie Umpufferung der vereinigten Eluate von CC1 geladen. (M) Marker: Novex Prestained Protein Ladder.

Die Gesamtmenge betrug 6,3 mg für das gewonnene rCEACAM1, welches entsprechend der Analyse durch Coomassie-Färbung schätzungsweise in einer Reinheit von ≥ 90% vorlag. Für die Immunisierung der Lamas wurden initial 500 µg von jedem Peptid-Antigen injiziert und im Abstand von mehreren Wochen zusätzliche Folgeimmunisierungen (*boosts*) durch Injektion von weiteren 500 µg der Antigene bewirkt. Insgesamt wurden 7 Immunisierungen über einen Zeitraum von 26 Wochen durch Frau Dr. Moors im Department für Nutztierwissenschaften der Universität Göttingen vorgenommen.
Zur Beurteilung des Immunisierungserfolgs wurden die nach jeder Immunisierung aus Vollblut präparierten Seren in einem indirekten ELISA mit den rekombinanten Antigenen CEACAM1 und CEACAM5 inkubiert und auf eine spezifische Bindung von enthaltenen Immunglobulinen mit anti-Lama Sekundärantikörper untersucht. Zu Kontrollzwecken hinsichtlich einer unspezifischen Reaktivität wurden die Seren parallel auf BSA inkubiert. Wie Abb. 3.31 zeigt, erfolgte die Ausbildung einer CEACAM-spezifischen Immunantwort für beide Lamas nach der 5. Folgeimmunisierung (Woche 23). Dabei lieferte das Serum des mit CEACAM1 immunisierten Lamas (#6) eine spezifische Immunantwort gegenüber CEACAM1 (s. Abb. 3.31 A), während das Serum des mit CEACAM5 immunisierten Lamas (#20) eine ähnlich starke Immunreaktivität sowohl für CEACAM5 als auch CEACAM1 entwickelte (s. Abb. 3.31 B). Die Reaktivität der Seren gegenüber BSA als unspezifische Kontrolle blieb dagegen im Bereich des Hintergrund-Signalniveaus der ELISA-Messung.

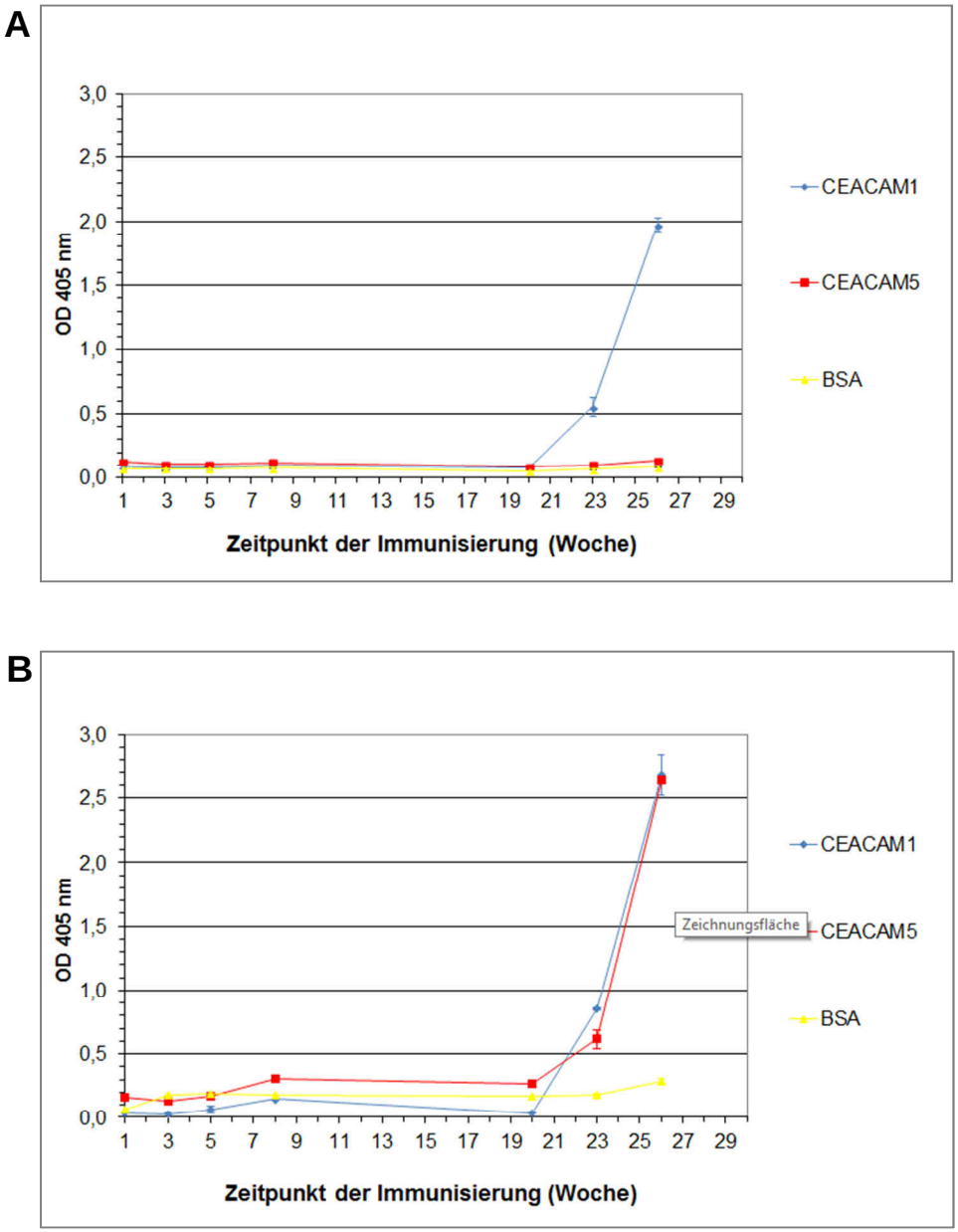


Abb. 3.31:
Charakterisierung des Immunisierungserfolgs durch Vermessung der verdünnten Seren mit CC1 und CC5 immunisierter Lamas im indirekten ELISA. Pro well der Mikrotiterplatte wurden 0.5 µg/mL der Antigene CC1 und CC5 sowie 0.5 µg/mL BSA zur Kontrolle einer unspezifischen Reaktivität immobilisiert. Die nach Immunisierung der Lamas entnommenen Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1.000 in DPBS inkubiert und mit HRP-konjugiertem Ziege-anti-Lama Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:10.000) nachgewiesen. Nach Inkubation mit ABTS erfolgte nach 15 min die photometrische Auswertung bei 405 nm. Alle Messungen wurden im Duplikat durchgeführt, die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.
(A) Dargestellt ist der Verlauf der Immunreaktivität für das Serum des mit CC1 immunisierten Lamas #6 gegenüber CC1, CC5 sowie BSA als Kontrolle für das Maß einer unspezifischen Bindung.
(B) Dargestellt ist der Verlauf der Immunreaktivität für das Serum des mit CC5 immunisierten Lamas #20 gegenüber CC1, CC5 sowie BSA als Kontrolle für das Maß einer unspezifischen Bindung.

Nach diesen Befunden wurde weiter eine quantitative Bestimmung des Immuntiters vorgenommen. Hierzu wurden serielle Verdünnungen für die nach Immunisierung in Woche 20 (vor Ausbildung eines nachweisbaren Immuntiters) und nach abschließender Immunisierung in Woche 26 aus Vollblut gewonnenen Lamaseren mit DPBS angesetzt, wobei der Startpunkt der Verdünnungsreihe 1:300 betrug. Die Verdünnungsreihen wurden in einem indirekten ELISA auf dem jeweils für die Immunisierung verwendeten Antigen sowie auf BSA zur Kontrolle vermessen.

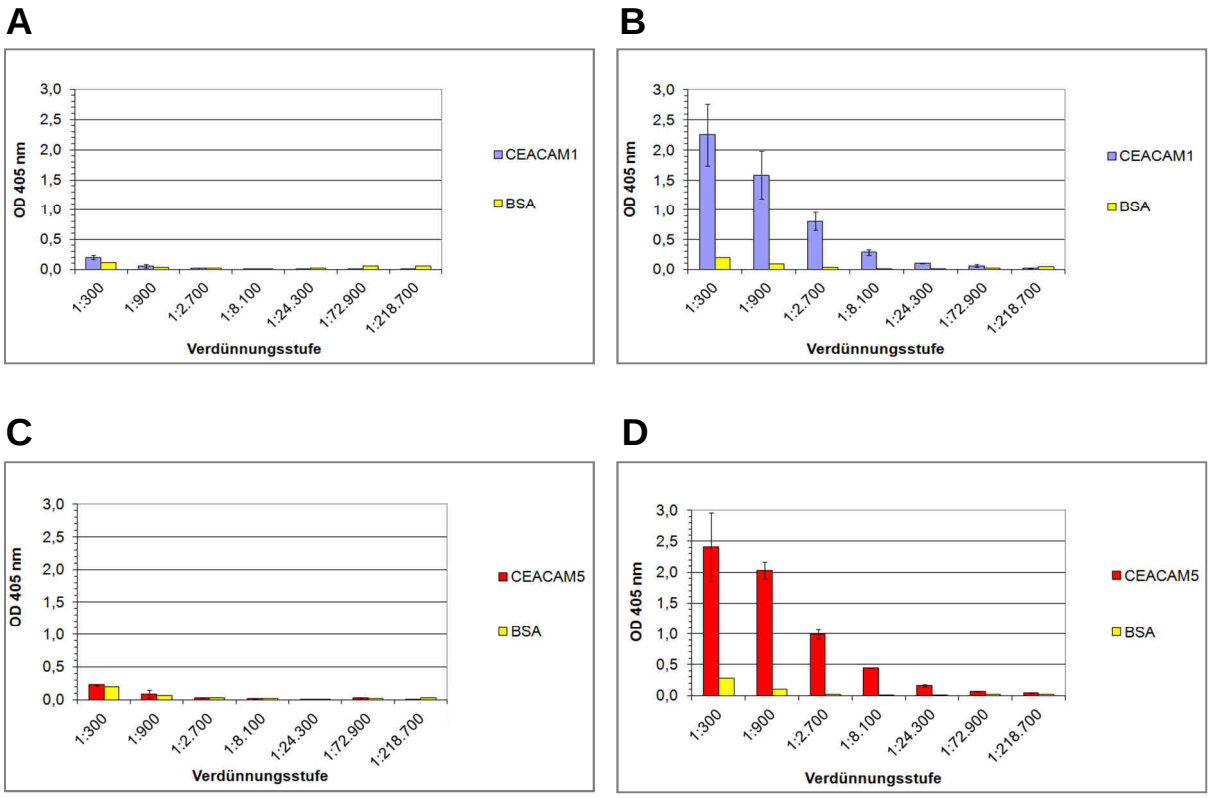


Abb. 3.32:
Ermittlung des Immuntiters für die Seren mit CC1 bzw. CC5 immunisierter Lamas durch serielle Verdünnung und Vermessung der Immunreaktivität im indirekten ELISA. Pro *well* wurden 0.5 µg/mL der rekombinanten Antigene CC1 und CC5 sowie 0.5 µg/mL BSA zur Kontrolle einer unspezifischen Reaktivität immobilisiert. Die Lamaseren wurden als serielle Verdünnung mit DPBS in 3er-Schritten über einen Intervall von 1:300 bis 1:218.700 inkubiert und mit HRP-konjugiertem Ziege-anti-Lama Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:10.000) nachgewiesen. Nach Inkubation mit ABTS erfolgte nach 10 min die photometrische Auswertung bei 405 nm. Alle Messungen wurden im Triplikat durchgeführt, die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.
(A) Inkubation von Serum des mit CC1 immunisiertem Lama #6 nach Immunisierung in Woche 20 auf CC1
(B) Inkubation von Serum des mit CC1 immunisiertem Lama #6 nach Immunisierung in Woche 26 auf CC1
(C) Inkubation von Serum des mit CC5 immunisiertem Lama #20 nach Immunisierung in Woche 20 auf CC5
(D) Inkubation von Serum des mit CC5 immunisiertem Lama #20 nach Immunisierung in Woche 26 auf CC5

Innerhalb eines Immunisierungszeitraums von 20 Wochen trat für die Seren beider Lamas wie zuvor beschrieben keine signifikante Immunreaktivität auf (s. Abb. 3.32 A u. C). Für die nach der Immunisierung in Woche 26 gewonnenen Seren konnte dagegen eine signifikante, konzentrationsabhängige Bindung an das jeweilige CEACAM-Antigen beobachtet werden. Dabei wurde ein Immuntiter von 1:10.000 für Serum #6 bezogen auf CEACAM1 und von 1:25.000 für Serum #20 bezogen auf CEACAM5 im Vergleich zur Bindungskontrolle mit BSA ermittelt (s. Abb. 3.32 B u. D).

3.3.2 Charakterisierung der Seren CEACAM-immunisierter Lamas

3.3.2.1 Bestimmung der differenziellen CEACAM-Spezifität für Lamaseren nach Immunisierung

Um die vorliegende Spezifitätsbreite der Vollseren für unterschiedliche Proteine der CEACAM-Familie überprüfen zu können, wurden Lysate verschiedener CEACAM-exprimierender Zellen sowie die rekombinanten Antigene CEACAM1 und CEACAM5 durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Membranen wurden nach Transfer mit Verdünnungen der Seren vor (Woche 20) und nach Ausbildung einer CEACAM-spezifischen Immunantwort (Woche 26) sowie mit den mAk T84.1 und T84.66 inkubiert.

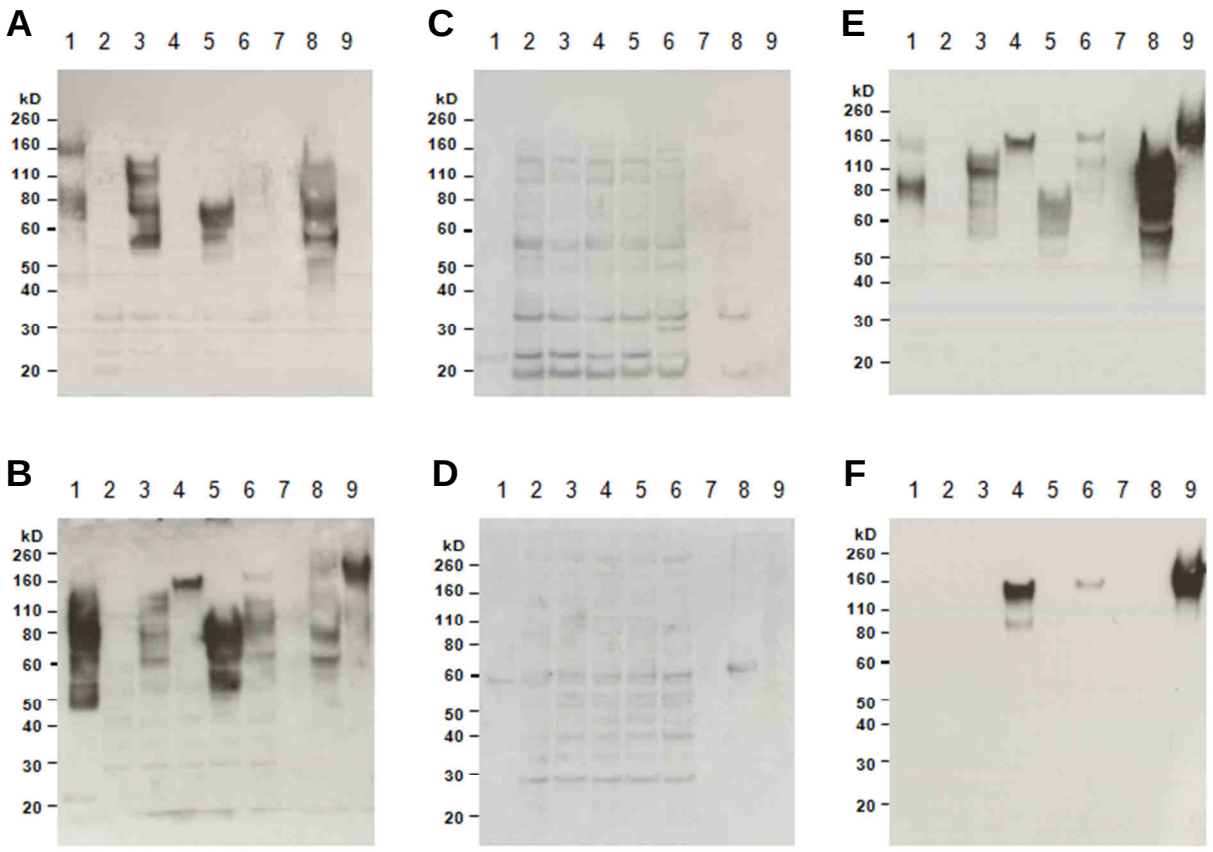


Abb. 3.33:
Western Blot-Analyse der CEACAM-Spezifität für Verdünnungen der Vollseren mit CC1/CC5 immunisierter Lamas nach SDS-PAGE. Geladen wurden je 50 µg Gesamtproteinmenge von humanem Granulozytenextrakt (Gran.; Spur 1), untransfiziertem HEK293-Lysat (Spur 2), von HEK293-Transfektomen mit CC1 (Spur 3), CC5 (Spur 4) und CC6 (Spur 5) und HT29-Lysat (Spur 6) sowie 100 ng der rekombinanten Antigene CC1 (Spur 8) u. CC5 (Spur 9). Die Membranen wurden inkubiert mit 1:2000-Verdünnungen der Seren vor (Woche 20) und nach Ausbildung einer spezifischen Immunantwort (Woche 26) sowie mit monoklonalen anti-CEACAM Antikörpern in einer Konz. von 1 µg/mL. Der Nachweis erfolgte mit HRP-konjugierten Sekündärantikörpern gegen Lama für die Seren (Verdünnung: 1:50.000) bzw. gegen Maus für die mAk (Verdünnung: 1:40.000).
(A) Inkubation mit Immunserum #6 (nach Woche 26); Expositionszeit: 5 min
(B) Inkubation mit Immunserum #20 (nach Woche 26); Expositionszeit: 10 min
(C) Inkubation mit Immunserum #6 (nach Woche 20); Expositionszeit: 10 min
(D) Inkubation mit Immunserum #20 (nach Woche 20); Expositionszeit: 10 min
(E) Inkubation mit T84.1 mAk; Expositionszeit: 1 min
(F) Inkubation mit T84.66 mAk; Expositionszeit: 10 min

Die in Abb. 3.33 dargestellten Western Blot-Ergebnisse zeigten eine spezifische Reaktivität der Immunseren nach abgeschlossener Immunisierung (Woche 26) für verschiedene CEACAM-Proteine. Die Seren aus Woche 20 dagegen lieferten nur geringfügige Signale, die am ehesten als unspezifische Hintergrundschwärzung einzustufen waren (Abb. 3.33 C+D). In Abgleich mit den Erkennungsschemata der mAk T84.1 und T84.66 (Abb. 3.33 E+F) wurde bei Inkubation von Immunserum #6 (anti-CC1) eine spezifische Bindung für die vorliegenden CEACAM1-Isoformen sowie für CEACAM6 (NCA) nachgewiesen (Abb. 3.33 A).
Dies traf weitgehend auch für Immunserum #20 (anti-CC5) zu, welches im Gegensatz zu Serum #6 zwar nicht die verlängerte CC1-Isoform in Granulozytenextrakt (~160 kDa; Abb. 3.33 B, Spur 1), dafür allerdings auch CEACAM5 erkannte (Abb. 3.33, Spuren 4, 6 und 9), mit dem das betreffende Lama immunisiert worden war. Die differenziellen Spezifitäten der Immunseren bzw. mAk für verschiedene CEACAM-Proteine in den unterschiedlichen Zelltypen einschließlich einer Abschätzung der relativen Signalintensitäten sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

	Immunserum #6 (anti-CC1)	**Immunserum #20 (anti-CC5)**	**T84.1 mAk**	**T84.66 mAk**
CC1 (160 kDa)/ Granulozyten	++	-	+	-
CC6 (50-80 kDa)/ Granulozyten	++	+++	++	-
CC1 (55-140 kDa)/ HEK-Transfektom	+++	++	++	-
CC5 (180 kDa)/ HEK-Transfektom	-	+++	++	+++
CC6 (50-80 kDa)/ HEK-Transfektom	++	+++	++	-
CC1 (120 kDa)/ HT29-Lysat	(+)	++	+	-
CC5 (180 kDa)/ HT29-Lysat	-	+	+	+
CC6 (80 kDa)/ HT29-Lysat	(+)	++	(+)	-
rCEACAM1 (55-120 kDa)	+++	++	+++	-
rCEACAM5 (80-160 kDa)	-	+++	+++	+++

Tab. 3.1: Übersicht der differenziellen Spezifität von Seren CEACAM-immunisierter *L. glama* sowie CEACAM-spezifischer mAk T84.1 und T84.66; da Zelltyp-abhängig verschiedene Isoformen bzw. Subfraktionen mit unterschiedlichem Glykosylierungsgrad für CEACAM-Moleküle auftreten, sind entsprechend Molekülmassen-bereiche angegeben, die für die betreffenden CEACAM-Mitglieder das Spektrum von nicht-glykosyliertem bis zum maximal glykosylierten Protein widerspiegeln (s. auch Kap. 1.1.2 sowie Kap. 3.1.2, Abb. 3.2)

3.3.2.2 Trennung der cIgG-Subfraktionen in Lamaseren durch kombinierte Protein G/Protein A-Affinitätschromatographie

Bei Cameliden liegen zwei cIgG-Fraktionen von Schwerketten-Antikörpern, deren Antigen-bindender Teil aus nur einer einzigen Domäne besteht, neben den konventionellen Antikörpern der cIgG1-Subklasse mit schweren und leichten Ketten vor (s. Kap. 1.2.4). Ein für unterschiedliche Vertreter der Cameliden beschriebenes Verfahren zur Isolierung der einzelnen cIgG-Subfraktionen wurde in modifizierter Form entsprechend Abb. 3.34 für die hier gewonnenen Immunseren aus *L. glama* angewendet (Hamers-Casterman *et al.*, 1993; van der Linden *et al.*, 2000; Reyelt, 2008). Dabei wurde eine Trennung der Subfraktionen durch kombinierte, serielle Affinitätschromatographie über Protein G/Protein A und Elution bei unterschiedlichen pH-Werten erreicht.

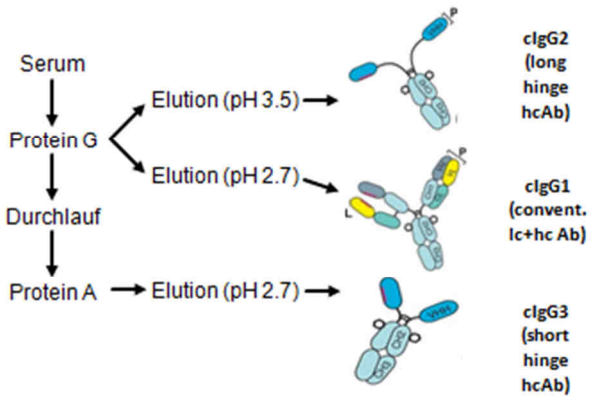


Abb. 3.34:
Schematische Darstellung der Auftrennung verschiedener cIgG-Antikörper aus Cameliden-Serum in die konventionelle cIgG-Subklasse mit schweren und leichten Ketten (cIgG1) sowie die beiden Schwerkettenantikörper-Subklassen mit kurzer (cIgG3) und langer Scharnierregion (cIgG2) durch kombinierte Affinitätschromatographie über Protein G/Protein A und Elution bei verschiedenen pH-Werten nach Hamers-Casterman *et al.*, 1993, mit Modifikationen für Seren von *L. glama* in Anlehnung an van der Linden *et al.*, 2000 und Reyelt, 2008 (Abb. mod. nach: Wesolowski *et al.*, 2009; Hussack, 2011).

Die Trennung der cIgG-Subtypen cIgG2 (*long hinge*) und cIgG1 (conv.) erfolgte über eine HiTrap Protein G HP-Säule mittels HPLC und Elution bei pH 3.5 und pH 2.7. Der hierbei erhaltene Durchlauf wurde anschließend in einer Säule mit Protein A-Agarose inkubiert und die verbliebene Schwerkettenfraktion cIgG3 (*short hinge*) bei pH 2.7 eluiert. Aus dem Chromatogramm (Abb. 3.35 A u. B) der Trennung von cIgG2 und cIgG1 über Protein G zeichnete sich ein deutlicher Mengenunterschied in beiden Seren für die selektiv eluierten cIgG-Subtypen ab. Hiernach lag schätzungsweise eine 10-fach höhere Konzentration konventioneller cIgG1-Antikörper im Vergleich zur Schwerketten-Spezies cIgG2 (*long hinge*) vor. Für die von Protein A eluierte cIgG3-Subfraktion in beiden Seren wurde photometrisch eine vergleichbare Konzentration wie für cIgG2 ermittelt.
Durch Coomassie-Färbung nach Auftrennen der cIgG-Subfraktionen per SDS-PAGE (s. Abb. 3.35 C u. D) konnte die vollständige Separation bestätigt werden; während die cIgG1-Subfraktion unter reduzierenden Bedingungen eine Bande bei ca. 55 kDa für die schweren Ketten sowie eine weitere bei ca. 25 kDa für die leichten Ketten aufwies, wurde bei den beiden Fraktionen cIgG2 und cIgG3 jeweils nur eine Bande bei ca. 50 kDa für die schweren Ketten angefärbt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte cIgG1 eine dem intakten mAk-Molekül entsprechende Bande bei einer Molekülmasse von ca. 160 kDa und cIgG2 bei etwa 100 kDa, cIgG3 lieferte dagegen eine Bande bei ca. 80 kDa für das intakte Molekül.

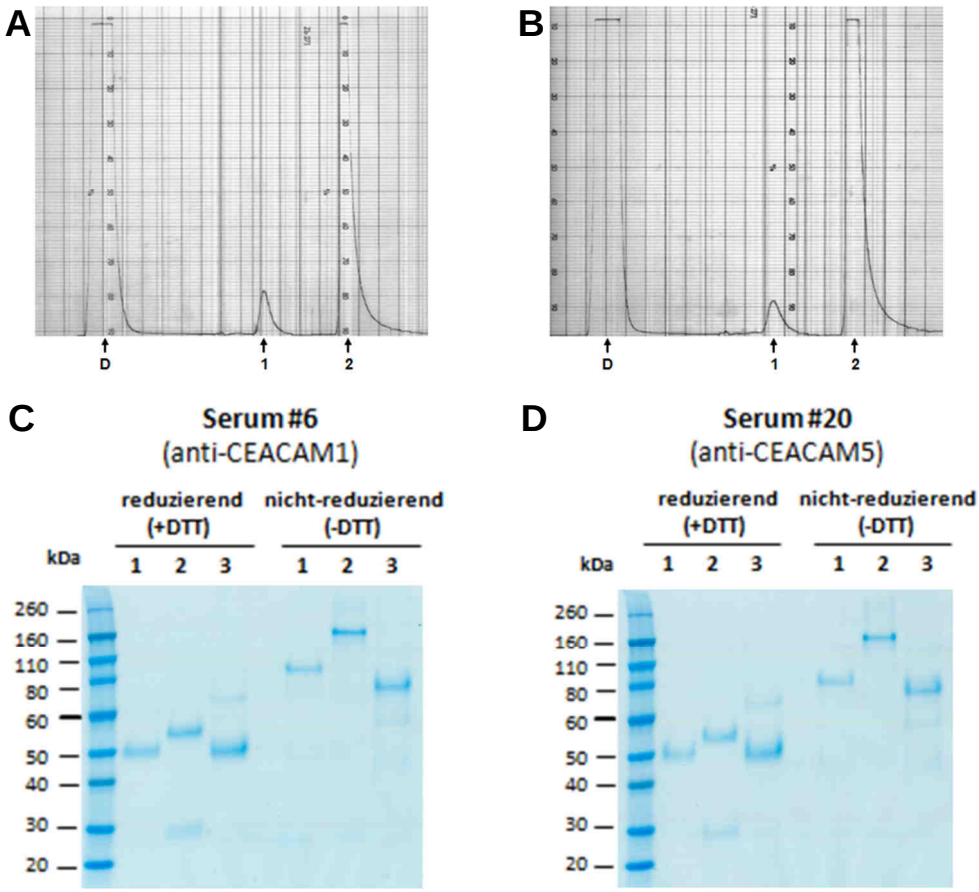


Abb. 3.35:
Charaktierisierung der Fraktionierung von cIgG-Subtypen aus Seren CEACAM-immunisierter Lamas.
(A+B) Chromatogramme der Protein G-Affinitätschromatographie durch HPLC für die Lamaseren #6 (A) und #20 (B). Die erste photometrisch detektierte Proteinfraktion beinhaltete den Säulendurchlauf (D), danach erfolgte die selektive Elution des cIgG2-Subtyps (*long hinge*) mit 0.58% AcOH, pH 3.5 (1) sowie des konventionellen cIgG1-Subtyps mit 0.1 M Glycin, pH 2.7 (2)
(C+D) Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE. Geladen wurde je 1 µg der eluierten cIgG-Subfraktionen cIgG2 (*long hinge*; Spur 1), konventioneller cIgG1 mit schweren und leichten Ketten (Spur 2) und cIgG3 (*short hinge*; Spur 3) unter reduzierenen (+DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) für die Seren der Lamas #6 (C) und #20 (D)

Vor der Affinitätschromatographie wurden für die Seren der Lamas Gesamtprotein-konzentrationen von 41 mg/mL (#6) sowie 53 mg/mL (#20) per Bradford-Assay bestimmt. Die Summe der erhaltenen cIgG-Antikörperfraktionen nach Affinitätschromatographie über Protein G/Protein A pro mL lag für Serum #6 bei 3.08 mg und für Serum #20 bei 5.5 mg, was einem prozentualen Anteil der cIgG-Antikörper am Serumgesamtprotein von 7.5% (#6) sowie von 10.4% (#20) entsprach. Die jeweiligen Anteile der cIgG-Subfraktionen an der cIgG-Gesamtkonzentration nach abgeschlossener Lama-Immunisierung sind in Tab. 3.2 zusammengefasst:

	Serum #6 (anti-CC1)	**Serum #20 (anti-CC5)**
cIgG2 (long hinge)	0.62 mg/mL (20.1%)	0.44 mg/mL (8%)
cIgG1 (conv. lc + hc)	1.91 mg/mL (62%)	4.5 mg/mL (81.8%)
cIgG3 (short hinge)	0.55 mg/mL (17.9%)	0.56 mg/mL (10.2%)

Tab. 3.2: Übersicht der cIgG-Konzentrationen bzw. des relativen Anteils an der cIgG-Gesamtkonzentration für die Subfraktionen aus Lamaseren nach Protein G/Protein A-Affinitätschromatographie und photometrischer Vermessung

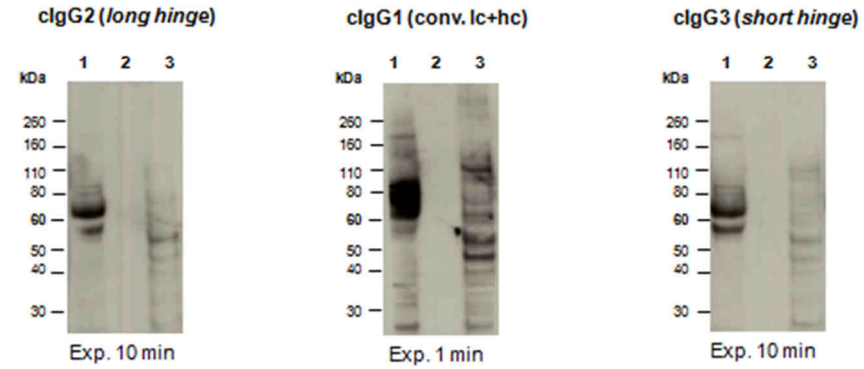
3.3.2.3 Charakterisierung der isolierten cIgG-Subtypen hinsichtlich CEACAM-Spezifität

Für die selektiv eluierten cIgG-Subfraktionen der Lamaseren wurde erneut die differenzielle CEACAM-Spezifität überprüft. In Hinblick auf ein *phage display* zur Selektion CEACAM-reaktiver V_HH-Domänen war hierbei vor allem die Spezifität der beiden Schwerketten-Antikörperfraktionen von Interesse. Dazu wurden zusammen mit rekombinantem CC5 die Lysate von HEK293-Transfektomen mit CC1 und CC6 per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit angepassten Volumina der isolierten cIgG-Subfraktionen für den Erhalt vergleichbarer Signale behandelt.
Für alle Fraktionen von Serum #6 (anti-CC1) konnte eine spezifische Bindung in Spur 1 mit CC1-Transfektom beobachtet werden (Abb. 3.36; vor IP, Serum #6). Die Signale erstreckten sich dabei vor allem über den Bereich von etwa 70-90 kDa, möglicherweise durch eine Präferenz für weniger glykosylierte Isoformen von CC1. Zudem wurde eine Bande bei ca. 55 kDa detektiert, die vermutlich nicht glykosyliertem CC1-Protein entspricht. An CC5 (Spur 2) erfolgte wie schon zuvor keine Bindung, allerdings konnte auch an CC6 (Spur 3) keine spezifische Interaktion mehr für die cIgG-Subtypen aus Serum #6 nachgewiesen werden. Alle drei aus Serum #20 (anti-CC5) isolierten Subtypen zeigten eine spezifische Bindung für CC1, CC5 und CC6 (Abb. 3.36; vor IP, Serum #20). Auch hier lagen die Bindungssignale in Spur 1 mit CC1-Transfektom wesentlich im Molekülmassenbereich von ca. 60-100 kDa.
Aufgrund der abweichenden Resultate für die cIgG-Subfraktionen hinsichtlich einer spezifischen Erkennung von CC1 und CC6 im Vergleich zu den Vollseren wurde eine Immunpräzipitation (IP) von CC1 und CC6 mit T84.1 mAk und Protein G-Agarose aus den entsprechenden HEK293-Lysaten vorgenommen und die Western Blot-Analyse wiederholt. Nach IP wurde für die Subtypen cIgG3 (*short hinge*) und cIgG1 (conv.) aus Serum #6 eine schwache, aber spezifische Bindung für CC1 bei einer Molekülmasse von ca. 120 kDa (Spur 1, Abb. 3.36; nach IP, Serum #6) beobachtet. Die entsprechende Isoform war scheinbar – in Übereinstimmung mit dem Bindungsmuster von T84.1 mAk im Western Blot – bevorzugt bei der Immunpräzipitation angereichert worden. Auch nach IP erfolgte an CC6 keine spezifische Bindung (Spur 3). Für cIgG2 (*long hinge*) aus Serum #6 konnte nach Immunpräzipitation in mehreren Versuchen keinerlei spezifische CEACAM-Bindung mehr vorgefunden werden. Im Gegensatz dazu waren alle drei Subtypen aus Serum #20 nach wie vor reaktiv gegen die vorhandenen CEACAM-Proteine (Abb. 3.36; nach IP, Serum #20). cIgG2 (*long hinge*) erkannte dabei CC6 besonders stark im Verhältnis zu den anderen CEACAM-Varianten. cIgG3 (*short hinge*) zeigte starke Signale für CC5 und CC6 im Vergleich zu CC1.

