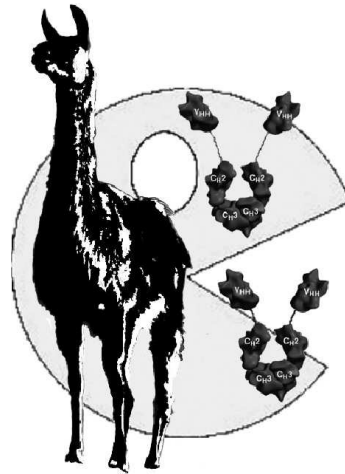


**Isolierung und Charakterisierung von
inhibitorischen Einzeldomänen-Antikörpern
aus dem Lama (*Lama glama* L., 1758) gegen die
T-Zell-Ekto-ADP-Ribosyltransferase 2.2
der Maus (*Mus musculus* L., 1758)**



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

vorgelegt von
Jan Reyelt
aus Hamburg

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. med. F. NOLTE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 22. Februar 2008

Hamburg, den 08. Februar 2008



Jörg Ganzhorn
Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation an der Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Department Biologie, wurde in der Zeit von Januar 2004 bis Januar 2008 unter der Anleitung von Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durchgeführt. Versuche an Wirbeltieren wurden unter der Genehmigung Nr. 19/04 durchgeführt. Gentechnische Experimente wurden in den behördlich registrierten Laboren des Institutes durchgeführt.

Ermöglicht wurde diese Arbeit durch die finanzielle Unterstützung der deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (DFG/BMZ No310/4-1, No310/5-1).

Erstgutachter:

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte
Institut für Immunologie
Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Udo Wienand
Biozentrum Grindel
Universität Hamburg

Tag der Disputation: 22.02.2008

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Publikationen in Fachzeitschriften

KOCH-NOLTE, F., REYELT, J., SCHOSSOW, B., SCHWARZ, N., SCHEUPLEIN, F., ROTHENBURG, S., HAAG, F., ALZOGARAY, V., CAUERHFF, A. & GOLDBAUM, F. A. (2007). Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *Faseb J* **21**, 3490-3498.

Kongressbeiträge - publizierte Posterbeiträge

REYELT, J., HAAG, F., GOLDBAUM, F. A. & KOCH-NOLTE, F. (2005): Blocking the active site crevice of mono-ADP-ribosyltransferase with llama heavy-chain antibodies. (30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference 2005, Budapest) *The Febs Journal*, **272** Suppl. 1: S. 18.

REYELT, J., BRAASCH, F., SCHOSSOW, B., ALZOGARAY, V., GOLDBAUM, F. A., HAAG F. & KOCH-NOLTE, F. (2005). Harnessing the long CDR3 and high stability of single chain llama antibodies to develop novel immunomodulators: potent new inhibitors of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2 as proof of principle. (36th Annual Meeting of the DGfI German Society of Immunology 2005, Kiel)

REYELT, J., SCHEUPLEIN, F., BRAASCH, F., ALZOGARAY, V., GOLDBAUM, F. A., HAAG F. & KOCH-NOLTE, F. (2006). Utilizing the long CDR3 and high stability of single chain antibodies to develop novel immunomodulators: *in vivo* inhibition of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2 on mouse T-lymphocytes. (CHI's 2nd annual PEGS: Protein Engeneering Summit 2006, Boston)

Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung	8
2	Einleitung	9
2.1	Die humorale Immunantwort	9
2.1.1	Die Wirkweise von Antikörpern	9
2.1.2	Aktivierung von B-Lymphozyten	10
2.1.3	Konventionelle Antikörper	13
2.1.4	Kameliden Schwere-Ketten-Antikörper	17
2.2	ADP-Ribosyltransferasen	22
2.2.1	Die enzymatische ADP-Ribosylierung	22
2.2.2	ADP-ribosylierende bakterielle Toxine	24
2.2.3	ADP-Ribosylierung durch eukaryotische ARTs.....	26
2.2.4	Konservierte Strukturen der ART-Proteine	27
2.2.5	Die ART2 und ihre Funktionen auf T-Lymphozyten	27
2.2.6	Untersuchungssysteme für die mART2.2-Aktivität	30
2.2.6.1	Enzymatischen Aktivität der mART2.2 auf T-Zellen der Maus.....	30
2.2.6.2	Zytotoxische Aktivität der mART2.2 auf T-Zellen der Maus im NICD	32
2.2.6.3	³² P-ADP-Ribosylierung von Agmatin durch mART2.2	35
2.3	Phagen-Display-Technologie.....	36
2.3.1	Selektionsmethoden	39
3	Material	41
3.1	Laborgeräte	41
3.2	Verbrauchsmittel.....	42
3.3	Chemikalien, Wasser und radioaktive Substanzen	42
3.4	Medien	43
3.5	Lösungen und Puffer.....	44
3.6	Oligonukleotide.....	45
3.6.1	Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation des VHH-Repertoires.....	45
3.6.2	Oligonukleotide für die Sequenzierung	45
3.7	Antikörper	46
3.8	Enzyme	46
3.9	Bakterienstämme.....	46
3.10	Vektoren.....	47
3.11	Mausstämme	47
3.12	DC27.10-Lymphomzelllinien	48
3.13	Lama „Matahari“	48
4	Methoden	49
4.1	Molekularbiologische Methoden I.....	49
4.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	49

4.1.2	Kryokonservierung von Bakterienkulturen.....	49
4.1.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	49
4.1.4	Arbeiten mit DNA.....	50
4.1.4.1	Präparation von Plasmid-DNA	50
4.1.4.2	Quantifizierung von DNA.....	50
4.1.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
4.1.4.4	Zielgerichtete PCR-Mutagenese	51
4.1.4.5	Restriktionsverdau von DNA.....	52
4.1.4.6	Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Proben.....	53
4.1.4.7	DNA-Standard	53
4.1.4.8	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	53
4.1.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten	53
4.1.4.10	Sequenzanalyse von DNA	54
4.1.5	Phagen-Display-Technologie.....	54
4.1.5.1	Konstruktion von Phagen Display-Bibliotheken	54
4.1.5.2	Festphasen- <i>Panning</i> mit mART2.2-HF-Protein	55
4.1.5.3	<i>Panning</i> an DC27.10_mART2.2-Lymphomzellen	56
4.2	Zellbiologische Methoden	57
4.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	57
4.2.2	Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten der Maus	57
4.2.3	Depletion von B-Zellen.....	58
4.2.4	Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.....	59
4.3	Immunologische Methoden I	59
4.3.1	Immunisierung von Lama „Matahari“	59
4.3.2	Blutabnahmen am Lama	61
4.3.3	Präparation von Präimmunsereen und Immunsereen	61
4.3.4	Aufreinigung von Immunglobulinen aus Serumproben	62
4.3.5	Isolierung von Leukozyten aus Vollblut.....	63
4.4	Molekularbiologische Methoden II.....	63
4.4.1	Arbeiten mit RNA.....	63
4.4.1.1	Präparation von gesamt-RNA aus Leukozyten.....	63
4.4.1.2	DNase I (RNase-frei)-Behandlung von gesamt-RNA-Präparationen.....	64
4.4.1.3	Quantifizierung von RNA.....	64
4.4.1.4	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	64
4.4.1.5	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	65
4.5	Immunologische Methoden II.....	66
4.5.1	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	66
4.5.2	Anfärbung von Zellen mit Antikörpern und Annexin V	67
4.5.3	Untersuchung der mART2.2-Aktivität	67
4.5.3.1	Enzymatische Aktivität nativer, membranständiger mART2.2.....	67
4.5.3.2	Zytotoxische Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 im NICD	69
4.5.3.3	³² P-ADP-Ribosylierung von Agmatin durch mART2.2	70
4.5.3.4	Dünnschichtchromatographie-Autoradiographie-Analyse	71

4.6	Proteinbiochemische Methoden.....	72
4.6.1	Periplasmalysat von <i>E. coli</i>	72
4.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Protein	73
4.6.3	Coomassie-Anfärbung von Proteinen nach Gelelektrophorese	73
4.6.4	Silberfärbung von Proteinen nach Gelelektrophorese	73
4.6.5	Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC).....	74
4.6.6	M2-Agarose-Affinitätschromatographie.....	74
4.6.7	Quantifizierung von Protein.....	75
4.6.8	Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)	75
5	Ergebnisse	77
5.1	Isolierung und Charakterisierung von vier mART2.2-spezifischen Lama Einzeldomänen-Antikörpern (VHHs) aus Phagen-Display-Bibliotheken eines immunisierten Lamas.....	78
5.1.1	Induktion von mART2.2-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörpern durch kombinierte DNA-/Protein-Immunisierung.....	78
5.1.2	Charakterisierung der Primärbibliotheken.....	79
5.1.3	Analyse der CDR3-Längen von VHHs.....	82
5.1.4	Expressionstest mit zufällig ausgewählten Klonen der Primärbibliotheken.....	83
5.1.5	Selektion und Sequenzanalyse von mART2.2-spezifischen VHHs aus Phagen- Display-Bibliotheken (10. Tag nach 10. Immunisierung)	84
5.1.6	Rekombinante Produktion selektierter VHH-Domänen in <i>E. coli</i>	86
5.1.7	Affinitätsanalyse der selektierten Einzeldomänen-Antikörper	87
5.1.8	Reaktivität der selektierten Einzeldomänen-Antikörper mit mART2.2, mART2.1 und mART1	88
5.1.9	Reaktivität der selektierten VHHs mit mART2.2/rART2.2- und rART2.2/mART2.2-Chimären.....	89
5.1.10	Blockade der enzymatischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 <i>in vitro</i>	91
5.1.11	Blockade der zytotoxischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 <i>in vitro</i>	92
5.1.12	Blockade der ³² P-ADP-Ribosylierung von Agmatin durch rekombinante, lösliche mART2.2 <i>in vitro</i>	93
5.1.13	Blockade der enzymatischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 <i>in vivo</i>	95
5.1.14	Blockade der zytotoxischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 <i>in vivo</i>	96
5.2	Isolierung von Varianten der mART2.2-spezifischen VHHs aus einer neuen Phagen-Display-Bibliothek nach erneuter Immunisierung des Lamas (2.5 Jahre später).....	98
5.2.1	Charakterisierung der Primärbibliothek.....	98
5.2.2	Sequenzvergleich der Mitglieder von Familien.....	102

5.3	Rekombinante Großproduktion von VHHs und mART2.2 in <i>E. coli</i> sowie Prozesse der Proteinaufreinigung mit dem Ziel der Kristallisierung eines Komplexes aus VHH und ART	108
5.3.1	Rekombinante Großproduktion und Aufreinigung von VHH JR0345_s+16a	108
5.3.2	Rekombinante Großproduktion und Aufreinigung von mART2.2.....	109
5.3.3	Methoden zur Herstellung von Proteinkomplexen aus rekombinanter VHH und mART2.2	109
5.3.3.1	Präparation des Antikörper-Antigen-Komplexes durch Koinkubation von ART und VHH in aufgereinigter Form (Strategie 1).....	111
5.3.3.2	Koaufrreinigung und Präparation von ART und VHH als Antikörper-Antigen-Komplex (Strategie 2).....	113
5.3.3.3	Erzeugung der VHH JR0345_s+16a ohne Epitop-Markierungen	115
5.3.4	Kristallographische Vorversuche.....	115
6	Diskussion.....	117
6.1	Die Verwendung von Immuno-Bibliotheken erhöht die Wahrscheinlichkeit, inhibitorische Einzelketten-Antikörper aufzufinden.....	117
6.2	Vorzüge von Einzeldomänen-Antikörpern gegenüber inhibitorischen Molekülen und konventionellen Antikörpern	119
6.3	Steigerung der Serum-Halbwertszeit der VHH.....	121
6.4	Somatische Mutationen und Subklassenwechsel im Rahmen einer Auffrischungsimpfimmunisierung	122
6.5	Aufklärung der molekularen Mechanismen der Inhibition von mART2.2 durch Epitopkartierung und Co-Kristallisation von mART2.2 und Einzeldomänen-Antikörper	124
6.6	Ausblick	128
7	Zusammenfassung.....	129
7.1	Abstract	130
8	Literatur.....	131
9	Anhang.....	140
9.1	Taxonomie der Artiodactyla (Paarhufer).....	140
9.2	3D-Modellierung der mART2.2-Struktur	141
9.3	Plasmidkarten.....	144
9.4	Abkürzungsverzeichnis.....	147
10	Danksagung.....	149

1 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung eines Einzeldomänen-Antikörpers, der die enzymatische Aktivität der ADP-Ribosyltransferase 2.2 der Maus (mART2.2) inhibiert. Die mART2.2 ist ein in der Membran von T-Lymphozyten verankertes Toxin-verwandtes Ekto-Enzym, das die Übertragung des ADP-Riboseanteils von NAD^+ auf Zelloberflächenproteine katalysiert. mART2.2 induziert die Apoptose von T-Zellen durch Aktivierung des zytolytischen P2X_7 -Purinorezeptors durch ADP-Ribosylierung. Die variable Domäne (*variable domaine of the heavy-chains of heavy-chain-only antibodies*, VHH) von kameliden-typischen Schwere-Ketten-Antikörpern stellt die kleinste bekannte physiologische Antigen-bindende Einheit dar, die im Zuge einer adaptiven Immunantwort generiert wird. Die oft sehr lange CDR3 versetzt diese Einzeldomänen-Antikörper in die Lage, in Spalten und Vertiefungen des Antigens einzudringen. So können zum Beispiel die aktiven Zentren von Enzymen durch VHHs blockiert werden.

Zur Herstellung von mART2.2-inhibierenden Schwere-Ketten-Antikörpern war bereits ein Lama (*Lama glama*) genetisch und mit mART2.2-Protein immunisiert worden. Aus einer Blutprobe dieses Tieres sollten Phagen-Display-Bibliotheken generiert werden, die das VHH-Repertoire der B-Zellen repräsentieren. Aus diesen sollten mART2.2-spezifische Einzeldomänen-Antikörper selektiert, rekombinant exprimiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, mART2.2 *in vitro* und *in vivo* zu inhibieren, charakterisiert werden.

2 Einleitung

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die Mechanismen gegeben, die in höheren Organismen und somit auch in Lamas im Verlauf der humoralen Immunantwort zur Bildung von hoch spezifischen und hoch affinen Antikörpern führen (Abschnitte 2.1.1 bis 2.1.3). Die Besonderheiten der von Kameliden gebildeten Schwere-Ketten-Antikörper werden in Abschnitt 2.1.4 erläutert. Die Rolle von ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) und der ADP-Ribosylierung als posttranslationale Proteinmodifikation werden in Abschnitt 2.2 erläutert. Dabei wird insbesondere auf die ART2.2 der Maus und ihre Bedeutung für die Apoptose von T-Lymphozyten eingegangen (Abschnitt 2.2.5 und 2.2.6). Im Abschnitt 2.3 wird die Phagen-Display-Technologie vorgestellt, die für die Selektion der mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörper genutzt wurde.

2.1 Die humorale Immunantwort

2.1.1 Die Wirkweise von Antikörpern

Die Hauptaufgabe der humoralen Immunantwort ist es, in den extrazellulären Flüssigkeiten des Körpers Pathogene zu zerstören und die Verbreitung von intrazellulären Infektionen zu verhindern. Dies wird durch Antikörper erreicht, die von aktivierten B-Lymphozyten, sogenannten Plasmazellen, sezerniert werden. Antikörper können auf drei Weisen wirken. Viren und intrazelluläre Bakterien müssen an spezifische Oberflächenmoleküle der Wirtszelle binden, um in diese eindringen zu können. Durch Bindung der Antikörper an das Pathogen kann dieses Eindringen unterbunden werden. Sie neutralisieren das Pathogen. Durch Neutralisierung erfolgt auch der Antikörper-vermittelte Schutz vor Toxinen. Vor extrazellulären Mikroorganismen schützen Antikörper hauptsächlich, indem sie deren Phagozytose durch phagozytische Zellen erleichtern. Dabei wird das Pathogen mit Antikörpern beschichtet (opsoniert), während die F_c -Anteile mit spezifischen F_c -Rezeptoren auf der Oberfläche z. B. eines Makrophagen interagieren können. Der dritte Weg, auf dem Antikörper Pathogene bekämpfen können, ist die Aktivierung des Komplementsystems. Diese erfolgt nach Bindung an die Oberfläche eines

Erregers ebenfalls über den F_c -Anteil und kann zur direkten Lyse der Mikroorganismen führen (JANEWAY, 2005).

2.1.2 Aktivierung von B-Lymphozyten

Um eine ruhende B-Zelle zu aktivieren bedarf es zweier spezifischer Signale (Abb. 2.1). Den ersten hierzu nötigen Impuls stellt das Zusammentreffen der B-Zellen mit dem für sie spezifischen Antigen dar. Dieser Kontakt erfolgt über den B-Zell-Rezeptor, ein oberflächenverankertes Immunglobulin, an welches das Antigen fest bindet und in das Zellinnere aufgenommen wird. Nach dem proteolytischen Verdau werden schließlich Fragmente des Antigens auf Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) des Typs II geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert.

Dieser Vorgang ist der gleiche wie bei den Antigen präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, Antigen-präsentierende Zellen, APZs) des angeborenen Immunsystems (ADEREM & UNDERHILL, 1999). Schließlich wandert eine solche APZ in ein peripheres lymphatisches Organ (z. B. einen Lymphknoten) ein. Mit dem Blutstrom und der Lymphe werden dort permanent T-Lymphozyten an den auf den APZs präsentierten Antigenen vorbei gespült. Erkennt dabei eine naive $CD4^+$ T_H0 -Zelle über ihren T-Zellrezeptor (TCR) ein solches Antigen (GARCIA *et al.*, 1999), so erfolgt unter dem Einfluss von Interleukin 4 (IL-4) die Differenzierung in eine T_H2 -Zelle (T-Helferzelle).

Für die vollständige Aktivierung der oben beschriebenen B-Zelle ist eine Stimulation durch eine T-Helferzelle notwendig. Auch B-Zellen werden mit dem Blutstrom in den Lymphknoten eingespült, so dass sich beide Zelltypen im Lymphknoten begegnen. Wird dabei ein spezifischer Kontakt zwischen dem TCR der T-Helferzelle und dem MHC-Klasse-II:Peptid-Komplex der B-Zelle hergestellt, stellt dies das zweite Reifungssignal dar.

Die Bindung des Peptidantigens an den B-Zellrezeptor stellt daher zum einen ein immunspezifisches Signal für die B-Zelle dar (Signal 1), zum anderen sorgt es für die Antigen-spezifische T-Zell-Hilfe (Signal 2). Dabei ist das Epitop, das von der T-Helferzelle erkannt wird, in der Regel nicht identisch mit dem, das die B-Zelle anspricht, jedoch physisch mit diesem gekoppelt (*linked recognition*).

Dem initialen Kontakt über MHC und TCR folgt die Bindung des CD40-Liganden (CD40L) der T_H2 -Zelle an CD40 auf der B-Zelle. Die Ausschüttung von IL-4 durch die

T_H2 -Zelle induziert die klonale Expansion der B-Zelle. Diese führt zu einer relativen Anreicherung von B-Zellen, deren Immunglobulingene in gleicher Weise umgelagert sind und dieselbe Spezifität aufweisen. Die Interleukine IL-5 und IL-6 induzieren schließlich die Differenzierung der B-Zellen zu Antikörper sezernierenden Lymphoblasten, die eine erste sezernierte Form des Antigen-spezifischen Antikörpers exprimieren, das pentamere IgM. Während diese in die Markstränge wandern, bilden andere Zellen sogenannte Keimzentren innerhalb des lymphatischen Organs, die auch als primäre Zentren bezeichnet werden. Ungerichtete Veränderungen in der Sequenz der V-Regionen funktioneller Antikörper, sogenannte somatische Hypermutationen, führen in dieser Phase zu alterierten Affinitäten der modifizierten Antigenbindungsstellen. Indem bevorzugt solche B-Zellen zur weiteren Proliferation stimuliert werden, deren B-Zellrezeptor eine gleichbleibende oder verstärkte Affinität aufweisen, werden hoch affine Klone selektiert. Dieser Vorgang wird als Affinitätsreifung bezeichnet. Anschließend differenzieren die B-Zellen entweder zu Plasmazellen, die große Antikörpermengen vom IgG-Typ freisetzen, oder zu langlebigen Gedächtniszellen. Diese verlassen den Lymphknoten und können danach in den Marksträngen, im roten Mark der Milz und vor allem im Knochenmark angetroffen werden.

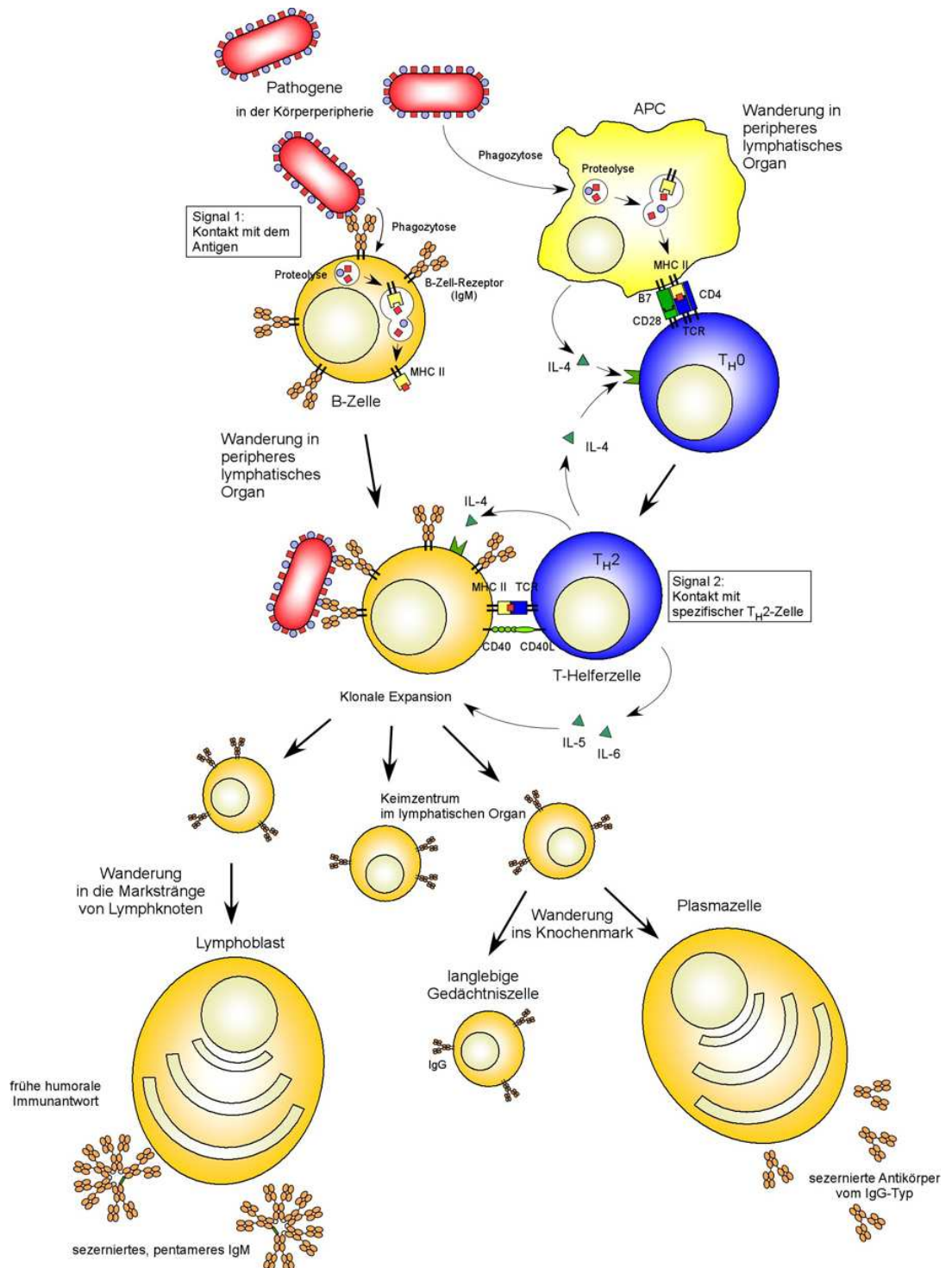


Abb. 2.1: Schema der B-Zellaktivierung. Eine ruhende B-Zelle benötigt zwei spezifische Stimuli, um in eine Antikörper sezernierende Plasmazelle differenzieren zu können. Das erste Signal ist der Kontakt des B-Zell-Rezeptors mit seinem Antigen. Den zweiten Impuls bekommt die B-Zelle von einer T-Helferzelle, deren T-Zell-Rezeptor spezifisch für das von der B-Zelle auf einem MHC-Klasse-II-Molekül präsentierte Peptidfragment ist. Nach einer klonalen Expansionsphase, die im peripheren lymphatischen Organ zur Bildung sogenannter Keimzentren führt, differenzieren einige Zellen zu IgM-sezernierenden Lymphoblasten. Dieser frühen humoralen Immunantwort folgt die Differenzierung gereifter B-Zellen zu Plasmazellen, die große Antikörpermengen vom IgG-Typ freisetzen. Diese verlassen das lymphatische Organ und wandern bis ins Knochenmark, wo sie sich einnisten. (Nach JANEWAY, 2005, modifiziert)

2.1.3 Konventionelle Antikörper

Antikörper sind lösliche Proteine, die zur Klasse der Immunglobuline (Ig) gehören (HARLOW & LANE, 1999). Sie sind Träger der humoralen, adaptiven Immunantwort und können im Blut und anderen Körperflüssigkeiten der Vertebraten gefunden werden, wo sie zur Erkennung von Pathogenen, Fremdproteinen und anderen fremden Molekülen fähig sind, die als Antigene bezeichnet werden. Antikörper werden von aktivierten B-Zellen, Lymphoblasten und Plasmazellen, generiert. Die meisten Säugetiere exprimieren fünf verschiedene Isotypen von Antikörpern, die als IgG, IgA, IgE, IgM und IgD bezeichnet werden. Im Folgenden wird näher auf das Immunglobulin G eingegangen, das den im Serum am stärksten vertretenen Isotyp darstellt.

Ein Antikörper vom IgG-Isotyp ist ein Y-förmiges Protein, das sich aus vier Polypeptidketten zusammenfügt und ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa aufweist (Abb. 2.2). Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen leichten Ketten (*light chains*, L) und zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*, H) (H_2L_2). Diese Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bestehen jeweils aus mehreren globulären

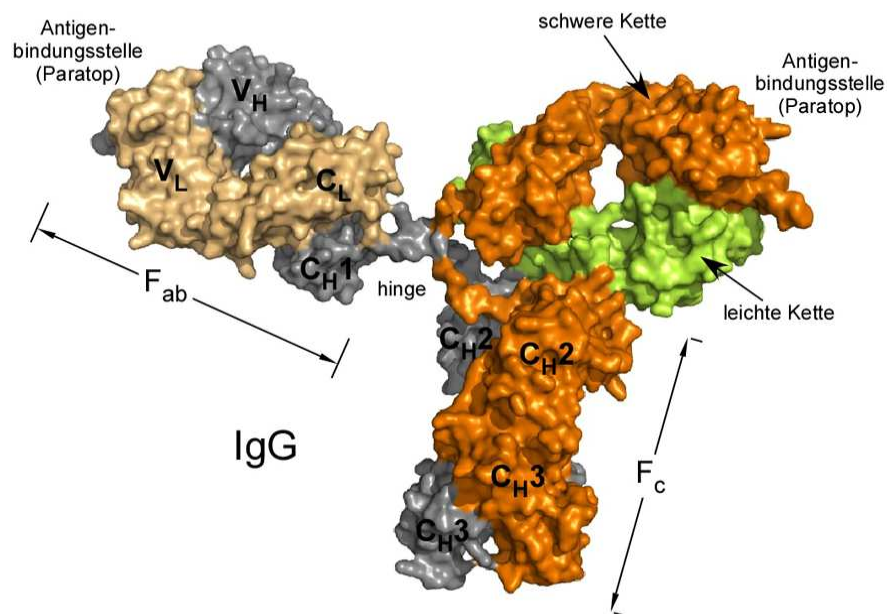


Abb. 2.2: 3D-Struktur eines humanen IgG. Ein Immunglobulin des G-Isotyps besteht aus zwei schweren Ketten (grau und rotbraun) und zwei leichten Ketten (hellbraun und grün) und besitzt eine Y-Form. Das F_c -Fragment bildet den Rumpf dieses Ypsilon. Die zwei Antigen-Bindungsstellen befinden sich an den Enden der F_{ab} -Fragmente, die über flexible Gelenkregionen (*hinges*) mit dem F_c -Teil verbunden sind. (pdb-code: 1HZH, human IgG anti HIV-1, nach SAPHIRE *et al.*, 2001)

Proteinabschnitten, sogenannte Domänen. Die Aminosäuresequenz der konstanten Domänen (C-Domänen) ist innerhalb einer Gruppe von Antikörpern des gleichen Isotyps identisch, während die Sequenz der variablen Domänen (V-Domänen) sehr unterschiedlich sein kann.

Die schwere Kette besteht aus vier globulären Domänen, einer variablen (V_H) und drei konstanten Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), wohingegen die leichte Kette aus nur zwei Domänen besteht, einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne. Ein flexibler Abschnitt der Polypeptidkette, der als Gelenk-Region oder auch *hinge region* bezeichnet wird, befindet sich zwischen der ersten und der zweiten konstanten Domäne der schweren Kette. Die zwei schweren Ketten eines Antikörpers sind in dieser *hinge region* über eine oder mehrere Disulfidbrücken miteinander verbunden. Beide C_{H2} -Domänen sind beim IgG-Isotyp durch kovalente Bindung eines Oligosaccharides modifiziert. Der Rumpf des Y-förmigen Immunglobulins wird als F_c -Fragment bezeichnet („*crystallizable*“) und wird aus den beiden C_{H2} - und C_{H3} -Domänen der verbundenen schweren Ketten gebildet. Der F_c -Teil vermittelt Effektorfunktionen des Antikörpers, wie z. B. die Interaktion mit Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen und anderen Zellen (F_c -Rezeptoren) oder mit Komponenten des Komplementsystems (Bindung des Komplement-Faktors C1).

Die zwei „Arme“ des Antikörpers, auch als F_{ab} -Fragmente („*antigen binding*“) bezeichnet (Abb. 2.3), setzen sich jeweils aus der C_{H1} - und der V_H -Domäne einer schweren Kette und der C_L - und V_L -Domäne einer leichten Kette zusammen. Eine Disulfidbrücke verknüpft die C_{H1} - mit der C_L -Domäne, wohingegen die variablen

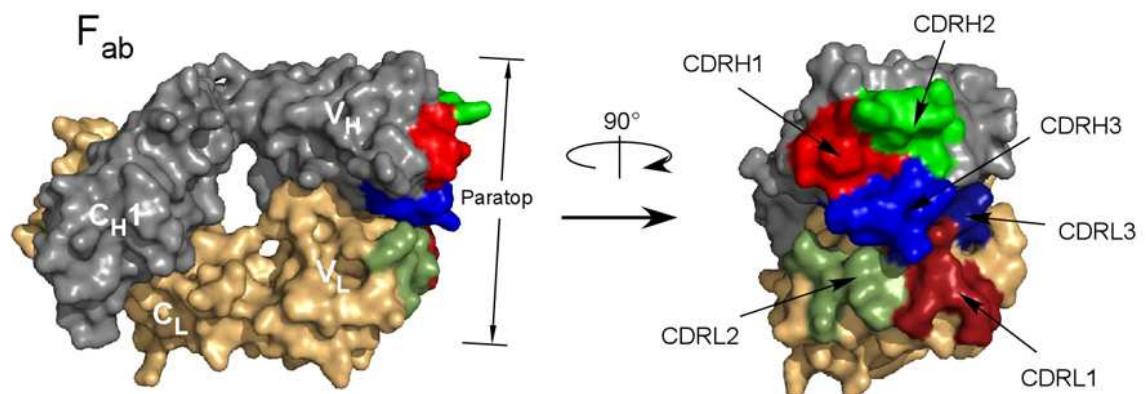


Abb. 2.3: Ein F_{ab} -Fragment konventioneller Antikörper bildet ein Paratop aus sechs CDRs. An der Bildung der Antigen-Bindungsstelle, des Paratopes, sind sowohl Anteile der V_H - als auch der V_L -Domänen beteiligt. Hierbei lagern sich die drei *complementarity determining regions* (CDRs) jeder dieser Domänen am auswärtigen Pol des F_{ab} -Fragmentes zusammen. (pdb-code: 1HZH, human IgG anti HIV-1, nach SAPHIRE *et al.*, 2001, modifiziert)

Domänen V_H und V_L über hydrophobe Interaktionen in Verbindung treten. Die Spitzen dieser variablen Domäne formen gemeinsam eine Antigen-Bindungsstelle, das Paratop. Ein natürliches IgG-Protein verfügt daher über zwei Paratope - es ist bivalent.

Die Domänen des Antikörpers bilden eine charakteristische Sekundärstruktur aus und gehören zur Struktursuperfamilie der Immunglobuline (Abb. 2.4). Jede globuläre Domäne ist aus 7 bis 10 anti-parallel angeordneten β -Strängen zusammengesetzt, die zwei β -Faltblätter ausbilden, die über eine die Struktur stabilisierende Disulfidbrücke

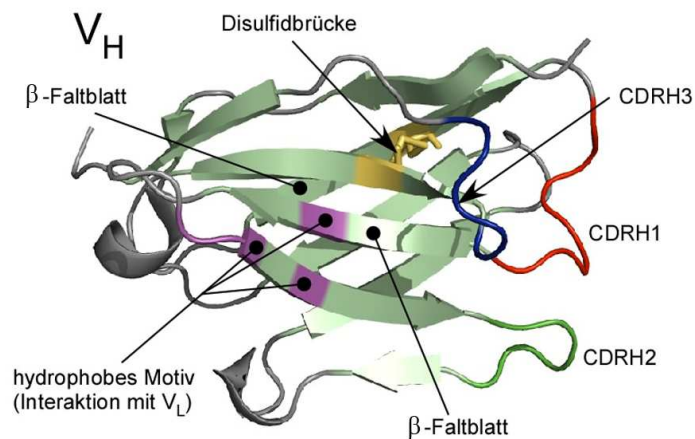


Abb. 2.4: Struktur eines Immunglobulins. Mitglieder der Immunglobulins Superfamilie besitzen zwei β -Faltblätter aus antiparallelen β -Strängen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Proteinschleifen am auswärtigen Pol bilden die CDRs. (pdb-code: 1IC4, V_H of Mouse IgG1 F_{ab} HYHEL-10 anti HEWL, nach SHIROISHI *et al.*, 2001, modifiziert)

miteinander verbunden sind. Drei Proteinschleifen, die am auswärts gerichteten Pol einer V-Domäne die β -Stränge miteinander verbinden, zeichnen sich durch eine hypervariable Aminosäuresequenz aus. Da sie an der Bildung der Antigen-Bindungsstelle beteiligt sind werden sie auch als *complementary determining regions* (CDRs) 1, 2 und 3 bezeichnet. In einem IgG wirken zwei V-Domänen, V_H und V_L , an der Formierung des Paratopes mit, so dass insgesamt sechs CDRs gemeinsam das Paratop bilden. Die CDRs werden dann wie folgt benannt: CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3 (Abb. 2.3). Die Regionen zwischen den CDRs, die sogenannten Zwischenraum-Abschnitte (*framework regions*, FRs), weisen eine höhere Konserviertheit auf. Die Gesamtheit der FRs einer V-Domäne, ohne Berücksichtigung der CDRs, wird häufig auch als Rahmenwerk oder Gerüst (*scaffold*) bezeichnet. Die CDRH3 ist das veränderlichste Element dieser Strukturen. Sie wird durch einen DNA-Abschnitt kodiert, der während der B-Zell-Entwicklung besonders umfassende Modifikationen erfährt. Sie hat durchschnittlich eine Länge von neun Aminosäuren bei der Maus und zwölf beim Menschen (WU *et al.*, 1993).

In den FR2-Regionen der variablen Domänen beider schwerer Ketten, zwischen CDRH1 und CDRH2, nehmen einige hydrophobe Aminosäuren Schlüsselpositionen ein (Pos. 37, 44, 45 und 47, Nomenklatur nach (KABAT *et al.*, 1991)), die für eine hydrophobe Interaktion zwischen beiden Domänen verantwortlich sind.

Die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen basiert auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken-Bindungen, van-der-Waals-Kräften und Salzbrücken. Der Schlüssel für die Vielfalt und Verschiedenartigkeit der auf diese Weise erkannten Antigenstrukturen liegt in der großen Variabilität der CDRs, sowohl der leichten als auch der schweren Kette. Man schätzt, dass in jedem Menschen etwa 10^9 unterschiedliche Antikörpervarianten vorkommen. Generiert wird diese immense Diversität an Antikörpern vor allem durch Rekombination von Gensegmenten während der B-Zell-Entwicklung („*rearrangement*“) (BERG *et al.*, 2002).

Die V-Region der leichten Kette wird von zwei Gensegmenten kodiert: dem V (*variable*)-Gensegment und dem J (*joining*)-Segment. Diese zwei bilden gemeinsam ein komplettes V-Region-Exon und werden durch somatische Rekombination der DNA zusammengelagert. Die C-Region der leichten Kette wird in einem separaten Exon kodiert, das erst durch Spleißen des Transkriptes mit den V-J-Segmenten vereinigt wird. Das menschliche Genom kodiert für zwei leichte Ketten, die nach den jeweiligen Genloci als λ -Ketten und κ -Ketten bezeichnet werden (JANEWAY, 2005).

Die V-Region der schweren Kette wird durch insgesamt drei Gensegmente kodiert. Zusätzlich zu den V- und J-Gensegmenten kommt ein drittes, das sogenannte D (*diversity*)-Segment hinzu. Durch somatische Rekombination wird zunächst ein D-J-Segment gebildet, das im konventionellen Antikörper die CDRH3, im Schwere-Ketten-Antikörper die CDR3 kodiert. Später lagert sich diesem das V-Segment an, so dass ein gemeinsames Exon gebildet wird. Bei der Zusammenlagerung dieser Gensegmente erhöht sich die Variabilität dieses Elementes noch durch das Hinzufügen und die Deletion von Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen, katalysiert durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT). Wie bei der leichten Kette kommen V-D-J-Exon und die Exons der C-Regionen erst durch das RNA-Spleißen in unmittelbare Nachbarschaft zueinander. Da es multiple Kopien von V-, D- und J-Gensegmenten in der Keimbahn-DNA gibt, kann durch freie Rekombination je einer dieser Elemente eine enorme Vielfalt von Immunglobulinen unterschiedlicher Spezifität ausgebildet werden. Der Genlocus der

schweren Ketten enthält eine große Zahl distinkter Gruppen von C-Gensegmenten, deren Nutzung zur Bildung verschiedener Isotypformen führt.

Die Immunglobulingene des Menschen befinden sich in drei Genloci, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Der Genlocus für die leichte λ -Kette enthält 29 funktionelle V_λ -Gensegmente sowie vier Paare von funktionellen J_λ -Gensegmenten und C_λ -Genen. Der κ -Locus weist 40 funktionelle V_κ -Gensegmente sowie einen Cluster von fünf J_κ -Segmenten, aber nur ein einziges C_κ -Gen auf. Der Locus für die schwere Kette besitzt 51 funktionelle V_H -Gensegmente, einen Cluster von etwa 27 D_H -Segmenten, gefolgt von sechs J_H -Gensegmenten. Der sich anschließende Cluster von C_H -Genen umfasst neun funktionelle Segmente: C_δ , C_μ , $C_{\gamma 1-4}$, $C_{\alpha 1-2}$ und C_ϵ . (JANEWAY, 2005). Umstrukturierungsprozesse innerhalb dieser Genabschnitte werden als Klassenwechsel bezeichnet und erfolgen, reguliert durch T_H2 -Zytokine, während der Reifung der Zelle.

2.1.4 Kameliden Schwere-Ketten-Antikörper

Zu den rezenten Vertretern der *Camelidae* gehören als sogenannte Altwelt-Kameliden Kamele (*Camelus bactrianus*) und Dromedare (*Camelus dromedarius*). In der „Neuen Welt“ sind die Kameliden durch Lamas (*Lama glama*), Guanacos (*Lama guanicoe*), Alpacas (*Lama pacos*) und Vicunias (*Vicugna vicugna*) vertreten. Der heute ausgestorbene gemeinsame Vorfahre dieser Familie lebte vor einigen 100.000 Jahren im heutigen Nordamerika. Der Verbreitungsraum der zweihöckrigen Kamele (Trampeltiere) erstreckt sich heute über weite Teile Zentralasiens bis hin zum Kaspischen Meer. Dromedare sind in ganz Nordafrika und im vorderen Orient anzutreffen. Eine Überlappung beider Verbreitungsräume gibt es in Kleinasien. Ihre Lebensräume sind Steppen, Halbwüsten und Wüsten. Die Neuweltkameliden kommen zumeist in den höher gelegenen Bergregionen der Anden vor, wo sie trockene, offene Landstriche bis in eine Höhe von über 5000 Metern bewohnen. Sowohl Altwelt- als auch Neuwelt-Kameliden wurden als Nutztiere vom Menschen in Gebiete mitgeführt, die nicht zu ihrem ursprünglichen Verbreitungsgebiet gehörten. So kann man die größte heute noch frei lebende Dromedarpopulation in Australien antreffen, die auf entlaufene, zuvor als Lasttiere eingesetzte Gründertiere zurückgeht.

Die Mitglieder der Familie der *Camelidae* verfügen neben den konventionellen über eine weitere Art von Antikörpern, sogenannte Schwere-Ketten-Antikörper (*heavy chain only antibodies*, HcAbs) (Abb. 2.5). Diese besitzen keine leichten Ketten und den schweren Ketten fehlt die C_{H1} -Domäne (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993; SHIROISHI *et al.*, 2001). Sie können bis zu 45% der im Blut zirkulierenden Immunglobuline eines Lamas ausmachen (VAN DER LINDEN *et al.*, 2000). Bisher konnten bei keinem anderen Säugetier funktionelle Schwere-Ketten-Antikörper gefunden werden. Diese sind lediglich in nicht funktioneller Form als pathologischer Befund der „Schwere-Ketten-Krankheit“ des Menschen beschrieben worden (SELIGMANN *et al.*, 1979). Antikörper ohne leichte Kette wurden auch beim Ammenhai (*Ginglymostoma cirratum*) (GREENBERG *et al.*, 1995), Wobbegong (*Orectobulus maculatus*) (STRELTSOV *et al.*, 2004) und der Gefleckten Seeratte (*Hydrolagus colliei*) (RAST *et al.*, 1998) entdeckt, wo sie die Bezeichnung „New Antigen-Rezeptor“ (NAR) oder IgH (*Immunoglobulin heavy chain*) erhielten. Diese stellen allerdings evolutionsgeschichtlich eine von den kameliden HcAbs unabhängige Entwicklung dar.

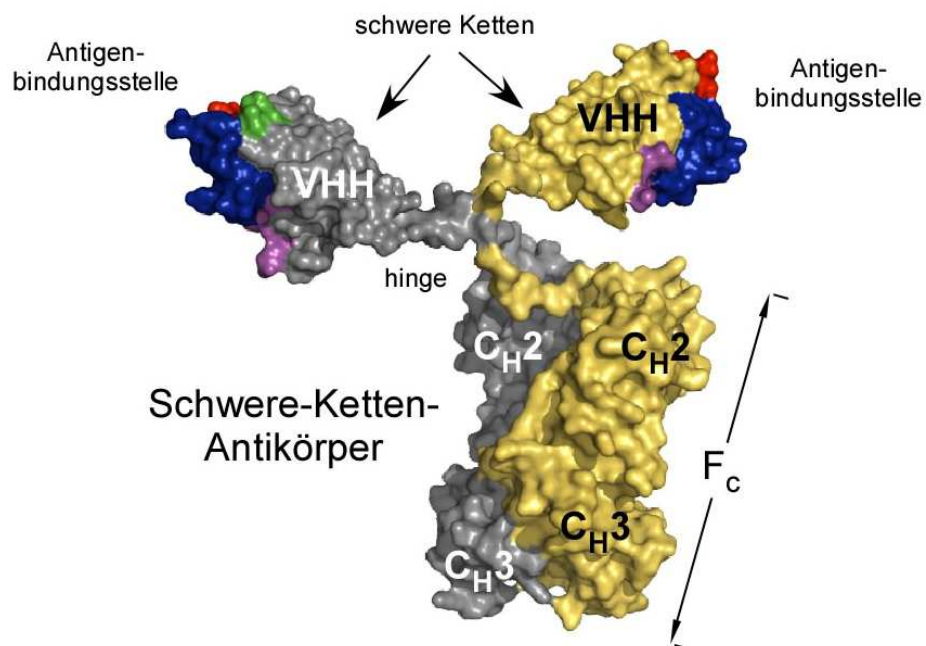


Abb. 2.5: Kameliden Schwere-Ketten-Antikörper. Ein Schwere-Ketten-Antikörper besteht aus nur zwei schweren Ketten, denen die C_{H1} -Domäne fehlt. Die Antigenbindung wird von den sog. VHH-Domänen übernommen. Farblich hervorgehoben sind: rot: CDR1, grün: CDR2, blau: CDR3, pink: hydrophiles Aminosäuremotiv in der FR2. (Computer-Konstruktion basierend auf pdb-code: 1HZH, human IgG anti HIV-1, nach SAPHIRE *et al.*, 2001 und pdb-code: 1MEL, VHH cAbsLys3 anti HEWL, nach DESMYTER *et al.*, 1996)

Die strukturellen Unterschiede zwischen Schwere-Ketten-Antikörpern und konventionellen Antikörpern sind groß: Das beschriebene Fehlen der C_H1-Domäne geht auf eine Mutation zurück, die zum Verlust eines Donor-Spleiß-Signals am 3'-Ende des C_H1-Exons geführt hat (NGUYEN *et al.*, 1999; WOOLVEN *et al.*, 1999). So wird die Information für diese Domäne während des Spleißens aus der RNA entfernt. Der Verlust der C_H1-Domäne wird zugleich auch als der Grund für die Abwesenheit der leichten Kette angenommen, da die einzige kovalente Interaktion zwischen leichter und schwerer Kette, eine Disulfidbrücke, nicht mehr ausgebildet werden kann. Zudem weisen die variablen Domänen, die als VHHs (variable schwere Ketten-Domäne von Schwere-Ketten-Antikörpern; *variable domaine of the heavy chain of heavy chain only antibodies*, Abb. 2.6) bezeichnet werden, Mutationen auf. In der FR2, die in konventionellen Antikörpern den hydrophoben Kontakt mit V_L-Domänen herstellt, tritt eine Reihe hydrophiler Aminosäuresubstitutionen auf (MUYLDERMANS *et al.*, 1994; VU *et al.*, 1997). Diese betreffen die Positionen 37, 44, 45 und 47 (Nomenklatur nach (KABAT *et al.*, 1991). Auf diese Weise wird die Löslichkeit der VHHs erhöht und eine Aggregation verhindert. Eine weitere besondere Eigenschaft der VHHs ist eine lange hypervariable CDR3. Während die Bandbreite von 6-26 Aminosäuren reicht (VU *et al.*, 1997; HARMSSEN *et al.*, 2000) liegt ihre durchschnittliche Länge bei 16 Aminosäuren (KOCH-NOLTE *et al.*, 2007).

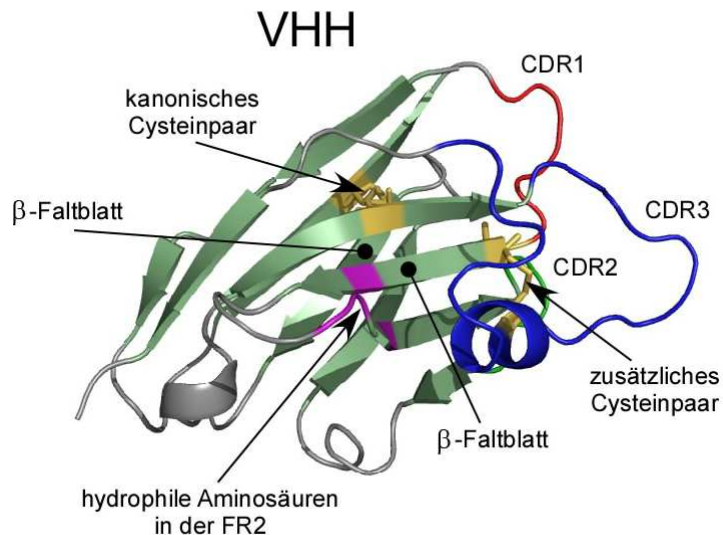


Abb. 2.6: Struktur einer VHH. Als Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie besitzt die VHH zwei β-Faltblätter aus antiparallelen β-Strängen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Proteinschleifen am auswärtigen Pol bilden die CDRs, wobei die CDR3 (blau) oft sehr lang ist. Diese kann, wie hier gezeigt, durch eine zusätzliche Disulfidbrücke stabilisiert werden. In der FR2 findet sich ein hydrophiles Aminosäure-Motiv (pink). (pdb-code: 1MEL, VHH cAbsLys3 anti HEWL, nach DESMYTER *et al.*, 1996, modifiziert.)

Bei der Maus beträgt sie neun, beim Menschen zwölf Aminosäuren (WU *et al.*, 1993). Einige VHHs besitzen eine zusätzliche Disulphidbrücke zwischen CDR1 und CDR3 (meist in Dromedaren) oder CDR2 und CDR3 (meist in Lamas), die vermutlich die Stabilität der langen CDR3 erhöht (VU *et al.*, 1997). Unterstützung erfährt diese Annahme durch die Beobachtung, dass besonders lange CDR3s und zusätzliche Disulphidbrücken häufig gemeinsame Merkmale von VHHs sind (KOCH-NOLTE *et al.*, 2007).

Die VHH-Gensegmente sind inklusive funktionaler Promotorregionen und Rekombinationssignale bereits im Keimbahngenom von Dromedar und Lama anzutreffen (NGUYEN *et al.*, 1998; WOOLVEN *et al.*, 1999; HARMSSEN *et al.*, 2000). So sind die hydrophilen Aminosäuresubstitutionen in der FR2 bereits im Dromedar-Genom enthalten und werden nicht etwa durch somatische Hypermutationsmechanismen in V_H -Gene eingebracht. Auch für ein Cystein in der CDR1 bzw. CDR2, das nach produktiver DNA-Rekombination eine zusätzliche Disulfidbrücke mit einem Cystein in der CDR3 ausbilden kann, kodieren beim Dromedar bzw. Lama bereits die Keimbahn-VHH-Gensegmente. Die im Vergleich mit V_{HS} verlängerte CDR3 der VHHs ist jedoch noch rätselhaft, vor allem, da beide auf ein gemeinsames oder ähnliches Repertoire von D- und J-Segmenten zurückzugreifen scheinen (NGUYEN *et al.*, 2000). Eine mögliche Erklärung für die Verlängerung wäre die Verwendung zweier D-Segmente oder eine verstärkte Aktivität der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase während der VHH-D-J-Rekombination.

Die Schwere-Ketten-Gene der kameliden HcAbs werden durch somatische Rekombination während der B-Zell-Reifung zusammengefügt. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob die VHH-Gensegmente durch denselben Genlocus kodiert werden wie die V_H -Segmente der konventionellen Antikörper. Die VHH-Gensegmente verbinden sich in der Regel nur mit bestimmten γC -Regionen. Beim Lama wurden vier distinkte Subtypen von Schwere-Ketten-Antikörpern beschrieben, die sich in der Länge der *hinge*-Region unterscheiden. Dabei ist die vom $\gamma 3$ -Gen kodierte *hinge*-Region kürzer als die von den $\gamma 2a$ -, $\gamma 2b$ - und $\gamma 2c$ -Genen kodierte (VU *et al.*, 1997; WOOLVEN *et al.*, 1999). Die V_H -Gensegmente verbinden sich mit zwei distinkten γC -Regionen ($\gamma 1a$, $\gamma 1b$).