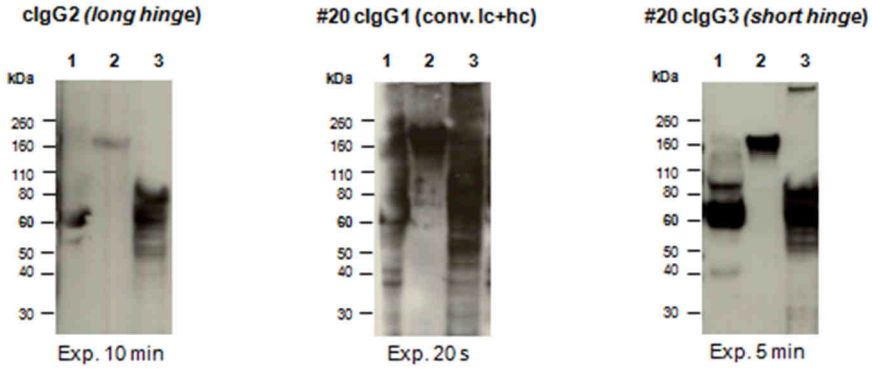
Abb. 3.36:
Western Blot-Analyse der CEACAM-Spezifität für cIgG-Subtypen immunisierter Lamas vor und nach Immunpräzipitation (IP) von CC1 und CC6 aus Lysaten transfizierter HEK293- Zellen mit T84.1 mAk.
Vor IP: Geladen wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein von HEK293-Transfektom mit CC1 (Spur 1), 100 ng rekombinantes CC5 (Spur 2) und 50 µg Gesamtprotein von HEK293-Transfektom mit CC6 (Spur 3)
Nach IP: Geladen wurden jeweils 8 µL (von 40 µL Gesamtvolumen) der IP für HEK293-Transfektom mit CC1 (Spur 1), 100 ng rekombinantes CC5 (Spur 2) und 8 µL (von 40 µL) der IP für HEK293-Transfektom mit CC6 (Spur 3).
Die Membranen wurden nach SDS-PAGE inkubiert mit den zuvor isolierten Subfraktionen cIgG2 (*long hinge*; links; Verdünnung: 1:10), cIgG1 (konventioneller IgG; Mitte; Verdünnung: 1:200) und cIgG3 (*short hinge*; rechts; Verdünnung: 1:20). Der Nachweis erfolgte mit HRP-konjugiertem anti-Lama Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:50.000).

Vor IP:

Serum #6 (anti-CEACAM1) cIgG-Subfraktionen

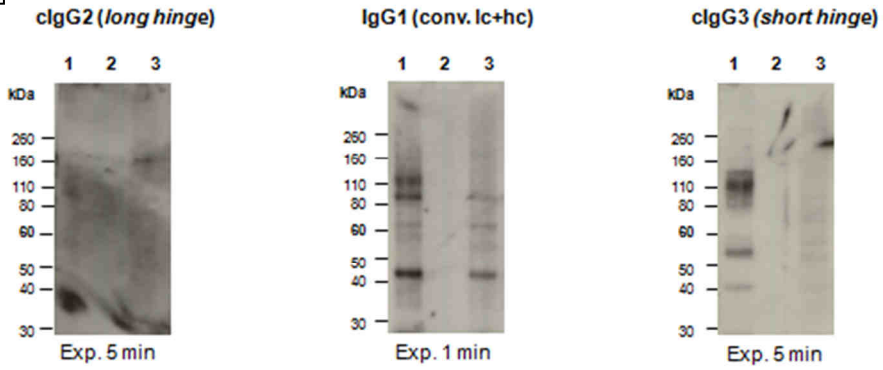


Serum #20 (anti-CEACAM5) cIgG-Subfraktionen

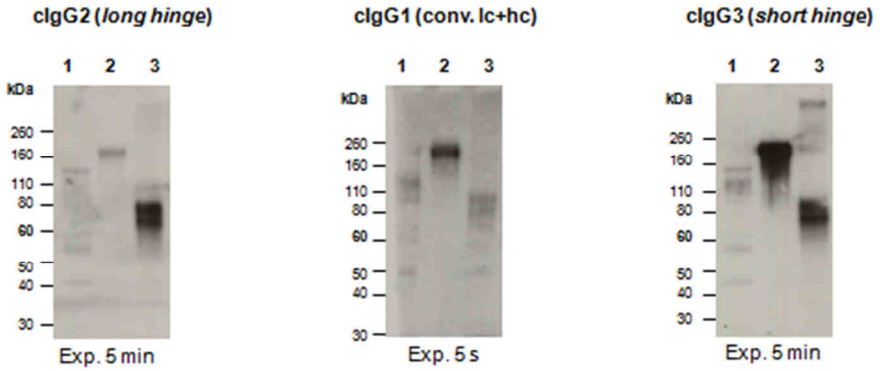


Nach IP:

Serum #6 (anti-CEACAM1) cIgG-Subfraktionen



Serum #20 (anti-CEACAM5) cIgG-Subfraktionen



3.3.3 Phagemid-Vektor-Klonierung und *phage display* für cIgG3 (*short hinge*) anti-CEACAM V_HH-Domänen

3.3.3.1 Klonierung des *short hinge* V_HH-Repertoires in den Phagemid-Vektor pCANTAB

Auf Basis der Western Blot-Resultate für die CEACAM-Spezifität der cIgG-Subfraktionen wurde zur Generierung von CEACAM-reaktiven V_HH-Domänen für beide Lamas das cIgG3-Repertoire (*short hinge*) ausgewählt. Als Phagemid-Vektor für die erforderlichen Klonierungen stand in der AG Nollau ein Konstrukt aus pCANTAB 5E mit einem für das Adaptorprotein v-Crk (~350 bp) kodierenden Insert zur Verfügung. Nach Isolation der *supercoil*-Form aus einem CsCl-Dichtegradienten wurde der Vektor durch Restriktionsverdau mit den Enzymen SfiI/NotI und anschließende Aufreinigung nach Agarose-Gelelektrophorese präpariert (s. Abb. 3.37).

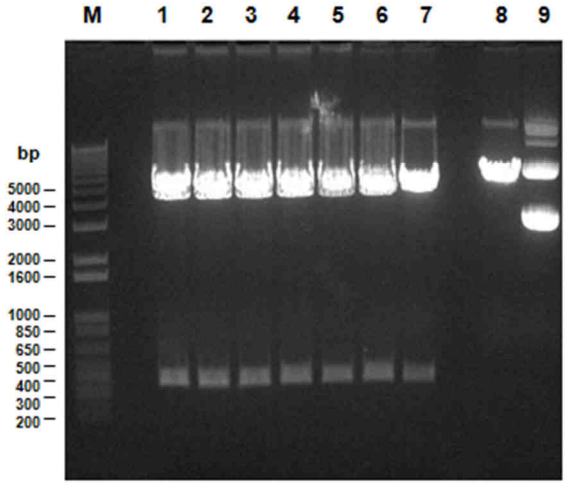


Abb. 3.37:
Präparative Agarose-Gelelektrophorese zur Aufreinigung von linearisiertem pCANTAB Phagemid-Vektor nach Restriktionsverdau mit den Enzymen SfiI/NotI für die Ligation des V_HH-Repertoires und anschließendes *phage display*. Geladen wurden die vollständigen Restriktionsansätze aus Doppelverdau von 3 µg Plasmid-DNA mit SfiI/NotI (Spur 1-7) sowie 3 µg nur mit SfiI inkubierte (Spur 8) und unbehandelte Plasmid-DNA (Spur 9) als Kontrolle für den vollständigen Verdau; (M) Marker. Die Bande bei ca. 350 bp für die doppelt verdauten Proben enthält das ursprüngliche Insert für *v-Crk.* (M) Marker: 1 kb DNA ladder Plus.

Als Ausgangsmaterial für die PCR-Amplifikation des genetischen V_HH-Repertoires CEACAM-immunisierter Lamas diente die nach abgeschlossener Immunisierung in Woche 26 aus peripheren Lymphozyten der Lamas isolierte Gesamt-RNA. Die aus reverser Transkription erhaltene cDNA wurde für die PCR als Matrize mit den Primern *unifor* und *shortrev* bzw. *longrev* zur spezifischen V_HH-Amplifikation eingesetzt (s. Kap. 2.1.8). Auch für die cIgG2-Form (*long hinge*) der Schwerkettenantikörper konnte mit dem *longrev reverse*-Primer eine spezifische Amplifikation des betreffenden V_HH-Segments erhalten werden, das jedoch nicht weiter eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Die zur Amplifikation der V_HH-kodierenden Segmente zwischen den konservierten Bereichen für den N-Terminus (FR1) und die jeweilige Scharnierregion (*hinge region*) verwendeten Primersequenzen waren in Anlehnung an vorherige Arbeiten definiert worden (Orlandi *et al.*, 1989; van der Linden *et al.*, 2000). Über diese wurden die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme SfiI am 5‘-Ende (*unifor*) und NotI am 3‘-Ende (*shortrev*, *longrev*) eingefügt. Für beide Ansätze konnte ein spezifisches V_HH-Amplifikat im erwartungsgemäßen Längenbereich von ca. 450 bp erhalten werden, wie in Abb. 3.38 dargestellt ist.

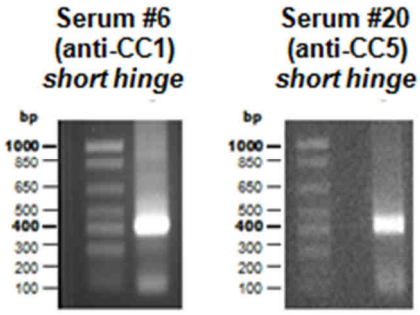


Abb. 3.38:
Präparative Agarose-Gelelektrophorese mit den aufgetrennten, spezifischen Amplifikaten für *short hinge* (cIgG3) V_HH-Domänen auf Basis der kodierenden Segmente für Schwerketten-Antikörper aus CEACAM-immunisierten Lamas #6 (links) und #20 (rechts). Diese waren durch PCR mit den Primern *unifor*/*shortrev* nach vorheriger reverser Transkription der Leukozyten-RNA amplifiziert worden. Marker: 1 kb DNA ladder Plus.

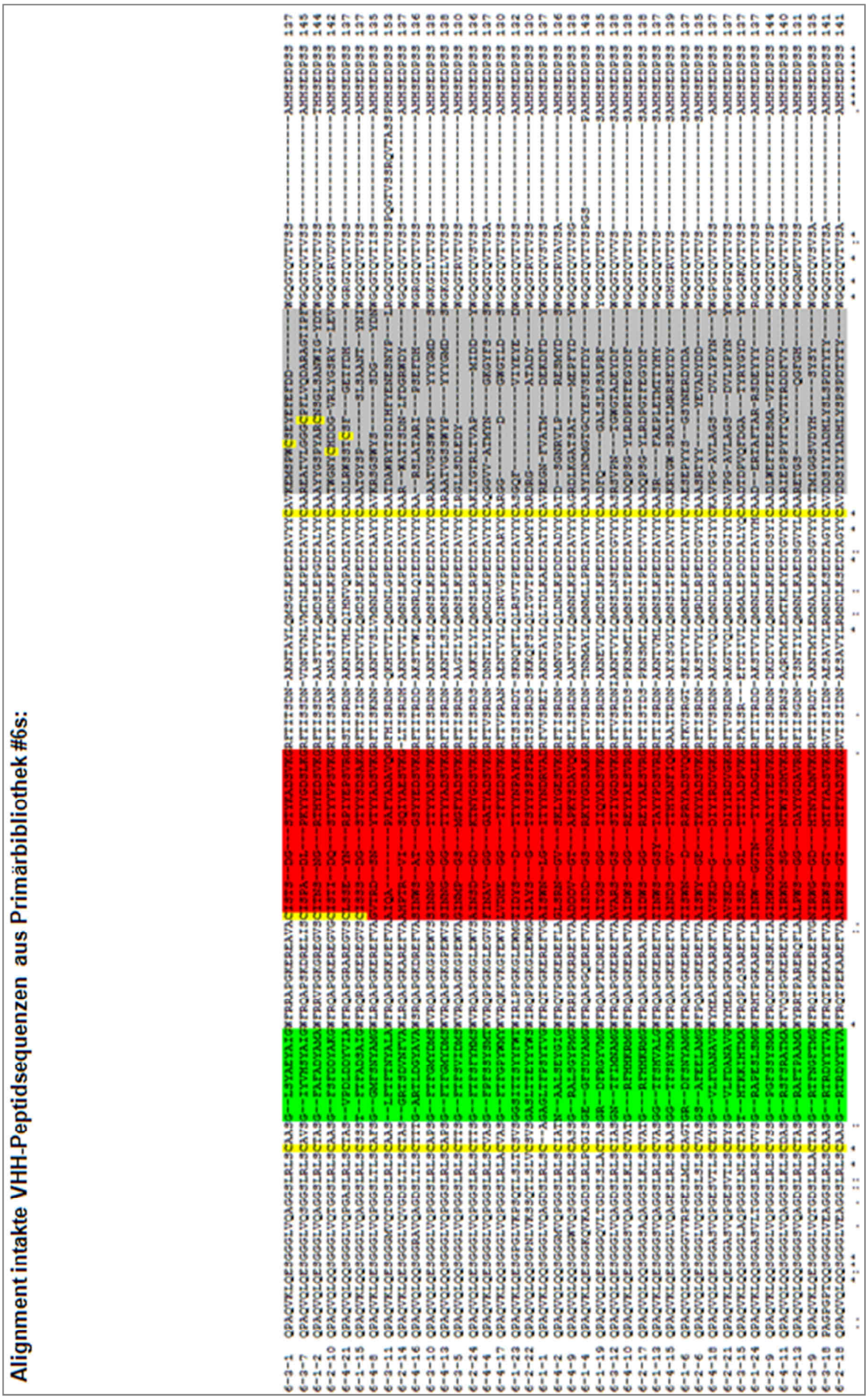
Nach Gelextraktion wurden die Amplifikate mit den Restriktionsenzymen SfiI und NotI inkubiert und anschließend über die kompatiblen Enden mit dem pCANTAB 5E-Vektor ligiert.

3.3.3.2 Generierung und Untersuchung von V_HH-Primärbibliotheken in TG1 *E.coli*

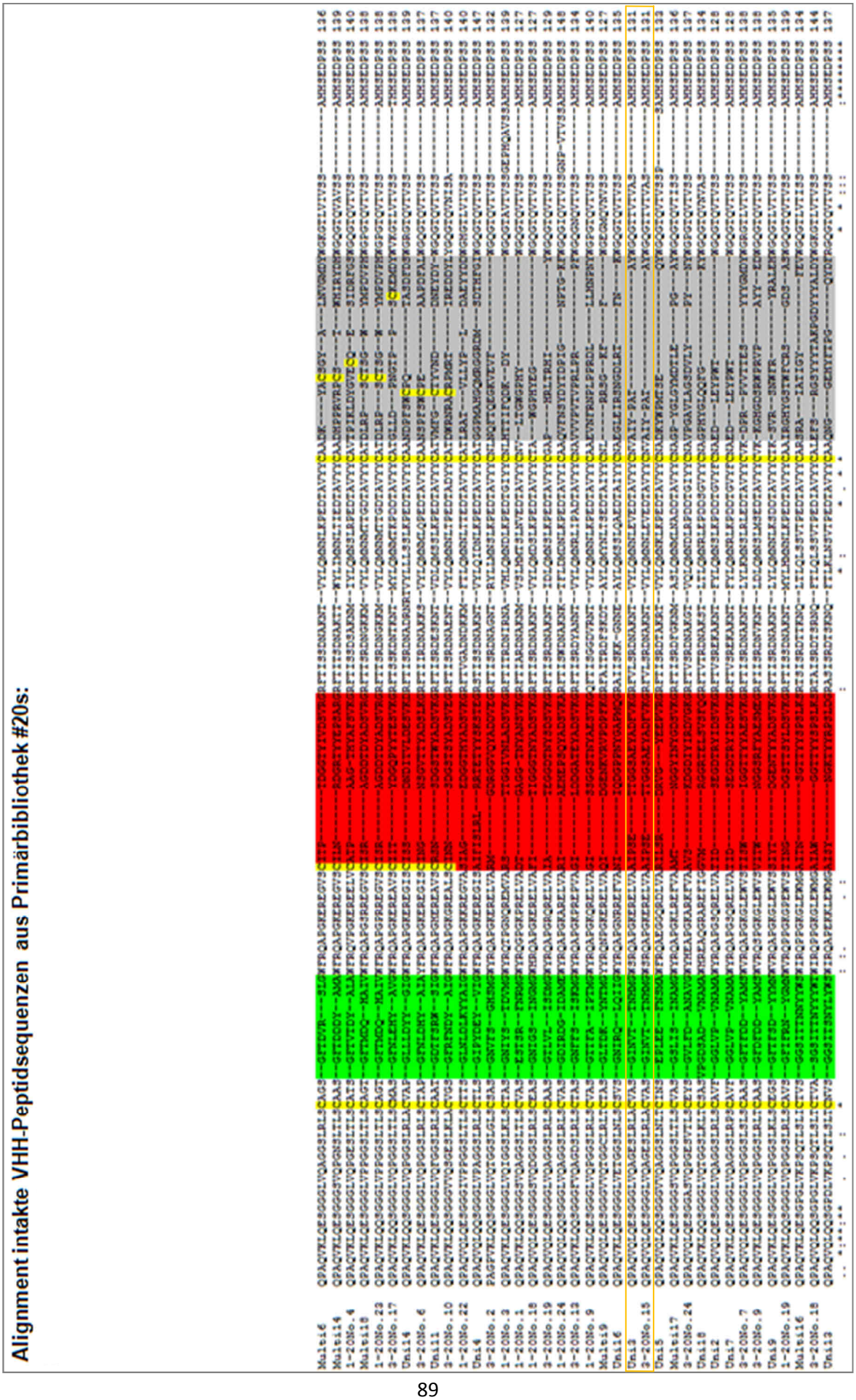
Das in pCANTAB 5E ligierte Amplifikat mit der Gesamtheit an *short hinge* V_HH-Spezies aus dem immunologischen Repertoire für Schwerketten-Antikörper des jeweiligen Lamas wurde durch Elektroporation in TG1 *E.coli* eingebracht. Dieser sog. „Suppressorstamm“ war durch eine veränderte tRNA in der Lage, das zwischen Insert und pIII-Gen lokalisierte Amber Stop-Codon (UAG) als Glutamatrest zu transkribieren. Dabei wurde eine durchgängige mRNA für N-terminal mit dem Phagenhüllprotein pIII fusionierte V_HH-Domänen erzeugt.
Für die Ansätze mit den *short hinge* V_HH-Segmenten aus Lama #6 wurden auf 20 Bakteriennährböden (500 cm^2) durchschnittlich rund $1.2 \cdot 10^4$ rekombinante Klone erhalten. Für die Bibliothek von Lama #20 wurden pro Platte etwa $2.5 \cdot 10^4$ rekombinante Klone erhalten; hier wurden insgesamt 10 Selektionsnährböden ausplattiert. Die Ausgangskomplexität der Primärbibliotheken hinsichtlich der potentiellen V_HH-Vielfalt lag dementsprechend bei ca. $2.4 \cdot 10^5$ für #6(*short*) und ca. $2.5 \cdot 10^5$ für #20(*short*). Für beide Bibliotheken wurden von 96 bzw. 88 zufällig gewählten Klonen DNA-Präparationen und Sequenzanalysen durchgeführt. Das *alignment* der entsprechenden Peptidsequenzen ist in Abb. 3.39 gezeigt.

Abb. 3.39:
Alignment der nach DNA-Sequenzierung für die Primärbibliotheken #6s (anti-CEACAM1) und #20s (anti-CEACAM5) erhaltenen Proteinsequenzen mit intakten *short hinge* V_HH-Domänen; die *complementarity determining regions* (CDRs) 1-3 sind farblich in grün (CDR1), rot (CDR2) und grau (CDR3) unterlegt. Gelb markiert sind die Cystein-Reste als wichtige Strukturmerkmale, über deren Schwefelatome die kanonischen Disulfid-Brücken ausgebildet werden. Im *alignment* für die Bibliothek #20s sind die zwei redundanten Sequenzen orange umrandet.

Alignment intakte VHH-Peptidsequenzen aus Primärbibliothek #6s:



Alignment intakte VHH-Peptidsequenzen aus Primärbibliothek #20s:



	Auswertbare Sequenzen	Kurze unspezif. Inserts	Religationen	Leserahmen-verschiebung	Sequenz-identische Inserts	Einzigartige V_HH-Inserts
Bibliothek #6s	90 (100%)	43 (47.8%)	1 (1.1%)	6 (6.7%)	0 (0%)	40 (44.4%)
Bibliothek #20s	79 (100%)	39 (49.4%)	2 (2.5%)	1 (1.25%)	1 (1.25%)	36 (45.6%)

Tab. 3.3: Gesamtübersicht der Ergebnisse aus DNA-Sequenzierungen zur Charakterisierung von erzeugten Immunbibliotheken für CEACAM-reaktive *short hinge* (cIgG3) V_HH-Fragmente aus Lama #6 (anti-CC1) und Lama #20 (anti-CC5)

Eine Gesamtübersicht der auf Proteinebene ausgewerteten Sequenzanalysen für die Primärbibliotheken ist in Tab. 3.3 dargestellt. In beiden Fällen lag jeweils ein fast 50%-iger Anteil von Sequenzen mit nur einem kurzen unspezifischen Insert vor, die möglicherweise durch Primer-Dimere entstanden waren. Zudem wurde in den ausgewerteten Sequenzen für Bibliothek #6s ein Religationsereignis ohne V_HH-Insert sowie zwei derartige Religationen in #20s beobachtet, was einer Quote von 1.1% (#6s) bzw. 2.5% (#20s) entsprach. Sechs V_HH-Inserts (6.7%) aus Bibliothek #6s zeigten eine Verschiebung des Leserahmens und konnten somit kein intaktes Fusionsprotein bilden. In Bibliothek #20s trat nur eine Leserahmenverschiebung auf (1.25%). Weiter wurden für die Bibliotheken 40 (#6s) bzw. 37 (#20s) Sequenzen mit intakten V_HH-Domänen im korrekten Leserahmen erhalten. Im Gegensatz zu Bibliothek #6s lag in Bibliothek #20s in einem Fall (1.25%) das wiederholte Auftreten einer vollständig identischen Sequenz für zwei verschiedene Klone vor (Abb. 3.39, #20s, gelbe Umrandung). Der Anteil korrekt kodierter, einzigartiger V_HH-Sequenzen betrug letztendlich 40 von 90 (44,4%) für Bibliothek #6s und 36 von 79 (45.6%) für Bibliothek #20s. Bezogen auf die erhaltene Gesamtzahl an Klonen konnte damit für beide Bibliotheken eine tatsächliche Komplexität von ca. $1.1 \cdot 10^5$ für einzigartige V_HH-Domänen abgeschätzt werden.
Beim Vergleich der Aminosäureabfolge für die einzelnen V_HH-Sequenzen ergaben sich für beide Bibliotheken Blöcke mit Homologien vor allem in Bezug auf Länge und Zusammensetzung der *complementarity determining regions*. Einige Vertreter im jeweiligen *alignment* für beide Primärbibliotheken wiesen dabei eine strukturelle Besonderheit auf; neben dem kanonischen Cystein-Paar in jeder V_HH-Sequenz besaßen die ersten fünf Sequenzen im *alignment* für Bibliothek #6s sowie die ersten 10 Sequenzen in Bibliothek #20s ein weiteres Paar an Cysteinresten, welches vermutlich die Ausbildung einer zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen CDR2 (rot) und 3 (grau) in den betreffenden V_HH-Spezies bewirkte (s. auch Kap. 1.2.4 sowie 1.2.6). Darüber hinaus wurde in #6s eine V_HH-Spezies mit nur einem zusätzlichen Rest, also einem alleinstehenden bzw. „freien“ Cystein vorgefunden (s. Abb. 3.39, #6s, Klon „6-1-15“).

3.3.3.3 *Phage Display* für CEACAM-reaktive V_HH-Phagen-Fusionsproteine

Beide Primärbibliotheken wurden für das anschließende *phage display* eingesetzt. Hierbei wurden nach Co-Infektion der transformierten TG1 *E. coli* mit M13 Helferphagen durch Selektion der produzierten Phagen-Fusionsproteine mittels Festphasen-*panning* CEACAM-reaktive V_HH-Spezies angereichert. Dem Immunisierungsschema und den Ergebnissen aus der Charakterisierung der Immunseren sowie der isolierten cIgG-Subfraktionen entsprechend wurde Primärbibliothek #6s auf CEACAM1- sowie #20s auf CEACAM5-reaktive V_HH-Phagen-Fusionsproteine untersucht.
Für beide Bibliotheken wurden drei aufeinanderfolgende *biopanning*-Selektionsrunden an immobilisiertem CEACAM-Antigen zur Anreicherung spezifischer Phagen-Fusionsproteine durchgeführt. Mit diesen wurden wiederum naive TG1-Kulturen infiziert, wobei die entsprechenden V_HH-Fragmente erneut durch Fusion mit pIII in die Hülle produzierter Phagenpartikel eingebaut wurden. Nach drei *panning*-Runden mit fortlaufender Reduzierung der Antigenmenge lagen letztendlich pro Bibliothek für jede der drei ausgestrichenen Platten (500 cm^2) etwa 5.000-8.000 Klone auf Selektionsnährboden vor. Von den Platten wurden zufällige Klone isoliert und Sequenzanalysen der Plasmid-DNA bzw. ein *screening* der erhaltenen rekombinanten Phagen im indirekten ELISA vorgenommen, um korrekt kodierte V_HH-Fragmente mit spezifischer CEACAM-Reaktivität zu identifizieren.
Aus Bibliothek #20s (anti-CEACAM5) konnten nach insgesamt zwei kompletten Selektionsdurchführungen mit je drei *panning*-Runden im ELISA-*screening* für die produzierten Phagen von 132 Klonen sowie die DNA-Sequenzierungen für insgesamt 68 Klone keine spezifische Bindung bzw. keine korrekten V_HH-kodierenden Sequenzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Von den nach *biopanning* der Bibliothek #6s an CEACAM1 erhaltenen Klonen wurden in 72 Sequenzanalysen insgesamt 4 intakte V_HH-Sequenzen identifiziert, während die restlichen Klone *frameshift*-Mutationen oder kein V_HH-Insert aufwiesen. Die vier korrekt kodierten V_HH-Sequenzen sind in Abb. 3.40 dargestellt. Drei der Sequenzen (No.17, No.32 und No.53) waren bis auf unterschiedliche Kombinationen in zwei AS-Positionen vollständig homolog, was auf ein durch CEACAM-Spezifität angereichertes Antikörperbindungsmotiv hinweisen könnte. Eine variable Aminosäure lag dabei im konstanten Bereich der *framework region* 1 (Position 5); diese Position war für Klon No.53 mit einem Glutaminrest (Q) besetzt, für die Klone No.17 und No.32 dagegen mit einem Lysinrest (K). Diese Variation stand vermutlich in Zusammenhang mit der Verwendung degenerierter Primer (s. Kap. 2.1.8). Die zweite variierende AS-Position lag dagegen innerhalb der CDR1 (Position 34); Klon No.32 wies hier einen Threoninrest (T) auf im Gegensatz zu einem Isoleucinrest (I) bei den Klonen No.17 und No.53.
Klon No.10 dagegen zeigte eine AS-Zusammensetzung mit deutlich geringerer Homologie zu den anderen drei Klonen, vor allem in Hinblick auf die hypervariablen Regionen und die *framework region* 3. Neben der unterschiedlichen AS-Abfolge war bei Klon No.10 die CDR3 und damit die gesamte Sequenz im Vergleich zu den drei anderen Klonen um einen AS-Rest verlängert. Alle vier V_HH-kodierenden Sequenzen verfügten über nur ein kanonisches Cystein-Paar, dessen beiden Reste sich jeweils vor der CDR1 und CDR3 befanden.

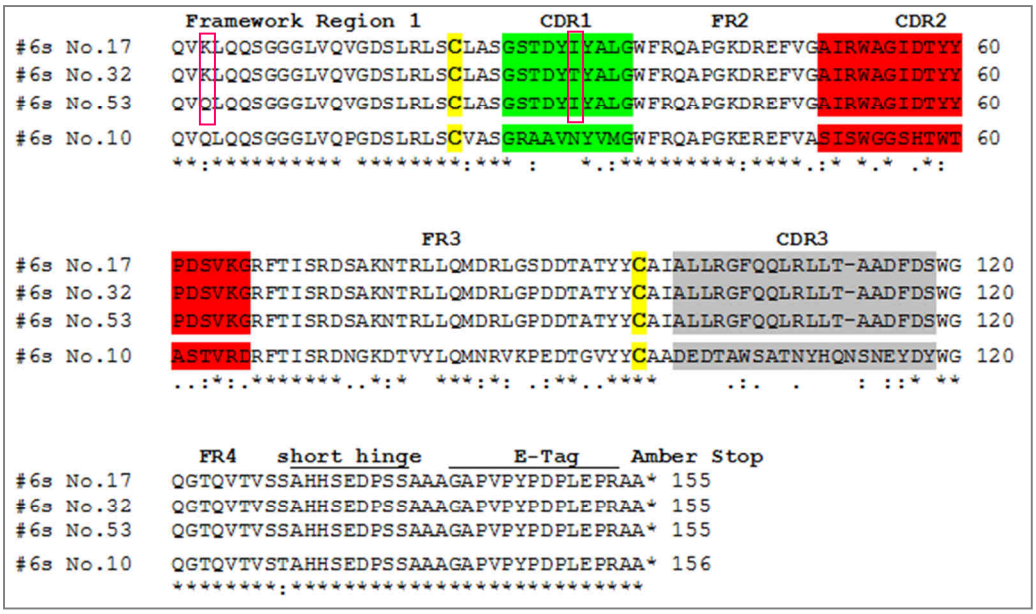


Abb. 3.40:
Alignment der nach *panning* von Bibliothek #6s an CEACAM1 erhaltenen Sequenzen für V_HH-Phagen-Fusionsproteine von der *framework region* 1 (V_HH N-Terminus) bis zum Amber Stop Codon. Grün, rot und grau unterlegt sind die Bereiche der *complementarity determining regions* (CDR). Die Cystein-Reste der intramolekularen Disulfid-Brücke sind gelb markiert. Die magentafarben umrandeten Reste stellen die unterschiedlich besetzten AS-Positionen bei den ansonsten homologen Klonen No.17, No.32 und No.53 dar. Die Konsensus-Symbole unterhalb der Sequenzen weisen auf eine identische Besetzung (*), eine konservative Substitution (:) bzw. eine semikonservative Substitution (.) an der jeweiligen Position für alle Sequenzen hin.

3.3.3.4 *Screening* potentieller anti-CEACAM1 V_HH-Phagen-Fusionsproteine im indirekten ELISA

Nach der Identifizierung von vier V_HH-kodierenden Sequenzen aus *biopanning* von Bibliothek #6s wurden die rekombinanten Phagen der entsprechenden Klone zur Bestätigung der spezifischen Reaktivität gegen CEACAM1 einem *screening* im indirekten ELISA unterzogen. Dazu wurde zuerst in einem direkten ELISA die Konzentration der rekombinanten Phagen für die betreffenden Klone durch Vermessung gegen eine Verdünnungsreihe von M13 Helferphagen bestimmt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde mit gleichen Phagenkonzentrationen (je $5 \cdot 10^{11}$ Phagen pro mL) das *screening* auf eine spezifische Bindung gegenüber CEACAM-Antigenen durchgeführt. Als Kontrolle wurde produzierter Phage von einem Klon (No.15) in gleicher Konzentration eingesetzt, für den nach *biopanning* an CEACAM1 eine V_HH-Sequenz mit *frameshift* identifiziert worden war, die somit kein spezifisches V_HH-Fusionsprotein exprimieren konnte. Der Nachweis spezifisch gebundener Phagen erfolgte über einen HRP-konjugierten anti-M13 Antikörper.
Abb. 3.41 zeigt die Ergebnisse des ELISA-*screenings*: Die Bindung der drei V_HH-Phagenspezies mit hoher Sequenzhomologie ist dabei in unterschiedlichen Blautönen, für den Klon mit alternativer Sequenz (No.10) in Grün und für die *frameshift*-Mutante in Rot dargestellt. Für die vier intakten Phagen-Fusionsproteine konnten relativ starke Bindungen an CEACAM1 im Vergleich zu immobilisiertem CEACAM5 sowie Milchpulver und unbeschichteter Polystyrol-Oberfläche beobachtet werden. Die *frameshift*-Mutante No.15 zeigte in keinem der Ansätze eine Bindung. Die V_HH-Variante mit alternativem Sequenzmotiv

(No.10, grün) wies bei gleicher Konzentration eine etwas schwächere spezifische Bindung an CEACAM1 auf im Vergleich zu den drei homologen Spezies No.17, No.32 und No.53 (Blautöne). Letztere lieferten untereinander für CEACAM1 Bindungssignale auf einem vergleichbaren Absorptionsniveau.