Die Antigenbindung wird bei kameliden Schwere-Ketten-Antikörpern von den VHH-Domänen übernommen, die sich an jedem N-terminalen Ende einer der beiden schweren Ketten befinden - Schwere-Ketten-Antikörper sind bivalent (Abb. 2.7). Rekombinant produzierte VHHs sind mit einer Größe von 15 kDa die kleinsten bekannten physiologischen Antigen-bindenden Fragmente (MUYLDERMANS *et al.*, 1994). Obwohl es bei diesen Antikörpern keine freie V_H - V_L -Rekombination zur Steigerung der Vielfalt an Paratopen geben kann, bilden sie doch ein sehr umfangreiches Repertoire an Antigenbindern aus. Tatsächlich wird das Fehlen der hypervariablen Regionen der leichten Kette durch die zum Teil extreme Verlängerung der vorhandenen CDRs der VHH, insbesondere der CDR3, kompensiert. Die besondere Ein-Domänen-Struktur in Verbindung mit der ausgeprägten Verlängerung der CDR3 macht die VHHs zudem zu Spezialisten für das Binden in Spalten und Vertiefungen auf dem Protein-Antigen, die konventionellen Antikörpern in der Regel nicht zugänglich sind (Abb.7A) (STIJLEMANS *et al.*, 2004; DE GENST *et al.*, 2006). Schon bald nach ihrer Entdeckung konnten verschiedene Enzym-inhibierende VHHs hergestellt werden, die durch ihre Bindung den Zugang zum aktiven Zentrum blockierten (Abb. 7B) (DESMYTER *et al.*, 1996; LAUWEREYS *et al.*, 1998; TRANSUE *et al.*, 1998; CONRATH *et al.*, 2001). Da auch die ADP-Ribosyltransferase 2.2 der Maus (mART2.2) ein aus einer tiefen Spalte bestehendes Aktives Zentrum aufweist

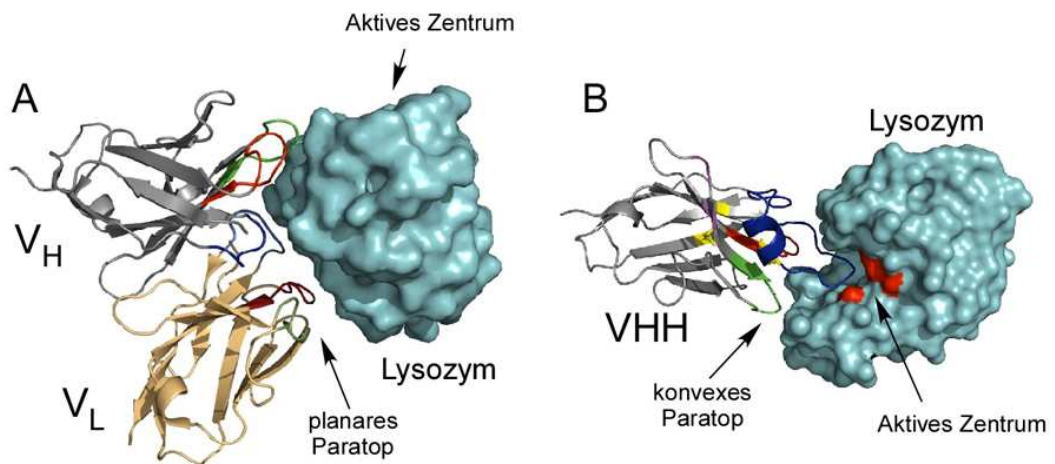


Abb. 2.7: Antigenbindung durch V_H - V_L -Domänen und eine VHH-Domäne. Konventionelle Antikörper, die über Antigenbindungsstellen aus V_H - und V_L -Domänen verfügen (A), bilden in der Mehrzahl planare Paratope aus. Diese binden bevorzugt planare Epitopstrukturen. Die untersuchten VHHs von Schwere-Ketten-Antikörpern (B) formen häufig konvexe Paratope aus, denen vorzugsweise Spalten und Vertiefungen als Epitope dienen. Der hier gezeigte Einzeldomänen-Antikörper cAbsLys3 bindet mit seiner weithervorragenden CDR3 (blau) in einem solchen Epitop und blockiert auf diese Weise das aktive Zentrum (rot) des Hühner-Ei Lysozyms (HEL). (A: pdb-code: 1MEL, VHH cAbsLys3 anti HEL nach DESMYTER *et al.*, 1996; B: pdb-code: 1IC4, Mouse IgG1 F_{ab} HYHEL-10 anti HEL nach SHIROISHI *et al.*, 2001).

(MUELLER-DIECKMANN *et al.*, 2002), wurde zur Herstellung inhibitorischer Antikörper ein Lama mit mART2.2 immunisiert.

2.2 ADP-Ribosyltransferasen

2.2.1 Die enzymatische ADP-Ribosylierung

Die ADP-Ribosylierung ist, wie die Phosphorylierung, eine posttranslationale Modifikation von Proteinen. Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), Poly-ADP-Ribosylpolymerasen (PARPs) und ADP-ribosylierende bakterielle Toxine binden β -Nikotinamidadenindinukleotid (β -NAD⁺) und katalysieren die Übertragung der Adenosindiphosphat-Ribosegruppe auf ein Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatom einer spezifischen Akzeptoraminosäure oder auf Wasser (JACOBSON & JACOBSON, 1989; AKTORIES, 1992). Dabei wird Nikotinamid freigesetzt. Die Hydrolyse der hochenergetischen N-glykosidischen Bindung zwischen Nikotinamid und der Ribosegruppe des NAD⁺ produziert eine freie Energie von -34,3 kJ/mol (ZATMAN *et al.*, 1953). Diese Energie treibt die Katalyse des ADP-Ribosegruppen-Transfers an (Abb. 2.8).

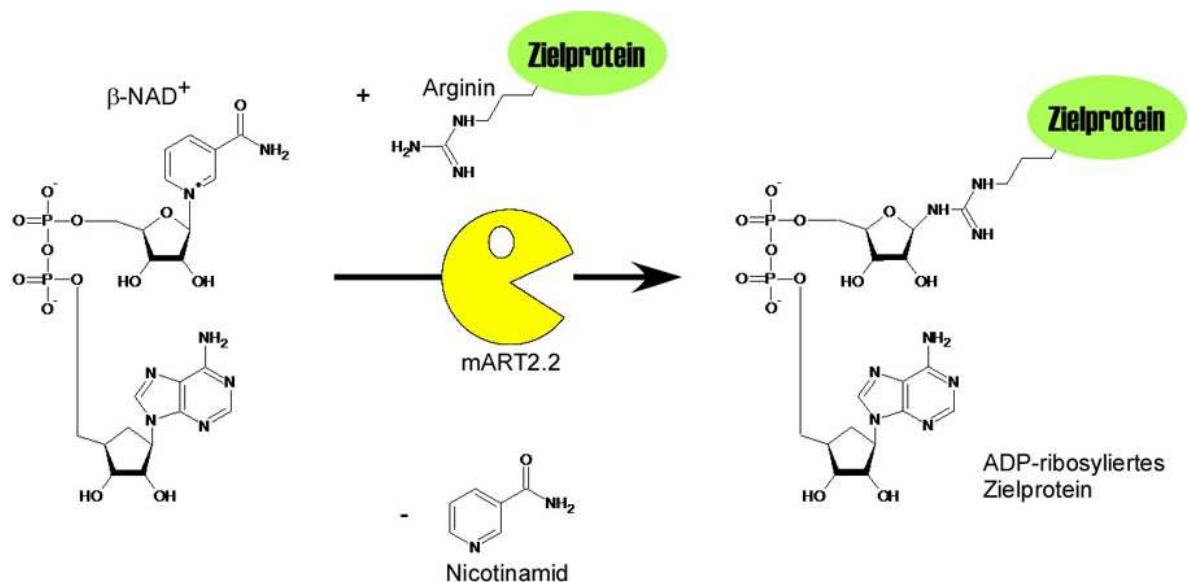


Abb. 2.8: Arginin-spezifische ADP-Ribosylierung von Proteinen durch die mART2.2. Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribosegruppe von β -NAD⁺ auf eine Aminosäureseitenkette im Zielprotein übertragen. Dabei wird Nicotinamid freigesetzt. Dieser Prozess wird durch Ekto-ADP-Ribosyltransferasen katalysiert. Viele Vertebraten-ARTs weisen Arginin-Spezifität auf.

Bei der Mono-ADP-Ribosylierung durch ARTs wird eine einzelne ADP-Ribosegruppe auf ein Zielprotein übertragen, wobei Arginin, Cystein, Asparagin oder Diphthamid (eine posttranslational modifizierte Form des Histidins) als Akzeptoraminosäuren fungieren können (KOCH-NOLTE & HAAG, 1997). Poly-ADP-Ribosylierung durch PARPs beginnt mit der ADP-Ribosylierung von Glutamatresten. In der Folge werden weitere ADP-Ribosegruppen an die erste angehängt, die ihrerseits ADP-ribosyliert werden. Hierbei entstehen verzweigte ADP-Ribose-Polymere, die aus bis zu 400 Monomeren bestehen können (RUF *et al.*, 1998). Darüber hinaus sind weitere ARTs bekannt, deren Akzeptormoleküle keine Proteine sind. Das Pierisin aus dem Schmetterling *Pieris rapae* ADP-ribosyliert doppelstängige DNA an 2'-Desoxy-Guanosin-Resten (TAKAMURA-ENYA *et al.*, 2001; TOTSUKA *et al.*, 2003). *Mycobacterium smegmatis* exprimiert eine ADP-Ribosyltransferase, die das Antibiotikum Rifampicin an einer Hydroxyl-Gruppe modifiziert und damit inaktiviert (QUAN *et al.*, 1999).

Einige ARTs, wie Cholera-Toxin, Pertussis-Toxin und Ratten ART2b transferieren die ADP-Ribosegruppe neben Zielaminosäuren auch auf Wasser, weisen also zusätzlich eine NAD-Glykohydrolase-Aktivität auf (HAAG *et al.*, 1997).

Eine weitere Gemeinsamkeit von Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung ist ihre Reversibilität (ZOLKIEWSKA & MOSS, 1997). Die Entfernung des ADP-Riboserestes kann durch ADP-Ribosylhydrolasen (ARHs) oder Nukleotid-Pyrophosphatasen/-phosphodiesterasen (NPPs) katalysiert werden (Abb. 2.9). Durch ADP-Ribosylhydrolasen wird die gesamte ADP-Ribosegruppe vom Zielprotein abgetrennt (MOSS *et al.*, 1997). Durch NPPs wird die energiereiche Bindung zwischen den beiden Phosphatgruppen des ADP-Riboserestes hydrolytisch gespalten, so dass ein Ribosephosphat-Rest am modifizierten Protein zurückbleibt. Hierdurch wird eine erneute ADP-Ribosylierung unmöglich (VOLLMAYER *et al.*, 2003).

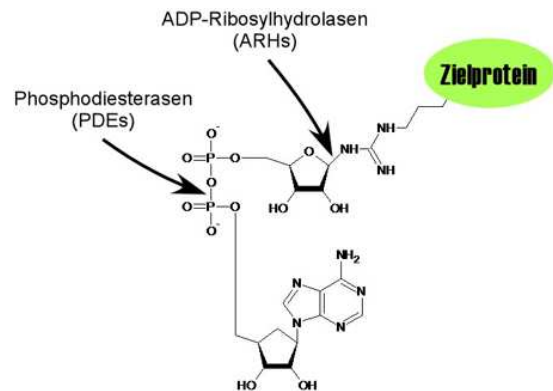


Abb. 2.9: De-ADP-Ribosylierungs-Mechanismen. Die ADP-Ribosylierung ist eine potentiell reversible Proteinmodifikation. Phosphodiesterasen (PDEs) und ADP-Ribosylhydrolasen (ARHs) können die ADP-Ribosegruppe hydrolytisch entfernen. Pfeile markieren die Angriffstellen dieser Enzyme.

2.2.2 ADP-ribosylierende bakterielle Toxine

1826 beschrieb PIERRE FIDÈLE BRETONNEAU erstmals eine Krankheit mit schwerer Entzündung von Rachen und Mandeln als *diphthérite* (Diphtherie). Achtzehn Jahre später wurde das *Corynebacterium diphtheriae* von FRIEDRICH LOEFFLER als Erreger der Diphtherie identifiziert und 1888 führten EMILE ROUX und ALEXANDRE YERSIN den Nachweis dafür, dass ein Toxin, das vom *Corynebacterium* sezerniert wird, für die Krankheitssymptome verantwortlich ist. Schon ein Jahr später gelang es EMIL VON BEHRING und PAUL EHRLICH mittels der Immunisierung von Pferden ein sogenanntes Antitoxin herzustellen, mit dem das Diphtherie-Toxin bekämpft werden konnte. In Anerkennung dieser Arbeiten bekam EMIL VON BEHRING 1901 den ersten vergebenen Nobelpreis für Medizin. Erst über 60 Jahre später konnte gezeigt werden, dass das Diphtherie-Toxin eine bakterielle ADP-Ribosyltransferase ist, die durch ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors EF2, die Proteinbiosynthese der betroffenen Wirtszelle vollständig zum Erliegen bringt (HONJO *et al.*, 1968; BELL & EISENBERG, 1996).

Wie bei der Phosphorylierung wird auch durch die ADP-Ribosylierung die Funktion des modifizierten Proteins beeinflusst. Bei den meisten durch bakterielle Toxine katalysierten ADP-Ribosylierungen handelt es sich dabei um eine Inhibition der Funktion des Zielproteins. In phototrophen Bakterien wie *Rhodospirillum rubrum* gibt es zudem einen durch Änderungen im Tageslicht induzierten, reversiblen ADP-Ribosylierungszyklus, der die Aktivität der Dinitrogenase Reduktase reguliert, welche ein Schlüsselenzym der Stickstofffixierung ist. Der Antagonist der Dinitrogenase Reduktase ADP-Ribosyltransferase (DRAT) ist die Dinitrogenase Reduktase ADP-Ribosylglykohydrolase (DRAG) (LUDDEN, 1994). Eine Übersicht über einige bakterielle ADP-ribosylierende Toxine bietet die Tabelle 2.1.

Tab. 2.1: Auswahl von ADP-Ribosyltransferasen der Prokaryoten. Eine Einteilung dieser ARTs in fünf Gruppen wird an Hand ihrer Zielproteine vorgenommen. Zielproteine und die in diesen modifizierten Aminosäuren sind angegeben. Eine Besonderheit stellt die Dinitrogenase Reduktase ADP-Ribosyltransferase (DRAT) dar, die intrazellulär exprimiert wird und nicht toxisch, sondern regulatorisch wirkt. EF2 = eukaryotischer Elongationsfaktor 2; G α = regulatorische α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteinen.

Bakterielle ART	Organismus	Zielprotein	Aminosäure-spezifität
Diphtherie-Toxin (DT)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	EF2	Diphthamid
Exotoxin A (ETA)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EF2	Diphthamid
Cholera-Toxin (CT)	<i>Vibrio cholera</i>	G α	Arginin
heat labile enterotoxin (LT)	<i>Escherichia coli</i>	G α	Arginin
SpvB	<i>Salmonella enterica</i>	G-Aktin	Arginin
C2-Toxin	<i>Clostridium botulinum</i>	G-Aktin	Arginin
Iota-Toxin	<i>Clostridium perfringens</i>	G-Aktin	Arginin
VIP2-Toxin	<i>Bacillus cereus</i>	G-Aktin	Arginin
Exotoxin S (ExoS)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ras-Proteine	Arginin
Exotoxin T (ExoT)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ras-Proteine	Arginin
C3-Exotoxin epidermal differentiation inhibitor (EDIN)	<i>Clostridium botulinum</i>	Rho-Proteine	Asparagin
Pertussis-Toxin (PT)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rho-Proteine	Asparagin
DRAT	<i>Bordatella pertussis</i>	G α	Cystein
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Dinitrogenase Reduktase	Arginin

2.2.3 ADP-Ribosylierung durch eukaryotische ARTs

Die erste bei Vertebraten nachgewiesene Mono-ADP-Ribosyltransferase war die ART1 (vormals: RABNAART), eine kleine Arginin-spezifische Ekto-ART im Skelettmuskel des Kaninchens (ZOLKIEWSKA *et al.*, 1992). Seitdem ist eine Familie ART1-verwandter ADP-Ribosyltransferasen bei Mensch, Maus und anderen Säugetieren kloniert worden (GLOWACKI *et al.*, 2002). Sie werden in verschiedenen Geweben als membranständige, mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) versehene Ekto-Enzyme oder als sezerniertes Enzym exprimiert und sind in einer einheitlichen Nomenklatur mit den Bezeichnungen ART1 bis ART5 zusammengefasst worden (Abb. 2.10). Mitglieder dieser Ekto-Enzymfamilie ADP-ribosylieren Proteine wie die Integrine LFA-1 und $\alpha 7$ (NEMOTO *et al.*, 1996; ZOLKIEWSKA & MOSS, 1997), sowie ein Vielzahl anderer Oberflächenproteine (KREBS *et al.*, 2005).


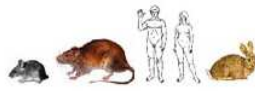
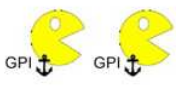






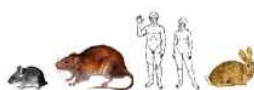
Gen-bezeichnung (vormal)	Kopienzahl im Genom	Protein GPI-verankert oder löslich	Expressions-muster	Nachweis in Organismen	Aminosäure-spezifität
ART1 (RABNAART) (MART) (YAC1)	1		Muskel Herz Lunge neut. Granulozyten		Arginin
ART2 (Pta) (Rt6-1) (Rt6-2)	2 (Paraloge)		reife T-Zellen		Arginin
ART3 (htMART) (TART1)	1		Hoden Herz Skelettmuskel Lunge Monozyten		?
ART4 (LART)	1		Lymphatische Gewebe Erythrozyten		?
ART5 (TART2) (YAC2)	1		Hoden Herz Skelettmuskel		Arginin

Abb. 2.10: Mono-ADP-Ribosyltransferasen der Säugetiere. Mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in Membranen verankerte ARTs sind mit einem Anker-Symbol im Pac-Man kenntlich gemacht. Die Expression der ARTs ist meist auf bestimmte Gewebe beschränkt. Die ART2-Gene kommen in Folge einer Genduplikation bei der Maus als Paraloge vor. Das ART2-Gen ist im menschlichen Genom ein Pseudogen (ψ), dessen Translation durch drei Stop-Kodons verhindert wird. Die meisten Vertebraten-ARTs sind Arginin-spezifisch. (Modifiziert, nach KOCH-NOLTE & HAAG, 1997).

Die Folge der ADP-Ribosylierung ist auch bei den eukaryotischen ARTs in der Regel eine negative Regulation durch Inaktivierung oder Inhibition, z. B. der Zellproliferation. Eine bemerkenswerte Ausnahme, die später näher betrachtet werden wird, stellt der Purinorezeptor P2X₇ dar, der in der Maus durch ADP-Ribosylierung aktiviert wird (SEMAN *et al.*, 2003; ADRIOUCH *et al.*, 2007).

2.2.4 Konservierte Strukturen der ART-Proteine

Alle ADP-Ribosyltransferasen weisen eine einheitliche, charakteristische dreidimensionale Struktur auf, die durch kristallographische Röntgenstrukturanalysen bakterieller ADP-Ribosyltransferasen und der ART2b der Ratte (vormals: RT6) aufgeklärt wurde (CHOE *et al.*, 1992; SIXMA *et al.*, 1993; STEIN *et al.*, 1994; MUELLER-DIECKMANN *et al.*, 2002). In Anlehnung an das Arkade-Spiel der 1980er Jahre, werden ARTs in schematischen Zeichnungen als „Pac-Man“ dargestellt. Die Abbildung 2.11 zeigt die Struktur der Ratten ART2b. Das aktive Zentrum der ARTs besteht aus einer tiefen Kerbe, der „Mundöffnung“ des Pac-Mans, an deren Grund die katalytischen Aminosäuren R, S und E in einer hoch konservierten Lage zueinander lokalisiert sind. Diese Spalte stellt das Ziel eines potentiellen inhibitorischen Lama-Antikörpers dar, da durch eine Bindung an dieser Stelle die Interaktion der mART2.2 mit ihren Substraten verhindert werden kann.

2.2.5 Die ART2 und ihre Funktionen auf T-Lymphozyten

Die ursprünglich als Ratten T-Zell-Alloantigen charakterisierte ART2 wurde auf Grund ihrer Strukturverwandschaft mit bakteriellen ARTs als membranständige ADP-Ribosyltransferase auf den T-Lymphozyten der Ratte identifiziert (KOCH-NOLTE *et al.*, 1996; THIELE *et al.*, 1997). Bei der Ratte ist das ART2 Gen auf Chromosom 1 lokalisiert und liegt in den zwei allelen Varianten *ART2a* und *ART2b* vor (BUTCHER, 1979). Für *ART2a* wurde NADase-, aber keine Transferase-Aktivität festgestellt. *ART2b* zeigt neben NADase-Aktivität auch eine Arginin-spezifische Automodifikation nach Inkubation mit NAD⁺ (HAAG *et al.*, 1995). Im Mausgenom gibt es zwei ART2-Paraloge, die durch eine Gen-Duplikation entstanden sind. *ART2.1* und *ART2.2* liegen tandemartig auf Chromosom 7 und weisen eine 79%ige Sequenzidentität auf (HOLLMANN *et al.*, 1996). Beim Menschen

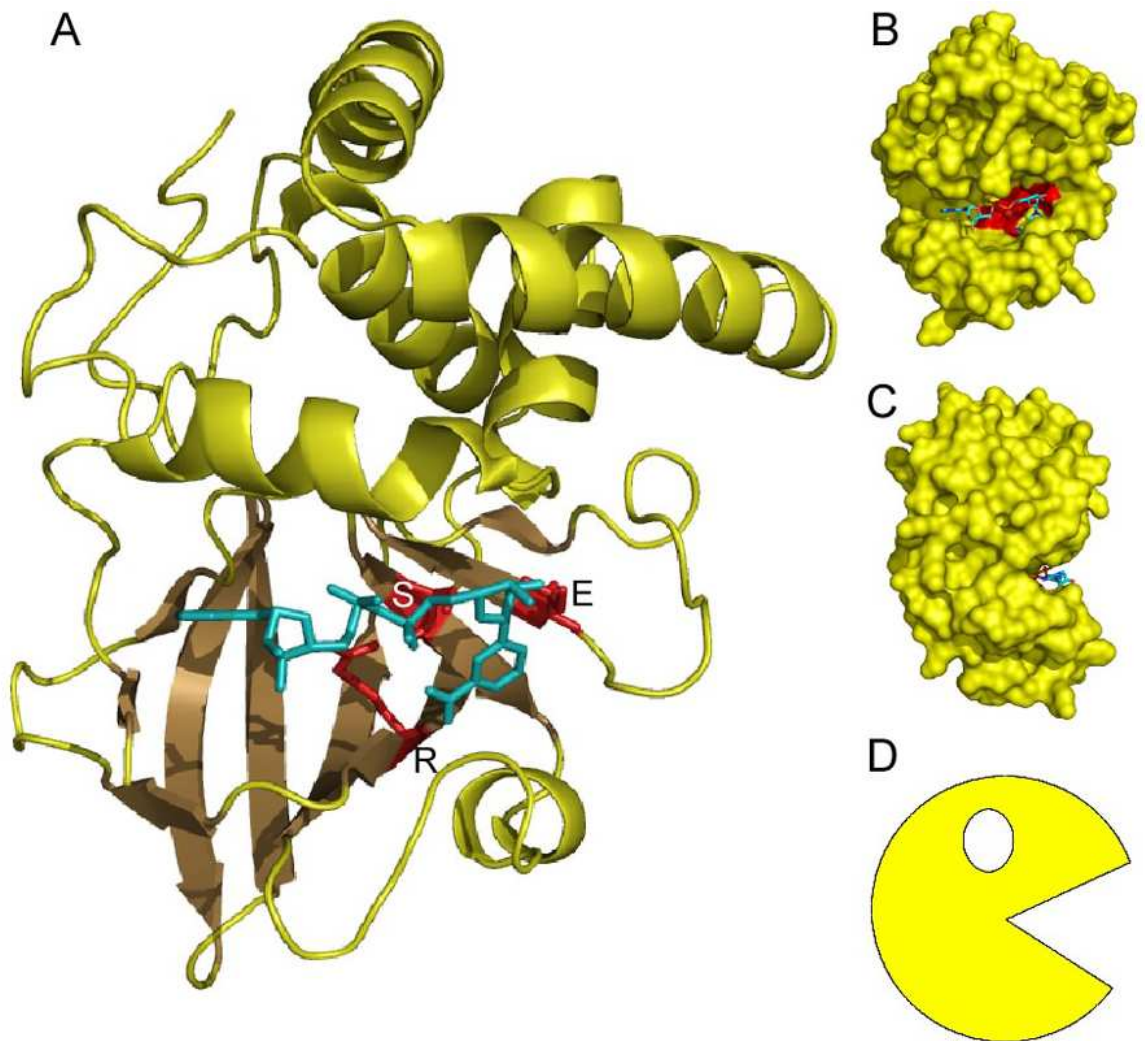


Abb. 2.11: 3D-Stuktur der ART2b der Ratte (*Rattus norvegicus*) und Pac-Man-Schema. Interpretation der durch Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Daten: (A) Darstellung der Sekundärstruktur-Elemente. Im N-terminalen Anteil liegen α -helikale Abschnitte. Darunter liegen im C-terminalen Abschnitt β -Stränge (braun), die zwei β -Faltblätter ausbilden. Diese β -Faltblätter können als „Oberkiefer“ und „Unterkiefer“ eines Pac-Man-Schemas (D) betrachtet werden. (B) Am Grund des „Mundes“ dieses Pac-Mans, zwischen den beiden Kiefern, liegt das katalytische Zentrum, das drei konservierte Aminosäuren R, S und E (rot eingefärbt) enthält. NAD^+ (türkis), das Substrat der ART2b, liegt im „Mund“ des Pac-Mans. (C) Eine um 90° versetzte Ansicht lässt die Ähnlichkeit mit einem „Pac-Man“ noch stärker hervortreten (A-C: pdb-code: 1OG3, nach MUELLER-DIECKMANN *et al.*, 2002).

liegt das *ART2* Gen auf Chromosom 11 (11q13) als Einzelkopie vor (KOCH-NOLTE *et al.*, 1993). Im Leseraster des Gens wurden drei vorzeitige Stop-Kodons identifiziert, was *ART2* beim Menschen und Schimpansen zu einem sogenannten Pseudogen macht (HAAG *et al.*, 1994). In der Maus werden *ART2.1* und *ART2.2* auf Makrophagen (HONG *et al.*, 2007) bzw. naiven T-Zellen exprimiert (KOCH-NOLTE *et al.*, 1999).

T-Zellen haben im Immunsystem zwei prominente Aufgaben: als $CD4^+$ T-Helferzellen unterstützen sie die Aktivierung von B-Zellen (T_H2) oder Makrophagen (T_H1) bei der Abwehr von Pathogenen, als $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen töten sie virusinfizierte oder entartete körpereigene Zellen (DELVES & ROITT, 2000a, b). Reife, im Körper zirkulierende $CD4^+$ T-Zellen können Antigene erkennen, die ihnen als Peptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen von professionellen Antigen präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APZs) und B-Zellen oder im Falle von $CD8^+$ T-Zellen auf MHC-Klasse-I-Molekülen von allen kernhaltigen Körperzellen präsentiert werden (HOLLING *et al.*, 2004; ALEXANDER-MILLER, 2005). Die Interaktion von T-Zellen mit der APZ beginnt mit der Kontaktaufnahme von membranständigen Adhäsionsmolekülen, wie LFA-1, auf der T-Zelle und I-CAM1 auf der APZ (ANDERSON & SIAHAAN, 2003). Wenn der TCR ein passendes Antigen erkennt, wird durch eine TCR-vermittelte Signaltransduktion eine Konformationsänderung im LFA-1-Molekül bewirkt, welche die Affinität des LFA-1 gegenüber I-CAM1 verstärkt. Die festere Bindung führt zur Ausbildung der sogenannten „Immunologischen Synapse“. Dabei ordnen sich Komplexe aus LFA-1-Integrinen und I-CAM1-Molekülen ringförmig um eine Gruppe von TCR-, MHC- und $CD4$ - oder $CD8$ -Molekülen an. Auch co-stimulatorische Moleküle wie $CD28$ und $B7$ Moleküle ($CD80$ und $CD86$) sind beteiligt und vermitteln ein für die endgültige Aktivierung der T-Zelle essentielles zweites Signal (GRAKOU *et al.*, 1999).

Die ART2.2 der Maus katalysiert die ADP-Ribosylierung vieler Membranproteine, die bei der Aktivierung und Migration von T-Zellen eine Rolle spielen (BANNAS *et al.*, 2005). Dies konnte zum Beispiel für das Integrin LFA-1 (NEMOTO *et al.*, 1996), den MHC I-Co-Rezeptor $CD8$, die T-Zelloberflächenproteine $CD27$, $CD44$, $CD45$ (OKAMOTO *et al.*, 1998), ein unbekanntes, an der T-Zellaktivierung beteiligtes 40 kDa Protein, das mit seiner intrazellulären Domäne mit der p56Lck-Kinase assoziiert ist (WANG *et al.*, 1997), sowie den $P2X_7$ -Ionenkanal (ADRIOUCH *et al.*, 2007) gezeigt werden. Die ADP-Ribosylierung dieser Zielproteine führt zu einer Reduktion der Zellproliferation, Signaltransduktion ins Innere der Zelle, Zielzelladhäsion sowie Zytotoxizität und Zytokin-Sekretion der T-Zellen. Eine reguläre Aktivierung von T-Zellen führt zu einem Abstoßen der mART2.2 durch TNF-alpha-connecting-enzyme (TACE) oder eine verwandte Metalloprotease, was mit einer stark reduzierten ART-Aktivität korreliert (KAHL *et al.*, 2000).

2.2.6 Untersuchungssysteme für die mART2.2-Aktivität

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Lama-Antikörper zu isolieren und zu klonieren, die die enzymatische Aktivität der mART2.2 inhibieren können. Um herauszufinden, ob mART2.2-spezifische Einzeldomänen-Antikörper in der Lage sind diese Anforderung zu erfüllen, wurden drei ADP-Ribosylierungs-Untersuchungen durchgeführt. Dies sind zum einen die FACS-Analyse der etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen durch die native membrangebundene mART2.2 (KREBS *et al.*, 2005) und zum anderen die FACS-Analyse des NAD-induzierten Zelltodes (*NAD induced cell death*, NICD), der durch die ADP-Ribosylierung des Purinorezeptors P2X₇ durch die native, membrangebundene mART2.2 eingeleitet wird (SEMAN *et al.*, 2003). Außerdem wurde die ³²P-ADP-Ribosylierung des Arginin-Analogons Agmatin durch lösliche, rekombinante mART2.2 in Gegenwart von VHHs untersucht (GLOWACKI *et al.*, 2002).

2.2.6.1 Enzymatischen Aktivität der mART2.2 auf T-Zellen der Maus

Auf T-Lymphozyten der Maus wird die mART2.2 als GPI-verankertes Ekto-Enzym exprimiert. Steht das NAD⁺ Analogon etheno-NAD⁺ als Substrat zur Verfügung, so katalysiert mART2.2 die etheno-ADP-Ribosylierung anderer Oberflächenproteine auf der T-Zelle (KREBS *et al.*, 2005). Der monoklonale Antikörper 1G4 bindet spezifisch an etheno-Adenosin (YOUNG & SANTELLA, 1988) und erkennt auch den etheno-Adenosin-Anteil im etheno-NAD⁺. Da es bisher nicht gelungen ist monoklonale Antikörper gegen die ADP-Ribose oder ADP-ribosylierte Proteine herzustellen, ermöglicht die Verwendung von etheno-NAD⁺ den direkten Nachweis der ART-vermittelten Modifikationen von Zelloberflächenproteinen. Hierzu wird eine Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Variante des 1G4-Antikörper genutzt, der so den Nachweis der mART2.2-Aktivität im FACS ermöglicht (Abb. 2.12).

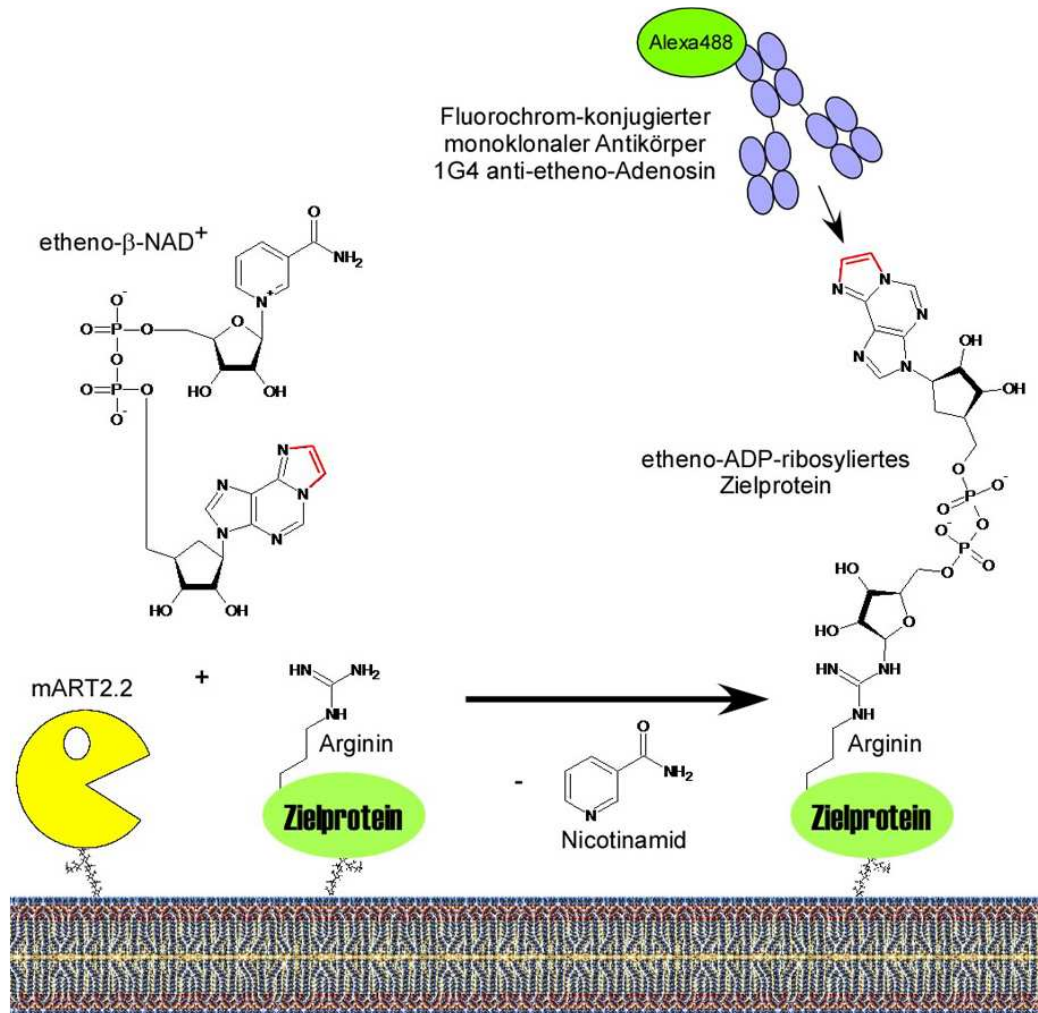


Abb. 2.12: Schema der etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen durch native, membranständige mART2.2. mART2.2 kann etheno-NAD wie NAD als Substrat für die ADP-Ribosylierungsreaktion dienen. Während bisher kein Antikörper gegen den ADP-Ribosylanteil verfügbar ist, kann die etheno-ADP-Ribosylierung durch den monoklonalen Antikörper 1G4 nachgewiesen werden, der sich gegen etheno-Adenosin richtet.

2.2.6.2 Zytotoxische Aktivität der mART2.2 auf T-Zellen der Maus im NICD

Der P2X₇-Rezeptor ist ein Mitglied der P2X-Familie, ATP-gesteuerter Ionenkanäle. Die Expression von P2X₇ konnte auf vielen Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden, so auch auf den T-Zellen von Maus und Mensch (BARICORDI *et al.*, 1996). P2X₇ besitzt zwei Transmembrandomänen, die über eine lange extrazelluläre Schleife miteinander verbunden sind. N- und C-Termini sind zytoplasmatisch lokalisiert (DI VIRGILIO, 2007). Der von P2X₇ gebildete Ionenkanal formiert sich als Homotrimer. Jedes Monomer kann am Arginin125 ADP-ribosyliert werden. Wie die Anlagerung von ATP, so kann auch diese kovalente Modifikation zur Öffnung des Ionenkanals führen (ADRIOUCH *et al.*, 2007). Im geöffneten Zustand ist der Kanal für monovalente und bivalente Kationen permeabel (Abb. 2.13). In der Folge kommt es zu Kalziumeinstrom in die Zelle, Kalium und Natrium treten aus und das Membranpotential wird lokal geschwächt. Innerhalb von Sekunden erfolgt die Exposition von Phosphatidylserin (PS). Dieses Membranlipid ist bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Lang anhaltende Aktivierung des P2X₇-Kanals führt zur Bildung einer großen Pannexin-1-Pore (PELEGRIN & SURPRENANT, 2006), die die Aufnahme von Farbstoffen wie Ethidiumbromid, aber auch den Austritt von anderen Molekülen einer Größe von bis zu ca. 900 kDa aus der Zelle erlaubt. Letztendlich führt dies zum Tod der Zelle. Da am Beginn dieser Signaltransduktionskette die NAD⁺-abhängige ADP-Ribosylierung von P2X₇ steht, wird dieser Mechanismus als NAD⁺-induzierter Zelltod (*NAD induced cell death*, NICD) bezeichnet (SEMAN *et al.*, 2003), P2X₇ als zytolytischer Rezeptor.

Der Verlauf der Apoptose kann im FACS verfolgt werden (Abb. 2.14). Zum Nachweis des PS wird FITC-(Fluorescein isothiocyanate-)konjugiertes AnnexinV verwendet, ein Protein mit hoher Affinität für dieses Membranlipid. Der Tod der Zelle wird durch das DNA-interkalierende Propidiumjodid (PI) erkennbar. Im Zuge zunehmender Dysfunktion der Membran kann dieser Farbstoff nur in sterbenden und toten Zellen bis in den Kern vordringen. Nach der Anlagerung an DNA verändert sich das Emissionsspektrum des PI in charakteristischer Weise, so dass damit tote von vitalen Zellen unterschieden werden können.

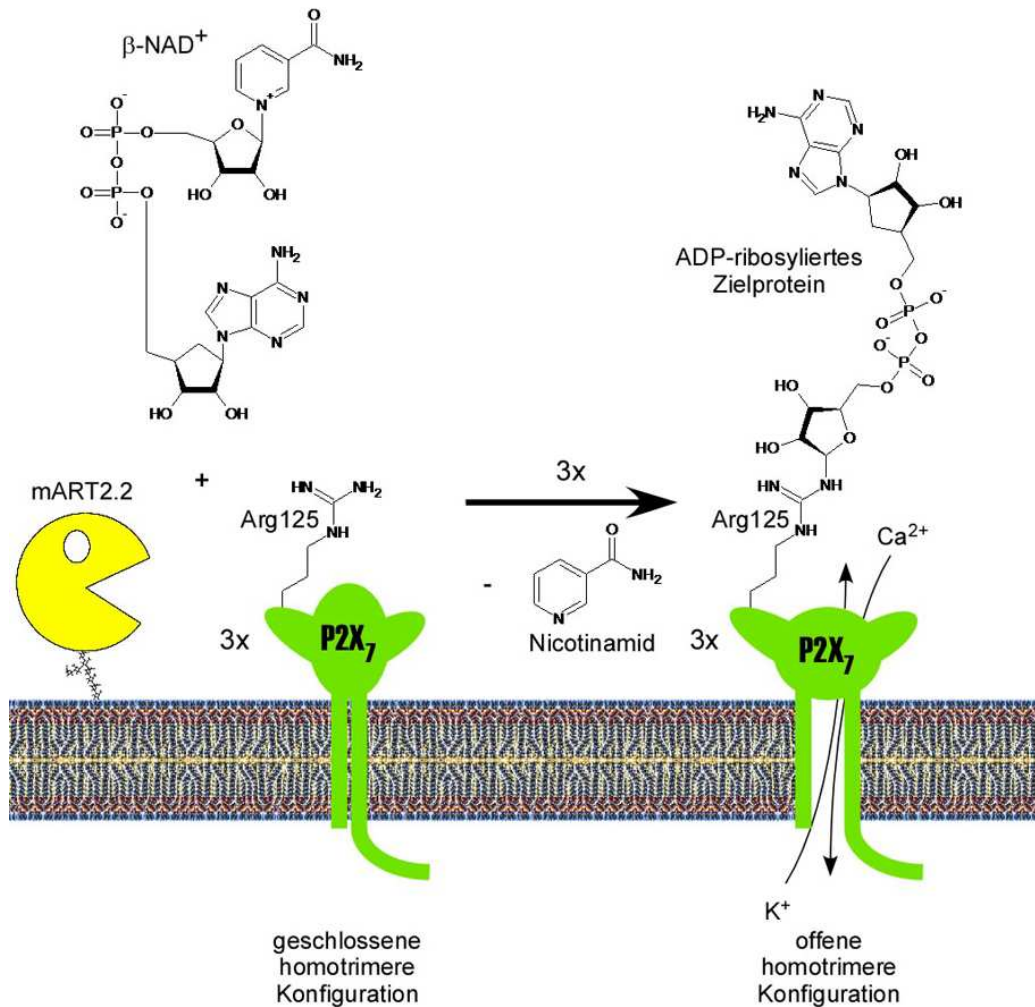


Abb. 2.13: Schema der ADP-Ribosylierung des Purinorezeptors P2X₇ durch native, membranständige mART2.2 und Einleitung des NICD. Auf murinen T-Zellen ADP-ribosyliert mART2.2 den Purinorezeptor P2X₇, wenn NAD als Substrat zur Verfügung steht. Ein P2X₇-Monomer ist über zwei transmembrane Regionen in die Membran integriert. Drei solcher Monomere sind in einem Homotrimer organisiert und bilden einen Ionenkanal, der im nicht modifizierten Zustand geschlossen vorliegt. Werden die Monomere am Arginin125 ADP-ribosyliert, so verändern sie ihre Lage zueinander und der Ionenkanal wird geöffnet. Als Folge kommt es zum Kalziueinstrom in die Zelle, Kalium tritt aus. Vermittelt über bisher nicht genau geklärte Signaltransduktionswege kommt es schließlich zum Tod der Zelle (Nach ADRIOUCH *et al.*, 2007).

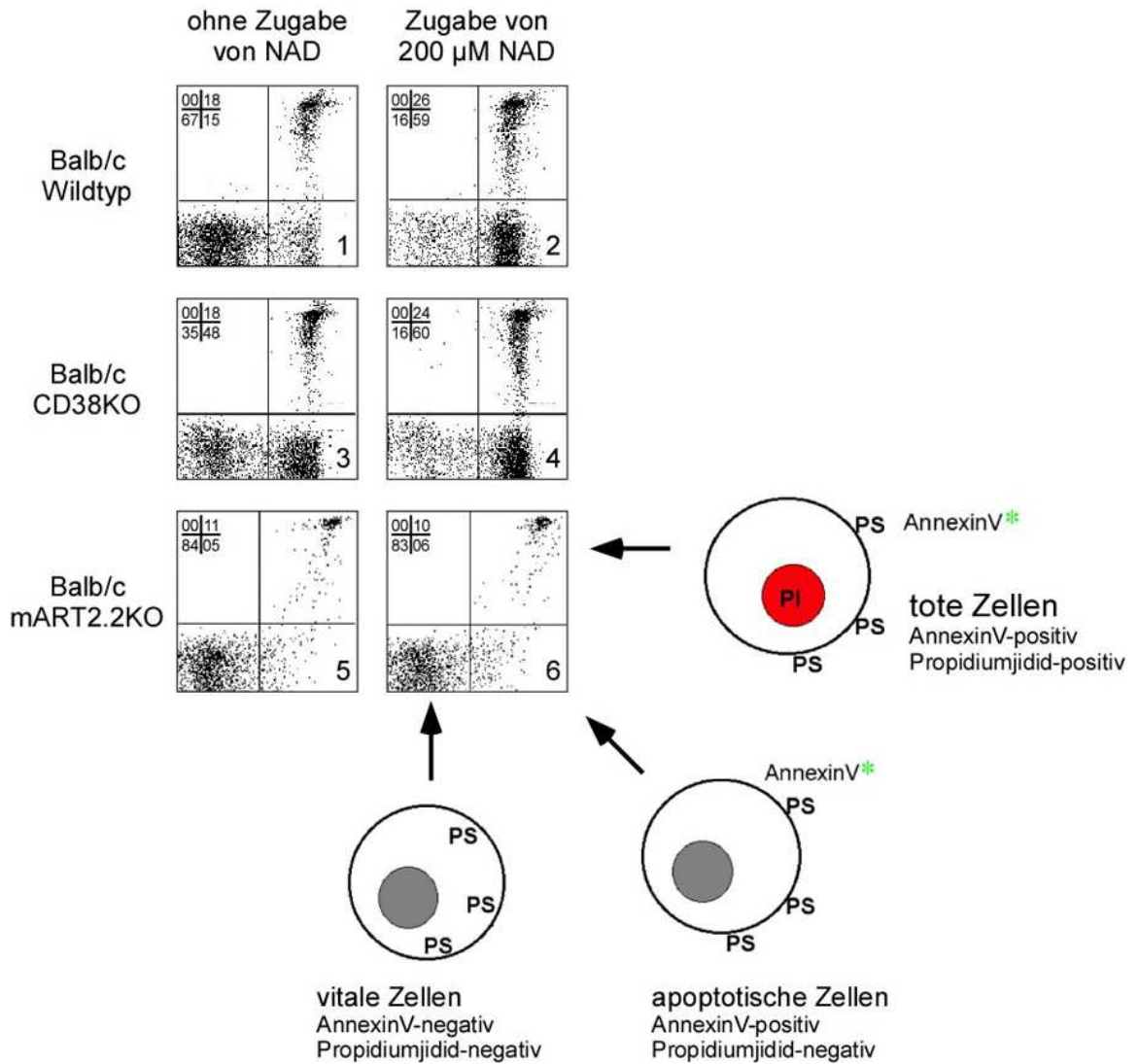


Abb. 2.14: Verlauf des NICD bei T-Lymphozyten aus Wildtyp-, CD38KO- und mART2.2KO-Maus. Phosphatidylserin (PS) befindet sich in vitalen Zellen auf der Innenseite der Plasmamembran (AnnexinV-negative Zellen im unteren linken Quadranten des FACS-Diagramms). Es tritt jedoch innerhalb von Minuten nach Zugabe des mART2.2-Substrates NAD⁺ auf der Außenseite der Zelle auf, wo es mittels AnnexinV-FITC detektiert wird (AnnexinV-positive Zellen im unteren rechten Quadranten). Nach chronischer Aktivierung des P2X₇-Rezeptors durch NAD⁺-abhängige ADP-Ribosylierung sterben die Zellen und Propidiumjodid (PI) gelangt in den Zellkern (PI-/AnnexinV-doppelt-positive Zellen im oberen rechten Quadranten).

Lymphknotenzellen einer Balb/c-Wildtyp-, einer BALB/c-CD38KO- und einer Balb/c-mART2.2KO-Maus wurden nach B-Zell-Depletion ohne zusätzliches NAD⁺ oder mit 200 μ M NAD⁺ für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und mit AnnexinV-FITC und PI angefärbt. Ohne NAD⁺-Zusatz von außen zeigt sich die Wirkung des endogenen NAD⁺, das während der Präparation der Zellen freigesetzt wurde. Bei Wildtyp-Zellen (Tafel 1) ist ein Anteil von 15% der Zellen „spontan“ apoptotisch (AnnexinV-positiv), 18% der Zellen sind tot (PI-positiv). Nach Zugabe von 200 μ M NAD⁺ weisen 59% der Zellen PS-Exposition auf (Tafel 2). Bei CD38KO-Zellen (Tafel 3) ist der Anteil AnnexinV-„spontan“-positiver Zellen mit 48 % stark erhöht. Eine durch die Abwesenheit der NADase-Aktivität von CD38 bewirkte höhere Verfügbarkeit von NAD⁺ bewirkt eine Verstärkung des mART2.2-vermittelten NICD. Dass der NICD mART2.2-abhängig ist zeigen die Untersuchungen von mART2.2KO-Zellen, wo kein „spontane“ Apoptose zu beobachten ist (Tafel 5). Auch unter Zugabe von hohen Dosen NAD⁺ bleibt die Population AnnexinV-positiver Zellen mit 6% sehr klein (Tafel 6). Ein Anteil von etwa 10% der Zellen tritt immer als PI-positiv auf und ist wahrscheinlich auf mechanische Zerstörung von T-Lymphozyten während der Präparation aus dem Lymphknoten zurückzuführen (Nach KREBS *et al.*, 2005).

2.2.6.3 ^{32}P -ADP-Ribosylierung von Agmatin durch mART2.2

Das kleine Arginin-Strukturanalogon Agmatin kann wie Arginin selbst durch die mART2.2 ADP-ribosyliert werden. Läuft diese Reaktion in Gegenwart von radioaktiv markiertem ^{32}P -NAD⁺ ab, so wird Agmatin ^{32}P -ADP-ribosyliert und kann radiometrisch erfasst werden (Abb. 2.15).

Für die Untersuchung der inhibitorischen Effekte von Einzelketten-Antikörpern auf die mART2.2-Aktivität ist das Arginin-Analogon Agmatin von besonderem Interesse, da es ein sehr kleines Molekül ist.

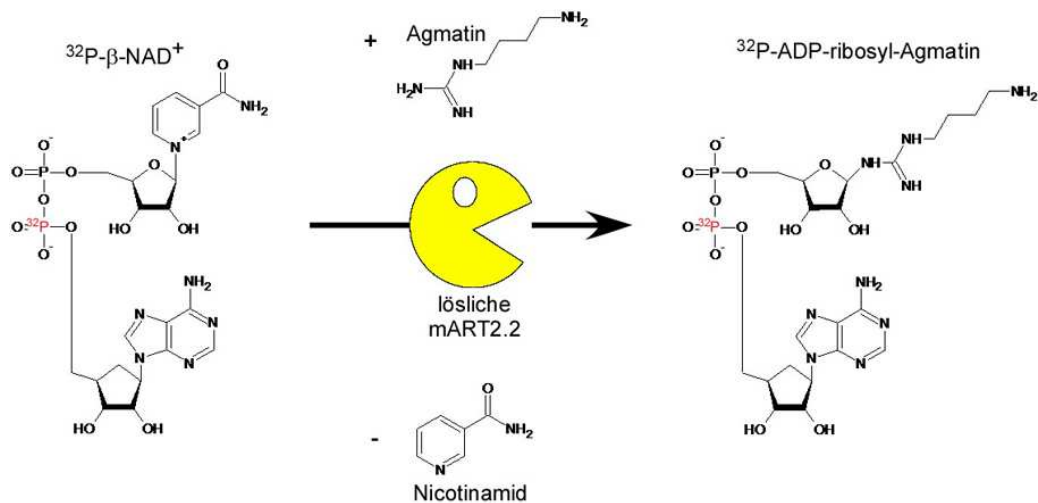


Abb. 2.15: Schema der ^{32}P -ADP-Ribosylierung des Arginin-Analogons Agmatin durch lösliche mART2.2. Bei der Verwendung von ^{32}P - β -NAD⁺ in der mART2.2-katalysierten ADP-Ribosylierung von Agmatin wird die radioaktive Markierung auf das Reaktionsprodukt ^{32}P -ADP-ribosyl-Agmatin übertragen.

2.3 Phagen-Display-Technologie

Die Phagen-Display-Technologie (SMITH, 1985) erlaubt die Selektion von Antikörpern, Proteinen und Peptiden gegen bekannte wie unbekannte Antigene. Die namensgebenden Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien befallen und die Replikation ihrer eigenen DNA initiieren. Am häufigsten findet hierbei der filamentöse Bakteriophage M13 Verwendung (Abb. 2.16 & 2.17), die einzelsträngige DNA in den männlichen Sexpilus von *E. coli* injizieren können, wobei die Kontaktaufnahme über die pIII-Proteine der Kopfregion des Phagen erfolgt. Das Prinzip der Phagen-Display-Technologie besteht darin, Fremd-DNA, die für ein Peptid oder Protein kodiert, in einen Phagenpartikel zu verpacken und die Peptide oder Proteine auf der Oberfläche des Phagen zu präsentieren (*display*). Auf diese Weise erfolgt eine Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp.

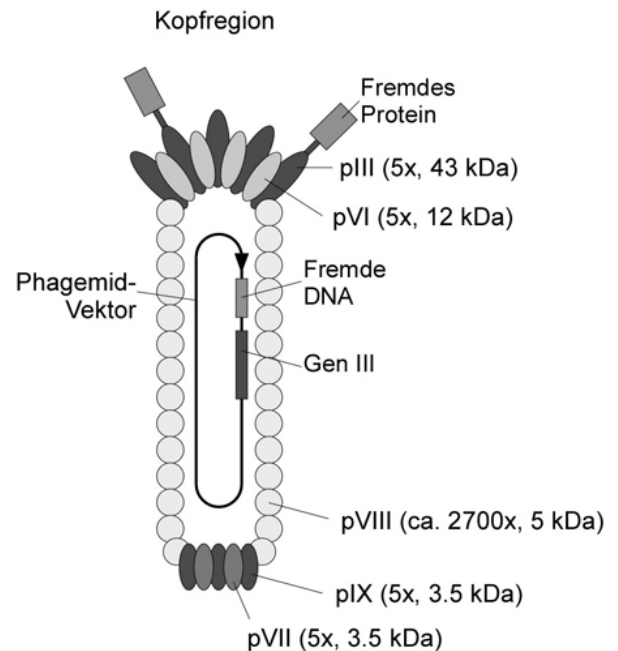


Abb. 2.16: Struktur des filamentösen Phagen M13 (schematisch). pIII, pVI, pVIII, pVII und pIX sind die Bezeichnungen der Hüllproteine. Die Angaben zur Kopienzahl beziehen sich auf jeweils einen Phagen. Fremdproteine werden meist, wie hier gezeigt, an die Proteine pIII, seltener an pVI fusioniert.

Eine Phagen-Display-Bibliothek ist eine Ansammlung unabhängiger Klone, von denen jeder eine andere Fremd-DNA enthält. Diese DNA, die für einen Antikörperfragment, ein Protein oder ein Peptid kodiert, ist zwischen eine Signalpeptid-Sequenz und das Gen für ein Phagen-Hüllprotein kloniert, was sicherstellt, dass das fremde Protein als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein synthetisiert wird.

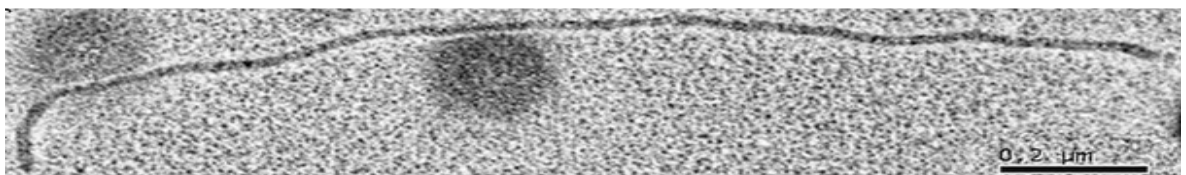


Abb. 2.17: Negativkontrast Elektronenmikrographie eines M13 Bakteriophagen. Balken = 200 nm.

In der vorliegenden Arbeit dient das Hüllproteine III (pIII) als Fusionspartner für VHH-Domänen. Dieses ist in fünffacher Kopienzahl in der Kopfregion des Phagen lokalisiert (Abb. 2.16). Als sogenannter Phagemid-Vektor wurde der Expressionsvektor pHEN2 verwendet (Abb. 2.18). Dieser verfügt über die herkömmlichen Replikationselemente eines Plasmids (*colE1 ori*), vereinigt diese jedoch in sich mit den für die Replikation als Phagengenom benötigten Eigenschaften (M13 ori). Von diesem zweiten Replikationsursprung aus können nach dem „rolling circle“-Prinzip Konkatemere synthetisiert werden, die, wie ein Phagengenom, während des Zusammenbaus neuer Phagenpartikel zu Einzelkopien zurechtgeschnitten und verpackt werden.

Bei der Verwendung von Phagemid-Vektoren ist die Superinfektion mit einem sogenannten Helfer-Phagen notwendig (z. B. M13KO7). Dieser injiziert ein komplettes Wildtyp-Phagengenom, von dem anschließend alle Phagenhüllproteine exprimiert werden. Beim Zusammenfügen neuer Phagenpartikel werden dann sowohl Wildtyp-Kapside als auch Fusionsproteine von Hüll- und Fremdprotein verwendet. Diese werden auf der Oberfläche des Phagen präsentiert. Durch Kontrolle des Expressionsniveaus des Fusionsproteins kann das Verhältnis zur Wildtypform gesteuert werden. In den

Phagenpartikeln wird der Phagemid-Vektor verpackt. Helfer-Phagengenome, die ebenfalls verpackt werden, vermitteln nach Infektion von neuen Wirtszellen nicht die gleiche Antibiotikaresistenz, wie der Phagemid-Vektor (Amp^R) und können über Selektionsdruck eliminiert werden.

Zur Gewinnung der Immunglobulingene wurden B-Zellen aus peripheren Blut-Lymphozyten eines mit dem Zielantigen immunisierten Lamas isoliert. Die VHH-Gene wurden durch reverse Transkription und Amplifikation aus B-Zell-RNA gewonnen. Anschließend war auf Grund der besonderen Einzeldomänen-Struktur der VHH nur ein einzelner Genabschnitt pro Phagemid-Vektor zu klonieren, um mit der Herstellung einer

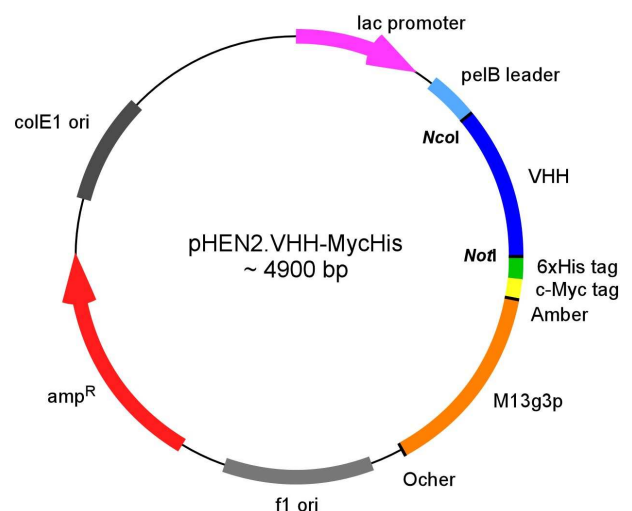


Abb. 2.18: Phagemid-Vektor pHEN2. Dieser Expressionsvektor verfügt neben dem *colE1 ori* auch über einen M13 ori, der eine „rolling circle“-Replikation erlaubt. Hier dargestellt ist Konfiguration für ein Fusionsprotein einer VHH mit dem Phagen- Hüllprotein III. Zwischen beiden Fusionspartnern ist ein Amber Stop-Kodon (TAG) lokalisiert.

VHH-Bibliothek beginnen zu können (Abb. 2.19 B). Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber der Konstruktion einer Phagen-Bibliothek aus konventionellen Antikörpern dar, für die sowohl V_H - als auch V_L -Gene durch eine RT-PCR amplifiziert werden müssen. Zudem können die zwei amplifizierten variablen Gensegmente nur ungerichtet kombiniert werden, was in einer geringen Zahl funktioneller Paarungen resultiert. In einen Phagemid-Vektor kloniert, der zusätzlich für eine kurze Peptidsequenz (*linker*) kodiert, die die beiden Domänen auf einer Peptidkette (*single chain fragment variable*, scFv) miteinander verbindet, werden sie zur Herstellung einer scFv-Bibliothek genutzt (Abb. 2.19 A) (WINTER *et al.*, 1994).

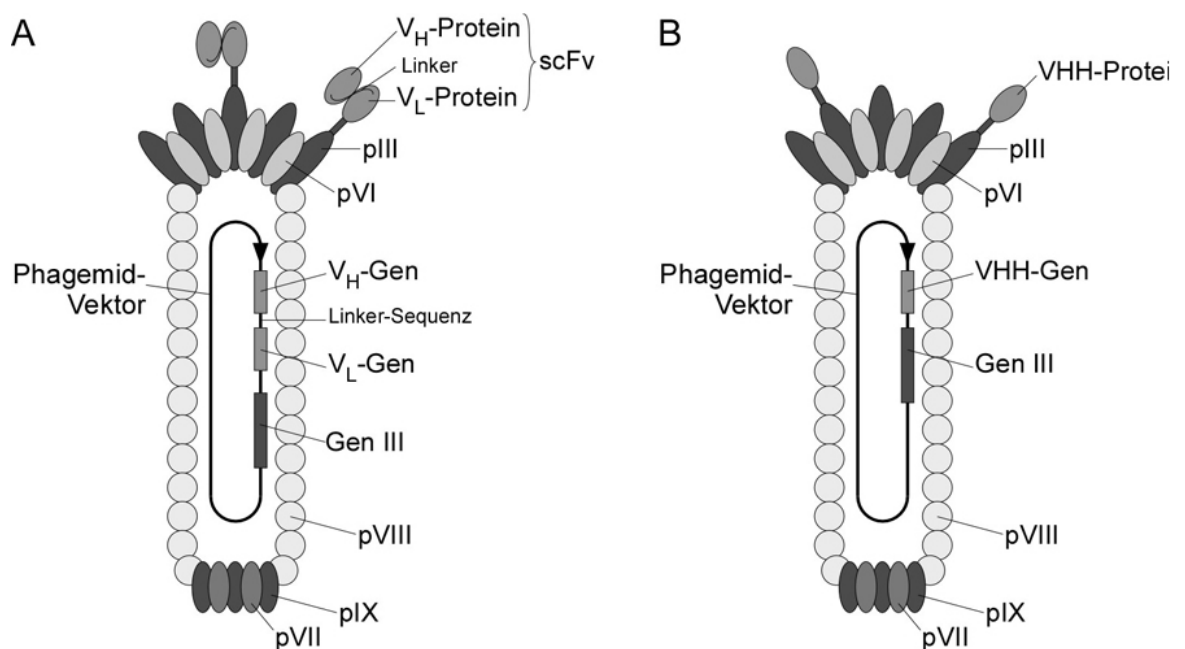


Abb. 2.19: (A) Rekombinanter Phage mit pIII-scFv-Fusionsproteinen. Die auf dem Phagen präsentierten scFv-Proteine werden auf dem im Inneren des Phagen verpackten Phagemid-Vektor von den V_H - und V_L -Genen kodiert. Wird ein Phagenpartikel auf Grund der Bindeeigenschaften dieser scFv-Proteine selektiert, wird auch der für diese kodierende Phagemid-Vektor selektiert. **(B) Rekombinanter Phage mit pIII-VHH-Fusionsproteinen.** In seinen Funktionen identisch mit einem scFv-Phagen, bietet ein VHHs präsentierender Phage den Vorteil einer einfacheren und effizienteren Herstellung des Phagemid-Vektors.

Bibliotheken, die wie hier aus Material konstruiert wurden, das von einem immunisierten Tier stammt, sogenannte Immuno-Bibliotheken, sind mit antigenspezifischen, hoch affinen Antikörpern angereichert; ein Effekt, der durch klonale Expansion und Affinitätsreifung im Immunsystem des Spenderorganismus verursacht wird (s. Abschnitt 2.1). Ein Vorteil der Nutzung von Immuno-Bibliotheken gegenüber randomisierten synthetischen oder semi-synthetischen Bibliotheken ist die sehr hohe Wahrscheinlichkeit einen Klon mit hoher Affinität zum Antigen zu selektionieren (SMITH *et al.*, 2005). Eine grundlegende

Voraussetzung hierfür ist, dass das Repertoire der in der Bibliothek vertretenen Antikörper groß genug ist.

2.3.1 Selektionsmethoden

Das Ziel der Phagen-Display-Technologie ist es, wenige Phagen, die ihr Zielantigen mit hoher Affinität binden, aus einem großen Überschuss von Phagen-Klonen zu selektieren, die das Antigen nicht oder mit schwächerer Affinität binden. Dies wird durch multiple Selektionsrunden erreicht (Abb. 2.20), in denen der Phage an das Antigen bindet und nicht bindende Phagen durch Waschen entfernt werden. Anschließend werden spezifisch bindende Phagen eluiert und amplifiziert.

In dieser Arbeit wurde für die Selektion einerseits in einem sogenannten Festphasen-*Panning* (CLACKSON *et al.*, 1991; MARKS *et al.*, 1991; GRIFFITHS *et al.*, 1994) aufgereinigtes, an ein MaxiSorb-Röhrchen immobilisiertes Antigen verwendet. Andererseits wurde die Selektion spezifischer Phagen mit intakten mART2.2-transfizierte Lymphomzellen durchgeführt (CAI & GAREN, 1995; VITI *et al.*, 2002). Auf eine Elution der Phagen aus dem Röhrchen bzw. von den gewaschenen Zellen wurde dabei verzichtet, um keine Phagenpartikel durch die harsche Behandlung zu verlieren. Stattdessen wurden für eine Infektion in log-Phase wachsende, susceptible *E. colis* mit den Phagen-Zell-Komplexen co-inkubiert.

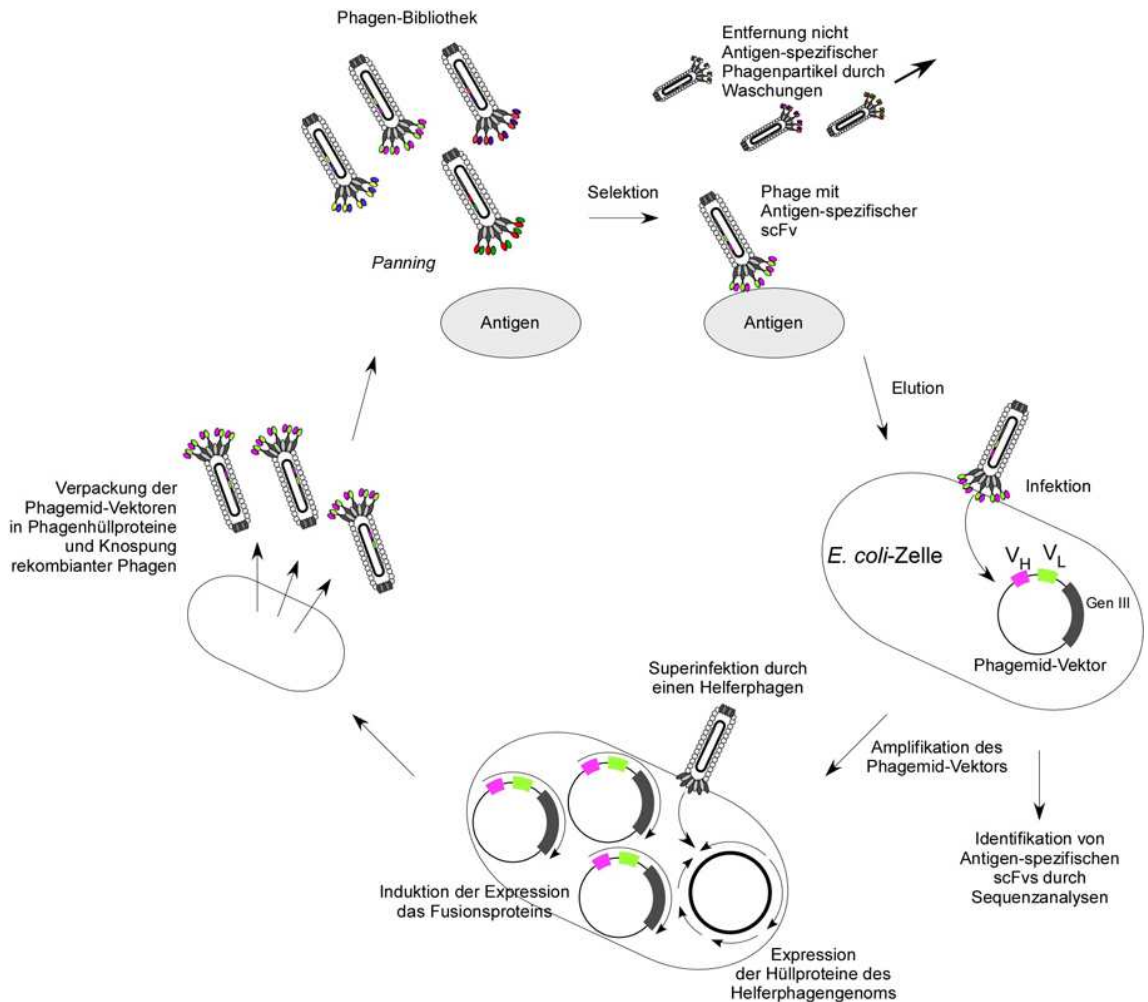


Abb. 2.20: Schematischer Ablauf eines Selektionszyklus der Phagen-Display-Technik. Nach der Herstellung einer Phagen-Bibliothek werden Antigen-spezifische Phagen durch *Panning*-Verfahren angereichert: Bindung spezifischer Phagen an immobilisiertes Antigen und Entfernung nicht-spezifische Phagen durch Waschen.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Gerät	Model	Hersteller/Lieferant
Analysenwaage	Typ 1412	Sartorius (Göttingen)
Autoklav	Varioclav	H+P (Oberschleißheim)
Durchflusszytometer	Modell 2540 EK	Tuttnauer (Hauppauge, NY, USA)
Entwicklungsmaschine	FACSCalibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
Folienschweißgerät	Processor FPM-100A	Fuji Photo Film GmbH (Düsseldorf)
Fotodokumentation (digital)	Vacufix electronic	Petra electric (Burgau)
FPLC-Anlage	Digitalkamera DP500	Olympus (Hamburg)
Gelelektrophorese - DNA/RNA	ÄKTaprime	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gelelektrophorese - Protein	Modell 40-0708	peqLab Biotechnologie (Erlangen)
Gelfiltrationssäule	Novex Xcell SureLock Mini-Cell	Invitrogen (Karlsruhe)
Geldokumentation	Sephadex 75 16/60 HiLoad	GE Healthcare (München)
Glasgefäße	Edas290 & Kamera DC290	Kodak (Stuttgart)
Goldkopplungsanlage	Flaschen, Kolben, e.t.c.	Schott (Mainz)
Heizblock	<i>tubing prep station</i>	BioRad (München)
Inkubator	Thermomixer kompakt	Eppendorf (Hamburg)
Inversmikroskop	B6060	Heraeus (Hanau)
Kontaminationsmonitor	Incubat	Melag (Berlin)
Kühltruhe (-80°C)	Contamat FHT 111 M	Leitz (Wetzlar)
Magnetrührer	HFC 586 Basic	Eberline (Erlangen)
Mikropipetten	RCT S 26	Heraeus (Hanau)
Mikrowelle	Typ „Research“	Omnilab (Bremen)
PCR-Maschinen	M 637 EC	Eppendorf (Hamburg)
	TGradient	Miele (Gütersloh)
	T3000 Thermocycler	Whatman Biometra (Göttingen)
Photometer	Ultraspec 2000	Whatman Biometra (Göttingen)
Pipettierhilfe	SmartSpec™3000	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Schüttelinkubator	"Express"	BioRad (München)
	ECOTRON	Falcon (Heidelberg)
	UNITRON	inforsHT (Bottmingen, Schweiz)
Sicherheitswerkbank	Herasafe HS12/2	inforsHT (Bottmingen, Schweiz)
Spannungsquelle	High Voltage Power Pack P30	Heraeus (Hanau)
Stickstofftank	Power Pac 200	Whatman Biometra (Göttingen)
Tischzentrifugen	K-Serie	BioRad (München)
	5415D	Taylor-Wharton (Husum)
	5417R	Eppendorf (Hamburg)
Transiluminatortisch	Typ TI 1	Eppendorf (Hamburg)
Wasserdeionisation	MilliQ synthesis	Whatman Biometra (Göttingen)
Werkbank	Gelaire Class 100	Millipore (Schwalbach/Ts.)
Zentrifugen	Rotanta 460 R	Gelman (Singapur)
	RC 26 PLUS	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifugen-Rotoren	SA-300	Sorvall
	SLA-3000	Sorvall

3.2 Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Format/Volumen	Hersteller/Lieferant
Blott-Karton	GB 003	Schleicher & Schuell (Dassel)
Combitips	verschiedene Größen	Eppendorf (Hamburg)
Dünnschicht-chromatographieplatten	20x20 cm, PEI-Cellulose F	Merck (Darmstadt)
Diafiltrationseinheit	Vivaspin20, MWCO 10000	Satorius (Göttingen)
	Vivaspin20, MWCO 30000	Satorius (Göttingen)
Einwegspritzen	verschiedene Größen	Braun (Melsungen)
Erlenmeyerkolben	250 ml, PP	Corning, Inc. (Acton, MA, USA)
FACS-Röhrchen	5ml, PP, Rundboden	Falcon/BD Biosciences (Heidelberg)
Filme	Hyperfilm ECL	Pharmacia Biotech (Freiburg)
	Biomax X-ray film MR; MS	Kodak (Stuttgart)
Filtrationseinheit (steril)	Steriflip, Stericup	Millipore (Billerica, MA, USA)
Handschuhe	Safeskin	Kimberly-Clark (Koblenz)
Kanülen	verschiedene Größen	Braun (Melsungen)
Kryoröhrchen	1 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Kulturschalen	10 cm	Greiner (Solingen)
Mikrotiterplatten	96 well V-Boden	Greiner (Solingen)
	96 well U-Boden	Greiner (Solingen)
Nitrocellulosemembran	Hybond-C, 0.45 µm	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Parafilm		Pechiney Plastic Packaging (USA)
Polyacrylamid-Gele	NuPAGE precast Gele	Invitrogen, Paisly (Großbritannien)
Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF)	ImmobilonP	Boehringer Ingelheim (Ingelheim)
Pipettenspitzen	verschiedene Größen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäße	0.2 ml / 1.5 ml / 2.0 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhre (PP)	15 ml, 50 ml	Falcon/BD Biosciences (Heidelberg)
StrataClean resin		Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Transformations-Röhre	round-bottom tube, PP 14 ml	Falcon/BD Biosciences (Heidelberg)
Zellsiebe	Nitex Membran (80 µm)	Cadisch Precision Meshes Ltd. (London, Großbritannien)
	Cellstrainer (70 µm)	Becton Dickinson (Heidelberg)

3.3 Chemikalien, Wasser und radioaktive Substanzen

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Aldrich (München), Amersham (Piscataway, NJ, USA), BioMol (Hamburg), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), OMNI Life Science (Bremen), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) in höchstmöglicher Qualität bezogen.

Das zum Ansetzen sämtlicher Medien verwendete Wasser wurde zuvor über eine Aufbereitungsanlage (Milli-Q Water System, Millipore, Bedford, MA, USA) bis zu einer Qualität von *aqua bidest* aufgereinigt. Pufferlösungen, die für die Arbeit mit Proteinen vorgesehen waren, wurden mit *Aqua ad injectabilia* (Baxter, Lessines, Belgien) angesetzt. Polymerase-Kettenreaktionen sowie Primer-Lösungen wurden mit LiChrosolv-Wasser (Merck, Darmstadt) angesetzt.

Sofern erforderlich, erfolgte eine Sterilisation durch Autoklavieren (30 Minuten, 121°C) in einem Table Top Autoclave Modell 2540 EL der Firma Tuttnauer oder Filtration (Porengröße: 0,22 µM).

Nikotinamid-Adenin-[Adenylat-³²P]-dinukleotid-(³²P-NAD) (~ 37 TBq/mmol) wurden über die Firma GE Healthcare (Buckinghamshire, England) bezogen.

3.4 Medien

Bezeichnung	Komponenten	Hersteller/Lieferant
Bakterien-Kulturen		
LB-Medium		Invitrogen (Karlsruhe)
LB _{Carb} -Medium	LB-Medium 100 µg/ml Carbenicillin	Invitrogen (Karlsruhe) Serva (Heidelberg) BD Difco (Heidelberg)
LB-Agar		
LB _{Carb} -Agar	LB-Agar 100 µg/ml Carbenicillin	Invitrogen (Karlsruhe) Serva (Heidelberg)
2xYT-Medium		BD Difco (Heidelberg)
2xYT _{Carb} -Medium	2xYT-Medium 100 µg/ml Carbenicillin	BD Difco (Heidelberg) Serva (Heidelberg)
2xYT _{Carb/Kan} -Medium	2xYT-Medium 100 µg/ml Carbenicillin 30 µg/ml Kanamycin	BD Difco (Heidelberg) Serva (Heidelberg) Roche (Basel, Schweiz)
2xYT _{Carb/Glu} -Medium	2xYT-Medium 100 µg/ml Carbenicillin 2% Glucose (w/v)	BD Difco (Heidelberg) Serva (Heidelberg)
Eukaryotische Zellkultur		
RPMI1640		GibcoBRL (Karlsruhe)
RPMI1640 (komplett)	RPMI1640 10% Fötale Kälberserum 2 mM L-Glutamin 1 nM Natriumpyruvat	GibcoBRL (Karlsruhe) Biochrom (Berlin) GibcoBRL (Karlsruhe) GibcoBRL (Karlsruhe)

3.5 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Komponenten		Hersteller/Lieferant
Stammlösungen			
AEBSF-Stammlösung	100 mM	AEBSF	MP Biomedicals (Irvine, CA, USA)
Carbenicillin-Stammlösung	100 mg/ml	Carbenicillin	Serva (München)
Geneticin-Stammlösung	50 mg/ml	Geneticin	GibcoBRL (Karlsruhe)
IPTG-Stammlösung	1 M	IPTG	Fermentas (St. Leon-Rot)
Lysozym-Stammlösung	10 mg/ml	Lysozym	Roche (Basel, Schweiz)
Puffer für Arbeiten mit DNA			
DNA-Probenpuffer Orange G (10x)	50%	Glycerol	OMNI Lifescience (Bremen)
	50%	20x TAE	GibcoBRL (Karlsruhe)
	1 Sptl.sp.	Orange G	Merck (Darmstadt)
Puffer für die Proteinbiochemie			
AnnexinV-Bindepuffer (10x)	1,4 M	NaCl	Baker (Deventer, Niederlande)
	25 mM	CaCl ₂	Merck (Darmstadt)
	0,1 M	HEPES	Merck (Darmstadt)
Blockpuffer	10%	Milchpulver in PBS	Roth (Karlsruhe) GibcoBRL (Karlsruhe)
Colloidal Blue Stain Kit Elutionspuffer pH 3.5 (Protein G)	150 mM	NaCl	Invitrogen (Karlsruhe) Baker (Deventer, Niederlande)
	0,58%	Essigsäure pH 3.5 mit Natronlauge	Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt)
Elutionspuffer pH 4.5 (Protein A)	150 mM	NaCl	Baker (Deventer, Niederlande)
	0,58%	Essigsäure pH 4.5 mit Natronlauge	Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt)
Elutionspuffer pH 2.7 (Protein G/A)	0,1 M	Glycin pH 2.7 mit Salzsäure	Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt)
Gel-Dry Drying Solution HBS	120 mM	HEPES	Invitrogen (Karlsruhe)
	150 mM	NaCl	Merck (Darmstadt)
		pH 7.4 mit Salzsäure	Baker (Deventer, Niederlande) Merck (Darmstadt)
IMAC-Waschpuffer	50 mM	Na-Phosphat- Puffer, pH8	Merck (Darmstadt)
	300 mM	NaCl	Baker (Deventer, Niederlande)
	10 mM	Imidazol	Merck (Darmstadt)
IMAC-Elutionspuffer	50 mM	Na-Phosphat- Puffer, pH8	Merck (Darmstadt)
	300 mM	NaCl	Baker (Deventer, Niederlande)
	250 mM	Imidazol	Merck (Darmstadt)
LDS-Ladepuffer			Invitrogen (Karlsruhe)
MES-Laufpuffer			Invitrogen (Karlsruhe)
PBS (D-PBS)			Invitrogen (Karlsruhe)
Transferpuffer			Invitrogen (Karlsruhe)
TS-Lysepuffer	30 mM	TrisHCl, pH 8.0	Merck (Darmstadt)
	20%	Saccharose	Merck (Darmstadt)
	500 mM	AEBSF	MP Biomedicals (Irvine, CA, USA)
	1%	Lysozym	Roche (Basel, Schweiz)

3.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide für den Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion wurden mit Hilfe des Programms „Net Prime“ (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) entworfen und analysiert. Die Synthese wurde durch die Firma MWG (Ebersberg) ausgeführt.

3.6.1 Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation des VHH-Repertoires

Für die Amplifikation des VHH-Repertoires aus der cDNA von peripheren Blut-Leukozyten des Lamas wurden zwei separate Primerpaarungen verwendet:

1. Für VHHs vom IgG2-Subtyp (*long hinge*, lh):

Lamb8: 5'-GCT GGA TTG TTA TTA TCT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC
GAT GTG ACG CTG CAG GCG TCT GGR GGA GG-3'

VH6: 5'-GAT GGT GAT GAT GAT GTG CGG CCG CTG GTT GTG GTT TTG GTG
TCT TGG G-3'

2. Für VHHs vom IgG3-Subtyp (*short hinge*, sh):

Lamb7: 5'-GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG
GTS MAR-3'

VH1: 5'-GAT GGT GAT GAT GAT GAT GTG CGG CCG CTG GTT GTG GTT TTG
GTG TCT TGG G-3'.

3.6.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Für die Sequenzanalyse von Insertionen in den Phagemid-Vektor pHEN2 wurden zwei Primer verwendet: 1. Für die Sequenzanalyse in 5'→3'-Richtung der inserierten DNA, LMB3: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'. 2. Für die Sequenzanalyse in 3'→5'-Richtung des inserierten DNS-Fragments, fdSeq1: 5'-TGA ATT TTC TGT ATG AGG-3'.

3.7 Antikörper

Antikörper/Protein	Spezies	Fluorochrom	Hersteller/Lieferant
Primärantikörper			
anti-etheno-Adenosin	Maus		UKE (Hamburg)
anti-etheno-Adenosin	Maus	Alexa488	UKE (Hamburg)
anti-c-Myc(9E10)	Maus	FITC	Santa Cruz Biotech (Santa Cruze, CA, USA)
anti-Maus	Ratte	FITC	
Sekundärantikörper			
anti-Maus-CD3	Hamster	APC	Pharmingen (Heidelberg)
anti-Maus-CD4	Ratte	APC	Pharmingen (Heidelberg)
Affinie Proteine			
AnnexinV (anti-Phosphatidylserin)		FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)

3.8 Enzyme

Enzym	Hersteller/Lieferant
Restriktionsendonukleasen	
<i>DpnI</i> (20,000 U/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
<i>NotI</i> (10,000 U/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
<i>NcoI</i> (10,000 U/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
DNA-Polymerasen	
KOD Hot Start DNA-Polymerase	Novagen-Merck (Darmstadt)
AmpliTaq GOLD DNA-Polymerase	Applied Biosystems (Forster City, CA, USA)
Andere Enzyme	
Lysozym	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)

3.9 Bakterienstämme

Für die Produktion rekombinanter Phagenpartikel und die Herstellung von Phagen-Bibliotheken wurden *E. coli*-Zellen des Stammes TG1 (Amersham) verwendet. Zellen dieses Stammes besitzen die genetische Information für eine zusätzliche Transfer-RNA, die das Amber Stop-Kodon (TAG) erkennt. Diese veranlasst anstelle des Abbruchs der Proteinbiosynthese den Einbau eines Glutamats in eine neu synthetisierte Polypeptidkette. TG1 ist ein sogenannter „Suppressor-Stamm“. Im Genotyp ist dies mit „*supE*“ vermerkt.

Zur Expression von rekombinanten Einzeldomänen-Antikörpern unter Nutzung des Phagemid-Vektors pHEN2 wurden *E. coli*-Zellen des Stammes HB2151 (Amersham) genutzt. In Zellen dieses Stammes bricht die Proteinbiosynthese am Amber Stop-Kodon (TAG) ab. HB2151 ist ein sogenannter „Nicht-Suppressor-Stamm“.

Für die Transformation von Ligationsansätzen wurden ultrakompetente XL10-GOLD *E. coli*-Zellen (Stratagene) verwendet.

TG1: K12 D(*lac-pro*), *supE*, *thi*, *hsdD5/F'*[*traD36*, *proAB*, *lacIq*, *lacZDM15*]

HB2151: K12 D(*lac-pro*), *ara*, *nalr*, *thi/F'*[*proAB*, *lacIq*, *lacZDM15*]

XL10-Gold: TetrD(*mcrA*)183 D(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacIqZDM15 Tn10* (Tetr) Amy Camr].

3.10 Vektoren

Vektor	Verwendungszweck	Quelle
pHEN2	Phagemid-Vektor Proteinexpression, prokaryotisch	GOLDBAUM FA
pASK60.mART2.2	Proteinexpression, prokaryotisch	
pME18Sneo	Proteinexpression, eukaryotisch	DNAX <i>Research Institute</i>
pME18Sneo.mART2.2	Transfektion genetische Immunisierung	UKE, Institut für Immunologie
pME18Sneo.m-rART2.2	Transfektion	UKE, Institut für Immunologie
pME18Sneo.r-mART2.2	Transfektion	UKE, Institut für Immunologie

3.11 Mausstämme

Mausstamm	Quelle
Balb/cByJ (Wildtyp)	Jackson Laboratory (ME, USA)
Balb/c.CD38KO	FRANCES E. LUND (Trudeau Institute, Saranac Lake, NY, USA)
C57BL/6J (Wildtyp)	Jackson Laboratory (ME, USA)

Alle Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des UKE gezüchtet.

3.12 DC27.10-Lymphomzelllinien

Die T-Zell-Lymphomzelllinie DC27.10 aus der Maus wurde in RPMI1640 (Gibco) unter Zusatz von 5% fetalen Rinderserums (v/v) bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. In dieser Arbeit wurden insgesamt drei stabil transfizierte Varianten des DC27.10-Lymphoms verwendet.

1.) DC27.10_mART2.2: hohes Expressionsniveau von ADP-Ribosyltransferase 2.2 aus der Maus (mART2.2) als GPI-verankertes, membranständiges Zelloberflächenprotein.
2.) DC27.10_m-rART2.2-Chimäre: hohes Expressionsniveau einer Chimären Form der ADP-Ribosyltransferase 2.2. Die N-terminalen 105 Aminosäuren entsprechen der Maus-Sequenz der ART2.2, während die darauf folgenden Aminosäuren 106 bis 225 der Rattensequenz entnommen sind. Auch dieses Protein wird als GPI-verankertes, membranständiges Zelloberflächenprotein exprimiert.
3.) DC27.10_r-mART2.2-Chimäre: hohes Expressionsniveau einer Chimären Form der ADP-Ribosyltransferase 2.2. Die N-terminalen 105 Aminosäuren entsprechen der Ratten-Sequenz der ART2.2, während die darauf folgenden Aminosäuren 106 bis 239 der Mausequenz entnommen sind. Auch dieses Protein wird als GPI-verankertes, membranständiges Zelloberflächenprotein exprimiert.

3.13 Lama „Matahari“

Das Lama Matahari gehört zur Spezies *Lama glama* (Fam. *Camelidae*) und wird in Mecklenburg-Vorpommern auf einem Öko-Bauernhof in einem Holzstall gehalten. Täglich besteht für das Tier die Möglichkeit sich frei auf einer mehrere hundert Quadratmeter großen, eingefriedeten Wiese zu bewegen. Die Haltung erfolgt in einer Gemeinschaft von anfänglich zwei Tieren (Matahari und Aubina). In der Zeit zwischen Herbst 2002 und Sommer 2003 wurde Matahari trächtig (Tragzeit bei Lamas: 10 Monate), sodass es sich nun um eine Herde von drei Tieren handelte (neues Lama: Michi).

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden I

4.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien wurde in LB-Medium oder 2xYT-Medium bei 30°C bzw. 37°C in einem Schüttelinkubator vorgenommen (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Zur Plasmidselektion wurden dem Medium 100 µg/ml Carbenicillin zugegeben.

Die optische Dichte von Flüssigkulturen wurde bei 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe eines UV/Vis Spectrophotometers (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bestimmt.

Festmedien enthielten 1,5% (w/v) Agar und wurden in Petrischalen (Durchmesser: 8,75 cm) eingesetzt.

4.1.2 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Konservierung von Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angelegt. Einem Aliquot der Kultur wurde Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 15% (w/v) zugesetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

4.1.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Hitzeschock-Transformation chemisch ultrakompetenter XL10-GOLD[®]-Zellen der Firma Stratagene wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Andere *E. coli*-Stämme, wie etwa TG1 oder HB2151, wurden in identischer Weise transformiert, doch wurde kein β-Mercaptoethanol zugesetzt.

4.1.4 Arbeiten mit DNA

4.1.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Je nach dem weiteren Verwendungszweck und der benötigten Menge an Plasmid wurden zwei verschiedene Kits zur Präparation angewendet.

Für Sequenzanalysen und Klonierungen wurden *E. coli*-Kulturen eines Volumens von 5 ml kultiviert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) präpariert.

Für die genetische Immunisierung wurden größere Mengen endotoxinfreier Plasmid-DNA benötigt, sodass *E. coli*-Kulturen eines Volumens von 120 bis 150 ml kultiviert und die Plasmide mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) präpariert wurden.

4.1.4.2 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde spektralphotometrisch ermittelt, wobei anschließend die folgende Formel angewendet wurde:

$$\text{Konzentration doppelsträngiger DNA} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung}$$

Als Qualitätsmerkmal galt das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} , welches $\geq 1,8$ sein sollte.

4.1.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus cDNA wurde die DNA-Polymerase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) in Kombination mit entsprechenden Oligonukleotiden verwendet (Tab. 4.1). Als DNA-Matrize diente 1 μl cDNA. Für den Amplifikationsvorgang wurde eine „Tochdown“-PCR programmiert (Tab. 4.2).

Tab. 4.1: Ansatz für eine herkömmliche PCR

PCR-Ansatz (Standard)		
1 µl	cDNA	
0,6 µl	dNTP-Mix, 10 mM pro Nucleotid	Invitrogen
0,5 µl	Primer A, 10 µM	MWG
0,5 µl	Primer B, 10 µM	MWG
2,0 µl	Gold Buffer with MgCl ₂	PerkinElmer
1,0 µl	AmpliTaq Gold PCR-Polymerase	AB
ad 20,0 µl	Aqua ad injectabilia	Baxter

Tab. 4.2: Programm „Tochdown“-PCR

Schritt	Dauer	Temperatur		Zyklenzahl	Rückkehr zu...
1	8'	94°C			
2	1'	95°C			
3	30"	55°C			
4	3'	72°C	→	2	2
5	1'	95°C			
6	30"	50°C			
7	3'	72°C	→	2	5
8	1'	95°C			
9	30"	45°C			
10	3'	72°C	→	2	8
11	1'	95°C			
12	30"	40°C			
13	3'	72°C	→	2	11
14	1'	95°C			
15	30"	40°C			
16	3'	72°C	→	2	14
17	1'	95°C			
18	30"	53.5°C			
19	3'	72°C	→	30	17
20	10'	72°C			
21	∞	4°C			

4.1.4.4 Zielgerichtete PCR-Mutagenese

Für die PCR-Mutagenese, durch die ein oder mehrere Nukleotide in einem Plasmid zielgerichtet verändert werden sollten, wurde die KOD Hot Start Polymerase (Novagen) eingesetzt, eine „*prove reading*“-Polymerase (Tab. 4.3). Die für die Mutagenesen konzipierten Primer waren stets komplementäre Primerpaare. Die zu mutierende Nukleotidfolge wurde von Primerabschnitten von mindestens 15 perfekt mit der Matrize paarenden Nukleotiden flankiert. Es wurde das in Tabelle 4.4 dargestellte Programm „PCR-Mutagenese“ verwendet.

Tab. 4.3: Ansatz für eine KOD-Polymerase PCR

PCR-Ansatz (prove reading polymerase)		
1,0 µl	DNA-Matrize	
5,0 µl	dNTP-Mix, 2 mM pro Nucleotid	Novagen
1,5 µl	Primer A, 10 µM	MWG
1,5 µl	Primer B, 10 µM	MWG
5,0 µl	Buffer for KOD HS DNA Polymerase, 10x	Novagen
3,0 µl	MgSO ₄ , 25 mM	Novagen
1,0 µl	KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen
ad 50 µl	LiCrosolve (Aqua)	Merck

Tab. 4.4: Programm „PCR-Mutagenese“

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl	Rückkehr zu...
1	2'	95°C		
2	20"	95°C		
3	10"	x°C*		
4	20"/kb	70°C	→ 30	2
5	1'	70°C		
6	∞	4°C		

* Die Anlagerungstemperatur ist gleich der niedrigsten T_m eines Primers

Nach der Polymerase-Kettenreaktion wurde dem Ansatz 1 µl *DpnI* (20 U/µl) zugesetzt. Es wurde 2 Stunden bei 37 °C und 20 Minuten bei 65 °C inkubiert. 1 µl des Mutageneseansatzes wurde in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert und auf LB_{Carb}-Agarplatten ausgestrichen. Aus Einzelkolonien wurden 5 ml-Kulturen in LB_{Carb}-Medium angeimpft. Ein Aliquot der Kultur wurde für die Kryokonservierung des Klons verwendet. Aus dem Restvolumen der Kultur wurde nach weiterer Inkubation Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung der Erfolg der Mutagenese überprüft.

4.1.4.5 Restriktionsverdau von DNA

Zur Restriktion von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA wurden 0,5 bis 1 U der entsprechenden Endonuklease pro µg DNA und der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer verwendet. Der Verdau erfolgte bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur im Wasserbad oder im Inkubator.

4.1.4.6 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Proben

Für die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten fand die Elektrophorese mit horizontalen Agarose-Gelen Anwendung (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Je nach Erforderter Trennleistung wurden Agarosekonzentrationen von 0.8% (w/v), 1.0% (w/v) oder 1.5% (w/v) mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) eingesetzt. DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Ladepuffer (10x TAE, 50% (v/v) Glycerol, Orange G) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 30 bis 110 Volt durchgeführt. Nukleinsäurebanden wurden nach Beendigung des Gellaufes über das mit ihnen interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Strahlung analysiert und dokumentiert.

4.1.4.7 DNA-Standard

Als Längen- sowie Massenstandard fand der Marker SmartLadder der Firma Eurogentec (Köln) Verwendung.

4.1.4.8 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der NucleoSpin[®] Extract II-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Es wurde standardmäßig das minimale Elutionsvolumen von 20 µl Aqua a.i. eingesetzt.

4.1.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die während dieser Arbeit durchgeführten Ligationsreaktionen wurde die T4 DNA-Ligase der Firma Invitrogen verwendet. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Es wurde lediglich auch für die Ligation kohäsiver DNA-Enden 1.0 U T4 Ligase eingesetzt.

Zur Berechnung der benötigten Volumina von Plasmidrückgrad- und Insert-Lösung leistete folgendes Internet-Werkzeug gute Dienste: *BioMath Calculator* auf der Homepage von Promega (<http://www.promega.com/biomath/default.htm>).

4.1.4.10 Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (SANGER *et al.*, 1977) im Rahmen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierfür wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotide aus dem ABI PRISM *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gemeinsam mit der AmpliTaq[®] DNA-Polymerase eingesetzt (Programm „Sequenzierung“ s. Tab. 4.5). PCR-Produkte wurden auf dem ABI PRISM 370A *DNA Sequencer* (Applied Biosystems) des Servicelabors des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg analysiert.

Tab. 4.5: Programm „Sequenzierung“

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl	Rückkehr zu...
1	40"	96°C		
2	15"	50°C		
3	4'	60°C	→ 28	1
4	∞	4°C		

4.1.5 Phagen-Display-Technologie

4.1.5.1 Konstruktion von Phagen Display-Bibliotheken

Ausgehend von einer Probe peripheren Blutes des immunisierten Lamas, wurden zunächst die Blut-Lymphozyten isoliert (Verweis), aus ihnen gesamt-RNA gewonnen (Verweise) und eine cDNA-Synthese durchgeführt (Verweis). Auf diese cDNA wurde mit VHH-spezifischen Primerpaarungen (Verweise) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das vorhandene Repertoire an für VHHs kodierenden DNAs amplifiziert (Verweise). Diese DNA-Fragmente wurden mit Endonukleasen behandelt (Verweise), die Schnittmotive

erkannten, die mit den für die Amplifikation verwendeten Primern eingebracht worden waren und in den Phagen Display-Vektor pHEN2 hinein kloniert.

Die Transformation von Aliquots der Ligationsreaktion erfolgte durch Hitzeschock in ultrakompetente XL10-GOLD® *E. coli*-Zellen (Stratagene) (Verweis). Diese Ansätze wurden auf 530 cm²-SOB(Carbenicillin/Glukose)-Platten ausplattiert. Von dieser Platte wurden zufällig Einzelkolonien für die Sequenzanalyse (Verweise) ausgewählt, um so eine Einschätzung der Diversität der Bibliothek zu ermöglichen.

Die folgenden Arbeitsschritte werden als Phagen-Rettung (phage rescue) bezeichnet. Nach der Abschwemmung der Transformations-Platte mit 2xYT(Carbenicillin/Glukose) wurde eine Flüssigkultur angesetzt, die nach einstündiger Kultivierung bei 30°C im Schüttelinkubator mit einem Aliquot des Helfer-Phagen M13KO7 (Amersham, Buckinghamshire) superinfiziert. Eine Stunde nach der Superinfektion wurde die Kultur zentrifugiert und das Pellet für eine ÜN-Kultur bei 30°C im Schüttelinkubator in 2xYT(Carbenicillin/Kanamycin) resuspendiert. Am folgenden Tag befanden sich die rekombinanten, VHH-tragenden Phagen im Kulturüberstand, der durch Zentrifugation und Filtration (0.45 µm) geklärt und von partikulären Bestandteilen befreit wurde. Nach eine Behandlung mit Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000) konnten die Phagenpartikel durch eine hochtourige Zentrifugation (30'/10800 xg) präzipitiert werden. Das in 2 ml sterilem 2xYT-Medium aufgenommene Pellet stellte die Phagen-Bibliothek dar.

4.1.5.2 Festphasen-*Panning* mit mART2.2-HF-Protein

Das Festphasen-*Panning* stellt die konventionelle Art der Selektion im Phagen Display-System dar. Es wurden hierfür 20 µg (1. *Panning*), 10 µg (2. *Panning*) bzw. 2 µg (3. *Panning*) rekombinanten mART2.2 HF-Proteins an den unteren Bereich der Innenwandung eines NUNC™-Immuno™ MaxiSorp StarTubes (PS, 75 x 12 mm 5.0 mL, Nunc) geschichtet (ÜN/4°C). Die danach noch freie Bindekapazität der Polystyrol-Wandung für Protein wurde mit einer 10%igen Milchpulverlösung in PBS abgesättigt.

Vor dem ersten *Panning* wurde ein Aliquot der primären Bibliothek zunächst negativ selektioniert: Inkubation (20'/RT) mit 10%iger Milchpulverlösung (in PBS) sättigt alle gegen Milchpulver reaktiven VHH-Phagen-Partikel mit entsprechendem Antigen ab. Danach wurde zur Durchführung eines Festphasen-*Pannings* der negativ selektionierte Ansatz in das mit 20 µg mART2.2 HF-Protein beschichtete MaxiSorp StarTube überführt

und inkubiert (2,5 h/37°C). Nach intensiver (40x) Waschung mit PBS/Tween20 0.1% wurden 2 ml einer in der *log*-Phase befindlichen *E. coli* TG1-Kultur zu den positiv selektierten VHH-Phagen-Partikeln gegeben. Eine Reinfektion dieser TG1-Zellen durch die rekombinanten Phagen konnte während einer Inkubation (1h/37°C/250 rpm) stattfinden. Schließlich wurden die Zellen pelletiert und nach der Aufnahme in etwa 200 µl 2xYT-Medium auf eine 530 cm² SOB(Carbenicillin/Glucose)-Platte ausplattiert (ÜN/30°C).

Die weiteren Arbeitsschritte stellten wiederum eine Phagen-Rettung (phage rescue) dar und verliefen analog dem oben beschriebenen Vorgehen (Verweis) ab. Insgesamt wurden zwei weitere Selektionsrunden mit 10 µg und 2 µg mART2.2 HF-Protein in der hier beschriebenen Weise durchgeführt.

Die Menge adsorbierten Proteins wurde von Selektionsrunde zu Selektionsrunde sukzessive verknüpft, um verbleibende VHH-tragende Phagenpartikel in größere Konkurrenz um die Anheftungsmöglichkeiten und zueinander treten zu lassen.

4.1.5.3 *Panning* an DC27.10_mART2.2-Lymphomzellen

Nach der Inkubation eines Aliquots der primären VHH-Phagen-Bibliotheken mit 1×10^7 untransfizierten DC27.10-Lymphomzellen (1h/RT; negative Selektion) wurden die Zellen pelletiert und mit ihnen alle VHH-Phagen-Partikel entfernt, die gegen Oberflächenproteine untransfizierter Lymphomzellen reaktiv waren. Der geklärte Überstand wurde in analoger Weise mit 1×10^7 mART2.2-transfizierten DC27.10-Zellen inkubiert (1h/RT; positive Selektion). Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in RPMI1640 resuspendiert und in eine 50 ml-PP-Röhre (Falcon) überführt. Darin wurde es 20x mit 40 ml RPMI1640 gewaschen, dann in eine frische 50 ml-PP-Röhre überführt und wiederum 20x mit 40 ml RPMI1640 gewaschen. Da das mART2.2-Protein auf den Oberflächen der Lymphomzellen mit einem GPI-Anker verankert war, konnten die VHH-Phagen-Partikel mitsamt der mART2.2-Proteine, denen sie anhafteten, durch eine Behandlung mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) von den Zellen getrennt werden (1h/37°C/Schüttler). Durch eine abschließende Zentrifugation wurden die DC27.10-Zellen sedimentiert, der geklärte Überstand in ein frisches Reagiergefäß überführt. Diese Lösung stellt die selektierte VHH-Phagen-Bibliothek dar.

Ein zweites *Panning* an Zellen wurde unter stringenteren Bedingungen durchgeführt. 1×10^6 mART2.2-transfizierte DC27.10-Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C mit einem

Aliquot der zuvor schon einmal Selektierten Phagen-Bibliothek inkubiert. Waschungen und Elution durch PI-PLC-Behandlung wurden wie für das erste *Panning* beschrieben durchgeführt.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

DC27.10-Lymphomzellen (Suspensionszellen) wurden in RPMI-komplett in 10 cm Zellkulturschalen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte durch Verdünnung im Verhältnis 1:5 bis 1:10 im Abstand von zwei bis drei Tagen.