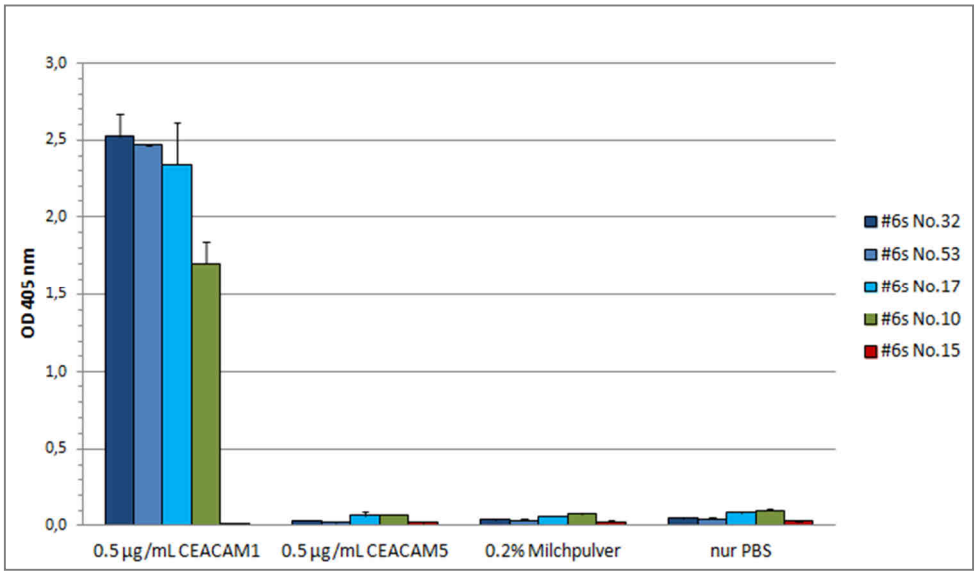


Abb. 3.41:
Indirekter ELISA zum *screening* der CEACAM-Spezifität für Phagen mit korrekt kodierten V_HH-Sequenzen nach Selektion aus Bibliothek #6s an CEACAM1. Pro *well* der Mikrotiterplatte wurden die rekombinanten Antigene CC1 und CC5 in einer Konzentration von 0.5 µg/mL immobilisiert. Als Kontrolle erfolgte zusätzlich die Immobilisierung von 0.2% Milchpulverlösung als unspezifisches Proteingemisch. Zudem wurden für die Beurteilung einer unspezifischen Polystyrol-Bindung weitere *wells* nur mit PBS, ohne Immobilisierung von Proteinen, beladen. Die *wells* wurden mit Phagenkonzentrationen von je $5{\cdot}10^{11}$ Partikeln pro mL für die ausgewählten Spezies inkubiert und die Bindung anschließend mit HRP-konjugiertem anti-M13-Antikörper (Verdünnung 1:1.000) nachgewiesen. Die Auswertung der Absorptionswerte bei 405 nm nach ABTS-Zugabe erfolgte nach 5 min. Alle Messungen wurden als Duplikat vorgenommen, die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder. Die Balken der Bindungssignale für die Phagen mit hoch homologen V_HH-Sequenzen (>98%) sind in unterschiedlichen Blautönen dargestellt (No.32: dunkelblau; No. 53: blau; No. 17: hellblau). Die Bindung des Phagen von Klon No.10 mit geringerer Homologie (ca. 64%) im Vergleich zu No.17, No.32 u. No.53 ist durch einen grünen Balken und die des Phagen mit *frameshift*-Mutation (No.15) durch einen roten Balken wiedergegeben.

Um die Spezifität der V_HH-Phagen für CC1 zu bestätigen, wurde in einem weiteren indirekten ELISA die Absättigung der Bindungsepitope auf CC1-Antigen durch eine Verdünnungsreihe der rekombinanten Phagen untersucht (s. Abb. 3.42). Dabei wurden $0.01{\cdot}10^{11}$ bis $5{\cdot}10^{11}$ Phagenpartikel pro mL von #6s No.53, No.17 und No.10 sowie von der *frameshift*-Mutante #6s No.15 eingesetzt und mit HRP-konjugiertem anti-E-Tag Antikörper nachgewiesen. Im Gegensatz zu anti M13-Antikörper weist dieser nicht den Phagen, sondern ein korrekt fusioniertes, rekombinantes Protein als spezifischen Binder nach. Alle drei V_HH-Fragmente zeigten eine Sättigung der Bindung an CC1. Wie zuvor konnte für die Phagen ohne korrektes V_HH-Fusionsprotein (#6s No.15; rot) keine Bindung und für die V_HH-Variante mit geringerer Sequenz-Homologie (No.10, grün) ein niedrigeres Sättigungsniveau bei gleichen Phagen- und Antigenmengen gegenüber den hoch homologen V_HH-Spezies No.53 (blau) und No.17 (hellblau) verzeichnet werden, die untereinander einen vergleichbaren Verlauf der Sättigungskurven zeigten bei geringfügig höheren Absorptionswerten für Klon No. 17.

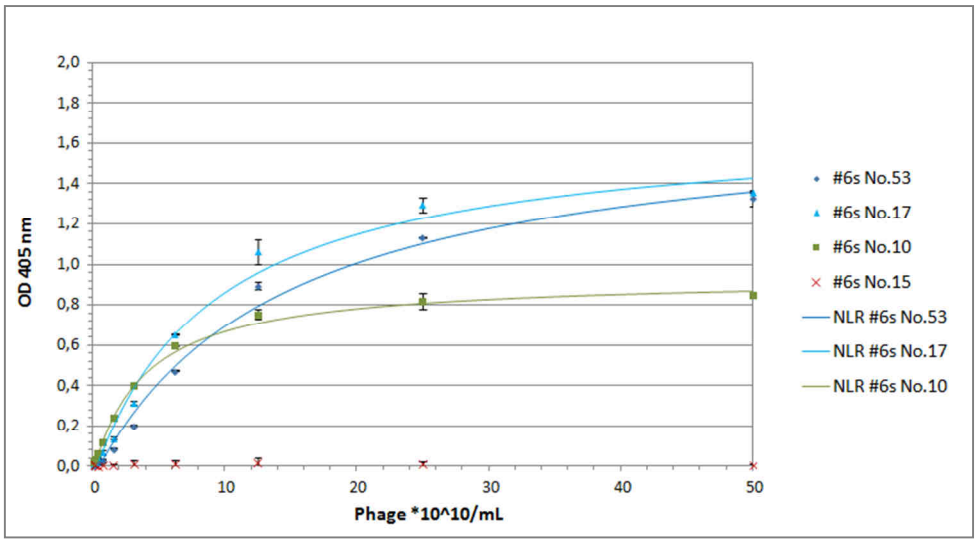


Abb. 3.42:
Vermessung der Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von V_HH-fusionierten Phagenpartikeln an CC1-Antigen zum Erhalt von Sättigungskurven als Bestätigung einer spezifischen Bindung im indirekten ELISA. Die *wells* der Mikrotiterplatte wurden mit CC1 in einer Konzentration von 0.5 µg/mL immobilisiert. Die Inkubation der V_HH-Phagenfusionsproteine erfolgte über einen Konzentrationsbereich von $0.01 \cdot 10^{11}$ Partikeln pro mL bis hin zu $5 \cdot 10^{11}$ Partikeln pro mL. Eingesetzt wurden die V_HH-Phagen der Klone No. 53 (blau) und No.17 (hellblau) mit hoher Homologie sowie des Klons No. 10 mit alternativer Sequenz (grün). Als Kontrolle wurden ebenfalls Phagenpartikel von Klon No.15 mit *frameshift*-Mutation (rot) eingesetzt. Der Nachweis von spezifischem V_HH-Fusionsprotein erfolgte mit HRP-konjugiertem anti-E-Tag Antikörper in einer Verdünnung von 1:500. Nach ABTS-Zugabe wurde die Auswertung der Absorptionswerte nach 40 min vorgenommen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.

Zusammenfassend zeigten die Experimentalbefunde zu diesem Teil der Arbeit, dass die Immunisierung von *L. glama* mit den rekombinanten Proteinen CEACAM1 und CEACAM5 zu einer durch Western Blot und ELISA in den aufbereiteten Seren der Tiere nachweisbaren, spezifischen Immunantwort geführt hatte. Sowohl für die Vollseren als auch für die isolierten cIgG-Subfraktionen von Schwerketten-Antikörpern konnte die differenzielle Spezifität hinsichtlich verschiedener Mitglieder der CEACAM-Familie, darunter CC1, CC5 und CC6, bestimmt werden. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde, ausgehend von der Gesamt-RNA aus Lama-Leukozyten, das V_HH-Repertoire für die cIgG3-Fraktion (*short hinge*) in einen Phagen-Vektor kloniert und mittels *phage display*-Verfahren einschließlich *biopanning* auf spezifische Bindung an CEACAM1 und CEACAM5 selektioniert.
Im Gegensatz zu Bibliothek #20s (anti-CEACAM5) konnten für die Bibliothek #6s (anti-CEACAM1) vier verschiedene, für V_HH-Phagen-Fusionsproteine kodierende Sequenzen identifiziert werden, von denen drei untereinander eine hohe Homologie aufwiesen (>98%), während die vierte ein alternatives Sequenzmotiv, vor allem für die hypervariablen Regionen der Antigenbindungsstellen (CDRs), zeigte. Für alle vier V_HH-Varianten wurde durch ELISA-*screening* eine spezifische Bindung an CEACAM1 im Vergleich zu verschiedenen Kontrollen nachgewiesen, so dass diese Resultate für die Zukunft den potentiellen Ausgangspunkt zur Produktion und dem Einsatz löslicher V_HH Einzeldomänen-Antikörper mit CEACAM1-Spezifität für mögliche diagnostische bzw. therapeutische Zwecke darstellen.

4 Diskussion

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, unterschiedliche monoklonale Antikörper sowie Antikörperfragmente gegen die Zelladhäsionsproteine CEACAM1 und CEACAM5 für die vergleichende Charakterisierung bzw. den weiteren Einsatz für molekulardiagnostische Fragestellungen herzustellen.
In diesem Zusammenhang wurden die CEACAM-spezifischen mAk T84.1 und T84.66 aus entsprechenden Hybridom-Kulturen gewonnen und für diese weiter durch verschiedene rekombinante Techniken analoge Einzelketten-Fragmente (scFv) generiert sowie exprimiert. Über eine Strategie zur gerichteten enzymatischen Biotinylierung wurden die scFv-Fragmente zudem für eine weitere Funktionalisierung vorbereitet.
In einem dritten Schwerpunkt dieser Arbeit wurde außerdem versucht, durch entsprechende Immunisierung von Cameliden (*L. glama*) und die weitere Herstellung von Immunbibliotheken zusätzliche CEACAM-reaktive Antikörperderivate in Form von V_HH-Fragmenten zu generieren, die sich von den speziellen Schwerketten-Antikörpern dieser Spezies ableiten.

4.1 Charakterisierung und Einsatz von monoklonalen anti-CEACAM Antikörpern

4.1.1 Charakterisierung der CEACAM-Bindung für monoklonale Antikörper

Durch Kultivierung entsprechender Hybridom-Zellen wurden in dieser Arbeit die CEACAM-spezifischen, monoklonalen Antikörper T84.1 und T84.66 vom Ig-Subtyp IgG1 generiert. T84.1 mAk erkennt ein Epitop auf der N-terminalen IgV-Domäne, die mit hoher Homologie in verschiedenen CEACAM-Molekülen vorliegt (s. Abb. 1.2, Kap. 1.1.2; Wagener *et al.*, 1983[a]; Siepen *et al.*, 1987; Wagener *et al.*, 1989). Aufgrund der daraus resultierenden Kreuzreaktivität für ansonsten unterschiedliche CEACAM-Mitglieder wird T84.1 mAk als *pan*-spezifisch klassifiziert. Hieraus ergibt sich eine breite Einsatzmöglichkeit z.B. zur Untersuchung der Expression verschiedener CEACAM-Proteine in pathologisch veränderten Geweben oder Körperflüssigkeiten (Wagener *et al.*, 1989; Bogoevska *et al.*, 2005). T84.66 mAk dagegen bindet ein zusammengesetztes Epitop aus AS-Resten der IgC-Domänen A3 und B3, die in dieser Kombination ausschließlich in CEACAM5 (CEA) vorliegen. Entsprechend ermöglicht T84.66 mAk den hochspezifischen Nachweis von CEACAM5 im Rahmen der Diagnostik von CEACAM5-assoziierten Krankheitsbildern (Neumeier *et al.*, 1985). In diesem Zusammenhang wird CEACAM5 bereits seit Jahrzehnten als Tumormarker, insbesondere für das kolorektale Karzinom, genutzt (Wagener *et al.*, 1983[a]; Hammarström, 1999).
In Einklang mit publizierten Arbeiten zeigte T84.66 mAk eine ausschließliche Spezifität für CEACAM5 in Western Blot- und ELISA-Experimenten, während mit T84.1 mAk die Proteine CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 nachweisbar waren (s. Kap. 3.1.2; Wagener *et al.*, 1983[a]; Bogoevska *et al.*, 2005). In kompetitiven ELISA-Experimenten wurde zudem keine

Verdrängung von mAk T84.1 durch T84.66 an CEACAM1- bzw. CEACAM5-Antigen beobachtet. Ebenso erfolgte keine Verdrängung von T84.66 mAk durch T84.1 mAk an CEACAM5, was die unterschiedlichen Bindungsepitope für beide mAk bestätigte (s. Kap. 3.1.4).
Für beide mAk konnten in quantitativen ELISA individuelle Charakteristika der jeweiligen Antigenbindung vergleichend dargestellt werden (s. Kap. 3.1.3). Dabei trat hinsichtlich der Absorptionssignale eine (halb-)maximale Absättigung von rCEACAM5 durch T84.66 mAk bei bereits deutlich geringeren Konzentrationen auf im Vergleich zur Sättigung der rekombinanten Antigene CEACAM1 und CEACAM5 durch T84.1 mAk. Dies lässt sich vermutlich auf die unterschiedlichen Affinitäten der Antikörper für die rekombinanten Antigene bzw. die verschiedenen Epitope zurückführen. Neben den nicht-markierten mAk wurden zu Nachweiszwecken parallel im Rahmen dieser Arbeit Biotin- und FITC-markierte mAk T84.1 und T84.66 hergestellt. Auch für die modifizierten mAk konnten vergleichbare Bindungssättigungskurven bei Nachweis mit entsprechenden Sekundärantikörpern bzw. Detektionsreagenzien erhalten werden (s. Abb. 3.3, Kap. 3.1.3). Durch die Modifikation der Antikörper und den markierungsspezifischen Nachweis, insbesondere für Fluoresceinisothiocyanat (FITC), konnte eine erhebliche Steigerung der Detektionssensitivität im ELISA erreicht werden. Zudem ermöglichte die Modifikation eine Etablierung kompetitiver Assays, die im Weiteren für den Bindungsnachweis der auf Basis der mAk generierten scFv-Fragmente eingesetzt wurden (s. Abb. 3.5, Kap. 3.1.4).

4.1.2 Einsatz des mAk T84.1 zum Nachweis von CEACAM-Proteinen auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*

Von den exprimierten monoklonalen anti-CEACAM Antikörpern wurde in Kooperation mit Dr. Markus Heine von Institut für Anatomie (UKE) der CEACAM *pan*-spezifische mAk T84.1 in weiteren Studien eingesetzt. Dabei wurde die Nachweisbarkeit von CEACAM-Molekülen auf verschiedenen Tumorzellen *in vitro* als auch *in vivo* in Hinblick auf die Eignung für molekulardiagnostische Zwecke untersucht. Die Resultate dieser Studien wurden unter dem Titel ″Investigations on the Usefulness of CEACAMs as Potential Imaging Targets for Molecular Imaging Purposes″ (Heine *et al.*, 2011) bereits publiziert.
In Vorversuchen dieser Arbeiten wurde zunächst das Expressionsniveau der verwendeten Tumorzelllinien für CEACAM-Moleküle auf mRNA-Ebene durch *real time*-PCR sowie auf Proteinebene in Western Blot und Durchflusszytometrie untersucht. Die maßgeblichste CEACAM-Expression konnte dabei für Kolonkarzinom- (HT29, Caco-2) Prostata- (LNCAP, PC-3) und Pankreaskarzinomzelllinien (5061, 5072) in guter Übereinstimmung zwischen mRNA- und Proteinebene ermittelt werden. Auf Proteinebene zeigten weitere Tumorzelltypen, vor allem von Melanomen (FEMX-I), Mamma- (MCF7) und kleinzelligen Bronchialkarzinomen (OH-1) eine deutliche CEACAM-Expression, die nicht in Einklang zu den detektierten mRNA-Niveaus stand. Derartige Diskrepanzen zwischen mRNA-Level und Proteinexpression waren beispielsweise bereits für das *PUP2*-Gen der alpha5-Untereinheit des 20S Proteasoms in *S. cerevisiae* und das circadiane *Period*2-Gen (*Per2*) bei Säugern beschrieben worden (Lee *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 2002; Heine *et al.*, 2011).

Weiter wurde die *in vitro* und *in vivo* Expression von CEACAMs durch immunhistochemische Färbung von kultivierten Zellen der Linien LNCAP und PC3 (Adenokarzinom der Prostata), T47D und MCF-7 (Mammakarzinom), MEWO und FEMX-1 (metastasierendes Melanom), HT29, SW480 und Caco-2 (koloretales Adenokarzinom), 5061 und 5072 (Pankreaskarzinom) sowie OH-1 (kleinzelliges Bronchialkarzinom) als auch von Paraffin-eingebetteten Tumorschnitten aus entsprechenden, in BALB/c SCID-Mäuse xenotransplantierten Primärtumoren untersucht. Dabei wiesen die Tumorschnitte nur eine geringfügige Färbung mit T84.1 mAk für wenige Zellbereiche auf, die vorwiegend am Tumorrand sowie in einzelnen Regionen im Tumorkernbereich lokalisiert waren. In den Zellkulturen dagegen zeigte der überwiegende Teil der Zellen eine spezifische Färbung und übte somit aktiv die Expression von CEACAMs aus. Entsprechend war von einer heterogenen CEACAM-Expression in den Tumoren auszugehen, die nicht mit den für Zellkulturen erhaltenen Resultaten korrespondierte.

Für *in vivo*-Experimente wurden in BALB/c SCID Mäusen durch Injektion CEACAM-exprimierender FEMX-1 Melanomzellen xenotransplantierte Tumore induziert und diese nach Verabreichung von [^{125}I]T84.1 mAk und [^{125}I]IgG1 Isotyp hinsichtlich CEACAM-abhängiger Tumoranreicherung, Gewebeverteilung und Bluthalbwertszeit untersucht. Dabei war eine signifikante, spezifische Akkumulation des radioaktiv markierten T84.1 mAk im Tumor gegenüber der Isotyp-Kontrolle zu beobachten. In den weiter untersuchten Geweben von Myokard, Niere, Leber und Milz wurden für beide mAk vergleichbare Mengen an Radioaktivität detektiert, die in der Größenordnung von [^{125}I]IgG1 für FEMX-1-abgeleitete Tumore lagen. Somit fand weder für eines der Organe eine erhöhte unspezifische Bindung statt, noch war eine mit dem Tumorgewebe vergleichbare, CEACAM-abhängige Bindung von T84.1 in den gesunden Geweben erfolgt. Lediglich die im Blut der Mäuse gemessene Radioaktivität lag nach Normierung gleichermaßen für T84.1 mAk und die Isotypkontrolle oberhalb der im Tumorgewebe detektierten Radioaktivität. Dies war vermutlich auf die relativ lange Bluthalbwertszeit der monoklonalen Antikörper zurückzuführen, die für [^{125}I]T84.1 bei 10.3 h und für [^{125}I]IgG1 bei 10.4 h bestimmt wurde. Bei Einsatz in der diagnostischen Bildgebung würde ein solches Mengenverhältnis zwischen Tumorgewebe und Blut für den mAk vermutlich einer Erhöhung des Hintergrundrauschens gleichkommen und damit die Sensitivität für den spezifischen Nachweis am Tumor beeinträchtigen.

Bei Verwendung von CEACAM-spezifischen Antikörperderivaten wie Einzelkettenfragmenten (scFv) oder V_HH-Fragmenten, welche ebenfalls innerhalb dieser Arbeiten generiert wurden, könnte diese Problematik durch eine erhöhte renale Ausscheidungsrate umgangen werden; die Nierenschwelle zur Passage der Glomeruli liegt für Proteinmoleküle bei < 60 kDa (Bauer, 2008). Für therapeutische Ansätze mit radioaktiven oder zytotoxischen Konjugaten wäre eine verringerte Bluthalbwertszeit ebenfalls von Vorteil, da nur eine geringe Schädigungsrate von Normalgewebe durch die verkürzte Zirkulation zu erwarten wäre (Reilly, 2010).

Auf der anderen Seite führt die verkürzte Zirkulationszeit auch zu einem geringeren Umfang Tumor-spezifischer Bindung und Aufnahme für derartige Konstrukte. Entsprechend wäre in diesem Punkt ein Kompromiss durch geeignete Modifikation erforderlich, damit sich vor- und nachteilhafte Eigenschaften hinsichtlich Zirkulationszeit die Waage halten. Beispielsweise wurde eine gerichtete Modifikation mit Polyethylenglykol (PEGylierung) für größenreduzierte Antikörperderivate in diesem Zusammenhang beschrieben. Diese hatte neben einer Erhöhung der Serumstabilität nachweisbar zur Kompensation einer zu hohen

Ausscheidungsrate bei Passage der renalen Glomeruli für die modifizierten Konstrukte geführt (Chapman, 2002; Palm *et al.*, 2011).

4.2 Generierung, Expression und enzymatische Biotinylierung von CEACAM-spezifischen scFv-Fragmenten

Die Möglichkeit der Generierung von Einzelketten-Antikörpern bzw. scFv-Fragmenten leitet sich direkt von der durch Milstein und Köhler entwickelten Hybridom-Technologie in Kombination mit weiteren Techniken zur Herstellung und Isolation rekombinanter Antikörper ab wie z.B. dem *phage display*-Verfahren (Köhler und Milstein, 1975; Marks, McCafferty *et al.*, 1991). Weitere publizierte Arbeiten legten die experimentelle Basis für die hier angewendete, rekombinante Generierung von Antikörperfragmenten durch Amplifikation überlappender Segmente mittels PCR ohne Anwendung von *phage display* (Horton *et al.,* 1989; LeBoeuf *et al.*, 1989). Grundsätzlich lassen sich scFv-Fragmente in zwei möglichen Orientierungen darstellen. Dabei ergibt sich entweder eine V_L-zu-V_H oder eine V_H-zu-V_L Orientierung, bezogen auf die Domänenabfolge der rekombinanten Kette bei Betrachtung vom N- zum C-Terminus. Beide Varianten ergeben in der Regel ein funktionales Protein mit der Fähigkeit zur spezifischen Epitoperkennung (Bühler *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit hergestellten anti-CEACAM scFv-Fragmente lagen in V_L-zu-V_H Orientierung vor bzw. wurden entsprechend generiert.

4.2.1 Bakterielle Expression des anti-CEACAM5 scFv-Fragments T84.66

Als Expressionssysteme für rekombinant erzeugte scFv-Fragmente wurden in der Vergangenheit zahlreiche Verfahren erfolgreich eingesetzt. Vorwiegend wurden dabei bakterielle Systeme wie *E. coli* verwendet. Allerdings sind auch verschiedenste eukaryotische Expressionssysteme, von Hefen wie *P. pastoris* über Säuger-Zelllinien bis hin zur Agrobacterium-vermittelten Expression in pflanzlichen Organismen wie *Nicotiana tabacum*, beschrieben (Vaquero *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2003; Ahmad, 2012).
Je nach Ursprung und Beschaffenheit des Konstrukts ist nicht immer jedes der erwähnten Expressionssysteme für den Erhalt von funktionalen scFv-Fragmenten einsetzbar. Vor allem für bakterielle Expressionssysteme werden trotz regelmäßiger erfolgreicher Anwendung auch immer wieder Probleme und Limitationen bei der scFv-Produktion beschrieben. So können z.B. fehlgefaltete sowie nicht hinreichend prozessierte Konstrukte oder eine Aggregation unlöslicher Proteine im zytoplasmatischen (*inclusion bodies*) bzw. periplasmatischen Raum auftreten. In anderen Fällen wurde eine toxische Wirkung des Expressionsprodukts auf den exprimierenden Organismus beobachtet (Rippmann *et al.*, 1998; Vendel *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit bakteriell als biotinyliertes GST-Fusionsprotein exprimierten T84.66 scFv-Fragmente konnten zwar über die entsprechenden Modifikationen bzw. über anti-Maus Antikörper bei Charakterisierung mittels Western Blot-Analyse sowie Coomassie-Färbung nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9, Kap. 3.2.1), jedoch

wurde weder im Western Blot noch in indirekten sowie kompetitiven ELISA eine spezifische Bindung des Fragments an CEACAM5 beobachtet (s. Anhang, Kap. 7.2).
Eine Möglichkeit zur Minimierung von derartigen Problemen bei prokaryotischer Expression von Antikörper-Fragmenten ist die Co-Expression von verschiedenen Chaperonen und Chaperoninen, die positiven Einfluss auf die Stabilität und korrekte Faltung der exprimierten Konstrukte nehmen (Kontermann und Dübel, 2010). Eine solche Strategie wurde auch im Weiteren bei der bakteriellen Expression des T84.66 scFv-Fragments innerhalb dieser Arbeit angewendet. Unterschiede zwischen den Durchführungen mit und ohne co-exprimierte Chaperone wurden dabei hinsichtlich des Auftretens zusätzlicher Proteinbanden bzw. der vorliegenden Menge an freiem GST beobachtet. Allerdings konnte kein quantitativer Unterschied für die Expression der GST-scFv Fusionsproteine an sich zwischen beiden Ansätzen festgestellt werden (s. Abb. 3.9, Kap. 3.2.1). Zudem wurde auch bei Co-Expression von Chaperonen kein bindungsfähiges scFv-Fragment über das verwendete bakterielle Expressionssystem erhalten. Dies war möglicherweise auf dessen Beschaffenheit zurückzuführen, da das klonierte scFv-Segment über den genutzten pAC4-Vektor als Fusionsprotein mit N-terminalem GST-Tag exprimiert wurde. In Zusammenhang mit der N-terminalen Fusion von Affinitäts-Tags wie GST oder auch MBP (*mannose binding protein*) wurde für die bakterielle Expression verschiedener rekombinanter Proteine eine effizientere Translationsinitiation sowie eine erhöhte Löslichkeit des Expressionsprodukts beschrieben. Zudem bieten derartige Konstrukte eine gut handhabbare Möglichkeit der affinitätschromatographischen Aufreinigung (Sachdev und Chirgwin, 1998; Waugh, 2005). Die Antigenbindungsstelle eines scFv-Fragments (Paratop) setzt sich aus AS-Resten der N-terminalen Region von variablen Leichtketten- (V_L) sowie Schwerkettendomänen (V_H) zusammen. Zumindest in Einzelfällen könnte die N-terminale Fusion von z.B. GST zu einer negativen Beeinflussung der Antigenbindungsfähigkeit durch sterische Hinderung oder andere Wechselwirkungen mit den beteiligten Resten des Antikörperfragments bzw. des Antigens führen. Hierzu wurden jedoch in dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen vorgenommen. Aufgrund der erfolglosen bakteriellen Expression in An- oder Abwesenheit von Chaperonen wurde dieses Verfahren nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde im Weiteren zu einem eukaryotischen Expressionssystem gewechselt, wobei die scFv-Fragmente in HEK293-Zellen ohne fusioniertes GST exprimiert wurden.

4.2.2 Generierung eines rekombinanten scFv-Fragments für den CEACAM *pan*-spezifischen mAk T84.1

Auf Grundlage des T84.66 scFv-Fragments wurde auch für den monoklonalen Antikörper T84.1 mit *pan*-Spezifität gegen verschiedene CEACAM-Mitglieder ein entsprechendes Antikörperderivat hergestellt. Dafür erfolgte eine gezielte Amplifikation der Segmente für variable Domänen der schweren und leichten Kette ausgehend von revers transkribierter RNA der entsprechenden Hybridom-Zelllinie. Diese wurden in einer anschließenden *overlap*-PCR durch zuvor mit den verwendeten Primern erzeugte, überlappende Regionen im Bereich des Peptid-Linkers zusammengefügt (s. Abb. 3.15, Kap. 3.2.3).

Neben dem Erhalt eines neuen, rekombinanten scFv-Fragments mit breiter CEACAM-Spezifität wurden durch die entsprechenden Arbeiten auch die bisher unbekannten Sequenzen für die variablen Domänen einschließlich der *complementarity determining regions* (CDRs) von T84.1 mAk aufgeklärt (s. Abb. 3.14 und Abb. 3.17, Kap. 3.2.3).

4.2.3 Eukaryotische Expression und Optimierung der enzymatischen Biotinylierungseffizienz für CEACAM-spezifische scFv-Fragmente

Für die eukaryotische Expression beider scFv-Fragmente wurde das HEK293 Zellsystem verwendet. Hierzu wurden die Konstrukte mit dem sekretorischen Ig kappa-Signalpeptid und einem Myc-Tag ausgestattet. Nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen konnte im Zellkulturüberstand eine Anreicherung entsprechender Proteine im Bereich der theoretischen Molekülmasse von 27.8 kDa durch Western Blot-Analyse festgestellt werden. Bei Einsatz der scFv-Fragmente als Primärantikörper gegen CEACAM-Antigene und Nachweis über anti-Myc-Antikörper im Western Blot sowie im indirekten ELISA war eine Bindung nicht nachweisbar. Diese Tatsache ist möglicherweise auf eine eingeschränkte Zugänglichkeit des Myc-Epitops innerhalb der scFv-Fragmente in Zusammenhang mit der moderaten Affinität des 9E10-Antikörpers für das verwendete Myc-Tag (K_d = 5.3 x 10^{-7} M; Hilpert *et al.*, 2001) zurückzuführen. Eine weitere Rolle spielte hierbei sicherlich auch die eingesetzte scFv-Menge, bedingt durch die begrenzten Ausbeuten aus eukaryotischer Expression. Weil diese im Gegensatz zu bakteriellen Expressionssystemen nicht kurzfristig substanziell gesteigert werden konnte, wurde entsprechend eine bessere Detektionsstrategie benötigt.
Da im Western Blot und indirektem ELISA kein Funktionsnachweis möglich war, wurde die Bindungsfähigkeit der scFv-Fragmente durch Verdrängung analoger, FITC-markierter mAk im kompetitiven ELISA untersucht. Im Gegensatz zu bakteriell exprimiertem T84.66 scFv wurde dabei für die scFv-Fragmente aus eukaryotischer Expression eine spezifische Verdrängung der analogen mAk an rekombinanten CEACAM-Antigenen beobachtet und somit die Bindungsfähigkeit der Fragmente bei Expression in HEK293-Zellen bestätigt (s. Abb. 3.19, Kap. 3.2.4). Für T84.1 scFv an CEACAM1 und für T84.66 scFv an CEACAM5 erfolgte eine halbmaximale Verdrängung der korrespondierenden, FITC-markierten Antikörper bei einem molaren Verhältnis von etwa 2:1 (s. Abb 3.19 A u. C, Kap. 3.2.4). Dies deutete auf vergleichbare Bindungsstärken der scFv-Fragmente und monoklonalen Antikörper hin unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die scFv-Fragmente monovalent (eine Antigenbindungsstelle) und die mAk bivalent (zwei Antigenbindungsstellen) sind. Die halbmaximale Verdrängung der gleichen Konzentration von FITC-markiertem T84.1 mAk durch T84.1 scFv an CEACAM5 erfolgte dagegen bereits bei einer 6-fach niedrigeren Konzentration des scFv-Fragments (s. Abb 3.19 B, Kap. 3.2.4). In diesem Fall lag möglicherweise eine erhöhte Bindungsfähigkeit des rekombinanten scFv-Fragments für CEACAM5 gegenüber dem korrespondierenden T84.1 mAk vor. Für die monoklonalen Antikörper T84.1-E3 und T84.66-A3.1-H11 waren in Radioimmunoassays Affinitäten in Bezug auf CEACAM5 ermittelt worden, die Dissoziationskonstanten von K_d = 5.6 x 10^{-11} M (T84.1) und 3.8 x 10^{-11} M (T84.66) entsprachen (Wagener *et al.*, 1983[b]). Eine exakte

Bestimmung der Affinitätskonstanten für die hier generierten scFv-Fragmente konnte innerhalb des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht erreicht werden.
Aufgrund des fehlenden direkten Nachweises der Bindungsfähigkeit und um eine effiziente Kopplung an Trägersubstanzen möglich zu machen, wurde eine Strategie zur Markierung der scFv-Fragmente durch geeignete Modifikation entwickelt. Diese kann entweder durch ungerichtete, chemische Konjugation wie z.B. Kopplung über NHS an verfügbare primäre Amine oder durch die gerichtete Konjugation mit Hilfe enzymatischer Systeme erreicht werden. Eine chemische Konjugation der Fragmente wurde als unvorteilhaft eingeschätzt, da durch die relativ geringen Ausbeuten und Konzentrationen bei transienter eukaryotischer Expression geringe Markierungseffizienzen zu erwarten sind. Zudem war hierbei mit einer maßgeblichen Funktionsbeeinträchtigung der weitgehend auf die Antigenbindungsstellen reduzierten scFv-Proteine zu rechnen, da diese Form der Modifikation mit hoher Wahrscheinlichkeit die an der Antigenbindung beteiligten Regionen betreffen und die entsprechenden Interaktionen stören würde (s. Abb. 4.1). Um diese Probleme zu umgehen, wurde eine Strategie für die zielgerichtete Biotinylierung innerhalb des eukaryotischen Expressionssystems (HEK293) gewählt. Durch die besonders hohe Affinität des Proteins Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* (Kd ≤ 10^{-14} M; Green, 1975) zu Biotin wurde so über entsprechende Sonden und Konjugate der hochsensitive Nachweis und eine effiziente Aufreinigung als auch eine weitere Funktionalisierung der scFv-Konstrukte ermöglicht.

```
T84.1scFv       DIVLTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNV----VSSVIWYQQKPGQSPKALIYSASYRYN 56
T84.66scFv      DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLES 60
                *******   ::.*:*:*.:::*:*.:.*    *. : ********.** *** **   .

T84.1scFv       GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYYCQQYNNYPFTFGSGTKLEINGSTSGGGSG 116
T84.66scFv      GIPVRFSGTGSRTDFTLIIDPVEADDVATYYCQQTNEDPYTFGGGTKLEIKGSTSGGGSG 120
                *:* **:*:** ***** *. *:::*:* ***** *: *:***.******:*********

T84.1scFv       GGSGGGGSSEVQLQQSDTELVKPGASVKISCKASGYTFTDHGIHWVKQRPEQGLEWIGYI 176
T84.66scFv      GGSGGGGSSEVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRI 180
                ***************.:***:******:**.***:.:.*  :*************** *

T84.1scFv       SPGNGDIKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRF-FLLLRGAMDYW 235
T84.66scFv      DPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYW 240
                .*.**: **  **:****:***.**.***:**.******:***:*  * : :   ** **

T84.1scFv       GQGTSVTVSS 245
T84.66scFv      GQGTSVTVSS 250
                **********
```

Abb. 4.1:
Sequenzvergleich der analogen scFv-Segmente für die anti-CEACAM mAk T84.1 und T84.66. Farbig dargestellt sind die an der Antigenbindung beteiligten CDRs (grün: CDR1; rot: CDR2; grau: CDR3) sowie die Lysinreste mit primären Amingruppen (K; magentafarben unterlegt), an denen potentiell eine chemische Konjugation mit Biotin über NHS-Ester möglich wäre. Zu beachten ist hierbei, dass nicht alle Lysinreste zwangsläufig auf der Proteinoberfläche für die Konjugation zur Verfügung stehen. Allerdings ist besonders für die innerhalb von CDRs vorliegenden bzw. in der Nähe von CDRs befindlichen Lysinreste die Wahrscheinlichkeit einer Oberflächenexposition hoch.