4.2.2 Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten der Maus

6-8 Wochen alte Mäuse werden mit einem 30 % O₂ / 70% CO₂ Gasgemisch betäubt und anschließend mit 100 % CO₂ getötet. Der Maus werden die zervikalen, axillären, inguinalen, mesenterialen und lumbalen Lymphknoten entnommen (Abb. 4.1) und in einer 35 mm Petrischale in eiskaltem RPMI aufgenommen. Um die Lymphozyten aus dem Zellverband freizusetzen werden die Lymphknoten im Medium zwischen zwei NITEX-Membran (70 µM Maschenweite) gelegt und mit einer Pinzette zerrieben. B- und T-Zellen können durch das feinmaschige Gewebe in das Medium flottieren, Hülle und Bindegewebe des Lymphknotens werden zurückgehalten. Die Zellen werden mit dem Medium in eine 50 ml PP-Röhre (Falcon) überführt und mehrfach bei 4°C mit RPMI gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Lymphozyten im jeweiligen Versuch eingestzt.

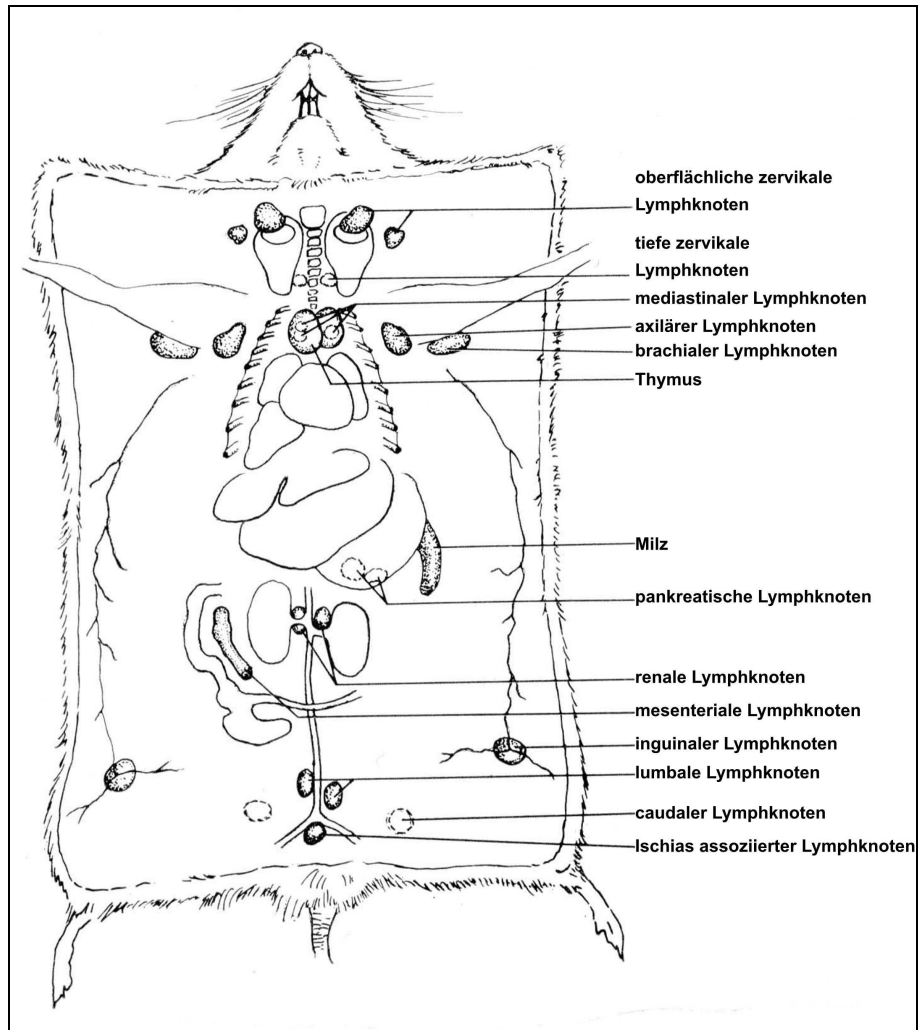


Abb. 4.1: Lymphatische Organe der Maus. Diese Abbildung zeigt die Lage der lymphatischen Organe der Maus: Lymphknoten, Milz und Thymus. Für Gewinnung von Gesamtlymphknotenzellen wurden die oberflächlichen zervikalen, axillären, brachialen, inguinalen, lumbalen und mesenterialen Lymphknoten präpariert. (Modifiziert nach: http://www.eulep.org/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php)

4.2.3 Depletion von B-Zellen

Die Depletion von B-Zellen erfolgt mit Hilfe magnetischer Partikel (*Beads*), an denen Schafantikörper gegen Maus IgG1 immobilisiert sind. Da B-Zellen, nicht aber T-Zelle, über sog. membranständiges „surface“ Immunglobulin (sIg) verfügen, binden die Beads selektiv an B-Zellen. Vor der Verwendung werden die Beads zweimalig mit RPMI gewaschen. Die Menge verwendeter Beads richtet sich nach der angenommenen Zahl der zu depletierenden B-Zellen. Es werden 5 Beads pro B-Zelle eingesetzt, ca. 30 % der Lymphknotenzellen sind B-Zellen. Die Zellen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotationsinkubator inkubiert. In dem sehr starken Magnetfeld eines

Permanentmagneten wird der Komplex aus magnetischen Beads und gebundenen B-Zellen aus der Suspension entfernt. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und der Vorgang ein weitere mal wiederholt. Durch die zweite Depletion werden noch verbliebene B-Zellen entfernt. Die Zahl der aufgereinigten T-Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

4.2.4 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zahl von Zellen in einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, LaborOptik) mit einer Tiefe von 0,1 mm verwendet. Hierbei wurde stellvertretend ein 10 µl-Aliquot einer Suspension untersucht, die Zellzahl in der Ausgangssuspension anschließend rechnerisch bestimmt.

4.3 Immunologische Methoden I

4.3.1 Immunisierung von Lama „Matahari“

Die zweistufige Immunisierungsstrategie für die Induktion einer humoralen Immunantwort des Lamas „Matahari“ bestand aus einer Serie genetischer Vakzinierungen, der Proteinimmunisierungen angeschlossen wurden (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Immunisierungsplan für das Lama „Matahari“

Immunisierung	Tag	Typ
1.	13.09.2000	DNA
2.	11.12.2000	DNA
3.	25.01.2001	DNA
4.	28.03.2001	DNA
5.	16.10.2001	DNA
6.	06.12.2002	DNA
7.	13.03.2002	DNA
8.	06.07.2002	DNA
9.	18.07.2002	Protein
10.	19.08.2002	Protein
11.	23.05.2005	Protein

Für die genetische Immunisierung wurde der eukaryotischen Expressionsvektor pME18Sneo mit einer cDNA-Insertion der ADP-Ribosyltransferase 2.2 aus der Maus in einer ethanolischen Fällungsreaktion auf sphärische Goldpartikel einem Durchmesser von 1,0 μm (Bio-Rad, München) präzipitiert. Unter Verwendung der Tubing Prep Station (Bio-Rad) wurden die so vorbehandelten Goldpartikel ebenmäßig auf der Innenseite von Polypropylenschläuchen aufgebracht. Auf 10 mm Länge zugeschnitten Abschnitte dieser Schläuche dienten als „Patronen“ für eine Helios[®] Gene Gun der Firma Bio-Rad. Die *sub cutane* Injektion von 8-12 μg DNA pro Immunisierung erfolgte durch Gasdruckbeschleunigung der Goldpartikel mit 300-400 psi auf die rasierte Haut am Hals (Immunisierungen 1 bis 4) bzw. mit 600 psi auf die rasierte und durch Aufbringen und Abziehen eines Heftpflasters leicht gereizte Haut des Lamas (Immunisierungen 5 bis 8).

Nach dem Prinzip der genetischen Immunisierung sollten Zellen der Haut, der Muskulatur, oder Antigen präsentierende Zellen (Langerhans-Zellen) bei ihrer Wanderung durch die Epidermis, transfiziert werden. In solchen Fällen würde das Antigen, die mART2.2, schließlich von den Zellen des Lamas selbst exprimiert und in GPI-verankerter Form auf den Zelloberfläche präsentieren werden. Dieses Protokoll war bereits sehr häufig erfolgreich mit Kaninchen und Ratten durchgeführt worden (KOCH-NOLTE *et al.*, 2005).

Für die Proteinimmunisierung (Immunisierungen 9 bis 11) wurden 200-300 μg rekombinanten mART2.2-His6xFLAG-Proteins in 400 μl D-PBS (Gibco) tropfenweise und unter ständiger Durchmischung (Vortex, 1400 U/min) zu 500 μl Specoll Adjuvant (ID-Lelystad, Lelystad, Niederlande) gegeben und anschließend unter ständiger Kühlung (4°C) dreimal kurzzeitig mit Ultraschall behandelt. Die Injektion erfolgte *sub cutan* in den rasierten Hals des Lamas.

Die beiden hier angewendeten Immunisierungsmethoden besaßen den Vorteil, dass stets das nativ gefaltete mART2.2-Protein zur Stimulierung einer Immunantwort vorlag. Die Generierung von mehrheitlich gegen das nativ gefaltete Antigen gerichteten Antikörpern sollte daher im Lama stark begünstigt sein. Damit setzte sich diese Immunisierungsstrategie entscheidend von einer konventionellen Peptid-Immunisierung ab und das Auffinden von Enzym-inhibierenden Antikörpern, ein zentrales Ziels dieser Arbeit, wurde so erst wahrscheinlich.

4.3.2 Blutabnahmen am Lama

Unmittelbar vor jeder Immunisierung, sowie 3 bis 55 Tage nach jeder Immunisierung wurden dem Lama Blutproben entnommen. Die Abnahme von Blut wurde von einem Veterinär ausgeführt und erfolgte aus einer Halsvene (*Vena jugularis externa*) des Lamas in 50 ml-PP-Röhren (Falcon). Solche Röhren waren je nach weiterem Verwendungszweck der Blutprobe unterschiedlich präpariert. Entweder wurden 100 µl Liquemin N 10000 (Hoffman La Roche, Basel) vorgelegt, um später Leukozyten isolieren zu können, oder es wurden zur späteren Gewinnung von Serum keine anti-Koagulantien zugesetzt. Sämtliche Proben wurden auf Eis (4°C) in einem Isoliergefäß in die Hamburger Labors transportiert.

4.3.3 Präparation von Präimmunsereen und Immunsereen

Seren wurden nach der Koagulationsreaktion des Blutes und Entfernung des sogenannten Blutkuchens durch Zentrifugation (2x 10 min/1970-2680 xg/4°C, mit Wechsel des Gefäßes) gewonnen und das Komplementsystem durch Hitze inaktiviert (30 min/65°C). Aliquots zu 4,5 ml wurden in Cryo-Röhrchen (Nunc-Nalgene) verfüllt und zur kurzfristigen Lagerung bei 4°C verwahrt, ansonsten bei -80°C gelagert.

Blutseren, die aus Blutproben unmittelbar vor einer Immunisierung gewonnen wurden, werden als Präimmunsereum (pIS) bezeichnet. Sie dienen im Vergleich mit dem entsprechenden Immunsereum (IS) der Beurteilung der jeweiligen Immunantwort.

Die Zeitpunkte nach den Immunisierungen, zu denen Blutproben abgenommen wurden, aus denen Immunsereen (IS) gewonnen wurden, können Tabelle 4.7 entnommen werden. Die verstrichene Zeit zwischen der ersten genetischen Immunisierung (1. Immunisierung, 13. September 200) und der folgenden Blutabnahme (06. November 200), sowie der Zeitraum zwischen der ersten Protein-Immunisierung (9. Immunisierung, 18. Juli 2002) und der Blutabnahme (01. August 2002) umfassen 44 bzw. 55 Tage, um es dem Immunsystem des Lamas zu erlauben eine voll ausgeprägte Immunantwort zu entwickeln.

Tab. 4.7: Verzeichnis der Präimmunseren und Immunseren

Serumbezeichnung	Tag	Tag nach	Immunsierung
Präimmunserum (pIS)	27.07.2000		
pIS 1	13.09.2000		keine Vorimmunsierung
pIS 2	06.11.2000	55. Tag nach	1.
pIS 3	11.12.2000	10. Tag nach	2.
pIS 4	20.12.2000	15. Tag nach	3.
pIS 5	25.01.2001	10. Tag nach	4.
pIS 6	08.02.2001	08. Tag nach	5.
pIS 7	28.03.2001	08. Tag nach	6.
pIS 8	06.04.2001	13. Tag nach	8.
pIS 9	16.10.2001	44. Tag nach	9.
pIS 10	24.10.2001	04. Tag nach	10.
pIS 11	06.12.2002	10. Tag nach	10.
	13.12.2001	07. Tag nach	11.
	13.03.2002		
	20.03.2002		
	06.07.2002		
	18.07.2002		
	18.07.2002		
	01.08.2002		
	19.08.2002		
	22.08.2002		
	29.08.2002		
	23.05.2005		
	30.05.2005		

pIS = Präimmunserum; IS = Immunserum

4.3.4 Aufreinigung von Immunglobulinen aus Serumproben

Aus Serumproben wurden mittels sequentieller Protein-G- und Protein-A-Säulenchromatographie (Amersham) die verschiedenen IgG-Subklassen des Lamas isoliert. Für die Elution von gebundenem Ig-Protein wurden die pH-Werte der Puffer so gewählt, dass eine Fraktionierung nach Subtypen erfolgte. So wurde von der Protein G-Säule bei pH 3.5 Immunglobulin des long hinge-Typs (IgG2) und bei pH 2.7 konventioneller IgG1-Antikörper, von der Protein A-Säule bei pH 4.5 und 2.7 zwei unterschiedliche Fraktionen des short hing-Immunglobulins (IgG3) eluiert.

4.3.5 Isolierung von Leukozyten aus Vollblut

Die Isolierung von Leukozyten aus Vollblut erfolgte mit Hilfe von Ficoll-Paque Plus (Amersham). Dabei wurde eine 1:1-Mischung von Liquemin-Lamablut mit RPMI1640 (Gibco) in einer 50 ml PP-Röhre (Falcon) über 10 ml Ficoll-Paque Plus geschichtet. Während einer vierzigminütigen Zentrifugation bei 450 xg bei Raumtemperatur und sanften Beschleunigungen durchwanderten Erythrozyten die Ficoll-Schicht und formierten ein rotes Pellet. Leukozyten sammelten sich an der Grenze zwischen Serum/RPMI1640 und Ficoll-Paque und bildeten eine mehr oder minder scharf abgegrenzte weißliche Bande. Die Leukozyten-Fraktion wurde anschließend isoliert abpipettiert und in PBS (Gibco) gewaschen. Nach Ermittlung der Zellzahl (durch Auszählung eines verdünnten Aliquots der Zellsuspension in einer Neubauer-Kammer) wurden Aliquots von 1×10^7 Leukozyten erneut zentrifugiert und in 600 μ l RLT-Puffer (RNeasy Protect Mini Kit, Qiagen, Hilden) resuspendiert. Diese Aliquots wurden entweder bei -80°C eingefroren, oder es erfolgte sofort die Präparation von RNA.

4.4 Molekularbiologische Methoden II

4.4.1 Arbeiten mit RNA

4.4.1.1 Präparation von gesamt-RNA aus Leukozyten

Für die Präparation von gesamt-RNA aus Leukozyten wurden das „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen, Hilden genutzt. Hierbei wurde nach dem Protokoll für die Gewinnung aus tierische Zellen unter Verwendung einer Zentrifuge vorgegangen („RNeasy Mini Handbook“, 3rd Edition, Juni 2001, Qiagen). Als Ausgangsmaterial dienten 1×10^7 Leukozyten, entweder frisch aus Vollblut präpariert, oder aus der -80°C -Lagerung und bereits in RLT-Puffer resuspendiert. Für die Homogenisierung dieser Zellen wurde der Ansatz viermal durch eine Kanüle (0.9 mm Weite) in eine sterile Spritze ausgezogen. Das abschließende Elutionsvolumen RNase-freien Wassers betrug 50 μ l. Für die Beseitigung von Verunreinigungen mit genomischer DNA wurde eine Behandlung mit DNase I (Roche)

durchgeführt. Zur Beurteilung der Qualität der RNA wurde ein 5 µl-Aliquot per Agarose-Gel analysiert.

4.4.1.2 DNase I (RNase-frei)-Behandlung von gesamt-RNA-Präparationen

In dieser Arbeit wurde dem Protokoll von Fermentas (Fermentas Life Sciences, Katalog 2004/05) in leicht abgewandelter Form folgend DNase I (Roche) eingesetzt, um Verunreinigungen mit genomischer DNA aus gesamt RNA-Präparationen zu entfernen.

Tab. 4.8: Ansatz für eine DNase I-Behandlung von RNA-Präparationen

DNase I-Ansatz			
1 µl	Desoxyribonuclease I (RNase-frei), 10 U/µl		Roche
5 µl	NEBuffer 2 (10x)		NEB
40 µl	RNA-Präparation		
1 µl	Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl		Roche
ad 50 µl	Aqua ad injectabilia		Baxter
	→ 30'/37°C		

Unmittelbar vor der Hitzeinaktivierung der DNase I (10 Minuten/ 65°C) wurde zum Schutz der RNA eine EDTA Konzentration von 25 mM im Ansatz eingestellt. Eine Kurzzeitlagerung von RNA wurde bei -20°C vorgenommen, ansonsten wurden diese bei -80°C gelagert.

4.4.1.3 Quantifizierung von RNA

Die Konzentration von RNA wurde spektralphotometrisch ermittelt, wobei anschließend die folgende Formel angewendet wurde:

$$\text{Konzentration einzelsträngiger RNA} = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung}$$

4.4.1.4 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die Synthese von komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) wurden für diese Arbeit unter Verwendung der SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) Ansätze wie in Tabelle 4.9 dargestellt verwendet. Die Synthese-Reaktion lief dann in einer

PCR-Maschine unter Verwendung des Programms „RT-PCR“ (s. Tab. 4.10) ab. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde zunächst durch eine PCR zur Amplifikation eines Haushälter-Gens überprüft. Die Amplifikation des VHH-Repertoires erfolgte mit demselben PCR-Programm.

Tab. 4.9: Ansatz für die cDNA-Synthese mit randomisierten Hexa-Nucleotiden

cDNA-Synthese-Ansatz		
1,0 µg	RNA-Präparation	
0,4 µg	random hexameres	Invitrogen
ad 11,3 µl	Aqua ad injectabilia	Baxter
→	10'/70°C	
1,0 µl	dNTP-Mix, 10 mM pro Nucleotid	Invitrogen
2,5 µl	DDT, 0.1 M	
1,0 µl	Super Script II Reverse Transkriptase, 200 U/µl	Invitrogen
5,0 µl	Reverse Transkriptase-Puffer, 5x	Invitrogen
1,0 µl	RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
ad 50,0 µl	Aqua ad injectabilia	Baxter

Tab. 4.10: Programm „RT-PCR“ für die cDNA-Synthese

Schritt	Dauer	Temperatur
1	10'	24°C
2	20'	42°C
3	2'	95°C
4	∞	4°C

4.4.1.5 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Analysen von RNA wurden mit für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese gebräuchlichen horizontalen Agarose-Gelen (0.8% (w/v), 0.5 µg/ml Ethidiumbromid, 1x TAE-Puffer) durchgeführt. Es wurde auch ein DNA-Ladepuffer verwendet, in dem die RNA-Proben für 3 Minuten bei 65°C denaturiert wurden. Bis zur Beladung der Gele wurde die RNA auf Eis (4°C) gehalten. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 45 Volt durchgeführt. Nukleinsäurebanden wurden nach Beendigung des Gellaufes über das mit ihnen interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Strahlung analysiert und dokumentiert.

4.5 Immunologische Methoden II

4.5.1 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Dieses auch als Durchflusszytometrie bezeichnete Verfahren ermöglicht die Analyse einer großen Zahl von Zellen in kurzer Zeit. Die zu untersuchenden Zellen werden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern oder fluoreszierenden Molekülen oder Farbstoffen angefärbt und durch eine Kapillare gespült, sodass ein Strom einzelner Zellen entsteht. Hierbei werden die Einzelzellen von einem Laserstrahl definierter Wellenlänge bestrahlt. Photodetektoren messen die durch die Zelle verursachte Streuung des Lichtes und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Diese Informationen werden durch einen Computer mit entsprechender Software („*Cellquest pro*“, Becton Dickinson) analysiert und interpretiert.

Bei der Lichtstreuung wird die Vorwärts-Streuung (*Forward Scatter*), die dem Schatten einer angestrahlten Zelle entspricht und ein Maß für ihre Größe darstellt, von der seitliche Streuung (*Side Scatter*), einem Maß für die Granularität der Zelle, unterschieden. Die detektierte Fluoreszenz entspricht in ihrer Intensität der Stärke der Anfärbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern bzw. fluoreszierenden Molekülen. Sie erlaubt daher sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussagen über die Expressionsstärke des entsprechenden Antigens oder Interaktionspartners.

Die Epitope der für solche Untersuchungen eingesetzten Antikörper können sowohl Zelloberflächenproteine als auch Modifikationen an solchen sein. In dieser Arbeit wird die Expression von CD3 bzw. CD4 auf T-Lymphozyten genutzt, um diese innerhalb der aus Lymphknoten gewonnen Zellpopulation von den B-Lymphozyten zu unterscheiden. Der monoklonale Antikörper 1G4 wird verwendet, um Zellen mit etheno-ADP-ribosylierten Oberflächenproteinen von Zellen zu unterscheiden, die keine solchen Modifikationen aufweisen.

Eine weitere Anwendung wird durch fluoreszierende Substanzen ermöglicht, mit denen die Zellen angefärbt werden. So wird das nach außen Kehren des Membranlipides Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran mit Hilfe des hoch affinen Bindungspartners AnnexinV nachgewiesen. Die Anfärbbarkeit mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumjodid lässt auf die Vitalität von Zellen schließen.

4.5.2 Anfärbung von Zellen mit Antikörpern und AnnexinV

Nachweisreaktionen mit Antikörpern wurden in 96-well Platten mit V-Boden (Greiner) an Aliquots von 5×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen pro Ansatz durchgeführt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit 100 μ l eisgekühltem RPMI (Gibco) durchgeführt. Zentrifugationen erfolgten für 5 Minuten bei 4°C und 510 xg. Antikörperinkubationen fanden unter Verwendung von 1 μ g der jeweiligen Fluorochrom-konjugierten Antikörper für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln statt. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper wurde nach der ersten Inkubation und einem Waschschrte, eine zweite Inkubation mit einem entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Ansätze in FACS-Röhrchen überführt, mit RPMI auf ein Volumen von 400 μ l aufgefüllt und mit Propidiumjodid versetzt. Die Interaktion zwischen Phosphatidylserin und AnnexinV ist Kalzium-abhängig. Daher müssen die Zellen bei einer Anfärbung mit AnnexinV in einem speziellen „AnnexinV-Bindepuffer“ mit einer Kalziumkonzentration von 2.5 mM vorliegen.

4.5.3 Untersuchung der mART2.2-Aktivität

4.5.3.1 Enzymatische Aktivität nativer, membranständiger mART2.2

Für den Nachweis von mART2.2-Aktivität wurde das NAD-Analogon etheno-NAD (eNAD) verwendet (Abb. 4.2). Dieses dient wie NAD der mART2.2 als Substrat. Nur tragen die modifizierten Zelloberflächenproteine anschließend etheno-ADP-Ribosylierguppen. Der monoklonale Antikörper 1G4 erkennt die etheno-Adenosingruppe dieser Modifikation und wird, mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, zur deren Detektion im FACS eingesetzt.

In vitro-Untersuchung

Aus den Lymphknoten von C57BL/6J-Mäusen wurden Lymphozyten präpariert, zu 1×10^6 Zellen aliquotiert und für 20 Minuten mit $1 \mu\text{g}$ VHH inkubiert. Nach der Entfernung von nicht gebundenen VHHs durch zweimaliges Waschen der Zellen mit RPMI folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei 37°C mit etheno-NAD ($2 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{l}$ RPMI). Im Anschluss wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und mit $1 \mu\text{g}$ Alexa488-gekoppeltem 1G4-Antikörper, sowie einem anti-CD4-Antikörper für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln angefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen im FACS analysiert.

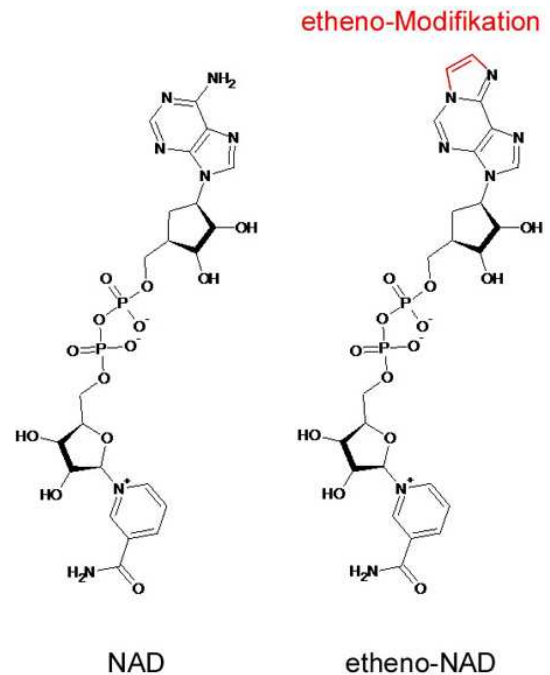


Abb. 4.2: Nikotinamadenindinucleotid (NAD^+) und das Analogon etheno- NAD^+ .

In vivo-Untersuchung

Balb/c CD38KO-Mäusen wurde intravenös eine Dosis von 50 bzw. $300 \mu\text{g}$ VHH-Protein injiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion werden Versuchstiere getötet und Lymphozyten aus den Lymphknoten präpariert. Nach Aliquotierung zu 1×10^6 Zellen und Waschung wurden die Zelle in $100 \mu\text{l}$ warmem RPMI resuspendiert und für 10 Minuten bei 37°C mit etheno-NAD ($2 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{l}$ RPMI) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und mit $1 \mu\text{g}$ Alexa488-gekoppeltem 1G4-Antikörper, sowie einem anti-CD3-Antikörper für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln angefärbt. Danach wurden die Zellen im FACS analysiert.

4.5.3.2 Zytotoxische Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 im NICD

Ist NAD als Substrat für die mART2.2 verfügbar, so ADP-ribosyliert und aktiviert sie den membranständigen zytolytischen Purinorezeptor P2X₇ (ADRIOUCH *et al.*, 2007). Die daraufhin temperaturabhängig bei 37°C ablaufende Signalkaskade bewirkt innerhalb von Sekunden das Auftreten des Membranlipides Phosphatidylserin (PS), eines integralen Bestandteils der Innenseite der Zytoplasmamembran vitaler Zellen, auf der Außenseite der Plasmamembran. Das Phänomen dieses nach außen Kehrens von Phosphatidylserin (PS-*flashing*) wurde vielfach als Merkmal apoptotischer Zellen beschrieben. Langanhaltende P2X₇-Aktivierung durch NAD-abhängige ADP-Ribosylierung führt schließlich zum Tod der Zelle, weshalb dieser Mechanismus als NAD-vermittelter Zelltod (*nicotinamid induced cell death*, NICD) bezeichnet wird (SEMAN *et al.*, 2003).

Die Anzeichen von Apoptose wurden im FACS beobachtet. Eine Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem AnnexinV, einem 35 kDa großen Protein, das sich kalziumabhängig mit hoher Spezifität an PS anlagert, erlaubte die Detektion von PS auf der Zellaußenseite. Der Farbstoff Propidiumjodid (PI) kann die Zellmembran durchdringen, wird von lebenden Zellen jedoch durch aktiven Transport wieder aus dem Zytosol entfernt. Unterbleibt dieser Transport aufgrund der zunehmenden Membrandysfunktion bei toten Zellen, verbleibt das PI in der Zelle und erreicht die DNA im Zellkern. Wenn PI mit DNA interkaliert verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 488 nm nach 535 nm, sein Emissionsmaximum von 590 nm nach 617 nm. Anfärbbarkeit mit PI, respektive Emission bei 590 nm, zeigt den Tod von Zellen an.

In vitro-Untersuchung

Um festzustellen, ob eine VHH durch Bindung an mART2.2 Einfluss auf den Verlauf des NICD nimmt, wurden Lymphozyten aus Lymphknoten von Balb/c-Mäusen präpariert. Nach B-Zell-Depletion wurden Aliquots von 5x10⁵ T-Zellen in einem Volumen von 100 µl RPMI für 20 Minuten mit 1 µg VHH-Protein inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von NAD (Endkonzentration 25 µM). Nach 10 Minuten wurde verbliebenes NAD durch mehrfaches Waschen entfernt und die Zellen schließlich in 100 µl warmem RPMI aufgenommen und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Um eine Detektion von PS mit AnnexinV zu ermöglichen wurden die Zellen schließlich in AnnexinV-Bindepuffer mit

2.5 mM CaCl₂ aufgenommen und AnnexinV und PI zugesetzt. Die Analyse der Anfärbung erfolgte am FACS.

In vivo-Untersuchung

Die *in vivo*-Variante dieses Versuches unterscheidet sich von der *in vitro*-Durchführung dadurch, dass die Interaktion zwischen ART und VHH bereits im Versuchstier stattfindet. Hierzu erfolgte die Injektion von 50 bzw. 300 µg VHH in einem Volumen von 200 µl PBS in die Schwanzvene von Balb/c CD38KO-Mäusen. Die Versuchstiere wurden 15 bzw. 90 Minuten nach der Injektion getötet und anschließend Lymphozyten aus den Lymphknoten präpariert. Da es sich um CD38KO-Tiere handelte, war die Menge des während der Präparation freigesetzten, endogenen NADs ausreichend, um in der gesamten T-Zell-Population den NICD zu induzieren. In FACS-Analysen wurde überprüft, ob der Einzeldomänen-Antikörper in der Lage war den NICD zu verhindern. Rückschlüsse auf die Verweildauer der VHHs im Tier (*in vivo half-life*) ließen die Untersuchungen von Mäusen zu, die zu verschiedenen Zeitpunkten (15 Minuten, 90 Minuten, 6 Stunden, 24 Stunden) nach der Injektion getötet worden waren.

4.5.3.3 ³²P-ADP-Ribosylierung von Agmatin durch mART2.2

Die Arginin-spezifische mART2.2 ist in der Lage das kleine Arginin-Strukturanalogon Agmatin zu ADP-ribosylieren (Abb. 4.3). Wird Agmatin von mART2.2 in Gegenwart von Nikotinamid-Adenin-[Adenylat-³²P]-dinukleotid-(³²P-NAD) ribosyliert, so wird die radioaktive Markierung mit der ADP-Ribosegruppe auf das Agmatin übertragen.

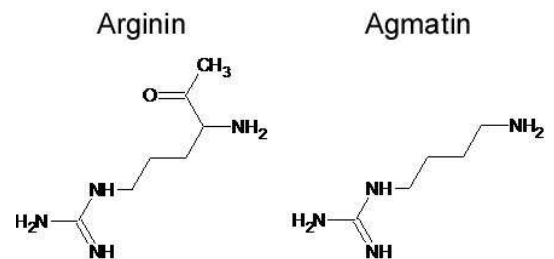


Abb. 4.3: Strukturformeln von Arginin und dem Arginin-Analogon Agmatin.

Dieser Test dient dazu festzustellen, ob eine spezifische VHH in der Lage ist die ³²P-ADP-Ribosylierung von Agmatin durch rekombinante, lösliche mART2.2-His6xFLAG zu verhindern. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe (64 pmol - 0,125 pmol) der zu testenden VHHs in PBS mit 1 µg/µl BSA als Trägerprotein hergestellt.

Die VHH (1 µg - 2 ng) wurden mit 50 ng (1,6 pmol) mART2.2-His6xFLAG für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden Agmatin (Endkonzentration 1 mM) und gleich darauf ³²P-NAD (1 µCi, Endkonzentration 40 nM) zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 20 Minuten bei 37°C und wurde schließlich durch Zugabe von 10 µl *StrataClean Resin* abstoppt, wodurch alle Proteine präzipitiert wurden. Eine kurze Zentrifugation stellte die rasche Abtrennung des Präzipitates sicher, das nach mehrfacher Waschung in PBS schließlich per SDS-PAGE (Verweise) analysiert wurde. Der Überstand wurde in ein separates Reagiergefäß überführt und per Dünnschichtchromatographie untersucht.

4.5.3.4 Dünnschichtchromatographie-Autoradiographie-Analyse

1 µl des zu untersuchenden Reaktions-Überstandes wurde auf den Startpunkt einer DC-Plastikfolie (PEI-Cellulose F, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Ein erster Chromatographielauf erfolgte in 1 M Essigsäure für 3 Minuten. Darauf wurde die DC-Platte in eine weitere Kammer überführt und es erfolgte ein zweiter Lauf mit 0.9 M Essigsäure/0.3 M Lithiumchlorid, der 9 Minuten dauerte. In Folge der unterschiedlichen Laufeigenschaften werden ³²P-ADPR-Agmatin und ³²P-NAD voneinander getrennt: ³²P-ADPR-Agmatin steigt bis in den Bereich der Lauffront des Laufmittels, ³²P-NAD steigt nur etwa halb so weit auf. Beide Verbindungen erzeugen daher in der Autoradiographie Signale in unterschiedlichen Bereichen der DC-Platte.

Nachdem die DC-Platte aus der Laufkammer entnommen und im Luftstrom einer Sicherheitswerkbank getrocknet und eingeschweißt worden war, wurde eine Autoradiographie angefertigt. Die Belichtungsdauer betrug 3 bis 16 Stunden und erfolgte bei -80°C.

Eine computergestützte, densitometrische Auswertung der Autoradiographie erfolgte mit der Software „*AIDA Image Analyzer*“ in der Version dev.3.20.017. Hierfür wurde der entwickelte Film zunächst gescannt, dann die Filmschwärzung an den mit ³²P-ADPR-Agmatin korrespondierenden Bereichen bestimmt. Dabei diente die stärkste Schwärzung als 100%-Wert, alle anderen Signale wurden hierzu in Relation gesetzt.

Die graphische Auswertung dieser Daten wurde mit der Software „*GraphPad Prism 4*“ in der Version 4.03 vorgenommen.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Periplasmalysat von *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten prokaryotischen Expressionsvektoren pHEN2 und pASK60 verfügen über eine Leader-Sequenz (pelB, OmpA), die das rekombinante Protein in den Periplasmatischen Raum der bakteriellen Zellwand leitet. Dieser Weg der Proteinsynthese wurde gewählt, um die reduzierende Umgebung des Zytoplasmas zu vermeiden und in dem nicht reduzierenden Milieu des Periplasmatischen Raumes die native Faltung von Proteine, die über interne Disulphidbrücken verfügen, zu begünstigen. Die Präparation von periplasmatisch exprimierten Proteinen bietet des weiteren den Vorteil, dass verhältnismäßig wenig bakterielles Protein freigesetzt werden. Zur Freisetzung der Proteine wurde der Mureinsacculus durch Lysozym abgebaut, so dass die äußere Membran (*outer membrane*) ihre Integrität verlor.

Für die rekombinante Proteinproduktion wurde zunächst ein Volumen von 5 ml 2xYT_{Carb}-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37°C kultiviert. Wenn diese Vorkultur eine hohe optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) erreicht hatte, wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert und in 5 ml frischem 2xYT_{Carb}-Medium resuspendiert. Die Hauptkultur mit einem Volumen von 800 ml 2xYT_{Carb}-Medium wurde mit der Vorkultur angeimpft und für etwa 3 Stunden bei 37°C kultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0.6 wurde durch Zusatz von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 0.5 bzw. 1 mM die durch den *lac*-Promotor kontrollierte Expression des Transgens induziert. Nach vier bis sechs Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert und das Nassgewicht festgestellt. Pro Gramm bakteriellen Nassgewichts wurden 5 ml eisgekühlten TS-Lysepuffers zugegeben und die Bakterien darin resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4°C wurde das Lysat hochtourig zentrifugiert (30'/43200 xg/4°C). Sphäroblastierte Bakterien und Trümmer der äußeren Membran sowie des Mureinsacculus' wurden so von den in Lösung befindlichen Proteinen abgetrennt. Der Überstand, den man als Periplasmalysat (PPL) bezeichnet, wurde steril filtriert (0.22 µm). Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass keine bakterielle Kontamination verschleppt wurde und verbliebene partikuläre Bestandteile entfernt.

4.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Protein

Für die Analyse von Proteinen in der Gelelektrophorese stand das „Novex“-System der Firma Invitrogen zu Verfügung. Es wurde mit verschiedenen Puffersystemen (MES, MOPS, Tris-Glycin) mit entsprechenden Fertig-Gelen verschiedener Prozentigkeit (10% oder 12 % Bis-Tris-Gele, 4-20% Tris-Glycin) genutzt.

Für die reduzierende SDS-PAGE wurden Proteinproben vor dem Auftragen auf das Gel mit LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und Reduktionsmittel (*Sample reducing Agent*, Invitrogen) versetzt und 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Für nicht-reduzierende SDS-PAGE wurde auf den Zusatz des Reduktionsmittels verzichtet. Nicht-reduzierende, native Gelelektrophorese wurde im Tris-Glycin-Puffersystem durchgeführt. Proteinproben wurden in diesem Fall in einem speziellen Puffer für die native Tris-Glycin-gepufferte Gelelektrophorese aufgenommen und nicht erhitzt.

4.6.3 Coomassie-Anfärbung von Proteinen nach Gelelektrophorese

Zur standardmäßigen Anfärbung von Proteinen in Gelen wurden eine Färbelösung aus 20 ml Methanol, 55 ml Wasser (bidest.) sowie 20 ml der Komponente „*Stainer A*“ und 5 ml „*Stainer B*“ des *Colloidal Blue Staining Kit* (Invitrogen) abgesetzt. Das zu färbende Gel wurde mindestens zehn Stunden in dieser Lösung gebadet. Anschließend wurde das Gel zum Auswaschen von nicht an Proteine gebundener Pigmente in Wasser (bidest.) unter Zugabe eines Aktivkohle-Beutels entfärbt. Zur Konservierung wurde das Gel nach ausreichender Entfärbung für etwa zehn Minuten in *Gel-Dry[®] Drying Solution* (Invitrogen) geschwenkt und anschließend zwischen zwei Blätter Cellophanfolie in einen Trockenrahmen eingespannt und getrocknet.

4.6.4 Silberfärbung von Proteinen nach Gelelektrophorese

Für den sehr sensitiven Nachweis von Proteinmengen bis mindestens 1 ng wurde das *SilverXpress[®] Silver Staining Kit* (Invitrogen) verwendet. Die Nachweismethode dieses Kits basiert auf der Reduktion von Silbernitrat zu metallischem Silber im Bereich von

Proteinbanden. Bei der Durchführung der Färbung wurde den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet.

4.6.5 Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Die immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (*immobilized metal-ion affinity chromatographie*, IMAC) wurde genutzt, um mit einer His6x-Markierung versehene Proteine spezifisch aufzureinigen. Bei der hier verwendeten Ni-NTA-Agarose (Ni-NTA Affinity Gel, P6611, Sigma) liegt Nitrilotriessigsäure (*nitrilotriacetic acid*, NTA) an Agarose-Partikel immobilisiert vor. Ein über fünf Bindungen von der NTA-Gruppe koordiniertes Ni²⁺-Ion ist in der Lage über die sechste, freie Valenz mit der negativen Ladungen eines Histidin-Stickstoff zu interagieren. Die Summe von sechs solcher Interaktionen, über die das His6x-markierte Protein Komplexe mit der Matrix bilden kann, führt zur Anheftung des markierten Proteins an der Matrix.

Die Beladung der Matrix mit His6x-markiertem Protein wird in einem Milieu von 50 mM Natrium-Phosphat, pH 8 und 300 mM Natriumchlorid durchgeführt. Die Beseitigung von nicht His6x-markierten Proteinen erfolgte durch Waschung mit IMAC-Waschpuffer. Imidazol, ein Strukturanalogon der Histidin-Seitenkette, kompetetiert Histidin aus der Interaktion mit dem Nickel-Ion der Matrix. Jedoch ist Imidazol in einer Konzentration von 10 mM nicht in der Lage alle sechs Histidine eines His6x-tags zugleich aus solchen Komplexen zu verdrängen. Nur über weniger Interaktionen anhaftende Proteine werden entfernt. Die Elution des gewünschten His6x-markierten Proteins wird erst mit einer Imidazol-Konzentration von 250 mM effizient durchgeführt (IMAC-Elutionspuffer).

4.6.6 M2-Agarose-Affinitätschromatographie

Der monoklonale M2-Antikörper, der sich gegen das FLAG-Epitop, eine acht Aminosäuren lange Peptidsequenz (DYKDDDDK) richtet, ist im ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (A2220, Sigma) an Agarose-Partikel immobilisiert. Hier wurde diese Matrix in Säulenform eingesetzt, Equilibrierungs-, Elutions- und Neutralisierungspuffer wurden gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt.

4.6.7 Quantifizierung von Protein

Für die schnelle und ressourcenschonende Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein UV/Vis-Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 (Vertrieb in Deutschland durch peqlab, Erlangen) eingesetzt. Über die A_{280} wurde unter Berücksichtigung des proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten (*Protein Extinction Coefficient Calculator*, BioMol Homepage: <http://www.biomol.net/tools-protein-extinction-coefficient.php>) die Proteinkonzentration der untersuchten Probe berechnet.

$$c = A_{280} \times M_W / \epsilon$$

c = Konzentration des Proteins [g/L]

A_{280} = Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm [cm^{-1}]

M_W = Molekulargewicht des untersuchten Proteins [g/M]

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{L} \times \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]

4.6.8 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Die schnelle Protein-Chromatographie (Fast Protein Liquid Chromatographie, FPLC) ist ein säulenchromatographisches Verfahren, das zur Aufreinigung einzelner Proteinfraktionen aus komplexen Proteingemischen wie etwa Zelllysaten eingesetzt wird.

Für diese Arbeit wurde eine FPLC-Anlage zur Durchführung von Gelfiltrations-Chromatographien genutzt. Das System bestand aus dem ÄKTAp_{prime} (Amersham Pharmacia Biotech) Pumpen-/Kontrollmodul mit integriertem UV-Detektor (automatische Messung der A_{280}), Leitfähigkeitsdetektor und Fraktionssammler und wurde in Verbindung mit einer Gelfiltrationssäule HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare) betrieben. Die Versuchsdokumentation fand durch einen Plotter REC112 (Amersham Pharmacia Biotech) statt. Die für die Gelfiltrations-Chromatographie verwendeten Systemeinstellungen sind in Tabelle 12 angegeben. Die Einstellungen des Plotters wurden

wie folgt vorgenommen: Papiervortrieb (*chart speed*) 1 mm/min, Ausschlagweite (*range*) 5 V.

Tab. 4.11: FPLC-Systemeinstellungen für Gelfiltrations-Chromatographie

Parameter	Einstellung
Method Base	(ml)
Concentration %B	(0 %B)
Gradient	(Off)
Flow Rate	(1 ml/min)
Fraction Base	(ml)
Fraction Size	(1 ml)
Pressure Limit	(0.6 MPa)
Buffer Valve Pos	(Pos 1)
Inject Valve Pos	(Inject)

5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte.

Im ersten Abschnitt wird die Generierung und Charakterisierung einer VHH-Phagen-Display-Bibliothek beschrieben, die das VHH-Repertoire aus einer Blutprobe eines mit mART2.2 immunisierten Lamas repräsentiert. Durch Sequenzanalysen von Phagen-Klonen wurden Einblicke in die primärstrukturellen Eigenschaften von VHH-Proteinen gewonnen. Durch Festphasen-*Panning* bzw. Selektion an transfizierten Lymphomzellen wurden vier mART2.2-spezifische Einzelketten-Antikörper selektiert, die alle mART2.2 hochspezifisch binden. Diese wurden rekombinant in *E. coli* produziert. Bei der Durchführung von drei ADP-Ribosylierungs-Tests zeigt sich, dass drei der selektierten VHH-Domänen die Aktivität sowohl der membranständigen, als auch der löslichen mART2.2 effizient inhibieren. Eine solche Inhibition der mART2.2-Aktivität konnte auch *in vivo* nach Injektion eines mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörpers in Mäusen festgestellt werden.

Im zweiten Abschnitt wird eine weitere VHH-Phagen-Display-Bibliothek charakterisiert, die nach einer Auffrischungsimmunisierung des Lamas konstruiert wurde. Dabei fiel auf, dass bereits in der primären Bibliothek viele mART2.2-spezifische Klone vorhanden sind. Diese weisen sehr große Sequenzähnlichkeiten mit den vier zuvor entdeckten mART2.2-Inhibitoren auf. In mehreren Fällen konnte ein Subklassenwechsel (*sub-class switch*) vom Schwere-Ketten-IgG3- zum Schwere-Ketten-IgG2-Isotyp festgestellt werden.

Der dritte Abschnitt beschreibt die rekombinante Großproduktion und Aufreinigung von Einzeldomänen-Antikörpern und mART2.2 mit dem Ziel, einen Komplex aus VHH und ART zu kristallisieren. Die Durchmusterung von 864 Kristallisationsbedingungen zeigte zwei für die Kristallisation geeignete Bedingungen und bietet damit eine Basis für künftige Strukturanalysen.

5.1 Isolierung und Charakterisierung von vier mART2.2-spezifischen Lama Einzeldomänen-Antikörpern (VHHs) aus Phagen-Display-Bibliotheken eines immunisierten Lamas

5.1.1 Induktion von mART2.2-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörpern durch kombinierte DNA-/Protein-Immunsierung

Um Schwere-Ketten-Antikörper gegen die ADP-Ribosyltransferase 2.2 aus der Maus (mART2.2) zu induzieren, wurde ein Lama (*Llama glama*) initialisierend genetisch immunisiert (1. bis 8. Immunisierung). Anschließend wurde die Immunisierungreihe durch subkutane Injektion rekombinanten mART2.2-Proteins ergänzt (9. bis 11. Immunisierung). Unmittelbar vor und 3 bis 15 Tage nach jeder Immunisierung wurden dem Lama 20 bis 100 ml peripheres Blut abgenommen. Das vor der Grundimmunisierung gewonnene Präimmunsersum (pIS) bzw. das nach der zehnten Immunisierung gewonnene Immunsersum

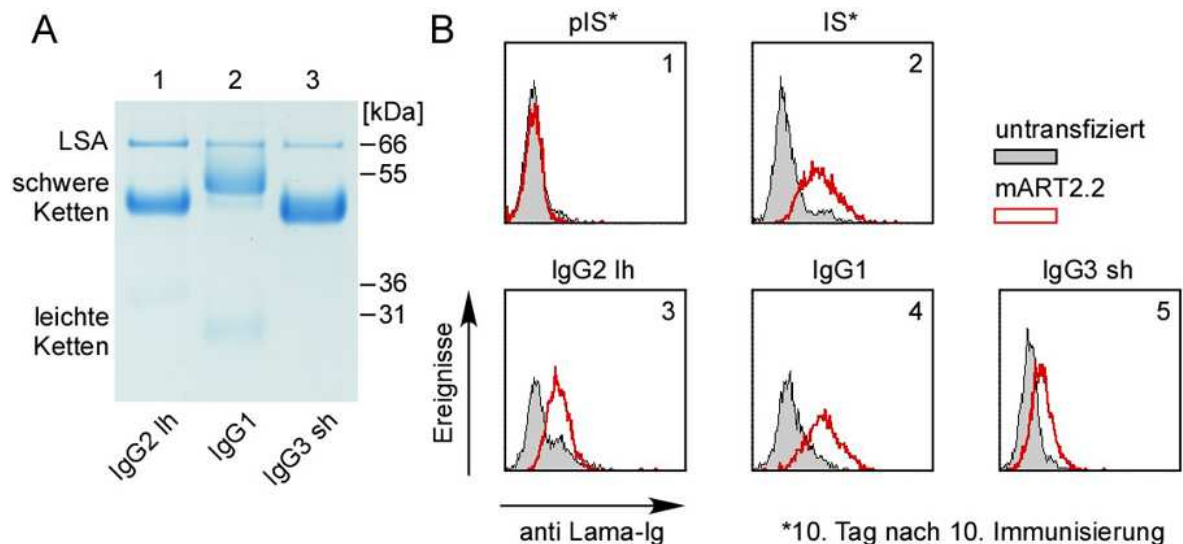


Abb. 5.1: Immunsersum und aufgereinigte IgG-Subklassen des mit mART2.2 immunisierten Lamas reagieren mit mART2.2-transfizierten, aber nicht mit untransfizierte Lymphomzellen. A) SDS-PAGE-Analyse von an Protein A und G aus Lama-Serum aufgereinigten Immunglobulinen. Die für Kameliden spezifischen Schwere-Ketten-Antikörper IgG2 (Spur 1) und IgG3 (Spur 3) sind Homodimere und zerfallen unter reduzierenden Bedingungen in schwere Ketten von ca. 45 kDa Größe. Konventionelle IgG1 (Spur 2) weisen schwere Ketten von 50 kDa und leichte Ketten von 25 kDa auf. lh: long hinge, sh: short hinge, LSA: lama serum albumin. B) Untransfizierte und mART2.2-tranfizierte DC27.10-Lymphomzellen wurden mit Präimmunsersum (1:1000, Tafel 1) und Immunsersum (1:1000, Tafel 2) oder aufgereinigten Lama-IgG-Subklassen (1 µg/ml, Tafeln 3-5) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit FITC-konjugiertem Ziege anti-Lama IgG detektiert.

(IS), sowie aus diesen Seren über sequenzielle Protein G- und Protein A-Chromatographie isolierte Immunglobulin-Subklassen (Abb. 5.1A), wurden auf ihre Reaktivität gegen mART2.2 getestet.

Diese durchflußzytometrischen Analysen (FACS-Analyse) wurden an stabil mit mART2.2 transfizierten DC27.10-Lymphomzellen durchgeführt, die das Antigen über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankert und in großer Kopienzahl auf der Zelloberfläche exprimieren (Abb. 5.1 B). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen eine starke Reaktivität des Immuserums, jedoch nicht des Präimmuserums. Alle untersuchten Immunglobulin-Subklassen, konventionelle IgG1, sowie die kameliden Schwere-Ketten-Antikörper vom IgG2- und IgG3-Isotyp, waren an dieser humoralen Immunantwort beteiligt.

5.1.2 Charakterisierung der Primärbibliotheken

Nachdem festgestellt worden war, dass das Lama Schwere-Ketten-Antikörper gegen mART2.2 generiert hatte, wurde aus Leukozyten einer peripheren Blutprobe des Lamas vom 10. Tag nach der 10. Immunisierung zunächst RNA isoliert, dann cDNA synthetisiert und schließlich das Repertoire an IgG2-(*long hinge*-) und IgG3-(*short hinge*-) VHH-Domänen mittels spezifischer Oligonukleotide in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (Abb. 5.2).

Die Amplifikate wurden in den Phagemid-Vektor pHEN2 ligiert und in TG1-*E. coli*-Zellen transformiert. Aus den zunächst generierten Bibliotheken „*long hinge* 1“ (lh1, 8×10^3 Klone) und „*short hinge* 1“ (sh1, 7×10^3 Klone) wurden zufällig ausgewählte Einzelklone einer Sequenzanalyse unterzogen (Abb. 5.3). Der Sequenzvergleich zeigte, dass die Bibliotheken eine hohe Diversität aufwiesen: Von den 58 untersuchten Sequenzen kommt keine mehrfach vor. Es sind

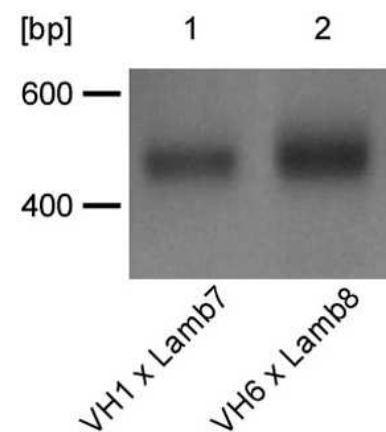


Abb. 5.2: PCR-Amplifikation des VHH-Repertoires aus Lymphozyten-cDNA. Mit Hilfe der Primerpaarungen VH1 x Lamb7 und VH6 x Lamb8 wurden PCR-Amplifikate einer Länge von etwa 500 Basenpaaren (bp) aus Lymphozyten-cDNA erzeugt, die für die N-terminalen VHH-Domänen der Lama-IgG2- (*short hinge*, Spalte 1) bzw. Lama-IgG3-Ketten (*long hinge*, Spalte 2) kodieren.

mART2.2-inhibierende Lama-Einzeldomänen-Antikörper

Table with 3 columns: ID (e.g., JR0272_s-03), Sequence (e.g., QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS...), and CDR3 region (e.g., ...SASFLAWYRQAPGK...).

Abb. 5.3 (Vorseite): Vergleich von VHH-Aminosäuresequenzen der primären Phagen-Bibliotheken (10. Tag nach 10. Immunisierung) - Seite 1/2. Die Klone sind nach ihrer Zugehörigkeit zum IgG3 short hinge- bzw. IgG2 long hinge-Istotyp, der CDR3-Länge, sowie dem Vorhandensein oder Fehlen eines zusätzlichen Cysteinpaares sortiert. Farbliche Kodierung: Cysteine = gelb unterlegt, CDR1 = rot, CDR2 = grün, CDR3 = blau. Nummerierung der Aminosäuren nach KABAT *et al.*, 1991.

Der Name eines Klons setzt sich aus einer fortlaufenden Nummer, Istotyp (s = short hinge IgG3; l = long hinge IgG2; c = konventioneller IgG1), Vorhandensein (+) oder Fehlen (-) eines zusätzlichen Cysteinpaares und der Länge der CDR3 (3-22 Aminosäuren) zusammen. ±: Klone mit nur einem zusätzlichen Cystein (in CDR2 oder CDR3); *: Klone mit einer Leserastermutation.

CDR3-Längen von drei bis 22 Aminosäuren vertreten. Von wenigen Ausnahmen abgesehen enthalten die Bereiche zwischen CDR1 und CDR2, die *framework regions 2* (FR2), das charakteristische hydrophile Aminosäuremotiv der VHHs. An dieser Stelle weisen konventionelle V_H-Domänen eine Folge hydrophober Aminosäuren auf, die die Interaktion mit V_L-Domänen eingehen (Aminosäurereste 37, 44, 45 und 47). An Hand dieser hydrophoben Motive wurden zwei V_H-Domänen identifiziert, die vermutlich als Nebenprodukte der PCR-Reaktion in die Bibliothek gelangt sind (Abb. 3, unten: JR0493_c-09, Motiv IGLW und JR0279_c-17, Motiv VGLW). Etwa 40% der Klone enthalten ein Cysteinpaar, das eine zusätzliche Disulfidbrücke formieren kann, die den vorderen Teil der CDR2 mit einer variierenden Position in der CDR3 verbindet. Alle übrigen Klone verfügen nur über das kanonische Cysteinpaar, das stets zwischen der FR1 und der FR3 ausgebildet ist.

Drei Konstrukte kodieren lediglich für ein einzelnes zusätzliches Cystein. Diese lassen sich jedoch nicht exprimieren (Abb. 5.5). Diese Klone werden im Hinblick auf ihre Cystein-Ausstattung mit „±“ gekennzeichnet. In drei anderen Konstrukten kann eine Leserastermutation festgestellt werden, die ebenfalls dazu führt, dass sich diese Klone nicht exprimieren lassen. In allen drei Fällen liegt die durch Mutation betroffene Sequenz im Bereich des Oligonukleotids, das für die Amplifikation aus cDNA genutzt wurde. Es ist wahrscheinlich, dass es durch Anlagerung eines inkorrekten Oligonukleotids zum *frame shift* gekommen ist.

Nachdem die Qualität der Bibliotheken lh1 und sh1 sichergestellt worden war, wurden auch die verbliebenen 15 µl der Ligationsansätze in TG1-Zellen transformiert. Die hieraus resultierenden Bibliotheken „long hinge 2“ und „short hinge 2“ umfassen jeweils etwa 3x10⁴ Klone. Die mit den zuvor getesteten Bibliotheken vergleichbare Qualität von lh2 und sh2 wurde ebenfalls durch Sequenzanalysen überprüft und bestätigt.

5.1.3 Analyse der CDR3-Längen von VHHs

Eine vergleichende Analyse aller verfügbarer VHH-Sequenzen wies eine zweigipflige Verteilung der CDR3-Längen auf (Abb. 5.4). Acht bis neun Aminosäuren, wie sie bei Antikörpern der Maus in der CDR3H typischerweise gefunden werden, wurden relativ häufig gefunden. Bei den hier untersuchten Klonen zeichnet sich jedoch ein zweites, noch stärker ausgeprägtes Maximum bei einer Länge von 15 bis 16 Aminosäuren ab.

Lange CDR3s sind bevorzugt in VHH-Domänen anzutreffen, die auch über ein zusätzliches Cysteinpaar verfügen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen CDR2 und CDR3 ein bevorzugtes Mittel zur Stabilisierung langer CDR3-Schleifen ist. Auch zwei der im Verlauf der vorliegenden Arbeit selektierten mART2.2-spezifischen VHHs verfügen über eine zusätzliche Disulfidbrücke in Verbindung mit langen CDR3s von jeweils 16 Aminosäuren.

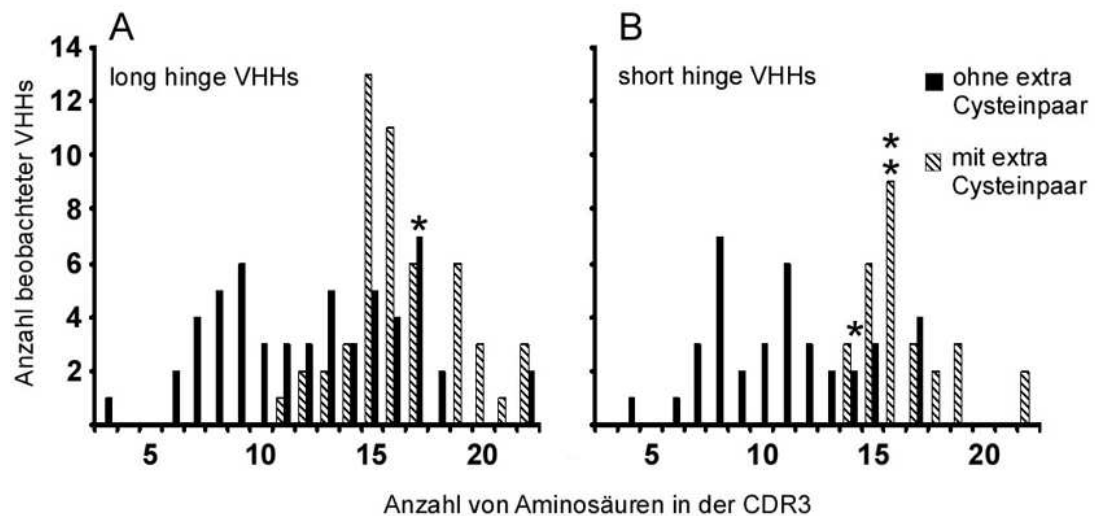


Abb. 5.4: VHH-Domänen verfügen über überdurchschnittlich lange CDR3s. Die Sequenzen zufällig ausgewählter *long hinge*- (links) und *short hinge*-VHH-Klone (rechts) wurde im Hinblick auf ihre CDR3-Längen untersucht. Die Höhe der Säulen im Diagramm stellt die Anzahl beobachteter VHHs dar, die über eine darunter angegebene Anzahl Aminosäuren innerhalb der CDR3s verfügen.

VHHs, die lediglich das kanonische Cysteinpaar enthalten, sind als schwarze Säulen dargestellt. VHHs, die darüber hinaus ein zusätzliches Cysteinpaar aufweisen, sind als gestreifte Säulen dargestellt. Zusätzliche Cysteinpaare finden sich gehäuft in VHHs mit überdurchschnittlich langen CDR3s. Sterne (*) markieren die Lage von im Verlauf der vorliegenden Arbeit aufgefundenen mART2.2-spezifische VHHs innerhalb des Diagramms.

5.1.4 Expressionstest mit zufällig ausgewählten Klonen der Primärbibliotheken

Noch vor der Durchführung der Selektion der Primärbibliotheken am Zielantigen wurde durch Expressionsstudien getestet, ob die Klone in dem verwendeten *E. coli*-System exprimierbar waren (Abb. 5.5). Dabei stellt sich heraus, dass in den meisten, jedoch nicht allen Kulturen auf hohem Niveau Einzeldomänen-Antikörper exprimiert wurden. In den meisten Fällen konnte die schlechte Expression einzelner Klone auf Leserastermutationen (Abb. 5.5, Spuren 5, 19, 24) oder das Vorkommen eines unpaaren Extra-Cysteins (Abb. 5.5, Spuren 17, 34) zurückgeführt werden.

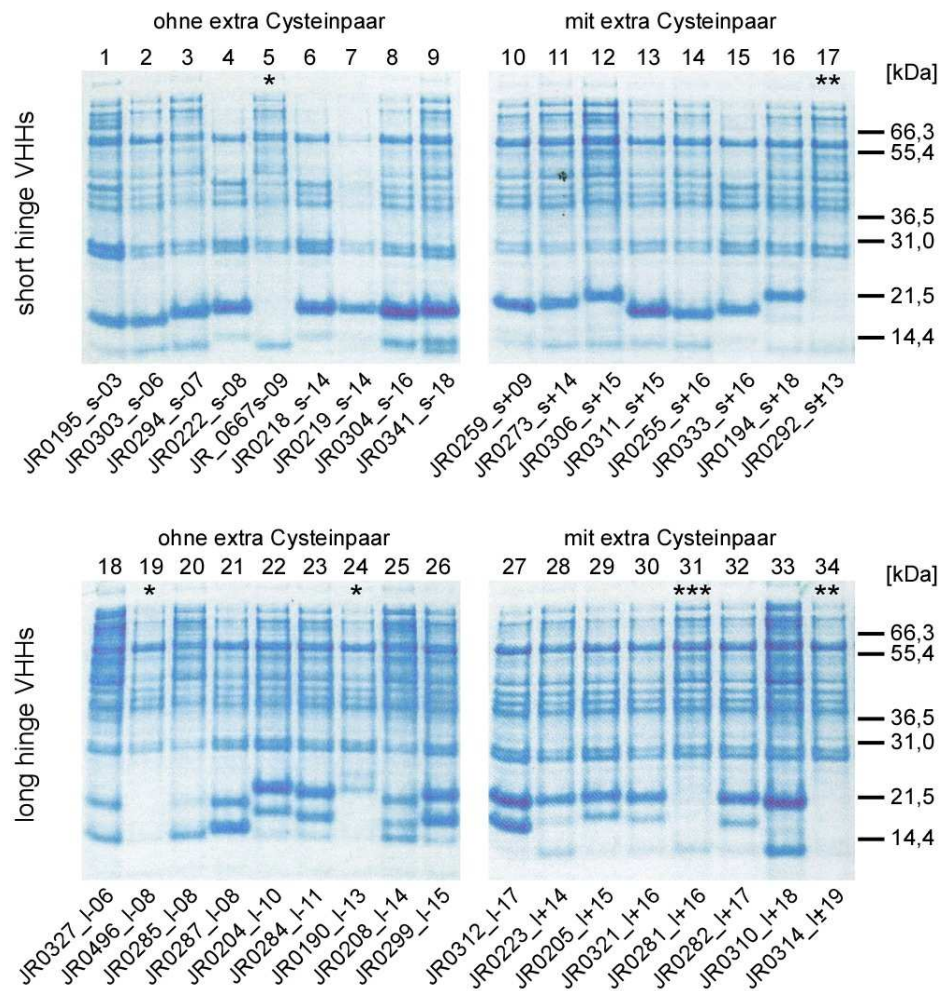


Abb. 5.5: Rekombinante Produktion von Einzeldomänen-Antikörpern in *E. coli*. Von *short hinge*- bzw. *long hinge*-VHHs ohne bzw. mit zusätzlichem Cysteinpaar wurden Periplasmalysate in *E. coli* hergestellt. In der SDS-PAGE-Analyse zeigen sich die VHH-Proteine als starke Banden im Bereich von 15 bis 20 kDa. In einigen Fällen ist kein VHH-Protein sichtbar, was zum Teil auf Leserastermutationen (*) beruht, aber auch auf die Anwesenheit nur eines einzelnen zusätzlichen Cysteins (**) zurückzuführen ist. Nur in einem Fall (***) konnte kein offensichtlicher Grund für den negativen Ausgang des Nachweises gefunden werden.

5.1.5 Selektion und Sequenzanalyse von mART2.2-spezifischen VHHs aus Phagen-Display-Bibliotheken (10. Tag nach 10. Immunisierung)

Die Phagen-Bibliotheken lh1 und sh1 wurden in einem Festphasen-*Panning* eingesetzt. Hierfür wurde rekombinant hergestelltes mART2.2-Protein an den Wänden von MaxiSorb-Röhrchen (NUNC) immobilisiert. Während der drei Selektionsrunden wurde die Menge immobilisierten Proteins sukzessiv von 20 µg über 10 µg auf 2 µg vermindert, um einen stetig steigenden Selektionsdruck für Bindung an das Antigen zu erzeugen.

Die Phagen-Bibliotheken lh2 und sh2 wurden einer Selektion an mART2.2-transfizierten Lymphomzellen unterzogen. Eine Erhöhung des Selektionsdruckes wurde durch Verringerung der Zahl eingesetzter Lymphomzellen von 1×10^7 auf 1×10^6 erreicht.

Die stichprobenartige Sequenzanalyse von selektierten Phagen zeigten, dass vier distinkte Klone angereichert wurden, die z. T. 100% der aus der jeweiligen Bibliothek isolierten Phagen ausmachten (s. Tab. 5.1). Diese vier Klone bekamen eine laufende Nummer und wurden nach ihrer Zugehörigkeit zum IgG3 (*short hinge*-) bzw. IgG2 (*long hinge*-) Isotyp mit „s“ oder „l“, dem Vorhandensein oder Fehlen eines zusätzlichen Cysteinopaars mit „+“ oder „-“ und der Anzahl der in der CDR3 enthaltenen Aminosäuren benannt: JR0337_s-14, JR0345_s+16a, JR0872_s+16b und JR0742_l-17. Die Analyse der früher erhaltenen Sequenzen ergab, dass keiner der vier selektierten Klone in den Primärbibliotheken angetroffen worden war, wohl aber bereits nach den ersten Selektionsrunden. Bereits nach der zweiten Selektion an mART2.2-transfizierten Zellen waren erhebliche Anteile des vertretenen VHH-Repertoires auf diese vier Klone beschränkt.

Von den vier putativ mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörpern (Abb. 5.6) weisen drei lange CDR3s mit 16 und 17 Aminosäuren auf, zwei von ihnen verfügen darüber hinaus über ein zusätzliches Cysteinpaar, das eine Disulfidbrücke zwischen der CDR2 und der CDR3 ausbilden kann (JR0345_s+16a und JR0872_s+16b). Die Lage der Cysteine innerhalb der CDRs ist bei diesen VHHs identisch. Die CDR-Sequenzen selbst weisen eine begrenzte Ähnlichkeit auf. Innerhalb der CDR1 sind vier von neun Positionen identisch besetzt, in der CDR2 sechs von acht und in der CDR3 neun von 16. JR0742_l-17 ist der einzige Klon vom *long hinge*-Typ. JR0337_s-14 ist der Klon mit der kürzesten CDR3.

Tab. 5.1: Selektion der Phagen-Bibliotheken an mART2.2 bewirkt die spezifische Anreicherung von vier VHHs. Die zwei Phagen-Bibliotheken „*long hinge 1*“ (lh1) und „*short hinge1*“ (sh1) wurden in einem Festphasen-Panning mit sukzessiv abnehmender Menge mART2.2-Protein eingesetzt (A). Die Bibliotheken „*long hinge 2*“ (lh2) und „*short hinge 2*“ (sh2) wurden einer Selektion an mART2.2-transfizierten Lymphomzellen unterzogen (B). Sowohl aus den Primärbibliotheken, als auch aus den selektierten Bibliotheken wurden stichprobenartig Einzelklone analysiert. Die Tabelle zeigt die Häufigkeit der später als mART2.2-spezifisch identifizierten VHHs unter diesen Klonen.

A

Häufigkeit der Klone in der Bibliothek					
Bibliothek Klon	Primär- bibliothek	nach 1.Panning	nach 2. Panning	nach 3. Panning	Bibliotheks- größe
long hinge 1 JR0742_l-17	0	0	0	0	
Summe putative mART2.2-spezifischer Klone	0	0	0	0	
Summe aller analysierter Klone	23	7	8	9	8x10³
short hinge 1 JR0337_s-14	0	1	3	0	
JR0345_s+16a	0	6	6	8	
JR0872_s+16b	0	0	0	0	
Summe putative mART2.2-spezifischer Klone	0	7	9	8	
Summe aller analysierter Klone	25	8	9	8	7x10³

B

Häufigkeit der Klone in der Bibliothek					
Bibliothek Klon	Primär- bibliothek	nach 1.Panning	nach 2. Panning	nach 3. Panning	Bibliotheks- größe
long hinge 2 JR0742_l-17	0	73	24	19	
Summe putative mART2.2-spezifischer Klone	0	73	24	19	
Summe aller analysierter Klone	8	104	25	19	3x10⁴
short hinge 2 JR0337_s-14	0	0	0	0	
JR0345_s+16a	0	0	0	4	
JR0872_s+16b	0	2	4	12	
Summe putative mART2.2-spezifischer Klone	0	2	4	16	
Summe aller analysierter Klone	5	100	14	16	3x10⁴

mART2.2-inhibierende Lama-Einzeldomänen-Antikörper

```
-----|10-----|20-----|30-----|40-----|50a-----|60-----
JR0337_s-14  QVQLQQSGGGLVQAGGSLTSLCRVSGTHTFPIRPLAWYRQAPGKERELVASISAGHVTNYNVA-VEGRFII 69
JR0345_s+16a QVQLQESGGGLVQPGGALRLSCAASGLTLADTATGWFRQAPGKEREWVACISRRKAGTFYADSLKDRFTI 70
JR0872_s+16b QVQLQESGGGLVQPGGSLRSLSCVASGTDLESYATGWFRQAPGKEREWVSCISRRNSGSFTADSVKGRFTI 70
JR0742_l-17  DVQLQASGGGLVQAGGSQRLSCAASGRIGIIGAMNWIYRQAPGKDELVAITLDDRG-RTYYADSVRGRFTI 69
:**** *::::**:: *** ** . *:*:*****:** *:: .: . :..** *
                    FR1                     CDR1                     FR2                     CDR2

|70-----ab-|80abc-----|90-----100|abcdefghi-----|110-
JR0337_s-14  SRDNYKDTV--YLMNNVKPEDTAVYLCNLGPATMSTDFRPT---DFWGGQTQVTVSSA 123
JR0345_s+16a SRDQSVNNTV--YLQIISLKPDDTANYVCVQIIPFCNEFMRGDLDR-AILGQGTQVTVASA 126
JR0872_s+16b SRDNAKNTV--YLMNSLQPEDTAVYICVWNGFCNEQKSGALDR-AYWGGQTQVIVSSA 126
JR0742_l-17  SRDKTTNTVTLYLQMNLSKLEDTAVYYCHVLDVAEVRSYDDLDSDYWGQGTQVTVSSE 128
***. :** **:: .:: :*** * * * ***** *:*
                    FR3                     CDR3                     FR4
```

Abb. 5.6: Aminosäuresequenzen der vier als mART2.2-spezifisch identifizierten VHH-Klone. Farbliche Kodierung: CDR1: rot, CDR2: grün, CDR3: blau, kanonisches Cysteinpaar (Pos. 22, 92) und extra Cysteinpaar (Pos. 50, 98): gelb, charakteristisches Motiv hydrophiler Aminosäurereste (Pos. 37, 44, 45 und 47) im FR2: pink, durch Primer determinierte Sequenzen: grau. (CDR = complementarity determining region, FR = framework region) Nummerierung der Aminosäuren nach KABAT *et al.*, 1991. [Alignment nach ClustalW-Algorithmus].

5.1.6 Rekombinante Produktion selektierter VHH-Domänen in *E. coli*

Die rekombinante Expression der vier selektierten Klone als His6x- und c-Myc-markierte Einzeldomänenantikörper fand in *E. coli*-Zellen des Stammes HB2151 statt. Dies ist ein sogenannter Nicht-Supressor-Stamm, der am Amber Stop-Kodon, das im pHEN2-Vektor zwischen VHH und Kapsidprotein liegt, die Transkription beendet. Die VHH-Domänen kann so ohne den Fusionspartner in größeren Mengen rekombinant produziert werden. Eine einfache Aufreinigung erfolgte durch immobilisierte Metall-Ionen Affinitäts-Chromatographie (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) (Abb. 5.7). Die Ausbeuten an VHH-Protein lagen zwischen 0,5 und 5 mg pro Liter *E. coli*-Kultur.

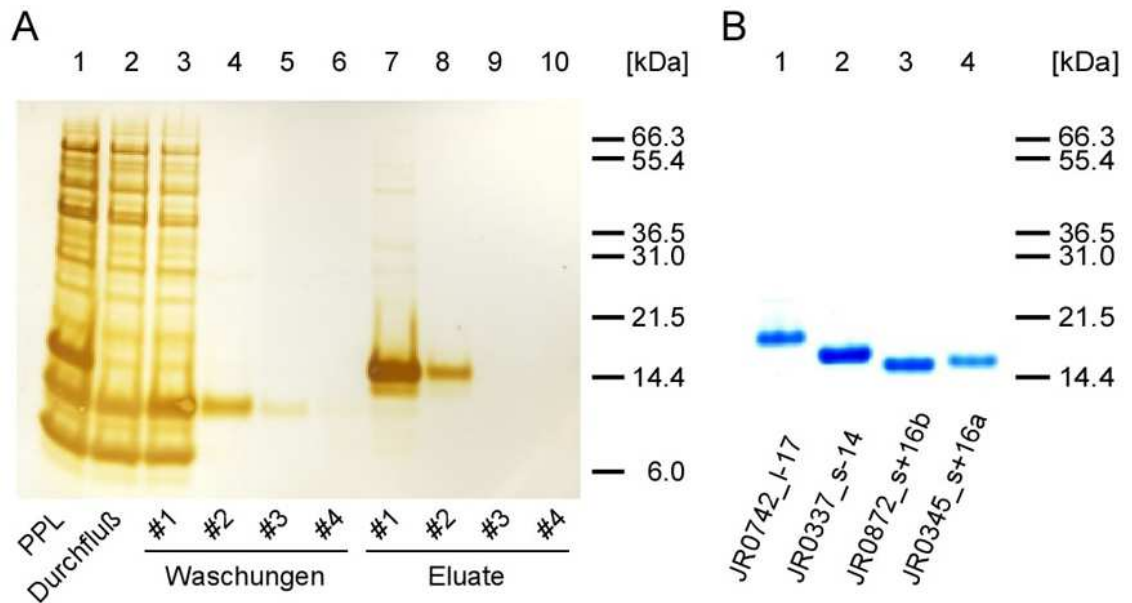


Abb. 5.7: Aufreinigung der mART2.2-spezifischen VHHs. A) Von transformierten *E. coli*s wurde ein Periplasmalysat (PPL) präpariert und die His6x-markierte VHH per IMAC (Ni-NTA-Agarose) aufgereinigt. Aliquots der Waschungen #1 bis #4 (10 mM Imidazol, Spuren 3 bis 6) und der Eluate #1 bis #4 (250 mM Imidazol, Spuren 7 bis 10) wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mit Silber angefärbt. B) Coomassie-Färbung der vier aufgereinigten mART2.2-spezifischen VHHs.

5.1.7 Affinitätsanalyse der selektierten Einzeldomänen-Antikörper

Die Bindungsaffinitäten der vier selektierten VHHs wurden mit dem IAsys Biosensor (Thermo Labsystems) analysiert und lagen mit 36 - 55 nM in einer Größenordnung, wie sie auch für andere VHHs oder konventionelle Antikörper gemessen worden sind (Tab. 5.2, durchgeführt von A. CAUERHFF, Instituto Leloir, Buenos Aires).

Tab. 5.2: IAsys Biosensor-Analyse der vier im Phagen-Display selektierten mART2.2-spezifischen VHHs.

VHH-Klon	$K_{\text{ass}} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$K_{\text{diss}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_D \text{ (nM)}$
s-14	$5.40 \pm 0.48 \times 10^4$	$2.44 \pm 0.03 \times 10^{-3}$	45.2 ± 4.5
s+16a	$7.20 \pm 0.27 \times 10^4$	$2.72 \pm 0.05 \times 10^{-3}$	37.7 ± 2.0
s+16b	$7.55 \pm 0.33 \times 10^4$	$4.19 \pm 0.16 \times 10^{-3}$	55.5 ± 3.4
l-17	$5.73 \pm 0.36 \times 10^4$	$2.08 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	36.3 ± 3.0

5.1.8 Reaktivität der selektierten Einzeldomänen-Antikörper mit mART2.2, mART2.1 und mART1

Um die Spezifität der selektierten VHHs zu untersuchen, wurden FACS-Analysen mit Lymphomzellen durchgeführt, die mit mART2.2 oder den zu 77% bzw. 37% sequenzidentischen Paralogen mART2.1 oder mART1 stabil transfiziert waren (Abb. 5.8).

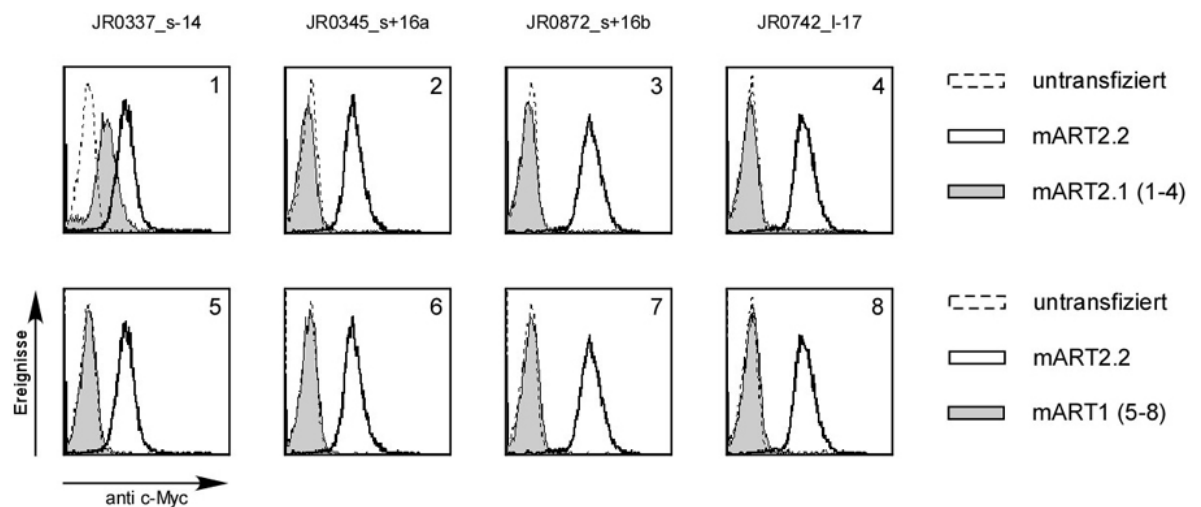


Abb. 5.8: Untersuchung der Spezifität der selektierten VHHs. Untransfizierte und ART-transfizierte Lymphomzellen wurden nach Inkubation mit jeweils einer der vier selektierten VHHs und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gegen deren C-terminale c-Myc-Markierung im FACS analysiert. In den Tafeln 1 bis 4 ist die Reaktivität mit mART2.2 im Vergleich mit der gegen mART2.1 dargestellt, in den Tafeln 5 bis 8 im Vergleich mit der gegen mART1.

Die VHHs JR0345_s+16a, JR0872_s+16b und JR0742_l-17 reagieren mit mART2.2-transfizierten Zellen, nicht jedoch mit den anderen ART-Transfektanden. Diese drei VHHs sind folglich spezifisch für mART2.2. JR0337_s-14 zeigt eine distinkte Bindung an mART2.2-transfizierte Zellen, weist jedoch eine Kreuzreaktivität mit mART2.1 auf. Keine der VHHs zeigt Reaktivität mit untransfizierten Lymphomzellen.

5.1.9 Reaktivität der selektierten VHHs mit mART2.2/rART2.2- und rART2.2/mART2.2-Chimären

Für eine genauere Lokalisierung der durch die VHHs erkannten Oberflächenstrukturen der mART2.2 (Epitopkartierung) wurden auf molekularbiologischem Weg zwei Chimären aus mART2.2 und der zu 77% sequenzidentischen ART2.2 der Ratte (rART2.2) erzeugt (Abb. 5.9). Die m-rART2.2-Chimäre verfügt über den N-Terminus der mART2.2 (Aminosäuren 1-102) in Fusion mit dem C-terminalen Anteil (Aminosäuren 103-226) der rART2.2. Die r-mART2.2-Chimäre besteht aus dem N-Terminus der rART2.2 (Aminosäuren 12-102) und dem C-Terminus der mART2.2 (Aminosäuren 103-229).

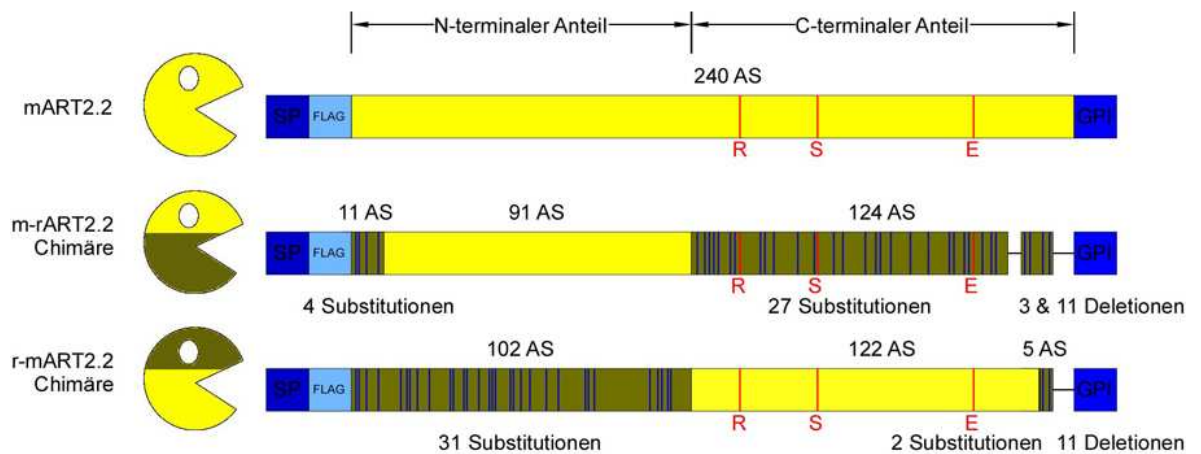


Abb. 5.9: Schematische Darstellung von mART2.2 und der beiden Chimären m-rART2.2 und r-mART2.2. Die mART2.2 ist gelb dargestellt und umfasst ohne Signalpeptid, FLAG-Markierung und GPI-Anker 240 Aminosäuren. Durch die Klonierung bedingt enthalten beide Chimären jeweils die N-terminalen 11 Aminosäuren (1-11, gelb) der mART2.2 und die fünf C-terminalen Aminosäuren (222-226, braun) der rART2.2. Da die mART2.2 und die rART2.2 zu 77% sequenzidentisch sind, ist die Anzahl der Unterschiede in der Aminosäuresequenz relativ gering. Diese sind in den Ratten-Anteilen als blaue Balken verzeichnet. SP: CD8-Signalpeptid, FLAG: FLAG-Markierung, GPI: Signalsequenz für den GPI-Anker, AS : Aminosäuren, rote Balken: katalytische Aminosäuren.

Die Ergebnisse von FACS-Analysen entsprechend transfizierter Lymphomzellen zeigen, dass der Austausch von 27 Aminosäuren im N-terminalen, 91 Aminosäuren langen Anteil der mART2.2 (Aminosäuren 12-102) zum Verlust der Bindung der VHHs JR0337_s-14 und JR0345_s+16a führt, während der Austausch von 27 Aminosäuren im C-terminalen, 122 Aminosäuren langen Anteil (Aminosäuren 103-224 der mART2.2) für eine starke Verminderung der Bindung der VHH JR0742_l-17 verantwortlich ist (Abb. 5.10). Keine der drei getesteten Einzeldomänen-Antikörper reagiert mit rART2.2 (nicht gezeigt).

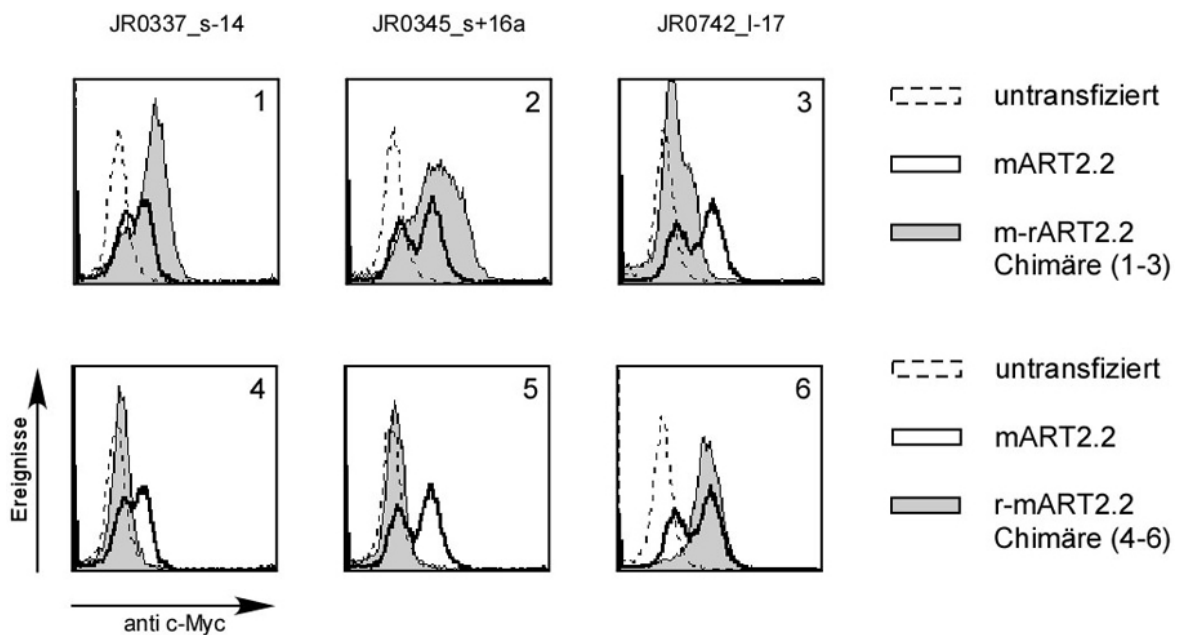


Abb. 5.10: Kartierung der Epitope der selektierten VHHs. Untransfizierte und ART-transfizierte Lymphomzellen wurden nach Inkubation mit jeweils einer der vier selektierten VHHs und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gegen deren C-terminale c-Myc-Markierung im FACS analysiert. In den Tafeln 1 bis 3 ist die Reaktivität mit der m-rART2.2-Chimäre dargestellt, in den Tafeln 4 bis 6 die Reaktivität mit der r-mART2.2-Chimäre.

5.1.10 Blockade der enzymatischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 *in vitro*

Auf T-Lymphozyten der Maus wird die mART2.2 als GPI-verankertes Enzym exprimiert. Etheno-NAD⁺ kann wie NAD⁺ als Substrat dienen, so dass die mART2.2 die etheno-ADP-Ribosylierung anderer Oberflächenproteine auf der T-Zelle katalysiert. Der monoklonale, Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper 1G4 bindet spezifisch an den etheno-Adenosin-Anteil in etheno-ADP-ribosylierten Membranproteinen, was die Detektion der ART-vermittelten Modifikationen im FACS ermöglicht.

Aus C57BL/6-Mäusen aufgereinigte T-Lymphozyten wurden mit mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit eNAD⁺ behandelt. Wie die FACS-Analyse in Abbildung 5.11 zeigt, sind die VHHs JR0345_s+16a, JR0872_s+16b sowie JR0742_I-17 in der Lage, die etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen zu inhibieren (Tafeln 4 - 6). Die VHH JR0337_s-14 ist hingegen trotz Bindung an mART2.2 nicht in der Lage, deren Aktivität zu beeinflussen (Tafel 3).

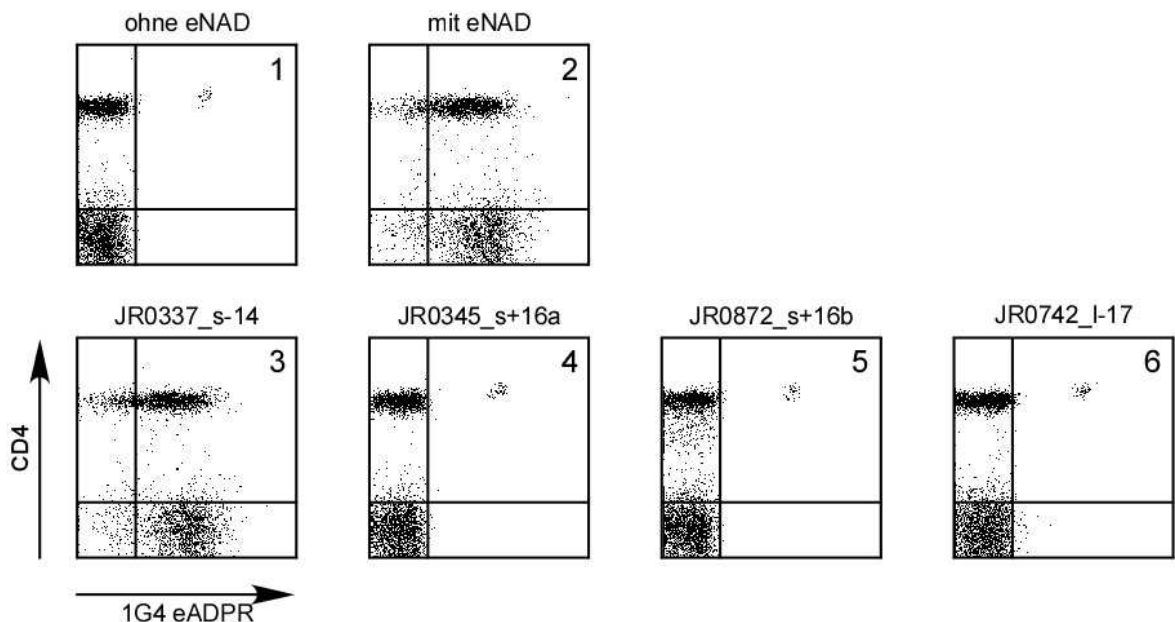


Abb. 5.11: Blockade der etheno-ADP-Ribosylierung durch mART2.2-spezifische VHHs. Tafel 2 zeigt den Nachweis der mART2.2-Aktivität auf T-Lymphozyten in Gegenwart von 5 μM etheno-NAD⁺. Nahezu alle Zellen tragen etheno-ADP-ribosylierte Oberflächenproteine. Drei der vier selektierten mART2.2-spezifischen VHHs (jeweils 2 μg) blockieren die etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen durch native membranständige mART2.2 *in vitro* (Tafeln 4 - 6).

5.1.11 Blockade der zytotoxischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 *in vitro*

Die ADP-Ribosylierung des trimeren zytolytischen P2X₇-Rezeptors an Arginin125 induziert die Öffnung des P2X₇-Ionenkanals (ADRIOUCH *et al.*, 2007). In der Folge kommt es zu Kalziumeinstrom in die Zelle, Kalium tritt aus und das Membranpotential wird lokal geschwächt. Innerhalb von Sekunden erscheint Phosphatidylserin (PS) auf der Plasmamembran. Lang anhaltende Aktivierung des P2X₇-Kanals führt zum NAD⁺-induzierten Zelltod (*NAD induced cell death*, NICD) (SEMAN *et al.*, 2003). Zum Nachweis des PS im FACS wird FITC-konjugiertes AnnexinV verwendet. Der Tod der Zelle wird durch das DNA-interkalierende Propidiumjodid (PI) erkennbar.

Die in Abbildung 5.12 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass aufgereinigte murine T-Zellen bei Zugabe von NAD⁺ vor dem NICD geschützt werden, wenn einer der Einzeldomänen-Antikörper JR0345_s+16a, JR0872_s+16b oder JR0742_I-17 die mART2.2 blockiert.

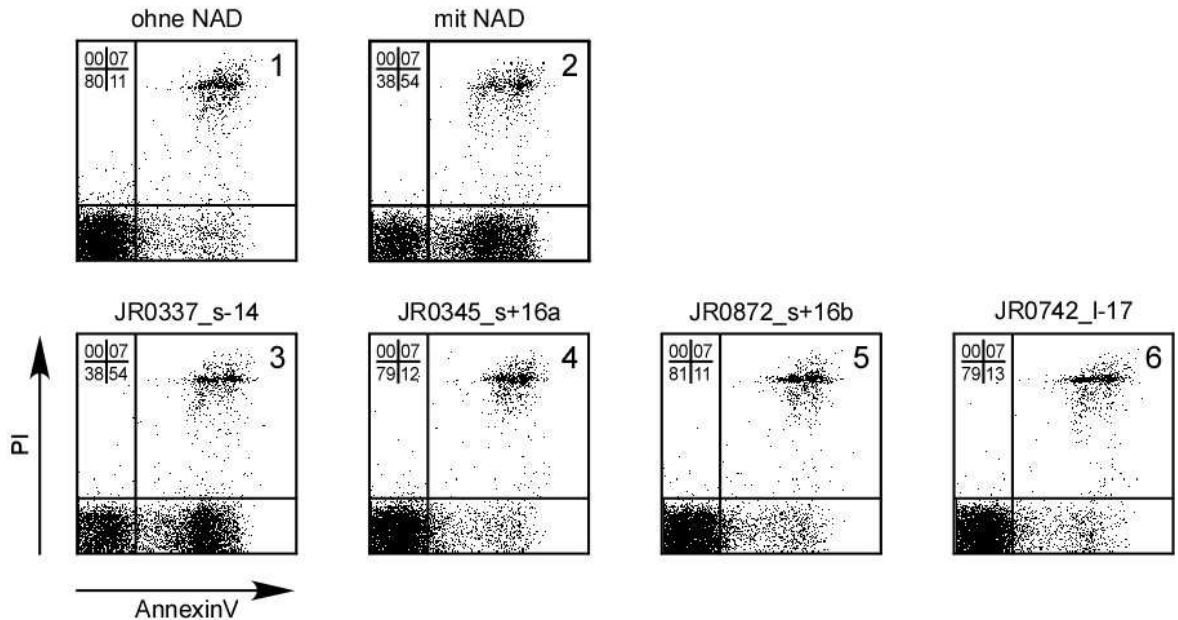


Abb. 5.12: Blockade der zytotoxischen Aktivität durch mART2.2-spezifische VHHs. Die Tafel 2 zeigt den Verlauf des durch Zugabe von 20 μ M NAD induzierten NICD bei aufgereinigter T-Zellen aus Lymphknoten einer BALB/c-Maus; über 50% der T-Lymphozyten sind AnnexinV-positiv. Drei der vier selektierten mART2.2-spezifischen VHHs (jeweils 2 μ g) blockieren die zytotoxische Aktivität von mART2.2 *in vitro* (Tafel 4 - 6), der Anteil AnnexinV-positiver Zellen bleibt auf einem Niveau, wie es auch T-Zellen zeigen, die nicht mit zusätzlichem NAD behandelt wurden (Tafel 1).

Eine Behandlung von frisch präparierten T-Zellen mit mART2.2-inhibierenden VHH-Domänen hatte jedoch keinen Effekt auf die Höhe des Hintergrundes „spontan“ apoptotischer Zellen (11 - 13% AnnexinV-positive Zellen im unteren rechten Quadranten der Tafeln 4 - 6). Diese erreichte stets ein Niveau, wie es auch Zellen aufweisen, die nicht zusätzlich mit NAD^+ behandelt wurden (Tafel 1). Der Auslöser dieser „spontanen“ Apoptose ist mART2.2-katalysierte ADP-Ribosylierung des P2X_7 -Rezeptors noch vor Zugabe der VHHs. Hierfür diente vor oder während der Präparation der Lymphozyten freigesetztes endogenes NAD^+ als Substrat (s. Einleitung 2.2.6.2, Abb. 2.14).

5.1.12 Blockade der ^{32}P -ADP-Ribosylierung von Agmatin durch rekombinante, lösliche mART2.2 *in vitro*

Agmatin ist ein Struktur analogon von Arginin, der natürlichen Zielaminosäure der mART2.2. Wird Agmatin in Gegenwart rekombinanter löslicher mART2.2 mit radioaktiv markiertem NAD^+ inkubiert, so wird es ^{32}P -ADP-ribosyliert und kann radiometrisch erfasst werden.

Hier wurde Agmatin mit einem mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (64 pmol - 0,125 pmol) inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch eine Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert (Abb. 5.13). Die VHHs JR0345_s+16a, JR0872_s+16b und JR0742_l-17, nicht aber die VHH JR0337_s-14 sind dabei in der Lage, die ^{32}P -ADP-Ribosylierung des Agmatins effektiv zu blockieren.

Des weiteren zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen VHH und mART2.2, dass im Falle der VHHs JR0345_s+16a und JR0872_s+16b zum Erreichen der halb-maximalen Inhibition (IC_{50}) von 1,6 pmol mART2.2 in einem Volumen von 50 μl rund 1,2 pmol VHH nötig sind [24 nM]. Für die VHH JR0742_l-17 liegt dieser Wert mit 2,5 pmol [50 nM] etwa doppelt so hoch. VHH JR0742_l-17 ist ein etwas schwächerer Inhibitor als die beiden anderen getesteten VHHs. Die gezeigten Ergebnisse sind für eine dreifache Durchführung der Versuche repräsentativ.

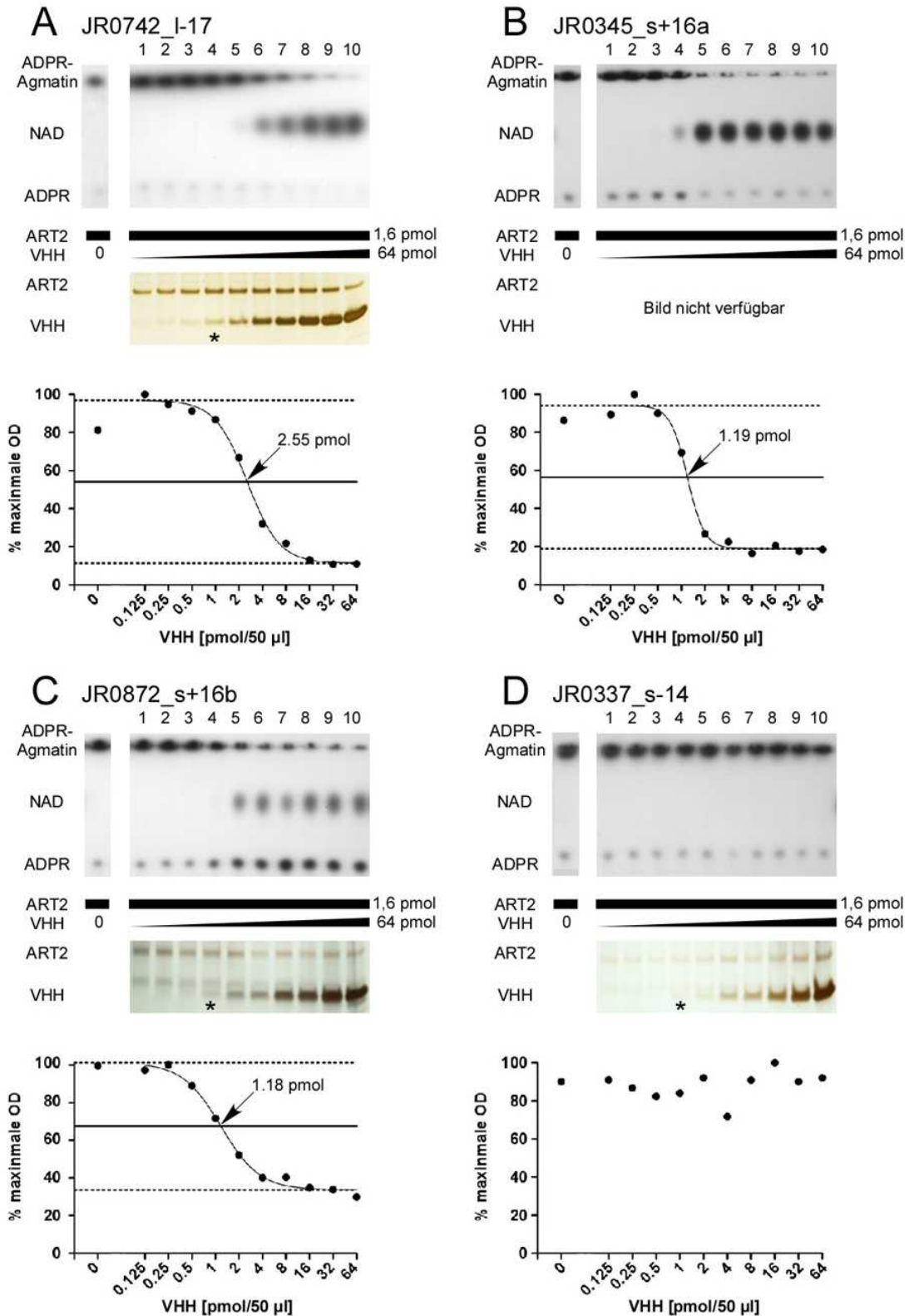


Abb.5.13: Blockade der Agmatin-³²P-ADP-Ribosylierung durch mART2.2-spezifische VHHs. Drei der vier mART2.2-spezifischen VHHs blockieren die Aktivität löslicher mART2.2 *in vitro* in einer Dosis-abhängigen Weise. Rekombinante lösliche mART2.2 wurde mit verschiedenen Mengen einer VHH präinkubiert. Im Anschluss wurden ³²P-NAD⁺ und Agmatin zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden in einer Dünnschichtchromatographie analysiert und autoradiographisch ausgewertet (oben). Die eingesetzten Proteine wurden in einer SDS-PAGE analysiert und mit Silber gefärbt (darunter). Ein * markiert den Punkt der äquimolaren Konzentration von mART2.2 und VHH.

5.1.13 Blockade der enzymatischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 *in vivo*

15 Minuten und 90 Minuten nach der Injektion von 50 bzw. 300 µg der inhibitorischen VHH JR0345_s+16a in die Schwanzvene einer CD38KO-Maus wurden Versuchstiere getötet, die Lymphknoten präpariert und separate Aliquots an T-Lymphozyten mit etheno-NAD⁺ inkubiert. Durch FACS-Analysen des mit dem monoklonalen etheno-Adenosin-spezifischen 1G4-Antikörper wurde die mART2.2-Aktivität überprüft (Abb. 5.14).