In der Vergangenheit hatten verschiedene Arbeiten gezeigt, dass in den meisten Organismen Biotin-abhängige Carboxylasen exprimiert werden, die essentiell an der Fettsäuresynthese beteiligt sind. Beispielsweise katalysiert die Acetyl-CoA-Carboxylase

(ACC) die irreversible Carboxylierung von Acetyl-CoA unter Entstehung von Malonyl-CoA. Die häufigste Carboxylase ist die Ribulose-1,5-bisphoshat-Carboxylase (Rubisco), die in allen C_3-Pflanzen und photoautotrophen Organismen innerhalb des Calvin-Zyklus der Photosynthese CO_2 auf Ribulose-1,5-bisphosphat überträgt (Tabita *et al.*, 2007). Bei den Carboxylasen handelt es sich um Multienzym-Komplexe aus mehreren funktionellen, miteinander verbundenen Untereinheiten. Dazu zählen ein Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP) sowie die katalytischen Untereinheiten Biotin-Carboxylase (BC) und Carboxyltransferase (CT). Bei der (Trans-)Carboxylierung wird durch die BC-Einheit zuerst ein Carboxylrest auf das als prosthetische Gruppe kovalent an eine spezifische Lysin-Seitenkette in BCCP gebundene Biotin übertragen, welcher dann durch die CT-Einheit weiter mit dem eigentlichen Substrat kovalent verknüpft wird (Cronan, 2001; s. Abb 4.2).

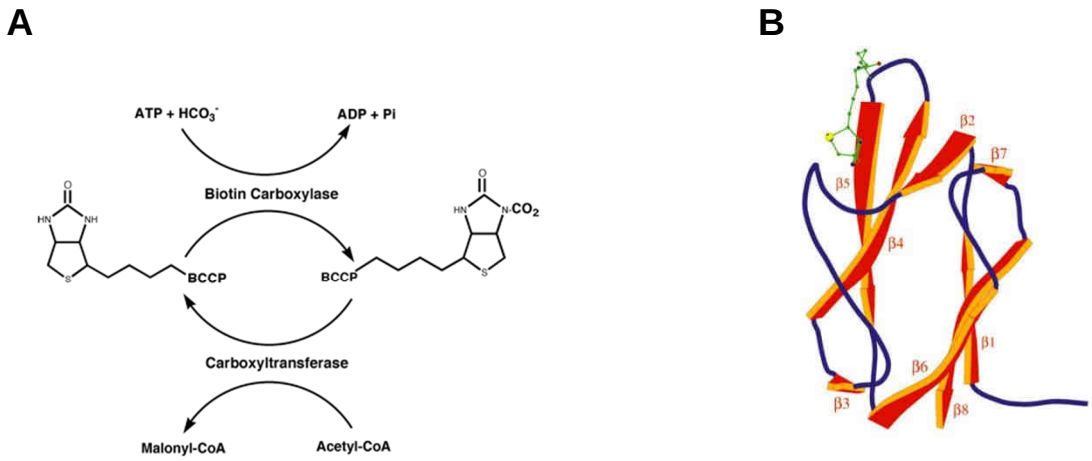


Abb. 4.2:
A: Mehrschritt-Reaktionsmechanismus der eukaryotischen Klasse I Carboxylasen (hier: Acetyl-CoA-Carboxylase): Verknüpfung einer Carboxylgruppe aus Hydrogencarbonat unter ATP-Verbrauch auf die Biotingruppe von BCCP durch die Biotin-Carboxylase (BC) und anschließende Übertragung der Carboxylgruppe auf das eigentliche Substrat (Acetyl-CoA) durch die Carboxyltransferase-Einheit (CT) unter Regeneration des Biotins (Abb. aus Cronan, 2001).
B: Tertiärstruktur der Biotinyl-Domäne von partiellem BCCP aus *E. coli* Acetyl-CoA-Carboxylase mit durch Biotin-Protein-Ligase spezifisch biotinyliertem Lysinrest oder Biocytin (grün; Abb. aus Athappilly and Hendrickson, 1995).

Die Biotinylierung der BCCP-Einheit an der Lysin-Seitenkette innerhalb einer konservierten Erkennungssequenz wiederum ist eine hochspezifische Reaktion, welche durch Biotin-Protein-Ligasen (BPL) katalysiert wird (s. Abb. 4.3). Die BPL-vermittelte Biotinylierung ist biologisch eine höchst seltene Form der posttranslationalen Proteinmodifikation. Je nach Spezies erfolgt nur für 1 bis 5 verschiedene Arten von Proteinen eine enzymatische Modifikation durch Biotin. Dazu zählen vier Gruppen von metabolischen Schlüsselenzymen (Acetyl-CoA-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase und β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase) sowie eine weitere Gruppe anderer Enzyme, die an speziellen metabolischen Transformationen beteiligt sind wie die Transcarboxylasen oder Oxalacetat-Decarboxylasen (Samols *et al.*, 1988; Chapman-Smith und Cronan, 1999[a]).

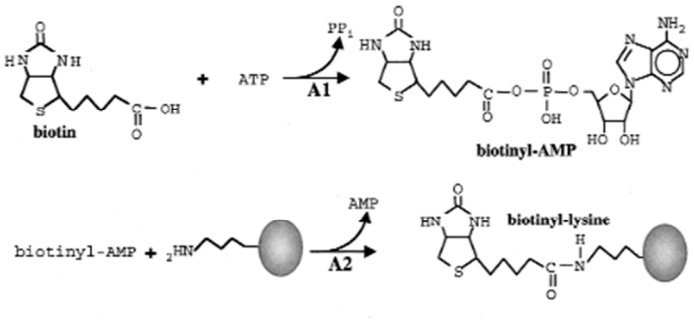


Abb. 4.3:
Reaktionsmechanismus der Biotin-Protein-Ligase (BPL): Unter Hydrolyse von ATP katalysiert BPL erst die Aktivierung von Biotin zu Biotinyl-AMP und in einem zweiten Schritt die eigentliche Biotinylierung an einem Lysinrest innerhalb des Erkennungsmotivs von BCCP (Abb. mod. nach Reche, 2000).

Die Interaktion von BPL und BCCP wurde für verschiedene Spezies ausgiebig untersucht. Für beide Proteine wurden dabei weitreichende Homologien in Bezug auf die an der Reaktion beteiligten Sequenzbereiche nachgewiesen (Reche und Perham, 1999; Chapman-Smith und Cronan, 1999[b]; Gupta *et al.*, 2010). 1994 wurde erstmals die Verwendung der BCCP-Sequenz aus *E. coli* als Affinitäts-Tag berichtet (Weiss *et al.*, 1994). Dieses wurde nach C-terminaler Fusion an ein Zielprotein bei Expression in *E. coli* endogen durch die Biotinligase BirA biotinyliert. Im Weiteren wurde die metabolische Biotinylierung von adenoviralen Proteinen sowie von GFP in Säugerzellen bei Fusion mit der 1.3S-Untereinheit der Transcarboxylase aus *P. shermanii* beschrieben (Parrot und Barry, 2001). Zudem konnte über Untersuchungen einer Deletionsmutante Δ[10-48] für die BCCP-Region in der 1.3S-Untereinheit gezeigt werden, dass die verbleibenden Reste bei Expression in *E. coli* ebenfalls durch BirA erkannt und effizient an einem spezifischen Lysin biotinyliert wurden (Jank *et al.*, 1999).

In diesem Zusammenhang wurde getestet, ob auch innerhalb des hier verwendeten Expressionssystems eine entsprechende Sequenz effektiv als Affinitäts-Tag für die scFv-Fragmente bei C-terminaler Fusion durch endogene Biotinylierung über humane BPL bei Expression in HEK293 genutzt werden konnte (s. Abb. 3.20, Kap. 3.2.5). Bei Expression in Anwesenheit von 100 µM D-(+)-Biotin wurde qualitativ eine endogene Biotinylierung der scFv-BCCP-Fragmente beobachtet. Entsprechend war auch hier von einer Erkennung bzw. Verwendung der fusionierten BCCP-Sequenz aus *P. shermanii* als Substrat durch humane BPL in HEK293, die auch als HCS (Holocarboxylase Synthetase) bezeichnet werden, auszugehen. In Abwesenheit von D-(+)-Biotin im Kulturmedium konnte dagegen keine Biotinylierung der scFv-Fragmente nachgewiesen werden (s. Abb. 3.21, Kap. 3.2.5).

Bei weiteren Untersuchungen zur Effizienz der Biotinylierung von scFv-BCCP-Fragmenten stellte sich heraus, dass nur ein sehr geringer Anteil der insgesamt exprimierten Fragmente effektiv biotinyliert worden war. Dies spiegelte sich in der Diskrepanz von Detektionssignalen im Western Blot bei Nachweis über das Myc-Tag bzw. über Biotin nach einer Affinitätschromatographie mit monomerem Avidin bzw. Pulldown mit Streptavidin-Agarose wider (s. Abb 3.22 A u. B, Kap. 3.2.5). Zudem wurde nur eine relativ geringe Verdrängungsaktivität der über monomeres Avidin aufgereinigten scFv-Fraktionen, verglichen mit der Ausgangsmenge, im kompetitiven ELISA beobachtet (s. Abb. 3.22 C, Kap. 3.2.5). Aus den Western Blot-Analysen wurde die Biotinylierungseffizienz der anti-CEACAM scFv-Fragmente auf ca. 5% geschätzt. Diese Beobachtungen deckten sich mit kürzlich veröffentlichten Arbeiten (Niers *et al.*, 2011). Hier wurde für ein anti-EGFR scFv-Fragment mit vollständiger BCCP-Sequenz bei Expression in verschiedenen humanen Tumorzelllinien ebenfalls nur ein stark begrenztes Maß an endogener Biotinylierung nachgewiesen. Dabei

wurde die Notwendigkeit einer Co-Expression z.B. bakterieller BPL innerhalb derartiger Expressionssysteme herausgestellt.
Entsprechend wurde für eine Steigerung der spezifischen Biotinylierung von anti-CEACAM scFv-Fragmenten die bakterielle Biotinligase BirA zur Co-Expression in HEK293-Zellen in den pEBB-Vektor kloniert (s. Abb. 3.23, Kap. 3.2.6). Für das Erreichen einer größtmöglichen Biotinylierungseffizienz wurde diese ebenfalls mit einem Ig kappa-Signalpeptid versehen, unter der Annahme, dass die BCCP-tragenden Zielproteine sowohl auf dem sekretorischen Pfad in der Zelle als auch nach Sekretion in den Zellkulturüberstand biotinyliert werden. Durch vorausgehende Klonierungsschritte in *E. coli* erhielten die scFv-Fragmente eine zusätzliche C-terminale BAP-Sequenz (*biotin acceptor peptide;* GLNDIFEAQ**K**IEWHE). Diese war nach *screening* von Peptidbibliotheken als alternatives Minimalsubstrat von BirA aus *E. coli* identifiziert worden und wies eine vergleichbar effiziente Biotinylierung wie das native *E. coli* BCCP-Element auf (Schatz, 1993; Beckett *et al.*, 1999). Unter Einsatz dieser Expressionsstrategie konnte für die resultierenden scFv-BAP-Fragmente eine deutliche Steigerung des Biotinylierungsgrads auf ca. >50% aus vergleichenden Western Blot-Analysen abgeschätzt werden (s. Abb. 3.24, Kap. 3.2.6). Zudem wurde eine quantitative Aufreinigung über monomeres Avidin (s. Abb. 3.25, Kap. 3.2.6) sowie der direkte Nachweis der Fragmente als spezifische Primärantikörper in Western Blot und ELISA gegen CEACAM-Proteine bzw. als Sonden in der Immunfluoreszenz auf CEACAM-positiven HT29-Zellen erreicht (s. Abb. 3.26 u. 3.27, Kap. 3.2.7/Abb. 3.29, Kap. 3.2.8). Hierbei zeigten beide scFv-Konstrukte ein vergleichbares Bindungs- und Färbungsverhalten wie die korrespondierenden monoklonalen Antikörper.

4.2.4 Charakterisierung struktureller Unterschiede der eukaryotisch exprimierten scFv-Fragmente

Nach eukaryotischer Expression der anti-CEACAM scFv-Fragmente wurde bei Auftrennung im Polyacrylamid-Gel und anschließenden Nachweisverfahren für T84.1 scFv im Gegensatz zu T84.66 scFv das Auftreten einer Doppelbande beobachtet. Um dieses besondere Wanderungsverhalten zu klären, wurden die scFv-Fragmente vergleichend auf mögliche posttranslationale Modifikationen untersucht. Bei der Behandlung mit Peptid N-Glycosidase F (PNGase F) konnte die Abspaltung einer glykosidischen Modifikation von T84.1 scFv durch entsprechende Verschiebung der Laufweite im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden (s. Abb. 3.28, Kap. 3.2.7). Entsprechend war das Doppelbandenmuster für T84.1 auf eine partielle N-Glykosylierung zurückzuführen: Die obere der beiden Banden stellte eine dominierende, glykosylierte Form des scFv-Fragments dar, welche bei PNGase F-Behandlung eliminiert wurde. Die untere Bande dagegen repräsentierte die nicht glykosylierte Form, welche nach Deglykosylierung ausschließlich vorlag.
Eine O-Glykosylierung konnte für T84.1 scFv ausgeschlossen werden, da nach Inkubation mit O-Glycosidase (Endo-α-*N*-Acetylgalactosaminidase) in der Western Blot-Analyse keine Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe vorlag. Bei Inkubation mit einer weiteren N-Glycosidase, Endoglycosidase H (EndoH), wurde ebenfalls keine Veränderung zur Kontrollprobe festgestellt. Diese Tatsache lässt eine Einschränkung der vorliegenden

Form einer N-Glykosylierung durch die bekannten Spezifitäten der beiden N-Glycosidasen zu. PNGase F spaltet N-glykosidische Bindungen direkt zwischen dem Asparaginrest (N) und dem ersten N-Acetylglucosamin-Rest der Glykostruktur, es sei denn dieser ist in einer α(1-3)-Verknüpfung mit Fucose verbunden. EndoH dagegen spaltet die β(1-4)-Verknüpfung zwischen dem ersten und dem zweiten N-Acetylglucosamin-Rest einer glykosidischen Modifikation, allerdings nur für Strukturen vom Hi-Mannose- oder Hybrid-Typ (s. Abb. 4.4). Die zusätzlich vorkommenden bi-, tri- und tetraantennären Strukturen, die durch Abspaltung von Mannoseresten und Zufügen weiterer Zuckermoleküle wie Galactose und N-Acetyl-Neuraminsäure bei der Passage des Golgi-Apparates entstehen, werden nicht durch EndoH gespalten (Koide und Muramatsu, 1974; Alberts, 2002; Depetris *et al.*, 2012).

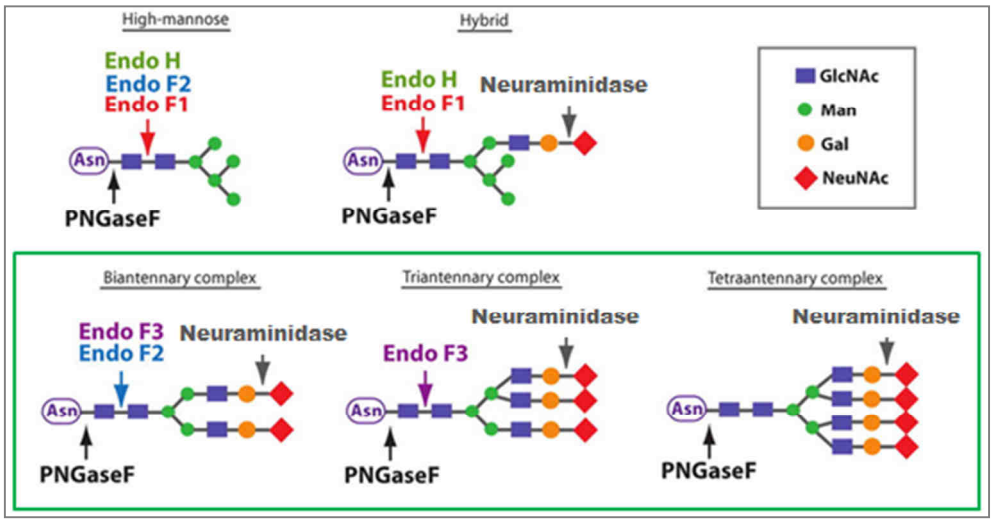


Abb. 4.4:
Reaktivitätsschemata verschiedener N-Glycosidasen. Die in dieser Arbeit zur Charakterisierung glykosidischer Modifikationen der in HEK293 exprimierten scFv-Fragmente verwendeten N-Glycosidasen PNGase F und EndoH weisen unterschiedliche Spezifitäten für Glykostrukturen auf. PNGase F spaltet die Bindung zwischen der Asparagin-Seitenkette und dem ersten N-Acetylglucosamin-Rest der Glykostruktur für alle der wesentlichen Gruppen N-glykosidischer Modifikationen, ausser im Falle einer α(1-3)-Verknüpfung der GlcNAc-Einheit mit Fucose. EndoH dagegen spaltet die β(1-4)-Verknüpfung zwischen der ersten und der zweiten GlcNAc-Einheit, jedoch nur für die Modifikationsformen vom Hi-Mannose- und vom Hybrid-Typ (oben). Die komplexen antennären Strukturen (unten, grün umrandet), die erst bei späterer Prozessierung im Golgi-Apparat entstehen, werden in Hinblick auf die hier verwendeten Glycosidasen nur durch PNGase F gespalten (Abb. mod. nach Lee *et al.*, 2009).

Wahrscheinlich handelte es sich bei der für T84.1 scFv vorliegenden Glykosylierungsform entsprechend um eine komplexe antennäre Struktur. Die weitere Untersuchung mit zusätzlichen N-Glycosidasen wie EndoF2 und EndoF3 könnte näheren Aufschluss über die genaue Form der komplexen N-glykosidischen Modifikation bringen. Innerhalb der Sequenz für T84.1 scFv wurde nur ein Element am C-Terminus der V_L-Domäne identifiziert, das einem Motiv für N-glykosidische Modifikation entsprach (Asn-X-Ser/Thr) und gleichzeitig im nachweislich nicht glykosylierten T84.66 scFv nicht vorlag. Dies konnte mit Hilfe des NetNGlyc 1.0 Servers des *Center for Biological Sequence Analysis* (CBS; Technische Universität Dänemark; Tomar *et al.*, 2011) bestätigt werden, welcher die Wahrscheinlichkeit einer glykosidischen Modifikation für eine bestimmte Peptidsequenz durch Datenbankabgleich vorhersagte. Diese lag für das besagte Motiv in T84.1 scFv bei >50% (s. Abb. 4.5).

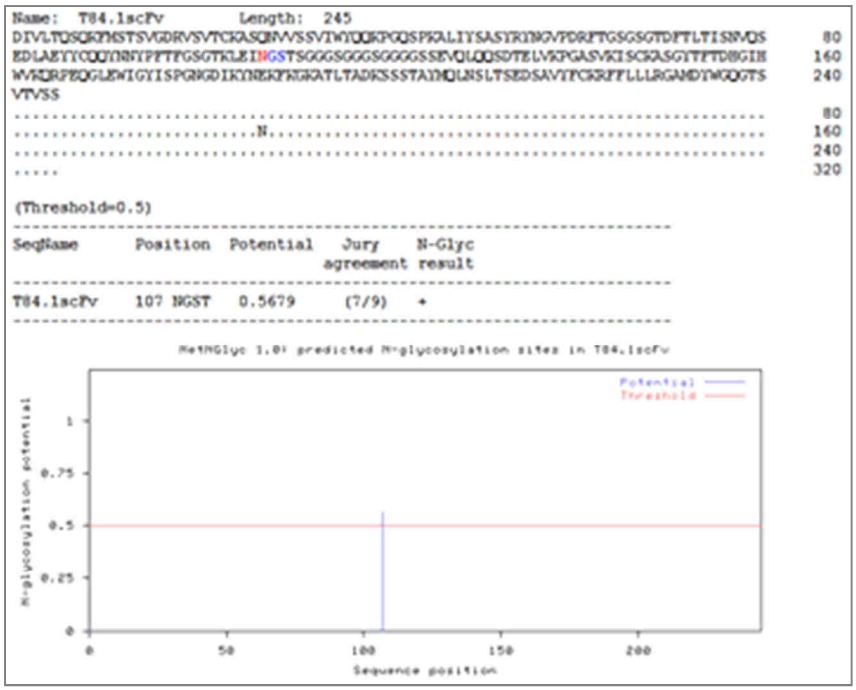


Abb. 4.5:
Sequenzauswertung für T84.1 scFv hinsichtlich N-glykosidischer Modifikationen durch NetNGlyc 1.0 Server (CBS, Technische Universität Dänemark); die Analyse bestätigte das Vorhandensein eines einzelnen N-glykosidischen Modifikations-motivs (Asn-X-Ser/Thr) gegenüber nicht glykosyliertem T84.66 scFv.

Die Beschaffenheit bzw. Lage des Glykosylierungsmotivs in T84.1 scFv lässt mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten, dass es sich um eine artifizielle *in vitro*-Modifikation durch Expression in HEK293-Zellen handelt. Das Motiv für N-Glykosylierung ist in diesem Fall durch Klonierung als Kombination aus dem Asparagin (N) als letztem Aminosäure-Rest der variablen Leichtketten-Domäne und den ersten beiden Resten des Peptidlinkers, Glycin (G) und Serin (S) entstanden. Diese vervollständigten hierbei zufällig das C-terminal gelegene Erkennungsmotiv für eine N-Glykosylierung (Asn-X-Ser/Thr). Typischerweise sind glykosidische Modifikationen von Immunglobulinen nur im Bereich der konstanten C_H2-Region des Fc-Teils zu finden. Hier ermöglichen sie im Wesentlichen die Fc-Rezeptor-vermittelte Bindung eines Antikörper/Antigen-Komplexes auf der Oberfläche von Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen für die weitere Internalisierung oder Auslösung einer zytotoxischen Reaktion (Wright und Morrison, 1997).
Hinweise auf eine Beeinflussung der Bindungsfähigkeit durch die glykosidische Modifikation konnten aus den Experimenten dieser Arbeit nicht abgeleitet werden. Für konkrete Aussagen hierzu wäre eine vergleichende Untersuchung der Bindung glykosylierter und nicht-glykosylierter scFv-Spezies erforderlich. Dazu würden hinreichende Mengen der nicht glykosylierten Form benötigt, so dass eine Inkubation mit Glycosidasen im großen Maßstab und anschließender Aufreinigung des scFv-Fragments erfolgen müsste. Eine andere Möglichkeit der Produktion nicht glykosylierter scFv-Formen wäre die gezielte Mutagenese des Glykosylierungsmotivs vor Transfektion oder die Expression des vorliegenden Konstrukts in Anwesenheit von Tunicamycin zur Inhibition der N-Glykosylierung (Fan *et al.*, 1997). Von der anderen Seite betrachtet kann die gezielte Glykosylierung jedoch auch zu einer Optimierung der biophysikalischen Eigenschaften für die scFv-Fragmente wie z.B. einer Erhöhung der Stabilität und Löslichkeit führen (Lizak *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang könnten sich derartige Modifikationen z.B. für eine verlängerte Bluthalbwertszeit bei in *vivo*-Einsatz möglicherweise zu Nutze gemacht werden.

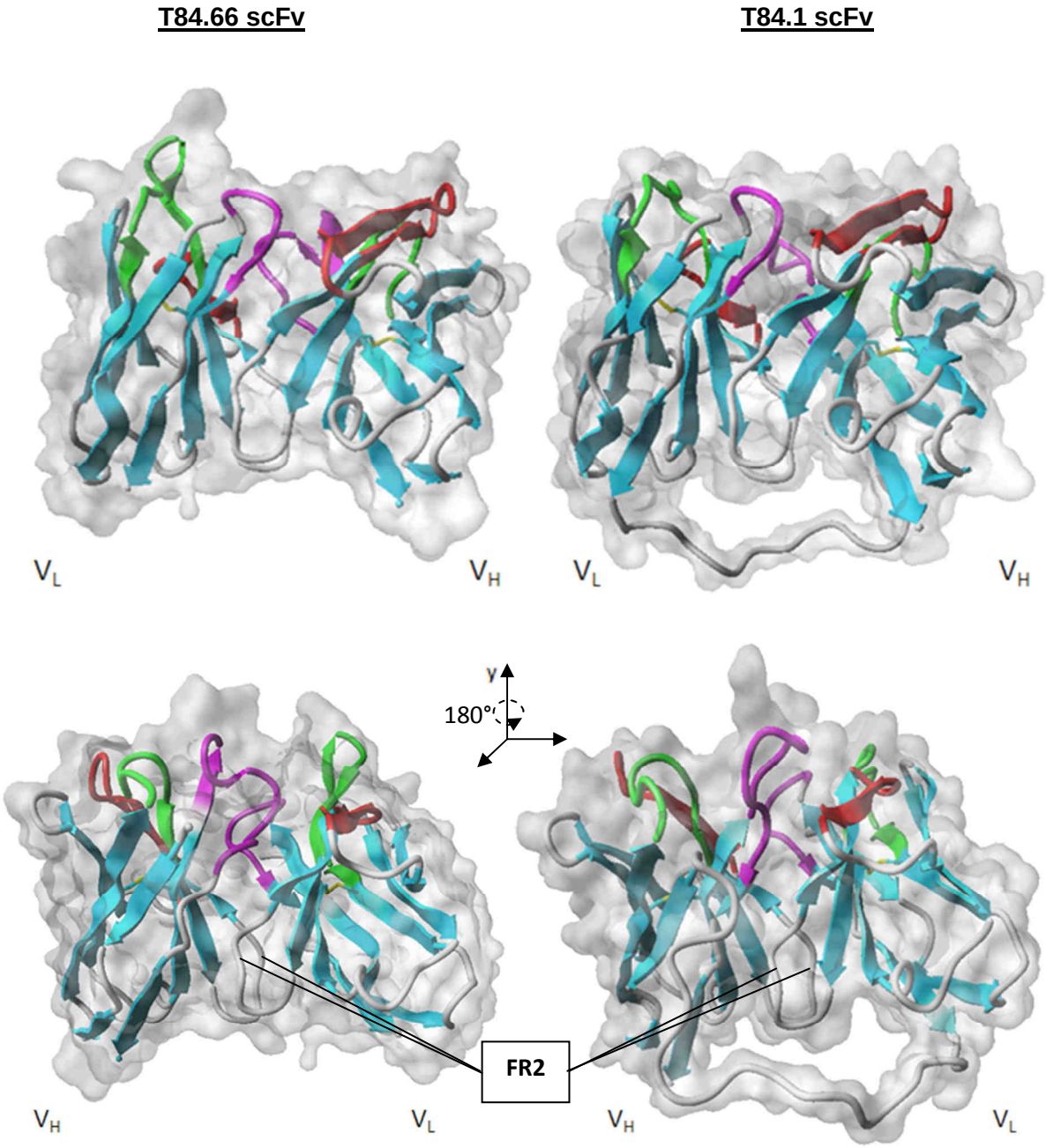
Für T84.66 scFv bzw. für das dimere Konstrukt (*diabody*) ist die dreidimensionale Kristallstruktur bereits bekannt, allerdings ist in der Darstellung der Peptidlinker nicht enthalten (PDB-Code: 1j05 bzw. 1moe; Kondo *et al.*, 2002, nicht publizierte Daten; Carmichael *et al.*, 2003). Über den ModWeb-Server der ModBase-Datenbank konnte auf Basis struktureller Übereinstimmungen mit bekannten homologen Sequenzen zur Veranschaulichung ein hypothetisches 3D-Model für T84.1 scFv berechnet werden (Pieper *et al.*, 2011). Die Bearbeitung der Modelle für die hier dargestellte, graphische Form erfolgte mit YASARA view bzw. mit PyMOL Software (s. Abb. 4.6).

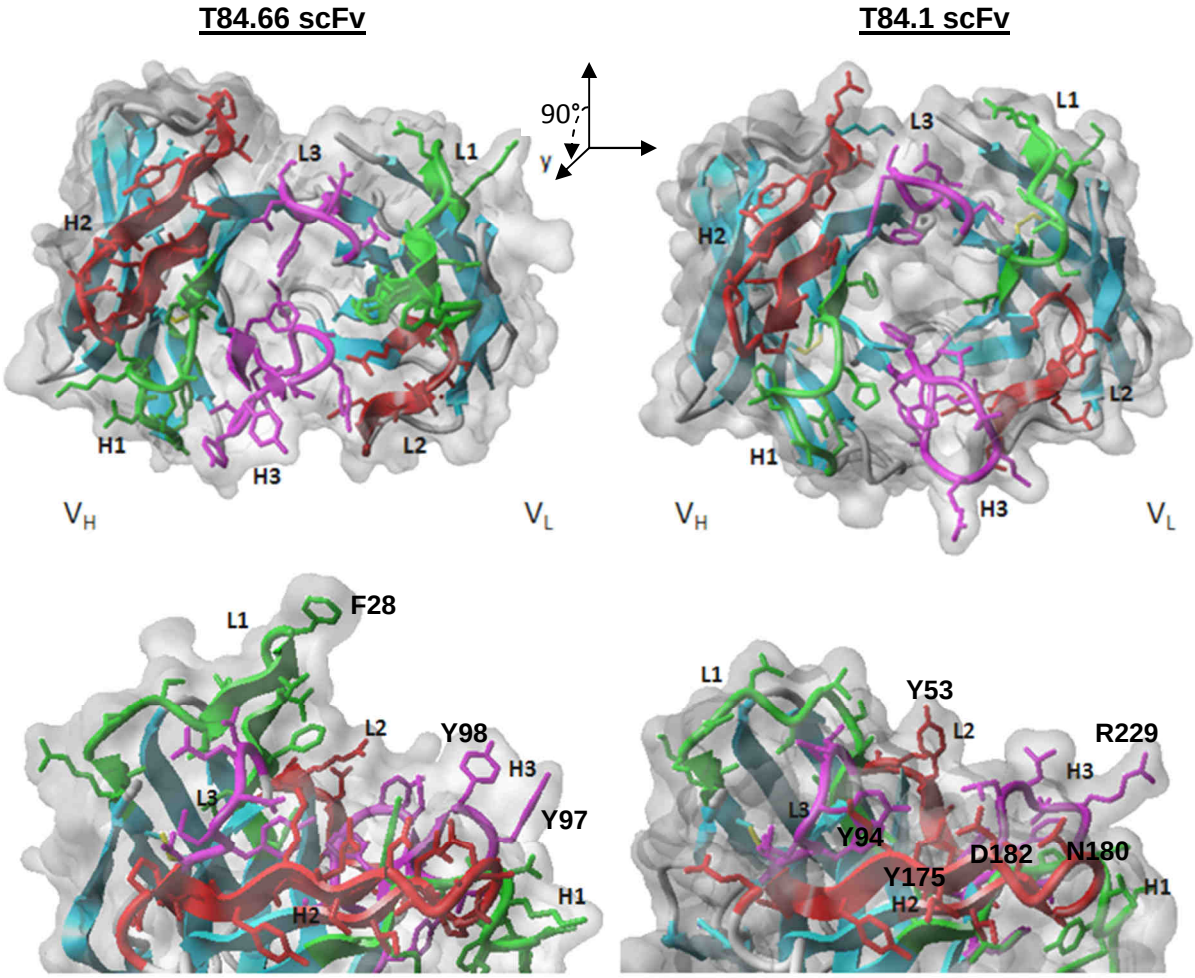
Beide scFv-Fragmente zeigten im Vergleich eine überaus ähnliche Gerüststruktur (*scaffold*) aus antiparallelen β-Faltblättern (hellblau markierte Pfeile) und den dazwischen liegenden Schleifen und Kehren (grauer Faden). Diese Grundstruktur für Ig-Domänen ist hochgradig konserviert und daher ein gemeinsames Merkmal für sämtliche Antikörper bzw. Antikörperderivate (s. Kap. 1.2.3). Die *framework regions* 2 (FR2) beider variablen Domänen, die in der zweiten Reihe von Abbildung 4.6 durch Linien markiert sind, enthalten ein konserviertes Motiv aus überwiegend hydrophoben Resten, welches durch nicht-kovalente Wechselwirkungen die Dimerisierung der beiden Domänen bewirkt bzw. diese in die erforderliche Konformation zur räumlichen Ausbildung der CDRs zwingt. Die einzelnen Domänen sind jeweils durch eine intramolekulare Disulfidbrücke über die Schwefel-Atome zweier Cysteinreste stabilisiert (gelbe Markierung).

Vor allem bei Aufsicht auf die *complementarity determining regions* (CDRs; dritte und vierte Reihe, Abb. 4.6) werden die wesentlichsten strukturellen Unterschiede beider scFv-Fragmente deutlich, die zur spezifischen Bindung des jeweiligen CEACAM-Epitops befähigen. Während die Reste der hypervariablen Regionen L3 und H3, die gemeinsam die CDR3 bilden (magentafarbene Markierung), bei T84.66 (links) relativ dicht zusammenliegen und der Moleküloberfläche (graue Umrandung) in dieser Betrachtung eine eher ellipsoide Form verleihen, haben die Seitenketten der CDR3-Reste bei T84.1 (rechts) deutlich mehr Abstand zueinander, so dass in der Molekülmitte eine regelrechte Furche entsteht und das Fragment in dieser Ansicht einen eher sphärischen Charakter erhält. Auffällig in der Nahaufnahme der CDRs (vierte Reihe) ist besonders die höhere räumliche Komplexität der hypervariablen Region 1 der leichten Kette (L1, grüne Markierung) für T84.66 scFv (links), die vier AS-Reste mehr aufweist als bei T84.1 scFv (rechts). Der herausragende Phenylalanin-Rest (F28) in der L1-Region von T84.66 erscheint in dieser Form wie der Teil einer Klammerstruktur, die Bereiche des Epitops durch hydrophobe Wechselwirkungen an dieser Stelle einschließt. Den Gegenpart in einer solchen Klammerstruktur könnten die unmittelbar aufeinanderfolgenden Tyrosinreste Y97 und Y98 in der H3-Region darstellen.

Für die räumliche Paratop-Struktur von T84.1 scFv ließe sich vermuten, dass einige hervorstehende Seitenketten wie von Y53 in L2 und R229 in H3 sowie der gegenüberliegenden Reste von N180 und D182 in H2 durch hydrophile Interaktionen in der Peripherie des Epitops das Antigen eng an die zentrale Mulde des scFv-Fragments heranführen, in der für weitere Wechselwirkungen prädestinierte Seitenketten wie die der Tyrosinreste Y94 in L3 und Y175 in H2 die Antigenbindung weiter verstärken. Die hier erörterten Bindungsstrukturen und potentiellen Interaktionen beruhen auf theoretischen Annahmen. Die tatsächliche Struktur bzw. Konformation für die an der Antigen-/ Antikörperbindung beteiligten CDRs und Aminosäurereste würde sich zweifelsfrei nur durch entsprechende Röntgenstrukturanalysen kristallisierter Proteinkomplexe bestimmen lassen.

Abb. 4.6:
Vergleichende graphische Darstellung der 3D-Struktur für T84.66 scFv ohne Peptidlinker (links, basierend auf der entsprechenden Kristallstruktur mit PDB-Code 1J05) und T84.1 scFv (rechts, hypothetisches Modell basierend auf Sequenzhomologie mit bekannten Strukturen über den ModWeb-Server in Einklang mit zulässigen Konformationen für Dieder-Winkel nach Ramachandran-Plot). Der Peptid-*Backbone* ist im Cartoon-Stil dargestellt als grauer Faden mit den hellblau hervorgehobenen Sekundärstrukturen für antiparallele β-Faltblatt-Motive in den beiden variablen Domänen. Farbig markiert sind zudem die Bereiche bzw. AS-Reste der hypervariablen Regionen, die zusammen die drei *complementarity determining regions* oder CDRs ausbilden (grün: L1 + H1 = CDR1; rot: L2 + H2 = CDR2; magenta: L3 + H3 = CDR3). Die Molekülоberfläche ist auf Basis der Elektronendichte als hellgraue, durchsichtige Hülle der 3D-Strukturen angezeigt. Die Disulfid-Brücken bildenden Schwefelatome der Cysteinreste sind gelb markiert. Dargestellt ist die räumliche Struktur beider scFv-Fragmente als Seitenansicht (erste Reihe) bzw. nach 180°-Drehung um die y-Achse (zweite Reihe) sowie in Aufsicht auf die CDR-Regionen mit den zugehörigen AS-Resten nach Kippen der y-Achse um 90° (dritte Reihe) und in seitlicher Nahaufnahme der CDRs (vierte Reihe).





4.3 Generierung von CEACAM-reaktiven V_HH-Fragmenten durch Lama-Immunisierung und *phage display*

4.3.1 Immunisierung von *L. glama* mit rekombinanten CEACAM-Proteinen

Neben den monoklonalen murinen Antikörpern und den davon abgeleiteten scFv-Fragmenten mit CEACAM-Reaktivität wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich versucht, gegen CEACAM gerichtete V_HH-Fragmente bzw. Einzeldomänen-Antikörper herzustellen. Die V_HH-Fragmente als kleinste bekannte Antikörperderivate leiten sich von bestimmten Schwerketten-Antikörpern ohne leichte Immunglobulin-Ketten ab. Diese werden u.a. in verschiedenen Vertretern aus der Familie der *Camelidae* gebildet (s. Kap. 1.2.6). Ihre Entdeckung in *C. dromedarius* geht auf die Arbeiten von Hamers-Casterman *et al.* (1993) zurück. In weiteren Arbeiten, u.a. von van der Linden *et al.* (2000), wurden entsprechende Schwerkettenantikörper für Neuweltkamele wie *L. glama* beschrieben und charakterisiert. Spezifische V_HH-Domänen können durch Klonierung der betreffenden Gensegmente und anschließende Selektion durch z.B. Phagen-Display-Technologie gewonnen werden (s. Kap. 1.2.6).

In diesem Zusammenhang war für die Generierung von CEACAM-reaktiven V_HH-Domänen eine Immunisierung von Cameliden mit entsprechenden Protein-Antigenen erforderlich. Hierzu wurde Individuen der Gattung *Lama* innerhalb des Departments für Nutztierwissenschaften der Universität Göttingen rekombinant produziertes und aufgereinigtes CEACAM1 sowie kommerziell bezogenes CEACAM5 injiziert. Anhand präparierter Seren aus Blutproben wurde der Immunisierungserfolg durch protein-biochemische Methoden untersucht (s. Kap. 2.2.3-Kap. 2.2.4/Kap. 3.3.1-Kap. 3.3.2). Über einen Zeitraum von 26 Wochen wurden insgesamt 7 Immunisierungen der Tiere mit je 500 µg rekombinantem Protein vorgenommen. Unerwarteterweise erfolgte sowohl für das mit CEACAM1 als auch das mit CEACAM5 immunisierte Lama eine späte, simultane Ausbildung nachweisbarer Immunantworten nach der jeweils fünften Folgeimmunisierung (*boost*) in Woche 23 (s. Abb. 3.31, Kap. 3.3.1). In anderen Arbeiten wurde eine Immunantwort bei Immunisierung von *L. glama* mit einer an WGA (*wheat germ agglutinin*)-Lektin gebundenen Proteinfraktion nach ca. 42 Tagen sowie bei einer Immunisierung mit *Clostridium difficile*-Toxinen nach ca. 57 Tagen beobachtet (Mortezai, 2010; Hussack, 2011).

Für das mit CEACAM1 immunisierte Lama #6 wurde mittels ELISA eine ausschließliche Spezifität der im Vollserum enthaltenen Immunglobuline für CEACAM1 im Vergleich zu CEACAM5 und dem zu Kontrollzwecken eingesetzten BSA ermittelt. Das Serum des mit CEACAM5 immunisierten Lama #20 dagegen zeigte eine Immunreaktivität sowohl gegen CEACAM5 als auch CEACAM1. Der Immuntiter wurde bei serieller Verdünnung des Serums von Lama #6 gegenüber CEACAM1 bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:10.000 bzw. für das Serum von Lama #20 gegenüber CEACAM5 von 1:25.000 nachgewiesen (s. Abb. 3.32, Kap. 3.3.1).

In Western Blot-Experimenten wurde für die Vollseren beider Tiere außerdem eine zusätzliche Spezifität für CEACAM6 bei Inkubation auf Lysat von entsprechend transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen (s. Abb. 3.33, Kap. 3.3.2.1). Die Immunseren vor der fünften Folgeimmunisierung, in denen noch keine spezifische Immunantwort nachweisbar war, zeigten in Übereinstimmung mit den ELISA-Daten entsprechend keine spezifische Bindung für die vorhandenen CEACAM-Antigene. Eine Gesamtübersicht der Immunreaktivität für die Seren gegenüber den eingesetzten CEACAM-Spezies ist in Tab. 3.1 (Kap. 3.3.2.1) gegeben. Das Serum des mit CEACAM5 immunisierten Lamas #20 besaß somit eine Immunreaktivität gegenüber CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6, während das Serum des mit CEACAM1 immunisierten Lamas #6 nur mit CEACAM1 und CEACAM6 reagierte. Entsprechend musste entweder von einer unterschiedlichen Vielfalt oder von einer unterschiedlichen Epitop-Spezifität für die gebildeten Antikörper beider Individuen hinsichtlich den in weiten Teilen homologen CEACAM-Antigenen ausgegangen werden.

Durch *alignment* der Peptid-Sequenzen für die drei CEACAM-Proteine gemäß UniProt-Datenbank ergaben sich zwei wesentliche Bereiche, in denen CEACAM1 und CEACAM6 eine hohe Homologie bezüglich der Aminosäuren-Abfolge aufweisen (ca. 90%-100%). Gleichzeitig lag für diese Bereiche eine geringere Homologie zu dem entsprechenden Sequenzabschnitt für CEACAM5 vor (ca. 75%-90%; s. Abb. 4.7, schwarze Umrandung). Diese Bereiche lagen in der jeweils C-terminalen Region der N-terminalen IgV-Domäne (blau) sowie der IgC1-Domäne A1 (rot) und stellen mögliche Epitope der CEACAM-reaktiven Antikörper im Serum von Lama #6 dar, welches keine Reaktivität für CEACAM5 zeigte.

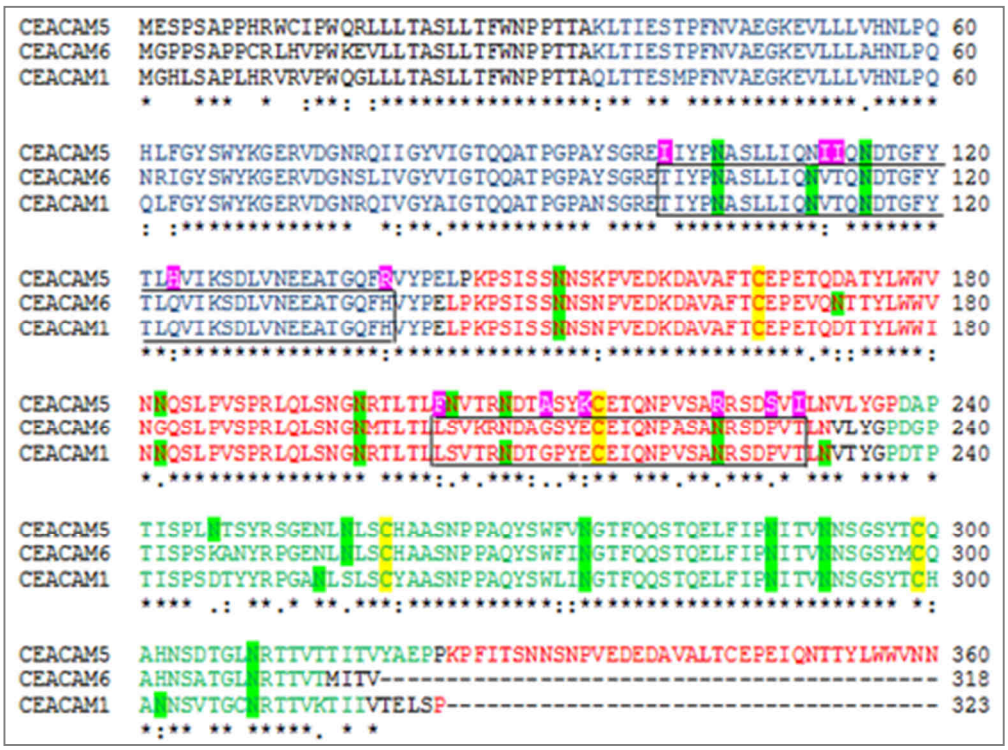


Abb. 4.7:
Alignment der auf dem UniProt-Server hinterlegten Peptidsequenzen für CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA) und CEACAM1-4L (BGPa). Dargestellt ist der Sequenzausschnitt vom N-Terminus der Proteine bis zum Ende der B1-Domäne, nach der das CEACAM6-Protein endet bzw. an einem amidierten Glycin-Rest über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (nicht abgebildet). Die ersten 34 AS in schwarzer Schrift stellen das jeweilige Signalpeptid für Membanproteine dar. In farbiger Schrift dargestellt sind die N-terminale IgV-Domäne (blau) und sowie die IgC1- bzw. IgC2-Domänen A1 (rot) und B1 (grün). Die Cysteinreste, welche innerhalb der IgC-Domänen Disulfidbrücken ausbilden, sind gelb und die Asparagin-Reste, für die eine N-glyosidische Modifikation bekannt ist, grün unterlegt. Mit schwarzen Linien umrandet sind die Bereiche, in denen CEACAM1 und CEACAM6 hochgradig homolog sind und sich gleichzeitig von CEACAM5 relativ gesehen am stärksten unterscheiden. Die magentafarben unterlegten Reste unterscheiden sich dort zwischen CEACAM5 und den anderen beiden CEACAM-Proteinen. Die Domänengrenzen für die unterschiedlichen Proteine entsprechen den Angaben aus der UniProt-Datenbank. Diese sind für die einzelnen Proteine nicht einheitlich.

Für eine gesonderte Charakterisierung der CEACAM-Reaktivität in Bezug auf die Schwerkettenantikörper-Fraktionen als Basis der V_HH-Fragmente wurde eine Auftrennung der verschiedenen IgG-Spezies von Cameliden (cIgG) vorgenommen. Nach der von Hamers-Casterman/van der Linden beschriebenen kombinierten Affinitätschromatographie über Protein G/Protein A und Elution bei unterschiedlichen pH-Werten konnte eine vollständige Trennung der konventionellen Antikörper mit leichten und schweren Ketten (cIgG1) sowie der Schwerketten-Antikörper mit langer (cIgG2) und kurzer Scharnierregion (cIgG3) erreicht werden (s. Abb. 3.34 und Abb. 3.35, Kap. 3.3.2.2). Die ermittelten Anteile der einzelnen Subtypen an der cIgG-Gesamtsumme sind in Tab. 4.1 aufgeführt, zusammen mit den von van der Linden *et al.* (2000) ermittelten Referenzbereichen für cIgG-Subfraktionen in *L. glama*. Beide Seren zeigten eine Mengenverteilung für die einzelnen cIgG-Subtypen, die tendenziell in Einklang mit den Referenzbereichen von van der Linden *et al.* stand. Der Vergleich untereinander zeigte einen insgesamt ca. 20% höheren Anteil an Schwerkettenantikörper-Fraktionen für Serum #6 gegenüber Serum #20 nach abgeschlossener Immunisierung.

	Serum Lama #6	Serum Lama #20	Van der Linden (2000)
cIgG2 (*long hinge*)	20.1%	8%	5-15%
cIgG1 (conv.)	62%	81.8%	55-75%
cIgG3 (*short hinge*)	17.9%	10.2%	20-30%

Tab. 4.1: Übersicht der relativen Anteile der einzelnen cIgG-Subfraktionen an der jeweiligen cIgG-Gesamtmenge für Lamaseren #6 und #20 im Vgl. zu ermittelten Referenzwerten (van der Linden *et al.,* 2000)

Die isolierten cIgG-Subtypen wurde erneut im Western Blot auf Lysaten von CEACAM1- und CEACAM6-transfizierten HEK293-Zellen sowie auf rekombinantem CEACAM5 inkubiert. Die Resultate nach Sub-Fraktionierung der Schwerkettenantikörper mit langer (cIgG2) und kurzer Scharnierregion (cIgG3) sowie der konventionellen Antikörper mit schweren und leichten Ketten (cIgG1) legten nahe, dass die Subfraktionen aus Serum #6 nur noch für CEACAM1 spezifisch waren, während die Subfraktionen aus Serum #20 nach wie vor eine Spezifität für CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 zeigten (s. Abb. 3.36, Kap. 3.3.2.3). Möglicherweise wurde die spezifische Bindung von CEACAM6 im Vollserum von Lama #6 überwiegend durch Immunglobulin-Subklassen vermittelt, die bei der hier durchgeführten, kombinierten Affinitätschromatographie über Protein G/Protein A nicht aufgereinigt wurden, wie z.B. IgM. Die Bindung der isolierten cIgG-Subfraktionen an CEACAM1 erfolgte dabei durchweg bei niedrigeren Molekülmassen im Vergleich zu den jeweiligen Vollseren, was möglicherweise auf eine bevorzugte Präferenz für nur gering glykosylierte Formen zurückzuführen war. Die Wiederholung der Western Blot-Analyse nach Immunpräzipitation von CEACAM1 und CEACAM6 aus den Lysaten entsprechender HEK293-Transfektome mit T84.1 mAk zeigte eine schwächere, aber spezifische Bindung für CEACAM1 bei ca. 120 kDa. Somit wurden in der IP durch T84.1 mAk hauptsächlich höher glykosylierte CEACAM1-Formen präzipitiert, welche durch die einzelnen cIgG-Fraktionen der Lamaseren dennoch weitgehend gebunden wurden. Nur für die cIgG2-Fraktion aus Lama #6 konnte nach IP der CEACAM-Antigene keinerlei spezifische Bindung mehr beobachtet werden. Vermutlich besaß diese Fraktion eine überwiegende Spezifität für die gering oder nicht glykosylierten CEACAM1-Formen. CEACAM6 wurde auch nach IP durch keinen der aus dem Serum von Lama #6 isolierten cIgG-Sybtypen gebunden. Alle Subtypen aus Serum #20 dagegen zeigten eine Spezifität für CEACAM6.

4.3.2 Klonierung von Immunbibliotheken für CEACAM-immunisierte Lamas und Selektion CEACAM-spezifischer V_HH-Phagenfusionsproteine durch *phage display*

Zur Selektion CEACAM-reaktiver V_HH-Fragmente in einem *phage display*-Verfahren wurde weiter mit den immunologischen Repertoires der Lamas #6 und #20 für cIgG3 (*short hinge*) Schwerkettenantikörper gearbeitet. Nach Immunisierung wurde Gesamt-RNA aus Leukozyten von Lama #6 zur Generierung von Immunbibliotheken mit CEACAM1-reaktiven als auch von Lama #20 für den Erhalt von CEACAM5-reaktiven V_HH-Fragmenten verwendet. Nach reverser Transkription wurde die von Leukozyten-RNA beider Lamas gewonnene cDNA für eine spezifische Amplifikation der V_HH-Domänen mit den Primern *unifor* und

shortrev durch PCR eingesetzt. Dabei konnten für beide Ansätze spezifische Amplifikate mit erwartungsgemäßer Größe von ~450 bp erhalten werden (s. Abb. 3.38, Kap. 3.3.3.1). Die Transformation von TG1 *E. coli* mit den in pCANTAB 5E ligierten V_HH-Segmenten lieferte Ampicillin-resistente Klone in einer Größenordnung von $2{\cdot}10^5$ für beide Primärbibliotheken. Durch Sequenzanalyse von 88 bzw. 96 zufällig ausgewählten Klonen beider Bibliotheken wurde eine Beurteilung der Qualität bzw. der Komplexität hinsichtlich rekombinanter V_HH-Fragmente vorgenommen. Von den 90 auswertbaren Sequenzierungen zu Bibliothek #6s trat in 43 Fällen ein kurzes, zu den V_HH-Domänen nicht homologes Insert und in einem Fall ein Religation ohne V_HH-Insert auf. 46 der vorliegenden Inserts kodierten für V_HH-Domänen, von denen jedoch 6 nicht im Leserahmen vorlagen. Unter den 40 V_HH-kodierenden Inserts im richtigen Leserahmen lag keine Sequenz doppelt vor. Für Bibliothek #20 waren 79 der Sequenzierungen auswertbar, dabei wurde 39x ein kurzes, nicht homologes Insert und in zwei Fällen eine Religation des Vektors ohne V_HH-Insert erhalten, während in 38 Fällen für eine V_HH-Domäne kodiert wurde. Zudem lag eine Sequenz doppelt und eine weitere nicht im korrekten Leserahmen vor. Entsprechend ergaben sich Quoten von 44.4% für die Bibliothek #6s und von 45.6% für #20s in Bezug auf intakte, einzigartige V_HH-Domänen (s. Abb. 3.39 und Tab. 3.3, Kap. 3.3.3.2). Somit lag die Komplexität beider Bibliotheken bei ca. $1{\cdot}10^5$. In anderen Arbeiten wurden Komplexitäten für entsprechende Immunbibliotheken mit V_H- und $V_{L(kappa)}$-Domänen zur scFv-Generierung im Bereich von $2{\cdot}10^5$ -$4{\cdot}10^7$ und mit gegen mART2.2 gerichteten V_HH-Fragmenten im Bereich von $7{\cdot}10^3$-$6{\cdot}10^4$ beschrieben (Clackson *et al.*, 1991; Reyelt, 2008). In einer weiteren Arbeit wiesen Immunbibliotheken für mutierte scFv-Segmente gegen das C-reaktive Protein (CRP) mit einer Klonzahl von 1.2-2.5$\cdot10^7$ nach PCR-*screening* Quoten für korrekt ligierte Inserts von 39% bis 56% auf (Fröde, 2012).
Die Sequenzanalysen zeigten eine hohe Heterogenität hinsichtlich Aminosäureabfolge und Gesamtlänge. Die Bandbreite der Unterschiede in Bezug auf Gesamtlänge, Länge der CDRs sowie Vorhandensein zusätzlicher Cysteinreste neben den kanonischen Cysteinen vor CDR1 und CDR3 zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Bibliothek	Gesamtlänge	Länge CDR1	Länge CDR2	Länge CDR3	Anzahl Seq. mit zusätzl. Cystein-Paar	Anzahl Seq. mit zusätzl. freien Cystein
#6s	130-153 AS	10-12 AS	14-22 AS	9-24 AS	5	1
#20s	127-148 AS	9-12 AS	15-24 AS	8-22 AS	10	0

Tab. 4.2: Übersicht charakteristischer Merkmale für V_HH-kodierende Sequenzen aus Primärbibliotheken #6s und #20s hinsichtlich Sequenz-Gesamtlänge, Länge der CDRs und Anzahl zusätzlicher Cystein-Reste in Bezug auf Cystein-Paare, die möglicherweise eine zweite intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden sowie einzelnen, freien Cystein-Resten

Nachdem die Qualität und Vielfalt durch Testsequenzierungen für beide Bibliotheken überprüft war, wurde ein *phage display*-Verfahren mit Selektion durch Festphasen-*panning* durchgeführt, um aus Bibliothek #6s CEACAM1-reaktive und aus Bibliothek #20s CEACAM5-reaktive V_HH-Phagenfusionsproteine anzureichern (s. Kap. 1.2.6 und Kap. 2.2.1.18). Obwohl für beide Bibliotheken eine vergleichbare Komplexität ermittelt wurde, konnten für Bibliothek #20s in zwei kompletten Wiederholungen von je drei Durchläufen des Festphasen-*pannings* keine CEACAM5-reaktiven Phagenfusionsproteine angereichert bzw. identifiziert werden. Für Bibliothek #6s wurden nach drei *panning*-Runden vier

unterschiedliche, V_HH-kodierende Sequenzen aus den einzelnen Klonen identifiziert. In allen vier Fällen wurde im ELISA-*screening* eine spezifische Bindung der entsprechenden Phagenfusionsproteine an CEACAM1 beobachtet (s. Abb. 3.40 bis Abb. 3.42, Kap. 3.3.3.3 u. Kap. 3.3.3.4). Diese zeigten in Kontrollexperimenten weder eine Reaktivität gegenüber hoch homologem CEACAM5, noch eine unspezifische Bindung an Milchproteine bzw. an Polystyroloberflächen. Die vorgenommenen Nachweise erfolgten dabei über anti-M13 Antikörper gegen die Phagenhülle sowie über anti-E-Tag Antikörper, der das Fusionsprotein nachweist.
In beiden Fällen wurden übereinstimmende Ergebnisse erhalten, so dass von einer spezifischen Bindung durch die fusionierte V_HH-Domäne auszugehen war. Zudem konnte mit unterschiedlichen Konzentrationen der Phagenfusionsproteine eine vollständige Absättigung des verwendeten Antigens CEACAM1 erreicht werden, was ebenfalls ein Kriterium für die Spezifität der nachgewiesenen Bindung darstellte. Für einen zu Kontrollzwecken eingesetzten Klon mit einer Leserahmenverschiebung im V_HH-kodierenden Segment (No.15) wurde in keinem der Ansätze eine Bindung der entsprechenden Phagenpartikel beobachtet.
Drei der Sequenzen für CEACAM1-spezifische V_HH-Domänen zeigten untereinander eine fast vollständige Homologie in der AS-Sequenz von >98% (No.17, No.32 und No.53), was auf die erfolgte Anreicherung eines mit spezifischer Bindung assoziierten Sequenzmotivs hindeutete. Die vierte Sequenz dagegen besaß ein alternatives Motiv (Klon No.10), dass sich besonders in der AS-Abfolge innerhalb der CDRs sowie der *framework region* 3 deutlich von den anderen drei Klonen unterschied; der Homologiegrad für das gesamte Molekül lag bei ca. 60% und für die Summe der CDR-Abschnitte bei lediglich 15% (s. Abb. 3.40, Kap. 3.3.3.3). In Einklang dazu wurde bei gleichem Phagentiter ein signifikant unterschiedliches Bindungsverhalten hinsichtlich des Signalniveaus bei vollständiger Epitopabsättigung für die V_HH-Domäne mit alternativer Sequenz im Vergleich zu den hoch homologen Spezies beobachtet. Diese wiesen untereinander ähnliche Bindungsverläufe auf (s. Abb. 3.42. Kap. 3.3.3.4).
In Bezug auf Gesamtlänge und strukturelle Merkmale zeigten die identifizierten Sequenzen aller vier Phagenklone für CEACAM1-spezifische V_HH-Domänen Ähnlichkeiten. Die alternative Sequenz von Klon No.10 besaß insgesamt einen Aminosäure-Rest mehr als die der drei anderen Klone. Dieser wurde von der Lage her CDR3 zugeordnet, die hier aus insgesamt 19 AS-Resten gebildet wurde. Abgesehen von der unterschiedlichen AS-Abfolge wiesen die restlichen hypervariablen Regionen in allen vier Sequenzen für CEACAM1-spezifische V_HH-Domänen die gleiche Anzahl von AS-Resten auf (CDR1: 10 AS-Reste; CDR2: 17 AS-Reste). Für keine der vier V_HH-Spezies wurden ein oder mehrere zusätzliche Cystein-Reste beobachtet, so dass entsprechend jeweils nur eine intramolekulare Disulfidbrücke vorlag.

4.3.3 Vergleich theoretischer 3D-Strukturen für verschiedene V_HH-Spezies mit CEACAM1-Reaktivität

Auf Basis der identifizierten Sequenzen für CEACAM1-reaktive V_HH-Domänen nach *phage display*-Selektion aus Immunbibliothek #6s wurden für einen der drei homologen Vertreter

(No.17) sowie für den Klon mit geringerer Homologie (No.10) wie bereits für die scFv-Fragmente theoretische 3D-Strukturen durch Abgleich mit bekannten Strukturen über den ModWeb-Server erstellt (s. Abb. 4.8). In Einklang mit den ausgeprägten Unterschieden für die AS-Abfolge der dargestellten V_HH-Fragmente (ca. 60% Gesamthomologie, 15% Homologie bezogen auf die CDR-Abschnitte) sind erhebliche Abweichungen in der räumlichen Struktur zu erkennen. Während die Struktur für V_HH-Klon No.10 (Abb. 4.8, links) insgesamt eher abgerundet erscheint, besitzt die Struktur für Klon No.17 (Abb. 4.8, rechts) vielmehr einen zylindrisch länglichen Charakter bei deutlich ungleichmäßigerer Oberfläche.
Den wesentlichsten Beitrag zu dieser unterschiedlichen Erscheinungsform liefern jeweils die hypervariablen Regionen H3 in beiden Molekülen: Für Klon No.10 sind die Seitenketten der AS-Reste dieser Region eher flach an der Molekülоberfläche anliegend, bei Klon No.17 dagegen ragen zahlreiche Seitenketten von H3 in verästelter Form aus der Molekülоberfläche heraus. Auffällig ist hierbei für Klon No.10 ein Motiv aus zwei nahe zusammen stehenden Tryptophan-Resten in H2 (W53) und H3 (W104), die mit einem weiteren Tryptophan (W59)- sowie einem Histidin-Rest (H57) aus H2 eine aromatisches Quartett bilden. Diese Struktur könnte mit ebenfalls aromatischen Resten auf Seiten des Antigens Wechselwirkungen durch sogenanntes *pi-stacking*, vermittelt durch elektrostatische Kräfte der delokalisierten p-Orbital-Elektronen, ausüben. Im gleichen Bereich des Moleküls von V_HH-Klon No.17 bildet sich hier eine Art Klammerstruktur aus den Seitenketten der Reste R102 und Q105 aus H3 sowie Y32 aus H1, welche durch entsprechende positive Ladungen und eine polare Gruppe ebenfalls einen Teil der Antigenbindung vermitteln könnten.
In der unteren Reihe von Abb. 4.8 ist zudem ein weiterer struktureller Unterschied zu erkennen: Während sich für Klon No.10 in der hypervariablen Region H3 (magentafarben) eine ausgedehnte Schleife ausbildet, wird für die Struktur von No.17 an dieser Stelle ein kurzer helikaler Abschnitt vorhergesagt (dargestellt durch eine kurze Röhre). Derartige Strukturmotive können für V_HH-Domänen zusätzliche sekundäre Wechselwirkungen zur Stabilisierung der Antigenbindung bewirken. Diese Aspekte sprechen vermutlich für deutlich unterschiedliche Wechselwirkungen innerhalb der jeweiligen Antigenbindung bzw. für die spezifische Erkennung unterschiedlicher Epitope auf CEACAM1. Durch die geringe Molekülgröße und die verlängerten CDRs, die einen erheblichen Teil der Molekülоberfläche ausmachen, sind die V_HH-Fragmente zu einer Vielzahl von spezifischen Wechselwirkungen befähigt, von denen die hier vorgeschlagenen Motive, wenn überhaupt, nur einen Teil ausmachen. Die besondere Struktur verleiht den V_HH-Domänen einzigartige Fähigkeiten bezüglich der spezifischen Antigenbindung, die für konventionelle Antikörper und andere Antikörperfragmente nicht beobachtet werden. So sind V_HH-Domänen z.B. durch die ausgeprägten Schleifen der verlängerten H3-Region in der Lage, in das aktive Zentrum von Enzymen hineinzuragen und dort eine wirksame spezifische Inhibition der katalytischen Aktivität zu bewirken (Koch-Nolte *et al.*, 2007). Näheren Aufschluss über die tatsächlichen molekularen Wechselwirkungen bzw. die Erkennung unterschiedlicher Epitope auf CEACAM1 könnten auch hier röntgenkristallographische Experimente mit entsprechenden V_HH-Antigen-Komplexen liefern.

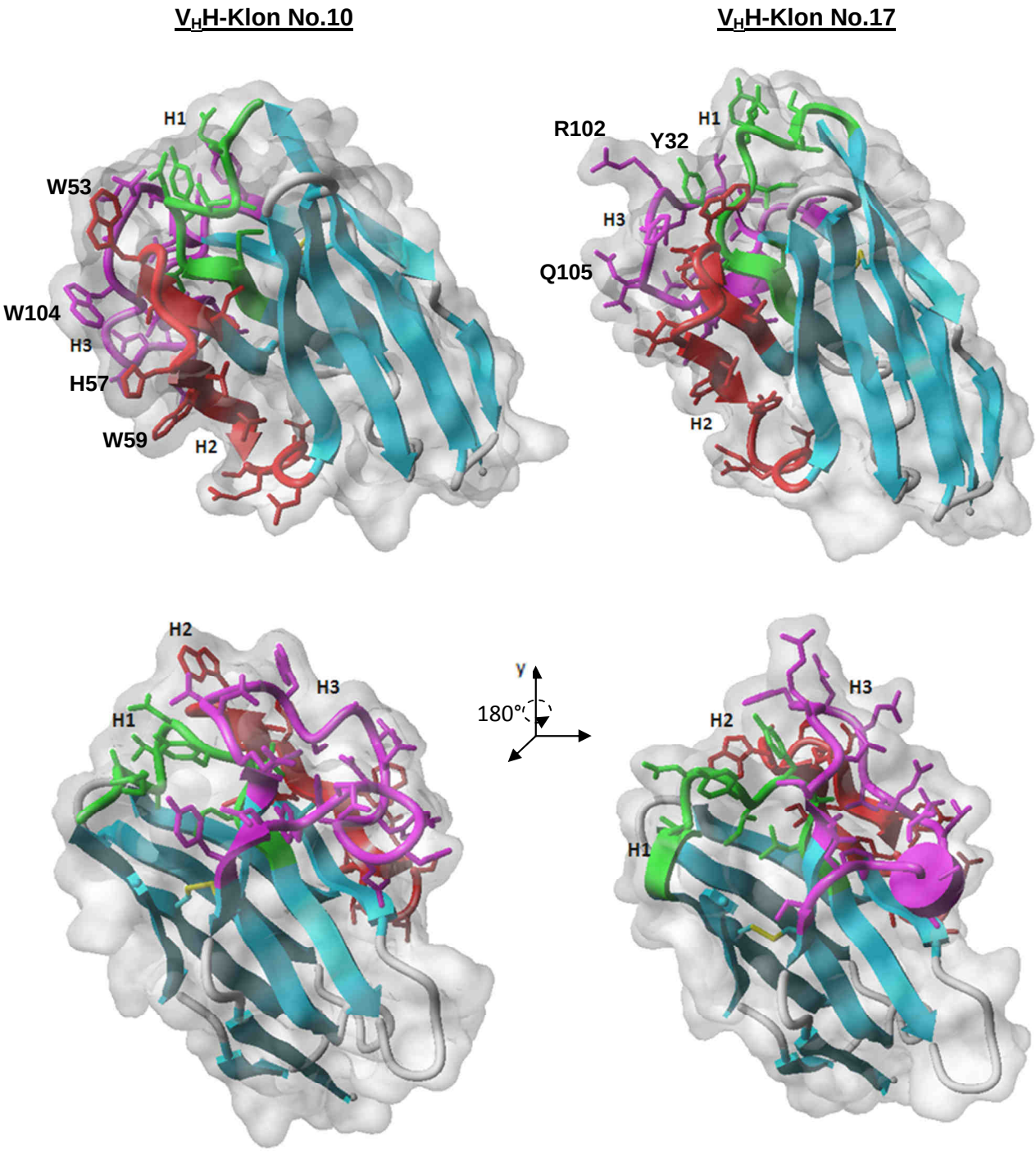


Abb. 4.8:
Vergleichende graphische Darstellung der prädiktiven 3D-Struktur für V_HH-Klon No.10 (links) sowie Klon No.17 (rechts) als ein Stellvertreter der drei hoch homologen V_HH-Spezies (s. Abb. 3.45, Kap. 3.3.3.3). Die Modelle basieren auf Sequenzhomologie zu bekannten Strukturen und wurden über den ModWeb-Server in Einklang mit zulässigen Konformationen für Dieder-Winkel nach Ramachandran-Plot berechnet. Der Peptid-Backbone ist für die jeweilige V_HH-Domäne im Cartoon-Stil als grauer Faden mit den hellblau hervorgehobenen Sekundärstrukturen für antiparallele β-Faltblatt-Motive dargestellt. Farbig markiert sind zudem die Bereiche bzw. AS-Reste der hypervariablen Regionen, die gleichzeitig die drei *complementarity determining regions* oder CDRs ausbilden (grün: H1 = CDR1; rot: H2 = CDR2; magenta: H3 = CDR3). Die Moleküloberfläche auf Basis der Elektronendichte ist als hellgraue, durchsichtige Hülle der 3D-Strukturen angezeigt. Die Disulfidbrücken-bildenden Schwefelatome der Cysteinreste sind gelb markiert. Dargestellt ist die räumliche Struktur beider V_HH-Fragmente als Ansicht des N-terminalen Bereichs mit CDRs bei schräger Aufsicht (oben) bzw. nach 180°-Drehung um die y-Achse (unten).

4.4 Ausblick

Die unterschiedlichen, zum Teil hoch homologen Mitglieder der humanen CEACAM-Familie von Zelladhäsionsmolekülen stehen in Zusammenhang mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, in denen sie u.a. als Tumorantigene oder Pathogenrezeptoren auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gegen unterschiedliche CEACAM-Proteine gerichteten, monoklonalen Antikörper T84.1 und T84.66 im Milligramm-Maßstab generiert und für die Etablierung von Assayplattformen sowie zur Testung von Einsatzmöglichkeiten hinsichtlich diagnostischen Bildgebungsverfahren verwendet. Wie unsere bisher durchgeführten Untersuchungen und die Studien anderer zur Diagnostik und dem therapieunterstützenden Einsatz bei malignen Tumorerkrankungen zeigen, sind die Einsatzmöglichkeiten kompletter monoklonaler Antikörper *in vivo* mitunter limitiert durch u.a. begrenzte Tumorpenetration und die Ausbildung von HAMA/HACA (*human anti mouse/anti chimeric antibodies*) Immunantworten (Wong *et al.*, 2006; Heine *et al.*, 2011).
Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit zusätzlich CEACAM-reaktive Antikörperderivate in Form von scFv- und V_HH-Fragmenten entwickelt, denen insbesondere durch ihre geringe Größe und Immunogenität Vorteile bei entsprechendem *in vivo*-Einsatz zukommen könnten. Die grundsätzliche Eignung der scFv-Fragmente für den vergleichenden Einsatz mit den analogen mAk wurde in dieser Arbeit durch entsprechende Charakterisierung über verschiedene Immunoassays belegt. Röntgenkristallisationsexperimente mit Antikörperfragment/Antigen-Komplexen könnten weiter die der spezifischen Bindung zugrunde liegenden, molekularen Interaktionen und Epitopregionen für die unterschiedlichen Fragmente aufklären sowie die gezielte Mutagenese/Rekombination zum Erhalt von optimierten Antikörperderivaten mit maßgeschneiderter Affinität bzw. Spezifität ermöglichen.

Die Funktionalisierung von Antikörperderivaten ist nicht trivial. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Strategie zur gerichteten enzymatischen Biotinylierung beispielhaft für die generierten scFv-Fragmente etabliert werden, die vielfältige Konjugationen mit Partikeln oder Biomolekülen ermöglicht (Shuvaev *et al.*, 2004). So können diese für weitere Studien schonend mit z.B. Chemotherapeutika, Immunotoxinen, Radionukliden oder anderen Tracern ausgestattet werden. In weiterer Zusammenarbeit mit dem Institut für Physikalische Chemie wurden parallel superparamagnetische Eisenoxid (SPIO) Nanopartikel mit optimierter Relaxivität synthetisiert (Pöselt *et al.*, 2012). Eine Konjugation der organischen Polymerhülle dieser Partikel über funktionelle Gruppen mit z.B. Streptavidin- oder Avidinderivaten würde hier eine konkrete Untersuchung der Einsetzbarkeit der scFv-Fragmente als spezifische Kontrastmittel für CEACAM-positive Tumorzellen in Magnetresonanz-basierter Bildgebung (MRI) erlauben.
Weitere Ansätze zu diagnostisch bzw. therapeutisch ausgerichteten Studien mit Antikörperfragmenten werden zudem durch die in dieser Arbeit nach Immunisierung von *L. glama* selektierten und charakterisierten rekombinanten V_HH-Domänen mit CEACAM1-Reaktivität geboten. Als lösliche Proteine exprimiert könnten diese weiter experimentell für einen möglichen Einsatz zur Hemmung von Tumorzell-Migration (z.B. metastasierendes Melanom) oder Unterdrückung der Blutgefäßneubildung in der Tumor-Neoangiogenese getestet werden (Thies *et al.*, 2002; Ebrahimnejad *et al.*, 2004; Horst und Wagener, 2004; Gerstel *et al.*, 2011).

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung und Charakterisierung von Antikörper-Fragmenten zum Nachweis von Mitgliedern der CEACAM-Familie, die als Zelladhäsionsproteine in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen, u.a. als Pathogenrezeptoren, Mediatoren der Angiogenese sowie als Tumorantigene. In diesem Zusammenhang wurden vor der Generierung von Antikörper-Derivaten die intakten monoklonalen Antikörper T84.1 und T84.66 aus Hybridomkulturen gewonnen und ihr Bindungsverhalten für unterschiedliche CEACAM-Proteine in verschiedenen Assay-Systemen untersucht. Weiter wurde der mAk T84.1 mit CEACAM *pan*-Spezifität in Studien für den Nachweis zellulärer CEACAM-Antigene auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich möglicher molekulardiagnostischer Anwendungen getestet (Heine *et al.*, 2011).

Zudem wurden für die monoklonalen Antikörper T84.1 und T84.66 in dieser Arbeit analoge Einzelkettenfragmente (scFv; *single chain variable fragment*) kloniert und exprimiert, die sich aus den Antigen-bindenden Domänen der mAk zusammensetzen. Für mAk T84.1 wurde ein entsprechendes Gen-Segment durch rekombinante PCR- und Klonierungstechniken auf Basis von RNA aus Zellen der T84.1 Hybridomzelllinie neu generiert. Dabei konnte auch die bisher unbekannte Nukleotid-Sequenz für die Antigen-bindenden Bereiche des korrespondierenden T84.1 mAk ermittelt werden. Für beide scFv-Fragmente konnte darüber hinaus eine Strategie zur effizienten Modifikation durch enzymatische Biotinylierung im Rahmen der eukaryotischen Expression umgesetzt werden, welche die Grundlage für den Nachweis, die Aufreinigung sowie ein breites Spektrum an Funktionalisierungen in Hinblick auf verschiedene Einsatzmöglichkeiten schuf. Die gemeinsame Charakterisierung mit den analogen mAk in verschiedenen Immunosassays zeigte für die scFv-Fragmente ein vergleichbares Maß an Bindungsstärke und Spezifität für rekombinante und zelluläre CEACAM-Antigene, was ihre potentielle Einsetzbarkeit unter Erhalt der Spezifität und Funktionalität für molekulardiagnostische Zwecke bestätigte.

Als weiterer wesentlicher Aspekt dieser Arbeit wurde versucht, gegen CEACAM gerichtete Einzeldomänenantikörper bzw. V_HH-Fragmente (*variable domain of heavy-chains of heavy-chain-only antibodies*) zu erzeugen, die sich von speziellen Schwerkettenantikörpern der Cameliden ableiten und die kleinsten bekannten Antikörperderivate darstellen. Für den Erhalt von CEACAM-reaktiven V_HH-Fragmenten wurden eine Immunisierung von *L. glama* mit rekombinantem CEACAM1 und CEACAM5 vorgenommen. Nach Feststellung einer spezifischen Immunantwort sowie Charakterisierung der Lamaseren und enthaltenen cIgG-Fraktionen hinsichtlich der differenziellen CEACAM-Spezifität wurde aus Immunbibliotheken die Selektion spezifischer Fragmente durch *phage display* vorgenommen. Dabei konnten vier verschiedene Klone aus insgesamt zwei Gruppen von unterschiedlichen Sequenzmotiven identifiziert werden, deren V_HH-Fusionsproteine spezifische Bindungsaktivität für CEACAM1 zeigten. Diese stellen den Ausgangspunkt für die mögliche weitere Generierung und den experimentellen Einsatz einer neuen Spezies von potentiell diagnostisch bzw. therapeutisch nutzbaren Antikörper-Fragmenten dar.

5.1 Abstract

The aim of the present work was to generate and characterize antibody fragments for the specific detection of members of the CEACAM cell adhesion molecule family, which play an important role in several physiological and pathological processes, e.g. as pathogen receptors, mediators of angiogenesis or as tumor antigens. In this context, the full-length monoclonal antibodies T84.1 and T84.66 were initially expressed from cultures of hybridoma cells and tested with regard to their binding properties for CEACAM proteins by different assay systems. The CEACAM *pan*-specific mAb T84.1 has been further applied in cooperative studies to detect cellular CEACAM antigens on tumor cells *in vitro* and *in vivo* in respect of possible usage for molecular diagnostic purposes (Heine *et al.*, 2011).

Furthermore, single-chain fragments (scFv) for T84.1 and T84.66 mAb were cloned and expressed, consisting of the antigen-binding domains from corresponding mAbs. Following the general structural attributes of given scFv T84.66, a single-chain fragment for T84.1 mAb was newly generated by recombinant cloning and PCR methods. This approach also led to the revelation of the nucleotide sequence coding the antigen-binding variable domains of T84.1 mAb, which has not been described so far. For both of the scFv fragments, a strategy for efficient modification via enzymatic attachment of biotin within eukaryotic expression was successfully established, which enabled sensitive detection and purification, offering a broad range of feasible functionalization possibilities for future applications as well. Characterization of scFv's in parallel to mAbs by different immunoassays demonstrated comparable properties for the single-chain fragments regarding their binding specificities and verified their potential applicability for molecular diagnostic purposes.

As an additional main part of this work, an attempt was waged to generate CEACAM-specific single-domain antibodies (sdAb) or V_HH fragments derived from heavy-chain-only antibodies of camelid origin. For this aim, llamas were immunized with recombinant CEACAM1 and CEACAM5. After confirmation of an appropriate immune response, llama whole sera as well as the different cIgG antibody subclass fractions were characterized for CEACAM specificity and accordingly constructed immuno-libraries were selected via phage display techniques in order to yield recombinant CEACAM-reactive V_HH fragments. This led to the identification of a total number of four unique clones forming two different sequence homology groups, whose V_HH fusion proteins exhibited specific binding to CEACAM1, thus providing a starting point for the generation and experimental testing of novel, potential diagnostic and therapeutic antibody fragment species directed against CEACAM1.

6 Literaturverzeichnis

Abou-Rjaily, George A, Sang Jun Lee, Denisa May, Qusai Y Al-Share, Anthony M Deangelis, Randall J Ruch, Michael Neumaier, Holger Kalthoff, Sue-Hwa Lin, and Sonia M Najjar. “CEACAM1 Modulates Epidermal Growth Factor Receptor--mediated Cell Proliferation.” *The Journal of Clinical Investigation* 114, no. 7 (2004): 944–952.

Ahmad, Zuhaida Asra, Swee Keong Yeap, Abdul Manaf Ali, Wan Yong Ho, Noorjahan Banu Mohamed Alitheen, and Muhajir Hamid. “scFv Antibody: Principles and Clinical Application.” *Clinical and Developmental Immunology* 2012 (2012): 1–15.

Alberts, Bruce*. Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

Albrecht, Huguette, and Sally J DeNardo. “Recombinant Antibodies: From the Laboratory to the Clinic.” *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 21, no. 4 (2006): 285–304.

Aplin, A E, A Howe, S K Alahari, and R L Juliano. “Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-cell Adhesion Molecules, and Selectins.” *Pharmacological Reviews* 50, no. 2 (1998): 197–263.

Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. “The SWISS-MODEL Workspace: a Web-based Environment for Protein Structure Homology Modelling.” *Bioinformatics* 22, no. 2 (2005): 195–201.

Athappilly, F K, and W A Hendrickson. “Structure of the biotinyl domain of acetyl-coenzyme A carboxylase determined by MAD phasing.” *Structure* 3, no. 12 (1995): 1407-1419.

Bamberger, A M, S Sudahl, T Löning, C Wagener, C M Bamberger, P Drakakis, C Coutifaris, and A Makrigiannakis. “The Adhesion Molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) Is Specifically Expressed by the Extravillous Intermediate Trophoblast.” *The American Journal of Pathology* 156, no. 4 (2000): 1165–1170.

Barclay, A.Neil. “Membrane Proteins with Immunoglobulin-like Domains—a Master Superfamily of Interaction Molecules.” *Seminars in Immunology* 15, no. 4 (2003): 215–223.

Bauer, Larry A. *Applied Clinical Pharmacokinetics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2008.

Beauchemin, N, P Draber, G Dveksler, P Gold, S Gray-Owen, F Grunert, S Hammarström, et al. “Redefined Nomenclature for Members of the Carcinoembryonic Antigen Family.” *Experimental Cell Research* 252, no. 2 (1999): 243–249.

Beckett, D., E. Kovaleva, and P. J. Schatz. “A Minimal Peptide Substrate in Biotin Holoenzyme Synthetase-catalyzed Biotinylation.” *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 8, no. 4 (1999): 921–929.

Benkert, Pascal, Marco Biasini, and Torsten Schwede. “Toward the Estimation of the Absolute Quality of Individual Protein Structure Models.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 27, no. 3 (2011): 343–350.

Berg, Jeremy M, Tymoczko, John L, Stryer, Lubert. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2002.

Berger, Cedric N., Oliver Billker, Thomas F. Meyer, Alain L. Servin, and Imad Kansau. “Differential Recognition of Members of the Carcinoembryonic Antigen Family by Afa/Dr Adhesins of Diffusely Adhering Escherichia Coli (Afa/Dr DAEC).” *Molecular Microbiology* 52, no. 4 (2004): 963–983.

Billker, Oliver, Andreas Popp, Volker Brinkmann, Gerald Wenig, Jutta Schneider, Emmanuelle Caron, and Thomas F Meyer. “Distinct Mechanisms of Internalization of Neisseria Gonorrhoeae by Members of the CEACAM Receptor Family Involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent Pathways.” *The EMBO Journal* 21, no. 4 (2002): 560–571.

Blumenthal, Rosalyn D, Evelyn Leon, Hans J Hansen, and David M Goldenberg. “Expression Patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in Primary and Metastatic Cancers.” *BMC Cancer* 7 (2007): 2.

Bogoevska, V. “CEACAM1, an Adhesion Molecule of Human Granulocytes, Is Fucosylated by Fucosyltransferase IX and Interacts with DC-SIGN of Dendritic Cells via Lewis x Residues.” *Glycobiology* 16, no. 3 (2005): 197–209.

Bos, M P, F Grunert, and R J Belland. “Differential Recognition of Members of the Carcinoembryonic Antigen Family by Opa Variants of Neisseria Gonorrhoeae.” *Infection and Immunity* 65, no. 6 (1997): 2353–2361.

Brooks, P C, R A Clark, and D A Cheresh. “Requirement of Vascular Integrin Alpha v Beta 3 for Angiogenesis.” *Science (New York, N.Y.)* 264, no. 5158 (1994): 569–571.

Brümmer, J, M Neumaier, C Göpfert, and C Wagener. “Association of Pp60c-src with Biliary Glycoprotein (CD66a), an Adhesion Molecule of the Carcinoembryonic Antigen Family Downregulated in Colorectal Carcinomas.” *Oncogene* 11, no. 8 (1995): 1649–1655.

Brümmer, J, A Ebrahimnejad, R Flayeh, U Schumacher, T Löning, A M Bamberger, and C Wagener. “Cis Interaction of the Cell Adhesion Molecule CEACAM1 with Integrin Beta(3).” *The American Journal of Pathology* 159, no. 2 (2001): 537–546.

Bühler, Patrick, David Wetterauer, Dorothee Gierschner, Ulrich Wetterauer, Ursula Elsässer Beile, and Philipp Wolf. “Influence of Structural Variations on Biological Activity of anti-PSMA scFv and Immunotoxins Targeting Prostate Cancer.” *Anticancer Research* 30, no. 9 (2010): 3373–3379.

Bütikofer, P, T Malherbe, M Boschung, and I Roditi. “GPI-anchored Proteins: Now You See ‘Em, Now You Don’t.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, no. 2 (2001): 545–548.

Busch, Walter. *Tiergesundheits- und Tierkrankheitslehre: 163 Tabellen*. Stuttgart: Parey, 2004.

Cameron, Sarina, Lilia Merida de Long, Mehlika Hazar-Rethinam, Eleni Topkas, Liliana Endo-Munoz, Andrew Cumming, Orla Gannon, Alexander Guminski, and Nicholas Saunders. “Focal Overexpression of CEACAM6 Contributes to Enhanced Tumourigenesis in Head and Neck Cancer via Suppression of Apoptosis.” *Molecular Cancer* 11 (2012): 74.

Carmichael, Jennifer A, Barbara E Power, Thomas P.J Garrett, Paul J Yazaki, John E Shively, Andrew A Raubischek, Anna M Wu, and Peter J Hudson. “The Crystal Structure of an Anti-CEA scFv Diabody Assembled from T84.66 scFvs in VL-to-VH Orientation: Implications for Diabody Flexibility.” *Journal of Molecular Biology* 326, no. 2 (2003): 341–351.

Casadevall, Arturo, Ekaterina Dadachova, and Liise-anne Pirofski. “Passive Antibody Therapy for Infectious Diseases.” *Nature Reviews. Microbiology* 2, no. 9 (2004): 695–703.

Chan, Carlos H F, Pilar Camacho-Leal, and Clifford P Stanners. “Colorectal Hyperplasia and Dysplasia Due to Human Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family Member Expression in Transgenic Mice.” *PloS One* 2, no. 12 (2007): e1353.

Chapman, Andrew P. “PEGylated Antibodies and Antibody Fragments for Improved Therapy: a Review.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, no. 4 (2002): 531–545.

Chapman-Smith, A, and J E Cronan Jr. “In Vivo Enzymatic Protein Biotinylation.” *Biomolecular Engineering* 16, no. 1–4 (1999[a]): 119–125.

Chapman-Smith, A, and J E Cronan Jr. “Molecular Biology of Biotin Attachment to Proteins.” *The Journal of Nutrition* 129, no. 2S Suppl (1999[b]): 477S–484S.

Chen, Charng-Jui, and John E Shively. “The Cell-cell Adhesion Molecule Carcinoembryonic Antigen-related Cellular Adhesion Molecule 1 Inhibits IL-2 Production and Proliferation in Human T Cells by Association with Src Homology Protein-1 and Down-regulates IL-2 Receptor.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172, no. 6 (2004): 3544–3552.

Chen, T, W Zimmermann, J Parker, I Chen, A Maeda, and S Bolland. “Biliary Glycoprotein (BGPa, CD66a, CEACAM1) Mediates Inhibitory Signals.” *Journal of Leukocyte Biology* 70, no. 2 (2001): 335–340.

Chen, Z., L. Chen, K. Baker, T. Olszak, S. Zeissig, Y.-H. Huang, T. T. Kuo, et al. “CEACAM1 Dampens Antitumor Immunity by Down-regulating NKG2D Ligand Expression on Tumor Cells.” *Journal of Experimental Medicine* 208, no. 13 (2011): 2633–2640.

Chothia, C, and A M Lesk. “Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins.” *Journal of Molecular Biology* 196, no. 4 (1987): 901–917.

Cianfriglia, Maurizio. “CEACAM1 Is a Privileged Cell Surface Antigen to Design Novel ScFv Mediated-Immunotherapies of Melanoma, Lung Cancer and Other Types of Tumors.” *The Open Pharmacology Journal* 6, no. 1 (2012): 1–11.

Clackson, Tim, Hennie R. Hoogenboom, Andrew D. Griffiths, and Greg Winter. “Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries.” *Nature* 352, no. 6336 (1991): 624–628.

Clark, K Reed, and Scott T R Walsh. “Crystal Structure of a 3B3 Variant--a Broadly Neutralizing HIV-1 scFv Antibody.” *Protein Science: a Publication of the Protein Society* 18, no. 12 (2009): 2429–2441.

Cotran, Ramzi S. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999.

Cronan, J. E. “The Biotinyl Domain of Escherichia Coli Acetyl-CoA Carboxylase. Evidence that the ‘Thumb’ Structure is essential and that the Domain functions as a Dimer.” *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 40 (2001): 37355–37364.

Depetris, R. S., J.-P. Julien, R. Khayat, J. H. Lee, R. Pejchal, U. Katpally, N. Cocco, et al. “Partial Enzymatic Deglycosylation Preserves the Structure of Cleaved Recombinant HIV-1 Envelope Glycoprotein Trimers.” *Journal of Biological Chemistry* 287, no. 29 (2012): 24239–24254.

Eades-Perner, A M, H van der Putten, A Hirth, J Thompson, M Neumaier, S von Kleist, and W Zimmermann. “Mice Transgenic for the Human Carcinoembryonic Antigen Gene Maintain Its Spatiotemporal Expression Pattern.” *Cancer Research* 54, no. 15 (1994): 4169–4176.

Ebrahimnejad, A, R Flayeh, G Unteregger, C Wagener, and J Brümmer. “Cell Adhesion Molecule CEACAM1 Associates with Paxillin in Granulocytes and Epithelial and Endothelial Cells.” *Experimental Cell Research* 260, no. 2 (2000): 365–373.

Ebrahimnejad, Alireza, Thomas Streichert, Peter Nollau, Andrea K Horst, Christoph Wagener, Ana-Maria Bamberger, and Jens Brümmer. “CEACAM1 Enhances Invasion and Migration of Melanocytic and Melanoma Cells.” *The American Journal of Pathology* 165, no. 5 (2004): 1781–1787.

Edlund, M, I Blikstad, and B Obrink. “Calmodulin Binds to Specific Sequences in the Cytoplasmic Domain of C-CAM and Down-regulates C-CAM Self-association.” *The Journal of Biological Chemistry* 271, no. 3 (1996): 1393–1399.

Fan, G. “N-Linked Glycosylation of the Human Ca2+ Receptor Is Essential for Its Expression at the Cell Surface.” *Endocrinology* 138, no. 5 (1997): 1916–1922.

Fiori, Valentina, Mauro Magnani, and Maurizio Cianfriglia. “The Expression and Modulation of CEACAM1 and Tumor Cell Transformation.” *Annali dell’Istituto Superiore Di Sanità* 48, no. 2 (2012): 161–171.

Fogh, J, J M Fogh, and T Orfeo. “One Hundred and Twenty-seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice.” *Journal of the National Cancer Institute* 59, no. 1 (1977): 221–226.

Fröde, David. “Rekombinante Antikörper Für Die Point-of-care-Diagnostik von CRP.” TU Braunschweig, 2012

Gemei, Marica, Peppino Mirabelli, Rosa Di Noto, Claudia Corbo, Antonino Iaccarino, Anna Zamboli, Giancarlo Troncone, et al. “CD66c Is a Novel Marker for Colorectal Cancer Stem Cell Isolation, and Its Silencing Halts Tumor Growth in Vivo.” *Cancer* 119, no. 4 (2013): 729–738.

Gerstel, D, F Wegwitz, K Jannasch, P Ludewig, K Scheike, F Alves, N Beauchemin, W Deppert, C Wagener, and A K Horst. “CEACAM1 Creates a Pro-angiogenic Tumor Microenvironment That Supports Tumor Vessel Maturation.” *Oncogene* 30, no. 41 (2011): 4275–4288.

Glas, Jürgen, Julia Seiderer, Christoph Fries, Cornelia Tillack, Simone Pfennig, Maria Weidinger, Florian Beigel, et al. “CEACAM6 Gene Variants in Inflammatory Bowel Disease.” *PloS One* 6, no. 4 (2011): e19319.

Gold, P, and S O Freedman. “Specific Carcinoembryonic Antigens of the Human Digestive System.” *The Journal of Experimental Medicine* 122, no. 3 (1965[a]): 467–481.

Gold, P, and S O Freedman. “Demonstration of tumor-specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance an Absorption Techniques.” *Journal of Experimental Medicine* no. 121 (1965[b]): 439–62.

Graham, F L, J Smiley, W C Russell, and R Nairn. “Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5.” *The Journal of General Virology* 36, no. 1 (1977): 59–74.

Gray-Owen, Scott D, and Richard S Blumberg. “CEACAM1: Contact-dependent Control of Immunity.” *Nature Reviews. Immunology* 6, no. 6 (2006): 433–446.

Green, N M. “Avidin.” *Advances in Protein Chemistry* 29 (1975): 85–133.

Greicius, Gediminas, Eva Severinson, Nicole Beauchemin, Björn Obrink, and Bernhard B Singer. “CEACAM1 Is a Potent Regulator of B Cell Receptor Complex-induced Activation.” *Journal of Leukocyte Biology* 74, no. 1 (2003): 126–134.

Guex, N, and M C Peitsch. “SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling.” *Electrophoresis* 18, no. 15 (1997): 2714–2723.

Gumbiner, Barry M. “Regulation of Cadherin-mediated Adhesion in Morphogenesis.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6, no. 8 (2005): 622–634.

Gupta, Vibha, Rakesh K Gupta, Garima Khare, Dinakar M Salunke, Avadhesha Surolia, and Anil K Tyagi. “Structural Ordering of Disordered Ligand-binding Loops of Biotin Protein Ligase into Active Conformations as a Consequence of Dehydration.” *PloS One* 5, no. 2 (2010): e9222.

Haas, Michael, Volker Heinemann, Frank Kullmann, Rüdiger P Laubender, Christina Klose, Christiane J Bruns, Stefan Holdenrieder, Dominik P Modest, Christoph Schulz, and Stefan Boeck. “Prognostic Value of CA 19-9, CEA, CRP, LDH and Bilirubin Levels in Locally Advanced and Metastatic Pancreatic Cancer: Results from a Multicenter, Pooled Analysis of Patients Receiving Palliative Chemotherapy.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139, no. 4 (2013): 681–689.

Hamers-Casterman, C, T Atarhouch, S Muyldermans, G Robinson, C Hamers, E B Songa, N Bendahman, and R Hamers. “Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains.” *Nature* 363, no. 6428 (1993): 446–448.

Hammarström, S. “The Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family: Structures, Suggested Functions and Expression in Normal and Malignant Tissues.” *Seminars in Cancer Biology* 9, no. 2 (1999): 67–81.

Hammarström, S, and V Baranov. “Is There a Role for CEA in Innate Immunity in the Colon?” *Trends in Microbiology* 9, no. 3 (2001): 119–125.

Harpaz, Y, and C Chothia. “Many of the Immunoglobulin Superfamily Domains in Cell Adhesion Molecules and Surface Receptors Belong to a New Structural Set Which Is Close to That Containing Variable Domains.” *Journal of Molecular Biology* 238, no. 4 (1994): 528–539.

Hauck, C R, E Gulbins, F Lang, and T F Meyer. “Tyrosine Phosphatase SHP-1 Is Involved in CD66-mediated Phagocytosis of Opa52-expressing Neisseria Gonorrhoeae.” *Infection and Immunity* 67, no. 10 (1999): 5490–5494.

Heine, Markus, Peter Nollau, Christoph Masslo, Peter Nielsen, Barbara Freund, Oliver T Bruns, Rudolph Reimer, et al. “Investigations on the Usefulness of CEACAMs as Potential Imaging Targets for Molecular Imaging Purposes.” *PloS One* 6, no. 12 (2011): e28030.

Hermunen, Kethe, Caj Haglund, and Pia Osterlund. “CEA Fluctuation During a Single Fluorouracil-based Chemotherapy Cycle for Metastatic Colorectal Cancer.” *Anticancer Research* 33, no. 1 (2013): 253–260.

Hilpert, K, G Hansen, H Wessner, G Küttner, K Welfle, M Seifert, and W Höhne. “Anti-c-myc Antibody 9E10: Epitope Key Positions and Variability Characterized Using Peptide Spot Synthesis on Cellulose.” *Protein Engineering* 14, no. 10 (2001): 803–806.

Holliger, Philipp, and Peter J Hudson. “Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains.” *Nature Biotechnology* 23, no. 9 (2005): 1126–1136.

Horst, A K, and C Wagener. “CEA-Related CAMs.” *Handbook of Experimental Pharmacology* no. 165 (2004): 283–341.

Horst, A. K. “Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 Modulates Vascular Remodeling in Vitro and in Vivo.” *Journal of Clinical Investigation* 116, no. 6 (2006): 1596–1605.

Horton, R M, H D Hunt, S N Ho, J K Pullen, and L R Pease. “Engineering Hybrid Genes Without the Use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension.” *Gene* 77, no. 1 (1989): 61–68.

Huh, Jung Wook, Chang Hyun Kim, Sang Woo Lim, Hyeong Rok Kim, and Young Jin Kim. “Factors Predicting Long-term Survival in Colorectal Cancer Patients with a Normal Preoperative Serum Level of Carcinoembryonic Antigen.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (2013).

Humphries, M J. “Integrin Structure.” *Biochemical Society Transactions* 28, no. 4 (2000): 311–339.

Hunter, I, H Sawa, M Edlund, and B Obrink. “Evidence for Regulated Dimerization of Cell-cell Adhesion Molecule (C-CAM) in Epithelial Cells.” *The Biochemical Journal* 320 (Pt 3) (1996): 847–853.

Hussack, Greg. “Single-domain Antibody Inhibitors of Clostridium Difficile Toxins.” Dissertation, University of Ottawa, 2011.

Hynes, Richard O. “Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines.” *Cell* 110, no. 6 (2002): 673–687.

Izzi, L, C Turbide, C Houde, T Kunath, and N Beauchemin. “cis-Determinants in the Cytoplasmic Domain of CEACAM1 Responsible for Its Tumor Inhibitory Function.” *Oncogene* 18, no. 40 (1999): 5563–5572.

Janeway, Charles A. *Immunologie*. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl., 2002.

Janeway, Charles A, Jr, and Ruslan Medzhitov. “Innate Immune Recognition.” *Annual Review of Immunology* 20 (2002): 197–216.

Jank, M M, S Bokorny, K Röhm, and S Berger. “Expression and Biotinylation of a Mutant of the Transcarboxylase Carrier Protein from Propioni Shermanii.” *Protein Expression and Purification* 17, no. 1 (1999): 123–127.

Jessup, J M, J C Kim, P Thomas, S Ishii, R Ford, J E Shively, H Durbin, C P Stanners, A Fuks, and H Zhou. “Adhesion to Carcinoembryonic Antigen by Human Colorectal Carcinoma Cells Involves at Least Two Epitopes.” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 55, no. 2 (1993): 262–268.

Johnson, George, and Tai Te Wu. “The Kabat Database and a Bioinformatics Example.” In *Antibody Engineering*, by Benny K. C. Lo, 11–26. New Jersey: Humana Press. Accessed July 4, 2013.

Kabat E A, T T Wu, H M Perry, K S Gottesmann, and C Foeller. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Bethesda, MD: NIH Publication No. 91-3242, 1991.

Kabat, E A, and T T Wu. “Identical V Region Amino Acid Sequences and Segments of Sequences in Antibodies of Different Specificities. Relative Contributions of VH and VL Genes, Minigenes, and Complementarity-determining Regions to Binding of Antibody-combining Sites.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 147, no. 5 (1991): 1709–1719.

Kammerer, R, S Hahn, B B Singer, J S Luo, and S von Kleist. “Biliary Glycoprotein (CD66a), a Cell Adhesion Molecule of the Immunoglobulin Superfamily, on Human Lymphocytes: Structure, Expression and Involvement in T Cell Activation.” *European Journal of Immunology* 28, no. 11 (1998): 3664–3674.

Kammerer, R, D Stober, B B Singer, B Obrink, and J Reimann. “Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 on Murine Dendritic Cells Is a Potent Regulator of T Cell Stimulation.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166, no. 11 (2001): 6537–6544.

Kammerer, Robert, Tanja Popp, Bernhard B Singer, Jörg Schlender, and Wolfgang Zimmermann. “Identification of Allelic Variants of the Bovine Immune Regulatory Molecule CEACAM1 Implies a Pathogen-driven Evolution.” *Gene* 339 (2004): 99–109.

Kannicht, C, L Lucka, R Nuck, W Reutter, and M Gohlke. “N-glycosylation of the Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule, C-CAM, from Rat Liver: Detection of Oversialylated Bi- and Triantennary Structures.” *Glycobiology* 9, no. 9 (1999): 897–906.

Kilic, Nerbil, Leticia Oliveira-Ferrer, Jan-Henner Wurmbach, Sonja Loges, Fariba Chalajour, Samira Neshat-Vahid, Samira Neshat Vahid, Joachim Weil, Malkanthi Fernando, and Suleyman Ergun. “Pro-angiogenic Signaling by the Endothelial Presence of CEACAM1.” *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 3 (2005): 2361–2369.

Kim, Kwang Soo, Jong-Tae Kim, Seon-Jin Lee, Min Ah Kang, In Seong Choe, Yun Hee Kang, Seon-Young Kim, et al. “Overexpression and Clinical Significance of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 in Colorectal Cancer.” *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 415 (2013): 12–19.

Kirshner, Julia, Charng-Jui Chen, Pingfang Liu, Jie Huang, and John E Shively. “CEACAM1-4S, a Cell-cell Adhesion Molecule, Mediates Apoptosis and Reverts Mammary Carcinoma Cells to a Normal Morphogenic Phenotype in a 3D Culture.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 2 (2003): 521–526.

Koch-Nolte, Friedrich, Jan Reyelt, Britta Schössow, Nicole Schwarz, Felix Scheuplein, Stefan Rothenburg, Friedrich Haag, Vanina Alzogaray, Ana Cauerhff, and Fernando A Goldbaum. “Single Domain Antibodies from Llama Effectively and Specifically Block T Cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in Vivo.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, no. 13 (2007): 3490–3498.

Köhler, G, and C Milstein. “Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity.” *Nature* 256, no. 5517 (1975): 495–497.

Koide, N, and T Muramatsu. “Endo-beta-N-acetylglucosaminidase Acting on Carbohydrate Moieties of Glycoproteins. Purification and Properties of the Enzyme from Diplococcus Pneumoniae.” *The Journal of Biological Chemistry* 249, no. 15 (1974): 4897–4904.

Kolla, Venkatadri, Linda W Gonzales, Nicole A Bailey, Ping Wang, Sreedevi Angampalli, Marye H Godinez, Muniswamy Madesh, and Philip L Ballard. “Carcinoembryonic Cell Adhesion Molecule 6 in Human Lung: Regulated Expression of a Multifunctional Type II Cell Protein.” *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 296, no. 6 (2009): L1019–1030.

Kontermann, Roland, Dübel, Stefan*. Antibody Engineering*. 2nd ed. Springer Protocols. Heidelburg: Springer, 2010.

Kowalski, Mark, Jacinthe Guindon, Louise Brazas, Celine Moore, Joycelyn Entwistle, Jeannick Cizeau, Michael A S Jewett, and Glen C MacDonald. “A Phase II Study of Oportuzumab Monatox: An Immunotoxin Therapy for Patients with Noninvasive Urothelial Carcinoma in Situ Previously Treated with Bacillus Calmette-Guérin.” *The Journal of Urology* 188, no. 5 (2012): 1712–1718.

Kunath, T, C Ordoñez-Garcia, C Turbide, and N Beauchemin. “Inhibition of Colonic Tumor Cell Growth by Biliary Glycoprotein.” *Oncogene* 11, no. 11 (1995): 2375–2382.

Kurio, Hitoshi, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, and Hiroshi Iida. “Testis-specific Cell Adhesion Molecule, CEACAM6-L, Forms Homophilic Interaction at the Cell Adhesion Site in Vitro.” *Zoological Science* 29, no. 11 (2012): 786–793.

Laack, E. “Expression of CEACAM1 in Adenocarcinoma of the Lung: A Factor of Independent Prognostic Significance.” *Journal of Clinical Oncology* 20, no. 21 (2002): 4279–4284.

Lasa, Adriana, Elena Serrano, Maite Carricondo, Maria J Carnicer, Salut Brunet, Isabel Badell, Jorge Sierra, Anna Aventín, and Josep F Nomdedéu. “High Expression of CEACAM6 and CEACAM8 mRNA in Acute Lymphoblastic Leukemias.” *Annals of Hematology* 87, no. 3 (2008): 205–211.

LeBoeuf, R D, F S Galin, S K Hollinger, S C Peiper, and J E Blalock. “Cloning and Sequencing of Immunoglobulin Variable-region Genes Using Degenerate Oligodeoxyribonucleotides and Polymerase Chain Reaction.” *Gene* 82, no. 2 (1989): 371–377.

Lee, Choogon, Jean-Pierre Etchegaray, Felino R.A. Cagampang, Andrew S.I. Loudon, and Steven M. Reppert. “Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock.” *Cell* 107, no. 7 (2001): 855–867.

Lee, Jeffrey E, Marnie L Fusco, and Erica Ollmann Saphire. “An Efficient Platform for Screening Expression and Crystallization of Glycoproteins Produced in Human Cells.” *Nature Protocols* 4, no. 4 (2009): 592–604.

Lehmann, Andrea, Katharina Janek, Beate Braun, Peter-Michael Kloetzel, and Cordula Enenkel. “20 S Proteasomes Are Imported as Precursor Complexes into the Nucleus of Yeast.” *Journal of Molecular Biology* 317, no. 3 (2002): 401–413.

Leung, N, C Turbide, M Olson, V Marcus, S Jothy, and N Beauchemin. “Deletion of the Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 (Ceacam1) Gene Contributes to Colon Tumor Progression in a Murine Model of Carcinogenesis.” *Oncogene* 25, no. 40 (2006): 5527–5536.

Leusch, H G, Z Drzeniek, Z Markos-Pusztai, and C Wagener. “Binding of Escherichia Coli and Salmonella Strains to Members of the Carcinoembryonic Antigen Family: Differential Binding Inhibition by Aromatic Alpha-glycosides of Mannose.” *Infection and Immunity* 59, no. 6 (1991): 2051–2057.

Ley, Klaus. “The Role of Selectins in Inflammation and Disease.” *Trends in Molecular Medicine* 9, no. 6 (2003): 263–268.

Liu, W, W Wei, D Winer, A-M Bamberger, C Bamberger, C Wagener, S Ezzat, and S L Asa. “CEACAM1 Impedes Thyroid Cancer Growth but Promotes Invasiveness: a Putative Mechanism for Early Metastases.” *Oncogene* 26, no. 19 (2007): 2747–2758.

Lizak, Christian, Yao-Yun Fan, Thomas Christian Weber, and Markus Aebi. “N-Linked Glycosylation of Antibody Fragments in Escherichia Coli.” *Bioconjugate Chemistry* 22, no. 3 (2011): 488–496.

Lodish, Harvey F. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2000.

Löffler, Georg. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer, 2007.

Lucka, L. “Identification of Lewis x Structures of the Cell Adhesion Molecule CEACAM1 from Human Granulocytes.” *Glycobiology* 15, no. 1 (2004): 87–100.

Majidi, Jafar, Jaleh Barar, Behzad Baradaran, Jalal Abdolalizadeh, and Yadollah Omidi. “Target Therapy of Cancer: Implementation of Monoclonal Antibodies and Nanobodies.” *Human Antibodies* 18, no. 3 (2009): 81–100.

Malhotra, Shikha, Susan Kovats, Weiguo Zhang, and K Mark Coggeshall. “B Cell Antigen Receptor Endocytosis and Antigen Presentation to T Cells Require Vav and Dynamin.” *The Journal of Biological Chemistry* 284, no. 36 (2009): 24088–24097.

Marks, J D, H R Hoogenboom, T P Bonnert, J McCafferty, A D Griffiths, and G Winter. “By-passing Immunization. Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage.” *Journal of Molecular Biology* 222, no. 3 (1991): 581–597.

Maxwell, P. “Carcinoembryonic Antigen: Cell Adhesion Molecule and Useful Diagnostic Marker.” *British Journal of Biomedical Science* 56, no. 3 (1999): 209–214.

Moffat, F L, Jr, C M Pinsky, L Hammershaimb, N J Petrelli, Y Z Patt, F S Whaley, and D M Goldenberg. “Clinical Utility of External Immunoscintigraphy with the IMMU-4 Technetium-99m Fab’ Antibody Fragment in Patients Undergoing Surgery for Carcinoma of the Colon and Rectum: Results of a Pivotal, Phase III Trial. The Immunomedics Study Group.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 14, no. 8 (1996): 2295–2305.

Mortezai, Naghmeh Seyed. “Identifizierung gering konzentrierter diagnostischer Glykoproteine in humanem Plasma mittels Affinitäts- Chromatographie und Massenspektrometrie.” Dissertation, Universität Hamburg, 2010.

Muyldermans, S, T Atarhouch, J Saldanha, J A Barbosa, and R Hamers. “Sequence and Structure of VH Domain from Naturally Occurring Camel Heavy Chain Immunoglobulins Lacking Light Chains.” *Protein Engineering* 7, no. 9 (1994): 1129–1135.

Muyldermans, S, T N Baral, V Cortez Retamozzo, P De Baetselier, E De Genst, J Kinne, H Leonhardt, et al. “Camelid Immunoglobulins and Nanobody Technology.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, no. 1–3 (2009): 178–183.

Nakajima, Atsushi, Hideki Iijima, Markus F Neurath, Takashi Nagaishi, Edward E S Nieuwenhuis, Raktima Raychowdhury, Jonathan Glickman, et al. “Activation-induced Expression of Carcinoembryonic Antigen-cell Adhesion Molecule 1 Regulates Mouse T Lymphocyte Function.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, no. 3 (2002): 1028–1035.

Neumaier, M, S Paululat, A Chan, P Matthaes, and C Wagener. “Biliary Glycoprotein, a Potential Human Cell Adhesion Molecule, Is Down-regulated in Colorectal Carcinomas.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 22 (1993): 10744–10748.

Nguyen, V K, R Hamers, L Wyns, and S Muyldermans. “Loss of Splice Consensus Signal Is Responsible for the Removal of the Entire C(H)1 Domain of the Functional Camel IGG2A Heavy-chain Antibodies.” *Molecular Immunology* 36, no. 8 (1999): 515–524.

Niers, Johanna M., John W Chen, Ralph Weissleder, and Bakhos A. Tannous. “Enhanced in Vivo Imaging of Metabolically Biotinylated Cell Surface Reporters.” *Analytical Chemistry* 83, no. 3 (2011): 994–999.

Nimrichter, L., M. M. Burdick, K. Aoki, W. Laroy, M. A. Fierro, S. A. Hudson, C. E. Von Seggern, et al. “E-selectin Receptors on Human Leukocytes.” *Blood* 112, no. 9 (2008): 3744–3752.

Nollau, P, F Prall, U Helmchen, C Wagener, and M Neumaier. “Dysregulation of Carcinoembryonic Antigen Group Members CGM2, CD66a (biliary Glycoprotein), and Nonspecific Cross-reacting Antigen in Colorectal Carcinomas. Comparative Analysis by Northern Blot and in Situ Hybridization.” *The American Journal of Pathology* 151, no. 2 (1997): 521–530.

Nollet, F, P Kools, and F van Roy. “Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily Allows Identification of Six Major Subfamilies Besides Several Solitary Members.” *Journal of Molecular Biology* 299, no. 3 (2000): 551–572.

Öbrink, B. “CEA Adhesion Molecules: Multifunctional Proteins with Signal-regulatory Properties.” *Current Opinion in Cell Biology* 9, no. 5 (1997): 616–626.

Öbrink, Björn, Hiroki Sawa, Inka Scheffrahn, Bernhard B Singer, Kristmundur Sigmundsson, Ulla Sundberg, Robert Heymann, et al. “Computational Analysis of Isoform-specific Signal Regulation by CEACAM1-A Cell Adhesion Molecule Expressed in PC12 Cells.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 971 (2002): 597–607.

Ohlsson, L, M-L Hammarström, A Israelsson, L Näslund, A Oberg, G Lindmark, and S Hammarström. “Biomarker Selection for Detection of Occult Tumour Cells in Lymph Nodes of Colorectal Cancer Patients Using Real-time Quantitative RT-PCR.” *British Journal of Cancer* 95, no. 2 (2006): 218–225.

Okamura, Kyoko, Koichi Takayama, Miiru Izumi, Taishi Harada, Kazuto Furuyama, and Yoichi Nakanishi. “Diagnostic Value of CEA and CYFRA 21-1 Tumor Markers in Primary Lung Cancer.” *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 80, no. 1 (2013): 45–49.

Orlandi, R, D H Gussow, P T Jones, and G Winter. “Cloning Immunoglobulin Variable Domains for Expression by the Polymerase Chain Reaction.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, no. 10 (1989): 3833–3837.

Palm, Thomas, Reza Esfandiary, and Rajesh Gandhi. “The Effect of PEGylation on the Stability of Small Therapeutic Proteins.” *Pharmaceutical Development and Technology* 16, no. 5 (2011): 441–448.

Parrott, M.Brandon, and Michael A. Barry. “Metabolic Biotinylation of Secreted and Cell Surface Proteins from Mammalian Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281, no. 4 (2001): 993–1000.

Peldschus, Kersten, Alexander Schultze, Peter Nollau, Michael Kaul, Udo Schumacher, Christoph Wagener, Gerhard Adam, and Harald Ittrich. “Quantitative MR Imaging of Targeted SPIO Particles on the Cell Surface and Comparison to Flow Cytometry.” *Magnetic Resonance Imaging* 28, no. 4 (2010): 599–606.

Pieper, Ursula, Benjamin M Webb, David T Barkan, Dina Schneidman-Duhovny, Avner Schlessinger, Hannes Braberg, Zheng Yang, et al. “ModBase, a Database of Annotated Comparative Protein Structure Models, and Associated Resources.” *Nucleic Acids Research* 39, no. Database issue (2011): D465–474.

Pöselt, Elmar, Hauke Kloust, Ulrich Tromsdorf, Marcus Janschel, Christoph Hahn, Christoph Maßlo, and Horst Weller. “Relaxivity Optimization of a PEGylated Iron-oxide-based Negative Magnetic Resonance Contrast Agent for T_2-weighted Spin-echo Imaging.” *ACS Nano* 6, no. 2 (2012): 1619–1624.

Prall, F, P Nollau, M Neumaier, H D Haubeck, Z Drzeniek, U Helmchen, T Löning, and C Wagener. “CD66a (BGP), an Adhesion Molecule of the Carcinoembryonic Antigen Family, Is Expressed in Epithelium, Endothelium, and Myeloid Cells in a Wide Range of Normal Human Tissues.” *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 44, no. 1 (1996): 35–41.

Reche, P, and R N Perham. “Structure and Selectivity in Post-translational Modification: Attaching the Biotinyl-lysine and Lipoyl-lysine Swinging Arms in Multifunctional Enzymes.” *The EMBO Journal* 18, no. 10 (1999): 2673–2682.

Reche, P A. “Lipoylating and Biotinylating Enzymes Contain a Homologous Catalytic Module.” *Protein Science: a Publication of the Protein Society* 9, no. 10 (2000): 1922–1929.

Rehn, M, T Veikkola, E Kukk-Valdre, H Nakamura, M Ilmonen, C Lombardo, T Pihlajaniemi, K Alitalo, and K Vuori. “Interaction of Endostatin with Integrins Implicated in Angiogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, no. 3 (2001): 1024–1029.

Reilly, Raymond, and Wiley InterScience (Online service). *Monoclonal Antibody and Peptide-targeted Radiotherapy of Cancer*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010.

Reyelt, Jan. “Isolierung und Charakterisierung von inhibitorischen Einzeldomänen-Antikörpern aus dem Lama (Lama glama L., 1758) gegen die T-Zell-Ekto-ADP-Ribosyltransferase 2.2 der Maus (Mus musculus L., 1758).” Dissertation, Universität Hamburg, 2008.

Rippmann, J F, M Klein, C Hoischen, B Brocks, W J Rettig, J Gumpert, K Pfizenmaier, R Mattes, and D Moosmayer. “Procaryotic Expression of Single-chain Variable-fragment (scFv) Antibodies: Secretion in L-form Cells of Proteus Mirabilis Leads to Active Product and Overcomes the Limitations of Periplasmic Expression in Escherichia Coli.” *Applied and Environmental Microbiology* 64, no. 12 (1998): 4862–4869.

Ruigrok, Vincent J. B., Mark Levisson, Michel H. M. Eppink, Hauke Smidt, and John van der Oost. “Alternative Affinity Tools: More Attractive Than Antibodies?” *Biochemical Journal* 436, no. 1 (2011): 1–13.

Sachdev, D, and J M Chirgwin. “Order of Fusions Between Bacterial and Mammalian Proteins Can Determine Solubility in Escherichia Coli.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244, no. 3 (1998): 933–937.

Samols, D, C G Thornton, V L Murtif, G K Kumar, F C Haase, and H G Wood. “Evolutionary Conservation Among Biotin Enzymes.” *The Journal of Biological Chemistry* 263, no. 14 (1988): 6461–6464.

Samsen, Alexandra. *Humane Glykorezeptoren zur Charakterisierung tumorassoziierter Glykostrukturen*. Dissertation, Uni Hamburg. Göttingen: Cuvillier, 2010.

Sapoznik, S, R Ortenberg, J Schachter, and G Markel. “CEACAM1 in Malignant Melanoma: a Diagnostic and Therapeutic Target.” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12, no. 1 (2012): 3–10.

Sappino, A-P, R Buser, Q Seguin, M Fernet, L Lesne, F Gumy-Pause, W Reith, V Favaudon, and S J Mandriota. “The CEACAM1 Tumor Suppressor Is an ATM and P53-regulated Gene Required for the Induction of Cellular Senescence by DNA Damage.” *Oncogenesis* 1, no. 4 (2012): e7.

Schatz, P J. “Use of Peptide Libraries to Map the Substrate Specificity of a Peptide-modifying Enzyme: a 13 Residue Consensus Peptide Specifies Biotinylation in Escherichia Coli.” *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11, no. 10 (1993): 1138–1143.

Schölzel, S, W Zimmermann, G Schwarzkopf, F Grunert, B Rogaczewski, and J Thompson. “Carcinoembryonic Antigen Family Members CEACAM6 and CEACAM7 Are Differentially Expressed in Normal Tissues and Oppositely Deregulated in Hyperplastic Colorectal Polyps and Early Adenomas.” *The American Journal of Pathology* 156, no. 2 (2000): 595–605.

Schrama, David, Ralph A Reisfeld, and Jürgen C Becker. “Antibody Targeted Drugs as Cancer Therapeutics.” *Nature Reviews. Drug Discovery* 5, no. 2 (2006): 147–159.

Schumann, D, C J Chen, B Kaplan, and J E Shively. “Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1 Directly Associates with Cytoskeleton Proteins Actin and Tropomyosin.” *The Journal of Biological Chemistry* 276, no. 50 (2001): 47421–47433.

Schwarz, K, N Brückel, H Schwaibold, S von Kleist, and F Grunert. “Non-specific Cross-reacting Antigen: Characterization of Specific and Cross-reacting Epitopes.” *Molecular Immunology* 26, no. 5 (1989): 467–475.

Schwede, T. “SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-modeling Server.” *Nucleic Acids Research* 31, no. 13 (2003): 3381–3385.

Shi, Xianzong, Tammy Karkut, Mahmood Chamankhah, Michelle Alting-Mees, Sean M Hemmingsen, and Dwayne Hegedus. “Optimal Conditions for the Expression of a Single-chain Antibody (scFv) Gene in Pichia Pastoris.” *Protein Expression and Purification* 28, no. 2 (2003): 321–330.

Shirahata, S, Y Katakura, and K Teruya. “Cell Hybridization, Hybridomas, and Human Hybridomas.” *Methods in Cell Biology* 57 (1998): 111–145.

Shuvaev, Vladimir V, Thomas Dziubla, Rainer Wiewrodt, and Vladimir R Muzykantov. “Streptavidin-biotin Crosslinking of Therapeutic Enzymes with Carrier Antibodies: Nanoconjugates for Protection Against Endothelial Oxidative Stress.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 283 (2004): 3–19.

Siepen, D, R J Paxton, M Neumaier, J E Shively, and C Wagener. “Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Two Crossreacting Antigens of 165 kD and 105 kD Isolated from Meconium Exhibit Identical Amino Terminal Sequences.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 147, no. 1 (1987): 212–218.

Silverstein, Arthur M. *Paul Ehrlich’s Receptor Immunology: The Magnificent Obsession*. San Diego: Academic Press, 2002.

Simeone, Diane M, Baoan Ji, Mousumi Banerjee, Thiruvengadam Arumugam, Dawei Li, Michelle A Anderson, Ann Marie Bamberger, et al. “CEACAM1, a Novel Serum Biomarker for Pancreatic Cancer.” *Pancreas* 34, no. 4 (2007): 436–443.

Singer, Bernhard B, Inka Scheffrahn, Robert Heymann, Kristmundur Sigmundsson, Robert Kammerer, and Björn Obrink. “Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 Expression and Signaling in Human, Mouse, and Rat Leukocytes: Evidence for Replacement of the Short Cytoplasmic Domain Isoform by Glycosylphosphatidylinositol-linked Proteins in Human Leukocytes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, no. 10 (2002): 5139–5146.

Singer, Bernhard B, Esther Klaile, Inka Scheffrahn, Mario M Müller, Robert Kammerer, Werner Reutter, Björn Obrink, and Lothar Lucka. “CEACAM1 (CD66a) Mediates Delay of Spontaneous and Fas Ligand-induced Apoptosis in Granulocytes.” *European Journal of Immunology* 35, no. 6 (2005): 1949–1959.

Singer, Bernhard, and Lothar Lucka. “CEACAM1.” *UCSD Nature Molecule Pages* (2005). doi:10.1038/mp.a003597.01

Smith, G. “Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface.” *Science* 228, no. 4705 (1985): 1315–1317.

Strebhardt, Klaus, and Axel Ullrich. “Paul Ehrlich’s Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress.” *Nature Reviews Cancer* 8, no. 6 (2008): 473–480.

Strickland, Laura A, Jed Ross, Simon Williams, Sarajane Ross, Maria Romero, Susan Spencer, Rich Erickson, et al. “Preclinical Evaluation of Carcinoembryonic Cell Adhesion Molecule (CEACAM) 6 as Potential Therapy Target for Pancreatic Adenocarcinoma.” *The Journal of Pathology* 218, no. 3 (2009): 380–390.

Suntharalingam, Ganesh, Meghan R Perry, Stephen Ward, Stephen J Brett, Andrew Castello-Cortes, Michael D Brunner, and Nicki Panoskaltsis. “Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412.” *The New England Journal of Medicine* 355, no. 10 (2006): 1018–1028.

Tabita, F Robert, Thomas E Hanson, Huiying Li, Sriram Satagopan, Jaya Singh, and Sum Chan. “Function, Structure, and Evolution of the RubisCO-like Proteins and Their RubisCO Homologs.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 71, no. 4 (2007): 576–599.

Takeichi, M. “The Cadherins: Cell-cell Adhesion Molecules Controlling Animal Morphogenesis.” *Development (Cambridge, England)* 102, no. 4 (1988): 639–655.

Tang, Jonathan C.Y., Tamas Szikra, Yevgenia Kozorovitskiy, Miguel Teixiera, Bernardo L. Sabatini, Botond Roska, and Constance L. Cepko. “A Nanobody-Based System Using Fluorescent Proteins as Scaffolds for Cell-Specific Gene Manipulation.” *Cell* 154, no. 4 (2013): 928–939.

Teng, Grace, and F. Nina Papavasiliou. “Immunoglobulin Somatic Hypermutation.” *Annual Review of Genetics* 41, no. 1 (2007): 107–120.

Thies, Anka, Ingrid Moll, Jürgen Berger, Christoph Wagener, Jens Brümmer, Hans-Joachim Schulze, Georg Brunner, and Udo Schumacher. “CEACAM1 Expression in Cutaneous Malignant Melanoma Predicts the Development of Metastatic Disease.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 20, no. 10 (2002): 2530–2536.

Tomar, Anil Kumar, Balwinder Singh Sooch, and Savita Yadav. “Computational Analysis of Concanavalin A Binding Glycoproteins of Human Seminal Plasma.” *Bioinformation* 7, no. 2 (2011): 69–75.

Topp, Max S, Peter Kufer, Nicola Gökbuget, Mariele Goebeler, Matthias Klinger, Svenja Neumann, Heinz-A Horst, et al. “Targeted Therapy with the T-cell-engaging Antibody Blinatumomab of Chemotherapy-refractory Minimal Residual Disease in B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results in High Response Rate and Prolonged Leukemia-free Survival.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, no. 18 (2011): 2493–2498.

Van der Linden, R, B de Geus, W Stok, W Bos, D van Wassenaar, T Verrips, and L Frenken. “Induction of Immune Responses and Molecular Cloning of the Heavy Chain Antibody Repertoire of Lama Glama.” *Journal of Immunological Methods* 240, no. 1–2 (2000): 185–195.

Vaneycken, Ilse, Nick Devoogdt, Naomi Van Gassen, Cécile Vincke, Catarina Xavier, Ulrich Wernery, Serge Muyldermans, Tony Lahoutte, and Vicky Caveliers. “Preclinical Screening of anti-HER2 Nanobodies for Molecular Imaging of Breast Cancer.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, no. 7 (2011): 2433–2446.

Vaquero, C, M Sack, J Chandler, J Drossard, F Schuster, M Monecke, S Schillberg, and R Fischer. “Transient Expression of a Tumor-specific Single-chain Fragment and a Chimeric Antibody in Tobacco Leaves.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, no. 20 (1999): 11128–11133.

Vendel, Michelle C, Michael Favis, William B Snyder, Flora Huang, Allan D Capili, Jianying Dong, Scott M Glaser, Brian R Miller, and Stephen J Demarest. “Secretion from Bacterial Versus Mammalian Cells Yields a Recombinant scFv with Variable Folding Properties.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526, no. 2 (2012): 188–193.

Virji, Mumtaz, Katherine Makepeace, David J. P. Ferguson, and Suzanne M. Watt. “Carcinoembryonic Antigens (CD66) on Epithelial Cells and Neutrophils Are Receptors for Opa Proteins of Pathogenic Neisseriae.” *Molecular Microbiology* 22, no. 5 (1996): 941–950.

Virji, M, D Evans, J Griffith, D Hill, L Serino, A Hadfield, and S M Watt. “Carcinoembryonic Antigens Are Targeted by Diverse Strains of Typable and Non-typable Haemophilus Influenzae.” *Molecular Microbiology* 36, no. 4 (2000): 784–795.

Virji, M. “CEA and Innate Immunity.” *Trends in Microbiology* 9, no. 6 (2001): 258–259.

Von Kleist, S, G Chavanel, and P Burtin. “Identification of an Antigen from Normal Human Tissue That Crossreacts with the Carcinoembryonic Antigen.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, no. 9 (1972): 2492–2494.

Vu, K B, M A Ghahroudi, L Wyns, and S Muyldermans. “Comparison of Llama VH Sequences from Conventional and Heavy Chain Antibodies.” *Molecular Immunology* 34, no. 16–17 (1997): 1121–1131.

Wagener, C, Y H Yang, F G Crawford, and J E Shively. “Monoclonal Antibodies for Carcinoembryonic Antigen and Related Antigens as a Model System: a Systematic Approach for the Determination of Epitope Specificities of Monoclonal Antibodies.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 130, no. 5 (1983[a]): 2308–2315.

Wagener, C, B R Clark, K J Rickard, and J E Shively. “Monoclonal Antibodies for Carcinoembryonic Antigen and Related Antigens as a Model System: Determination of Affinities and Specificities of Monoclonal Antibodies by Using Biotin-labeled Antibodies and Avidin as Precipitating Agent in a Solution Phase Immunoassay.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 130, no. 5 (1983[b]): 2302–2307.

Wagener, C, L Wickert, and W Meyers. “Limited Improvement of Tumour Diagnosis by the Simultaneous Determination of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and of a Tumour-associated CEA-related Antigen of Mr 128,000 in Serum.” *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.* 27, no. 9 (1989): 643–652.

Wagener, C, and S Ergün. “Angiogenic Properties of the Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1.” *Experimental Cell Research* 261, no. 1 (2000): 19–24.

Waugh, David S. “Making the Most of Affinity Tags.” *Trends in Biotechnology* 23, no. 6 (2005): 316–320.

Wedepohl, Stefanie, Figen Beceren-Braun, Sebastian Riese, Konrad Buscher, Sven Enders, Gesche Bernhard, Karin Kilian, Véronique Blanchard, Jens Dernedde, and Rudolf Tauber. “L-selectin--a Dynamic Regulator of Leukocyte Migration.” *European Journal of Cell Biology* 91, no. 4 (2012): 257–264.

Weinberg, Robert A. *The Biology of Cancer*. New York: Garland Science, 2007.

Weiss, E, J Chatellier, and G Orfanoudakis. “In Vivo Biotinylated Recombinant Antibodies: Construction, Characterization, and Application of a Bifunctional Fab-BCCP Fusion Protein Produced in Escherichia Coli.” *Protein Expression and Purification* 5, no. 5 (1994): 509–517.

Wesolowski, Janusz, Vanina Alzogaray, Jan Reyelt, Mandy Unger, Karla Juarez, Mariela Urrutia, Ana Cauerhff, et al. “Single Domain Antibodies: Promising Experimental and Therapeutic Tools in Infection and Immunity.” *Medical Microbiology and Immunology* 198, no. 3 (2009): 157–174.

Wong, Jeffrey Y C, David Z Chu, Lawrence E Williams, An Liu, Jiping Zhan, Dave M Yamauchi, Sharon Wilczynski, et al. “A Phase I Trial of (90)Y-DOTA-anti-CEA Chimeric T84.66 (cT84.66) Radioimmunotherapy in Patients with Metastatic CEA-producing Malignancies.” *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 21, no. 2 (2006): 88–100.

Wright, A, and S L Morrison. “Effect of Glycosylation on Antibody Function: Implications for Genetic Engineering.” *Trends in Biotechnology* 15, no. 1 (1997): 26–32.

Yazaki, P. J., M. A. Sherman, J. E. Shively, D. Ikle, L. E. Williams, J. Y.C. Wong, D. Colcher, A. M. Wu, and A. A. Raubitschek. “Humanization of the anti-CEA T84.66 Antibody Based on Crystal Structure Data.” *Protein Engineering Design and Selection* 17, no. 5 (2004): 481–489.

Zebhauser, Roland, Robert Kammerer, Andreas Eisenried, Andrew McLellan, Tom Moore, and Wolfgang Zimmermann. “Identification of a Novel Group of Evolutionarily Conserved Members Within the Rapidly Diverging Murine Cea Family.” *Genomics* 86, no. 5 (2005): 566–580.

Zhou, H, R J Fisher, and T S Papas. “Optimization of Primer Sequences for Mouse scFv Repertoire Display Library Construction.” *Nucleic Acids Research* 22, no. 5 (1994): 888–889.

Zhou, Guang-Qian, Yang Zhang, and Sten Hammarström. “The Carcinoembryonic Antigen (CEA) Gene Family in Non-human Primates.” *Gene* 264, no. 1 (2001): 105–112.

Zhu, J., and W. E. Paul. “CD4 T Cells: Fates, Functions, and Faults.” *Blood* 112, no. 5 (2008): 1557–1569.

Zinkernagel, R M, and P C Doherty. “Restriction of in Vitro T Cell-mediated Cytotoxicity in Lymphocytic Choriomeningitis Within a Syngeneic or Semiallogeneic System.” *Nature* 248, no. 450 (1974): 701–702.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AICD	*activation-induced cytidine deaminase*
ALL	akute lymphatische Leukämie
ART	ADP-Ribosyltransferase
AS	Aminosäure
ATM	*ataxia teleangiectasia mutated*
BAP	*biotin acceptor peptide*
BC	Biotin-Carboxylase
BCCP	*biotin carboxylase carrier protein*
BCR	*B-cell receptor*
bidest.	*bidestillatus*
BiTE	*bi-specific T-cell engager*
BGP	*biliary glycoprotein* (CEACAM1)
bp	*base pairs*
BPL	Biotin-Protein-Ligase
BSA	*bovine serum albumine*
btn	(D)-+-Biotin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CAM	*cell adhesion molecule*
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	*complementary* DNA
CDR	*complementarity determining region*
CEA	*carcinoembryonic antigen* (CEACAM5)
CEACAM	*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*
C_H	*constant domain of heavy chain*
cIgG	*camelid immunoglobulin G*
C_L	*constant domain of light chain*
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Con A	Concanavalin A
CRD	*carbohydrate recognition domain*
CsCl	Cäsiumchlorid
CT	Carboxytransferase
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence*
ECM	*extracellular matrix*

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	*epidermal growth factor (receptor)*
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
ETA	Exotoxin A
et al.	*et alii / et aliae*
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fab	*fragment antigen-binding*
FACS	*fluorescence-assisted cell sorting*
FAK	*focal adhesion kinase*
Fc	*fragment crystallizable*
FCS	*fetal calf serum*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	*framework region*
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GFP	*green fluorescending protein*
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GST	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HAMA	*human anti-mouse antibodies*
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HCS	Holocarboxylase Synthetase
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HRP	*horse raddish peroxidase*
lat.	lateinisch
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITIM	*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*
kb	*kilobase*
kDa	Kilo-Dalton
KLB	*kinase lysis buffer*
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	*multiple cloning site*
mod.	modifiziert
$MgCl_2$	Magnesiumdichlorid
MHC	*major histocompatibility complex*
MRD	*minimal residual disease*
MRI bzw. MRT	*magnetic resonance imaging* bzw. Magnet-Resonanz-Tomographie
mRNA	*messenger* RNA
MWCO	*molecular weight cut-off*
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid

NaN_3	Natriumazid
NaOAc	Natriumacetat
NCA	*non-specific cross reacting antigen* (CEACAM6)
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NIH	*National Institute of Health*
NLR	Nicht-lineare Regression
NSCLC	*non-small cell lung cancer*
OD	*optical density*
ORF	*open reading frame*
pAk	polyklonaler Antikörper
PAMP	*pathogen-associated molecular pattern*
PCR	*polymerase chain reaction*
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
pfu	*plaque forming unit*
pH	*potentia Hydrogenii*
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PKC	Proteinkinase C
POI	*protein of interest*
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	*reactive oxygen species*
RT	Reverse Transkriptase bzw. Raumtemperatur
scFv	*single chain fragment variable*
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*
$SiLe^X$	Sialyl-Lewis-X
sog.	sogenannte, sogenannter, sogenanntes
TCR	*T-cell receptor*
TNF	*tumor necrosis factor*
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VEGF	*vascular-endothelial growth factor*
Vgl.	Vergleich/verglichen
V_H	*variable domain of heavy chain*
V_HH	*variable domain of heavy chain of heavy-chain-only antibodies*
V_L	*variable domain of light chain*
z.B.	zum Beispiel

7.2 Untersuchung von bakteriell exprimierten T84.66 scFv-Fragmenten auf CEACAM5-spezifische Bindung

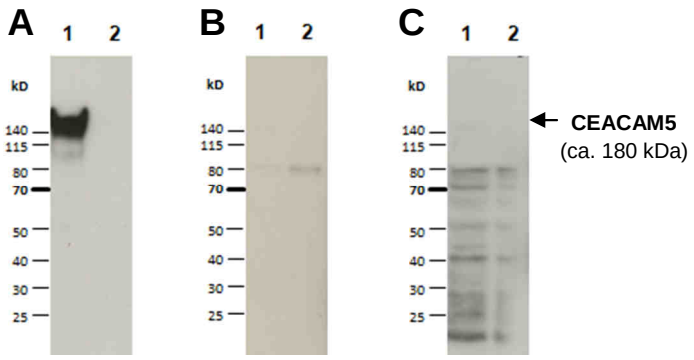


Abb. 7.1:
Western Blot-Analyse von bakteriell exprimierten T84,.66 scFv-Fragmenten im Vergleich zu T84.66 mAk an Lysaten von HEK293/CEACAM5-Transfektom (1) und untransfizierten HEK293-Zellen (2). Von den Lysaten wurden je 50 µg Gesamtprotein aufgetrennt.
(**A**) T84,.66 mAk wurde in einer Konzentration von 1 µg/mL inkubiert und mit anti-Maus Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:40.000) nachgewiesen. Expositionszeit: 10 min.
(**B**) T84.66 scFv aus bakterieller Expression (*E. coli*) wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL Gesamtprotein inkubiert und mit HRP-konjugiertem Streptavidin-HRP (Verdünnung:1:100.000) nachgewiesen. Exp.: 10 min.
(**C**) T84.66 scFv aus bakterieller Expression (*E. coli*) bei Co-Expression KJE8-kodierter Chaperone wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL Gesamtprotein inkubiert und mit HRP-konjugiertem Streptavidin-HRP (Verdünnung:1:100.000) nachgewiesen. Exp.: 30 min.

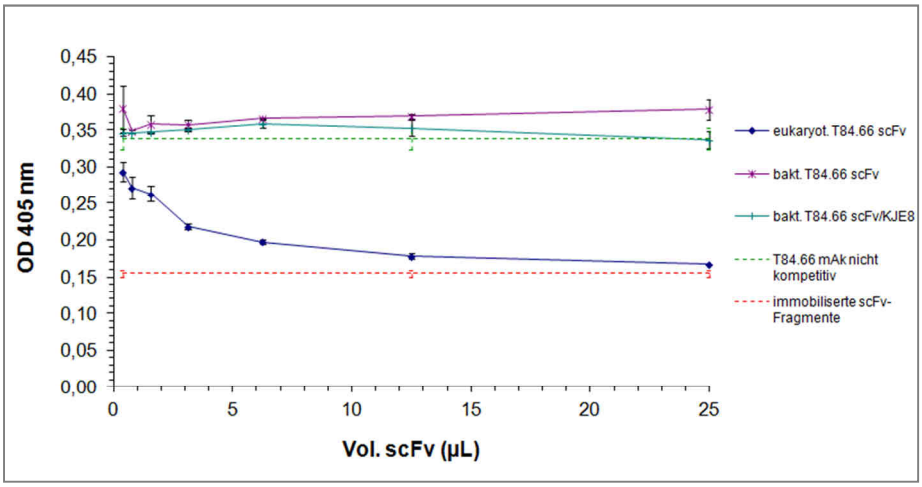
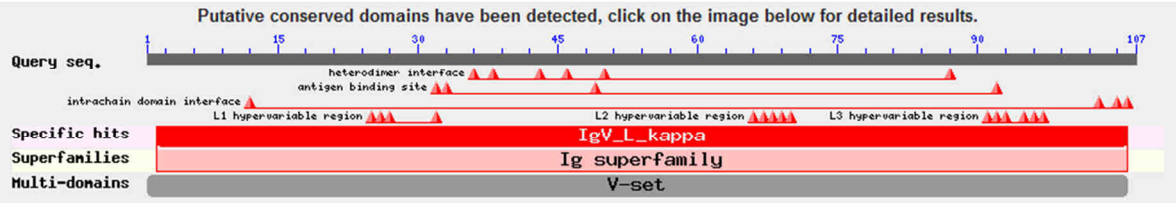


Abb. 7.2:
Kompetitiver ELISA zum vergleichenden Nachweis einer CEACAM5-spezifischen Bindung von verschieden exprimierten T84.66 scFv-Fragmenten durch Verdrängung von T84.66 mAk. Pro well der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes CEACAM5 in einer Konzentration von 0.5 µg/mL immobilisiert. Verdünnungsreihen mit steigender Konzentration an T84.66 scFv-Fragmenten wurden zusammen mit einer konstanten Konzentration T84.66 mAk (0.125 µg/mL) in den beschichteten wells inkubiert. Der Nachweis des mAk erfolgte mit HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5.000. Nach Inkubation mit ABTS wurde die Absorption bei 405 nm nach einer Messzeit von 40 min ausgewertet. Alle Messungen wurden als Duplikat vorgenommen. T84.66 scFv aus bakt. Expression ohne (lilafarbene Bindungskurve) bzw. mit co-exprimierten Chaperonen (türkisfarbene Bindungskurve) wurden in Gesamtprotein-Konzentrationen von 0.04 µg/mL bis 25 µg/mL mit je 0.125 µg/mL T84.66 mAk inkubiert. Die Proben aus eukaryotischer Expression (blaue Bindungskurve) von T84.66 scFv mit unbekannter Konzentration wurden in gleichen Volumina wie die bakt. exprimierten scFv-Fragmente 0.4 µL/mL bis 250 µL/mL) mit je 0.125 µg/mL T84.66 mAk inkubiert. Die grüne gestrichelte Linie entspricht dem durchschnittlichen Signal für 0.125 µg/mL T84.66 mAk an CEACAM5 unter nicht-kompetitiven Bedingungen. Die rote gestrichelte entspricht dem durchschnittlichen Detektionssignal für immobiliserte scFv-Fragmente (250 µL/mL) durch HRP-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:5.000).

7.3 pBLAST-*alignment* für Segmente variabler Ig-Domänen auf Basis von RNA aus T84.1 Hybridom-Zellen

A



cytomegalovirus gB-specific single chain antibody fragment [synthetic construct]
Sequence ID: gb|ACQ99514.1| Length: 252 Number of Matches: 1

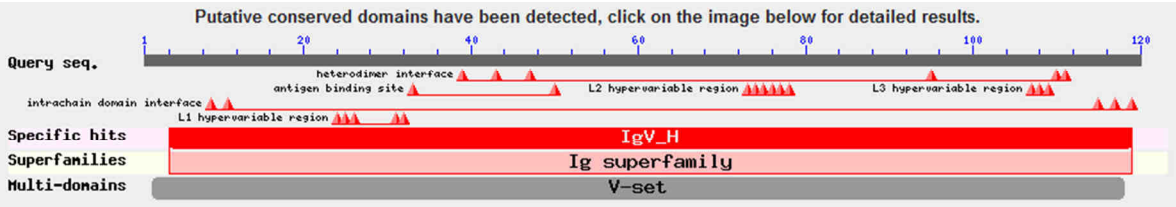
Range 1: 1 to 107 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
199 bits(506)	1e-61	Compositional matrix adjust.	95/107(89%)	101/107(94%)	0/107(0%)

```
Query  1    DIVLTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVVSSVIWYQQKPGQSPKALIYSASYRYNGVPD  60
            DI +TQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNV ++V WYQQKPGQSPKALIYSASYRY+GVPD
Sbjct  1    DIQMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPD  60

Query  61   RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYYCQQYNNYPFTFGSGTKLEIN  107
            RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEY+CQQYN+YP TFG GTKLEI
Sbjct  61   RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK  107
```

B



immunoglobulin heavy chain, partial [Mus musculus]
Sequence ID: gb|AAA16915.1| Length: 134 Number of Matches: 1

Range 1: 20 to 134 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
201 bits(510)	9e-64	Compositional matrix adjust.	100/120(83%)	106/120(88%)	5/120(4%)

```
Query  1    EVQLQQSDTELVKPGASVKISCKASGYTFTDHGIHWVKQRPEQGLEWIGYISPGNGDIKY  60
            +VQLQQSD ELVKPGASVKISCKASGYTFTDH IHWVKQ+PEQGLEWIGYISPGN DIKY
Sbjct  20   QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNDDIKY  79

Query  61   NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRFFLLLRGAMDYWGQGTSVTVSS  120
            NEKFKGKATLTADK S+T YMQLNSLTSEDSAVYFC R    L G  + WGQGT++TVSS
Sbjct  80   NEKFKGKATLTADKPSNTVYMQLNSLTSEDSAVYFCTR---SLSG--NSWGQGTTLTVSS  134
```

Abb. 7.3:
Charakterisierung der Aminosäuresequenzen für PCR-amplifizierte Segmente variabler Ig-Domänen auf Basis von RNA aus T84.1 Hybridom-Zellen durch Datenbank-Vergleich mit homologen Sequenzen mittels pBLAST-Algorithmus. Durch den Abgleich konnten für beide Sequenzen charakteristischer Merkmale variabler Immunglobulin-Domänen wie z.B. Dimerisierungsmotive und hypervariable Regionen aufgezeigt werden. Zudem ist exemplarisch der direkte Vergleich mit einer bekannten, homologen Sequenz dargestellt.
(**A**) pBLAST-*alignment* für PCR-amplifiziertes Segment der variablen Ig-Domäne von leichten Ketten (κ)
(**B**) pBLAST-*alignment* für PCR-amplifiziertes Segment der variablen Ig-Domäne von schweren Ketten

7.4 Parameter für 3D-Modellierung von Antikörper-Fragmenten

7.4.1 ModWeb-log und Anolea/Qmean-Protokoll für T84.1 scFv

HEADER T84.1single chain-1374684029-01-30885
SOURCE ModWeb Comparative Modeling Server version SVN.r1409M
REMARK 1 Length of target sequence : 245
REMARK 1 Region of target sequence modeled : 1 to 245
REMARK 1
REMARK 2 Number of templates used : 1
REMARK 2 Details of the first template structure
REMARK 2 PDB Code : 1h8nA
REMARK 2 Region used for modeling : 4 to 243
REMARK 2
REMARK 3 E-value of the alignment : 0
REMARK 3 Sequence identity of the alignment : 78
REMARK 3 Quality of the model (GA341 score) : 1
EXPDTA THEORETICAL MODEL, MODELLER SVN 2013/07/24 10:02:03
REMARK 6 MODELLER OBJECTIVE FUNCTION: 1422.5963
REMARK 6 MODELLER BEST TEMPLATE % SEQ ID: 78.440
REMARK 6 GENERATED BY MODPIPE VERSION SVN.r1409M

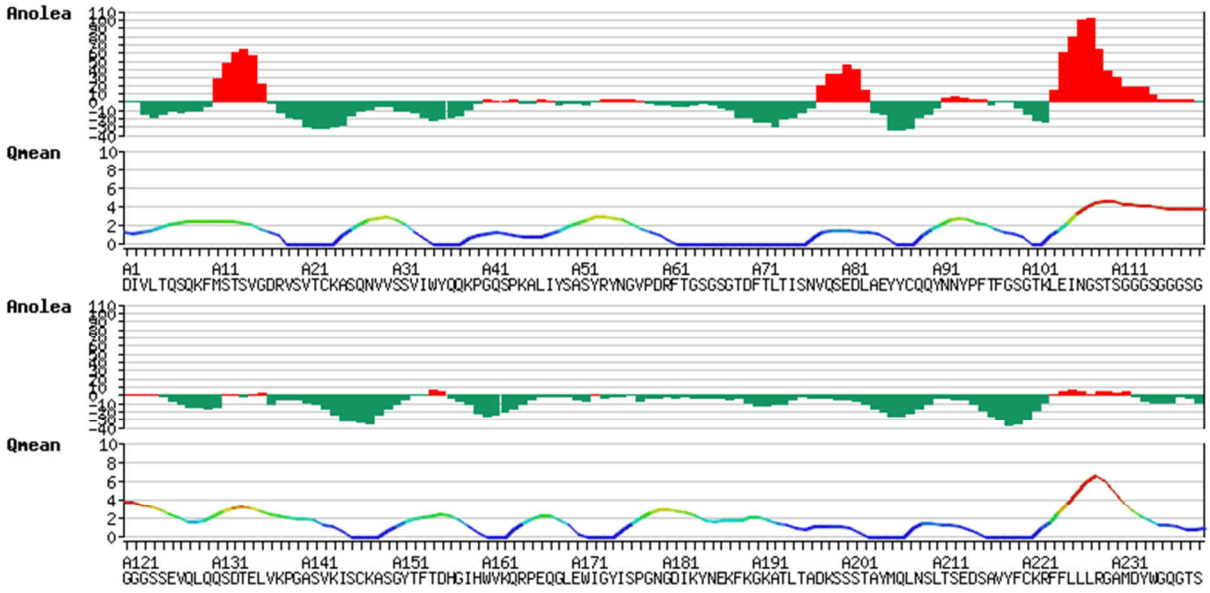


Abb. 7.4:
ANOLEA- und Qmean-Protokolle der T84.1 scFv-Modellierung (s. Abb. 4.6, Kap. 4.2.4). ANOLEA (*Atomic non-local environment assessment*) berechnet als Teil des SWISS-MODEL Netzwerks Energien für paarweise Interaktionen des nicht-lokalen Umfelds (NLE) der schweren Atome des Modells als mittleres Kraftpotential (Guex und Peitsch, 1997; Schwede, 2003; Arnold et al., 2005). Die y-Achse des Plots gibt dabei die Energie für jede Aminosäure der Proteinkette an. Negative Energiewerte (grün) geben dabei ein günstiges energetisches Umfeld und positive Energiewerte (rot) ein eher ungünstiges energetisches Umfeld für die jeweilige Aminosäure an. Qmean ist ein zusammengesetzte Wertungsfunktion sowohl für die globale Qualität des gesamten Modells als auch für unterschiedliche Regionen innerhalb des Modells durch Analyse der einzelnen Reste (Benkert *et al.*, 2011).

7.4.2 ModWeb-log und Anolea/Qmean-Protokoll für CEACAM1-spezifischen V_HH-Klon No.10

HEADER VHH-Clone No.10-1374833903-01-45962
SOURCE ModWeb Comparative Modeling Server version SVN.r1409M
REMARK 1 Length of target sequence : 159
REMARK 1 Region of target sequence modeled : 6 to 132
REMARK 1
REMARK 2 Number of templates used : 1
REMARK 2 Details of the first template structure
REMARK 2 PDB Code : 2x6mA
REMARK 2 Region used for modeling : 3 to 126
REMARK 2
REMARK 3 E-value of the alignment : 0
REMARK 3 Sequence identity of the alignment : 61
REMARK 3 Quality of the model (GA341 score) : 1
EXPDTA THEORETICAL MODEL, MODELLER SVN 2013/07/26 11:36:05
REMARK 6 MODELLER OBJECTIVE FUNCTION: 772.7242
REMARK 6 MODELLER BEST TEMPLATE % SEQ ID: 61.290
REMARK 6 GENERATED BY MODPIPE VERSION SVN.r1409M

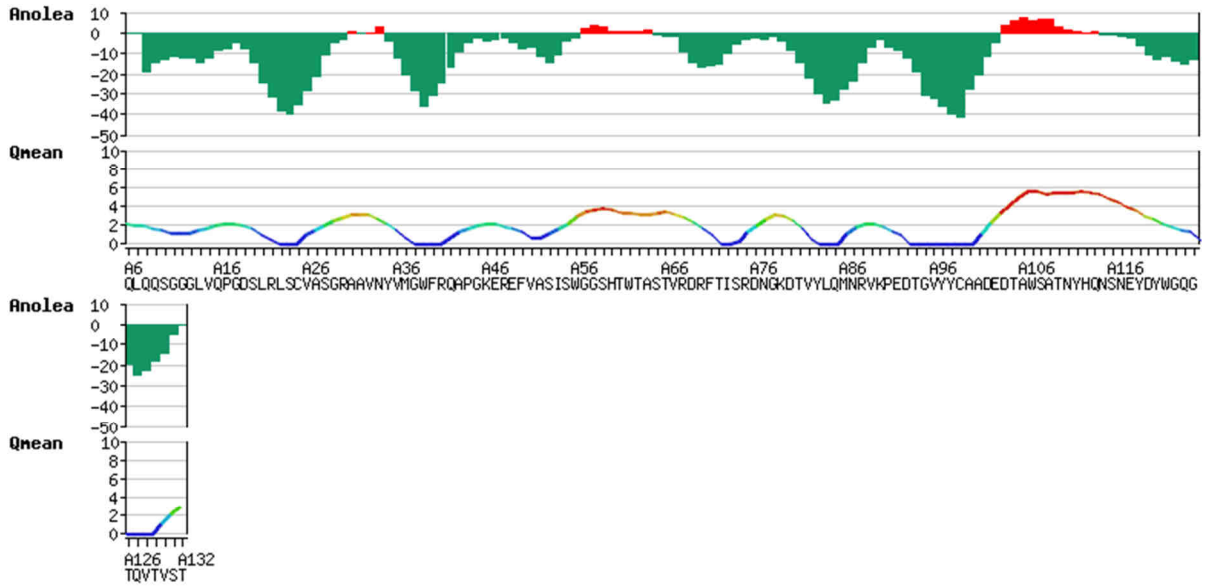


Abb. 7.5:
ANOLEA- und Qmean-Protokolle der 3D-Modellierung für den anti-CEACAM1 V_HH-Klon No.10 (s. Abb. 4.8, Kap. 4.3.3). Die Beschreibung zu den Protokollen ist der Legende von Abb. 7.2 zu entnehmen.

7.4.3 ModWeb-log und Anolea/Qmean-Protokoll für CEACAM1-spezifischen V_HH-Klon No.17

HEADER VHH-Clone No.17-1375213688-01-16734
SOURCE ModWeb Comparative Modeling Server version SVN.r1409M
REMARK 1 Length of target sequence : 137
REMARK 1 Region of target sequence modeled : 1 to 128
REMARK 1
REMARK 2 Number of templates used : 1
REMARK 2 Details of the first template structure
REMARK 2 PDB Code : 4dkaA
REMARK 2 Region used for modeling : 1 to 127
REMARK 2
REMARK 3 E-value of the alignment : 0
REMARK 3 Sequence identity of the alignment : 65
REMARK 3 Quality of the model (GA341 score) : 1
EXPDTA THEORETICAL MODEL, MODELLER SVN 2013/07/30 21:48:48
REMARK 6 MODELLER OBJECTIVE FUNCTION: 709.0502
REMARK 6 MODELLER BEST TEMPLATE % SEQ ID: 64.567
REMARK 6 GENERATED BY MODPIPE VERSION SVN.r1409M

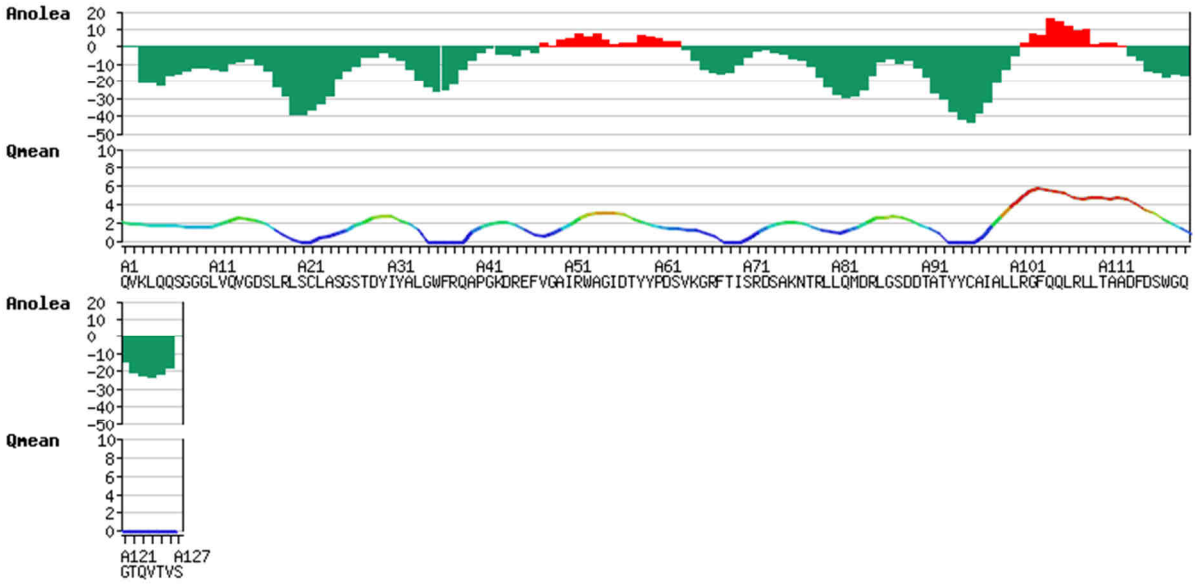


Abb. 7.6:
ANOLEA- und Qmean-Protokolle der 3D-Modellierung für den anti-CEACAM1 V_HH-Klon No.17 (s. Abb. 4.8, Kap. 4.3.3). Die Beschreibung zu den Protokollen ist der Legende von Abb. 7.2 zu entnehmen.

7.5 Schematische Darstellung der Arbeitsschritte in einem *phage display*-Verfahren

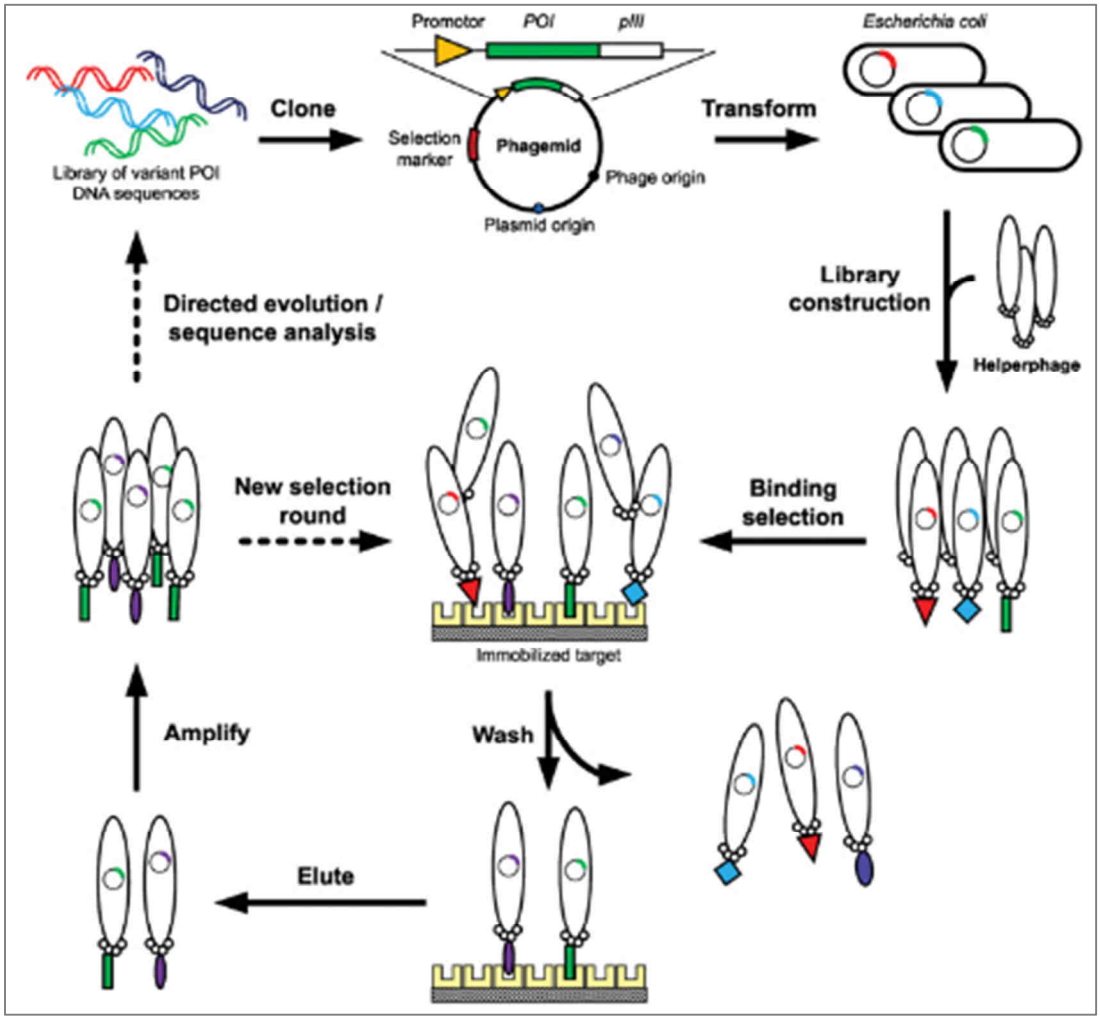


Abb. 7.7:
Schematische Darstellung des Ablaufs eines *phage display*-Verfahrens zur Selektion spezifischer Zielproteine aus einer Gen-Bibliothek. Die Gesamtheit der verschiedenen genetischen Varianten für ein Zielprotein (*protein of interest*; POI) aus einer entsprechenden Genbibliothek wird in den ORF eines Phagemid-Vektors kloniert. Dieser enthält *downstream* das für ein Phagenhüllprotein (hier: pIII) kodierende Segment, welches in der Regel vom Insert durch ein sog. Amber Stop Codon (UAG) getrennt ist. Durch Transformation eines *E. coli* Suppressor-Stammes (z.B. TG1; ignoriert das Amber Stop Codon durch veränderte tRNA) und anschließende Infektion der Transformanten mit einem Helferphagen erfolgt die Produktion von Phagenpartikeln, welche die verschiedenen Varianten des Zielproteins zum einen als genetische Information im Inneren und zum anderen fusioniert mit dem entsprechenden Hüllprotein auf der Oberfläche tragen. Die Gesamtheit der rekombinanten Phagen stellt die entsprechende Phagen-Bibliothek dar. Aus dieser können u.a. durch Inkubation mit an einer Festphase immobilisiertem Interaktionspartnern (z.B. Antigen) die spezifischen Varianten selektioniert werden, wobei unspezifische Phagen durch Waschschritte aus der Reaktionslösung entfernt werden. Nach Elution werden die spezifischen Phagenfusionsproteine wieder durch Infektion in E. coli eingebracht und amplifiziert (*phage rescue*). Die amplifizierten, spezifischen Binder können nun für weitere Selektionsrunden eingesetzt werden. Nach abgeschlossener Selektion lassen sich Gensegmente für angereicherte spezifische Zielproteine durch DNA-Sequenzierung identifizieren bzw. kann die Spezifität einzelner Klone durch *screening* über funktionale Assays (z.B. ELISA) bestätigt werden (Abb. aus Ruigrok *et al.*, 2011).

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Wagener für die Möglichkeit bedanken, diese Promotionsarbeit am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchführen zu können sowie für die kritische und gleichzeitig fürsorgliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt weiter Herrn Dr. Peter Nollau für die exzellente Anweisung, Betreuung und Beratung in Zusammenhang mit dieser Arbeit als auch für die anregenden Diskussionen und die Ermöglichung der interdisziplinären Arbeiten in diesem Projekt.

Weiter möchte ich vor allem den Herren Dr. Markus Heine, Dr. Elmar Pöselt für die interessante und ertragreiche Zusammenarbeit auf interdisziplinären Gebieten danken. Ganz besonderer Dank gebührt an dieser Stelle Frau Dr. Eva Moors von der Universität Göttingen, deren freundliche Unterstützung die Generierung von Lama-Immunbibliotheken und die Identifizierung CEACAM-reaktiver V_HH-Fragmente überhaupt erst möglich machte.

Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester danke ich sehr für seine Hilfsbereitschaft in Bezug auf die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der naturwissenschaftlichen Fakultät, die freundliche und umfassende Beratung sowie für die Anfertigung des Zweitgutachtens zu dieser Dissertationsschrift.

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung in Zusammenhang mit der Kultivierung von Hybridom-Zelllinien und der Produktion monoklonaler Antikörper, der Einweisung in die Zellkulturarbeiten sowie der Klonierung der scFv-BCCP-Fragmente danke ich Frau Birgit Klampe und Frau Helwe Gerull sowie weiter Herrn PD Dr. Friedrich Buck, Frau Agata Blaszczyk-Wewer und Herrn Sönke Harder in Zusammenhang mit LC/MS-Fragestellungen.

Aus dem Institut für Immunologie danke ich den Mitarbeitern, insbesondere Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte, Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag, Herrn Dr. Welbeck Danquah und Herrn Stephan Menzel für die interessanten Seminarbeiträge und den Austausch in Zusammenhang mit Fragestellungen zur Produktion von V_HH-Fragmenten.
Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Trepel des Instituts für Molekulare Onkologie danke ich den Herren Dr. Henning Seismann und Dr. Fabian Müller ebenfalls für die Anregungen in Zusammenhang mit *phage display*-Arbeiten sowie für die Hilfe bei der CsCl-Plasmidpräparation.

Allgemein danke ich den Kollegen des Instituts für Klinische Chemie für die freundliche, angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre, insbesondere meinem Kommilitonen und Laborpartner Malik Khenkhar.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Norbert und Angelika Maßlo, bei Carolin Anghel sowie bei meinen Freunden bedanken, die mir den nötigen Rückhalt und die Unterstützung gegeben haben und mir stets treu zur Seite standen.

9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

_____

Christoph Maßlo