Es zeigt sich, dass die mART2.2-vermittelte eADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen in Folge der VHH-Injektion effektiv inhibiert lässt (Tafeln 2 bis 5). Während bei der Kontroll-Maus 41% der T-Zellen etheno-ADP-ribosylierte Membranproteine aufweisen (Tafel 1) sind es bei VHH-behandelten Tieren nur 10%. Dieser Effekt ist auch 90 Minuten nach der Injektion noch vorhanden. Zudem konnte festgestellt werden, dass sich mit 300 µg VHH kurze Zeit nach Injektion eine etwas

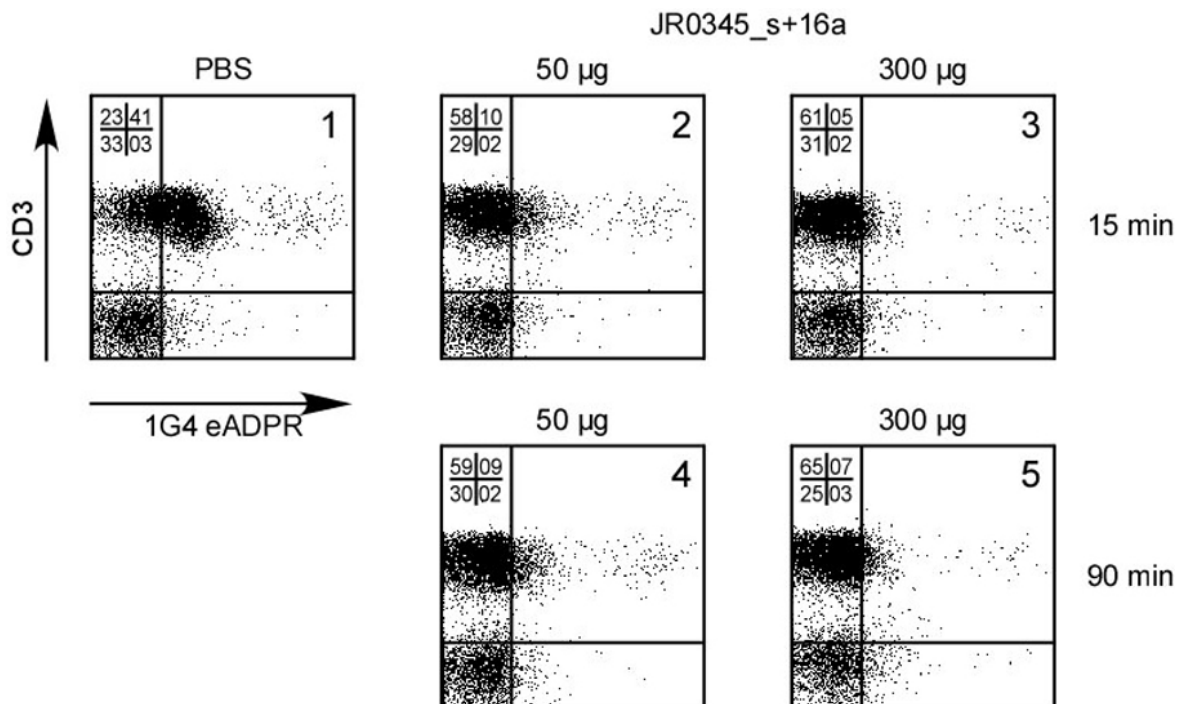


Abb. 5.14: Intravenöse Injektion der VHH JR0345_s+16a blockiert die enzymatische mART2.2-Aktivität auf T-Zellen *in vivo*. Balb/c_CD38KO-Mäusen wurde PBS, oder 50 µg bzw. 300 µg der mART2.2-spezifischen VHH JR0345_s+16a intravenös injiziert. 15 Minuten bzw. 90 Minuten nach Injektion wurden die Tiere getötet und Lymphknotenzellen präpariert. Separate Aliquots dieser Zellen wurden mit eNAD inkubiert, bevor eine Anfärbung mit monoklonalen Antikörper 1G4 und anti CD3 stattfand.

stärkere Hemmung der ART-Aktivität erzielen lässt als mit 50 µg. Eine leichte Inhibition war noch nach sechs Stunden detektierbar, nach 24 Stunden war die Blockade weitgehend aufgehoben (nicht gezeigt).

5.1.14 Blockade der zytotoxischen Aktivität nativer, membranständiger mART2.2 *in vivo*

Die Ergebnisse weiterer Untersuchung zeigen, dass die VHH JR0345_s+16a in der Lage ist, die mART2.2-vermittelte Zytotoxizität für Lymphknoten-T-Zellen dosisabhängig auch *in vivo* zu blockieren und den NICD zu verhindern (Abb. 5.15). Die zytotoxische Aktivität der mART2.2 war bereits 15 Minuten nach intravenöser Injektion von 50 µg VHH stark reduziert. So wird der hohe Hintergrund „spontan“ apoptotischer T-Zellen, der zu beobachten ist, wenn der mART2.2 durch die Präparation freigesetztes, endogenem NAD⁺ als Substrat zur Verfügung steht, nach VHH-Injektion deutlich reduziert: von 57% (Tafel

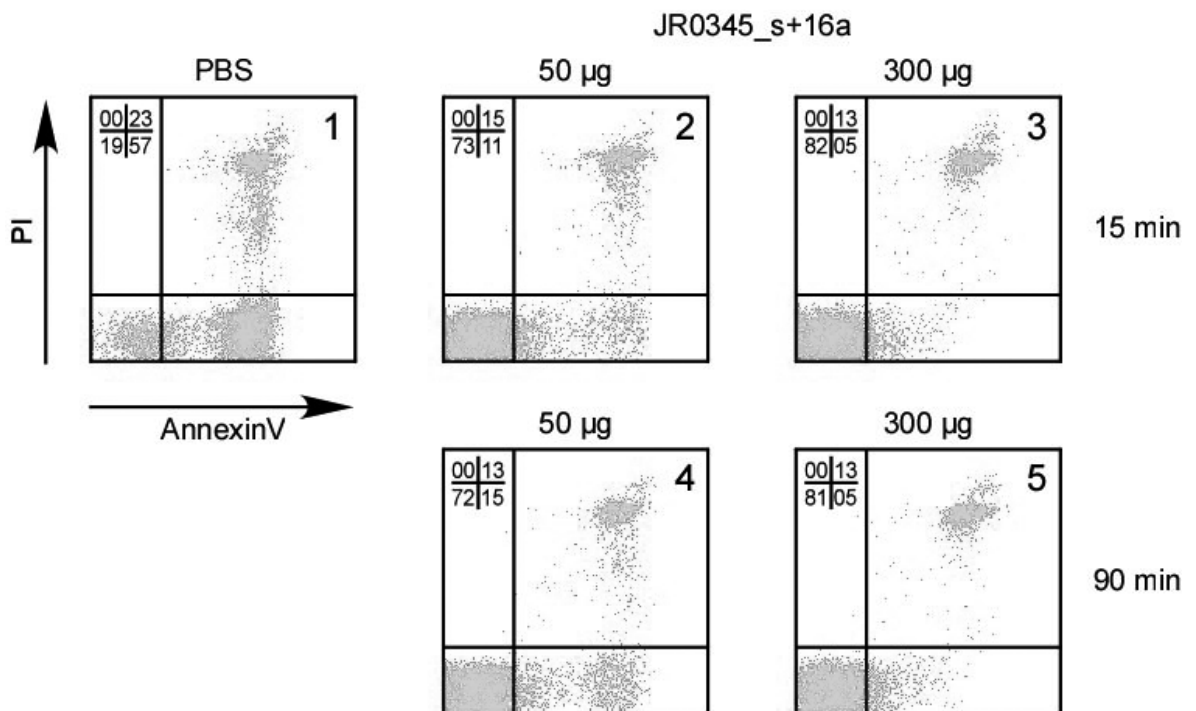


Abb.5.15: Intravenöse Injektion der VHH JR0345_s+16a blockiert die zytotoxische mART2.2-Aktivität auf T-Zellen *in vivo*. Balb/c_CD38KO-Mäusen wurde PBS, oder 50 µg bzw. 300 µg der mART2.2-spezifischen VHH JR0345_s+16a intravenös injiziert. 15 Minuten bzw. 90 Minuten nach Injektion wurden die Tiere getötet und Lymphknotenzellen präpariert. Die durch endogenes, während der Präparation freigesetztes NAD induzierte Apoptose der Lymphknotenzellen wurde durch die Anfärbbarkeit mit AnnexinV und Propidiumjodid verfolgt.

1) auf 11-15% (Tafeln 2 und 4). Durch Injektion von 300 µg VHH lässt sich dieser Anteil auf 5% weiter reduzieren (Tafeln 3 und 5). Ein konstanter Anteil von 13 - 15% toter Zellen ist wahrscheinlich auf mechanisch während der Präparation zerstörte Zellen zurückzuführen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch intravenöse Injektion rekombinant erzeugter, spezifischer Einzeldomänen-Antikörper in einen Organismus die effektive Inhibition eines membranständigen Ekto-Enzyms möglich ist, die über einen Zeitraum von mehr als 90 Minuten anhalten kann.

5.2 Isolierung von Varianten der mART2.2-spezifischen VHHs aus einer neuen Phagen-Display-Bibliothek nach erneuter Immunisierung des Lamas (2.5 Jahre später)

Über zwei Jahre nach der zehnten Immunisierung des Lamas erfolgte eine elfte Auffrischungsimmunisierung. Sieben Tage nachdem 300 µg rekombinanten mART2.2-Proteins subkutan am Hals des Tieres injiziert worden waren, wurde eine Blutprobe entnommen und daraus eine Phagen-Display-Bibliothek hergestellt.

5.2.1 Charakterisierung der Primärbibliothek

Aus der neu generierten Bibliothek „*long hinge 3*“ (lh3, 6×10^4 Klone) wurden zufällig ausgewählte Einzelklone einer Sequenzanalyse unterzogen. Im Sequenzvergleich fiel auf, dass es drei Gruppen von Klonen mit jeweils sehr ähnlicher CDR3-Sequenz gab (rote Balken in Abb. 5.16). Auch die anderen CDRs und Abschnitte der *framework*-Regionen dieser Klone waren zum Teil identisch.

Ein Vergleich mit den Sequenzen der vier bekannten mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörper ergab, dass zwei dieser Gruppen Sequenzähnlichkeiten zu diesen VHHs zeigen. 29 von 85 untersuchten Klonen sind mit der VHH JR0742_1-17 verwandt, drei davon sind zu 100% sequenzidentisch (in Abb. 5.16 vertreten durch VHH JR1075_1-17). Die CDR3s der anderen Gruppenmitglieder unterscheiden sich in maximal drei Positionen von der der VHH0742_1-17. Die zweite Gruppe, die aus fünf *long hinge*-Klonen (1-14) besteht, zeigt große Sequenzidentität zur VHH0337_s-14. Von diesen weisen zwei innerhalb der CDR3 eine 100%ige Sequenzhomologie mit dem mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörper auf. Die anderen Gruppenmitglieder zeigen hier bis zu sieben Aminosäuresubstitutionen.

Der Klon VHH JR1066_1-14 hatte keine Ähnlichkeit mit einem der inhibitorischen Einzeldomänen-Antikörper. Einer dieser Klone war aber in zwölf-facher Kopienzahl vorhanden und es gab drei weitere VHHs mit identischer CDR3-Sequenz.

Diese Gruppen von VHHs wurden als „Familien“ zusammengefasst.

Abb. 5.16 (Vorseite): Vergleich von VHH-Aminosäuresequenzen der primären Phagen-Bibliothek lh3 (7. Tag nach 11. Immunisierung). Rote Balken markieren Gruppen sequenzähnlicher Klone. Die Klone sind nach der CDR3-Länge, sowie dem Vorhandensein oder Fehlen eines zusätzlichen Cysteinopaars sortiert. *: Klone mit *frame shift*-Mutation; c: IgG1-Isotyp.

Die Bibliothek wurde in einer ersten *Panning*-Runde an mART2.2-transfizierten Lymphomzellen bei Raumtemperatur selektiert, in einem zweiten *Panning* bei 37°C. Nach jeder Runde wurden stichprobenartig weitere Sequenzanalysen durchgeführt. Die analysierten Klone konnten stets einer Familie putativer mART2.2-Binder zugeordnet werden (Tab. 5.3).

Neben den bereits in der Primärbibliothek enthaltenen Familien traten während der Selektion zunehmend auch Klone auf, die den bereits bekannten VHHs JR0345_s+16a und JR0872_s+16b ähnelten. Diese werden im Folgenden 16er-Familie 1 und 2 genannt. In der 16er-Familie 3 werden 1-16-VHHs zusammengefasst, die im *Panning* angereichert werden, jedoch eine begrenzte Ähnlichkeit mit den Mitgliedern der anderen 16er-Familien aufweisen.

Tab. 5.3: Häufigkeit putativer mART2.2-Binder in der Bibliothek lh3. Erfasst sind Mitglieder von VHH-Gruppen großer Sequenzähnlichkeit und deren beobachtete Kopienzahl in der Primärbibliothek, sowie nach den Selektionsrunden. Vier dieser Familien kann jeweils eine der vier bekannten mART2.2-spezifischen VHHs auf Grund hoher Sequenzähnlichkeit zugeordnet werden.

Klon	Häufigkeit der Klone in der Bibliothek lh3			Summe der Sichtungen	Aminosäuren in der CDR3	extra Cystein in der CDR3
	Primärbibliothek	post 1st Panning	post 2nd Panning			
Summe analysierter Klone						
	91	50	43			
Summe putative mART2.2-spezifischer Klone						
	40	46	38			
14er-Familie 1						
JR1277_-l-14	1			1	14	nein
JR1240_-l-14*	1			1	14	nein
JR1712_-l-14		1		1	14	nein
JR1078_-l-14	1			1	14	nein
JR1721_-l-14		1		1	14	nein
JR1614_-l-14			1	1	14	nein
JR1270_-l-14	1			1	14	nein
JR1281_-l-14	1			1	14	nein
14er-Familie 2						
JR1066_-l-14	12	1		13	14	nein
JR1071_-l-14	1			1	14	nein
JR1077_-l-14	1			1	14	nein
JR1195_-l-14	1			1	14	nein
16er-Familie 1						
JR1616_-l-16			2	2	16	ja
16er-Familie 2						
JR2212_-l-16*		1		1	16	ja
16er-Familie 3						
JR2149_-l-16		3	1	4	16	ja
JR2240_-l-16*			1	1	16	ja
JR1720_-l-16		1	1	2	16	ja
JR1762_-l-16		2	2	4	16	ja
JR2146_-l-16*		27	2	29	16	ja
JR1253_-l-16	1			1	16	ja
17er-Familie						
JR1075_-l-17	3	1	12	16	17	nein
JR1594_-l-17			1	1	17	nein
JR1607_-l-17			1	1	17	nein
JR1634_-l-17			1	1	17	nein
JR1227_-l-17*	1			1	17	nein
JR1209_-l-16	5	4	2	11	16	nein
JR1719_-l-16		1		1	16	nein
JR1604_-l-16			1	1	16	nein
JR1619_-l-16			1	1	16	nein
JR1067_-l-16	1		1	2	16	nein
JR1280_-l-16	1			1	16	nein
JR1210_-l-16	1			1	16	nein
JR1085_-l-16	3	2	3	8	16	nein
JR1255_-l-16	1	1	3	5	16	nein
JR1267_-l-16	1			1	16	nein
JR1621_-l-16			1	1	16	nein
JR1237_-l-16	1		1	2	16	nein
JR1272_-l-16	1			1	16	nein

5.2.2 Sequenzvergleich der Mitglieder von Familien

Die Gruppe um die VHH JR1277_1-14, „14er-Familie 1“, ist sehr heterogen. Ihre Mitglieder definieren sich durch eine hohe Sequenzähnlichkeit der CDR3 mit der bekannten mART2.2-spezifischen VHH JR0337_s-14 (Abb. 5.17). Insbesondere die anderen beiden CDRs und die *framework*-Regionen 3 weisen eine geringere Ähnlichkeit auf. Die Beobachtung, dass diese ähnlichen VHH-Sequenzen sowohl in Antikörpern vom IgG3 (*short hinge*)- als auch IgG2 (*long hinge*)-Isotyp in Erscheinung treten, lässt einen Klassenwechsel (*sub-class switch*) vermuten.

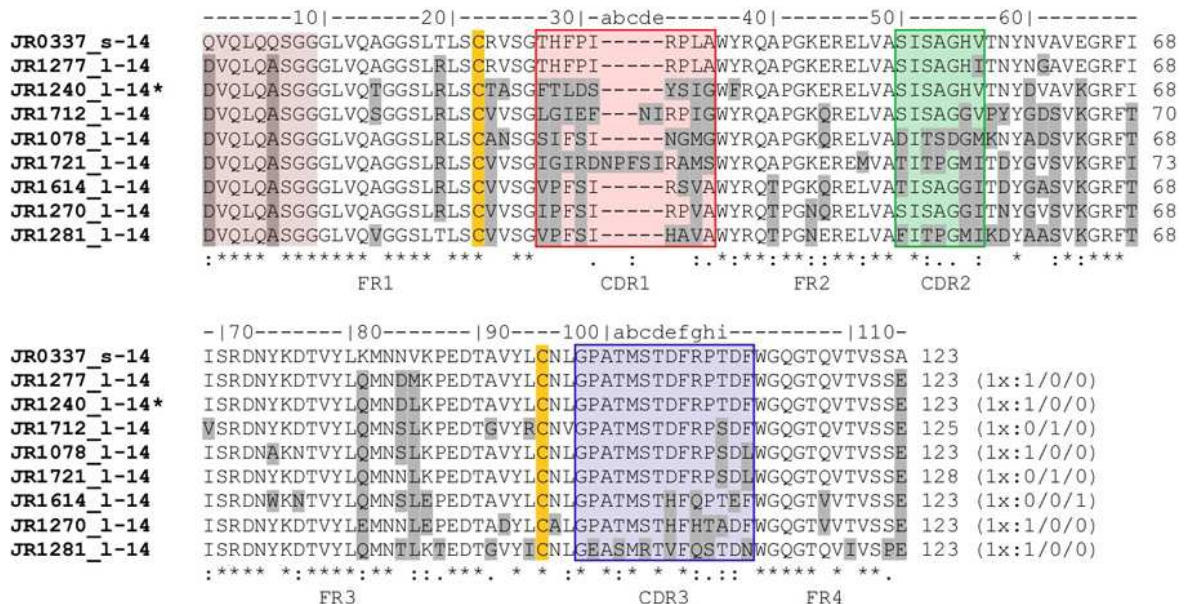


Abb. 5.17: Sequenzvergleich der Mitglieder der „14er-Familie 1“. Als Referenz dient die mART2.2-spezifische VHH JR0337_s-14 aus der Bibliothek sh1. Unter Berücksichtigung der CDR3-Sequenz wurden die in der Bibliothek lh3 gefundenen Klone dem Grad an Konserviertheit entsprechend zeilenweise von oben nach unten abnehmend aufgelistet. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind grau hinterlegt. Hinter jeder Sequenz ist die Häufigkeit angegeben mit der sie gesichtet wurde. Dabei folgt der gesamten Anzahl der Sichtungen (z. B. 1x) eine Aufschlüsselung nach dem Zeitpunkt der Stichproben-Sequenzierung: aus der Primärbibliothek/nach *Panning 1*/nach *Panning 2*. Farbliche Kodierung: CDR1: rot, CDR2: grün, CDR3: blau, kanonisches Cysteinpaar: gelb, Oligonukleotid-determinierte Bereiche: braun. *: Klon mit Leserastermutation. Nummerierung der Aminosäuren nach KABAT *et al.*, 1991. [Alignment nach ClustalW-Algorithmus].

Die „14er-Familie 2“ um die VHH JR1066_1-14 wurde unter dem Selektionsdruck der *Pannings* eliminiert. Diese VHHs waren wahrscheinlich nicht mART2.2-spezifisch. Die hohe Kopienzahl in der Primärbibliothek kann daher als humorale Immunantwort auf ein anderes Antigen interpretiert werden.

Die 16er-Familie 1 und 2 bestehen jeweils nur aus einer einzelnen VHH, lassen sich jedoch den beiden mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörpern JR0345_s+16a und JR0872_s+16b zuordnen (Abb. 5.18). Die neuen Klone weisen jeweils nur wenige Substitutionen auf (15 bzw. 18). In den CDRs sind von solchen Austauschen jeweils ein bis drei Aminosäuren betroffen. Auch hier finden sich von *short hinge*-VHHs bekannte Sequenz auf einem *long hinge*-Hintergrund wieder. Einer dieser neuen Klone findet sich mehrfach in der stringent selektierten Bibliothek lh3.

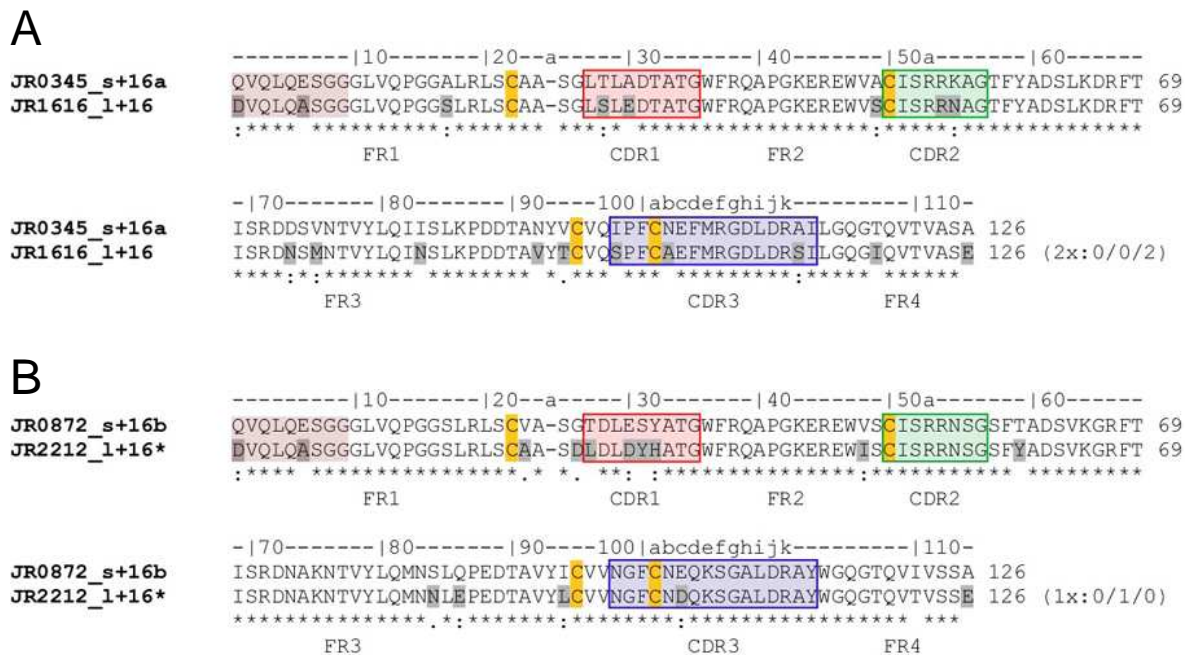


Abb. 5.18: Sequenzvergleich der Mitglieder der „16er-Familien“ 1 und 2. Als Referenz dienen die mART2.2-spezifischen VHHs JR0345_s+16a (A) und JR0872_s+16b (B) aus der Bibliothek sh2. Unter Berücksichtigung der CDR3-Sequenz wurden in der Bibliothek lh3 gefundene Klone diesen Referenzen zugeordnet. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind grau hinterlegt. Hinter jeder Sequenz ist die Häufigkeit angegeben mit der sie gesichtet wurde. Dabei folgt der gesamten Anzahl der Sichtungen (z. B. 1x) einer Aufschlüsselung nach dem Zeitpunkt der Stichproben-Sequenzierung: aus der Primärbibliothek/nach *Panning* 1/nach *Panning* 2. Farbliche Kodierung: CDR1: rot, CDR2: grün, CDR3: blau, kanonisches Cysteinpaar: gelb, Oligonukleotid-determinierte Bereiche: braun. *: Klon mit Leserastermutation. Nummerierung der Aminosäuren nach KABAT *et al.*, 1991. [Alignment nach ClustalW-Algorithmus].

Die als „16er-Familie 3“ zusammengefassten Klone (Abb. 5.19) weisen nur sehr geringe Ähnlichkeit mit den bekannten VHHs JR0345_s+16a und JR0872_s+16b auf, so dass sie eine erstmals in der lh3-Bibliothek beobachtete Gruppe bilden. Sie sind nach der ersten Selektionsrunde in erhöhter Kopienzahl vertreten, werden nach dem zweiten, stringenteren *Panning* weniger.

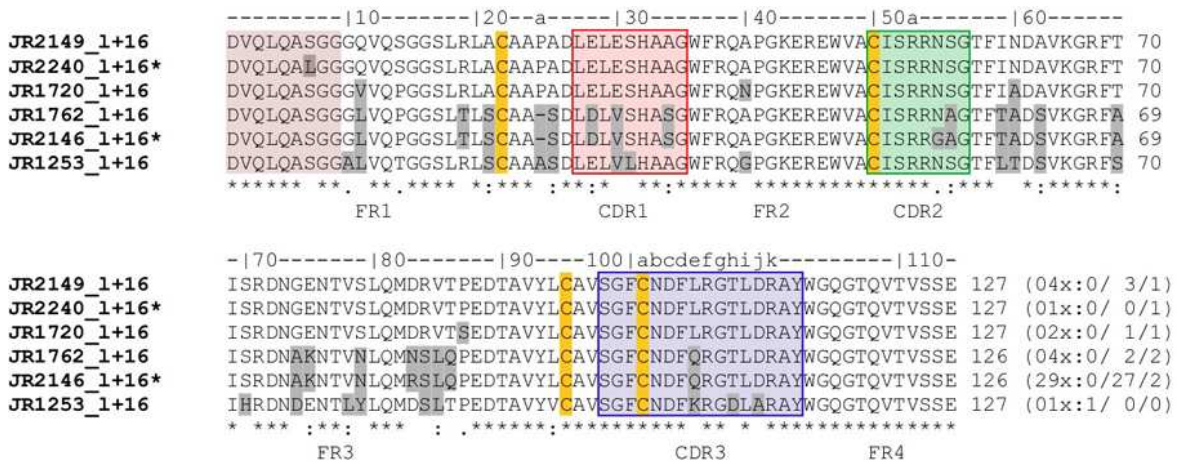


Abb. 5.19: Sequenzvergleich der Mitglieder der „16er-Familie 3“. Als Referenz dient die VHH JR2149_1+16. Unter Berücksichtigung der CDR3-Sequenz wurden die gefundenen Klone dem Grad an Konserviertheit entsprechend zeilenweise von oben nach unten abnehmend aufgelistet. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind grau hinterlegt. Hinter jeder Sequenz ist die Häufigkeit angegeben mit der sie gesichtet wurde. Dabei folgt der gesamte Anzahl der Sichtungen (z. B. 1x) eine Aufschlüsselung nach dem Zeitpunkt der Stichproben-Sequenzierung: aus der Primärbibliothek/nach *Panning* 1/nach *Panning* 2. Farbliche Kodierung: CDR1: rot, CDR2: grün, CDR3: blau, kanonisches Cysteinpaar: gelb. Nummerierung der Aminosäuren nach KABAT *et al.*, 1991. [Alignment nach ClustalW-Algorithmus].

Ein Vergleich der Sequenzen von lh3-Klonen aller drei 16er-Familien (Abb. 5.20) zeigt deutlich die Vielzahl von Substitutionen auf, die relativ gleichmäßig über die gesamten VHHs verteilt sind. Dies lässt vermuten, dass die Klone keinen gemeinsamen Ursprung haben. Jedoch weisen insbesondere die CDRs Bereiche auf, die in allen drei Sequenzen homolog sind. Dies betrifft drei von neun Positionen in der CDR1, sieben von acht in der CDR2 und sechs von sechzehn in der CDR3. Vergleicht man nur JR2146_1+16 und JR2212_1+16, so erscheint der Anteil identischer Aminosäuren innerhalb der CDRs noch größer (CDR1: fünf von neun, CDR2: acht von acht, CDR3: elf von sechzehn). Er erscheint daher vorstellbar, dass die drei Klone ganz ähnliche Epitope erkennen.

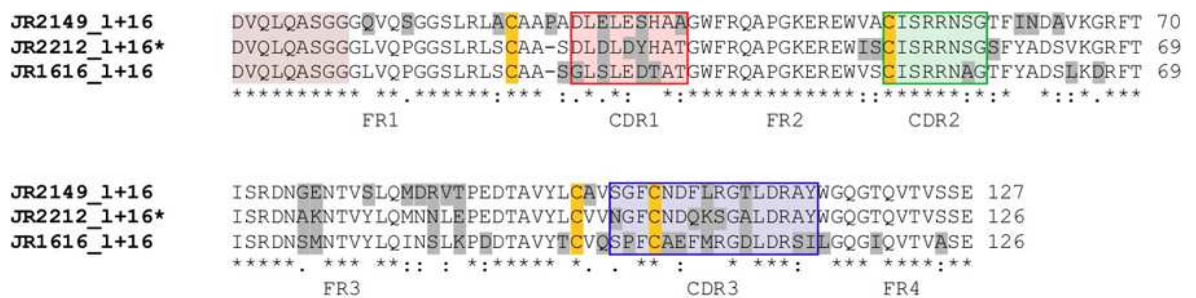


Abb. 5.20: Sequenzvergleich von lh3-Klonen aller drei 16er-Familien. JR1616_1+16 ist Mitglied der 16er-Familie 1, JR2212_1+16 Vertreter der 16er-Familie 2 und JR1616_1+16 der 16er-Familie 3. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind grau hinterlegt. Die Vielzahl von Aminosäuresubstitutionen in den Sequenzen der drei Klone lassen vermuten, dass diese keinen gemeinsamen Ursprung haben. Auffällig ist die Konserviertheit einiger Positionen innerhalb der CDRs. Es ist vorstellbar, dass diese VHHs sehr ähnliche Epitope erkennen.

Farbliche Kodierung: CDR1: rot, CDR2: grün, CDR3: blau, kanonisches Cysteinpaar: gelb, Oligonukleotid-determinierte Bereiche: braun. Nummerierung der Aminosäuren nach KABAT *et al.*, 1991. [Alignment nach ClustalW-Algorithmus].

Die Mitglieder der 17er-Familie (Abb. 5.21) sind bereits stark in der nicht selektierten Primärbibliothek vertreten und reichern sich über die Selektionsrunden hinweg kontinuierlich an. Nach der zweiten Selektionsrunde stellt diese Gruppe drei Viertel der in der Bibliothek enthaltenen Klone. Diese Familie zeigt eine wesentliche höhere Sequenzidentität als die anderen betrachteten Familien. Knapp die Hälfte der 17er-Klone entsprechen der bekannten Sequenz des mART2.2-spezifischen Einzelketten-Antikörpers JR0742_1-17. Es sind siebzehn Variationen dieser Sequenz nachgewiesen worden, die zum Teil auch in mehrfacher Kopienzahl vorliegen. Fünfzehn dieser Varianten weisen die auffällige Eigenschaft einer Verkürzung der CDR3 um eine Aminosäure auf, so dass diese Klone als „I-16“-VHHs betrachtet werden müssen.

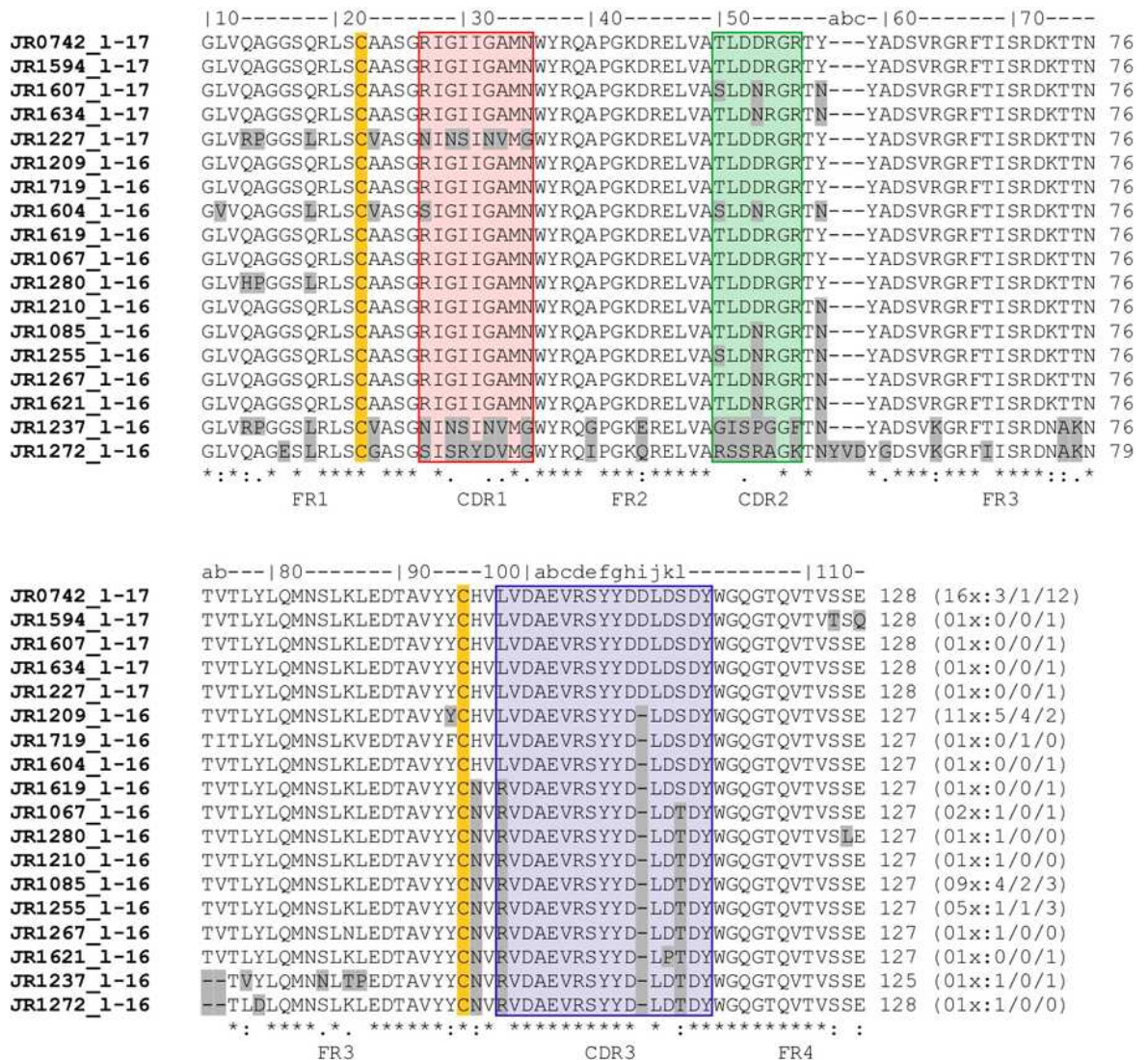


Abb. 5.21: Sequenzvergleich der Mitglieder der 17er-Familie. Die Sequenz der VHH JR0742_1-17 (oberste Zeile), die auch in der Bibliothek lh3 vorkommt und die nach dem zweiten *Panning* am stärksten vertretene VHH darstellt, dient als Referenz für den Vergleich mit den anderen Mitgliedern der Familie. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind grau hinterlegt. Farbliche Kodierung: CDR1: rot, CDR2: grün, CDR3: blau, kanonisches Cysteinpaar: gelb. Nummerierung der Aminosäuren nach KABAT et al., 1991. [Alignment nach ClustalW-Algorithmus].

Von allen Mitgliedern der „17er-Familie“, der drei „16er-Familien“ und der „14er-Familie 1“ wurde eine Testexpression durchgeführt. Eine SDS-PAGE-Analyse (Abb. 5.22) der aus Periplasmalysaten präparierten Einzeldomänen-Antikörper zeigt, dass die meisten Klone funktionelle VHH-Domänen kodieren. Nur in vier Fällen kann aus nicht erklärbaren Gründen kein oder nur sehr wenig rekombinantes Protein festgestellt werden.

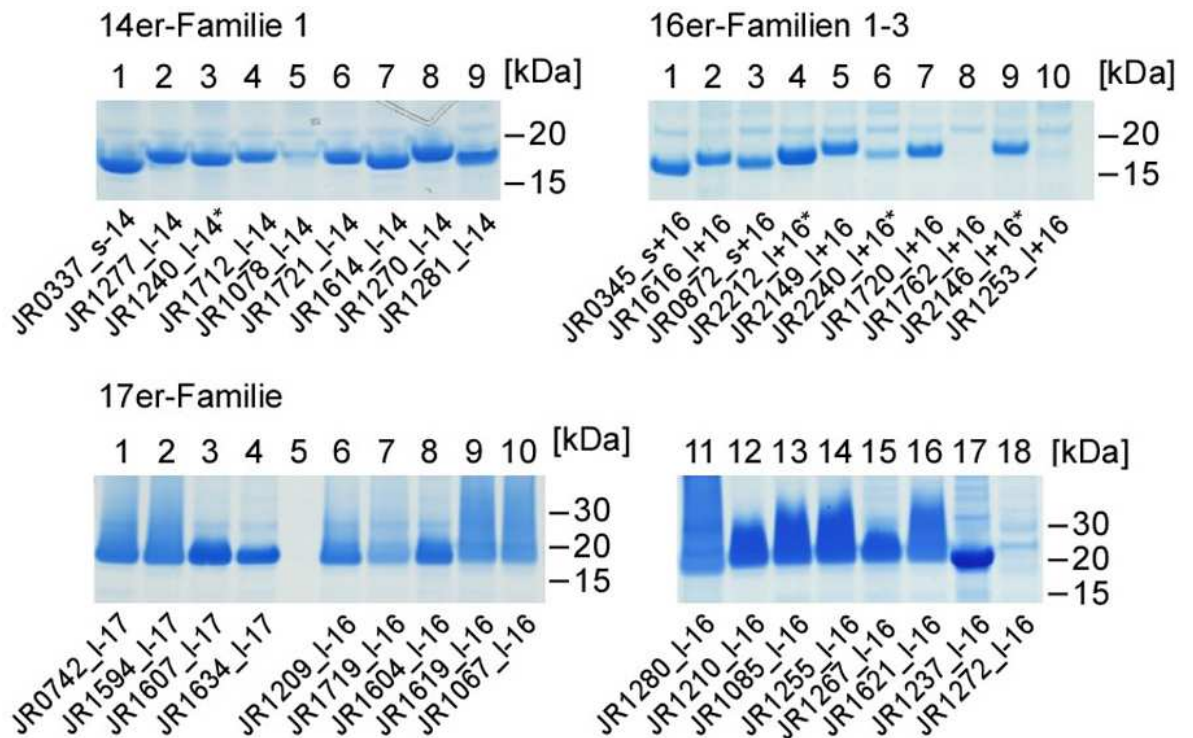


Abb. 5.22: Expressionstest mit Mitgliedern der fünf Familien putativ mART2.2-spezifischer VHHs. Von kleinen Expressionskulturen (12 ml) wurden Periplasmalysate präpariert und aus 500 µl davon mit Ni-NTA-Agarose (15 µl) rekombinant exprimiertes VHH-Protein präzipitiert. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigt, dass vier der getesteten Klone kein solches Protein produziert haben. (Mit * markierte Konstrukte wiesen Leserastermutationen auf, die durch Mutagenese korrigiert wurden.)

5.3 Rekombinante Großproduktion von VHHs und mART2.2 in *E. coli* sowie Prozesse der Proteinaufreinigung mit dem Ziel der Kristallisierung eines Komplexes aus VHH und ART

5.3.1 Rekombinante Großproduktion und Aufreinigung von VHH JR0345_s+16a

Für die rekombinante Expression großer Mengen VHH-Proteins mit C-terminaler His6xMyc-Markierung wurden *E. coli*-Zellen des Stammes HB2151 mit dem entsprechenden Phagemid-Vektor transformiert. Übliche Kulturvolumina waren 12 bis 15 Liter. Daraus resultierten ca. 120 g Bakterien (Nassgewicht), die zu 600 ml Periplasmalysat verarbeitet wurden. Eine Aufreinigung durch IMAC (20 ml Ni-NTA-Agarose) ging einer Gelfiltrationschromatographie voraus.

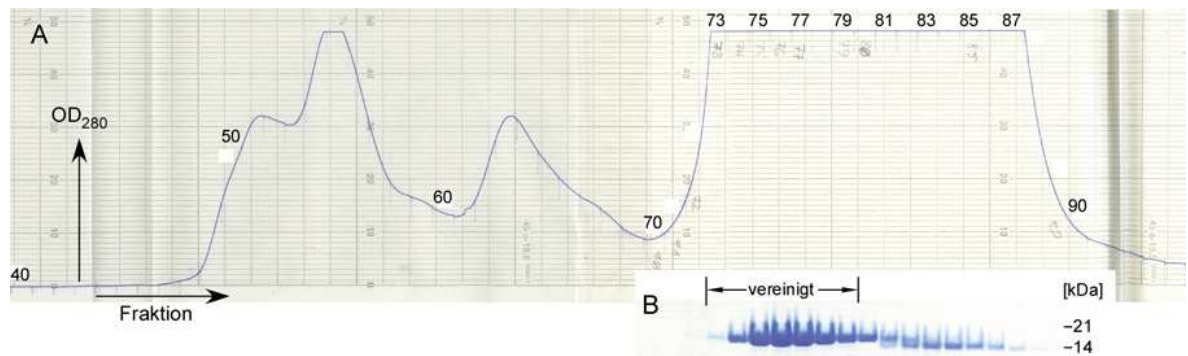


Abb. 5.23: Plot einer Gelfiltrations-Chromatographie rekombinanter VHH JR0345_s+16a und SDS-PAGE-Analyse ausgesuchter Fraktionen. Der Plot (A), der simultan zur automatisierten Sammlung von Fraktionen angefertigt wurde, weist diverse kleine Extinktionsmaxima im Vorfeld eines sehr hohen Extinktionsmaximums (Fraktionen 73 - 87) auf. (B) Aliquots der Fraktionen 73 bis 87 wurden in einer SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie gefärbt.

Eine SDS-PAGE-Analyse (Abb. 5.23 B) von Fraktionen, die in der Plot-Aufzeichnung (Abb. 5.23 A) hohe Proteinkonzentrationen aufwiesen zeigt, dass das aufgereinigte VHH-Protein in den Fraktionen 73 - 79 enthalten war. Diese wurden vereinigt und per Diafiltrationszentrifugation auf ein Volumen von 750 μ l eingengt. Die Proteinkonzentration wurde mit 26 mg/ml bestimmt, was einer Gesamtmenge von 20 mg Protein entspricht. Die Produktionsrate lag bei 1,6 mg/Liter *E. coli*-Kultur. So aufgereinigtes Protein wurde für die Injektion in Mäuse oder die Kristallisation verwendet.

5.3.2 Rekombinante Großproduktion und Aufreinigung von mART2.2

Die rekombinante Expression von mART2.2-His6xFLAG erfolgte vom prokaryotischen Expressionsvektor pASK60 aus in *E. coli*-Zellen des Stammes XL10-GOLD (Stratagene). Das Kulturvolumen betrug üblicherweise 4 bis 5 Liter. Daraus resultierten ca. 50 g Bakterien (Nassgewicht), die in 250 ml Periplasmalysat umgesetzt wurden. Durch die anschließende Aufreinigung mit M2-Agarose konnte eine so hohe Reinheit erzielt werden, dass auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet werden konnte (Abb. 5.24). Das mART2.2-HF-Protein wurde abschließend in PBS umgepuffert und per Diafiltrationszentrifugation aufkonzentriert. Die Produktionsraten für die mART2.2 sind mit ca. 125 µg/Liter *E. coli*-Kultur sehr viel niedriger als die der VHHs. Diese Präparationen wurden für die Immunisierung des Lamas oder die Kristallisation eingesetzt.

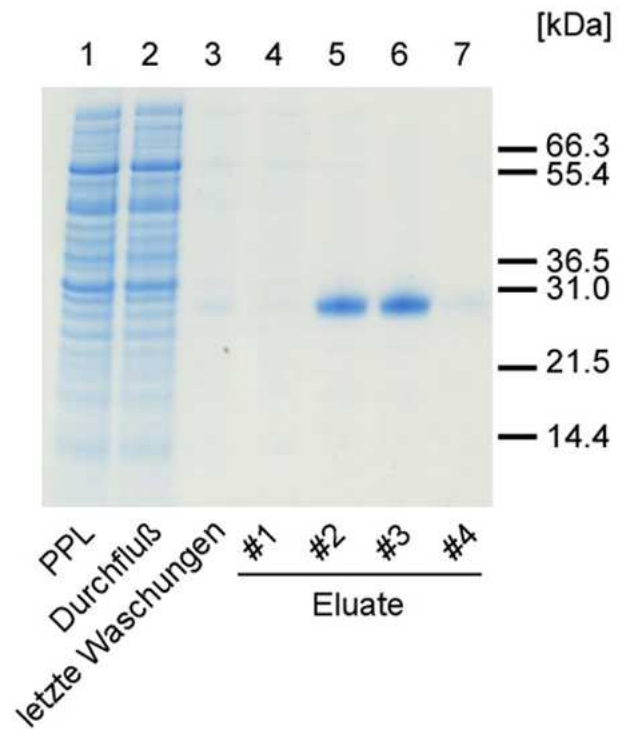


Abb. 5.24: Aufreinigung von mART2.2-His6xFLAG. Das FLAG-markierte mArt2.2-Protein wurde als periplasmatisches Protein exprimiert, als Periplasmalysat präpariert und per Affinitätsäulenchromatographie mit M2-Agarose aufgereinigt. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt an, dass sich das Protein in den Eluatelanes 2 und 3 befindet.

5.3.3 Methoden zur Herstellung von Proteinkomplexen aus rekombinanter VHH und mART2.2

Für die Herstellung eines Proteinkomplexes aus mART2.2-His6xFLAG und einer für sie spezifischen VHH wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt (Abb. 5.25). Nachdem beide Proteine exprimiert worden waren, wurden sie separat aufgereinigt und danach zur Komplexbildung inkubiert (Abschnitt 5.3.3.1). Alternativ wurden die Periplasmalysate

beider Expressionskulturen koinkubiert und die bereits komplexierten Proteine gemeinsam ausgereinigt (Abschnitt 5.3.3.2).

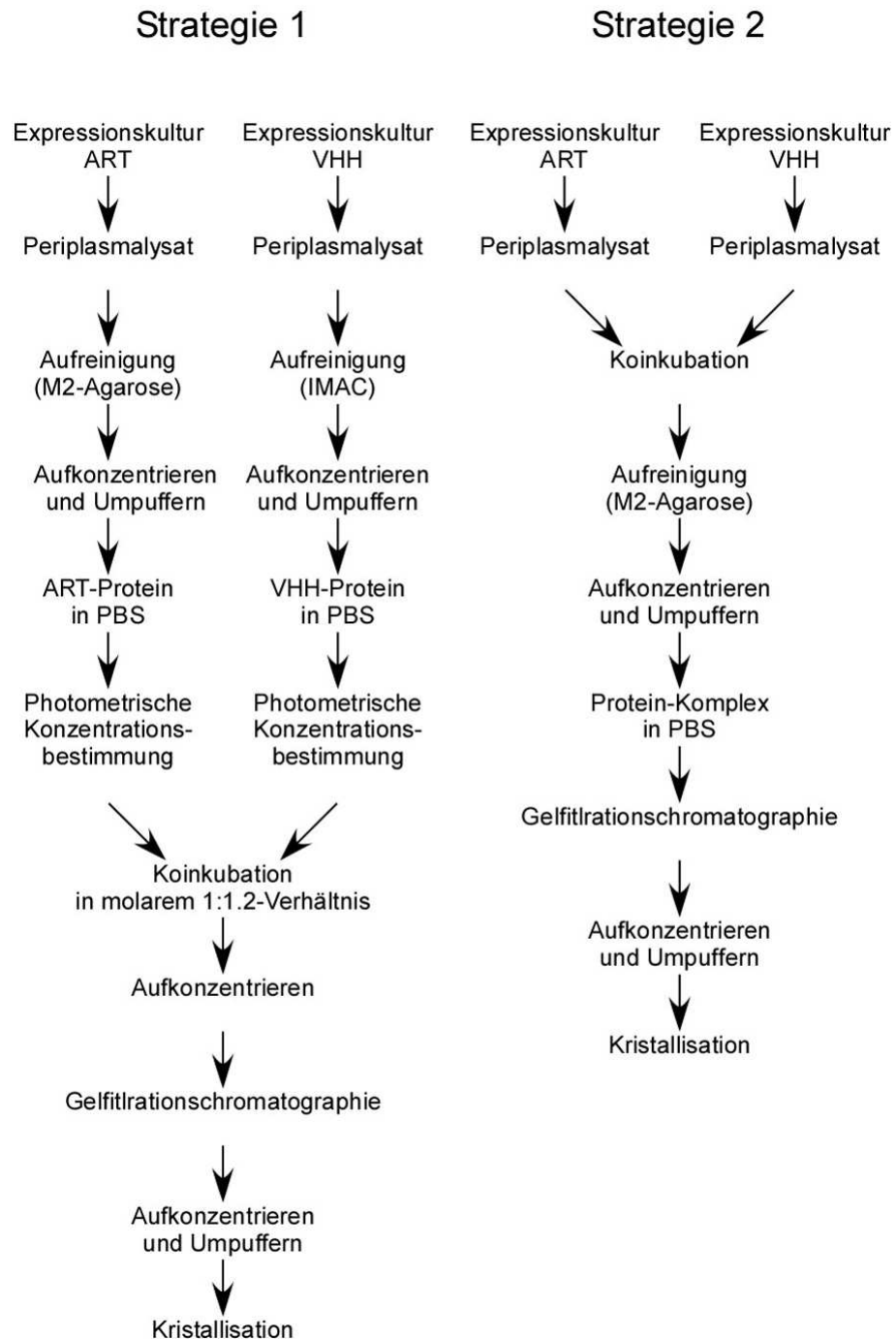


Abb. 5.25: Alternative Strategien zur Herstellung von VHH-ART-Proteinkomplexen. Strategie 1 stellt die ursprüngliche Methode dar. Strategie 2 ist zeitsparender und technisch einfacher.

5.3.3.1 Präparation des Antikörper-Antigen-Komplexes durch Koinkubation von ART und VHH in aufgereinigter Form (Strategie 1)

Damit sich das mART2.2-His6xFLAG-Protein zu einem möglichst hohen Anteil an der Bildung des gewünschten Komplexes aus ART und VHH beteiligt, wurde für die Koinkubation der in PBS gelösten Proteine ein molares Mischverhältnis von 1 (ART) zu 1.2 (VHH) eingestellt. Für die Komplexbildung wurde der Ansatz 30 Minuten bei 4°C rollend inkubiert. Durch eine angeschlossene fraktionierte Gelfiltrationschromatographie konnte nicht komplexiertes VHH-Protein effektiv abgetrennt werden (Abb. 5.26).

Innerhalb der Folge von Fraktionen 41 bis 66 zeigen sich drei Absorptionsmaxima. Das erste Maximum (Fraktionen 43-45) setzte sich aus ART- und VHH-Protein zusammen, die in einem Komplex vorlagen. Abgesehen von der kürzeren Retentionszeit gleicht dieses somit dem Maximum 2 (Fraktionen 49-52). Dieses zweite Maximum umfasst mit etwa 1,5 mg weit mehr Protein-Komplexe als das erste. Ein drittes Absorptionsmaximum formiert sich nach deutlich längerer Retention (Fraktionen 60-63). Die eluierten Proteine waren ausschließlich VHHs, die nicht an einer Komplexbildung teilgenommen hatten.

Die *Peak*-Fraktionen des zweiten Maximums wurden vereinigt und durch Diafiltrationszentrifugation zunächst aufkonzentriert, anschließend in HBS umgepuffert. Nach Erreichen einer Proteinkonzentration von 7,2 mg/ml in einem Volumen von 200 µl wurden Aliquots der Proteinlösung in der Gelelektrophorese analysiert (Abb. 5.27). In der Präparation sind Spuren von zwei kleineren Banden zu erkennen, die möglicherweise prozessierte oder unvollständig oxidierte VHH-Proteine darstellen. Kristallographische Arbeiten wurden in den Laboren der HT-X facility, EMBL Hamburg durchgeführt (Abschnitt 5.3.4).

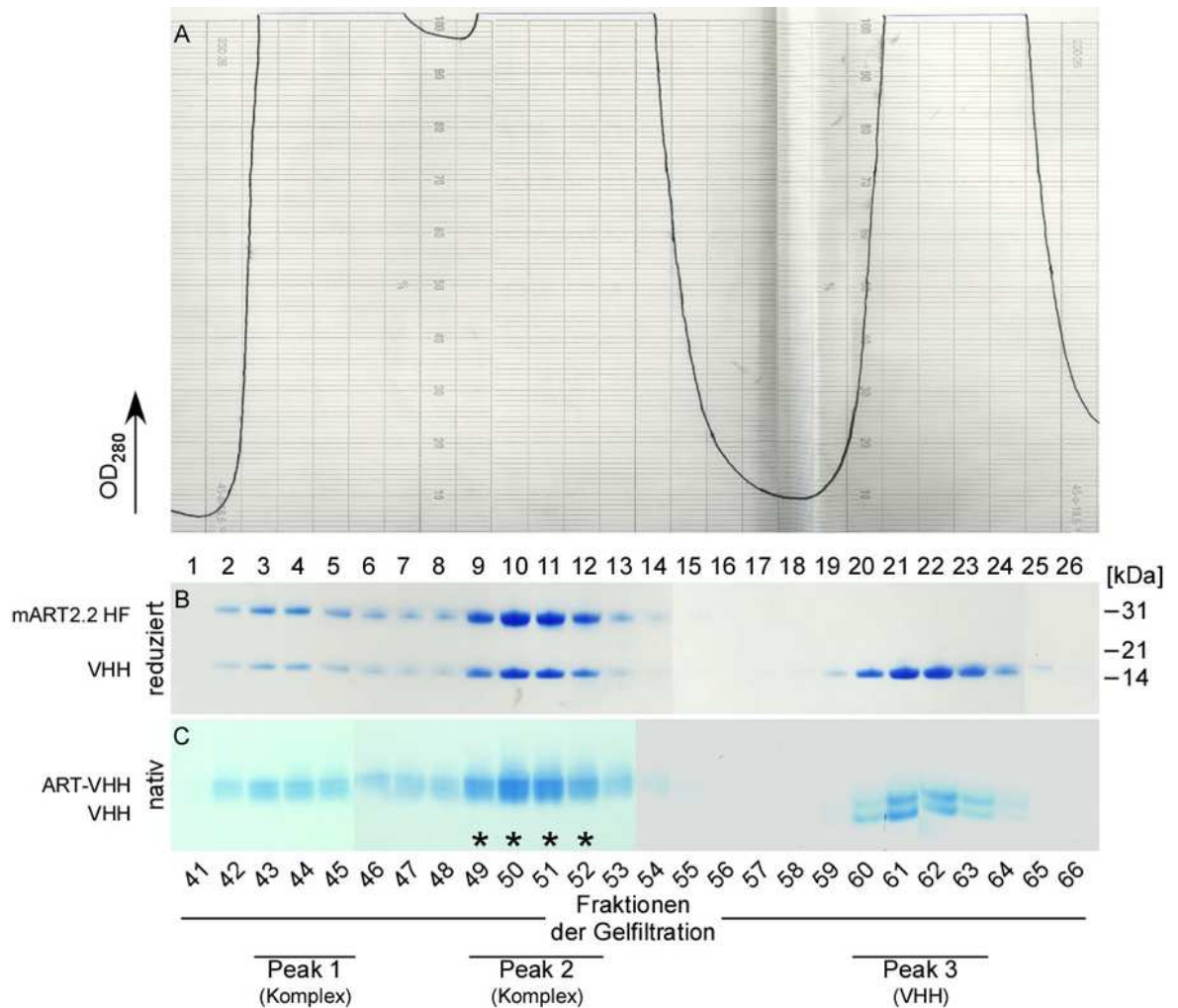


Abb. 5.26: Plot und Gelelektrophorese von Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie eines mART2.2-VHH-Komplexes. Aus dem Plot (A) kann abgelesen werden, welche Fraktionen Protein enthalten. In der reduzierenden SDS-PAGE (B) zeigt sich, dass in frühen Fraktionen (42-53) ART- und VHH-Proteine gemeinsam auftreten. Native Gelelektrophorese (C) offenbart, dass diese als Komplexe vorliegen. Deutlich durch Retentionszeit und Laufverhalten davon zu unterscheiden ist VHH-Protein alleine (Fraktionen 60-64). Der Doppelbandencharakter von Proteinen im nativen Gel kann durch eine Reduktion von Disulfidbrücken in einigen Molekülen erklärt werden. Mit einem (*) gekennzeichnete Fraktionen wurden für die Kristallographie aufbereitet.

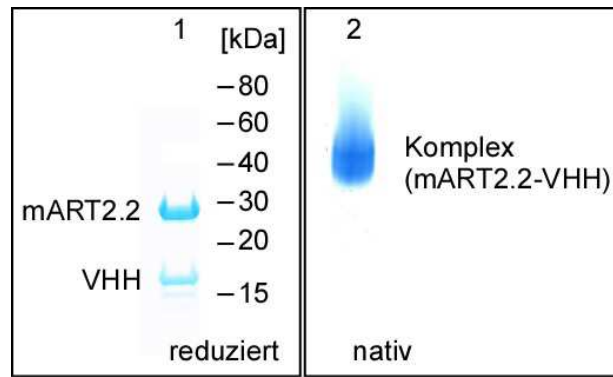


Abb. 5.27: Gelelektrophorese der Proteinpräparation des Antikörper-Antigen-Komplexes unter Beteiligung von Epitop-markierter VHH. Unter reduzierenden Bedingungen werden die Interaktionen zwischen ART und VHH aufgehoben und der Komplex verfällt in seine einzelnen Bestandteile. Während der nativen Elektrophorese bleibt der Komplex bestehen. Solitäre VHH-Proteine sind nicht detektierbar

5.3.3.2 Koaufrreinigung und Präparation von ART und VHH als Antikörper-Antigen-Komplex (Strategie 2)

Wie zuvor wurde mART2.2 als periplasmatisches Protein mit C-terminalen His6x- und FLAG-Markierungen exprimiert (Abschnitt 5.3.2). Die Expression der VHH erfolgte wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, doch wurde der Expressionsvektor so verändert, dass das Protein nun keine Epitop-Markierungen mehr trug (Abschnitt 5.3.3.3). Die Periplasmalysate beider Expressionskulturen wurden vereinigt, die Ausbildung von Antikörper-Antigen-Komplexen erfolgte während einer Inkubation von 30 min bei 4°C. Anschließend fand die Aufrreinigung des Komplexes per Affinitätschromatographie mit M2-Agarose (Sigma) über die FLAG-Markierung der mART2.2 statt. Die reduzierende SDS-Gelelektrophorese (Abb. 5.28) bestätigt, dass ART und VHH gemeinsam aufgereinigt wurden.

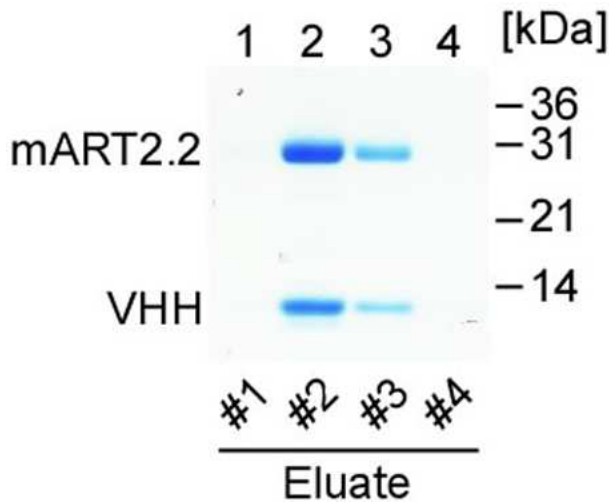


Abb. 5.28: Koaufrreinigung von mART2.2-HF und unmarkierter VHH JR0345_s+16a. Nach Passage eines Gemisches von Periplasmalysaten mit mART2.2-His6xFLAG-Protein und mit VHH-Protein durch eine M2-Agarose-Chromatographiesäule konnten in den Eluaten 2 und 3 sowohl die FLAG-markierte mART2.2 als auch die unmarkierte VHH gefunden werden.

Durch eine fraktionierende Gelfiltrationschromatographie (Abb. 5.29) wurde ein ausreichend hoher Reinheitsgrad der Präparation für die Kristallographie gewährleistet. Die an Hand der Elektrophorese-Analysen ausgewählten Fraktionen 50 - 54 (Abb. 5.29 A) wurden per Diafiltrationszentrifugation aufkonzentriert und in HBS umgepuffert. Es wurde ein Endvolumen von 110 µl mit einer Proteinkonzentration von ca. 20 mg/ml erreicht. Kristallisationsarbeiten wurden in den Laboren der HT-X facility, EMBL Hamburg durchgeführt (Abschnitt 5.3.4).

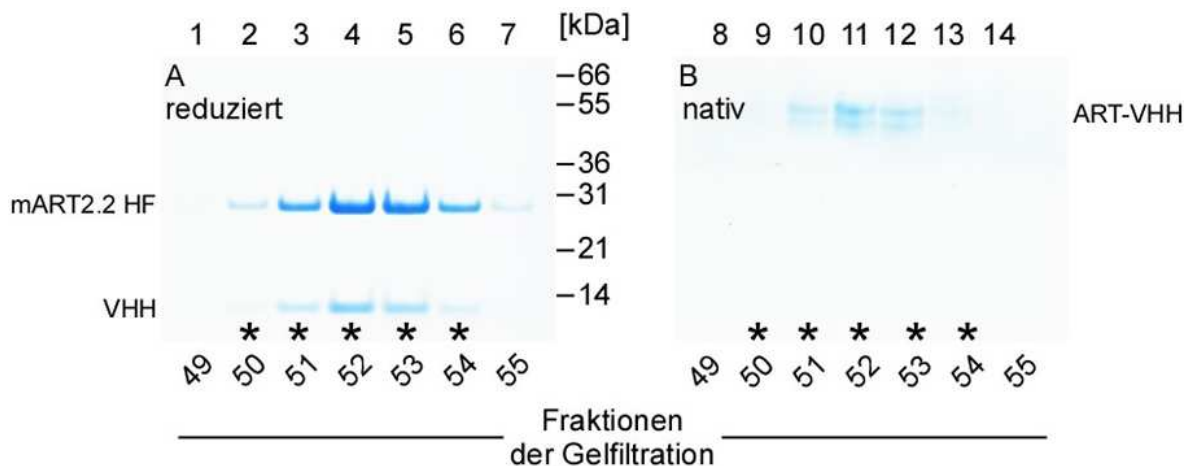


Abb. 5.29: Gelelektrophorese von Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie eines Komplexes aus ART und unmarkierter VHH. In der reduzierenden SDS-PAGE (A) zeigt sich, dass das im Proteinmaximum (Fraktionen 50-54) ART- und VHH-Proteine gemeinsam auftreten. Native Gelelektrophorese (B) zeigt, dass diese Proteine im Komplex vorliegen. Mit einem (*) gekennzeichnete Fraktionen wurden vereinigt und für die Kristallisation aufbereitet.

5.3.3.3 Erzeugung der VHH JR0345_s+16a ohne Epitop-Markierungen

Für diesen Versuchsabschnitt wurde der Phagen-Display-Vektor pHEN2, der die cDNA der VHH JR0345_s+16a inseriert hatte, einer gerichteten PCR-Mutagenese unterzogen. Durch die Erzeugung eines doppelten Stop-Kodons (TAATAA, „ochre-ochre“) zwischen dem C-terminalen Ende der VHH-cDNA und dem die His6x- und c-Myc-Markierungen kodierenden Bereichen des Vektors, konnte eine unmarkierte Variante des Proteins hergestellt werden.

5.3.4 Kristallographische Vorversuche

Für ein initiales Durchmühen von 384 bzw. 480 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen im „*sitting drop*“-Verfahren wurde das vollautomatische Hydra plusOne Crystallization Robot (HT-X facility, EMBL Hamburg) eingesetzt. Es war möglich, für Proteinpräparationen aus beiden Herstellungsstrategien vielversprechende Pufferbedingungen für das Entstehen von Kristallen zu bestimmen.

Für den Komplex aus mART2.2-HF und VHH JR0345_s+16a mit His6x- und c-Myc-Markierung wurden die besten beobachteten Pufferbedingungen mit 1.9 M Natriummalonat, pH 6.0 ermittelt. Hier wurde die Bildung eines orthorhombischen Kristalls begünstigt (Abb. 5.30 A). Eine Reproduktion dieses Ergebnisses gelang bisher im größeren Maßstab nicht.

Bei der Durchmusterung von Kristallisationsbedingungen für den Proteinkomplex aus mART2.2-His6xFLAG und unmarkierter VHH JR0345_s+16a fanden sich mit 1.9 M Natriummalonat, pH 6.0 identische optimale Konditionen (Abb. 5.30 B). Auch unter geringfügig von diesen Pufferbedingungen abweichende Ansätze zeigte der Komplex Neigung zur Kristallisation (Abb. 5.30 C & D).

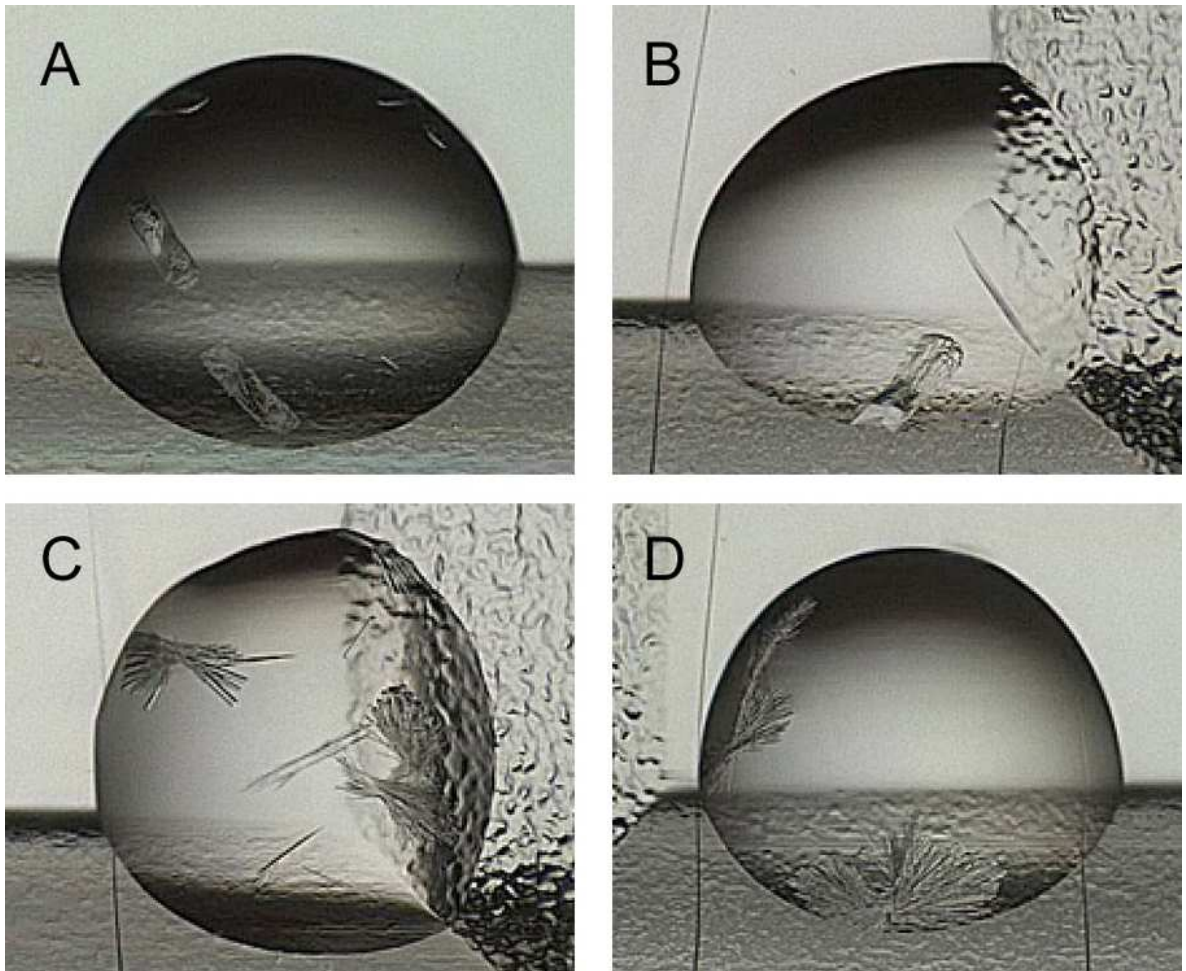


Abb. 5.30: „Sitting drop“-Nano-Kristallisationsansatz für mART2.2-VHH-Komplexe. (A) Komplex unter Beteiligung von His6x- und c-Myc-markierter VHH; Puffer: 1.9 M Natriummalonat, pH 6.0. (Plate: S0005769, G11, Screen: Grid_com, Name: ARTVHH16). (B) Komplex unter Beteiligung einer unmarkierten VHH; Puffer: 1.9 M Natriummalonat, pH 6.0. (Plate: S0006388, G9, Screen: Grid_ih, Name: ARTVHH16#3). (C) Proteine wie bei B, jedoch andere Pufferbedingungen: 2.1 M Natriummalonat, pH 7.0. (Plate: S0006389, B11, Screen: Index_ih, Name: ARTVHH16#3). (D) Proteine wie bei B, jedoch andere Pufferbedingungen: (online nicht verfügbar) (Platte: S0006391, E1, Screen: JCSG). Aufnahme durch das automatische Dokumentationssystem am 12. Tag nach Beginn der Inkubation. Der Tropfen befindet sich im Napf einer 96-well Screening-Platte. Der Napf hat die Form eines umgekehrten Pyramidenstumpfes, der Tropfen sitzt am Rand der Bodenfläche.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, inhibitorische VHHs zu finden, in Immuno-Bibliotheken stark erhöht ist (Abschnitt 6.1). Die Vorzüge von Einzeldomänen-Antikörpern gegenüber anderen inhibitorischen Molekülen und konventionellen Antikörpern werden in Abschnitt 6.2 dargestellt. Da die Verweildauer von Einzeldomänen-Antikörpern nach Injektion relativ kurz ist, werden in Abschnitt 6.3 Möglichkeiten der Verlängerung der Serum-Halbwertszeit von VHHs erörtert.

Die Beobachtung von Subklassenwechseln von Schwere-Ketten-Antikörpern geben Hinweise auf die genomische Organisation des Immunglobulin-Locus (Abschnitt 6.4).

Des weiteren demonstrieren die erzielten Ergebnisse erstmals die effektive, reversible Blockade eines Leukozyten Ekto-Enzyms *in vivo*. Eine einmalige intravenöse Injektion der VHH JR0345_s+16old bewirkt dabei die Ausschaltung der enzymatischen und zytotoxischen Aktivität der mART2.2 auf der Oberfläche von Lymphknotenzellen (Abb. 5.14 & 5.15). Mit Ansätzen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen dieser Inhibition setzt sich der Abschnitt 6.5 auseinander.

Ein abschließender Ausblick vermittelt einen Eindruck vom Potential der Einzeldomänen-Antikörper als immunmodulierende Agentien, bei der Bekämpfung von Krankheiten und als Antitoxin (Abschnitt 6.6).

6.1 Die Verwendung von Immuno-Bibliotheken erhöht die Wahrscheinlichkeit, inhibitorische Einzelketten-Antikörper aufzufinden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier mART2.2-spezifische Einzeldomänen-Antikörper kloniert, von denen drei in der Lage sind das mART2.2-Enzym zu inhibieren. Dieses hohe Verhältnis von Inhibitoren zu Bindern scheint typisch für Schwere-Ketten-Antikörper zu sein, wenn Arbeiten mit einer Immuno-Bibliothek durchgeführt werden. Untersuchungen von Lysozym-spezifischen Einzeldomänen-Antikörpern, die aus einem immunisierten Dromedar gewonnen wurden, ergaben, dass sechs von acht Lysozym-bindenden VHH-Domänen eine Enzym-inhibierende Aktivität aufweisen (DE GENST *et al.*, 2006). Dies steht in Kontrast zu dem seltenen Auftreten von

Enzym-Inhibitoren in einer synthetischen Phagen-Bibliothek. Für ein Kartoffelstärke verzweigendes Enzym wurde dort unter acht bindenden Einzeldomänen-Antikörpern nur eine inhibierende VHH-Domäne gefunden (JOBILING *et al.*, 2003). Vermutlich werden Enzym-inhibierende Schwere-Ketten-Antikörper durch das Immunsystem des Lamas oder Dromedars während der natürlichen Immunantwort bevorzugt selektiert. VHH-Domänen weisen, wie schon gezeigt wurde, lange CDR3-Regionen auf, die dazu neigen konvexe Paratope zu bilden. Damit unterscheiden sie sich deutlich von den planen Interaktionsflächen, die für die konventionellen V_H - V_L -Domänen typisch sind (DE GENST *et al.*, 2006). Diese langen hypervariablen Proteinschleifen tendieren dazu, sich in Vertiefungen auf dem Protein einzupassen, die z. B. häufig im aktiven Zentrum von Enzymen gefunden werden. Es ist denkbar, dass bei Kameliden sowohl die genetische Immunisierung als auch die Immunisierung mit dem nativen Enzym zur Präsentation dieses Enzym-Antigens auf den folikulären dendritischen Zellen im Lymphknoten führt. Die Kerbe des aktiven Zentrums wäre so ein prominentes Antigen. In der Folge würden dann solche Schwere-Ketten-Antikörper-produzierenden B-Zellen zur klonalen Expansion stimuliert werden, die gute Bindeeigenschaften für dieses Epitop aufweisen. Dies wären bevorzugt Klone, die VHH-Domänen mit konvexen Paratopen exprimieren, die zum aktiven Zentrum komplementär sind. Hingegen würden B-Zellen, die Einzeldomänen-Antikörper mit flachen Paratopen exprimieren, durch Regionen des Enzyms selektiert, die außerhalb der aktiven Spalte liegen und mit B-Zellen in Konkurrenz treten, die konventionelle Antikörper produzieren.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese verfügen die drei mART2.2-inhibierenden Einzelketten-Antikörper aus dem Lama über lange CDR3s von 16 bis 17 Aminosäuren Länge, wohingegen die einzige nicht inhibierende VHH eine kürzere CDR3 mit 14 Aminosäuren aufweist (Abb. 5.4). Es wird von großem Interesse sein zu bestimmen, ob eine gleichartig bevorzugte Selektion von Enzyme-blockierenden Antikörpern auch in transgenen Mäusen erreicht werden kann, die kameliden Schwere-Ketten-Antikörper exprimieren (JANSSENS *et al.*, 2006).

6.2 Vorzüge von Einzeldomänen-Antikörpern gegenüber inhibitorischen Molekülen und konventionellen Antikörpern

Einzelketten-Antikörper bieten wichtige Vorzüge gegenüber sowohl kleinen inhibierenden Molekülen als auch konventionellen Antikörpern. Ein Vorteil der VHH-Domänen gegenüber kleinen molekularen Inhibitoren sind hohe Spezifität und Affinität der Antikörper, die aus der Selektion und Affinitätsreifung in Rahmen der *in vivo*-Immunantwort resultiert.

Die dreidimensionale Struktur der ART2.2 der Ratte und wahrscheinlich auch die Struktur der mART2.2 sowie verwandter bakterieller Toxine, weisen sehr ähnliche NAD⁺-bindende Kerben mit konservierten Schlüsselpositionen der katalytischen Aminosäuren im aktiven Zentrum auf (MUELLER-DIECKMANN *et al.*, 2002; RITTER *et al.*, 2003). Auch die Mechanismen der Bindung von NAD⁺ und die Übertragung des ADP-Riboserestes sind die gleichen. Nikotinamid inhibiert sowohl bakterielle, als auch eukaryotische ARTs, wie die meisten anderen NAD⁺-Analoge und kleinen ART-Antagonisten (BANASIK *et al.*, 1992; SEMAN *et al.*, 2004). Viele dieser Inhibitoren beeinflussen jedoch auch andere Stoffwechselprozesse von Zellen, an denen NAD⁺ beteiligt ist.

Die Bindeeigenschaften eines Antikörpers für sein Antigen kann durch geringste Veränderungen in der Struktur des Antigens beeinflusst werden. Häufig wurde daher beobachtet, dass eine einzige Aminosäuresubstitution in einem antigenen Epitop die Bindung des Antikörpers verhindert. In Übereinstimmung damit inhibieren die mART2.2-spezifischen VHH-Domänen die Aktivität von mART2.2, beeinflussen jedoch nicht die enzymatische Aktivität der eng verwandten mART2.1 und mART1 (Abb. 5.8). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass VHH-Domänen ein effektiveres Werkzeug zur Blockade spezifischer Mitglieder von Ekto-Enzym-Familien sein können, als kleine Substrat-Analoge. Darüber hinaus könnte der Einsatz von enzymespezifischen VHH-Domänen die unerwünschten Nebeneffekte unterbinden, die auftreten können, wenn kleine, wenig spezifische Inhibitorsubstanzen alle Mitglieder einer Enzymfamilie oder ganze Stoffwechselwege beeinflussen.

Die murine ART2.2 zeichnen sich durch eine recht promiskuitive Zielspezifität aus. Als Expressionskonstrukt in Zellen transfiziert und als membranständiges Protein exprimiert, ADP-ribosyliert sie viele andere Zelloberflächenproteine, wie z. B. das Integrin LFA-1

(KREBS *et al.*, 2003) und den P2X₇-Purinorezeptor (ADRIOUCH *et al.*, 2007). Es wurde vor kurzem gezeigt, dass die Assoziation der mART2.2 mit *lipid rafts*, Cholesterin-reiche Mikrodomänen in Zellmembranen, die Auswahl der für sie verfügbaren Zielproteine vermindert (BANNAS *et al.*, 2005). Nach ihrer Freisetzung aus dem Verbund mit der Plasmamembran, entweder durch Metalloprotease-vermittelte proteolytische Spaltung des Stiels, oder durch PI-PLC-vermittelte Spaltung des GPI-Ankers, kann die lösliche mART2.2 viele andere lösliche Proteine modifizieren. Dazu zählen auch nicht-physiologische Ziele, wie argininreiche Histone und das kleine Arginin-Analogon Agmatin (KAHL *et al.*, 2000). Vergleichbare Aktivitäten zeigt rekombinant in Insektenzellen oder *E. coli* hergestellte mART2.2 (KOCH-NOLTE *et al.*, 1996; GLOWACKI *et al.*, 2002). Es liegt nahe, dass die beobachtete, voneinander abweichende Zielspezifität von löslicher und membranständiger mART2.2 eher in der veränderten Zugänglichkeit als in unterschiedlichen Konformationen der mART2.2 begründet liegt. Alle bekannten mART2.2-spezifischen monoklonalen Ratten-Antikörper binden sowohl lösliche, als auch membranständige mART2.2 (KOCH-NOLTE *et al.*, 1999; KOCH-NOLTE *et al.*, 2005). Damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang, dass die drei mART2.2-inhibierenden VHHs sowohl lösliche, als auch membranständige mART2.2 inhibieren (Abb. 5.11-13).

Entscheidende Vorteile der Einzeldomänen-Antikörper gegenüber konventionellen Antikörpern sind die höhere Löslichkeit und Stabilität, die Präferenz für das Binden in aktive Zentren von Enzymen (Abb. 2.7) und das Fehlen eines F_c-Teils. Ohne F_c-Fragment können rekombinante VHH-Domänen keine über dieses Element vermittelten Effektorfunktionen auslösen. So werden unerwünschte Nebeneffekte, wie die Aktivierung oder die Depletion der das Zielantigen exprimierenden Zell-Subpopulation, verhindert (WALDMANN, 2003). Die bevorzugte Bindung an sowie die damit verbundene Blockade von aktiven Zentren von Enzymen durch Einzeldomänen-Antikörper (DE GENST *et al.*, 2006) wird durch die Tatsache unterstrichen, dass drei von vier hier selektierten mART2.2-spezifischen VHH-Domänen Inhibitoren der enzymatischen und zytotoxischen Aktivität sind. Im Gegensatz dazu ist keiner von zwölf konventionellen mART2.2-spezifischen monoklonalen Ratten-Antikörpern, die in unserem Labor erzeugt wurden (KOCH-NOLTE *et al.*, 1999; KOCH-NOLTE *et al.*, 2005), in der Lage die enzymatische Aktivität der mART2.2 zu blockieren.

6.3 Steigerung der Serum-Halbwertszeit der VHH

Die vollständige Blockade der mART2.2 durch die VHH war innerhalb von 15 Minuten nach der Injektion nachweisbar und dauerte mindestens sechs Stunden an, war jedoch 24 Stunden nach der Injektion nicht mehr vorhanden. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Umstand, dass die geringe Größe (14-17 kDa), die globuläre, kompakte Struktur und die hohe Stabilität von Einzeldomänen-Antikörpern sowohl in einer Fähigkeit zur guten Gewebepenetration, als auch in einer raschen renalen Exkretion resultieren (DESMYTER *et al.*, 1996; MUYLDERMANS, 2001; CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2004; BARAL *et al.*, 2006).

Eine schnelle und reversible Blockade von Leukozyten Zelloberflächen-Enzymen könnte zum Beispiel bei einer akuten Entzündungsreaktion, oder einem Gewebeschaden indiziert sein. Wird eine länger anhaltende Wirkung angestrebt, so könnte die wiederholte Inhibition des Enzyms erforderlich sein. Neben einer mehrfachen Injektion stehen hierfür eine Reihe verschiedener Techniken zur Verfügung. Beispielsweise kann die Avidität durch eine Dimerisierung von VHH-Domänen über ein *Linkerpeptid* erfolgen (HOLLIGER & HUDSON, 2005). Auch die Fusion von VHH-Domänen mit Proteinen, die lösliche Multi-Proteinkomplexe bilden kann unter bestimmten Bedingungen nützlich sein. Eine Alternative zur Fusionierung zweier identischer VHHs stellt die Verbindung von zwei VHHs mit unterschiedlicher Spezifität dar. Sofern sich eine der VHHs gegen ein langlebiges Serumprotein richtet, kann so die Serum-Halbwertszeit der fusionierten VHH erhöht werden (HARMSSEN *et al.*, 2005; ROOVERS *et al.*, 2007). Auch die direkte Fusion mit einem Serumprotein, wie z. B. der F_c-Domäne eines Antikörpers, ist denkbar (GHETIE *et al.*, 1997). Eine Verlängerung der Serum-Halbwertszeit der VHH-Domäne könnte auch durch eine PEGylierung erzielt werden (HOLLIGER & HUDSON, 2005). Diese kovalente Modifikation verhindert die Ausscheidung während der glomerulären Filtration. Dieser Effekt wird zum einen durch die elektrostatische Abstoßung der gleichartigen Ladungen der Basalmembran des Glomerulus und des PEGs verursacht. Zum anderen erreicht die VHH durch die PEGylierung eine Größe, die eine Ultrafiltration unter normalen Bedingungen nicht mehr zulässt. Als unterer Grenzwert für nicht in den Primärharn abgeschiedene Moleküle gilt eine Größe von 66 kDa. Diese Methode bietet auf Grund der Verfügbarkeit unterschiedlich schwerer Polyethylenglycol-Moleküle die Möglichkeit zu einer genauen Anpassung an spezielle Anforderungen.

6.4 Somatische Mutationen und Subklassenwechsel im Rahmen einer Auffrischungsimpunisierung

Drei auffällige Beobachtungen wurden bei der Analyse des VHH-Repertoires des Lamas in peripheren Blutlymphozyten am siebten Tag nach einer erneuten Immunisierung gemacht.

Dies ist zum einen das gehäufte Auftreten von Varianten bereits aus der vorhergehenden Immunantwort bekannter mART2.2-spezifischer Einzeldomänen-Antikörper und zum anderen die Fülle dieser unterschiedlichen Varianten. Bereits in der Primärbibliothek ähneln 29 von 85 untersuchten Klonen der VHH0742_1-17 stark, drei davon sind mit dieser zu 100% sequenzidentisch, fünf Klone sind der VHH0337_s-14 sehr ähnlich. Alle VHH-Domänen, die im Verlauf von zwei Selektionsrunden auf mART2.2-Bindung aus dieser neu erstellten Phagen-Bibliothek angereichert wurden, können auf Grund einer hohen Sequenzähnlichkeit einer der vier VHHs JR0337_s-14, JR0345_s+16a, JR0872_s+16b oder JR0742_1-17 zugeordnet werden. Nur eine Gruppe von Einzeldomänen-Antikörpern um die VHH JR2149_1+16 geht vermutlich auf eine neu in Erscheinung getretene Population von B-Zellen zurück. Da diese VHHs inner halb der CDRs eine große Ähnlichkeit mit den Sequenzen der VHHs JR0345_s+16a und JR0872_s+16b aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass diese Einzeldomänen-Antikörper das gleiche Epitop erkennen. In diesem Fall wäre eine konvergente Entwicklung der Paratope für deren große Ähnlichkeit verantwortlich.

Eine Überprüfung dieser Hypothese sollte durch einen Kompetitionstest erfolgen. In diesem würde zunächst eine der VHHs mit dem Antigen inkubiert werden, an ihr Epitop binden und es besetzen. Andere VHHs, die dasselbe Epitop erkennen, könnten danach nicht mehr oder nur zu einem geringen Anteil ans Antigen binden. Werden die Einzeldomänen-Antikörper mit einem jeweils anderen Fluorochrom konjugiert, kann durch eine FACS-Analyse festgestellt werden, welche VHHs am Antigen gebunden haben. Eine einfache Anfärbung gäbe einen Hinweis darauf, dass die untersuchten Einzeldomänen-Antikörper dasselbe Epitop erkennen, eine Doppelanfärbung resultierte aus verschiedenen Antigenbindungsstellen.

Sowohl das Erscheinen der großen Vielfalt von Antikörper-Varianten als auch deren festgestellte relative Sequenzähnlichkeit können als Hinweis auf eine Reaktivierung von Gedächtnis-B-Zellen gedeutet werden. Es ist naheliegend anzunehmen, dass die

zahlreichen somatischen Mutationen im Verlauf einer erneuten klonalen Expansion entstehen.

Die dritte auffällige Beobachtung ist der Subklassenwechsel vom IgG3(*short hinge*)- zum IgG2(*long hinge*)-Typ bei den drei bekannten mART2.2-spezifischen *short hinge*-VHHs JR0337_s-14, JR0345_s+16a und JR0872_s+16b. Über die genomische Organisation des Immunglobulin-Locus beim Lama ist bis jetzt nicht viel bekannt (WOOLVEN *et al.*, 1999). Arbeiten zu dessen Kartierung finden gegenwärtig in unserem Arbeitskreis statt. Geht man davon aus, dass die verantwortlichen Mechanismen ähnliche sind wie die, die bei konventionellen Antikörpern für einen Isotypwechsel verantwortlich sind, so müssen zwei Situationen betrachtet werden.

Eine konventionelle B-Zelle ist nach der Umschaltung von IgM/IgD-Co-Expression auf einen anderen Isotyp, wie z. B. IgG, in der Lage weitere Klassenwechsel zu einem strangabwärts gelegenen C-Gensegment durchzuführen. Solche Wechsel zu anderen Isotypen erfolgen als Reaktion auf die Stimulation durch Antigenkontakt unter Einfluss von T_H2-Zytokinen. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse deuten an, dass der IgG2(*long hinge*)-Locus strangabwärts des IgG3(*short hinge*)-Locus liegt.

6.5 Aufklärung der molekularen Mechanismen der Inhibition von mART2.2 durch Epitopkartierung und Co-Kristallisation von mART2.2 und Einzeldomänen-Antikörper

Untersuchungen zur Epitopkartierung (Abb. 5.10) deuten an, dass die VHHs unterschiedliche Epitope auf dem Antigen erkennen. Alle drei untersuchten VHHs binden die mART2.2, jedoch nicht das Homolog der Ratte. Die beiden VHHs JR0337_s-14 und JR0345_s+16a binden an die m-rART2.2-Chimäre, nicht jedoch an die r-mART2.2-Chimäre. Diese nicht gebundene Chimäre unterscheidet sich von der mART2.2 in 27 Positionen in der N-terminalen Hälfte (Abb. 6.1). Da die VHH JR0337_s-14 die enzymatische Aktivität nicht hemmt, ist anzunehmen, dass sie nicht in der Nähe des aktiven Zentrums bindet. Die VHH JR0345_s+16a hingegen inhibiert die mART2.2-Aktivität und bindet daher wahrscheinlich im oder nahe des aktiven Zentrums. Die VHH JR0742_1-17 erkennt ein Epitop der r-mART2.2-Chimäre. Sie bindet jedoch nicht an die m-rART2.2-Chimäre. Letztere unterscheidet sich in der C-terminalen Hälfte in 31 Aminosäurepositionen von der mART2.2 (Abb. 6.1). Da die Bindung der VHH JR0742_1-17 die enzymatische Aktivität inhibiert, ist anzunehmen, dass sie im oder in der Nähe des aktiven Zentrums bindet.

Um die mögliche Bedeutung dieser Aminosäuresubstitutionen für die Enzymaktivität beurteilen zu können, wurde auf der Basis der bekannten Kristallstruktur der rART2.2 (in der pdb-Datenbank unter der Kennziffer 1OG3 hinterlegt (MUELLER-DIECKMANN *et al.*, 2002) ein *in silico*-Modell der mART2.2 erstellt. Hierfür wurde das online verfügbare Programm SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) genutzt (GUEX & PEITSCH, 1997; SCHWEDE *et al.*, 2003; ARNOLD *et al.*, 2006). Die Vorhersagen in dieser Modellierung gelten in über 95% der Positionen als sicher (s. Anhang 9.2).

Die VHHs JR0345_s+16a und JR0742_1-17 inhibieren wahrscheinlich durch Behinderung der Substratbindung die enzymatische Aktivität der mART2.2. Aus der Epitopkartierung und den Strukturvergleichsstudien der beiden Chimären (Abb. 6.2) geht hervor, dass die Anzahl der für den Verlust der Bindung der VHHs möglicherweise verantwortlichen Aminosäuresubstitutionen begrenzt ist. Im Falle der VHH JR0345_s+16a sind dies vor allem S81N, I82L und/oder V84I, bei der VHH JR0742_1-17 kommen

insbesondere die Substitutionen T130V, E159N, F183S, R184F, D186R und Q187E in Frage.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse können zur weiteren Charakterisierung der Epitope der inhibierenden Einzeldomänen-Antikörper Mutagenese-Studien durchgeführt werden. Die nicht von den inhibitorischen VHHs erkannten Chimären stellen dabei eine Negativkonstellation als Ausgangsbasis dar. Die determinierten Aminosäurepositionen in den beiden Chimären sollten dabei durch zielgerichtete Mutagenesen schrittweise an die Sequenz der mART2.2, des erkannten Antigens, angeglichen werden und dann jeweils dahingehend getestet werden, ob sie von den mART2.2-spezifischen Einzeldomänen-Antikörpern gebunden wird.

In Umkehrung dieses Konzeptes können auch in der mART2.2 die neun Aminosäuren in aufeinander folgenden Schritten durch zielgerichtete Mutagenesen durch Alanin oder durch die entsprechende Aminosäure der rART2.2 substituiert werden. Hierbei würde der Verlust der Bindeeigenschaft der mART2.2-spezifischen VHH-Domänen Aufschluss über die das Epitop bildenden Aminosäuren Aufschluss geben.

Schließlich können auch die Aminosäuren der CDR3s der spezifisch bindenden VHHs schrittweise mutiert werden und so für die Bindung essentielle Aminosäuren bestimmt werden. Im Fall der Einzeldomänen-Antikörper JR0345_s+16a, JR0872_s+16b und JR2149_s+16, die vermutlich konvergent entwickelte CDRs aufweisen und das gleiche Epitop binden, sind hierfür insbesondere die als konserviert identifizierten Aminosäurepositionen interessant.

Den besten Hinweis auf den Mechanismus der Inhibition der mART2.2 durch den Einzeldomänen-Antikörper JR0345_s+16a wird die Aufklärung der Röntgenstruktur des Co-Kristalls aus Antigen und VHH geben. Die Auswertung der so gewonnenen Daten wird sehr detaillierte Informationen über die Inhibition liefern.

mART2.2-inhibierende Lama-Einzeldomänen-Antikörper

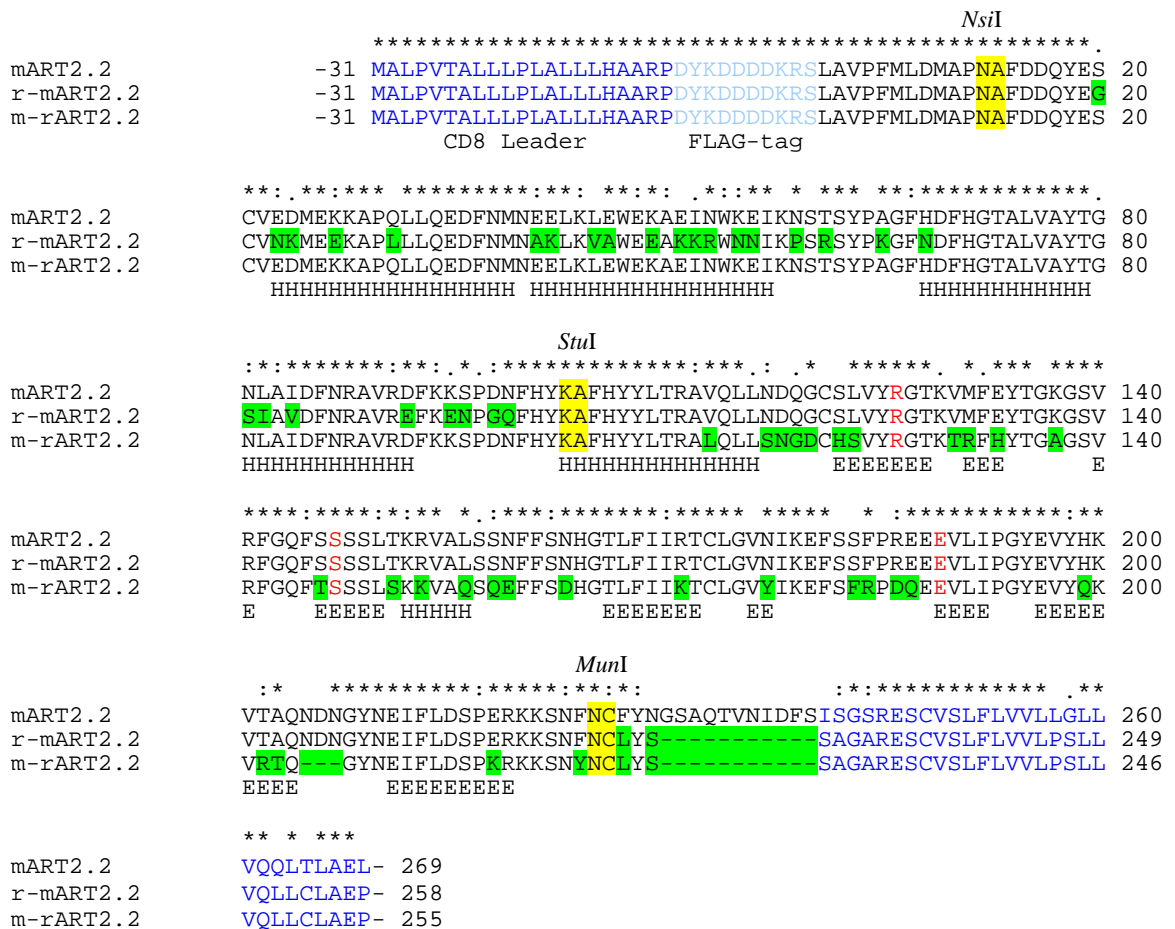


Abb. 6.1: Sequenzvergleich der mART2.2 und der beiden Chimären r-mART2.2 und m-rART2.2. Gelb hervorgehoben sind Bereiche, in denen auf DNA-Ebenen die für die Chimären-Erzeugung genutzten Restriktionsschnittstellen liegen (*NsiI*, *StuI*, *MunI*). Durch deren Lage bedingt entsprechen die ersten 11 Aminosäuren (1-11) in beiden Chimären der mART2.2-Sequenz, die letzten 32 Aminosäuren (227-258 bzw. 224-255) der rART2.2. Grün unterlegt sind Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der rART2.2-Bereiche der Chimären im Vergleich mit der mART2.2-Sequenz. Zwischen mART2.2 und r-mART2.2 liegen 27 solcher Substitutionen vor, zwischen mART2.2 und m-rART2.2 gibt ebenfalls 27 Unterschiede und zusätzlich eine Deletion von 3 Aminosäuren. Blaue Abschnitte (Bestandteile des Expressionsvektors pME18Sneo) am N-Terminus: CD8-Signalpeptid und FLAG-Markierung, am C-Terminus: GPI-Anker-Signal. In rot angegeben: katalytische Aminosäuren. Angaben zur Sekundärstruktur: H: α -helikale Abschnitte, E: β -Strang. [Alignment nach ClustalW-Algorithmus].

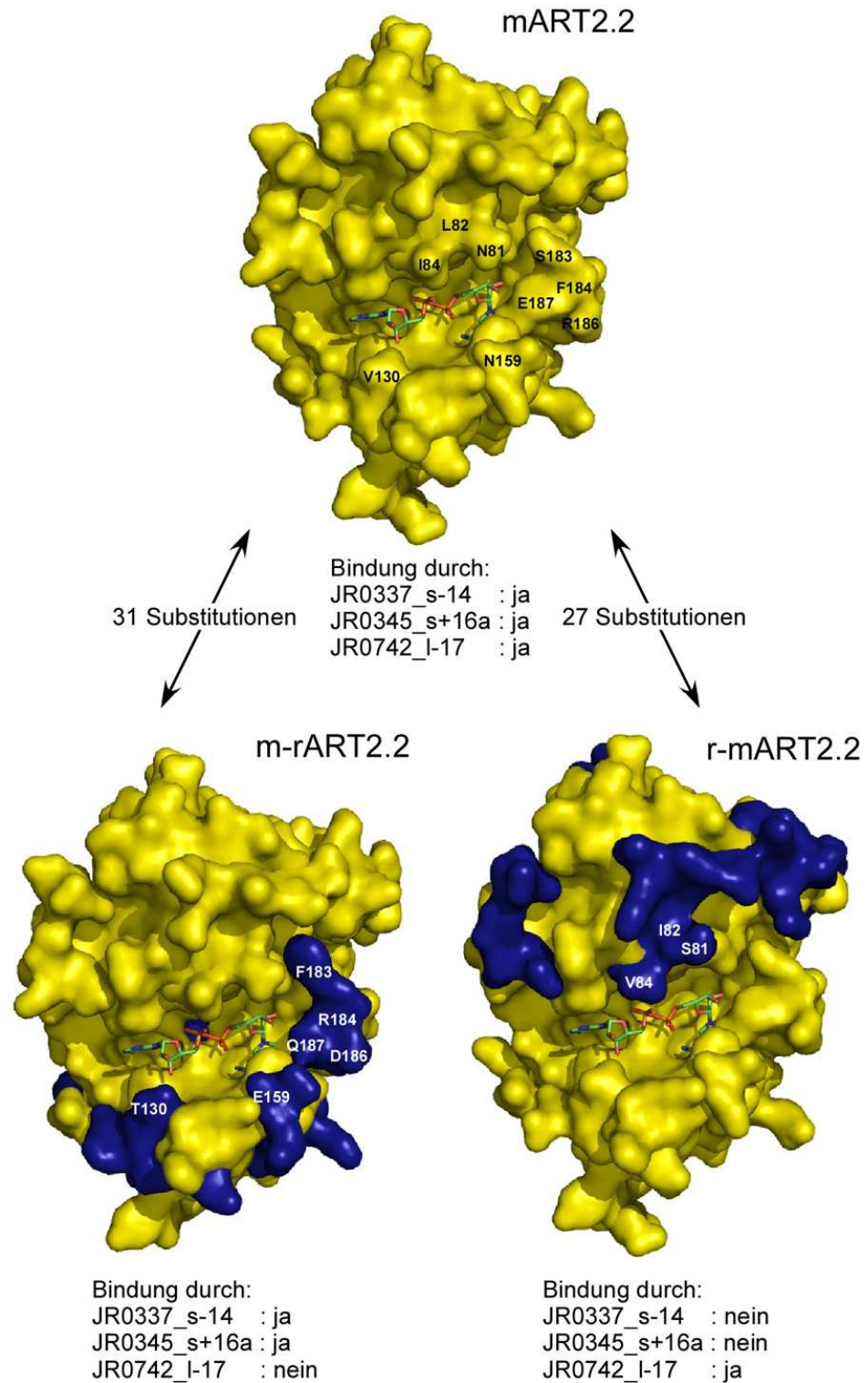


Abb. 6.2: Modell der mART2.2 im Vergleich mit den Chimären m-rART2.2 und r-mART2.2. Die in gelb dargestellten Bereiche in den 3D-Modellen repräsentiert Abschnitte mit identischer Aminosäuresequenz. Zwischen mART2.2 und den Chimären divergierende Aminosäuren sind in den Chimären blau hervorgehoben. Solche Aminosäuren, die in unmittelbarer Nähe des Aktiven Zentrums lokalisiert sind wurden zusätzlich mit Namen und Position gekennzeichnet. Im aktiven Zentrum ist ein NAD⁺-Molekül dargestellt.

Die mART2.2-Struktur wurde *in silico* mit Hilfe von SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) modelliert und basiert auf Vergleich mit der bekannten Struktur der rART2.2. pdb-code: 1OG3, nach MÜLLER-DIECKMANN *et al.*, 2002.

6.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit stützt die Hypothese, dass Einzelketten-Antikörper als Werkzeug zur spezifischen Blockade von Lymphozyten-Ekto-Enzymen *in vivo* dienen können. Das vorliegende Beispiel stellt den Beweis („proof of principle“) für das Funktionieren dieses Mechanismus' dar.

Die hier vorgestellten mART2.2-inhibierenden Einzelketten-Antikörper sind die Prototypen einer neuartigen Klasse von immunmodulierenden Agentien, die spezifisch immunregulatorische Ekto-Enzyme angreifen (GODING & HOWARD, 1998; SALMI & JALKANEN, 2005). Ein medizinischer Nutzen von VHHs bei der Bekämpfung, z. B. von Trypanosomiasis oder Autoimmunerkrankungen, zeichnet sich bereits heute in Mausmodellsystemen ab (BARAL *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2006).

Darüber hinaus ist festzuhalten, dass das hier vorgestellte experimentelle Vorgehen auch einen neuen Weg zur Gewinnung von Einzelketten-Antikörpern als Toxin Gegengift darstellt, da das erkannte Epitop, eine tiefe NAD⁺-bindende Tasche als aktives Zentrum, ein gemeinsames Merkmal sowohl der eukaryotischen mART2.2 als auch ihrer nahe verwandten bakteriellen Toxin ist (MUELLER-DIECKMANN *et al.*, 2002). Diese Toxine haben entscheidenden Einfluss auf die menschliche Gesundheit.

Eine starke Aussagekraft bezüglich des Mechanismus der Inhibition der mART2.2 durch eine VHH-Domäne wird die Aufklärung der Röntgenstruktur von Co-Kristallen aus Antigen und Einzeldomänen-Antikörper haben. Die Interpretation der aus solchen Untersuchungen gewonnenen Daten wird sehr genau und anschaulich die Interaktionen aufklären können, die letztendlich zu der Inhibition der mART2.2 führen. Diese Daten werden in absehbarer Zeit zur Verfügung stehen und wären z. B. für die Konstruktion von Minimalinhibitoren, sogenannten Peptibodies, von Bedeutung (MARQUARDT *et al.*, 2006).

7 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines Werkzeugs, das die enzymatische Aktivität der ADP-Ribosyltransferase 2.2 der Maus (mART2.2) *in vitro* und *in vivo* inhibiert. Die mART2.2 ist ein in der Membran von T-Lymphozyten verankertes Toxin-verwandtes Ekto-Enzym, das die Übertragung des ADP-Riboseanteils von NAD⁺ auf Zelloberflächenproteine katalysiert. mART2.2 induziert die Apoptose von T-Zellen durch Aktivierung des zytolytischen P2X₇-Purinorezeptors durch ADP-Ribosylierung.

Die variable Domäne (*variable domain of the heavy-chains of heavy-chain-only antibodies*, VHH) von kameliden-typischen Schwere-Ketten-Antikörpern stellt die kleinste bekannte physiologische Antigen-bindende Einheit dar, die im Zuge einer adaptiven Immunantwort generiert wird. Die oft sehr lange CDR3 versetzt VHHs in die Lage in Spalten und Vertiefungen des Antigens einzudringen. So werden insbesondere die aktiven Zentren von Enzymen blockiert.

Zur Generierung von mART2.2-inhibierenden Schwere-Ketten-Antikörpern wurde ein Lama genetisch und mit mART2.2-Protein immunisiert. Daraufhin wurden Phagen-Display-Bibliotheken generiert, die das VHH-Repertoire der B-Zellen aus einer Blutprobe des Lamas repräsentieren. Aus diesen wurden vier mART2.2-spezifische VHHs selektiert. Enzym-Tests zeigten, dass drei der vier VHHs die Aktivität der mART2.2 *in vitro* effizient und spezifisch inhibieren. Die Paraloge ART2.1 und mART1 bleiben unbeeinflusst. Nach intravenöser Injektion einer der mART2.2-spezifischen VHHs wurde eine Inhibition der enzymatischen und zytotoxischen mART2.2-Aktivität in lymphatischen Organen erzielt. Diese Inhibition ist schnell und reversibel. Die Blockade der mART2.2 trat bereits 15 Minuten nach Injektion ein und war nach 24 Stunden wieder weitgehend abgeklungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, Ekto-Enzyme auf Leukozyten per intravenöser Injektion von VHHs *in vivo* zu blockieren und stellen zugleich die Basis für die Entwicklung neuartiger Gegengifte gegen ADP-ribosylierende Toxine dar.

Nach einer Auffrischungsimmunisierung des Lamas mit mART2.2-Protein wurde eine weitere Phagen-Bibliothek kloniert. Dabei wurde festgestellt, dass, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, bereits in der primären Bibliothek ein beachtlicher Anteil (> 20%) mART2.2-spezifische Klone vorhanden ist. Diese Einzeldomänen-Antikörper weisen Sequenzähnlichkeiten mit den vier zuvor entdeckten mART2.2-spezifischen VHHs auf, unterscheiden sich jedoch von diesen durch Punktmutationen. Diese Beobachtungen lassen den Ablauf einer sekundären Immunreaktion vermuten, in deren Verlauf es zur klonalen Expansion von B-Lymphozyten und Affinitätsreifung von Antikörpern gekommen ist. In drei Fällen kann ein Subklassenwechsel (*sub-class switch*) vom Schwere-Ketten-IgG3- zum Schwere-Ketten-IgG2-Isotyp festgestellt werden.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wird die rekombinante Großproduktion und Aufreinigung von Einzeldomänen-Antikörpern und der mART2.2 beschrieben, mit dem Ziel einen Komplex aus VHH-Domäne und ART2.2 zu kristallisieren. In zwei von 864 getesteten Nano-Kristallansätzen konnte die Entstehung von Kristallen durch Fotos dokumentiert werden. Die Grundlage für die Röntgenstrukturanalyse wurde damit bereitet.

7.1 Abstract

The purpose of this study was to develop a tool for blocking the enzymatic and cytotoxic activities of mouse ADP-ribosyltransferase 2.2 (mART2.2) *in vitro* and *in vivo*. mART2.2 is a toxin-related leukocyte ecto-enzyme that transfers the ADP-ribose moiety from NAD⁺ onto other cell surface proteins. ART2.2 induces T cell death by activating the cytolytic P2X₇ purinoceptor via ADP-ribosylation.

The variable domain of heavy-chain antibodies (variable domain of the heavy-chains of heavy-chain-only antibodies, VHH) represents the smallest known antigen-binding unit generated by adaptive immune responses. Their long CDR3 endows VHH domains with the extraordinary capacity to extend into and block molecular clefts such as the active sites of enzymes.

To generate ART2.2-blocking single domain antibodies, a llama (*Lama glama*) was immunized by gene-gun immunization and with mART2.2 protein. After amplifying the VHH repertoire of B cells from a peripheral blood sample by polymerase chain reaction, VHH-phage display libraries were generated. From these libraries four mART2.2-specific VHHs were selected. The results of three different ADP-ribosylation show that three of these VHHs inhibit the enzymatic activity of mART2.2 *in vitro*. This inhibition was highly specific for mART2.2, as it did not affect the closely related enzyme paralogs ART1 or ART2.1. Following intravenous injection, ART2.2-specific VHH domains shut off the enzymatic and cytotoxic activities of ART2.2 in lymphatic organs. This blockade was essentially complete within 15 minutes after injection and subsided 24 hours after injection.

These findings constitute a proof of principle that opens up a new avenue for targeting leukocyte ecto-enzymes *in vivo* by intravenous injection and that can serve as a model also for developing new antidotes against ADP-ribosylating toxins.

A new phage display library was cloned from the same llama, following a mART2.2-protein boost immunization two years after the previous one. In contrast to the libraries obtained from the previous boost, the new primary library already contained a substantial fraction (>20%) of mART2.2-specific VHHs. These and additional single domain antibodies obtained by panning, showed sequence similarities to the four known mART2.2-specific VHHs, but featured a number of point mutations. This observation is in accord with the notion of a classical secondary immune response with clonal expansion of mART2.2-specific B cells and somatic hyper mutations of the heavy-chain antibody genes. Moreover, in several cases a class switch was noticed from heavy-chain IgG3 to heavy-chain IgG2 isotype.

The last part of this thesis describes the large scale production and purification of single domain antibodies and mART2.2-protein with the aim of generating crystals of a complex of VHH and ART2.2. A nano-scale screen of 864 crystallization buffers yielded two conditions showing growth of orthorhombic crystals. These results are documented by photos and that provide a basis for future X-ray structure analyses.

8 Literatur

- ADEREM, A. & UNDERHILL, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623.
- ADRIOUCH, S., BANNAS, P., SCHWARZ, N., FLIEGERT, R., GUSE, A. H., SEMAN, M., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2007). ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *Faseb J.*
- AKTORIES, K. (1992). *ADP-ribosylating toxins*. Springer-Verlag, Berlin ; New York.
- ALEXANDER-MILLER, M. A. (2005). High-avidity CD8+ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol Res* **31**, 13-24.
- ANDERSON, M. E. & SIAHAAN, T. J. (2003). Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* **24**, 487-501.
- ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J. & SCHWEDE, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195-201.
- BANASIK, M., KOMURA, H., SHIMOYAMA, M. & UEDA, K. (1992). Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* **267**, 1569-1575.
- BANNAS, P., ADRIOUCH, S., KAHL, S., BRAASCH, F., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2005). Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood* **105**, 3663-3670.
- BARAL, T. N., MAGEZ, S., STIJLEMANS, B., CONRATH, K., VANHOLLEBEKE, B., PAYS, E., MUYLDERMANS, S. & DE BAETSELIER, P. (2006). Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med* **12**, 580-584.
- BARICORDI, O. R., FERRARI, D., MELCHIORRI, L., CHIOZZI, P., HANAU, S., CHIARI, E., RUBINI, M. & DI VIRGILIO, F. (1996). An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* **87**, 682-690.
- BELL, C. E. & EISENBERG, D. (1996). Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* **35**, 1137-1149.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. & STRYER, L. (2002). *Biochemistry*. W.H. Freeman, New York.
- BUTCHER, J. N. (1979). *New developments in the use of the MMPI*. Univ. of Minnesota Press, Minneapolis.

- CAI, X. & GAREN, A. (1995). Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6537-6541.
- CHEN, J., CHEN, Y. G., REIFSNYDER, P. C., SCHOTT, W. H., LEE, C. H., OSBORNE, M., SCHEUPLEIN, F., HAAG, F., KOCH-NOLTE, F., SERREZE, D. V. & LEITER, E. H. (2006). Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-ribosyltransferase 2-dependent fashion. *J Immunol* **176**, 4590-4599.
- CHOE, S., BENNETT, M. J., FUJII, G., CURMI, P. M., KANTARDJEFF, K. A., COLLIER, R. J. & EISENBERG, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **357**, 216-222.
- CLACKSON, T., HOOGENBOOM, H. R., GRIFFITHS, A. D. & WINTER, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-628.
- CONRATH, K. E., LAUWEREYS, M., GALLEN, M., MATAGNE, A., FRERE, J. M., KINNE, J., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. (2001). Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2807-2812.
- CORTEZ-RETAMOZO, V., BACKMANN, N., SENTER, P. D., WERNERY, U., DE BAETSELIER, P., MUYLDERMANS, S. & REVETS, H. (2004). Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* **64**, 2853-2857.
- DE GENST, E., SILENCE, K., DECANNIERE, K., CONRATH, K., LORIS, R., KINNE, J., MUYLDERMANS, S. & WYNS, L. (2006). Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4586-4591.
- DELVES, P. J. & ROITT, I. M. (2000a). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49.
- DELVES, P. J. & ROITT, I. M. (2000b). The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-117.
- DESMYTER, A., TRANSUE, T. R., GHAHROUDI, M. A., THI, M. H., POORTMANS, F., HAMERS, R., MUYLDERMANS, S. & WYNS, L. (1996). Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* **3**, 803-811.
- DI VIRGILIO, F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 465-472.
- GARCIA, K. C., DEGAN, M., SPEIR, J. A. & WILSON, I. A. (1999). Emerging principles for T cell receptor recognition of antigen in cellular immunity. *Rev Immunogenet* **1**, 75-90.

- GHETIE, V., POPOV, S., BORVAK, J., RADU, C., MATESOI, D., MEDESAN, C., OBER, R. J. & WARD, E. S. (1997). Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol* **15**, 637-640.
- GLOWACKI, G., BRAREN, R., FIRNER, K., NISSEN, M., KUHL, M., RECHE, P., BAZAN, F., CETKOVIC-CVRLJE, M., LEITER, E., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2002). The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* **11**, 1657-1670.
- GODING, J. W. & HOWARD, M. C. (1998). Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol Rev* **161**, 5-10.
- GRAKOU, A., BROMLEY, S. K., SUMEN, C., DAVIS, M. M., SHAW, A. S., ALLEN, P. M. & DUSTIN, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227.
- GREENBERG, A. S., AVILA, D., HUGHES, M., HUGHES, A., MCKINNEY, E. C. & FLAJNIK, M. F. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* **374**, 168-173.
- GRIFFITHS, A. D., WILLIAMS, S. C., HARTLEY, O., TOMLINSON, I. M., WATERHOUSE, P., CROSBY, W. L., KONTERMANN, R. E., JONES, P. T., LOW, N. M., ALLISON, T. J. & ET AL. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J* **13**, 3245-3260.
- GUEx, N. & PEITSCH, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- HAAG, F., ANDRESEN, V., KARSTEN, S., KOCH-NOLTE, F. & THIELE, H. (1995). Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD. *Eur J Immunol* **25**, 2355-2361.
- HAAG, F., KOCH-NOLTE, F., GERBER, A., SCHRODER, J. & THIELE, H. G. (1997). Rat T cell differentiation alloantigens RT6.1 and RT6.2 are NAD(+)-metabolizing ecto-enzymes that differ in their enzymatic activities. *Transplant Proc* **29**, 1699-1700.
- HAAG, F., KOCH-NOLTE, F., KUHL, M., LORENZEN, S. & THIELE, H. G. (1994). Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J Mol Biol* **243**, 537-546.
- HAMERS-CASTERMAN, C., ATARHOUCHE, T., MUYLDERMANS, S., ROBINSON, G., HAMERS, C., SONGA, E. B., BENDAHMAN, N. & HAMERS, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448.
- HARLOW, E. & LANE, D. (1999). *Using antibodies : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- HARMSSEN, M. M., RUULS, R. C., NIJMAN, I. J., NIEWOLD, T. A., FRENKEN, L. G. & DE GEUS, B. (2000). Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol* **37**, 579-590.

- HARMSSEN, M. M., VAN SOLT, C. B., FIJTEN, H. P. & VAN SETTEN, M. C. (2005). Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* **23**, 4926-4934.
- HOLLIGER, P. & HUDSON, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1126-1136.
- HOLLING, T. M., SCHOOTEN, E. & VAN DEN ELSEN, P. J. (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol* **65**, 282-290.
- HOLLMANN, C., HAAG, F., SCHLOTT, M., DAMASKE, A., BERTULEIT, H., MATTHES, M., KUHLE, M., THIELE, H. G. & KOCH-NOLTE, F. (1996). Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products. *Mol Immunol* **33**, 807-817.
- HONG, S., BRASS, A., SEMAN, M., HAAG, F., KOCH-NOLTE, F. & DUBYAK, G. R. (2007). Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages. *J Immunol* **179**, 6215-6227.
- HONJO, T., NISHIZUKA, Y. & HAYAISHI, O. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem* **243**, 3553-3555.
- JACOBSON, M. K. & JACOBSON, E. L. (1989). *ADP-ribose transfer reactions : mechanisms and biological significance*. Springer-Verlag, New York.
- JANEWAY, C. (2005). *Immunobiology : the immune system in health and disease*. Garland Science, New York.
- JANSSENS, R., DEKKER, S., HENDRIKS, R. W., PANAYOTOU, G., VAN REMOORTERE, A., SAN, J. K., GROSVELD, F. & DRABEK, D. (2006). Generation of heavy-chain-only antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15130-15135.
- JOBLING, S. A., JARMAN, C., TEH, M. M., HOLMBERG, N., BLAKE, C. & VERHOEYEN, M. E. (2003). Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol* **21**, 77-80.
- KABAT, E. A., WU, T. T., PERRY, H. M., GOTTESMAN, K. S. & FOELLER, C. (1991). *Sequences of proteins of immunological interest*. U.S. Public Health Service, NIH Bethesda, MD.
- KAHL, S., NISSEN, M., GIRISCH, R., DUFFY, T., LEITER, E. H., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2000). Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* **165**, 4463-4469.
- KOCH-NOLTE, F., DUFFY, T., NISSEN, M., KAHL, S., KILLEEN, N., ABLAMUNITS, V., HAAG, F. & LEITER, E. H. (1999). A new monoclonal antibody detects a developmentally

- regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol* **163**, 6014-6022.
- KOCH-NOLTE, F., GLOWACKI, G., BANNAS, P., BRAASCH, F., DUBBERKE, G., ORTOLAN, E., FUNARO, A., MALAVASI, F. & HAAG, F. (2005). Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation. *Cell Immunol* **236**, 66-71.
- KOCH-NOLTE, F. & HAAG, F. (1997). Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families. *Adv Exp Med Biol* **419**, 1-13.
- KOCH-NOLTE, F., HAAG, F., KUHL, M., VAN HEYNINGEN, V., HOOVERS, J., GRZESCHIK, K. H., SINGH, S. & THIELE, H. G. (1993). Assignment of the human RT6 gene to 11q13 by PCR screening of somatic cell hybrids and in situ hybridization. *Genomics* **18**, 404-406.
- KOCH-NOLTE, F., PETERSEN, D., BALASUBRAMANIAN, S., HAAG, F., KAHLKE, D., WILLER, T., KASTELEIN, R., BAZAN, F. & THIELE, H. G. (1996). Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J Biol Chem* **271**, 7686-7693.
- KOCH-NOLTE, F., REYELT, J., SCHOSSOW, B., SCHWARZ, N., SCHEUPLEIN, F., ROTHENBURG, S., HAAG, F., ALZOGARAY, V., CAUERHFF, A. & GOLDBAUM, F. A. (2007). Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *Faseb J* **21**, 3490-3498.
- KREBS, C., ADRIOUCH, S., BRAASCH, F., KOESTNER, W., LEITER, E. H., SEMAN, M., LUND, F. E., OPPENHEIMER, N., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2005). CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins. *J Immunol* **174**, 3298-3305.
- KREBS, C., KOESTNER, W., NISSEN, M., WELGE, V., PARUSEL, I., MALAVASI, F., LEITER, E. H., SANTELLA, R. M., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2003). Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal Biochem* **314**, 108-115.
- LAUWEREYS, M., ARBABI GHARROUDI, M., DESMYTER, A., KINNE, J., HOLZER, W., DE GENST, E., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. (1998). Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *Embo J* **17**, 3512-3520.
- LUDDEN, P. W. (1994). Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol Cell Biochem* **138**, 123-129.
- MARKS, J. D., HOOGENBOOM, H. R., BONNERT, T. P., MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A. D. & WINTER, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222**, 581-597.
- MARQUARDT, A., MUYLDERMANS, S. & PRZYBYLSKI, M. (2006). A synthetic camel anti-lysozyme peptide antibody (peptibody) with flexible loop structure identified by high-resolution affinity mass spectrometry. *Chemistry* **12**, 1915-1923.

- MOSS, J., ZOLKIEWSKA, A. & OKAZAKI, I. (1997). ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles. *Adv Exp Med Biol* **419**, 25-33.
- MUELLER-DIECKMANN, C., RITTER, H., HAAG, F., KOCH-NOLTE, F. & SCHULZ, G. E. (2002). Structure of the ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat. *J Mol Biol* **322**, 687-696.
- MUYLDERMANS, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* **74**, 277-302.
- MUYLDERMANS, S., ATARHOUCHE, T., SALDANHA, J., BARBOSA, J. A. & HAMERS, R. (1994). Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* **7**, 1129-1135.
- NEMOTO, E., YU, Y. & DENNERT, G. (1996). Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J Immunol* **157**, 3341-3349.
- NGUYEN, V. K., HAMERS, R., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. (1999). 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. *Mol Immunol* **36**, 515-524.
- NGUYEN, V. K., HAMERS, R., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. (2000). Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *Embo J* **19**, 921-930.
- NGUYEN, V. K., MUYLDERMANS, S. & HAMERS, R. (1998). The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J Mol Biol* **275**, 413-418.
- OKAMOTO, S., AZHIPA, O., YU, Y., RUSSO, E. & DENNERT, G. (1998). Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J Immunol* **160**, 4190-4198.
- PELEGRIN, P. & SURPRENANT, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* **25**, 5071-5082.
- QUAN, S., IMAI, T., MIKAMI, Y., YAZAWA, K., DABBS, E. R., MORISAKI, N., IWASAKI, S., HASHIMOTO, Y. & FURIHATA, K. (1999). ADP-ribosylation as an intermediate step in inactivation of rifampin by a mycobacterial gene. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 181-184.
- RAST, J. P., AMEMIYA, C. T., LITMAN, R. T., STRONG, S. J. & LITMAN, G. W. (1998). Distinct patterns of IgH structure and organization in a divergent lineage of chondrichthyan fishes. *Immunogenetics* **47**, 234-245.
- RITTER, H., KOCH-NOLTE, F., MARQUEZ, V. E. & SCHULZ, G. E. (2003). Substrate binding and catalysis of ecto-ADP-ribosyltransferase 2.2 from rat. *Biochemistry* **42**, 10155-10162.

- ROOVERS, R. C., LAEREMANS, T., HUANG, L., DE TAEYE, S., VERKLEIJ, A. J., REVETS, H., DE HAARD, H. J. & VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M. (2007). Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 303-317.
- RUF, A., ROLLI, V., DE MURCIA, G. & SCHULZ, G. E. (1998). The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J Mol Biol* **278**, 57-65.
- SALMI, M. & JALKANEN, S. (2005). Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* **5**, 760-771.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- SCHWEDE, T., KOPP, J., GUEX, N. & PEITSCH, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**, 3381-3385.
- SELIGMANN, M., MIHAESCO, E., PREUD'HOMME, J. L., DANON, F. & BROUET, J. C. (1979). Heavy chain diseases: current findings and concepts. *Immunol Rev* **48**, 145-167.
- SEMAN, M., ADRIOUCH, S., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2004). Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem* **11**, 857-872.
- SEMAN, M., ADRIOUCH, S., SCHEUPLEIN, F., KREBS, C., FREESE, D., GLOWACKI, G., DETERRE, P., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* **19**, 571-582.
- SHIROISHI, M., YOKOTA, A., TSUMOTO, K., KONDO, H., NISHIMIYA, Y., HORII, K., MATSUSHIMA, M., OGASAHARA, K., YUTANI, K. & KUMAGAI, I. (2001). Structural evidence for entropic contribution of salt bridge formation to a protein antigen-antibody interaction: the case of hen lysozyme-HyHEL-10 Fv complex. *J Biol Chem* **276**, 23042-23050.
- SIXMA, T. K., KALK, K. H., VAN ZANTEN, B. A., DAUTER, Z., KINGMA, J., WITHOLT, B. & HOL, W. G. (1993). Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* **230**, 890-918.
- SMITH, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.
- SMITH, J., KONTERMANN, R. E., EMBLETON, J. & KUMAR, S. (2005). Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *Faseb J* **19**, 331-341.
- STEIN, P. E., BOODHOO, A., ARMSTRONG, G. D., COCKLE, S. A., KLEIN, M. H. & READ, R. J. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**, 45-57.

- STIJLEMANS, B., CONRATH, K., CORTEZ-RETAMOZO, V., VAN XONG, H., WYNS, L., SENTER, P., REVETS, H., DE BAETSELIER, P., MUYLDERMANS, S. & MAGEZ, S. (2004). Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* **279**, 1256-1261.
- STRELTSOV, V. A., VARGHESE, J. N., CARMICHAEL, J. A., IRVING, R. A., HUDSON, P. J. & NUTTALL, S. D. (2004). Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12444-12449.
- TAKAMURA-ENYA, T., WATANABE, M., TOTSUKA, Y., KANAZAWA, T., MATSUSHIMA-HIBIYA, Y., KOYAMA, K., SUGIMURA, T. & WAKABAYASHI, K. (2001). Mono(ADP-ribosylation) of 2'-deoxyguanosine residue in DNA by an apoptosis-inducing protein, pierisin-1, from cabbage butterfly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12414-12419.
- TAKEBE, Y., SEIKI, M., FUJISAWA, J., HOY, P., YOKOTA, K., ARAI, K., YOSHIDA, M. & ARAI, N. (1988). SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* **8**, 466-472.
- THIELE, H. G., HAAG, F., NOLTE, F., LISCHKE, C. & BAUSCHUS, S. (1997). Expression profiles of RT6 and other T lymphocyte surface markers in the black rat (*Rattus rattus*). *Transplant Proc* **29**, 1697-1698.
- TOTSUKA, Y., KAWANISHI, M., NISHIGAKI, R., MATSUKAWA, K., YAGI, T., TAKAMURA-ENYA, T., WATANABE, M., SUGIMURA, T. & WAKABAYASHI, K. (2003). Analysis of HPRT and supF mutations caused by pierisin-1, a guanine specific ADP-ribosylating toxin derived from the cabbage butterfly. *Chem Res Toxicol* **16**, 945-952.
- TRANSUE, T. R., DE GENST, E., GHAHROUDI, M. A., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. (1998). Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins* **32**, 515-522.
- VAN DER LINDEN, R., DE GEUS, B., STOK, W., BOS, W., VAN WASSENAAR, D., VERRIPS, T. & FRENKEN, L. (2000). Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods* **240**, 185-195.
- VITI, F., GIOVANNONI, L. & NERI, D. (2002). Recombinant antibodies for the selective targeting of tumor neovasculature. *Curr Opin Drug Discov Devel* **5**, 204-213.
- VOLLMAYER, P., CLAIR, T., GODING, J. W., SANO, K., SERVOS, J. & ZIMMERMANN, H. (2003). Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem* **270**, 2971-2978.

- VU, K. B., GHAHROUDI, M. A., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. (1997). Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* **34**, 1121-1131.
- WALDMANN, T. A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* **9**, 269-277.
- WANG, J., NEMOTO, E. & DENNERT, G. (1997). Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored ecto-ADP-ribosyltransferase. *Adv Exp Med Biol* **419**, 191-201.
- WINTER, G., GRIFFITHS, A. D., HAWKINS, R. E. & HOOGENBOOM, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* **12**, 433-455.
- WOOLVEN, B. P., FRENKEN, L. G., VAN DER LOGT, P. & NICHOLLS, P. J. (1999). The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics* **50**, 98-101.
- WU, T. T., JOHNSON, G. & KABAT, E. A. (1993). Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* **16**, 1-7.
- YOUNG, T. L. & SANTELLA, R. M. (1988). Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine. *Carcinogenesis* **9**, 589-592.
- ZATMAN, L. J., KAPLAN, N. O. & COLOWICK, S. P. (1953). Inhibition of spleen diphosphopyridine nucleotidase by nicotinamide, an exchange reaction. *J Biol Chem* **200**, 197-212.
- ZOLKIEWSKA, A. & MOSS, J. (1997). The alpha 7 integrin as a target protein for cell surface mono-ADP-ribosylation in muscle cells. *Adv Exp Med Biol* **419**, 297-303.
- ZOLKIEWSKA, A., NIGHTINGALE, M. S. & MOSS, J. (1992). Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11352-11356.

9 Anhang

9.1 Taxonomie der Artiodactyla (Paarhufer)

Stellung der Kameliden innerhalb der Klasse der Säugetiere (Mammalia)

Mammalia = Säugetiere (Klasse);

Theria (Subklasse);

Eutheria = Höhere Säuger (Infraklasse) (94% der rezenten Arten);

Laurasiatheria (Überordnung);

Cetartiodactyla (Überordnung);

- Cetacea (Ordnung) (Wale, Delphine)
- Artiodactyla = Paarhufer (Ordnung)
 - Ruminantia (Unterordnung)
 - Antilocapridae (Familie) (Gabelböcke)
 - Bovidae (Familie)
 - Alcelaphinae (Subfamilie) (Hartebeests, Wildebeests)
 - Hippotraginae (Subfamilie) (Oryxantilope, u.a.)
 - Caprinae (Subfamilie) (Schaf, Ziege, Moschusochse)
 - Cephalophinae (Subfamilie) (Duikers)
 - Reduncinae (Subfamilie) (Wasserbock, u.a.)
 - Antilopae (Subfamilie) (Gazelle, u.a.)
 - Cervidae (Familie) (Hirsche, Elche, Karibus)
 - Giraffidae (Familie) (Giraffen und Okapis)
 - Moschidae (Familie) (Moschustier)
 - Tragulidae (Familie) (Chevrotains und Mouse deer)
 - Tylopoda = Schwielensohler (Unterordnung)
 - Camelidae (Familie)
 - Camelus (Genus)
 - Camelus bactrianus (Spezies)
 - Camelus dromedarius (Spezies)
 - Lama (Genus)
 - Lama glama (Spezies)
 - Lama guanicoe (Spezies)
 - Lama pacos (Spezies)
 - Vicuna (Genus)
 - Vicugna vicugna (Spezies)
 - Suiformes (Unterordnung)
 - Hippopotamidae (Familie) (hippopotamuses)
 - Suidae (Familie) (Wildschweine und Schweine)
 - Tayassuidae (Familie) (Peccaries)

Alle Säugetiere verfügen über konventionelle Antikörper (s. Abschnitt 2.1.3), so auch die Paarhufer. Unter diesen verfügen lediglich die Tylopoda (Schwielensohler; markiert mit rotem Balken) darüber hinaus auch über Schwere-Ketten-Antikörper (s. Abschnitt 2.1.4). Diese Antikörperart ist vermutlich eine relativ neue evolutive Erfindung. (Systematik nach „Tree of life“, <http://www.tolweb.org/tree/>).

9.2 3D-Modellierung der mART2.2-Struktur

Die dreidimensionale Struktur der mART2.2 wurde mit Hilfe der Internet-Datenbank SWISS-MODEL des SIB-Biozentrum Basel vorhergesagt (GUEX & PEITSCH, 1997; SCHWEDE *et al.*, 2003; ARNOLD *et al.*, 2006). Als Vorlage diente die bekannte Kristallstruktur der rART2.2 (MUELLER-DIECKMANN *et al.*, 2002), die in der PDB-Datenbank unter dem Code 1OG3 hinterlegt ist.

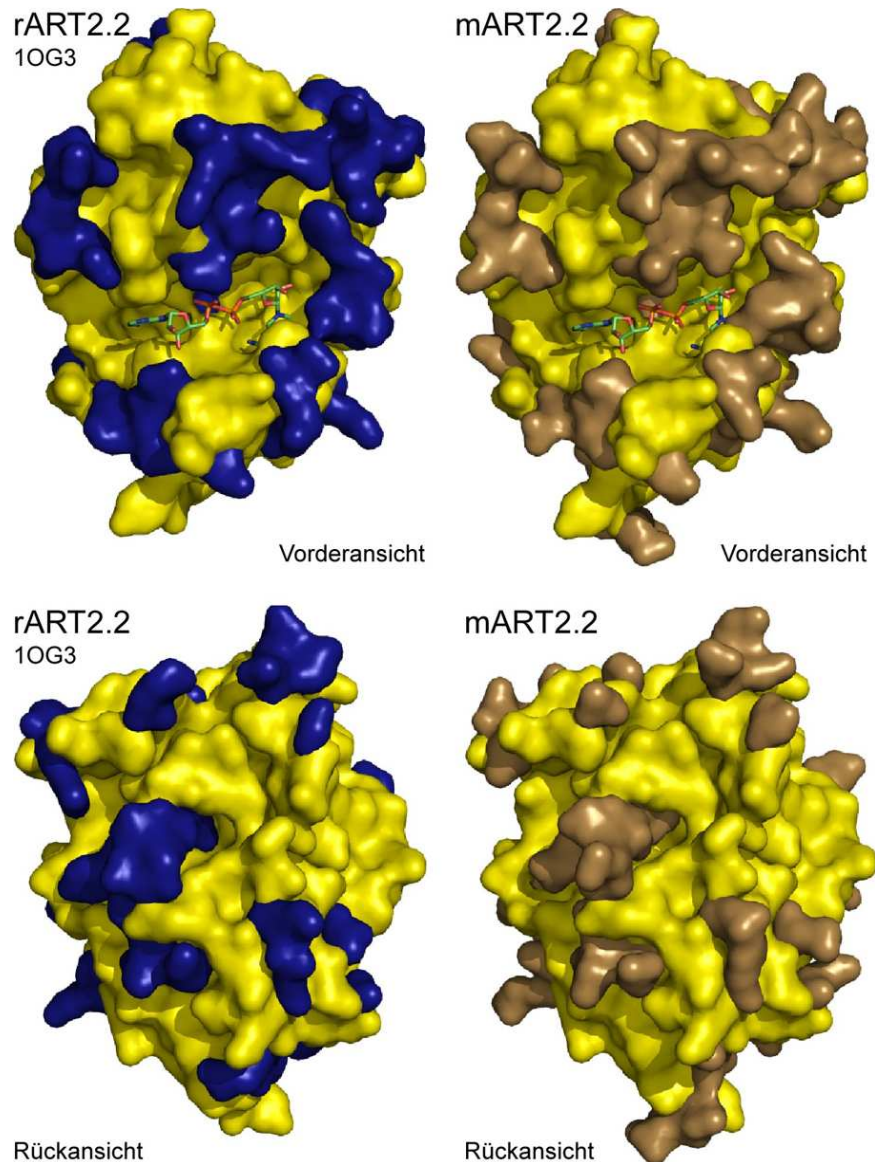


Abb. 9.1: Struktur der rART2.2 und Modell der mART2.2. Die gelben Kernbereiche in den Molekülen repräsentiert Abschnitte, die in beiden Enzymen identische Aminosäuresequenzen aufweisen. Unterschiede in den Sequenzen sind in der rART2.2 in blau, in der mART2.2 in braun hervorgehoben. Die räumliche Lage und Ausrichtung der Aminosäurereste in der mART2.2 wurden durch das Internet-Programm „SWISS-MODEL Workspace“ an Hand der bekannten Aminosäurekonformationen in der rART2.2 (pdb-code: 1OG3) vorhergesagt.

Modelling log

3.70 (SP3)

Loading Template: 1og3A.pdb

Loading Raw Sequence

Renumber target sequence starting from (4)

Aligning Raw Sequence

Refining Raw Sequence Alignment

ProModII: doing simple assignment of backbone

ProModII: adding blocking groups

Adding Missing Sidechains

AddPolar H

BuildDeletedLoopsModel

Building CSP loop with anchor residues ASN 205 and TYR 209

Building CSP loop with anchor residues GLN 204 and TYR 209

Number of Ligations found: 354

ACCEPTING loop 228: clash= 0 FF= -540.6 PP= -2.00

Optimizing Sidechains

Adding Hydrogens

Optimizing loops and OXT (nb = 6)

Final Total Energy: -12131.043 KJ/mol

Dumping Sequence Alignment

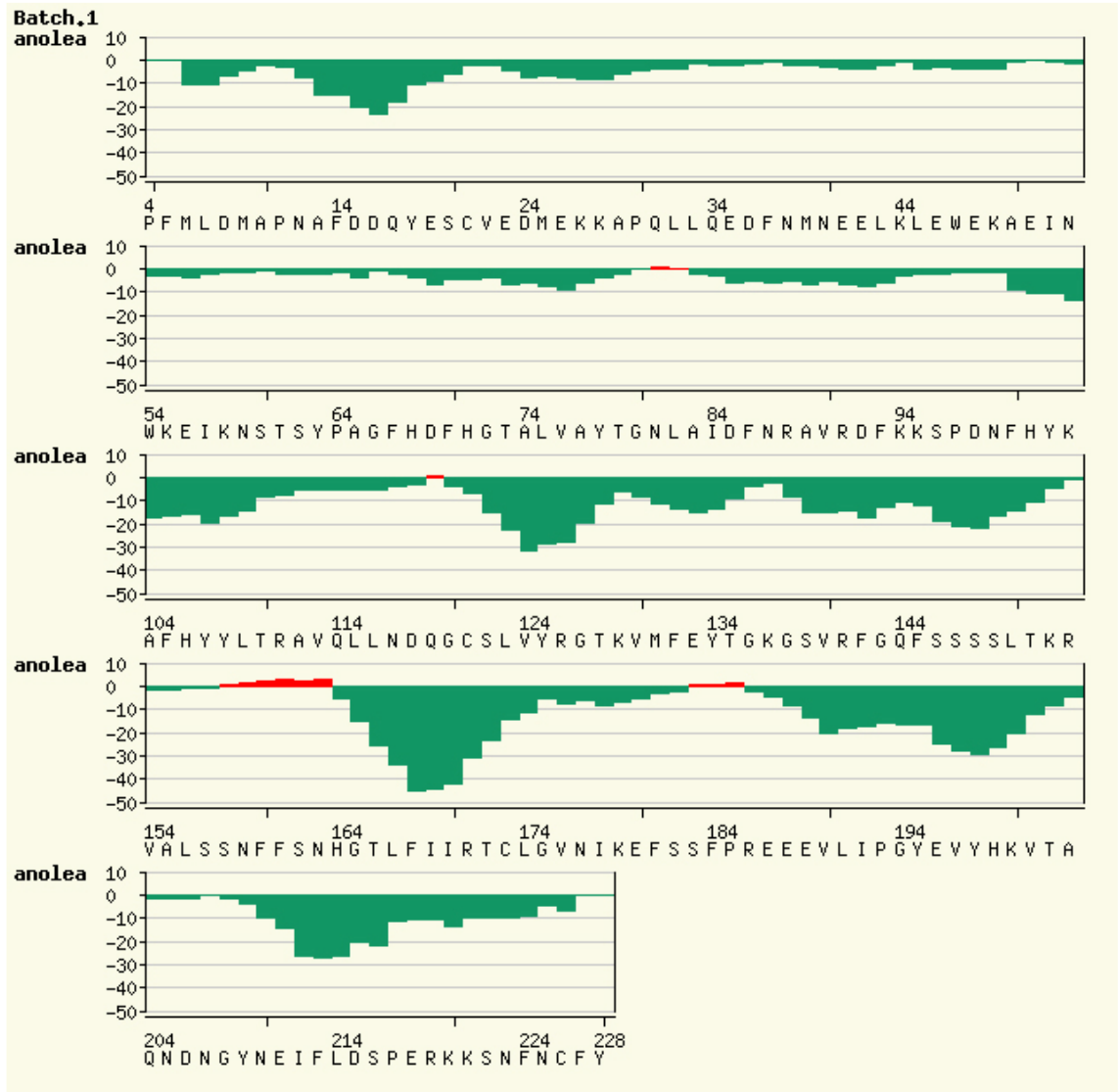
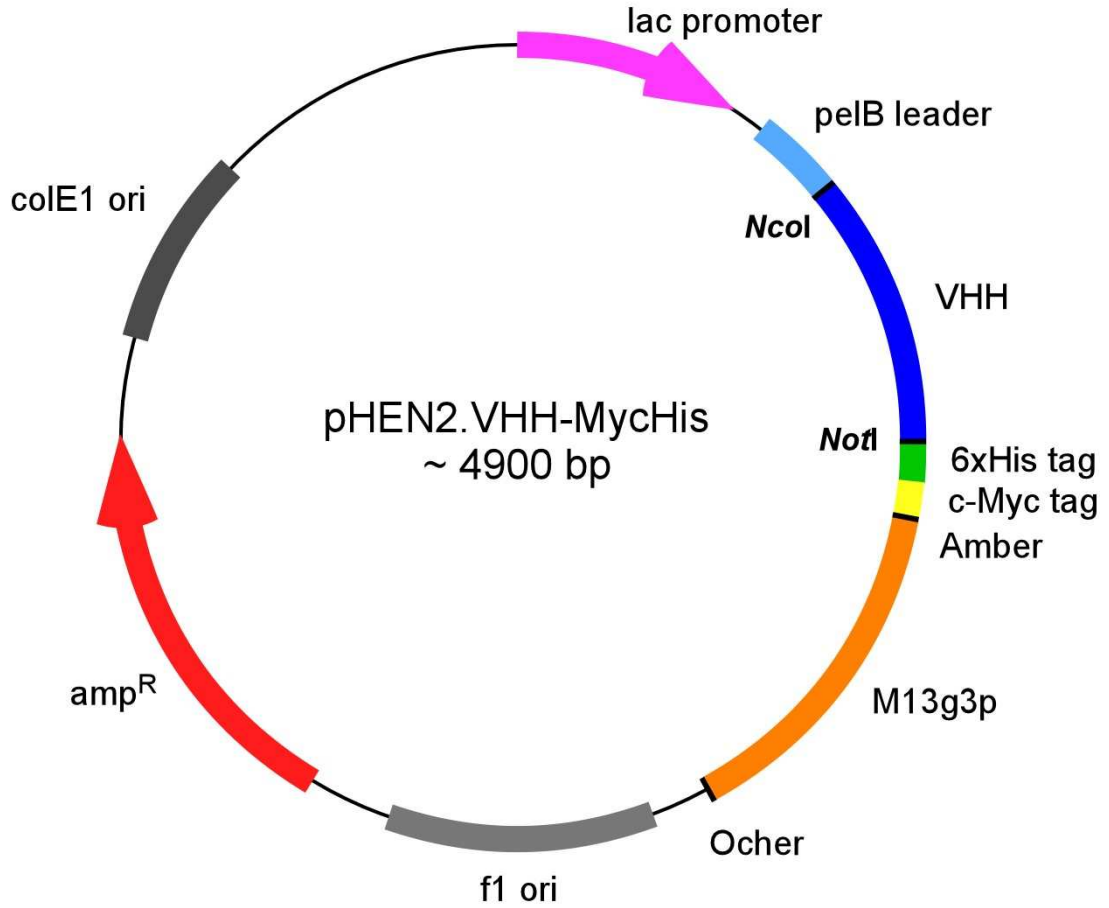


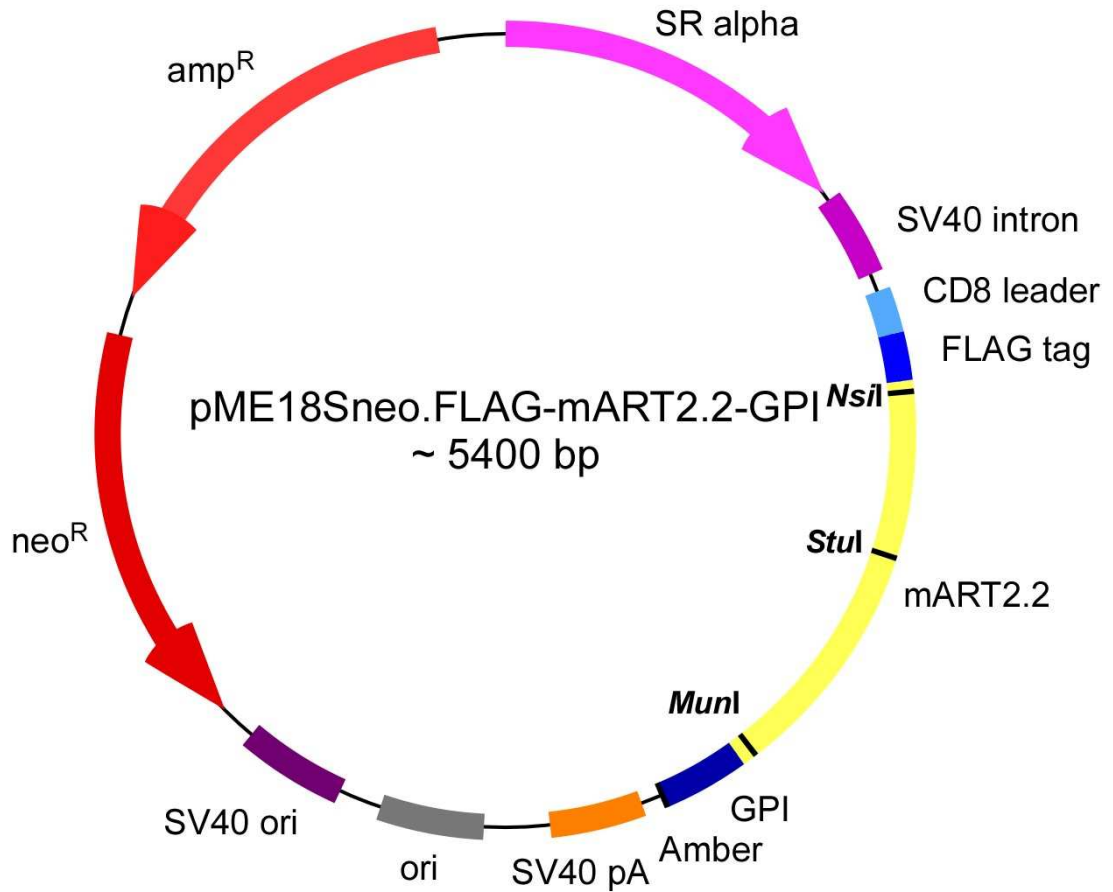
Abb. 9.2: ANOLEA-Protokoll der mART2.2-Modellierung. ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment, <http://swissmodel.expasy.org/anolea/>) ist ein Server des SWISS-MODEL-Netzwerkes, der die Energien in eine Proteinkette berechnet und das nicht-lokale Umfeld („Non-Local Environment“, NLE) jedes schweren Atoms im Molekül auswertet. Die Energie jeder paarweisen Interaktion in diesem nicht-lokalen Umfeld wird distanzabhängigen und auf Vergleichsanalysen gestützt als mittleres Kraftpotential berechnet. Diese Kalkulationen werden auf Basis einer Datenbank mit 147 nicht-redundanten Proteinen durchgeführt, die untereinander eine Sequenzidentität von 25% nicht überschreiten und deren Struktur röntgenkristallographisch mit einer Auflösung von unter 3 Å gelöst wurde. Je negativer das berechnete Potential der Interaktionen ausfällt, desto sicherer ist die modellierte Struktur. Das hier dargestellte Protokoll für die ANOLEA-Modellierung der mART2.2-Proteinsequenz auf Basis der rART2.2-Struktur (pdb-code: 1OG3) weist weite Bereiche der Sequenz als sicher vorhergesagt aus.

9.3 Plasmidkarten



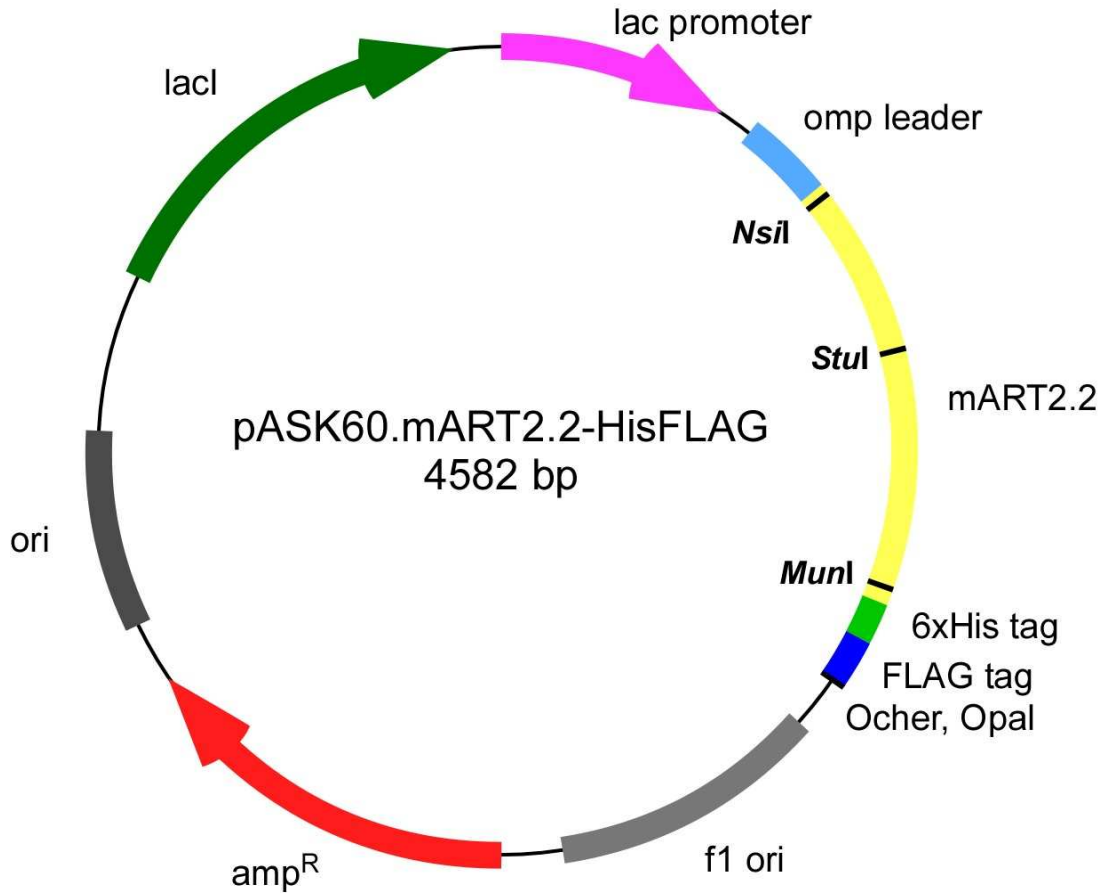
pHEN2.VHH-MycHis

- lac-Promotor
- pelB-Signalpeptid
- VHH (cDNA-Insertion)
- 6xHis-Markierung
- c-Myc-Markierung
- Amber Stop-Kodon (TAG)
- Bakteriophage M13 Hüllprotein III-Gen (M13g3p)
- Ocher Stop-Kodon (TAA)
- f1-Replikationsursprung (f1 ori)
- Ampicillinresistenz-Gen (amp^R)
- E. coli*-Replikationsursprung (ori)



pME18Sneo.FLAG-mART2.2-GPI

SR alpha-Promotor (TAKEBE *et al.*, 1988)
SV40-Intron
CD8-Signalpeptid
FLAG-Markierung
mART2.2 (cDNA)
GPI-Anker
SV40-poly-Adenylierungsstelle (SV40 pA)
E. coli-Replikationsursprung (ori)
SV40-Replikationsursprung (SV40 ori)
Neomycinresistenz-Gen (neo^R)
Ampicillinresistenz-Gen (amp^R)



pASK60.mART2.2-HisFLAG

lac-Promotor
omp-Signalpeptid
mART2.2 (cDNA)
6xHis-Markierung
FLAG-Markierung
Ocher und Opal Stop-Kodon
f1-Replikationsursprung (f1 ori)
Ampicillinresistenz-Gen (amp^R)
E. coli-Replikationsursprung (ori)
lacI-Gen

9.4 Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-Präsentierende Zellen
ARH	ADP-Ribosyl-X Hydrolase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Mischung gleicher Stoffmengen der vier Desoxy-nukleosid-Triphosphaten für die PCR
DRAG	Dinitrogenase Reduktase-aktivierende Glykohydrolase
DRAT	Dinitrogenase Reduktase ADP-Ribosyltransferase
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F _{ab}	antigenbindendes Antikörperfragment
F _c	(kristallisierbares) Rumpffragment eines Antikörpers
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
HBS	HEPES-gepufferte Saline
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LDS	Lithiumdodecylsulfat
mART	Mono-ADP-Ribosyltransferasen
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TS-Lysepuffer	Tris-Succhrose-Lysepuffer
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
U	Unit
V _H	variable Domäne der schweren Kette konventioneller Antikörper
V _L	variable Domäne der leichten Kette konventioneller Antikörper
VHH	variable Domäne der schweren Ketten von kameliden Schwere-Ketten-Antikörpern

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für die Überlassung eines interessanten und zukunftsweisenden Themas, die exzellente Anleitung und Unterstützung in allen Phasen der Arbeit. Ich danke ihm auch für die Möglichkeit, im Rahmen meiner Doktorarbeit internationale Kongresse und unser Partnerlabor in Buenos Aires besuchen zu können.

Herrn Prof. Dr. Fernando Goldbaum danke ich für die freundliche Aufnahme und den angenehmen Aufenthalt in seiner Arbeitsgruppe am Instituto Leloir, Buenos Aires. Ana Cauerhff danke ich für die Durchführung der Affinitätsmessungen und Vanina Alzogaray für die nette Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Udo Wienand danke ich sehr für die Bereitschaft als mein Betreuer seitens der Naturwissenschaftlichen Fakultät und als Zweitgutachter meiner Doktorarbeit zu fungieren.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag, Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker, Herrn Dr. Stefan Rothenburg, Herrn Dr. Sahil Adriouch und Herrn Dr. Felix Scheuplein danke ich für ihre freundliche Unterstützung und Ratschläge, sowie für den kritischen und fruchtbaren Gedankenaustausch.

Für eine sehr gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor danke ich besonders Stefan Kernstock, Nikolaus Deigendesch, Nicole Schwarz, Fabienne Seyfried, Gudrun Dubberke und Marion Nissen sowie allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors und des Diagnostiklabors des Institutes für Immunologie.

Ich danke meinen Eltern, Jürgen und Gerda Reyelt, dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mir auch während der Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Meinem Bruder Karsten und meiner Schwägerin Birgit bin ich für ihre Unterstützung dankbar.

Lebenslauf

Jan Reyelt

- 29.08.1976 Geburt in Hamburg-Harburg
- 1996 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am
Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg
- 1996-1997 Wehrdienst, 6. Sanitätsregiment, Breitenburg
- 1997-2002 Studium der Biologie an der Universität Hamburg
- 2002 Hauptprüfung mit folgenden Schwerpunkten:
Hauptfach: Molekularbiologie/Genetik
Nebenfach: Zoologie
Nebenfach: Mikrobiologie
Zusatzfach: Biochemie
- Abschluss: Diplom
 Gesamtnote: sehr gut
- 2002 Diplomarbeit am Institut für allgemeine Botanik in der Abteilung
 „Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen I“
 unter der Leitung von
 Prof. Dr. Udo Wienand (Universität Hamburg).
 Thema: „Untersuchungen zur stabilen und transienten
 Expression des Gens *ZmKCSI* aus Mais (*Zea mays* L.) in Mais
 und Mohrenhirse (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)“
- 2004-2008 Promotion am Institut für Immunologie,
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von
 Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte.