
KLONIERUNG UND MOLEKULARE
CHARAKTERISIERUNG VON EINZELDOMÄNEN-
ANTIKÖRPERN GEGEN DAS MEMBRANSTÄNDIGE
EKTO-ENZYM CD38 AUS *HOMO SAPIENS* UND GEGEN
TOXINE AUS *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Dissertation zur Erlangung der Würde des Doktors der
Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, der Universität
Hamburg

vorgelegt von
Mandy Unger
aus Kiel

Hamburg 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. F. KOCH-NOLTE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. H. LÜTHEN
Tag der Disputation: 13. April 2012

Hamburg, den 29. März 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Erstgutachter:

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Institut für Immunologie

Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Zweitgutachter:

PD Dr. Hartwig Lüthen

Biozentrum Grindel

Universität Hamburg

Tag der Disputation: 13.04.2012

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Nolte für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation, für die Überlassung dieses interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und die lehrreiche Zeit. Herrn PD. Dr. Hartwig Lüthen danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag, Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker und Frau Dr. Eva Tolosa danke ich für ihre freundliche Unterstützung und Ratschläge.

Für die nette Laboratmosphäre, interessante Gespräche und viele Hinweise bedanke ich mich besonders...

bei Welbeck Danquah und Karla Oyuky Juarez für zahlreiche Tipps und viel Spaß, bei Björn Rissiek für gute Ratschläge beim FACS, Marion Nissen für stets erfolgreiche Experimente, bei Gudrun Dubberke für die Zellkulturexpertise, bei Joanna Schmidt für die Proteinexpressionen und bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie.

und...

bei Prof. Dr. Fernando Goldbaum für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Institut Leloir, Buenos Aires. Vanina Alzogaray und Sebastian Klinke danke ich für die Einführung in die Kristallisation und die tolle Betreuung.

bei der Studienstiftung des deutschen Volkes und dem BMBF bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieses Forschungsprojektes ermöglichten.

bei meiner Mutter, Lukas und Nina möchte ich für die Unterstützung in allen Lebenslagen, das Vertrauen und stets gute Laune bedanken.

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE BESONDEREN EIGENSCHAFTEN VON KAMELIDEN-ANTIKÖRPERN	1
1.1.1	DIE FAMILIE DER KAMELIDEN	1
1.1.2	SCHWEREKETTEN-ANTIKÖRPER DER KAMELIDEN	2
1.2	HUMANES CD38: EIN NAD-METABOLISIERENDES EKTO-ENZYM	7
1.3	DIE PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> : DREI ENZYMTOXINE	11
1.3.1	CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFESTIONEN	12
1.3.2	TOXIN A UND TOXIN B: DURCH AUTOKATALYTISCHE SPALTUNG REGULIERTE GLUCOSYLTRANSFERASEN	13
1.3.3	DAS CDT TOXIN: EINE AKTIN-ADP-RIBOSYLTRANSFERASE	14
1.4	ZIELSETZUNG	16
2	<u>MATERIAL</u>	18
2.1	ENZYME	18
2.2	AFFINITÄTSMATRICES	18
2.3	CHEMIKALIEN UND BIOREAGENZIEN	18
2.4	GRÖßENSTANDARDS FÜR PROTEINE UND DOPPELSTRÄNGIGE DNA	19
2.5	OLIGONUKLEOTIDE	19
2.6	PHAGE DISPLAY HELFERPHAGEN	19
2.7	ANTIKÖRPER	19
2.8	PLASMIDE	20
2.9	VERWENDETE KITS (KOMMERZIELL ERHÄLTICH)	20
2.10	PUFFER UND LÖSUNGEN	20
2.10.1	LÖSUNGEN FÜR DIE DNA-GELELEKTROPHORESE	21
2.10.2	LÖSUNGEN FÜR DIE PROTEINBIOCHEMIE	21
2.10.3	LÖSUNGEN FÜR DIE AUFREINIGUNG REKOMBINANTER PROTEINE	22
2.10.4	LÖSUNGEN FÜR ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN	23
2.10.5	LÖSUNGEN FÜR IMMUNFLUORESCENZANFÄRBUNGEN	23
2.11	ANTIBIOTIKA	23
2.12	MEDIEN	23
2.12.1	KULTURMEDIE FÜR BAKTERIEN	23
2.12.2	MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR EUKARYOTISCHE ZELLKULTUR	24
2.13	E. COLI STÄMME UND DEREN GENOTYP	25
2.14	ZELLINIEN UND ZELLKULTUR	26
2.15	VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
2.16	APPARATIVE AUSRÜSTUNG	26
3	<u>METHODEN</u>	30
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	30
3.1.1	AUFREINIGUNG DER IMMUNGLOBULIN-SUBKLASSEN AUS SERUMPROBEN	30
3.1.2	RNA-ISOLIERUNG AUS LYMPHOZYTEN	30
3.1.3	QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	31
3.1.4	CDNA-SYNTHESE	31
3.1.5	POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	32
3.1.6	DNA-SEQUENZIERUNG	33
3.1.7	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	33
3.1.8	EXTRAKTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN	34
3.1.9	DNA-SPALTUNG MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	34
3.1.10	DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	34
3.1.11	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	35
3.1.12	TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> ZELLEN	35
3.1.13	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA MIT KOMMERZIELL ERHÄLTICHEN KITS	36

3.1.14	WACHSTUM UND LAGERUNG VON BAKTERIEN-KOLONIEN	36
3.1.15	PHOA-FUSIONSPROTEINE	36
3.2	PHAGEN-DISPLAY-TECHNOLOGIE	37
3.2.1	KONSTRUKTION DER PHAGEN DISPLAY BIBLIOTHEKEN	38
3.2.2	DARSTELLUNG REKOMBINANTER PHAGEN	39
3.2.3	SELEKTION	40
3.2.4	REINFEKTION	41
3.2.5	AMPLIFIKATION SELEKTIERTER PHAGEN	42
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	42
3.3.1	PERIPLASMATISCHE EXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	42
3.3.2	IMMOBILISIERTE METALL-IONEN AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (IMAC)	43
3.3.3	M2-AGAROSE AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	43
3.3.4	DIALYSE MITTELS SLIDE-A-LYZER•-DIALYSE-KASSETTEN	44
3.3.5	QUANTIFIZIERUNG VON PROTEIN	44
3.3.6	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	44
3.3.7	COOMASSIE BRILLIANT BLAU-FÄRBUNG VON SDS-PAGE-GELEN	44
3.3.8	FLUOROCHROMKONJUGATION AN ANTIKÖRPER	45
3.3.9	MICROSCALE-THERMOPHORESE	45
3.3.10	UNTERSUCHUNG ZUR HEMMUNG DER AUTOKATALYTISCHEN PROTEOLYSE VON TOXIN A DURCH VHHS	45
3.3.11	UNTERSUCHUNG ZUR VHH VERMITTELTEN HEMMUNG DER RAC1-GLUKOSYLIERUNG DURCH TOXIN B	46
3.3.12	ELEKTROPHORETISCHER PROTEINTRANSFER (<i>WESTERN BLOT</i>)	46
3.3.13	DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE	46
3.3.14	³² P-ADP-RIBOSYLIERUNGSASSAY	47
3.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	47
3.4.1	KULTIVIEREN UND PASSAGIEREN VON ZELLEN	47
3.4.2	ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT DER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	48
3.4.3	TRANSFEKTION UND TRANSIENTE EXPRESSION IN HEK-T ZELLEN	48
3.4.4	KRYOKONSERVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN	48
3.4.5	HERSTELLUNG VON ZELLLYSATEN	48
3.4.6	ZYTOTOXIZITÄTSEXPERIMENTE	48
3.4.7	FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG VON ZELLEN	49
3.5	FLUORESCENZMIKROSKOPIE	49
3.6	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	49
3.6.1	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	49
3.6.2	ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY (ELISA)	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	SELEKTION UND CHARAKTERISIERUNG CD38-SPEZIFISCHER VHHS AUS PHAGEN-DISPLAY-BIBLIOTHEKEN IMMUNISierter LAMAS	51
4.1.1	ZWEI MIT REKOMBINANTEM CD38 IMMUNISIERTE LAMAS ZEIGEN SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER-TITER	51
4.1.2	DNA-SEQUENZIERUNGEN BESTÄTIGEN EIN BREITES VHH-REPertoire IN DEN KLONierten PHAGEN-DISPLAY-BIBLIOTHEKEN	54
4.1.3	DNA-SEQUENZIERUNGEN ZEIGEN DIE ANREICHERUNG VON 15 VHH-FAMILIEN DURCH PANNING AN CD38-TRANSFIZIERTEN ZELLEN UND REKOMBINANTEM CD38	56
4.1.4	FACS UND MST ANALYSEN ZEIGEN, DASS 12 VHH FAMILIEN CD38 SPEZIFISCH BINDEN, DAVON FÜNF MIT HOHER AFFINITÄT	59
4.1.5	KEINE DER VHH FAMILIEN HEMMT DIE GLYKOHYDROLASE-AKTIVITÄT VON CD38	65
4.1.6	KREUZBLOCKADE ANALYSEN ZEIGEN, DASS DIE FÜNF HOCHAFFINEN VHH-FAMILIEN ZWEI VERSCHIEDENE EPITOPE ERKENNEN	67

4.2	SELEKTION TOXIN A UND TOXIN B-SPEZIFISCHER VHHs AUS PHAGEN-DISPLAY-BIBLIOTHEKEN IMMUNISIERTER LAMAS	69
4.2.1	DIE MIT CLOSTRIDIEN-TOXINEN IMMUNISIERTEN LAMAS ZEIGEN SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER-TITER	69
4.2.2	DNA-SEQUENZIERUNGEN BESTÄTIGEN EIN BREITES VHH-REPERTOIRE IN DEN KLONierten PHAGEN-DISPLAY-BIBLIOTHEKEN	71
4.2.3	ELISA-ANALYSEN ZEIGEN DIE SPEZIFISCHE BINDUNG VON DREI TOXIN A UND VIER TOXIN B SPEZIFISCHEN VHH-FAMILIEN	75
4.2.4	INHIBITION DER CYSTEINPROTEASE-AKTIVITÄT DURCH TOXA-CPD SPEZIFISCHE VHHs	79
4.2.5	SELEKTIONIERTER VHHs BLOCKIEREN SPEZIFISCH DIE GLUCOSYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT VON TOXIN B	81
4.3	SELEKTION UND CHARAKTERISIERUNG CDTA-SPEZIFISCHER VHHs AUS PHAGEN-DISPLAY-BIBLIOTHEKEN IMMUNISIERTER LAMAS	82
4.3.1	DIE MIT CDTA IMMUNISIERTEN LAMAS ZEIGEN SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER-TITER	82
4.3.2	DNA-SEQUENZIERUNGEN BESTÄTIGEN EIN BREITES VHH-REPERTOIRE IN DEN KLONierten PHAGEN-DISPLAY-BIBLIOTHEKEN	84
4.3.3	ELISA-ANALYSEN ZEIGEN DIE SPEZIFISCHE BINDUNG VON FÜNF CDTA VHH-FAMILIEN	85
4.3.4	FÜNF VHH-FAMILIEN BLOCKIEREN DIE ENZYMATISCHE ADP-RIBOSYLIERUNG VON AKTIN DURCH CDTA	90
4.3.5	DIE VHH L+8 INHIBIERT DIE CDTA VERMITTELTE ZYTOTOXIZITÄT	92
4.4	REFORMATIERUNG DER VHHs IN BI- UND TETRAVALENTE FORMATE	95
5	DISKUSSION	101
5.1	DIE SELEKTIONIERTEN VHH-FAMILIEN GEGEN DIE VIER ENZYM-ANTIGENE ZEIGEN EINIGE STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE AUFFÄLLIGKEITEN	101
5.2	EIN HOHER ANTEIL DER TOXIN-SPEZIFISCHEN VHHs INHIBIERT DIE ENZYMAKTIVITÄT GEGEN DIE ZUR IMMUNISIERUNG VERWENDETE TOXINDOMÄNE.	103
5.3	CD38-SPEZIFISCHE VHHs KÖNNTEN FÜR DAS <i>IN VIVO IMAGING</i> GEEIGNET SEIN	107
5.4	MÖGLICHE NUTZUNG DER TOXIN-SPEZIFISCHEN VHHs FÜR DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE ANWENDUNGEN	112
5.5	AUSBLICK	117
6	ZUSAMMENFASSUNG	119
7	ABSTRACT	120
8	ANHANG	121
8.1	PLASMIDKARTEN	121
8.1.1	PHAGEMID-VEKTOR PHEN2 UND PME VEKTOR.	121
8.1.2	PQUANTAGEN VEKTOR	121
8.2	LISTE DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE	122
8.2.1	OLIGONUKLEOTIDE ZUR ERSTELLUNG DER cDNA	122
8.2.2	UNIVERSELLE SEQUENZIER-OLIGONUKLEOTIDE	122
8.2.3	OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE KLONIERUNG DER LAMA-IMMUNBIBLIOTHEKEN AUS cDNA	122
8.2.4	OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE KLONIERUNG IN DEN VEKTOR PQUANTAGEN DES PHOA COLOR SYSTEMS	123
8.2.5	OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE KLONIERUNG VON VHH-DIMEREN	123
8.2.6	OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE KLONIERUNG IN DEN VEKTOR PME	123
8.3	SCHEMA DER IMMUNISIERUNG UND BLUTENTNAHMEN DER LAMAS 5, 5026 UND 5037	123
8.4	EIN- UND DREIBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN	125
8.5	PRIMÄRBIBLIOTHEKEN	125
8.6	ÜBERSICHT ÜBER DIE SELEKTIONIERTEN VHHs	128

<u>9</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>130</u>
<u>10</u>	<u>LITERATUR</u>	<u>133</u>

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Schwereketten-Antikörpern aus immunisierten Lamas (*Lama glama*) gegen humanes CD38 und die drei Pathogenitätsfaktoren (Toxin A, Toxin B und CDT) von *Clostridium difficile*. Im Rahmen der Einleitung werden die Besonderheiten der Kameliden und ihrer Schwereketten-Antikörper beschrieben. Es folgt eine Darstellung über Struktur und Wirkmechanismen der Zielantigene, gegen die Antikörperfragmente über die Phagen-Display-Technologie selektioniert werden sollten.

1.1 Die besonderen Eigenschaften von Kameliden-Antikörpern

1.1.1 Die Familie der Kameliden

Die Kameliden sind eine Säugetierfamilie aus der Ordnung der Artiodactyla (Paarhufer), innerhalb derer sie die einzige Familie mit der Unterordnung der Tylopoda (Schwielensohler) darstellen. Stammesgeschichtlich sind die Kameliden vor etwa 40 bis 50 Millionen Jahren in Nordamerika aufgetreten und waren zunächst auf diesen Kontinent beschränkt (Webb 1974). Über die zeitweise trockene Behringstraße beziehungsweise den Isthmus von Panama sind sie nach Asien bzw. Südamerika eingewandert (Abb. 1.1.1). Die Kamele der Neuen Welt (Lama, Alpaka, Guanako und Vikunja) sind heute vor allem in den Andenregionen Südamerikas verbreitet. Die Kamele der Alten Welt sind das Dromedar, welches in den Wüsten Arabiens, Indiens und Nordafrikas verbreitet ist, und das zweihöckrige Kamel, welches in Zentralasien und der Mongolei anzutreffen ist (Stanley, Kadwell et al. 1994).

Die Kameliden haben, konvergent mit den Haifischen, einzigartige Antikörper (Abb. 1.1.2), entwickelt: Schwereketten-Antikörper (Flajnik, Deschacht et al. 2011). Diese können im Lama bis zu 45% der im Blut zirkulierenden Immunglobuline ausmachen (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993; Nguyen, Su et al. 2002).

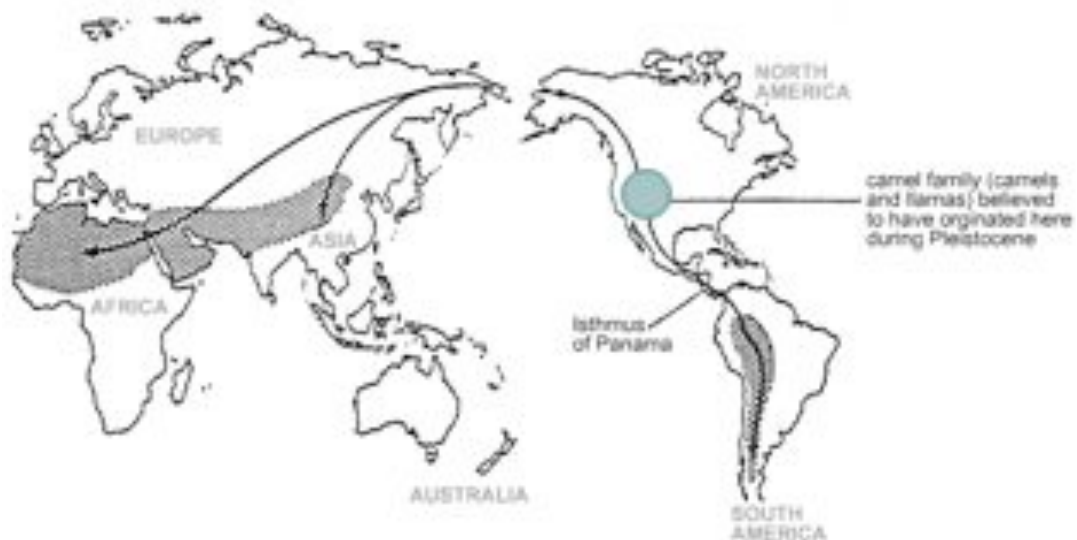


Abb. 1.1.1: Entstehungsort und heutige Verbreitungsgebiete der Tylopoda. Die Weltkarte zeigt den Entstehungsort der Tylopoda in Nordamerika und die Wanderungen in ihre heutigen Verbreitungsgebiete (Wikipedia.org). Die Altweltkameliden sind in weiten Teilen Afrikas und Asiens verbreitet. Die Neuweltkameliden kommen zumeist in den höher gelegenen Bergregionen Südamerikas vor.

1.1.2 Schwereketten-Antikörper der Kameliden

Antikörper (Immunglobuline) sind Glykoproteine, die als Reaktion des Immunsystems auf eingedrungene Fremdstoffe und Pathogene gebildet werden. Membranständig werden sie auf B-Lymphozyten als Teil des B-Zellrezeptors präsentiert; bei einer Quervernetzung durch das passende Antigen, können sie die B-Zelle aktivieren. Die sezernierten Antikörper werden von differenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, produziert. Als sezernierte Antikörper können sie Bakterien, Viren und Pilze durch ihre Bindung neutralisieren und durch Opsonierung, bei dem die Oberfläche von eingedrungenen Fremdzellen mit Immunglobulinen und Faktoren des Komplementsystems bedeckt wird, für Phagozyten markieren. Die Bindung des Fc-Teils von Antikörpern durch Rezeptoren der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) von mit Antikörpern bedeckten körpereigenen Zellen wird als ADCC *antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity* bezeichnet, hierbei kommt es zur Ausschüttung von Proteinen aus NK-Granula, die die Apoptose der Zielzelle induzieren. (Murphy, Travers et al. 2008).

Konventionelle Antikörper bestehen aus vier Polypeptidketten: zwei leichten Ketten mit einem Molekulargewicht von 25 kDa und zwei glykosylierten schweren Ketten mit einem Molekulargewicht zwischen 50-70 kDa (Abb. 1.1.2). Die leichte und die schwere Kette besitzen jeweils eine N-terminale variable und eine C-terminale konstante Region (Stryer 1995). Die Ig der Säugetiere werden nach ihrer schweren Kette in fünf Klassen eingeteilt: IgM, IgD, IgG, IgE, IgA. Aufgrund regionaler Genduplikationen besitzen einige Säugetiere mehrere Subklassen von IgG, IgE und IgA, bei einigen Spezies liegt das IgD Gen nur als nicht funktionstüchtiges Pseudogen vor. Die H-Ketten werden mit dem entsprechenden griechischen Buchstaben α , γ , μ , δ und ϵ bezeichnet. Die schweren Ketten haben jeweils eine variable und drei (IgG, IgA, IgD) bzw. vier (IgM, IgE) konstante Domänen. Diese werden als V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} (C_{H4}) bezeichnet. Die beiden leichten Ketten sind vom κ oder λ Typ (Hayashida, Miyata et al. 1984) und haben jeweils eine konstante und eine variable Domäne, analog als V_L und C_L bezeichnet. Die Interaktion mit dem Antigen findet über die V_L und V_H statt. Jede dieser Domänen besteht aus etwa 110 Aminosäuren. Die schweren Ketten sind untereinander und mit der leichten Kette über Disulfidbrücken verbunden. Innerhalb jeder Ig-Domäne ist eine konservierte (sogenannte kanonische) Disulfidbrücke zu finden, die die Tertiärstruktur stabilisiert.

Charakteristisch für Antikörper ist die Immunglobulinfaltung aus zwei antiparallelen β -Faltblattsträngen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Dieses bietet den Immunglobulinen ein flexibles Grundgerüst für die Erkennung von Antigenen. Die Antigenspezifität wird durch die hypervariablen CDRs (*complementarity determining region*) bestimmt, die sich als Schleifen zwischen den β -Faltblattsträngen an den nach aussen gerichteten Enden der variablen Domänen befinden. Jede Kette besitzt drei CDRs, wobei der CDR3 die größte Beteiligung an der Antigenerkennung zugesprochen wird (De Genst, Silence et al. 2006). Die für die CDR3 kodierende Region der schweren und der leichten Kette wird jeweils während der B-Zell Entwicklung durch DNA Rekombination und Einfügen von Nukleotiden neu kodiert. Zusätzlich zu den konventionellen Antikörpern besitzen die kameliden Schwereketten-Antikörper. Die Schwereketten-Antikörper der Lamas sind Homo-Dimere und bestehen aus der variablen Domäne, die als VHH (*variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies*) bezeichnet wird, gefolgt von einer *hinge*-Region, der C_{H2} und C_{H3} Domäne (Abb. 1.1.2). Die Schwereketten-Antikörper interagieren mit dem Antigen nur über die VHH. Aufgrund der Größe im nm Bereich (Durchmesser 2.5

nm, Höhe 4 nm) wird diese Domäne - rekombinant exprimiert- auch als *nanobody* oder Einzeldomänen-Antikörper bezeichnet.

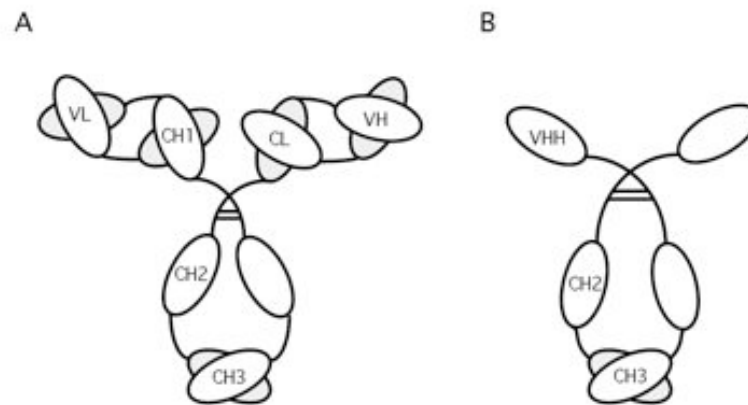


Abb. 1.1.2: Schematische Darstellung eines konventionellen Immunglobulins (IgG) (A) und eines kameliden Schwereketten-Antikörpers (B). Konventionelle Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren und leichten Ketten. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne. Die schweren Ketten haben eine variable (V_H) und drei (IgG) konstante Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Die V_L und die V_H bilden die Antigenbindungsstelle. Die Schwereketten-Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren Ketten mit einer variablen Domäne die als VHH bezeichnet wird und mit zwei konstanten Domänen (C_{H2} , C_{H3}). Die Interaktion mit dem Antigen erfolgt nur über diese eine variable Domäne.

Für die Expression eines löslichen Antikörpers mit einer V-Domäne im Einzeldomänenformat sind Veränderungen notwendig. Die Interaktion der schweren Kette mit der leichten Kette und dem *Binding Protein* (BiP) muss vermieden werden, um eine Retention und Degradation des Antikörpers im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu verhindern (Sitia, Neuberger et al. 1990). Das BiP und die leichte Kette binden nahezu an der gleichen Stelle der schweren Kette (Knarr, Gething et al. 1995). Durch die Deletion der C_{H1} , die durch eine Mutation des Spleiß-Signals am 3' Ende des C_{H1} -Exons bedingt wird (Nguyen, Hamers et al. 1999), wird die Sekretion der Schwereketten-Antikörper unabhängig von der Ab- bzw. Anwesenheit von BiP oder der leichten Kette ermöglicht (Hendershot, Bole et al. 1987; Hendershot 1990). Eine weitere Adaption betrifft die normalerweise hoch konservierte Framework Region 2

der variablen Domäne. In dieser Region sind bei konventionellen Antikörpern viele hydrophobe Aminosäuren zu finden, die in der V_H für die Interaktion mit der V_L elementar sind. Diese sind in der VHH durch hydrophile Aminosäuren substituiert. In der V_H sind dies Val37, Gly44, Leu45 und Trp47, in der VHH Phe/Tyr37, Glx44, Arg/Cys 45 und Leu/Gly47 (Kabat and Wu 1991). Diese hydrophilen Aminosäuren könnten die höhere Löslichkeit der VHHs bedingen (Wesolowski, Alzogaray et al. 2009).

Obwohl sie die kombinatorische Diversität der V_H - V_L Interaktion nicht besitzen, zeigen die VHHs ein hohes Antigenbindungsrepertoire. VHHs können außergewöhnlich lange CDR3 Regionen mit einer durchschnittlichen Länge von 16 Aminosäuren ausbilden (Wu, Johnson et al. 1993; Harmsen and De Haard 2007), die aus der Oberfläche herausragen und in das katalytische Zentrum von Enzymen eindringen können. Die CDR3 hat bei V_H Domänen der Maus eine durchschnittliche Länge von 12 Aminosäuren und bei V_H des Menschen eine Länge von 14 Aminosäuren (Wu, Johnson et al. 1993). Die Interaktion konventioneller Antikörper mit Antigenen ist eher planar, während die Schwereketten-Antikörper häufig durch die hervorragende CDR3 konvexe Paratope formen und z.B. in das aktive Zentrum eines Enzyms eindringen und die Funktion inhibieren können (Abb. 1.1.3).

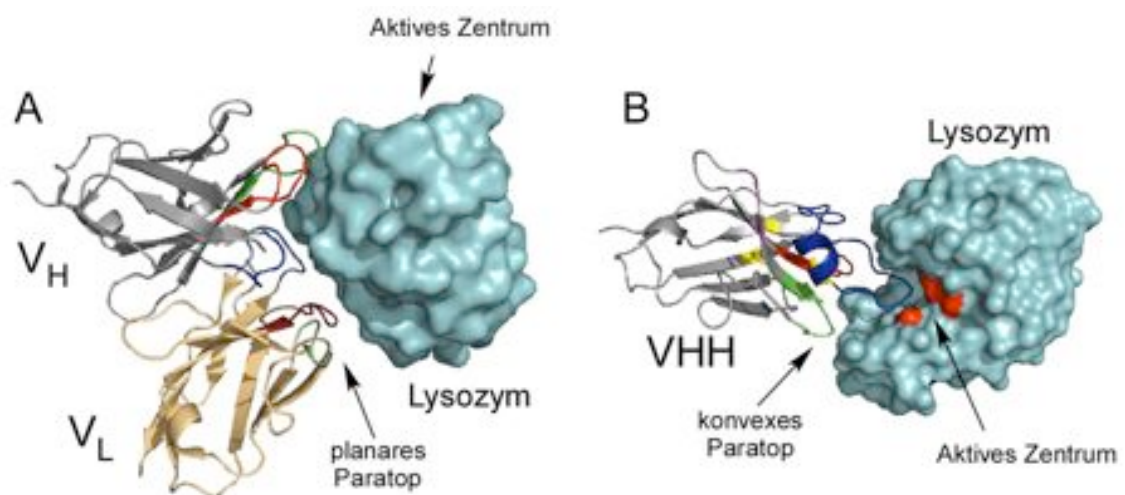


Abb. 1.1.3: 3D-Modell der antigenbindenden Domäne eines konventionellen- (A) und eines Schwereketten-Antikörpers (B). Konventionelle Antikörper zeigen eine planare Interaktion mit dem Antigen, während Schwereketten-Antikörper ein konvexes Paratop ausprägen und so das

aktive Zentrum eines Enzyms blockieren können. Das dargestellte Beispiel zeigt die 3D-Strukturen der antigenbindenden Domänen mit der CDR1 in rot, der CDR2 in grün und der CDR3 in blau und das von diesen gebundene bzw. blockierte Hühnereiweiß-Lysozym (HEL) mit den katalytischen Aminosäuren (rot). (A: pdb-Code: 1IC4, Mouse IgG1 Fab HYHEL-10 anti-HEL; B: pdb-Code: 1MEL, VHH cAbsLys3 anti-HEL). Abbildung erstellt mit PyMOL.

Die Organisation der variablen Domäne der schweren Ketten eines konventionellen Antikörpers und der eines Schwereketten-Antikörpers sind ähnlich. Ein Struktur-Vergleich von V_H und VHH (Abb. 1.1.4) zeigt, dass die CDR1 und die CDR3 in der VHH länger sind als in der V_H . CDR2 und CDR3 der VHH enthalten zusätzlich oft Cysteine, die eine Disulfidbrücke mit einem Cystein-Rest in der CDR3 ausbilden und somit die *loop*-Struktur der CDR3 stabilisieren können (Muyldermans, Baral et al. 2009).

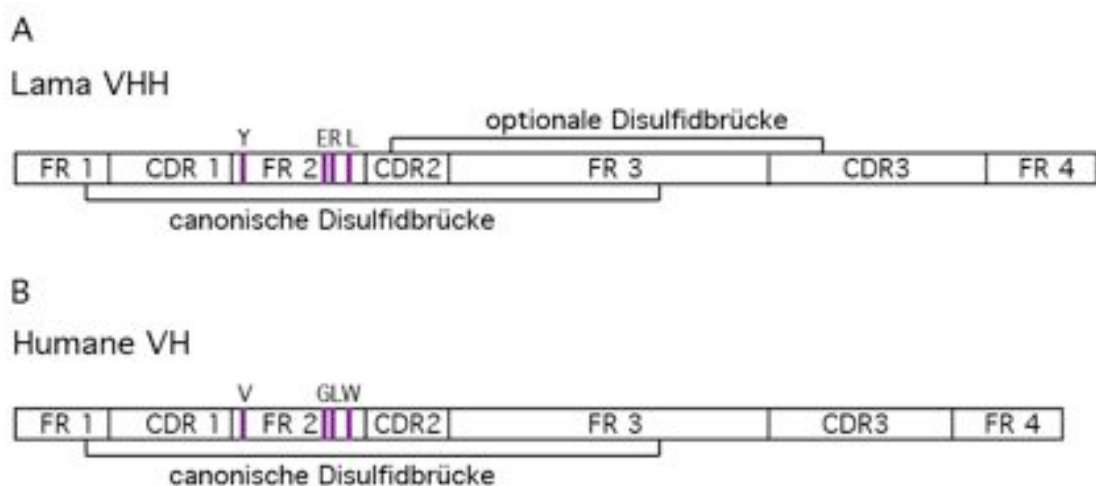


Abb. 1.1.4: Vergleich des Aufbaus von (A) VHH- und (B) VH-Segmenten. VHH und VH besitzen drei CDR-Regionen, die an der Antigenbindung beteiligt sind. Diese werden von *framework*-Regionen (FR1-FR4) umgeben. VHHs tragen häufig eine längere CDR3 als VHs. Diese CDR3 wird im Zuge der VDJ-Rekombination während der B-Zell Entwicklung neu kodiert und bildet den Kern der Antigenerkennungsstelle. Bei der VHH kann sich zwischen der CDR2 und der CDR3 eine optionale Disulfidbrücke ausbilden. Die hydrophilen Aminosäuresubstitutionen in der *framework 2* (FR) sind in violett dargestellt.

Schwereketten-Antikörper besitzen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften Vorteile gegenüber konventionellen Antikörpern. VHHs mit einem Molekulargewicht zwischen 14 und 18 kDa sind die kleinsten Antikörperfragmente, die von einem funktionellen Immunglobulin erhalten werden können (Wesolowski, Alzogaray et al. 2009). Durch ihre geringe Größe bedingt, zeigen sie eine gute Gewebegängigkeit und werden schnell über die Nieren ausgeschieden - dies sind entscheidende Vorteile für das *in vivo imaging* (Gainkam, Huang et al. 2008). Durch die ausgeprägten *loop*-Strukturen der CDR3 sind sie in der Lage auch kryptische Epitope zu erkennen und können so z.B. die Aktivität von Enzymen zu inhibieren (Koch-Nolte, Reyelt et al. 2007). Durch ihre relative Einfachheit können VHHs kostengünstig und in hoher Ausbeute rekombinant in *E. coli* produziert werden. Durch die hydrophoben Aminosäuresubstitutionen in der *framework-2* sind sie sehr gut löslich. Ein weiterer Vorteil der Monovalenz ist die einfache Klonierung in unterschiedliche multivalente Formate und die Darstellung als Fusionsproteine (Wesolowski, Alzogaray et al. 2009).

Rekombinante VHHs werden in der Regel aus den peripheren Blut B-Lymphozyten von immunisierten Lamas über die Phagen-Display-Technologie spezifisch angereichert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dieser Technik VHHs gegen das humane Leukozyten Ekto-Enzym CD38 und gegen die drei sekretierten Enzym-Toxine (ToxA, ToxB und CDT) von *Clostridium difficile* selektioniert.

1.2 **humanes CD38: ein NAD-metabolisierendes Ekto-Enzym**

CD38 (Abb. 1.2.1) ist ein 42 kDa großes Transmembranglykoprotein vom Typ-II, das auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems, aber auch anderen Zellen exprimiert wird (Partida-Sanchez, Cockayne et al. 2001; Liu, Kriksunov et al. 2006). Das Protein hat 300 Aminosäuren. Einer kurzen N-terminalen und intrazellulären Domäne folgt eine *singlepass*-Transmembranhelix sowie eine größere C-terminale extrazelluläre Domäne (Liu, Kriksunov et al. 2005).

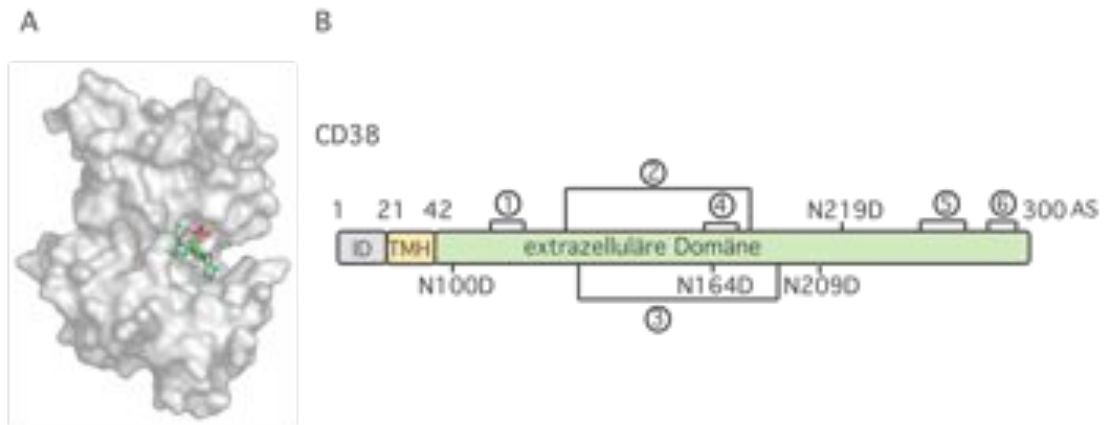


Abb. 1.2.1: (A) 3D-Modell des humanen CD38 mit dem im aktiven Zentrum gebundenen Substrat NAD. Abbildung erstellt mit PyMOL unter Verwendung des pdb-codes: 2i65 (B) Schematische Darstellung der Domänen von CD38. Mit eins bis sechs sind die Disulfidbrücken dargestellt. Die Disulfidbrücke 2 ist eine zusätzliche, die in anderen ADP-Ribosyl-Zyklasten nicht vorkommt. Für die Kristallisierung wurden die intrazelluläre Domäne (ID) und die Transmembranhelix (TMH) deletiert, sowie vier Glykosylierungsstellen durch Substitution von Asparagin (N) zu Aspartat (D) inaktiviert (Liu, Kriksunov et al. 2005; Liu, Kriksunov et al. 2006). Vor Beginn dieser Arbeit waren zwei Lamas (10, 25) mit dieser rekombinanten extrazellulären Domäne (42-300, grün) immunisiert worden.

CD38 ist ein multifunktionelles Protein (Liu, Kriksunov et al. 2006; Malavasi, Deaglio et al. 2008). Als Enzym synthetisiert es die *second messenger* ADP-Ribose (ADPR), Nikotinsäure-adenindinukleotidphosphat (NAADP) und zyklische ADP-Ribose (cADPR) von NAD(P)⁺ (Abb. 1.2.2). ADPR und NAADP sind an der Modulation des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels beteiligt. ADPR reguliert den Ca²⁺-Einstrom über TRPM2 (*transient receptor potential cation channel member*) (Perraud, Fleig et al. 2001), während NAADP Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisiert (Young, Choleris et al. 2006). cADPR kontrolliert die Ca²⁺-Level unabhängig von IP₃ über Ryanodinsensitive intrazelluläre Speicher (1,4,5-Trisphosphat) (Howard, Grimaldi et al. 1993).

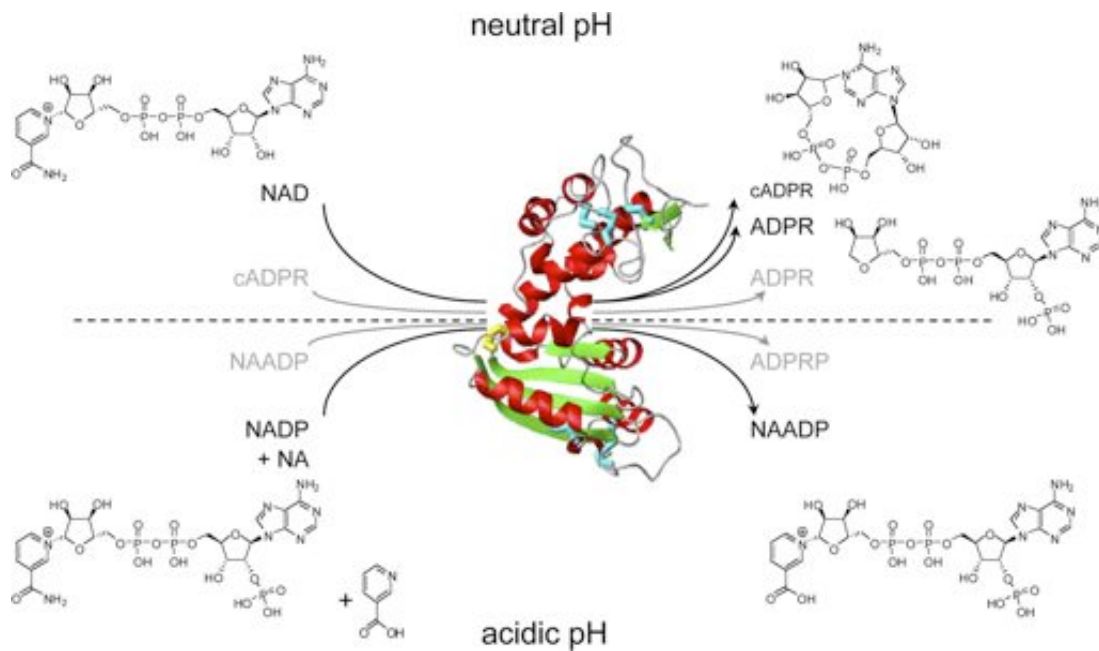


Abb. 1.2.2: Schematische Darstellung der Substrate und Reaktionsprodukte von CD38. NAD (Nikotinamid-adenindinukleotid), NADP (Nikotinamid-adenindinukleotidphosphat), NAADP (Nikotinsäure-adenindinukleotidphosphat), ADPR (ADP-Ribose) und cADPR (zyklische-ADP-Ribose). Abb. von Malavasi F et al. *Physiol Rev* 2008; 88:841-886.

Die extrazelluläre Lokalisation von CD38 wirft die Frage auf, wie das von CD38 synthetisierte cADPR intrazellulär wirksam sein kann. Der Halbkanal Connexin 43 könnte den Transport von NAD aus dem Zytosol zum aktiven Zentrum von CD38 vermitteln (Bruzzone, Guida et al. 2001) und der cADPR-Transport wird entweder durch CD38 selbst oder durch Nukleosidtransporter vermittelt (Franco, Guida et al. 1998). Neben diesem autokrinen Mechanismus, könnten die gleichen Transporter auch parakrin wirksam sein (De Flora, Zocchi et al. 2004). Ein klares Model auf molekularer Ebene muss noch etabliert werden.

CD38 begrenzt die Halbwertszeit des extrazellulären NAD und kontrolliert somit das Niveau, der von ADP-Ribosyltransferasen katalysierten ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen (Krebs, Adriouch et al. 2005). Es wird vermutet das CD38 und die ADP-Ribosyltransferasen zusammen Informationen über die Anwesenheit von Ekto-NAD, das von Zellen bei Entzündungsreaktionen freigesetzt wird vermitteln und so die Immunantwort modulieren (Koch-Nolte, Adriouch et al. 2006).

CD31 ist der Ligand von CD38. Die Interaktion führt sowohl zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, als auch zur Proliferation und Induktion von Zytokinen (Deaglio, Mallone et al. 2000). Bei der Bindung von Lymphozyten an das Endothelium spielt die Bindung zwischen CD38 und CD31 ebenfalls eine Rolle. Durch die Interaktion kommt es zu einer Hochregulation der Expression von Integrinen, die für die folgenden Schritte der Adhäsionskaskade essentiell sind (Gurubhagavatula, Amrani et al. 1998).

Klinisch wird CD38 als Marker der chronisch lymphatischen Leukämie eingesetzt (CLL) (Deaglio, Aydin et al. 2008). Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer starken Expansion der B-Lymphozyten (Mallone, Ferrua et al. 1998). Ein Drittel der Patienten mit CLL benötigt eine iterative Therapie, die zu einer Einschränkung der Lebensqualität und Lebensdauer führt. (Tsimberidou, Wen et al. 2007). Verschiedene klinische, morphologische und molekulare Parameter werden angewendet, um diese aggressive Variante zu diagnostizieren. Hochreguliertes CD38 ist einer dieser Marker für Patienten mit einer schlechten Prognose. Die Arbeiten von Deaglio und Malavasi deuten darauf hin, dass CD38 mehr als nur ein Marker ist und die Expression, Proliferation und Expansion der B-Lymphozyten aktiv beeinflusst (Deaglio, Aydin et al. 2008). Auch für die HIV-I Infektion ist CD38 ein prognostischer Marker. Eine erhöhte Expression von CD38 auf T-Zellen ist ein Indikator für den Fortschritt der Erkrankung und eine Abnahme der Expression wird als Indikator für eine effektive HAART (*highly active antiretroviral therapy*) gewertet (Roussanov, Taylor et al. 2000).

Monoklonale Antikörper gegen CD38 wurden entwickelt für die Diagnostik und Therapie von CLL (Deaglio, Aydin et al. 2008). Humane anti-CD38 Antikörper werden derzeit bereits in klinischen Studien (Phase I/II) als Therapeutikum für das multiple Myelom erprobt. (NIH clinical trials registry NCT01324947). Einzeldomänen-Antikörper können für bestimmte diagnostische und therapeutische Anwendungen gegenüber konventionellen Antikörpern Vorteile zeigen, z.B. eine hohe Gewebeporosität und rasche renale Eliminierung (Ginkam, Huang et al. 2008; Roovers, Vosjan et al. 2011; Vosjan, Perk et al. 2011). Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit das Repertoire an Werkzeugen gegen CD38 durch *nanobodies* erweitert werden.

1.3 Die Pathogenitätsfaktoren von *Clostridium difficile*: drei Enzymtoxine

Viele Bakterientoxine entfalten ihre Wirkung indem sie die Anheftung von chemischen Gruppen an humane Zielproteine katalysieren. Diphtherie, eine Infektion der oberen Atemwege, wurde erstmals von Emil von Behring mit einer Serum-Therapie erfolgreich behandelt. Dafür erhielt es den ersten Nobelpreis für Medizin im Jahre 1901. Der Wirkmechanismus des Diphtherie-Toxins (DT) wurde 60 Jahre später entdeckt. DT ADP-ribosyliert den Elongationsfaktor-2 (EF-2), der die Translation der Proteinbiosynthese bei Eukaryoten katalysiert (Honjo, Nishizuka et al. 1968) (Abb. 1.3.1). Inzwischen sind viele bakterielle-ADP-Ribosyltransferasen bekannt. Bei vielen ADP-Ribosylierungen kommt es zu einer Inhibition der Funktion des modifizierten Proteins. Ein Beispiel ist das CDT (*Clostridium difficile* Transferase), ein binäres Toxin aus *Clostridium difficile*, das spezifisch Aktin an Arg-177 ADP-ribosyliert. (Schwan, Stecher et al. 2009). Zwei weitere Toxine von *Clostridium difficile* sind ebenfalls posttranslational wirksam: Toxin A (ToxA) und Toxin B (ToxB), der Pathogenitätsmechanismus ist hier die Glucosylierung von Rho-Proteinen an Thr-37 (Just, Wilm et al. 1995).

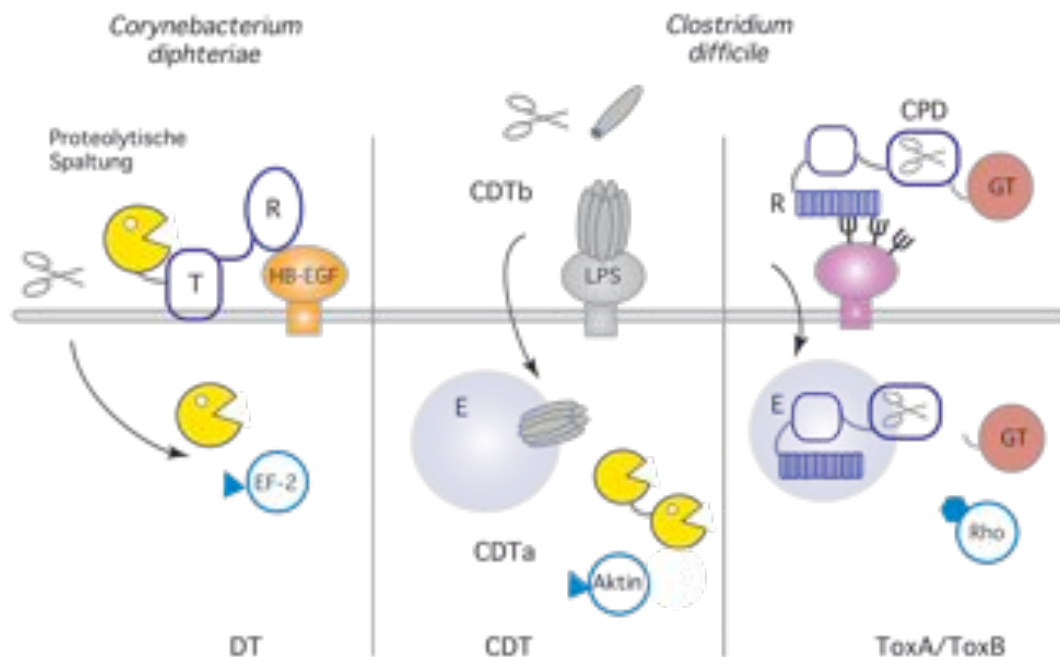


Abb. 1.3.1: Toxin-vermittelte posttranslationale Modifikationen. Diphtherie-Toxin (DT): Nach Bindung der R-Domäne an den Rezeptor Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor (HB-EGF) vermittelt die T-Domäne die Translokation durch die Zellmembran. Nach Spaltung durch eine Wirtszellprotease (Schere) ADP-ribosyliert die katalytische Domäne (Pacman) den Elongationsfaktor 2 (EF-2). *Clostridium difficile* transferase (CDT): CDTb wird durch proteolytische Spaltung aktiviert und bindet an den Lipolyse stimulierenden Lipoprotein Rezeptor (LPS) in heptamerer Anordnung. CDTa (Pacman) bindet an CDTb und wird über Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es in den Endosomen (E) zu einer Konformationsänderung und der Formung einer heptameren Pore (CDTb), die die Translokation von CDTa durch die Endosomenmembran vermittelt. Im Zytosol ADP-ribosyliert CDTa Aktin an Arg-177. ToxA/ToxB: Die Toxine binden an die Zelle über Zucker-bindende repetitive Domänen in der C-terminalen rezeptorbindenden Domäne (R) und werden über Endozytose aufgenommen. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es in den Endosomen (E) zu einer Konformationsänderung und der Formung einer Pore, die die Translokation der enzymatischen Domäne (GT: Glucosyltransferase-Domäne) ins Zytosol ermöglicht. Durch Bindung des allosterischen Aktivator InsP_6 an die Cysteinprotease-Domäne (CPD, Schere) wird die GT autokatalytisch abgespalten und ins Zytosol entlassen. Dort katalysiert die GT-Domäne die Glucosylierung von RhoGTPasen.

1.3.1 *Clostridium difficile* Infektionen

Clostridium difficile ist ein anaerobes Gram-positives endosporen-bildendes Bakterium. Bei gesunden Menschen ist *C. difficile* ein harmloses Darmbakterium. Wird die normale Darmflora durch Antibiotika zurückgedrängt, kann sich *C. difficile* vermehren und führt zu CDI (*C. difficile* Infektion) oder im schwereren Verlauf zur pseudomembranösen Colitis (Kelly and LaMont 1998). Die Symptome variieren von leichter bis zu schwerer Diarrhö, Colitis bis zu pseudomembranöser Colitis mit Schmerzen im Abdomen, Fieber und Unwohlsein. Die Rückfallquote nach Behandlung mit Antibiotika beträgt 22% und 26% (Fekety, McFarland et al. 1997). Bei dem schweren Verlauf der pseudomembranösen Colitis kommt es zu einer Ausschüttung von Fibrin aus dem Darmepithel, das sich mit den Granulozyten und den Darmzellen zu einer weißen Schicht auf der Darmwand verbindet (Bartlett and Gorbach 1977). In Folge es kommt zu einer Erschlaffung des Darmabschnitts und zu einer erhöhten Proliferation und systemischen Ausbreitung der Bakterien, was zu einer Sepsis führen kann (Mylonakis, Ryan et al. 2001; Rupnik, Wilcox et al. 2009). Der Durchfall und die Darmentzündung werden durch die von *C. difficile* produzierten Toxine A und B ausgelöst (Just and Gerhard 2004). Durch die Glucosylierung von Rho an Thr-37 kann die GTPase nicht mehr ihre aktive Konformation einnehmen (Geyer, Wilde et al. 2003).

Dies führt zur Umverteilung des Aktinzytoskeletts, zur Desintegration der Zell-Zellkontakte des Darmepithels und zum Verlust der Schrankenfunktion (Aktories and Barbieri 2005). Die Entzündungsreaktionen werden durch die gestiegene Expression von RhoB erklärt, das der Inaktivierung durch Glucosylierung entgeht (Gerhard, Tatge et al. 2005).

1.3.2 Toxin A und Toxin B: durch autokatalytische Spaltung regulierte Glucosyltransferasen

ToxA und ToxB haben ein Molekulargewicht von 308 kDa bzw. 270 kDa und werden aufgrund ihrer Größe auch als LCTs (*large clostridial cytotoxins*) bezeichnet. Sie bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit vierteiliger Organisation (Abb. 1.3.2). Der genaue Mechanismus, durch den Toxin A und Toxin B in die Zelle gelangen, ist noch nicht geklärt. Bekannt ist, dass sie über die repetitiven C-terminalen Lektin-Domänen (*RBD-receptor binding domains*) (von Eichel-Streiber and Sauerborn 1990) an zuckerhaltige Rezeptoren auf der Zellmembran binden (Tucker and Wilkins 1991; Karlsson 1995). Durch die Bindung wird die Endozytose der Toxine eingeleitet (Florin and Thelestam 1983). Durch den niedrigen pH-Wert in den Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung des Toxins und einer Translokation des enzymatisch aktiven Bereichs ins Zytosol (Giesemann, Jank et al. 2006). Mittels Inositolhexakisphosphat findet die autokatalytische Abspaltung statt und entlässt das enzymatisch aktive Fragment ins Zytosol der Wirtszelle. Das C-terminale Fragment verbleibt in den Endosomen und der Endosomenmembran (Rupnik, Pabst et al. 2005). In Untersuchungen konnte die Relevanz beider Toxine für die Pathogenese nachgewiesen werden (Kuehne, Cartman et al. 2010). Beide Toxine führen zur Produktion von Zytokinen, einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität, der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten, zur Apoptose der Epithelzellen und der Zerstörung des Darmgewebes (Hodges and Gill 2010).

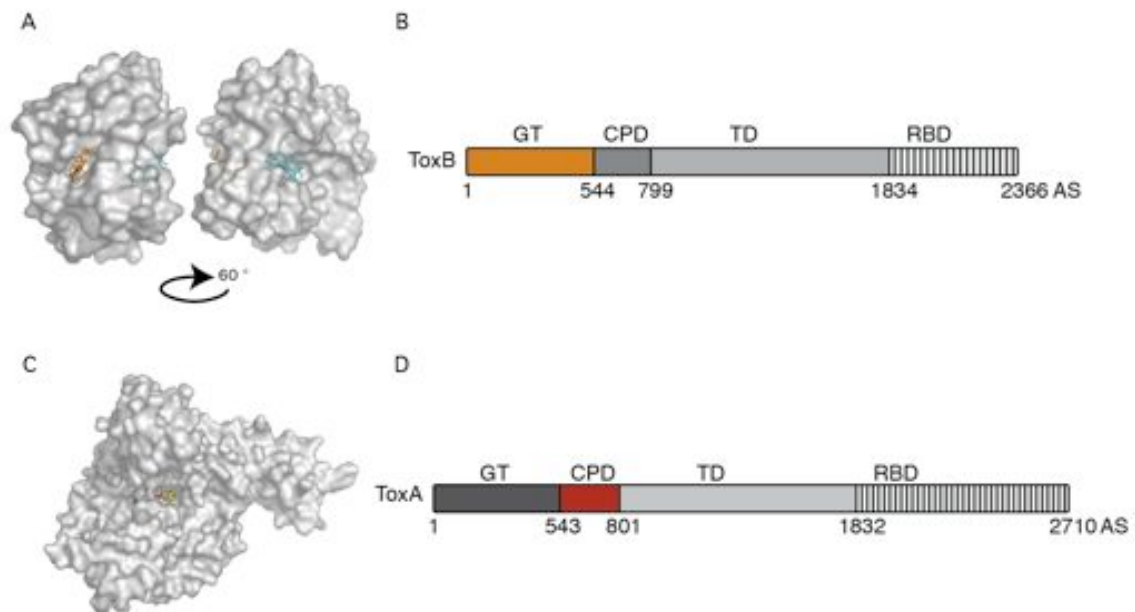


Abb. 1.3.2: 3D-Modell der GT und CPD Domänen von Toxin B und schematische Darstellung der Toxine A und B. (A) 3D-Modell der Cystein-Protease Domäne (CPD) von ToxB mit gebundenem Substrat (Peptid, orange) und allosterischem Ko-Aktivator (InsP₆, cyan). Abbildung erstellt mit PyMOL unter Verwendung des pdb-codes: 3pa8. (B+D) Schematische Darstellung der Toxine A und B. Die Bindung an die Zelle erfolgt durch die Rezeptor bindende Domäne (RBD). Nach der Bindung kommt es zur Rezeptor vermittelten Endozytose in die Zelle. In den Endosomen kommt es aufgrund des niedrigen pH-Wertes zu einer Konformationsänderung der Toxine. Es bildet sich eine Pore in der Endosomenmembran, der die Translokation der Glucosyltransferase (GT) Domäne ins Zytosol folgt. Man geht davon aus, dass die Transmembran-Domäne (TD) an der Porenbildung beteiligt ist. Durch die Cysteinprotease-Domäne (CPD) wird die GT-Domäne autokatalytisch in Anwesenheit von InsP₆ abgespalten. Im Zytosol werden die RhoGTPasen durch die GT-Domäne glucosyliert. (C) 3D-Modell der Glucosyltransferase-Domäne (GT) von ToxB mit dem gebundenen Substrat UDP-Glucose. Abbildung erstellt mit PyMOL unter Verwendung des pdb-codes: 2blv. Vor Beginn dieser Arbeit waren zwei Lamas (5 und 5037) mit der CPD von Toxin A und zwei Lamas (5026 und 5037) mit der GT-Domäne von Toxin B immunisiert worden.

1.3.3 Das CDT Toxin: eine Aktin-ADP-Ribosyltransferase

In 20-35% der Clostridien-Stämme tritt zusätzlich das binäre Toxin CDT (*Clostridium difficile* Transferase) auf (Perelle, Gibert et al. 1997; Schwan, Stecher et al. 2009) (Abb. 1.3.3). Das CDT setzt sich aus zwei separaten Untereinheiten zusammen: CDTa und CDTb. CDTa mit einem Molekulargewicht von 48 kDa ist die enzymatische

Untereinheit und ADP-ribosyliert Aktin an Arg-177 im Zytosol. CDTb hat ein Molekulargewicht von 99 kDa. CDTb bindet nach proteolytischer Abspaltung der Aktivierungsdomäne als Heptamer an den Lipolyse stimulierenden Lipoprotein Rezeptor (Papatheodorou, Carette et al. 2011). Das an CDTb gebundene CDTa wird über Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es in den Endosomen zu einer Konformationsänderung und der Insertion einer heptameren Pore in die Endosomenmembran, die die Translokation von CDTa in das Zytosol vermittelt. Durch die ADP-Ribosylierung von G-Aktin durch CDTa kommt es zum Zusammenbruch des Zytoskeletts (Davies, Roberts et al. 2011). Zudem kommt es zur Formation von Mikrotubuli-assoziierten Vorstülpungen auf der Oberfläche der Darmepithelzellen. Dies führt zu einer erhöhten Adhärenz der Bakterien (Schwan, Stecher et al. 2009).

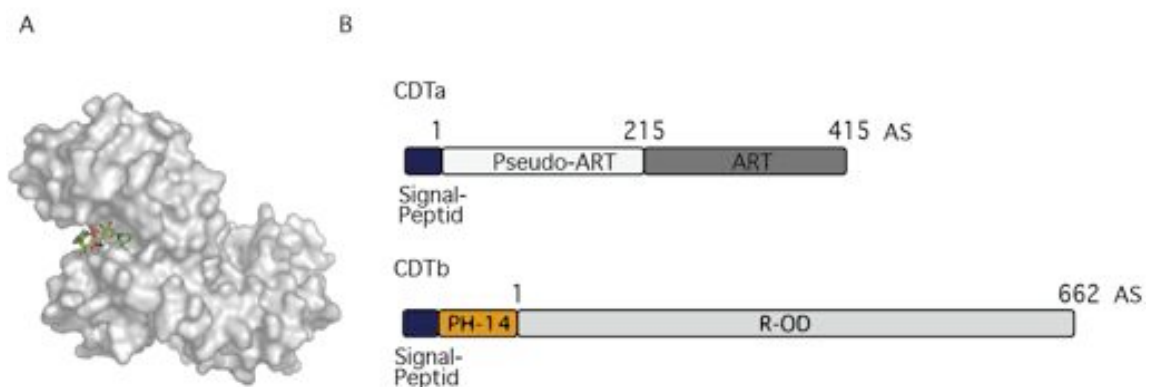


Abb. 1.3.3: (A) 3D-Modell der CDTa verwandten I-Untereinheit des Iota Toxins von *Clostridium perfringens* mit gebundenem NAD. Abbildung erstellt mit PyMOL unter Verwendung des pdb-codes: 2qiq **(B) Schematische Darstellung der a und b Untereinheiten von CDT.** Die PH-14 Domäne wird im Darm proteolytisch abgespalten. Nach Rezeptorbindung inseriert die Oligomerisierungsdomäne (R-OD) als Heptamer in die Zellmembran und bildet eine Pore durch die die CDTa Untereinheit ins Zytosol gelangt (Schleberger, Hochmann et al. 2006). Im Verlauf dieser Arbeit waren zwei Lamas (5 und 5037) mit der CDTa Untereinheit immunisiert worden.

Monoklonale Antikörper gegen die *C. difficile* Toxine sind wichtige Hilfsmittel für die Differentialdiagnostik von Durchfallerkrankungen (Laughon, Viscidi et al. 1984).

Einige monoklonale Antikörper wurden bereits in klinischen Studien erfolgreich für die Behandlung eingesetzt (Lowy, Molrine et al. 2010). Aufgrund der vorteilhaften physikochemischen Eigenschaften der *nanobodies* gegenüber den konventionellen Antikörpern, sollten im Rahmen dieser Arbeit Toxin-spezifische VHHs als neue experimentelle Werkzeuge isoliert und charakterisiert werden

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Einzeldomänen-Antikörpern (VHHs) aus immunisierten Lamas gegen das humane Leukozyten Ecto-Enzym CD38 sowie gegen die drei Enzym-Toxine von *Clostridium difficile*. CD38 ist ein multifunktionelles Protein und wird in hoher Epitopdichte auf vielen Chronischen Lymphatischen Leukämien, Myelomen und in einigen AIDS-assoziierten Lymphomen exprimiert. Die Clostridien Toxine A, B und CDT entfalten ihre toxischen Wirkungen, indem sie die Anheftung von kleinen chemischen Gruppen (Toxin A und Toxin B: Glucose, CDT: ADP-Ribose) an humane Zielproteine katalysieren. Zur Induktion einer Antikörper-Antwort waren Lamas vor Beginn dieser Arbeit mit rekombinanten Proteinen für diese Antigene immunisiert worden. Aus Lymphozyten - gewonnen aus Blutentnahmen 10-21 Tage nach der letzten Boost-Immunisierung - sollte das VHH-Repertoire dieser Tiere in Phagen-Display Bibliotheken kloniert werden und aus diesen über unterschiedliche Selektionsstrategien spezifische-VHHs angereichert werden. Zur weiteren molekularen Charakterisierung sollten diese rekombinant in *E. coli* exprimiert und hinsichtlich ihrer Spezifität, Affinität und Fähigkeit zur Inhibition der Enzymaktivität untersucht werden.

Langfristiges Ziel ist der Einsatz der selektionierten Einzeldomänen-Antikörper für diagnostische und therapeutische Applikationen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb interessante VHHs in verschiedene bi- und multivalente Formate umklontiert werden (Abb. 1.4.1) und deren Exprimierbarkeit in pro- und eukaryontischen Zellen evaluiert werden.

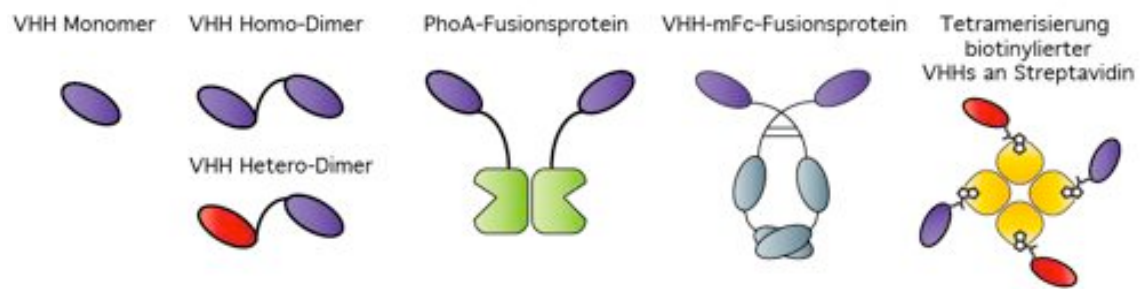


Abb. 1.4.1: schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit generierten VHH-Konstrukte.

2 Material

2.1 Enzyme

Die Enzyme, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen: New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe). Enzyme als Bestandteile käuflich erworbener Kits wurden bei der Auflistung nicht berücksichtigt.

2.2 Affinitätsmatrices

M2-Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN GmbH (Hilden)
StrataClean-Agarose	Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande)
Streptavidin-Agarose	Thermo Scientific (Erlangen)

2.3 Chemikalien und Bioreagenzien

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Chemikalien, Salze und Bioreagenzien in molekularbiologischer bzw. analytischer Qualität verwendet. Sie wurden bezogen von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Biomol GmbH (Hamburg), AppliChem GmbH (Darmstadt), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Acros Organics (Geel, Belgien), Thermo Electron GmbH Bioscience Technologies (Dreieich), Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Sigma, Aldrich, Fluka (alle: Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Taufkirchen, Merck KGaA (Darmstadt), Novagen Merck Biosciences GmbH, Schwalbach), Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande), J.T. Baker (Phillipsburg, US), Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn), Fisher Scientific GmbH (Schwerte) und Molecular Biosciences Inc. (Boulder, US).

2.4 Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA

DNA

GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
SmartLadder (DNA)	Eurogentec (Köln)

Proteine

Supermark (Protein) 75 µg/ml IgG, BSA 100 µg/ml, Lysozym 10 µg/µl	eigene Herstellung
Novex Sharp Pre-stained	Invitrogen (Karlsruhe)

2.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von Metabion Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Die Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt.

2.6 Phage Display Helferphagen

Der Helferphage M13K07 wurde kommerziell von Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) erworben.

2.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Spezifität	Klon	Lieferant
anti-Human CD38-PE	Maus	monoklonal	HIT2, IgG1κ	BD Biosciences
anti-Human CD38-FITC	Maus	monoklonal	IA10, IgG2ακ	BD Biosciences
anti-Human CD3-APC	Maus	monoklonal	SK7, IgG1κ	BD Biosciences
anti-c-Myc-FITC	Maus	monoklonal	9E10, IgG1κ	Abd Serotec
anti-Rac1	Maus	monoklonal	23A8, IgG2b	Abcam
anti-Rac1	Maus	monoklonal	102/Rac1, IgG2b	BD Biosciences
anti-Lama IgG1	Maus	monoklonal	27E10	L. P. Daley

anti-Lama IgG2b	Maus	monoklonal	19D8	L. P. Daley
anti-Lama IgG3	Maus	monoklonal	8E1	L. P. Daley
anti-c-Myc-HRP	Kaninchen	polyklonal	-	Santa Cruz
anti Kaninchen-HRP	Ziege	polyklonal	.	GE Healthcare
anti-Maus.HRP	Schaf	polyklonal	-	GE Healthcare

2.8 Plasmide

pMe	DNAX <i>Research Institute</i> (Palo Alto, USA)
pHEN2	Institut Leloir (Buenos Aires, Argentinien)
pQuantagen	QBiogene (Quebec, Kanada)

2.9 Verwendete Kits (kommerziell erhältlich)

Alexa Fluor 680 Protein Labeling Kit	Molecular Probes (Eugene, USA)
Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit	Molecular Probes (Eugene, USA)
BCA-Proteinquantifizierung <i>BCA Protein Assay Reagent</i>	Pierce (Rockford, USA)
EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotinylation	Thermo Scientific (Erlangen)
Gelextraktion <i>NucleoSpin Extract II</i>	Macherey-Nagel (Düren)
PhoA-Color System	QBiogene (Quebec, Kanada)
Plasmid-Präparation QIAprep	QIAGEN GmbH (Hilden)
Spin Miniprep Kit	
RNA-Isolierung RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)

2.10 Puffer und Lösungen

Die benutzten Puffer, Lösungen sowie ihre Zusammensetzungen sind nachfolgend aufgeführt. Puffer als Bestandteile käuflich erworbener Kits bzw. Puffer für Restriktionsenzyme werden nicht berücksichtigt.

2.10.1 Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

6x DNA Loading Dye	10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,03%
MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	bromophenol blue, 0,03% xylene
	cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM
	EDTA
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	2mM TRIS-Acetate, pH 7,8, 50 mM
Gibco-BRL (Gaithersburg, USA)	EDTA

2.10.2 Lösungen für die Proteinbiochemie

PEG/NaCl-Lösung:	20% (w/v) Polyethylenglycol-6000
	2,5 M NaCl
BCIP-Stocklösung	0,5% (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in DMF
Beschichtungspuffer ELISA	0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,8
Blot-Puffer	10% Methanol, 0,1% Antioxidans,
	1x Transferpuffer
Blockpuffer	5% Milchpulver in PBS
Colloidal blue Staining Kit	
Invitrogen (Karlsruhe)	
Detektionspuffer AP	13 mM pNPP in TBS, pH 9,5, 0,1 M
	MgCl ₂ , 0,1 M NaCl
Detektionspuffer HRP	TMB 0,4 g/l
1x Dulbecco's PBS	2,67 mM KCl, 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ,
Invitrogen (Karlsruhe)	137,93 mM NaCl, 8,06 mM Na ₂ PO ₄ ,
	pH 7,4
ECL-Reagenz	
Amersham Biosciences (Freiburg)	
Gel-Dry Drying Solution HBS	
Invitrogen (Karlsruhe)	
LDS-Ladepuffer (4x)	
Invitrogen (Karlsruhe)	

MES-Laufpuffer (20x)	50 mM MES, 50 mM Tris Base, 0,1%
Invitrogen (Karlsruhe)	SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3
MST-Puffer	25 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,1% BSA, 0,1% Tween-20, 0,5 mM DTT
Neutralisationspuffer Protein A/G	1 M Tris-HCl, pH 9
Reduktionsmittel	0,5 M Dithiothreitol, stabilisiert
Invitrogen (Karlsruhe)	
Stopplösung ELISA-HRP	0,5 M Schwefelsäure
TBS	0,025 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl
Transferpuffer (20x)	0,5 M Bicin, 0,5 M BIS-TRIS, 20,5 mM
Invitrogen (Karlsruhe)	EDTA, 1 mM Chlorobutanol
Waschpuffer für ELISA	0,05% Tween-20 in TBS

2.10.3 Lösungen für die Aufreinigung rekombinanter Proteine

AEBSF-Stammlösung	100 mM
MP Biomedicals (Irvine, USA)	
Elutionspuffer Ni-NTA	50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 0,3 M NaCl, 100 mM Imidazol
Elutionspuffer pH 3,5 (Protein G)	150 mM NaCl, 0,58% Essigsäure mit Natronlauge
Elutionspuffer pH 4,5 (Protein A)	150 mM NaCl, 0,58% Essigsäure mit Natronlauge
Elutionspuffer pH 2,7 (Protein A/G)	150 mM NaCl, 0,58% Essigsäure mit Natronlauge
IPTG-Stammlösung	1M
MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	
Lysozym-Stammlösung	10mg/ml
Roche (Basel, Schweiz)	

TS-Lysepuffer	30 mM Tris-HCl, pH 8, 20% Saccharose, 500 mM AEBSF, 1% Lysozym
Waschpuffer Ni-NTA	50 mM Natriumphosphat pH 8, 0,3 M NaCl, 4 mM Imidazol

2.10.4 Lösungen für enzymatische Untersuchungen

Dünnschichtchromatographie-Laufpuffer 1	1M Essigsäure
Dünnschichtchromatographie Laufpuffer 2	300 mM LiCl, 0,9 M Essigsäure

2.10.5 Lösungen für Immunfluoreszenzanfärbungen

Blocklösung	10% FCS, 0,2% BSA, 0,3% Triton in PBS
Carrier-Lösung	1% Serum, 0,2% BSA, 0,3% Triton in PBS
Fixierungslösung	4 % Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung	0,5 % Triton X-100 in PBS
Waschlösung	0,1 % Triton X-100 in PBS

2.11 Antibiotika

Carbenicillin-Stammlösung	100 mg/ml
Kanamycin-Stammlösung	100 mg/ml

2.12 Medien

2.12.1 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium	10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l
-----------	------------------------------------

Formulierung nach Miller Invitrogen (Karlsruhe)	Hefeextrakt
LB-Carb-Medium Carbenicillin	LB-Medium, 100 µg/ml
LB-Agar Formulierung nach Miller BD Difco (Heidelberg)	10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Agar
LB-Carb-Agar	LB-Agar, 100 µg/ml Carbenicillin
2xYT BD Difco (Heidelberg)	16 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt
2xYT-Carb-Medium Carbenicillin	2xYT-Medium, 100 µg/ml
2xYT-Carb-Kana-Medium	2xYT-Medium, 100 µg/ml Carbenicillin, 100 µg/ml Kanamycin
2xYT-Carb-Gluc-Medium	2xYT-Medium, 100 µg/ml Carbenicillin, 2% Glucose (w/v)
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

2.12.2 Medien und Lösungen für eukaryotische Zellkultur

DMEM-Komplett Gibco-BRL Invitrogen (Karlsruhe)	DMEM mit 10% FKS. 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1x nicht essentielle Aminosäuren und 10 mM HEPES-Puffer
Fötales Kälberserum (FKS) Biochrom (Berlin)	

HEPES-Puffer 20 mM:	132 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 1,2 mM K ₂ HPO ₄ , 5,5 mM Glucose
Isotone Natriumchloridlösung Braun (Melsungen)	154 mM NaCl
jetPEI Transfektionsreagenz Polyplus (Illkirch, Frankreich)	
L-Glutamin Gibco-BRL Invitrogen (Karlsruhe)	200 mM
Natriumpyruvat Gibco-BRL Invitrogen (Karlsruhe)	100 mM
Nicht-essentielle Aminosäuren Gibco-BRL Invitrogen (Karlsruhe)	100x
RPMI-Komplett Gibco-BRL Invitrogen (Karlsruhe)	RPMI mit 10% FKC, 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat

2.13 E. coli Stämme und deren Genotyp

Bei den Bakterienstämmen handelte es sich um unterschiedliche *E. coli* K12-Stämme. Zur Transformation von Ligationsansätzen wurden ultrakompetente XL-10 Gold, XL-2 blue oder TG1 Zellen (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Für die Expression der VHHs wurden die Plasmide in HB2151 Zellen (Amersham) transformiert.

TG1:	F' [traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (rK-mK-)
HB2151:	K12 D(<i>lac-pro</i>), <i>ara</i> , <i>nalr</i> , <i>thi</i> /F'[<i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZDM15</i>]
XL-2 blue	endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr].
XL10-Gold:	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]

2.14 Zelllinien und Zellkultur

Eukaryotische Zelllinien wurden von der American type culture collection (ATCC) bezogen oder waren bereits im Labor etabliert.

HEK-293T Embryonales Nierengewebe *H. sapiens*

NIH/3T3 Embryonales Bindegewebe *M. musculus*

MDCK-II Nierengewebe *C. familiaris*

2.15 Verbrauchsmaterialien

Sämtliches Material sowie Plastikware für den Laborbedarf wurden bezogen von Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg), Becton Dickinson Labware (Heidelberg), Biotechnologie GmbH (Erlangen), Bode Chemie (Hamburg), Braun (Melsungen), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe), Corning Costar. (Amsterdam, Niederlande), Eppendorf AG (Hamburg), Greiner Bio-One (Solingen), Millipore GmbH (Schwalbach), Nunc Labware (Roskilde), PEQLAB Biotechnologie GmbH, (Erlangen), Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn), Sarstedt AG & Co (Nümbrecht) und Sartorius (Göttingen).

2.16 Apparative Ausrüstung

Agarose-Gelelektrophorese Modell B2

Owl Separation Systems
(Rochester, USA)

Analysenwaage Analytical Plus

Ohaus (Parsippany, USA)

Autoklav Modell 2540 EK

Tuttnauer Europe (Breda,

Niederlande)

Autoklav Varioklav

H+P Labortechnik GmbH
(Oberschleissheim)

Brutschrank CO₂ Inkubator MCO-20AIC,
(Japan)

Sanyo Electric Co., Ltd (Tokio,

Brutschrank Bakterien Incubator

Melag (Berlin)

CCD-Kamera AxioCam MRm,	Zeiss (Jena)
Durchflusszytometer FACS-Calibur/Canto	Becton Dickinson and Company (Heidelberg)
ELISA-Reader Victor ³	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Feinwaage Typ 1412	Sartorius (Göttingen)
Filmentwicklungsmaschine Fuji FPM 100A	Fuji Photofilm GmbH (Düsseldorf)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss (Jena)
Fluoreszenzmikroskop-Objektive	Zeiss (Jena)
Plan-Apochromat 10x/0,25	
Plan-Apochromat 20x/0,8	
Folienschweißgerät vacufix electronic	Petra electric (Burgau)
Heizblock Thermomixer kompakt,	Eppendorf (Hamburg)
Kontaminationsmonitor Contamat FHT 111M	Thermo Scientific (Erlangen)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Kühltruhe -80°C HFC 586 Basic	Eberline (Erlangen)
Laufkammern Agarose-Gelelektrophorese Modell 40-0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen),
Magnetrührer IKAMAG RH	Janke&Kunkel IKA Labortechnik (Staufen)
Mikropipetten Typ Research	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowelle M637 EC	Miele (Gütersloh)
Minishaker MS1	Wilke&Witzel (Hamburg)
NanoTemper Monolith NT.115	Nanotemper (München)

Neubauer Zählkammer	Labor Optik (Bad Homburg)
pH-Meter InLab Routine pro	Mettler (Toledo, USA)
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad (München)
Pipetierhilfe Express	Falcon (Heidelberg)
RealTime PCR System Step One Plus USA)	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Reine Werkbank Gelaire Typ BSB4	Gelman (Singapur)
Roller Mixer SRT6	Stuart (Staffordshire, UK)
Röntgenfilmkassetten	Suprema Dr. Goos (Heidelberg)
Scanner Canonscan 9800 F	Canon (Tokio, Japan)
Schüttelinkubator ECOTRON / UNITRON	inforsHT (Bottmingen, Schweiz)
SDS-PAGE Novex MiniCell	Invitrogen (Karlsruhe)
Sicherheitswerkbank Herasafe HS12/2	Heraeus (Hanau)
Spannungsgerät Agarose Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
Spannungsgerät SDS-PAGE Power Pac 200	Bio-Rad (München)
Spektrophotometer Nanodrop 2000c	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Stickstofftank K series Taylor-Wharton Modell BI0105 LVD	Biometra (Göttingen)
Thermocycler T3 / T Gradient	Biometra (Göttingen)
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
UV-Transilluminator Typ TI1	Biometra (Göttingen)
Volt-Ohm-Meter Millicell-ERS	Millipore GmbH (Schwalbach)

Wasserbad Typ 1007

Gesellschaft für Labortechnik
(Burgwedel)

Zentrifuge Rotanta 460 R

Hettich (Tuttlingen)

Zentrifugen Rotoren SA-300 / SLA-300

Sorvall (Waltham, USA)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Sambrook et. al (Sambrook and Russell 2001) durchgeführt. Für alle wässrigen Puffer, Lösungen und Medien wurde ddH₂O verwendet. Einige Puffer und Lösungen wurden bei Bedarf sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße). Einige Puffer, Lösungen und alle Medien wurden in einem Autoklav (Varioklav Dampfsterilisator 135 S von H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) durch wassergesättigten, unter Druck (5 bar) stehenden Dampf für 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert.

3.1.1 Aufreinigung der Immunglobulin-Subklassen aus Serumproben

Aus dem Serum wurden mittels sequentieller Protein-G und Protein-A Chromatographie die verschiedenen IgG-Subklassen des Lamas isoliert. Für die Elution von gebundenem IgG-Protein wurden die pH-Werte der Puffer so gewählt, dass eine Fraktionierung nach Subtypen erfolgte (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993). 1 ml Serum wurde mit 4 ml PBS verdünnt und auf eine mit PBS äquilibrierte 1 ml G-Sepharose Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Matrix mit 10 ml PBS gewaschen und die Immunglobuline des Subtyps IgG2c bei einem pH-Wert von 3,5 und die IgG1-Antikörper bei einem pH-Wert von 2,7 eluiert. Die Eluate wurden in vier 1 ml Fraktionen aufgefangen und mit 1M Tris-HCl pH 9 neutralisiert. Die Fraktion, die nicht an die Protein-G-Säule gebunden hat, wurde auf die Protein-A Säule aufgetragen. Eluiert wurden zwei unterschiedliche Fraktionen des IgG2b-Subtyps bei einem pH-Wert von 4,5 und 2,7. Die Aufreinigung der IgG-Subklassen wurde mittels SDS-PAGE Gel überprüft.

3.1.2 RNA-Isolierung aus Lymphozyten

Die Isolierung der RNA aus 1×10^7 peripheren Lymphozyten erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits und wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Mit einem Spektrophotometer wurde die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA} = A_{260} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnung}$$

$$\text{DNA} = A_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnung}$$

Die Reinheit der DNA bzw. RNA lässt sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmen. Reine Nukleinsäuren haben ein A_{260}/A_{280} Verhältnis von 1,8 (DNA) bzw. 2,0 (RNA). Geringere Werte sprechen für Verunreinigungen durch Proteine, Phenol oder andere Substanzen die bei 280 nm absorbieren.

3.1.4 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA beruht auf der Verwendung einer klonierten Reversen Transkriptase des Moloney murinen Leukämie Virus (M-MLV-RT), die in der Lage ist, bei Vorgabe von Ansatzpunkten, die RNA in die stabilere Form der cDNA umzuschreiben. Die SuperScript III verfügt über eine hohe Thermostabilität und eine reduzierte RNase H-Aktivität. Die RNase H ist eine unspezifische Endoribonuklease, die RNA-DNA Heteroduplexe erkennt und spaltet. Für die reverse Transkription wurden *Random*-Hexamere (RH6) verwendet, die unspezifisch an die RNA binden.

X μl RNA	1,5 μg gesamt RNA
3 μl	Random Hexamere (200 ng/ μl)
ad 17 μl	ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Um die Qualität der RNA-Präparation zu überprüfen, wurden 5 μl für ein RNA-Agarosegel abgenommen. Der Rest wurde für die RT-PCR verwendet:

12 μl	RNA + RH6
1 μl	dNTPs (1mM)
4 μl	5x 1 st Strand Buffer
2 μl	DTT (0,1 M)

1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Tab. 3.1.1: Programm für die cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer
<i>annealing</i>	24 °C	10 min
cDNA-Synthese	42 °C	20 min
Termination der Reaktion	95 °C	2 min

Aus der gewonnenen cDNA wurden mit spezifischen Oligonukleotiden SHF/SHR und LHF/LHR (Anhang: 8.2.3) die Genabschnitte der VHHs PCR-amplifiziert. Die cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der *in-vitro* Amplifikation von DNA unter Verwendung von Oligonukleotiden, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Die PCR lässt sich in drei Reaktionsschritte unterteilen. Im ersten Schritt wurde der DNA-Doppelstrang bei 95 °C denaturiert. Im nächsten Schritt, dem *annealing*, lagerten sich die Oligonukleotide (Anhang: 8.2) an die komplementäre Sequenz auf dem DNA-Strang an. Die Temperatur dieses Schrittes wurde durch die Schmelztemperatur der Oligonukleotide bestimmt. Im Elongationsschritt beginnt die Synthese der Komplementärstränge durch die hitzestabile KOD-DNA-Polymerase bei 70 °C in Gegenwart von freien dNTPs. Die Dauer des Schrittes richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Als Elongationsgeschwindigkeit wurden 1000 bp / 20 s für die KOD-DNA-Polymerase zugrunde gelegt. Durch zyklische Wiederholung der drei Reaktionsschritte kommt es zur exponentiellen Amplifikation des DNA-Abschnitts. Die Mengen bzw. Finalkonzentrationen einer Standard-PCR wurden wie folgt eingestellt:

x µl	Template (0,01-1 ng Plasmid-DNA, 0,1-1 µg genomische DNA)
5 µl	dNTPs (jeweils 0,2 mM)
5 µl	Reaktionspuffer (10 x)

1,5 µl	sense-Oligonukleotid (0,3 µM)
1,5 µl	antisense-Oligonukleotid (0,3 µM)
3 µl	MgSO ₄ (1,5 mM)
1 µl	KOD-DNA-Polymerase (1 U/µl)

mit ddH₂O ad 50 µl

Tab. 3.1.2: Programm für eine Standard-PCR Reaktion.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Primärdenaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s	
<i>annealing</i>	48-60 °C	10 s	30
Elongation	70 °C	20 s/ 1000 bp	
finale Elongation	70 °C	30 s	1

3.1.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden 600-700 ng der Plasmid-DNA mit 20 pmol der Oligonukleotide in einem Volumen von 7 µl angesetzt. Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode (Sanger, Nicklen et al. 1977).

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung und Isolierung von DNA- und RNA- Molekülen. 0,5 g bzw. 1 g Agarose wurde in 50 ml/100 ml TRIS-Acetat-EDTA Puffer unter Erhitzen gelöst und in eine Gelkammer mit 5 µl/10 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zum Auskühlen gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die zu untersuchende Probe wurde mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90-120 V für 40-60 Minuten. Mit Hilfe des verwendeten Farbstoffs (Xylen Cyanol FF: 4160 bp, Bromphenolblau: 370 bp) konnte

die Lauffront sichtbar gemacht werden und somit die Elektrophorese kontrolliert ablaufen. Auf einem UV-Transilluminator konnte die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA mit einem Video-Image-System festgehalten werden und mit Hilfe eines mitlaufenden DNA-Standards analysiert werden.

3.1.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde unter Zuhilfenahme des Gelextraktion Kits *NucleoSpin Extract II* von Macherey-Nagel (Düren) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Methode basiert auf der Auflösung der Agarose und der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an die Silizium-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein and Gillespie 1979). Die Elution erfolgte in einer Lösung mit geringer Salzkonzentration oder ddH₂O.

3.1.9 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die DNA innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz schneiden. Die Restriktionsansätze wurden in Volumina von 20 µl durchgeführt unter Verwendung des vom Hersteller (New England Biolabs, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) empfohlenen Reaktionspuffers und Temperatur für 2-4 Stunden. Eine Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte im Anschluss bei 65 °C für 20 Minuten.

3.1.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Rezyklisierung von Plasmiden zu minimieren wurden diese mit der Antarctic Phosphatase von New England Biolabs endständig dephosphoryliert. 1 µl (1 u/µl) des Enzyms und 2 µl des 10x Puffers wurden dem Reaktionsansatz beigefügt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde im Anschluss durch Hitze inaktiviert (5 Minuten, 65 °C).

3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation dient der Verknüpfung von DNA-Enden. Die T4-Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) katalysiert die Verknüpfung der 5'-Phosphatgruppen und der 3'-Hydroxygruppe unter ATP-Verbrauch. Die Reaktion fand in einem 20 µl Volumen statt. Für die Ligation wurde ein Verhältnis von 3:1 von DNA-Fragment zu Vektor gewählt. Die Finalkonzentrationen bzw. Volumina für die Ligationsreaktion wurden wie folgt eingestellt:

x µl DNA-Fragment
y µl Vektor
1 µl T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
2 µl 10 x Ligationspuffer (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
ad 20 µl ddH₂O

Die Reaktion erfolgte für 16 Stunden bei 16 °C. Das Enzym wurde anschließend hitzeinaktiviert (10 Minuten, 65 °C).

3.1.12 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

3.1.12.1 Hitzeschock-Methode

Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 50-100 µl in Rundbodenröhrchen überführt. Der Ansatz wurde nach Zugabe des Plasmids für 30 Minuten inkubiert und im Anschluß erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C. Nach erneuter Inkubation der Bakterien auf Eis für 2 Minuten wurden 900 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben. Die Röhrchen wurden dann für eine Stunde bei 37 °C und 240 rpm inkubiert. Eine definierte Menge der Bakterien wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum unter sterilen Bedingungen ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.1.12.2 Elektroporation

Um eine hohe Transformationseffizienz zu erreichen, wurden die Bakterienzellen elektroporiert (Dower, Miller et al. 1988). Nach Inkubation der Zellen mit dem Plasmid für eine Minute auf Eis, wurde der Ansatz in eine vorgekühlte

Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand pipettiert. Es wurde am MicroPulser (Bio-Rad) mit einer Spannung von 1800 V gearbeitet. Unmittelbar danach wurden 900 µl vorgewärmtes SOC-Medium zupipettiert und die Zellen in Rundbodenröhrchen überführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 240 rpm wurde eine definierte Menge der Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum unter sterilen Bedingungen ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.13 Isolierung von Plasmid-DNA mit kommerziell erhältlichen Kits

Plasmid-DNA wurde mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt. Die Bakterien wurden in 3-5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C und 240 rpm kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.1.14 Wachstum und Lagerung von Bakterien-Kolonien

E. coli Zellen in LB-Medium wurden maximal 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Die *E. coli* Kolonien auf LB-Agarplatten wurden bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden. Dafür wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und invertiert bei 4 °C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden 700 µl einer logarithmisch-wachsenden Kultur mit 300 µl Glycerol in einem Kryo-Röhrchen vermengt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.15 PhoA-Fusionsproteine

Für die bivalente Darstellung der VHHs als Fusionsproteine mit der alkalischen Phosphatase wurde das PhoA-Color System verwendet. In dem Vektor pQUANTagen liegt die Alkalische Phosphatase nicht im Leseraster. In der Phosphatase befinden sich jedoch Restriktionsschnittstellen zwischen den Codons +6 und +7, in die über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SalI* die VHHs kloniert (Anhang: 8.2.4) werden können. Den sechs Codons vorgeschaltet ist das Signalpeptid der Phosphatase, dass das Fusionsprotein in den periplasmatischen Spalt der Bakterien dirigiert. Die Sequenz der VHHs muss 3n+1 Nukleotide zusätzlich zu den Restriktionsschnittstellen

enthalten, um das korrekte Leseraster wieder herzustellen. Im Periplasma der *E. coli* dimerisiert das PhoA-Fusionsprotein in seine aktive Form. Die endogene phoA-Aktivität wurde durch die Anwesenheit von anorganischem Phosphat reprimiert oder es wurden *E. coli* Stämme (XL-2 blue) mit mutierter nativer Phosphatase verwendet. Die Transformation wurde auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) und dem chromogenen Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) durchgeführt. Klone im richtigen Leseraster sind als blaue Kolonien zu erkennen, während Klone ohne Insert weiß bleiben. Die korrekte Insertion wurde über Sequenzierung verifiziert (Anhang: 8.2.3)

3.2 Phagen-Display-Technologie

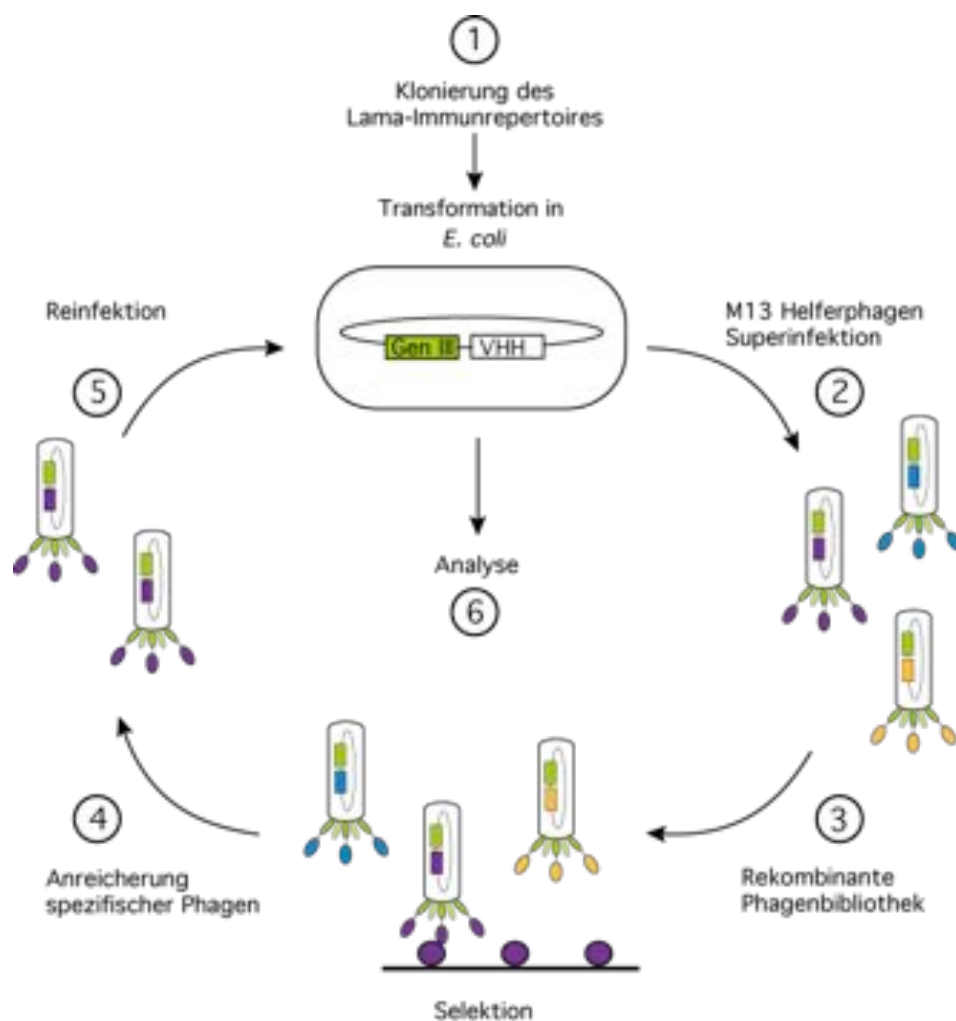


Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung der Phagen Display Technologie. (1) Der pHEN2-Vektor mit dem VHH-Immunrepertoire des Lamas wurde in *E. coli* transformiert (2) Nach Infektion mit M13KO7-Helferphagen wurden die Phagenpartikel verpackt und eine rekombinante Phagenbibliothek generiert. In diesem Schritt wurde der Geno- mit dem Phänotyp gekoppelt (McCafferty, Griffiths et al. 1990) (3) In einem sogenannten Biopanning konnten die "bindenden" Phagen über die auf der Oberfläche exprimierten Antikörperfragmente durch Wechselwirkung mit dem Antigen gerettet werden (4) Die nicht gebundenen Phagen wurden gewaschen und die bindenden Phagen kompetitiv eluiert (5) Durch erneute Infektion von *E. coli* konnten spezifische Phagen angereichert werden (6) Es wurden drei Selektionsrunden durchgeführt und jeweils einzelne Klone wurden analysiert.

3.2.1 Konstruktion der Phagen Display Bibliotheken

Nach der Isolierung der RNA aus den Lymphozyten der immunisierten Lamas wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und mittels spezifischer Oligonukleotide das Immunrepertoire PCR-amplifiziert (Anhang: 8.2.3). Über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* wurden die DNA-Fragmente in den Phagen Display Vektor pHEN2 kloniert (Abb. 3.2.2).

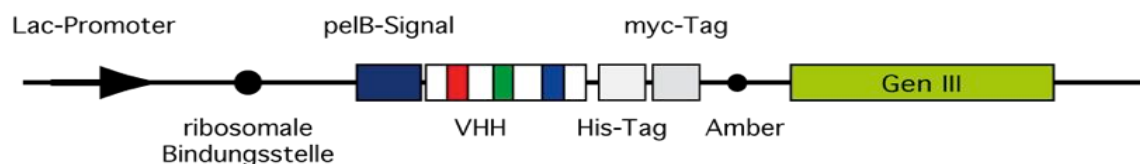


Abb. 3.2.2: Schematische Darstellung des Phagemid Vektors pHEN2. Die VHHs werden mit dem verkürzten Gen des Hüllproteins gIII des Phagen im pHEN2-Vektor in Reihe kloniert. Die Proteine werden durch das Signalpeptid pelB ins Periplasma der Bakterien transportiert und falten sich dort zu einer funktionalen VHH Domäne. Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist eine Sequenz der mRNA bei Prokaryoten, die als Teil der ribosomalen Bindungsstelle (RBS) von den Ribosomen erkannt wird und damit den Startpunkt der Translation markiert. Der Lac-Promoter induziert die Proteinexpression in Anwesenheit von IPTG, einem nicht verstoffwechselbarem Lactose-Analogon. Der His-Tag dient der Affinitätsreinigung und der Myc-Tag kann für ELISAs und Western Blots genutzt werden. Zwischen den Tags und dem Hüllprotein des Phagen befindet sich noch ein Amber-Stoppocodon, das nur von bestimmten *E. coli* Stämmen erkannt wird.

Die Immunbibliotheken wurden in ultrakompetente XL10-GOLD *E. coli*-Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin und Glucose unter sterilen Bedingungen ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Einzelne Klone wurden einer Sequenzanalyse unterzogen, um die Diversität der Bibliothek zu bestätigen. Die Klone wurden dann mit einem Zellschaber von den Agarplatten mit 2xYT-Carb-Gluc-Medium gelöst und zur Vereinzelung im Anschluss für 30 Minuten auf einem Rollbrett inkubiert. Es folgte die Darstellung rekombinanter Phagenpartikel.

3.2.2 Darstellung rekombinanter Phagen

Phagemid-tragende Zellen des *E. coli* Suppressor-Stammes TG1 wurden in 2xYT-Carb-Gluc-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Dieser Wert korreliert mit einer Zellzahl von 4×10^8 Zellen / ml und gilt als Basis für die nachfolgende Infektion. Bei Kulturen höherer Dichte wurde jeweils ein linearer Zusammenhang vorausgesetzt; Kulturen einer OD₆₀₀ > 0,8 wurden grundsätzlich nicht verwendet. Es wurde eine MOI (*multiplicity of infection*) von 10 gewählt. Dies entspricht einem Verhältnis von 10 Phagen pro Bakterienzelle. Nach Zugabe der M13KO7-Helferphagen wurden die Zellen bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und in 2xYT-Carb-Kana-Medium resuspendiert. Die Sekretion der Phagen erfolgte über Nacht für einen Zeitraum von maximal 16 Stunden bei 30 °C und 240 rpm. Im Rahmen der Selektionen wurden üblicherweise Volumina von 10 ml infiziert und in Volumina von 50 ml resuspendiert. Die Kultur wurde durch Zentrifugation (4000 rpm, 30 Minuten, 4 °C) von zellulären Bestandteilen befreit, der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die Phagen daraus nach Zugabe von 1/5 Volumenanteil PEG/NaCl-Lösung für einen Zeitraum von mehr als 2 Stunden auf Eis präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation (3000 rpm, 30 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und das Präzipitat in 750 µl PBS aufgenommen. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) wurde der nun phagenhaltige Überstand von zellulären Restbestandteilen abgetrennt und bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Selektion

3.2.3.1 Festphase

Die Festphasenselektion (Abb. 3.2.3) fand auf der Polystyrol-Oberfläche von ELISA-Näpfen statt. Diese wurden mit 100 ng Antigen in einem Volumen von 100 µl über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die freien Bindungsstellen für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 10% Milchpulver in PBS blockiert, um eine unspezifische Bindung der rekombinanten Phagen zu minimieren. Nach dreifachem Waschen mit PBS wurde ein Aliquot der Phagenbibliothek, die zuvor für einen Zeitraum von 30 Minuten mit 5% Milchpulver in PBS vorinkubiert wurde, zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Näpfe wurden 50 mal mit 0,1% Tween-20/PBS und 50 mal mit PBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte kompetitiv mit 200 ng des Antigens für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde dann bei 4° C gelagert und konnte für die Reinfektion verwendet werden.

3.2.3.2 Zellpanning

Für die Negativselektion beim Zellpanning (Abb. 3.2.3) wurde ein Aliquot der rekombinanten Phagenbibliothek mit 1×10^7 untransfizierten NIH-3T3 Zellen in 2 ml DMEM-Medium für 1 Stunde inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss pelletiert (1600 rpm, 5 Minuten, 4 °C). Phagen, die gegen die Oberflächenproteine der Zellen reaktiv waren, wurden so aus der Bibliothek entfernt. Der Überstand wurde dann zu 1×10^7 mit hCD38-transfizierten NIH-3T3 Zellen gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden dann unter zweimaligem Wechsel des Gefäßes zehnmal mit 2 ml DMEM-Medium gewaschen. Im letzten Schritt wurden die NIH-3T3 Zellen pelletiert und die Zellen mit den gebundenen Phagen für die Reinfektion verwendet.

3.2.3.3 Biotinpanning

Für das Biotinpanning (Abb. 3.2.3) wurde das Antigen mit dem EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) nach Angaben des Herstellers biotiniliert. 2 µg des biotinilierten Antigens wurden mit 50 µl Streptavidin-Agarose für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS, um ungebundenes Antigen zu entfernen, wurde ein Aliquot der rekombinanten Phagenbibliothek zugegeben und für weitere 30 Minuten

inkubiert. Im Anschluss wurde die Matrix zehnmal gewaschen und die Phagen kompetitiv mit 2 µg des Antigens für 1 Stunde bei Raumtemperatur eluiert. Der Überstand wurde für die Reinfektion verwendet.

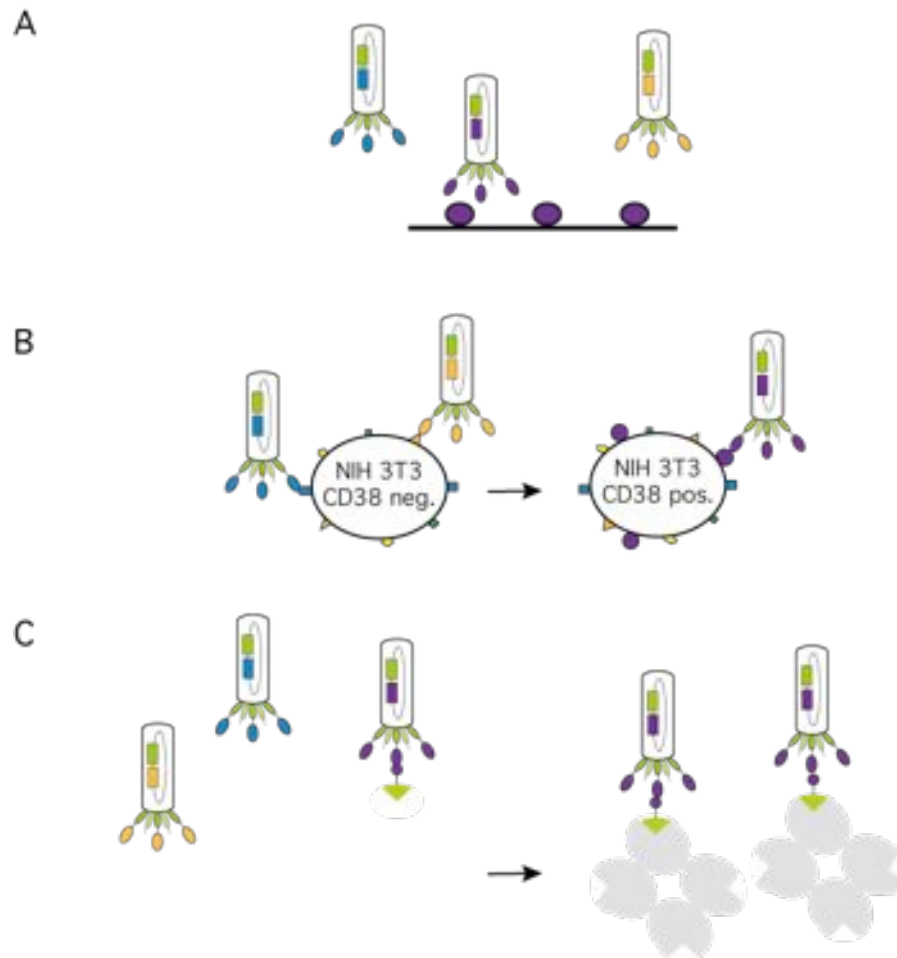


Abb. 3.2.3: Schematische Darstellung der eingesetzten Selektionsmethoden zur Anreicherung spezifischer Phagen. (A) schematische Darstellung des Festphasenpannings (B) schematische Darstellung des Zellpannings auf NIH-3T3 Zellen (C) schematische Darstellung des Biotinpannings.

3.2.4 Reinfektion

Nach der Selektion wurden die rekombinanten Phagen des Eluates erneut in den zellulären Wirtsorganismus *E. coli* eingebracht. Für die Reinfektion wurde der F-Pilus tragende *E. coli* Suppressor Stamm TG1 verwendet. 10 ml der logarithmisch

wachsenden Kultur wurden mit dem Phagen-Eluat infiziert (Wind, Stausbol-Gron et al. 1997). Nach einer Stunde wurden die Zellen pelletiert (4000 rpm, 10 Minuten, 4 °C), auf zwei großen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C im Brutschrank kultiviert.

3.2.5 Amplifikation selektierter Phagen

Die auf den LB-Agarplatten gewachsenen Kolonien repräsentieren die nach den einzelnen Selektionsrunden resultierende Bibliothek. Unter Zugabe von 2xYT-Carb-Medium wurden die Bakterien mit einem Zellschaber von den Agarplatten gelöst und zur Vereinzelung im Anschluss für 30 Minuten auf einem Rollbrett inkubiert. 100 ml 2xYT-Medium wurde mit der Zellsuspension derart inokuliert, dass die OD₆₀₀ unter 0,1 war, um sicher zu stellen, dass die F-Pili ausgebildet werden. Die Zellen wurden dann bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Bei OD₆₀₀ 0,5 wurden 10 ml mit den Helferphagen superinfiziert und bei 37 °C für 1 Stunde bei 240 rpm inkubiert, anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und in 50 ml 2xYT-Carb-Kana-Medium mit zur Sekretion der neuen Generation rekombinanter Phagen resuspendiert. Ein Teil des verbliebenen Rests der abgeschabten Zellen wurde nach Zugabe einer von 30% Glycerol aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Periplasmatische Expression in *E. coli*

Der Phagemid-Vektor pHEN2 wurde für die prokaryotische Expression verwendet. Der Vektor verfügt über eine pelB-Leadersequenz, die das rekombinante Protein in den periplasmatischen Raum der bakteriellen Zellwand dirigiert. In dem nicht reduzierendem Mileau des periplasmatischen Raumes, wurde die Faltung der Proteine, die über interne Disulfidbrücken verfügen, begünstigt.

Für die rekombinante Proteinexpression wurde zunächst eine Vorkultur mit 5 ml 2xYT-Carb-Medium mit einer einzelnen Kolonie bei 37 °C und 240 rpm inokuliert. Beim Erreichen einer hohen optischen Dichte, wurden die Bakterien pelletiert und in 5 ml frischem 2xYT-Carb-Medium resuspendiert. Die Hauptkultur wurde dann mit 1/100 Volumen angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C und

240 rpm kultiviert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde dann Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach drei bis vier Stunden wurden die Bakterien sedimentiert und das Gewicht des Pellets bestimmt. Pro Gramm des bakteriellen Nassgewichts wurden 5 ml eines TS-Lysepuffers zugegeben und die Bakterien darin resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit auf Eis wurden die Lysate hochtourig zentrifugiert (30 Minuten, 20000 rpm, 4 °C). Hierbei werden die Proteine von den sphäroblastierten Bakterien und Teilen der äußeren Membran abgetrennt. Der Überstand, den man als Periplasmalysat (PPL) bezeichnet, wurde steril filtriert (0,22 μ m Porengröße) um bakterielle Kontaminationen zu verhindern.

3.3.2 Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Die immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie wurde zur Aufreinigung der 6xHistidin markierten rekombinanten Proteine verwendet. Die Aufreinigung beruht auf der spezifischen Bindung von Histidin an Nickel-Ionen. Die Ni^{2+} -Ionen sind über einen Chelatkomplex mit NTA (Nitriloessigsäure) an eine Agarosematrix gebunden. Nach Äquilibrierung mit PBS wurde das Periplasmalysat auf die Säule gegeben. Unspezifisch bindende Proteine wurden zunächst durch das Waschen mit 20 ml PBS entfernt und dann mit einem 15 ml Imidazol-Waschpuffer (4 mM). Die Elution der His-markierten Proteine erfolgte mit einem Imidazol-Elutionpuffer (100 mM) in vier Fraktionen mit je 1 ml. Die Proteine wurden nach Dialyse gegen PBS bei 4 °C gelagert.

3.3.3 M2-Agarose Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der VHH-mFc-Fusionsproteine erfolgte über den FLAG-Tag. Der monoklonale M2-Antikörper, der sich gegen das FLAG-Epitop, eine acht Aminosäuren lange Peptidsequenz (DYKDDDDK) richtet, ist im M2-Affinity Gel an Agarose-Partikel immobilisiert. Äquilibrierungs-, Elutions- und Neutralisierungspuffer wurden gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt. Es wurden 5 ml Elutionspuffer auf die Säule geladen und fünf Fraktionen je 1 ml aufgefangen. In den Gefäßen wurde 75 μ l Neutralisationspuffer vorgelegt und die Proteine wurden nach Dialyse gegen PBS bei 4 °C gelagert.

3.3.4 Dialyse mittels Slide-A-Lyzer-Dialyse-Kassetten

Die verwendeten Slide-A-Lyzer (Pierce) für die Dialyse von VHHs hatten einen *molecular weight cut off* (MWCO) von 3500 Da und wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Dialyse wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Rührblock gegen 1 l PBS durchgeführt

3.3.5 Quantifizierung von Protein

Mit dem BCA-Protein Assay Reagent von Pierce wurden die Proteinkonzentrationen kalorimetrisch im Vergleich zu einer parallel angesetzten BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration am Spektrophotometer gemäß den Herstellerangaben quantifiziert.

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde zur Analyse von Proteinen verwendet. Es wurden *pre-cast* Gele des Novex-Systems von Invitrogen mit 10-12% Bis-Tris und 4-20% Tris-Glycin Anteil verwendet. Für die reduzierende SDS-PAGE wurden die Proteine mit dem LDS-Probenpuffer (4x) und dem *reducing agent* (10x) (Invitrogen) versetzt und 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Gele wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit MES-Puffer bei einer Spannung von 200 V für 45 Minuten der Elektrophorese unterzogen.

3.3.7 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Zur Färbung von Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen wurde nach abgeschlossener elektrophoretischer Auftrennung das Gel für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur mit der Coomassie-Blau Färbelösung aus dem *Colloidal Blue Staining Kit* (Invitrogen) angefärbt. Mit Hilfe eines Aktivkohlepads wurde nach Abkippen der Färbelösung das Gel bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt. Für die Konservierung des Gels wurde es etwa 5 Minuten in Gel-Dry® Drying Solution (Invitrogen) geschwenkt und anschließend zwischen zwei Blätter Cellophanfolie in einen Rahmen eingespannt und getrocknet.

3.3.8 Fluorochromkonjugation an Antikörper

Die Konjugation von Alexa-647 und Alexa-680 an Antikörper bzw. Antikörperfragmente wurde mit dem Alexa Fluor-647 Protein Labeling Kit bzw. Alexa Fluor-680 Protein Labeling Kit von Molecular Probes nach Herstellerangaben durchgeführt. Die erfolgreiche Kopplung wurde durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.9 Microscale-Thermophorese

Die Methode (Wienken, Baaske et al. 2010; Jerabek-Willemsen, Wienken et al. 2011) basiert auf dem Prinzip der Thermophorese, also der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten. Dieser wird durch einen Infrarot-Laser erzeugt und die Bewegung der Moleküle innerhalb des Gradienten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt und gemessen. Kommt es zu einer Interaktion der Moleküle in Lösung, verändert sich deren thermophoretische Bewegung. Für die Messungen wurden serielle Verdünnungen der monomeren, ungelabelten VHHs mit einer konstanten Konzentration des Alexa647-konjugierten CD38 (12,5 nM) in MST-Puffer für 10 Minuten inkubiert. Die Ansätze wurden im NanoTemper Monolith NT.115 analysiert. Die VHH Konzentrationen wurden gegen die prozentuale Veränderung der normalisierten Fluoreszenz aufgetragen und die Bindungsaffinitäten mit der GraphPad prism Software berechnet.

3.3.10 Untersuchung zur Hemmung der Autokatalytischen Proteolyse von Toxin A durch VHHs

Toxin A entfaltet seine toxische Wirkung nach Abspaltung der enzymatisch aktiven Fragments durch die Cysteinproteasedomäne. Um eine Hemmung der autokatalytischen Proteolyse von Toxin A durch die VHHs zu untersuchen wurde 1 µg ToxA 1-809 mit unterschiedlichen Konzentrationen der VHHs (1,25 µg - 80 ng) in 100 mM Tris-HCl für 1 h bei RT inkubiert. Die autokatalytische Spaltung wurde durch die Zugabe des allosterisch wirksamen Inositol-Hexakisphosphat (InsP6) eingeleitet und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-PAGE Probenpuffer und Erhitzen für 10 min bei 75 °C beendet. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels SDS-PAGE.

3.3.11 Untersuchung zur VHH vermittelten Hemmung der Rac1-Glukosylierung durch Toxin B

ToxB1-546 wurde mit 4,5 µg der ToxB-spezifischen VHHs in PBS für 20 min bei RT vorinkubiert. Rekombinantes Rac1 (600 ng) und UDP-Glucose (10 µM) wurden zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Auftrennung der Reaktionsprodukte über SDS-PAGE, wurden Western Blots mit zwei Antikörpern durchgeführt. Der Antikörper Rac1-23A8 erkennt Rac1 in der nativen und glucosylierten Form, während der Antikörper Rac1/102 nur das unglucosylierte Rac1 erkennen kann.

3.3.12 Elektrophoretischer Proteintransfer (*Western Blot*)

Durch elektrophoretischen Transfer lassen sich Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf einer polymeren proteinbindenden Membran immobilisieren. Die PVDF-Membranen wurden vor dem Blot für 15 Sekunden in Methanol aktiviert. Die Blotapparatur wurde den Herstellerangaben entsprechend aufgebaut. Es wurde 90 Minuten lang auf die proteinbindende Membran geblottet. Der Blot erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA bei einer Spannung von ca. 30 V. Nach dem Western Blot wurde die PVDF-Membran mit 5% Milchpulver in TBS blockiert, um ein unspezifisches Binden des Antikörpers, der für den spezifischen Nachweis genutzt werden sollte, zu verhindern. Nach mehrmaligen Waschen mit Waschpuffer folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper. Für die Immunodetektion wurde das ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Reagenz von Amersham Biosciences nach Herstellerangaben eingesetzt.

3.3.13 Dünnschichtchromatographie

3 ng rekombinantes CD38 wurden mit 100 ng der VHHs für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach Zugabe des Substrats und ³²P-NAD folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl StrataClean-Resin gestoppt. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 1 Minute, RT) wurde 1 µl des Überstandes auf eine DC-Plastikfolie (PEI-Cellulose F, Merck) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte als erstes für 3 Minuten in 1 M Essigsäure und als zweites für 9 Minuten in 1 M Essigsäure/0,3 M Lithiumchlorid. Die

Reaktionsprodukte ^{32}P -ADP-Ribose und ^{32}P -NAD konnten aufgrund der unterschiedlichen Adsorption aufgetrennt werden. Nach dem Lauf wurde die DC-Platte im Luftstrom getrocknet, eingeschweißt und einer Autoradiographie unterzogen. Die Belichtungsdauer betrug 1-4 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.14 ^{32}P -ADP-Ribosylierungsassay

ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) übertragen die ADP-Ribosegruppe von NAD auf eine Aminosäure des Zielproteins. Wurde das Antigen in Gegenwart von Nicotinamid-Adenin-[Adenylat- ^{32}P]-dinukleotid-(^{32}P -NAD) ribosyliert, so wurde die radioaktive Markierung mit der ADP-Ribosegruppe übertragen. Um festzustellen, ob die VHHs die enzymatische Aktivität der ARTs inhibieren können, wurde das Antigen mit den VHHs für 20 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Es folgte die Zugabe des Substrats (HEK-Zelllysate) und des ^{32}P -NADs für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe des SDS-Ladepuffers gestoppt und die Reaktionsansätze anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Hemmung der enzymatischen Aktivität konnte durch eine Autoradiographie (Amersham Hyperscreen, GE Healthcare) sichtbar gemacht werden. Die Belichtungsdauer betrug 1-4 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank (Sicherheitswerkbank Typ BSB 4, Gelaire Flow Laboratories, Singapur) durchgeführt.

3.4.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS in 10 cm Zellkulturschalen, adhärenzte Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% in Zellkulturflaschen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden im Abstand von zwei bis drei Tagen unter der Laminarströmungsbank im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 geteilt.

3.4.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl in Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, LaborOptik) durchgeführt.

3.4.3 Transfektion und transiente Expression in HEK-T Zellen

Der Expressionsvektor pME wurde durch das Transfektionsreagenz jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich) in die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK-T) eingebracht. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 5 Tage bei 37 °C kultiviert. Die VHH-mFc-Fusionsproteine konnten im Anschluss über den Flag-Tag mit M2-Agarose aus dem Überstand (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) aufgereinigt werden.

3.4.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Kryoröhrchen wurden mit 1 ml Einfriermedium und 1×10^6 Zellen zunächst für 24 h bei -80 °C eingefroren, bevor diese für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.4.5 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurde eine konfluente T75-Flasche dies entspricht etwa 1×10^7 Zellen zunächst trypsiniert (Trypsin 0,05%/EDTA 0,02% in PBS, Biochrom KG, Berlin) und mit 1% TX-100/1 mM AEBSF in PBS +/- für 20 Minuten auf Eis lysiert. Die Kerne wurden bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und so aus dem Lysat entfernt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Lysat bei 4 °C gelagert.

3.4.6 Zytotoxizitätsexperimente

Subkonfluent gewachsene Zellen (MDCK-II, Vero) wurden in μ -Slides passagiert. Nach einem Tag hatten sich die Zellen adhärirt und wurden mit den Toxinen in An- oder Abwesenheit der VHHs in DMEM-Medium bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Morphologie der Zellen wurde mit Hilfe des Axiovert 200M von Zeiss analysiert. Die

Konzentrationen und die Dauer der Intoxikation variierten in den einzelnen Versuchen und werden detailliert im Ergebnisteil angegeben.

3.4.7 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Die Zellen wurden in μ -Slides (Ibidi) passagiert. Nach Behandlung der Zellen mit den Toxinen in An- bzw. Abwesenheit der VHHs und PBS als Kontrolle wurden die Zellen für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen mit der Blocklösung (10% FCS /0,2% BSA, 0,3% Triton in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:4000 in Carrier-Lösung (1% Serum, 0,2% BSA, 0,3% Triton in PBS) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. Es folgte die mikroskopische Analyse der Zellen am Fluoreszenzmikroskop.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen wurden am Axiovert 200M von Zeiss durchgeführt. Die Objektive Plan-Apochromat 10x/0,25 und Plan-Apochromat 20x/0,8 wurden verwendet. Die Quecksilberdampfampe HBO103 wurde als Lichtquelle eingesetzt. Als Kamera wurde die CCD-Kamera AxioCam MRm verwendet. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte mit der Software Axiovision (Zeiss, Jena).

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie wird zur quantitativen Bestimmung der Expression von Oberflächenproteinen auf Zellen eingesetzt. Fluorochrom-konjugierte Antikörper oder Moleküle dienen der Anfärbung von Antigenen auf der Zelloberfläche. Pro Färbung wurden 1×10^6 Zellen und 1 μ g eines fluorochrom-konjugierten Antikörpers eingesetzt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden

die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und konnten durchflusszytometrisch analysiert werden. Bei einem unkonjugierten Primärantikörper erfolgte eine weitere Antikörperinkubation mit einem Fluorochromkonjugierten Zweitantikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte am FACS Calibur bzw. FACS Canto (BD Biosciences, Heidelberg) Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software FlowJo (Treestar, Stanford, US) durchgeführt.

3.6.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Das Zielantigen wurde über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur für 1 h in 100 µl 0,1 M NaHCO₃, pH 8,8 in den Vertiefungen einer ELISA-Platte inkubiert. Anschließend wurden die Näpfe für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 10% Milchpulver in PBS blockiert. Die Näpfe wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation der Primärantikörper wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 100 µl durchgeführt. Die Platten wurden nachfolgend mit 0,05% TWEEN-20/PBS dreimal gewaschen. War der Primärantikörper mit der alkalischen Phosphatase oder der Meerrettichperoxidase gekoppelt erfolgte die Detektion direkt. War dies nicht der Fall wurde mit einem AP oder HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen 0,05% TWEEN-20 in PBS wurde die Farbentwicklung mit 100 µl TMB-Substrat eingeleitet und die Reaktion mit 50 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Extinktion wurde bei 450 nm im ELISA-Reader (Victor³, Perkin-Elmer Waltham USA) gemessen.

4 Ergebnisse

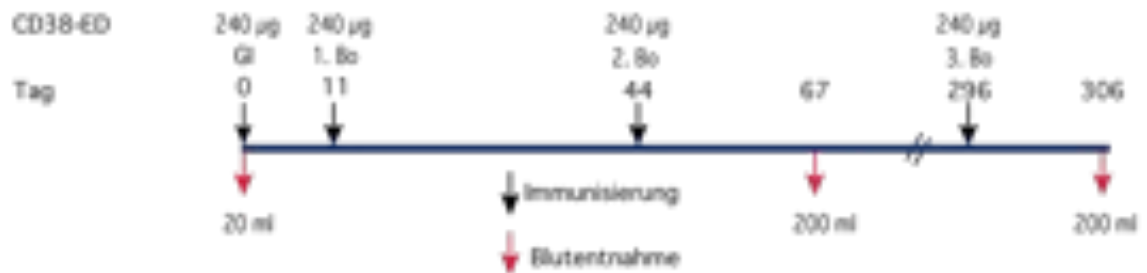
In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Generierung und Charakterisierung von spezifischen VHHs aus Phagen-Display-Bibliotheken gegen die Zielantigene CD38 und die drei Enzym-Toxine A, B und CDT von *Clostridium difficile* dargestellt. Es folgt eine Übersicht über die reformatierten auf monovalenten VHHs-basierenden Konstrukten für den optimierten Einsatz in therapeutischen und diagnostischen Anwendungen.

4.1 Selektion und Charakterisierung CD38-spezifischer VHHs aus Phagen-Display-Bibliotheken immunisierter Lamas

4.1.1 Zwei mit rekombinantem CD38 immunisierte Lamas zeigen spezifische Antikörper-Titer

Für die Induktion von anti-CD38 Schwereketten-Antikörpern wurden zwei Lamas, 10 und 25, mit rekombinant hergestellten humanen CD38 aus Insektenzellen (Hon-Cheung Lee, Minnesota, USA) immunisiert (Abb. 4.1.1). Für die Grundimmunisierung und die nachfolgenden Boosts wurden jeweils 240 µg des rekombinanten Proteins in 400 µl PBS verwendet und zu 500 µl Specol Adjuvans gegeben. Die Lösung wurde bei 4 °C dreimal kurz mit Ultraschall behandelt. Die Injektionen erfolgten *sub cutan* in den Hals der Lamas. 23 Tage nach dem zweiten Boost und zehn Tage nach dem dritten Boost wurde den beiden Lamas 200 ml Blut für die Bibliothekserstellung abgenommen. Zwischen dem zweiten und dritten Boost lagen 252 Tag

Lama 10 und Lama 25



Grundimmunisierung	1. Boost	2. Boost	3. Boost	Blut > I	Blut >II
11.06.07	22.06.07	25.07.07	1-4.04.08	17.08.07	10-14.04.08

Abb. 4.1.1: Schema der Immunisierung und Blutentnahmen von zwei mit humanem CD38 immunisierten Lamas (10 und 25). Phage-Display-Bibliotheken wurden aus Blut-Leukozyten nach dem zweiten und dem dritten Boost hergestellt, gekennzeichnet mit I bzw. II.

Um die CD38-spezifische Immunantwort zu überprüfen, wurden die Immunglobulin-Subklassen aus den Seren der Lamas 10 und 25 über Protein-G- und Protein-A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zunächst wurde das Immuneserum auf die Protein-G Säule gegeben. Bei einem pH-Wert von 3,5 wurden die Schwereketten-Antikörper des IgG2c-Subtyps und bei einem pH-Wert von 2,7 wurden die konventionellen Antikörper von der Säule eluiert (Abb. 4.1.2 A). Der Durchfluss der Protein-G Säule wurde dann auf die Protein-A Säule aufgetragen und bei pH 4,5 und pH 2,7 wurden Schwereketten-Antikörper des IgG2b-Subtyps eluiert (Abb. 4.1.2 A). Die Reaktivität der Immunsereen und der aufgereinigten IgG-Subklassen gegen rekombinantes humanes CD38 wurde anschließend in einem ELISA getestet (Abb. 4.1.2 B, C). Im Vergleich zu dem hier eingesetzten Kontrollantigen (EDIN, ein Enzym-Toxin aus *Staphylococcus aureus*) zeigten beide Immunsereen sowie die aufgereinigten IgG-Subklassen spezifische Reaktivitäten für CD38. Die erfolgreiche Induktion der humoralen Immunantwort unter Beteiligung der Schwereketten-Antikörper in Lama 10 und Lama 25 konnte somit bestätigt werden.

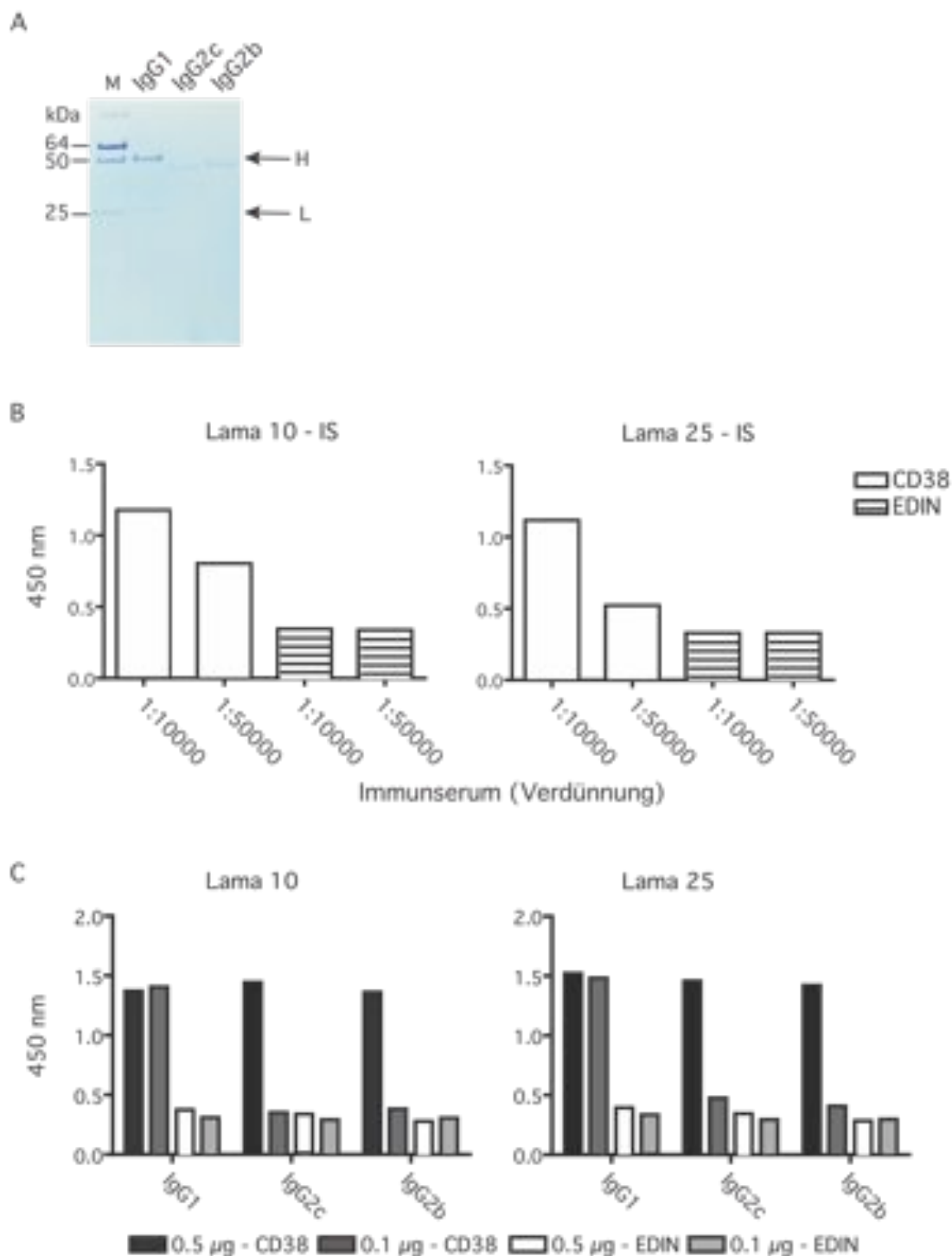


Abb. 4.1.2: Die Spezifität der Immunseren und der aufgereinigten Ig-Subklassen für CD38 konnte mittels ELISA bestätigt werden. (A) SDS-PAGE der affinitätsgereinigten IgG-Subklassen aus dem mit CD38 immunisierten Lama 10. Spur 1: IgG1 500 ng (konventionelle Antikörper), Spur 2: IgG2c 250 ng (*short hinge* Schwereketten-Antikörper), Spur 3: IgG2b 250 ng (*long hinge* Schwereketten-Antikörper). IgG2c und IgG2b sind Homo-Dimere bestehend aus zwei schweren

Ketten, die unter reduzierenden Bedingungen eine Größe von etwa 45 kDa aufweisen. Die konventionellen Antikörper weisen eine schwere Kette bei 50 kDa und eine leichte Kette bei 25 kDa auf. H = *heavy chain*. L = *light chain*. M = Molekulargewichtsmarker. (B, C) ELISA-Analyse der Reaktivitäten der Lama-Immunsereen und der aufgereinigten Lama-Antikörper gegen CD38. Über Nacht wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte bei 4 °C (B) mit 100 ng CD38 und einem Kontrollprotein (EDIN) (C) bzw. mit 100 und 500 ng CD38 und einem Kontrollprotein (EDIN) beschichtet. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen für 2 h bei RT mit 5% Milchpulver in PBS blockiert. Die Immunsereen wurden in einer 1:10000 und 1:50000 Verdünnung eingesetzt und die aufgereinigten IgG-Subklassen wurden mit 500 ng/Napf verwendet und für 1 h bei RT inkubiert. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein polyklonales Kaninchen anti-Lama-IgG Serum (1:1000) eingesetzt. Als Tertiärantikörper wurde ein Ziegen anti-Kaninchen-IgG-PO Konjugat (1:10000) verwendet. Die Farbentwicklung mit TMB wurde bei 450 nm am ELISA-reader vermessen.

4.1.2 DNA-Sequenzierungen bestätigen ein breites VHH-Repertoire in den klonierten Phagen-Display-Bibliotheken

Zur Klonierung des VHH-Repertoires der immunisierten Lamas in Phagen-Display-Bibliotheken, wurden periphere Blut-Lymphozyten 23 bzw. zehn Tage nach dem zweiten und dritten Boost isoliert. Die aus diesen Zellen gewonnene RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus dieser wurden die VHH kodierenden Regionen der Schwereketten-Antikörper PCR-amplifiziert. Dabei wurden partiell degenerierte Vorwärtsoligonukleotide eingesetzt, die auf die kodierende Region für den N-Terminus der bekannten VHH-Sequenzen passen (SHF, LHF), sowie nicht-degenerierte Rückwärtsoligonukleotide, die auf die bekannten Sequenzen (Achour, Cavelier et al. 2008) der langen und kurzen *hinge*-Exone für die Schwereketten Isotypen IgG2b (LHR) und IgG2c (SHR) passen (Anhang: 8.2.3). Die VHH-Fragmente wurden nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *SfiI* und *NotI* in den Phagemid-Vektor pHEN2 kloniert.

DNA-Sequenz-Analysen mit den pHEN2 spezifischen Sequenzier-Oligonukleotiden LMB3 und Fdseq1 (Anhang: 8.2.2) aus jeweils 12 zufällig gewählten Klonen aus den *short hinge* und *long hinge* Bibliotheken von Lama 10 (Abb. 4.1.3, Sequenzen von Lama 25: Abb. 8.5) bestätigten die erfolgreiche Klonierung eines breiten VHH-Repertoires. Die VHHs wiesen CDR3-Längen zwischen sieben und 30 Aminosäuren, sowie die charakteristischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen (V37F, G44E, L45R/L45C und W47G) in der FR2 auf (Kabat and Wu 1991). Alle Klone verfügten über das

kanonische Cysteinpaar in FR1 und der FR3. Etwa 40% der zufällig ausgewählten ausgewählten Primärklone von Lama 10 tragen ein zusätzliches Cysteinpaar in der CDR2 und der CDR3, während dieser Anteil bei Lama 25 bei etwa 20% lag. Zwei der sequenzierten Klone aus Lama 25 zeigten eine Leserasterverschiebung, die durch inkorrekte Anlagerung der Oligonukleotide bedingt sein könnten.

Lama 10 I (CD38)

```

L-7 CAASGFTFSRYWYWRnnKGLEWVSFMTGGSETYYnnCSRDKQGISY-----RGQ
L+9 CAASGFTFDDYAIGWFRnnKEREGVSCIFSSDGRYYnnCAGPCFGGLYDY-----WGQ
S-10 CAASGSIFSINAMGWFRnnNEREWVAHITDSGLTNYAnnCNARHTRWRRTSY-----WGQ
S-10 CAASGSIFSINAMGWFRnnQRELVTITQGGSTDYAnnCTADTPGSDRWTY-----WGQ
S-10 CAASGSTFRLNAMGWFRnnQRELVARITSAIAPGTGnnCNAVRGXTIAAYD-----WGQ
S-11 CAASGFTFSSYAMSWFRnnKGLEWVSTINSGGLSIGYYnnCARGGLGDXIGMDX-----WGK
S-14 CAASGFTFGTYDMSWFRnnKGPEWVSGILSGGSTYYnnCGTGMPAWDGSXSMDMT-----WGX
S-14 CAASGVTFAINRMGWFRnnQRELVAITITSNGLTRYAnnCFAQDYXXDXXVGRYAY-----WGX
S-14 CAASGFTFSSYAMTWFRnnKGLEWVARINASGGNTTYnnCAKYPRSTYYADSYFDS-----RGX
L+15 CAASGFTFDDYNIGWFRnnKAREGVSCISNSDGRTDYnnCAATPIRWRLCFHHSFDS-----WGQ
L-15 CAASGSIFSINAMGWFRnnKQRLVAAVTSGGSTNYnnCNAETEIEITVLADYEYDY-----WGQ
L+15 CAASGFTFDDYNIGWFRnnKAREGVSCIKNDGSDTDYnnCAATPIRWRLCFHHSFDS-----WGQ
L-16 CAASGSIYSIDAMAWFRnnQRELAASITNGGSTNYAnnCNAEVSHSDYEGDMEEYDY-----WGQ
L-16 RAASGSIFGLNAXGWFRnnQREFVADITRXGSTNYAnnCNAEVTHSDYEGDTEEYDY-----WGQ
S+17 CAASGFTFDDYTIGWFRnnKEREVSCFSDSDSPYYnnCAALERDSGPHCSDPLGMDX-----WGK
L+18 CAASGFTSLDDYNIGWFRnnKLREIMACARGPDGSSYYnnCHAHTEDSRGAYGVTLGYLEV-----WGQ
S-19 CAASGFTFSSDWMYWRnnKGLELVAVINPAGDNPNYnnCASSPYGPLVVAGNLLDEFDX-----YGX
L+20 CAASRWTLRYAYAWFRnnKEREGVSCISTRDGSAYYnnCATDPLHWTYGSDCPRAAVDYNA-----WGQ
S+30 CAASGFTFDDHAIGWFRnnKEREGVSCISSGDGSTYYnnCVADLVCA TVGSSWVEPFQFFREAPGDPRLYLEVWGX

```

Lama 10 II (CD38)

```

S-3 CAVSGFTFGSYDMSWFRnnKGPEWVSAINSGGSTDYnnCRTDPF-----WGQ
L-8 CAASGFTFGSYDMSWFRnnKGPEWVSSIDGGDSSTHYnnCATGTGGSSDY-----WGQ 2
L-10 CAASGSGFSSRPMAWFRnnQRELVAITITSGGRSNNYnnCKADRLIEGRDY-----WGQ
L-11 CAASGRFTFSMFAIGWFRnnKEREVGRIFWSSGVASYYnnCAASVPGNSGEYDY-----WGQ
S+13 CAASGFTFDDYAFGWXnnKEREVXSCISSRATSYYYnnCVADVGCCTTAADLYDY-----SGQ
L-13 CAASERTFSSYVMGWFRnnKEREVVARITWRYGSSWGnnCAAQVHWHETEDEYDY-----WGQ
S-14 CAASERIFSSYAMGWFRnnKEREVFAAISWRGDSSTYSnnCAASLFDGNTDYSRYDW-----WGQ
S+14 CAASGLTFDDYAMSWFRnnKEREIVSCFSRSDRTLTYnnCAAHAVFCTLASGEYDY-----WGQ
L-16 CELSGSIFEDYAIGWFRnnKEREVGVSCISGTSSTYYnnCAATQDVLLRVWILGEYDY-----WGQ
S-17 CAASXSIFSMTMSWFRnnKXRELVAAITSGGNTNYAnnCNADTVYYYSDSRAQYAYDV-----WGQ
L-17 CAPSTPTFANYARAWFRnnKEREVFAAISWRGGSWSVnnCAAVVHWYDDYDLNNGPYDY-----WGQ
L-17 CAPSERTFSAAMGWFRnnKEREVFAAISWTGGTWSSnnCAAKVHYSDYHYDHTQGYDH-----WGQ
L+17 CAASGISFDDSAIGWFRnnKEREVGVSCITPSDGSTSYnnCAADYHFCGSSSLGIFGMDF-----WGK
S+18 CAASGFTFDDYAIGWFRnnKEREVGVSCISSSDGSTYYnnCAAVVGPFCKNTYCTDYEHDY-----WGQ
S+18 CAASGFTFDDYGVGWFRnnKEREVGVSCISSSDNSTYYnnCAAHPLPVSWCSAYDWEYDY-----WGQ
S+18 CAASGFTFDDYVIGWFRnnKEREVGVSCITTSDGRTYYnnCATGPLXDIANCEEVEYGMXX-----WGX
S+19 CTASGFTFDDYAIGWFRnnKEREAVSCISGTDGRTYYnnCAALWGTSYRCDISIIEYDN-----WGQ
L-21 CAASERTFSSYAMGWFRnnKAREFVAIVWKGFSSWnnCAAQVHWHETENDHWHETEDQYDY-----WGQ
L+22 CATSGLSFDDYAIGWFRnnKEREIGCTSKSDGNTYYnnCAAESVWLGGHPICQPDHAHTYDY-----WGQ
S+23 CVASGFAFDYTYIGWFRnnKEREVGVSCISSSDGRYYnnCATDVLDYLETMNFKDDTCDPEYRY-----WGQ
S+28 CATSGFNFDYAIAWFRnnKEREVGVSCIGGRDGVSYnnCAVSLVGVLRGSRALRDKDGLPLVCSISLGMEY--WGK

```

Abb. 4.1.3: Aminosäuresequenz-Vergleich in verkürzter Darstellung von zufällig gewählten Klonen aus den VHH-Bibliotheken des mit CD38 immunisierten Lamas 10 (Sequenzen für Lama 25: 8.5). I steht für die nach dem zweiten Boost generierte Bibliothek und II für die nach dem dritten Boost generierte Bibliothek. Die drei CDR-Regionen (CDR1: rot, CDR2: grün und CDR3: blau) sowie die für VHHs typischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen in der FR2 sind farbig

(magenta) hervorgehoben. Gelb hinterlegt sind das kanonische sowie ein zuweilen zusätzlich auftretendes Cysteinpaar (CDR2, CDR3). Die Namensgebung der Sequenzen reflektiert das Vorkommen einer *short hinge* bzw. *long hinge* (S/L), das Vorkommen eines extra Cysteinpaares (-/+) gefolgt von der Anzahl der Aminosäuren in der CDR3.

Tabelle 4.1.1 zeigt eine Übersicht der sieben aus Lamas 10 und 25 generierten Phagen-Display-Bibliotheken. Es konnten Bibliotheken aus insgesamt $1,5 \times 10^5$ (Lama 25) und $2,9 \times 10^5$ (Lama 10) Klonen generiert werden (Tab. 4.1.1).

Tab. 4.1.1: Übersicht über die generierten *short hinge* (S) und *long hinge* (L) Primärbibliotheken aus den mit CD38 immunisierten Lamas (10 und 25). Es wurden jeweils 12 zufällig gewählte Klone sequenziert. #Seq gibt die Anzahl der sequenzierten Klone an, ORF (*open reading frame*) gibt an wie viele der Klone ein korrektes Leseraster aufwiesen, CDR3 gibt die Anzahl der Aminosäuren in derselbigen an. D: Duplikate steht für Klone die mehr als einmal gefunden wurden. aCD38 gibt an wie viele der in der Primärbibliothek gefundenen Klone in den selektierten Familien wiedergefunden werden konnten.

Lama	hinge	Boost	Klone	#Seq	ORF	CDR3	D	aCD38	
10	S	2	$6,7 \times 10^4$	12	10	10-30	0	0	2x nicht lesbar
10	S	3	$1,2 \times 10^5$	12	11	3-28	0	0	1x nicht lesbar
10	L	2	$3,3 \times 10^4$	12	9	7-20	0	0	3x nicht lesbar
10	L	3	$6,9 \times 10^4$	12	10	8-22	D:1x2	0	1x nicht lesbar
Summe			$2,9 \times 10^5$			3-30	D:1x2	0	
25	S	2	-	-	-	-	-	-	
25	S	3	5×10^4	12	10	6-22	0	0	2x Stopcodons
25	L	2	$3,9 \times 10^4$	12	9	4-19	0	0	2x nicht lesbar,
25	L	3	$5,9 \times 10^4$	12	10	7-19	D:2x2	0	1x verkürzt
Summe			$1,5 \times 10^5$			4-22	D:2x2	0	2x nicht lesbar

4.1.3 DNA-Sequenzierungen zeigen die Anreicherung von 15 VHH-Familien durch Panning an CD38-transfizierten Zellen und rekombinantem CD38

Für die Selektion wurden die Bibliotheken in ein Phagenformat überführt und an Festphasen-immobilisiertem rekombinantem CD38 sowie auf der Oberfläche von

CD38-transfizierten NIH-3T3 Zellen selektiert. Für das Festphasenpanning wurde eine Vertiefung einer Mikrotiter-Platte mit rekombinantem CD38 beschichtet und die freien Bindungsstellen mit Milchpulver blockiert. Um die Bindung an Milchpulver-Bestandteile zu minimieren, wurde die Phagenbibliothek vor der Zugabe in die Mikrotiter-Platte für eine Stunde in 5% Milchpulver in PBS vorinkubiert. Für das Panning auf der Zelloberfläche wurden die Bibliotheken zunächst auf untransfizierten murinen NIH-3T3 Zellen einer Negativselektion unterzogen. VHHs, die an andere Oberflächenproteine binden, sollten so aus der Bibliothek entfernt werden, um den unspezifischen Hintergrund zu minimieren. Danach wurden zwei bis drei Selektionsrunden an CD38-transfizierten NIH-3T3 Zellen durchgeführt. Nach jeder Runde wurden 12 Klone sequenziert, um eine Anreicherung spezifischer Klone nachzuweisen.

Klone, die häufiger als einmal, oder von denen mehrere Klone mit wenigen Aminosäuresubstitutionen in den CDR-Regionen gefunden werden konnten, wurden als Familie definiert und sind in Tab. 4.1.2 gelistet (Lama 25: Abb. 8.6). Es konnten neun Familien aus Lama 10 und sechs VHH Familien aus Lama 25 an CD38 selektioniert werden.

Tab. 4.1.2: Übersicht über die selektionierten VHH-Familien gegen CD38. 2. Bo und 3. Bo stehen für die Bibliotheken, die nach dem zweiten bzw. dritten Boost hergestellt wurden. FP steht für Festphasenpanning, ZP für Zellpanning. Die Zahlen stehen für die Häufigkeit, mit der die Klone nach den einzelnen Selektionsrunden (Ru) gefunden wurden. CDR3 zeigt die Abfolge der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code in derselbigen. Zusätzliche Cysteine in der CDR3 sind in rot hervorgehoben. nd steht für nicht durchgeführte Selektionsrunden bzw. Sequenzierungen. Für VHHs, die in blau dargestellt wurden, konnte die Bindung im FACS und über MST-Messungen bestätigt werden. Getestet wurde jeweils der am häufigsten gefundene Klon einer Familie.

Lama 10 CD38

Name	Seq #	2.Bo	3. Bo	ZP			FP			CDR3
				1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
L-9.2	272	x		-	-	-	-	2	3	ANSWGGLNA
L+13	1055	x		1	-	-	-	-	-	DPWGVCTDLRPNY
S-14a	738	x		-	1	2	-	-	10	DRFVVAAGTHDLDY
S-14b	728	x		-	5	-	-	-	2	DRFAVATGTHDLDY
S-14c	737	x		-	-	1	-	-	4	DRFAVASGTHDLDY
S-14d	43	x		-	-	-	-	-	3	DRFVVAVGTHDLDY
S-14e	727	x		-	1	-	-	-	-	DRFAVAIGTHDLDY
S-15a	1884		x	3	1	1	2	-	1	DPLVITSLTISDPSY
S-15b	1891		x	1	-	-	-	-	-	DSLITAATISDPSY
L-15.3	1053	x		5	4	-	-	-	-	GRGIVAGRIPAHEYAD
L+/-15	415		x	1	6	-	-	-	1	TTSVVVLLAPNWEY
L-16a	987		x	1	-	-	-	-	-	EVTHTDYEGDTEEDY
L-16b	1260	x		1	-	-	-	-	-	EVTHSDYEGDSEDDDY
S-24a	54	x		-	1	-	-	-	-	DVTLPNFTGWDTRSGPMYREYDY
S-24b	1103	x		-	1	-	-	-	-	DVTLPNFTGWTRSGPMYREYDY
S-24c	1105	x		-	1	-	-	-	-	DVTLPNFTGWDTRSGPMYREYDY
S-24d	725	x		-	1	-	-	-	-	DVTLPNFTGWNTRSGPMYREYDY
S+24	650	x		2	-	-	-	-	-	SYRSPETDYCLGSGCFFWEDYDY
einzel				26	10	2	nd	9	3	
unlesb				47	15	8	nd	2	28	

Lama 25 CD38

Name	Seq #	2.Bo	3. Bo	ZP			FP			CDR3
				1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
S-7a	1910		x	1	-	-	-	-	-	RRLFNVEY
S-7b	1915		x	1	-	-	-	-	-	RVLFRRY
L-9.1a	370		x	1	1	-	-	-	4	ASTAVGADT
L-9.1b	375		x	2	-	-	-	-	2	ASPAVGADT
L-15.1a	397	x		1	-	-	-	2	3	DRWGLFSLIATPTH
L-15.1b	1068	x		1	-	-	-	1	-	DRLVLVALSIADPGF
L-15.2a	274	x		3	-	-	-	10	14	GFPVLVALSIADPDY
L-15.2b	413		x	-	-	-	-	-	1	GFPVLTALHIADPDY
L-19.1a	523		x	2	7	-	-	-	-	QYQDRYYDEFTWKEKMDY
L-19.1b	1065	x		1		-	-	-	-	QYQERYYSDFSLKEKMEY
L-19.2a	1067	x		3		-	-	-	-	RYQPRYYDSGDMGGEYEF
L-19.2b	551		x		1	-	-	-	-	RYQPRYYDSGDMGGEYDN
einzel				7	1	nd	nd	0/1	0/0	
unlesb				4	2	nd	nd	6/4	3/7	

4.1.4 FACS und MST Analysen zeigen, dass 12 VHH Familien CD38 spezifisch binden, davon fünf mit hoher Affinität

Für weiterführende Untersuchungen wurden die VHHs rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (Abb. 4.1.4). Verwendet wurde der Bakterienstamm HB2151, ein *non-supressor* Stamm, der das Amber-Stopcodon zwischen VHH und dem Phagenkapsidprotein erkennt und damit die lösliche Produktion der VHHs im Phagemid-Vektor pHEN2 erlaubt. Durch den *pelB-leader* wurden die VHHs in den periplasmatischen Raum transportiert, durch die reduzierenden Bedingungen konnten sich Disulfidbrücken ausbilden. Die transformierten *E. coli* wurden in 100 ml 2xYT-Carb-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch IPTG induziert und wurde nach drei Stunden durch Zentrifugation beendet. Mittels osmotischem Schocks wurde die äußere Zellwand der Bakterien aufgebrochen und die VHHs konnten über ihren 6xHis-Tag durch immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie aus dem Periplasma aufgereinigt werden. Die VHHs wurden im Anschluß gegen PBS dialysiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration über BCA bei 4 °C gelagert. Die monomeren VHHs konnten in Ausbeuten zwischen 0,1 bis 10 mg aus einem Liter *E. coli* Kultur aufgereinigt werden.

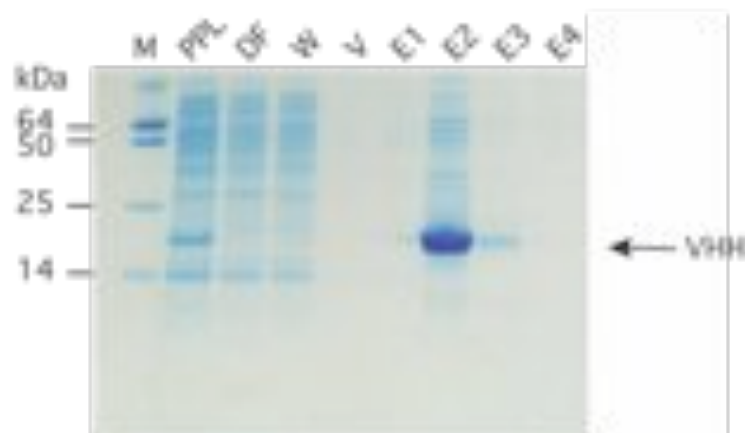


Abb. 4.1.4: Analyse des Aufreinigungsprozess der VHH S-24a mittels SDS-PAGE. Zur Produktion der VHHs wurden transformierte HB2151 *E. coli* in 100 ml Kulturvolumen bis zu einer OD von 0,5 gezüchtet, bevor die Expression der VHHs durch Zugabe von IPTG (1 mM) für 3 h bei 37 °C induziert wurde. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation geerntet (15 min, 4000 rpm, 4 °C)

und in 5 ml TS-Puffer pro Gramm Bakterienpellet für 30 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurde für 30 min bei 4 °C bei und 20000 rpm zentrifugiert, der Überstand (Periplasmalysat, PPL) steril filtriert und die VHHs über den C-terminalen 6xHis-Tag über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Die Säule wurde dann mit 30 ml Waschpuffer gewaschen und 10 µl auf das Gel aufgetragen. Mit Elutionspuffer wurden je 900 µl *void* (V) und vier Elutionsfraktionen (E1-E4) zu je 1 ml aufgefangen. Es wurden je 10 µl des PPLs, des Durchflusses (DF) und der Waschung (W) sowie je 5 µl des *voids* und der Elutionsfraktionen auf das Gel aufgetragen. Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung detektiert.

Die Spezifität der selektierten VHHs für CD38 wurde durch Bindung an verschiedene Zelllinien mittels Durchflusszytometrie untersucht. Um die Bindungsstärke zu erhöhen, wurden die VHHs in ein bivalentes Format überführt, in dem sie in einem molaren Verhältnis von 1:7 mit einem Fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen den C-terminalen c-Myc-Tag für 30 min vorinkubiert wurden. 12 VHH-Familien zeigten eine spezifische Bindung an human CD38-transfizierte NIH-3T3 Maus-Fibroblasten, nicht aber an untransfizierten NIH-3T3 Zellen. Keine der VHH-Familien zeigte eine Bindung an eine Maus CD38 exprimierende Lymphomzelllinie (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um die Bindungsstärke der VHHs an natives CD38 auf der Zelloberfläche von peripheren Blut-Leukozyten zu testen, wurden durchflusszytometrische Analysen mit peripheren Blut-Leukozyten und VHHs in monovalentem Format durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl Blut mit unterschiedlichen VHH-Konzentrationen (50 ng - 16 pg) für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Überschuss an FITC-markiertem anti-c-Myc Antikörper weiter inkubiert. Für die Unterscheidung von B- und T-Lymphozyten, die CD38 hoch bzw. schwach exprimieren (Malavasi, Deaglio et al. 2008) wurde ein APC-markierter anti-CD3-Antikörper verwendet. Nach Waschen der Zellen und Lyse der Erythrozyten wurde die Bindung durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativ-Kontrolle wurde die Toxin B spezifische VHH L-14 (s. Abschnitt 4.2) verwendet, als Positiv-Kontrolle ein FITC-markierter monoklonaler Antikörper gegen CD38. Lymphozyten wurden über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert. Mit Hilfe der FlowJo Software wurde die MFI (*mean fluorescence intensity*) der CD3-negativen Population errechnet und gegen die VHH-Konzentrationen aufgetragen (Abb. 4.1.5). Alle sechs selektierten Familien aus

Lama 25, sowie sechs der neun Familien aus Lama 10 zeigten ein ähnliches Bindungsverhalten wie der konventionelle anti-CD38 Kontrollantikörper (stärkere Färbung der CD3-negativen Lymphozyten) (Abb. 4.1.5 A). Für drei der neun selektierten VHH-Familien aus Lama 10 konnte keine Bindung bestätigt werden (L-9.2, L-16 und S+24, Daten nicht gezeigt). Es handelt sich bei diesen VHHs vermutlich um "falsch" selektierte Familien (L-9.2 an Bestandteile des Milchpulvers, L-16 und S+24 an Oberflächenproteine von NIH-3T3 Zellen). Für die Negativkontrolle L-14 (aToxB-GT) konnte - wie bei der Negativkontrolle - keine Bindung nachgewiesen werden. Der Kurvenverlauf der Titrationsreihe erlaubt eine semiquantitative Aussage über die Bindungsaffinität der untersuchten VHHs (Abb. 4.1.5 B). Fünf VHH-Familien zeigen eine hohe MFI selbst bei geringer Konzentration, und haben demzufolge eine relativ hohe Bindungsaffinität (L-9.1, L-15.2, L-15.3, L-19.1, L-19.2). Drei VHH-Familien zeigten nur bei sehr hohen Konzentrationen ein detektierbares CD38-typisches Signal (S-7, S-14, S-15) (Ergebnis nicht gezeigt). Vier VHH-Familien zeigen eine intermediäre Affinität (L+13, L+/-15, L-15.1, S+24). Eine SDS-PAGE-Analyse bestätigt die Reinheit, Integrität und Konzentration der untersuchten VHHs (Abb. 4.1.5 C).

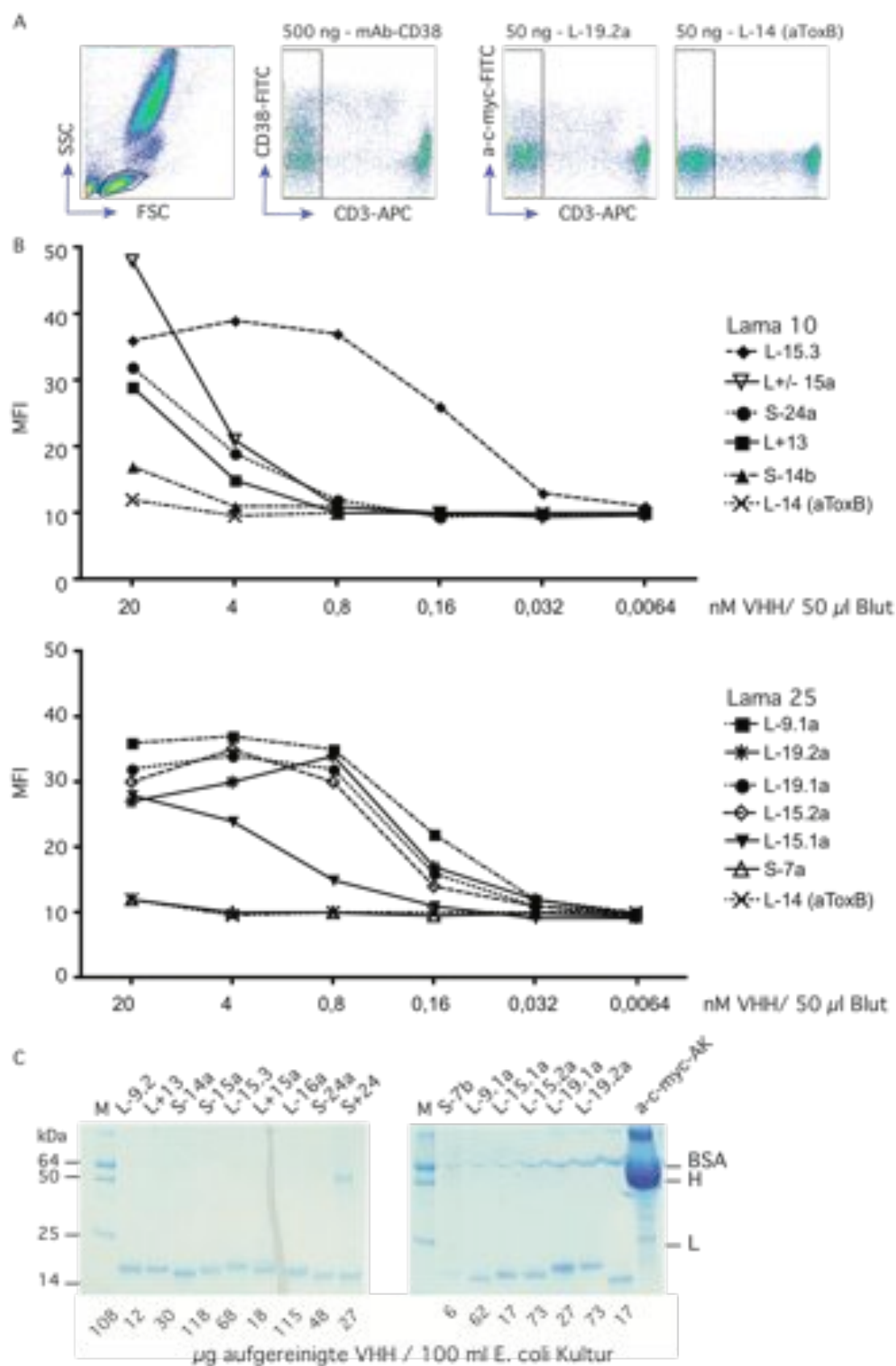
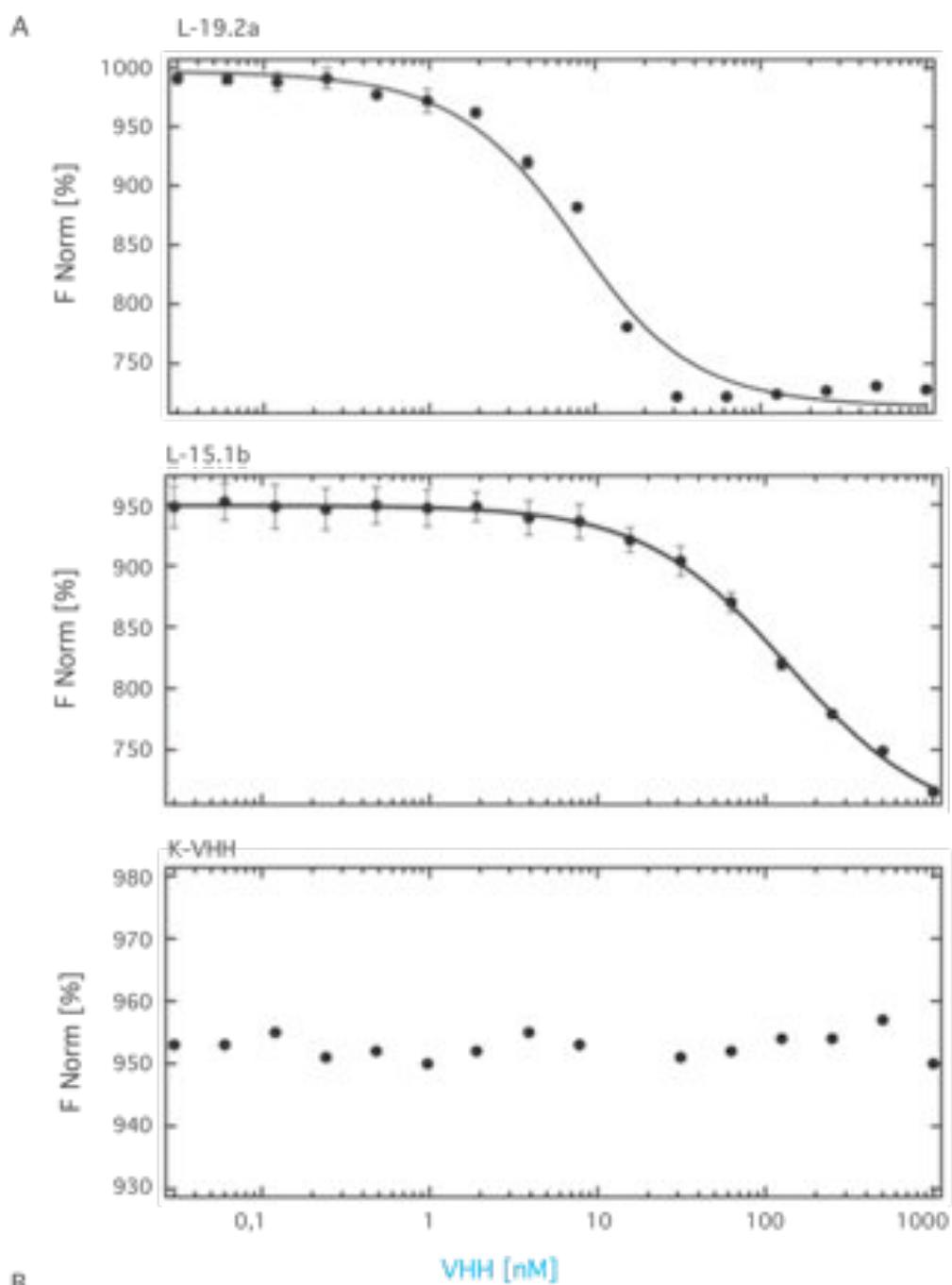


Abb. 4.1.5: Fünf VHH-Familien binden hochaffin an CD38 auf humanen B-Zellen (CD3-negative Lymphozyten). 50 µl Blut wurde mit unterschiedlichen VHH Mengen (50 ng - 16 pg) für 30 min bei RT inkubiert. Zur Auftrennung der B- von den T- Lymphozyten wurde ein APC-markierter anti-CD3-Antikörper verwendet, gebundenen VHHs wurden mit einem FITC anti-c-Myc-Antikörper detektiert. Im Anschluß wurden die Erythrozyten lysiert und die Anfärbungen durchflusszytometrisch analysiert. (A) Die Lymphozytenpopulation wurde über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert. (B) Mit Hilfe der FlowJo Software wurde die MFI (*mean fluorescence intensity*) für die CD3-negative Zellpopulation (die in A eingekastete Zellpopulation) für Lama 10 und Lama 25 errechnet und gegen die VHH Konzentration aufgetragen. (C) SDS-PAGE Analyse der im FACS eingesetzten aufgereinigten VHHs. Zur Produktion der VHHs wurde ein *E. coli*-Stamm (HB2151) verwendet, der das Amber-Stopcodon zwischen VHH und dem gIII-Kapsidprotein des M13-Phagen erkennt. Nach Aufreinigung der VHHs über Ni-NTA Säulen wurden diese über eine Gelfiltrationssäule umgepuffert und über eine Zentrifugationssäule mit einem MWCO von 3000 Da eingeeengt. Die Konzentration der VHH wurde spektrophotometrisch bestimmt. Es wurden jeweils 500 ng der VHHs und der anderen Proteine aufgetragen. Unter dem Bild wurde die errechnete Gesamtausbeute an VHH aus 100 ml Kulturvolumen angegeben. M = Molekulargewichtsmarker. H = *heavy chain*. L = *light chain*. BSA = bovines Serumalbumin.

Die Bindungsaffinitäten der VHHs gegen lösliches, nicht glykosyliertes, rekombinantes humanes CD38 wurden über eine zweite Untersuchungsmethode, die Mikroskala-Thermophorese, untersucht (Abb. 4.1.6). Hierbei wurde die Konzentration des Fluorochrom-konjugierten CD38 (Alexa-647) konstant gehalten, während die Konzentration der VHHs variiert wurde. In einer Glaskapillare wurde in jedem Ansatz durch einen Infrarot-Laser ein lokaler Temperaturgradient erzeugt. Gleichzeitig wurden Veränderungen der Fluoreszenzintensität durch die Bewegung der Moleküle gemessen. Bei Bindung der VHHs kommt es zu einer Verzögerten thermophoretischen Bewegung, die am Meßgerät detektiert werden konnte. Veränderungen der Fluoreszenz-Werte wurden als prozentuale Veränderung der normalisierten Fluoreszenz gemessen und gegen die VHH-Konzentrationen aufgetragen. Der K_D wurde mit der GraphPad prism Software berechnet (Abb. 4.1.6). Fünf VHHs (L-15.3, L-9.1a, L-19.2a, L-19.1a L-15.2a) wiesen hochaffine Bindung im unteren nanomolaren Bereich (1 - 6 nM) auf. Diese Affinitäten sind vergleichbar mit denen monoklonaler Antikörper (De Genst, Silence et al. 2006). Als Negativ-Kontrolle wurde die S+16 (aART2) verwendet, die keine Verzögerung der thermophoretischen Bewegung des markierten CD38 bewirkte.



VHH	K _D [nM]
L-15.1a	1
L-15.1b	138
L-15.2a	3
L-19.1a	3
L-19.2a	4, 5
L-15.3	6
S-24a	16
L+13	21
L+/-15	23

L-9.1a	225
S-7a	kBd
S-15	kBd
K-VHH	kBd, kBd

Abb. 4.1.6: Quantitative Untersuchung der Affinität von VHHs zu CD38 mittels Mikroskala Thermophorese. Für die Messungen wurden serielle Verdünnungen der unmarkierten VHHs mit einer konstanten Konzentration des Alexa-647-konjugierten CD38 (12.5 nM bzw. 5 nM) in MST-Puffer für 10 Minuten inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde eine nicht-CD38 spezifische VHH eingesetzt (K-VHH). Die Ansätze wurden am NanoTemper Monolith NT.115 analysiert. Die eingesetzte Konzentration der VHHs wurden gegen die prozentuale Veränderung der normalisierten Fluoreszenz aufgetragen und die Affinitätskonstanten K_D mit der GraphPad prism Software berechnet. Gezeigt sind die Messergebnisse zweier unabhängig durchgeführter Versuche (schwarz n=1, blau n = 2). (A) zeigt Graphen des zweiten Versuchs, (B) die ermittelten K_D Werte beider Versuche. kBd = keine spezifische Bindung detektierbar.

4.1.5 Keine der VHH Familien hemmt die Glykohydrolase-Aktivität von CD38

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die bindenden VHHs die Enzymaktivität von CD38 blockieren können. Um eine für Inhibitionsversuche geeignete Konzentration von CD38 zu ermitteln, wurde zunächst eine Titration von rekombinantem humanem CD38 durchgeführt und die NAD-Hydrolase-Aktivität mit einem radioaktiv Versuch ermittelt. Hierzu wurde CD38 mit ^{32}P -NAD für 20 min inkubiert und das radioaktiv markierte Reaktionsprodukt ^{32}P -ADP-Ribose sowie das nicht umgesetzte ^{32}P -NAD über eine Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet (Abb. 4.1.7 A). Die Ergebnisse zeigten, dass unter diesen Bedingungen CD38 Mengen von über 6 ng das eingesetzte ^{32}P -NAD nahezu vollständig zu ^{32}P -ADP-Ribose umsätsen. Deshalb wurden für die folgenden Inhibitionsversuche 3 ng CD38 und 100 ng der VHHs verwendet. Hierbei wurde CD38 mit den einzelnen VHHs für 30 min vorinkubiert, bevor die Zugabe des Substrats erfolgte (Abb. 4.1.7 B). Die Ergebnisse zeigen eine nahezu vollständige Hydrolyse des eingesetzten ^{32}P -NADs, selbst in Anwesenheit der hochaffinen anti-CD38 VHHs. Mit den anderen CD38-spezifischen VHH-Familien konnte ebenfalls keine Inhibition der enzymatischen Aktivität beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

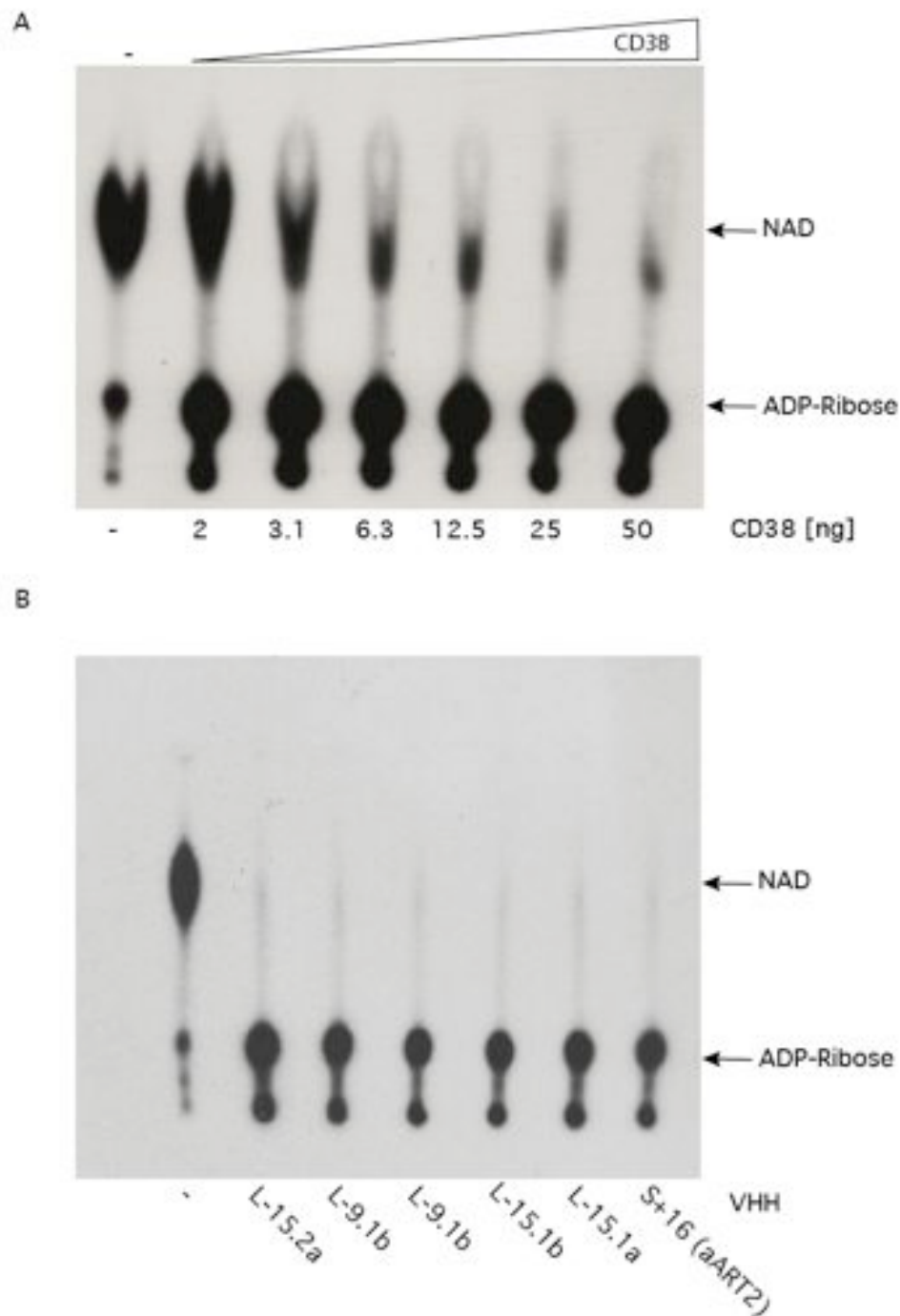
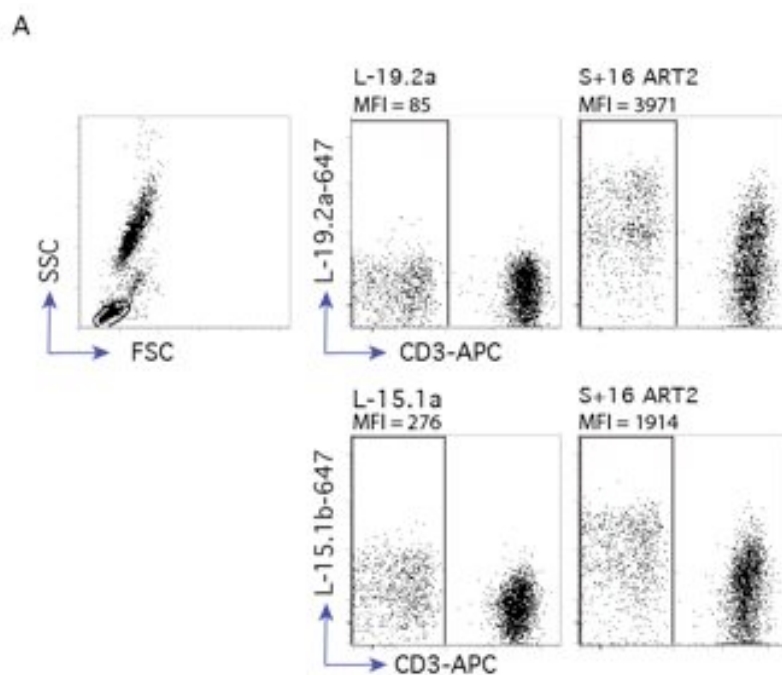


Abb. 4.1.7: Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte von CD38 nach Inkubation mit ^{32}P -NAD. (A) Rekombinantes humanes CD38 wurde mit ^{32}P -NAD (1 μCi /Ansatz) für 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 μl Strataclean-Matrix gestoppt. Die Proteine wurden durch die Matrix gebunden und durch Zentrifugation (30 s, 12000 rpm, RT) präzipitiert. Jeweils 1 μl des Überstandes wurde auf die DC-Plastikfolie aufgetragen. Die Reaktionsprodukte wurden in einer Dünnschichtchromatographie analysiert und autoradiographisch ausgewertet. (B) Gleiche Versuchsdurchführung wie in (A) mit Vorinkubation von CD38 (3 ng) mit unterschiedlichen VHHs (100 ng) für 30 Minuten bei RT. Spur1: ohne CD38.

4.1.6 Kreuzblockade Analysen zeigen, dass die fünf hochaffinen VHH-Familien zwei verschiedene Epitope erkennen

Im nächsten Schritt sollte am Beispiel von zwei hochaffinen VHHs untersucht werden, ob diese und andere VHHs an verschiedene oder überlappende Epitope von CD38 binden. Hierzu wurden die VHHs L-15.1b und L-19.2a jeweils mit Alexa-647 Fluorochrom konjugiert. Diese VHHs wurden für das *epitop-mapping* eingesetzt. Humanes Blut wurde mit 5 µg der VHHs vorinkubiert und anschließend die Bindung der Fluorochrom-konjugierten VHHs im FACS analysiert. Wurde das Signal vermindert, so bindet die unkonjugierte, kompetitive VHH ein ähnliches Epitop wie die Fluorochrom-konjugierte VHH. Als Negativ-Kontrolle dienten die VHH S+16 (anti-ART2), die die Bindung der anti-CD38 VHHs nicht blockieren sollte. Als Positiv-Kontrolle diente jeweils die unkonjugierte Variante der Fluorochrom-konjugierten VHHs, die deren Bindung verhindern sollte. Zur Markierung der CD38-schwachpositiven T-Lymphozyten wurde ein APC-konjugierter anti-CD3-Antikörper verwendet. Nach Lyse der Erythrozyten wurde die Bindung durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 4.1.8). Die Lymphozyten wurden über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert. Mit Hilfe der FlowJo Software wurde die MFI (*mean fluorescence intensity*) der CD3-negativen Population errechnet. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Blockade der Bindung von L-19.2a nur durch Vorinkubation mit den VHHs L-19.1a und L-19.2b. Die Bindung der VHH L-15.1b wurde durch Vorinkubation mit den VHHs L-9.1a, L-15.1a, L-15.2b und L-15.3 deutlich blockiert. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden hochaffinen VHHs L-19.2a und L-15.1b verschiedene, nicht überlappende Epitope erkennen.



B

kompetitive VHH	MFI (L-19.2a-647)	MFI (L-15.1b-647)
L-15.1a	4400	300
L-19.2a	90	1100
S+16 (aART2)	4000	1900
S-7a	2800	1800
L-9.1a	4100	100
L+13	4200	1900
S-14a	4200	1100
S-15a	3900	1400
L-15.1a	4400	300
L-15.2b	2400	60
L-15.3	4000	100
L-19.1a	200	1400
L-19.2a	90	1500
L-19.2b	100	1500
S-24a	4000	1600

Abb. 4.1.8: Epitopkartierung der hochaffinen anti-CD38 VHHs L-19.2a und L-15.1b an humanen Blut-Lymphozyten. 100 µl Blut wurden mit 5 µg der unkonjugierten VHHs für 10 min bei RT vorinkubiert und im Anschluß für 30 min bei RT mit 500 ng der Alexa-647-konjugierten VHHs L-19.2a oder L-15.1b. Zur Markierung der T- Lymphozyten wurde ein anti-CD3-Antikörper verwendet. Im Anschluß wurden die roten Blutkörperchen lysiert und die Anfärbungen im Durchflusszytometer untersucht. Die Lymphozytenpopulation wurde über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert und die gebundenen konjugierten VHHs auf den CD3 negativen Zellen über das Fluorochrom Alexa-647 detektiert. (A) FACS plots der Positiv- und Negativ-Kontrollen. Die

im Überschuss zugegebene unkonjugierte VHH ist jeweils oben angegeben. (B) Tabellarische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten der CD3-negativen Lymphozyten in allen untersuchten Ansätzen. Die in A gezeigten Positiv und Negativ Kontrollen sind in den ersten beiden Zeilen dargestellt. Eine Verminderung des Signals (grau hinterlegt) deutet darauf hin, dass die kompetitive VHH das gleiche (bzw. ein überlappendes) Epitop erkennt wie die Fluorochrom-konjugierte VHH.

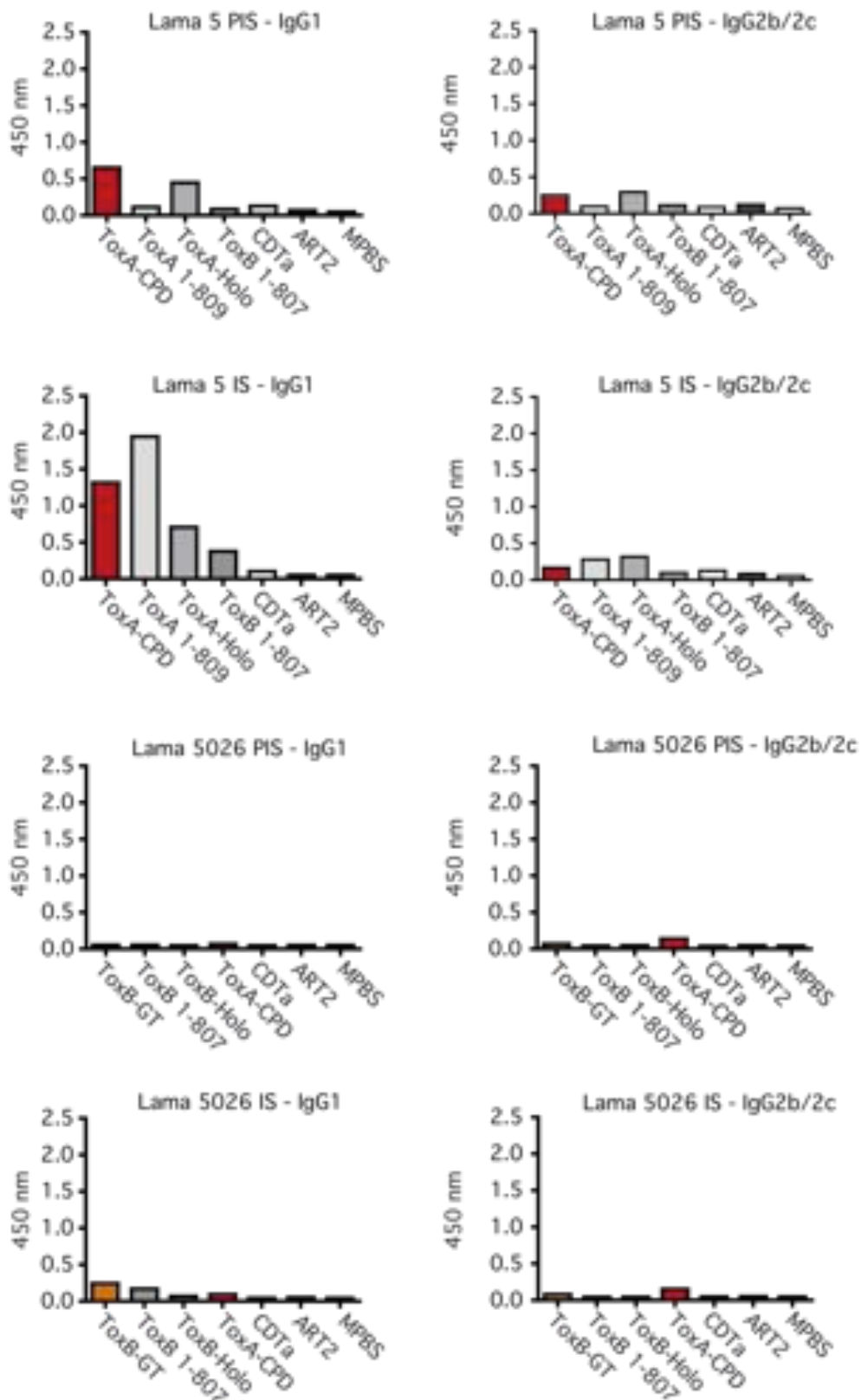
4.2 Selektion Toxin A und Toxin B-spezifischer VHHs aus Phagen-Display-Bibliotheken immunisierter Lamas

4.2.1 Die mit Clostridien-Toxinen immunisierten Lamas zeigen spezifische Antikörper-Titer

Für die Induktion von anti-ToxA-CPD und anti-ToxB-GT Schwereketten-Antikörpern wurden drei Lamas, 5 (ToxA-CPD), 5026 (ToxB-GT) und 5037 (ToxA-CPD, ToxB-GT und CDTa) mit den rekombinant hergestellten Toxinen immunisiert. Für die Immunisierung mit Toxin A wurde die Cysteinproteasedomäne (CPD, AS: 547-779, 25 kDa) und für Toxin B die Glucosyltransferasedomäne (GT, AS: 1-546, 60 kDa) verwendet (Klaus Aktories, Freiburg). Für die Grundimmunisierung wurden jeweils 400 µg (ToxA-CPD/ToxB-GT) bzw. 50 µg (CDTa) der Antigene verwendet. Die Toxinfragmente wurden in 400 µl PBS zu 500 µl des Specol Adjuvans gegeben und bei 4 °C dreimal kurz mit Ultraschall behandelt. Die Injektionen erfolgten *sub cutan* in den Hals der Lamas. Die Lamas 5 und 5026 wurden zweimal und das Lama 5037 dreimal mit den Antigenen geboostet.

Um die Toxin-spezifische Immunantwort zu überprüfen, wurden die Präimmunseren und die Immunseren der Lamas nach dem zweiten (5, 5026) bzw. dritten Boost (5037) mittels ELISA analysiert. Zur Detektion der konventionellen und Schwereketten-Antikörper wurden monoklonale Maus anti-Lama-IgG1 bzw. Maus anti-Lama-IgG2c/2b Antikörper verwendet (Daley, Gagliardo et al. 2005) (Abb. 4.2.1). Die Präimmunseren zeigten keine Reaktivität gegen die getesteten Antigene. Das Immunserum des Lamas 5026 zeigte nach den Immunisierungen keine erhöhte Reaktivität gegen ToxB-GT. Das Lama, das mit den drei Antigenen immunisiert wurde, zeigte eine hohe Reaktivität für alle Toxinantigene. Die Reaktivität dieses

Immunserums wurde offensichtlich sowohl durch konventionelle Antikörper als auch durch Schwereketten-Antikörper vermittelt.



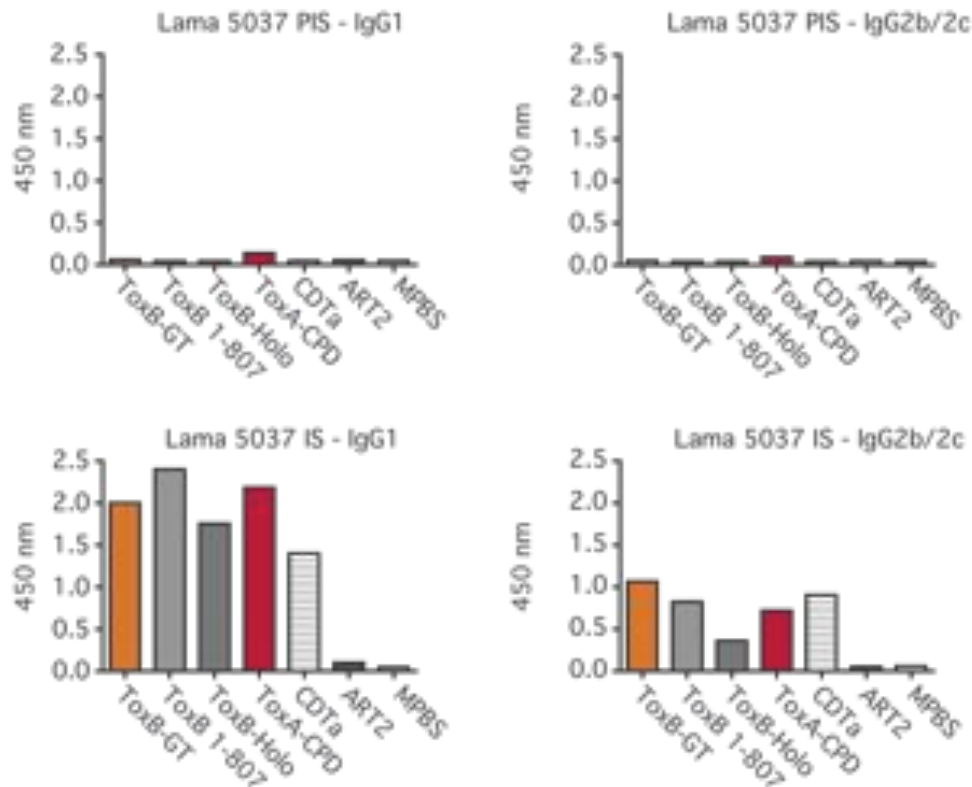


Abb. 4.2.1: ELISA-Analyse der Reaktivität der Immunsere von Lama 5, 5026 und 5037. Untersucht wurde das Lama-Präimmunserum (PIS) und das Lama-Immunsereum (IS) von einem mit ToxA-CPD immunisierten Lama (5), einem mit ToxB-GT immunisierten Lama (5026) und einem mit einem „Toxin Cocktail“ (CDTa, ToxA-CPD und ToxB-GT) immunisierten Lama 5037. Über Nacht wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte bei 4 °C mit 500 ng Antigen/Napf (ART2 und 5% Milchpulver in PBS wurden als Kontrollen verwendet) beschichtet und anschließend die freien Bindungsstellen für 2 h bei RT mit 5% Milchpulver in PBS blockiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet und für 1 h bei RT in den Näpfen inkubiert. Zur Detektion der Antikörper wurden monoklonale Maus anti-Lama-IgG1 bzw. Maus anti-Lama-IgG2c/2b Antikörper (100 µl Hybridoma-Überstand) verwendet. Als Tertiärantikörper wurde ein Schaf anti-Maus-IgG-PO Konjugat (1:5000) verwendet. Die Farbentwicklung mit TMB wurde bei 450 nm am ELISA-reader vermessen.

4.2.2 DNA-Sequenzierungen bestätigen ein breites VHH-Repertoire in den klonierten Phagen-Display-Bibliotheken

Zur Klonierung des VHH-Repertoires der immunisierten Lamas in Phagen-Display-Bibliotheken wurden periphere Blut-Lymphozyten elf Tage nach dem zweiten Boost (Lama 5, 5026) und zehn Tage nach dem dritten Boost (Lama 5036) verwendet

(Anhang: 8.3). Aus den peripheren Blut-Lymphozyten wurde zunächst die RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus dieser wurden die VHHs der Schwereketten-Antikörper PCR-amplifiziert (Anhang: 8.2.3). Die VHH-Fragmente wurden nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *SfiI* und *NotI* in den Phagemid-Vektor pHEN2 kloniert. Für das Lama 5 (ToxA-CPD) konnte eine berechnete Primärbibliothek mit $8,2 \times 10^4$ *short hinge* (IgG2b) und mit $4,1 \times 10^4$ *long hinge* (IgG2c) Klonen, für das Lama 5026 eine Primärbibliothek mit $5,7 \times 10^4$ *short hinge* und $1,1 \times 10^5$ *long hinge* Klonen und für das Lama 5037 (CDTa, ToxA-CPD, ToxB-GT) eine Primärbibliothek mit $4,3 \times 10^4$ *short hinge* und $7,8 \times 10^4$ *long hinge* Klonen generiert werden. DNA-Sequenz-Analysen aus jeweils 12 zufällig gewählten Klonen (Anhang: 8.5) bestätigten die erfolgreiche Klonierung eines breiten VHH-Repertoires der Bibliotheken (Tab. 4.2.1). Darunter fanden sich - wie zuvor bei den Bibliotheken aus den mit CD38 immunisierten Lamas (Tab. 4.1.1) - vereinzelt Duplikate bzw. Familien mit ähnlichen oder identischen Sequenzen. Die VHHs wiesen CDR3-Längen zwischen sechs und 23 Aminosäuren, sowie die charakteristischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen in der FR2 auf. Alle Klone verfügten über das kanonische Cysteinpaar, das sich zwischen der FR1 und der FR3 ausbildet. 75% der sequenzierten Klone aus Lama 5 wiesen eine zusätzliche Disulfidbrücke auf, während im Lama 5026 10% und in Lama 5037 weniger als 5% der Klone ein zusätzliches Cysteinpaar zwischen CDR2 und CDR3 aufwiesen.

Tab. 4.2.1: Übersicht über die generierten *short hinge* (S) und *long hinge* (L) Primärbibliotheken aus den mit ToxA-CPD, ToxB-GT und dem mit ToxA-CPD, ToxB-GT und CDTa immunisierten Lamas (5, 5026 und 5037). #Seq gibt die Anzahl der sequenzierten Klone an, ORF (*open reading frame*) gibt an wie viele der Klone ein korrektes Leseraster aufwiesen, CDR3 gibt die Anzahl der Aminosäuren in derselbigen an. D: Duplikate steht für Klone, die mehr als einmal gefunden wurden; F: Familien steht für gefundene Klone mit ähnlichen CDR-Regionen. aToxA-CPD/aToxB-GT gibt an wie viele der in der Primärbibliothek gefundenen Klone in den gefundenen Familien nach Selektion wiedergefunden werden konnten.

Lama	<i>hinge</i>	Klone	#Seq	ORF	CDR3	D/F	aToxA-CPD	
5	S	$8,2 \times 10^4$	12	11	8-20	0	0	1x nicht lesbar
5	L	$4,1 \times 10^4$	12	9	6-21	F:1x3	0	2x nicht lesbar, 1x Stopcodon
Summe		$1,2 \times 10^5$				F:1x3	0	

Lama	hinge	Klone	#Seq	ORF	CDR3	D/F	aToxA-CPD	
5037	S	4,3x10 ^{*4}	12	8	12-17	F:2x2	0	2x nicht lesbar, 2x Stopcodons
5037	L	7,8x10 ^{*4}	12	9	6-19	0	0	3x nicht lesbar
Summe		1,2x10^{*5}				F:2x2	0	

Lama	hinge	Klone	#Seq	ORF	CDR3	D/F	aToxB-GT	
5026	S/L	1,2x10 ^{*6}	24	21	9-23	F:1x2	0	3x nicht lesbar
Summe		1,2x10^{*6}				F:1x2	0	

Lama	hinge	Klone	#Seq	ORF	CDR3	D/F	aToxB-GT	
5037	S/L	3,3x10 ^{*5}	24	16	9-22	D:1x2	0	6x nicht lesbar, 2x Stopcodons
Summe		3,3x10^{*5}				D:1x2	0	

Toxin-spezifische VHHs wurden über zwei unterschiedliche Selektionsstrategien der Phagen-Display-Technologie angereichert. Für das Festphasenpanning wurde das rekombinant hergestellte ToxA-CPD bzw. ToxB 1-807 in den Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte immobilisiert. Für das Biotinpanning wurden die Toxine biotiniliert. Biotin ist 244 Da groß und erlaubte die Konjugation mit Streptavidin-Agarose für das Biotinpanning im *batch*-Verfahren. 20 µl Streptavidin-Agarose wurden mit 2 µg der biotinilierten Antigene inkubiert und im Anschluss mit einem Aliquot der Phagenbibliothek inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Phagen kompetitiv mit 2 µg des unkonjugierten Antigens eluiert und der Überstand für die Reinfektion verwendet. Die Bibliotheken wurden zwei bis drei Selektionszyklen unterzogen. Nach jeder Runde wurden 12 Klone sequenziert, um den Erfolg der Selektion zu überprüfen. Tabelle 4.2.2 zeigt eine Übersicht der selektionierten Klone. Für ToxA-CPD konnten fünf Familien und für ToxB-GT vier Familien selektioniert werden.

Tab. 4.2.2: Übersicht über die selektionierten VHH-Familien gegen ToxA-CPD und ToxB-GT.

FP steht für Festphasenpanning, BP steht für Biotinpanning. Die Zahlen geben die Häufigkeit an, mit der die Klone nach den einzelnen Selektionsrunden (RU) gefunden wurden. CDR3 zeigt die Abfolge der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code in derselbigen. nd steht für nicht durchgeführte Selektionsrunden bzw. wurden keine Sequenzierungen durchgeführt. Für VHHs, die in blau dargestellt sind, konnte die Bindung im ELISA bestätigt werden. Für VHHs, die in rot dargestellt sind, konnte neben der Bindung im ELISA auch die Blockade der Enzymaktivität *in vitro* bestätigt werden. Getestet wurde jeweils der am häufigsten gefundene Klon einer Familie.

Lama 5 ToxA-CPD

Name	Seqnr.	FP			BP			CDR3
		1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
L-10a	2150	2	2	-	-	-	-	GFTTTSGYNY
L-10b	2303	-	3	-	-	-	-	GFTTTSGYNY
L-10c	2152	2	-	-	-	-	-	GPTTTSGYQY
L-10d	2151	2	1	-	-	-	-	GVTTTSGYDY
L-10e	2308	-	2	-	-	-	-	GAPTTSGYKY
L-11a	2147	1	2	-	-	-	-	RSDASSPTYDY
L-11b	2314	-	1	-	-	-	-	RSDASSPTYDY
L-14	2145	1	1	-	-	-	-	YPSDSRQVAPNFKY
einzel		4	3	nd	nd	nd	nd	
unlesb		2	-	nd	nd	nd	nd	

Lama 5037 (CDTa, ToxA-CPD, ToxB-GT)

Name	Seqnr.	FP			BP			CDR3
		1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
S-12a	2382	-	-	-	1	-	-	DVADSVTTYTDL
S-12b	2389	-	-	-	1	-	-	DVQDSSTMYTDL
S-20	2395	-	3	-	-	-	-	STAGLPVQSIVAITTREY
einzel		5	7	nd	10	9	8	
unlesb		4	9	nd	2	3	4	

Lama 5026 ToxB-GT

Name	Seqnr.	FP			BP			CDR3
		1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
L-7II	2971	-	4	-	-	-	-	WLGGNEY
S+12	2967	-	2	-	-	-	-	RPYGCNRPECDD
L-14	2966	-	2	-	-	-	-	SPSSTWYRSGEFDY
einzel		0	1	nd	nd	nd	nd	
unlesb		12	3	nd	nd	nd	nd	

Lama 5037 (CDTa, ToxA-CPD, ToxB-GT)

Name	Seqnr.	FP			BP			CDR3
		1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
L-7aI	2964	2	3	-	-	-	-	WVDGKNY
L-7bI	2958	2	2	-	-	-	-	WVDGKNY
L-7cI	2954	2	2	-	-	-	-	WVAGKNY
L-7dI	2953	3	1	-	-	-	-	WVDGKNY
L-7eI	2988	-	1	-	-	-	-	WVDGKNY
L-7fI	2956	1	-	-	-	-	-	WVDGKNY
einzel		0	0	nd	nd	nd	nd	
unlesb		3	3	nd	nd	nd	nd	

4.2.3 ELISA-Analysen zeigen die spezifische Bindung von drei Toxin A und vier Toxin B spezifischen VHH-Familien

Die spezifische Bindung der selektierten VHHs an die Toxine wurde mittels ELISA in einem bivalenten VHH-Format analysiert (nach Vorinkubation der VHHs mit einem monoklonalen anti-c-Myc-Antikörper in einem molaren Verhältnis von 1:7). Die Antigene wurden über Nacht in den Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte immobilisiert und nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit 5% Milchpulver in PBS wurden die VHHs für 1 h in den Vertiefungen inkubiert. Die Detektion erfolgte mit TMB und wurde durch die Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Am ELISA-reader wurde bei 450 nm die Substratumsetzung quantifiziert (Abb. 4.2.2 A, B). Drei der fünf selektierten anti-ToxA-CPD VHHs (L-10, L-11, L-14) zeigten eine spezifische Reaktivität sowohl gegen die zur Immunisierung eingesetzte Cysteinproteasedomäne als auch gegen ToxA 1-809 und das Holo-Toxin. Vier der vier selektierten anti-ToxB-GT VHHs (L-7I, L-7II, S+12, L-14) zeigten eine spezifische Reaktivität sowohl gegen die zur Immunisierung eingesetzte Glucosyltransferasedomäne als auch gegen ToxB 1-807 und das Holo-Toxin B. Die VHH S+12 zeigte eine Kreuzreaktivität mit der ToxA-GT (Abb. 4.2.2 B). Die GT-Domäne der beiden Toxine zeigt eine Sequenzidentität von 51% (Barroso, Wang et al. 1990; Sauerborn and von Eichel-Streiber 1990).

Die Bindungsaffinität der selektierten VHHs gegen ToxA-CPD und ToxB-GT wurde in einem monovalenten ELISA-Format semiquantitativ bestimmt (Abb. 4.2.3). Dazu wurde eine konstante Konzentration der Antigene immobilisiert und die VHHs nach serieller Verdünnung für die Detektion eingesetzt.

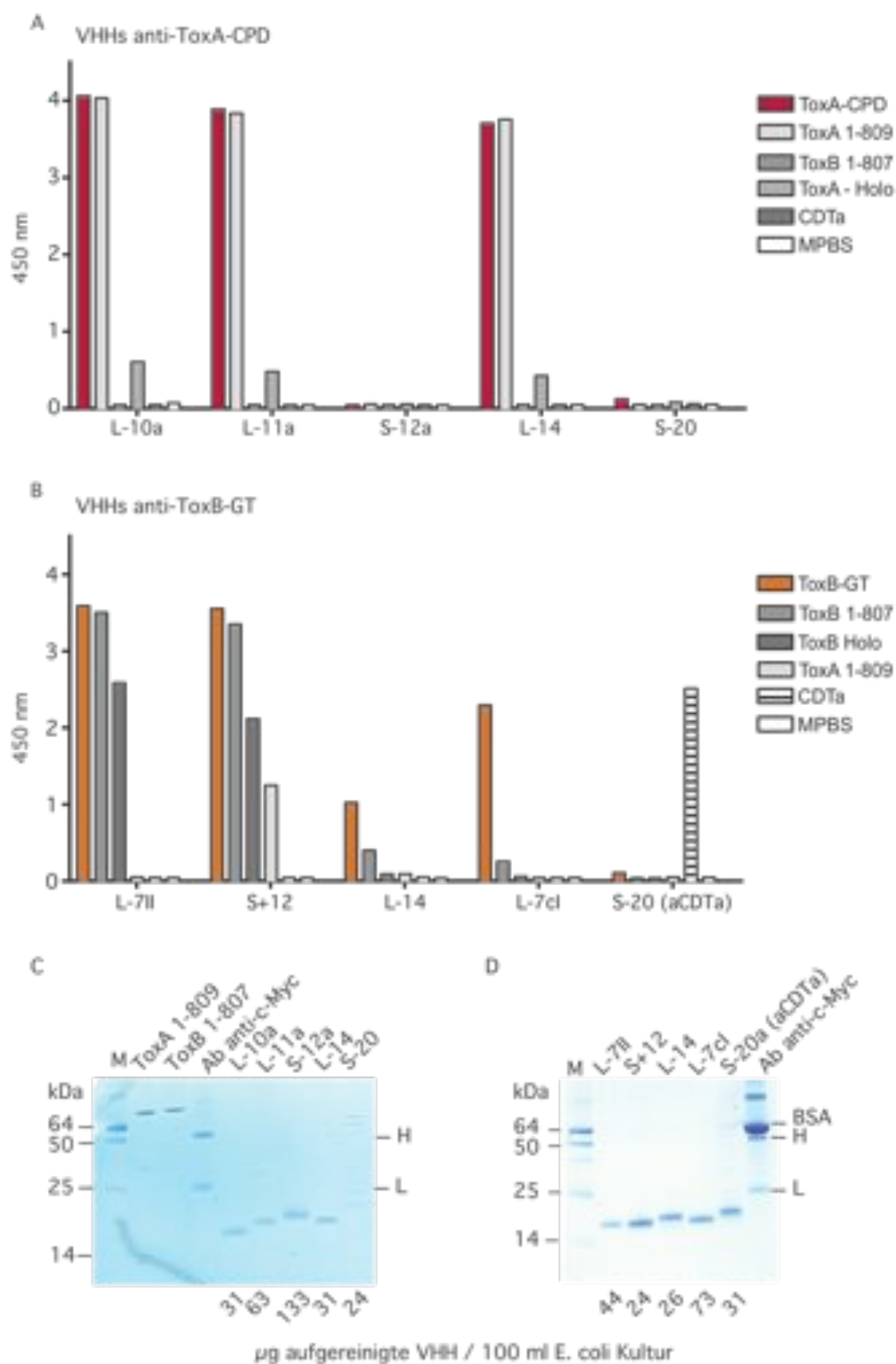


Abb. 4.2.2: ELISA-Analyse der Reaktivitäten der selektionierten VHHs in einem bivalenten Format gegen Toxin A und B (A, B) Über Nacht wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte bei 4 °C mit 500 ng der Antigene beschichtet und anschließend für 2 h bei RT mit 5% Milchpulver in PBS die freien Bindungsstellen blockiert. 100 ng der VHHs wurden mit 700 ng eines Maus anti-c-Myc-Antikörpers für 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend für eine Stunde bei RT in den Vertiefungen der Mikrotiter-Platte inkubiert. Als Tertiärantikörper wurde ein Schaf anti-Maus-IgG-PO Konjugat (1:5000, 1h bei RT) verwendet. Die Farbentwicklung mit TMB wurde bei 450 nm am ELISA-reader vermessen. (C) SDS-PAGE-Analyse der im ELISA eingesetzten Proteine. Zur Produktion der VHHs wurde der *E. coli*-Stamm HB2151 verwendet, der das Amber-Stopcodon zwischen VHH und dem gIII-Kapsidprotein des M13-Phagen erkennt. Die Konzentration der mittels Nickel-NTA Säulen gereinigten VHHs wurde spektrophotometrisch bestimmt. Es wurden jeweils 500 ng der Proteine pro Spur aufgetragen. Unter dem Bild ist die errechnete Gesamtausbeute an VHH aus 100 ml Kulturvolumen angegeben. H = *heavy chain*. L = *light chain*. BSA = bovines Serumalbumin. M = Molekulargewichtsmarker.

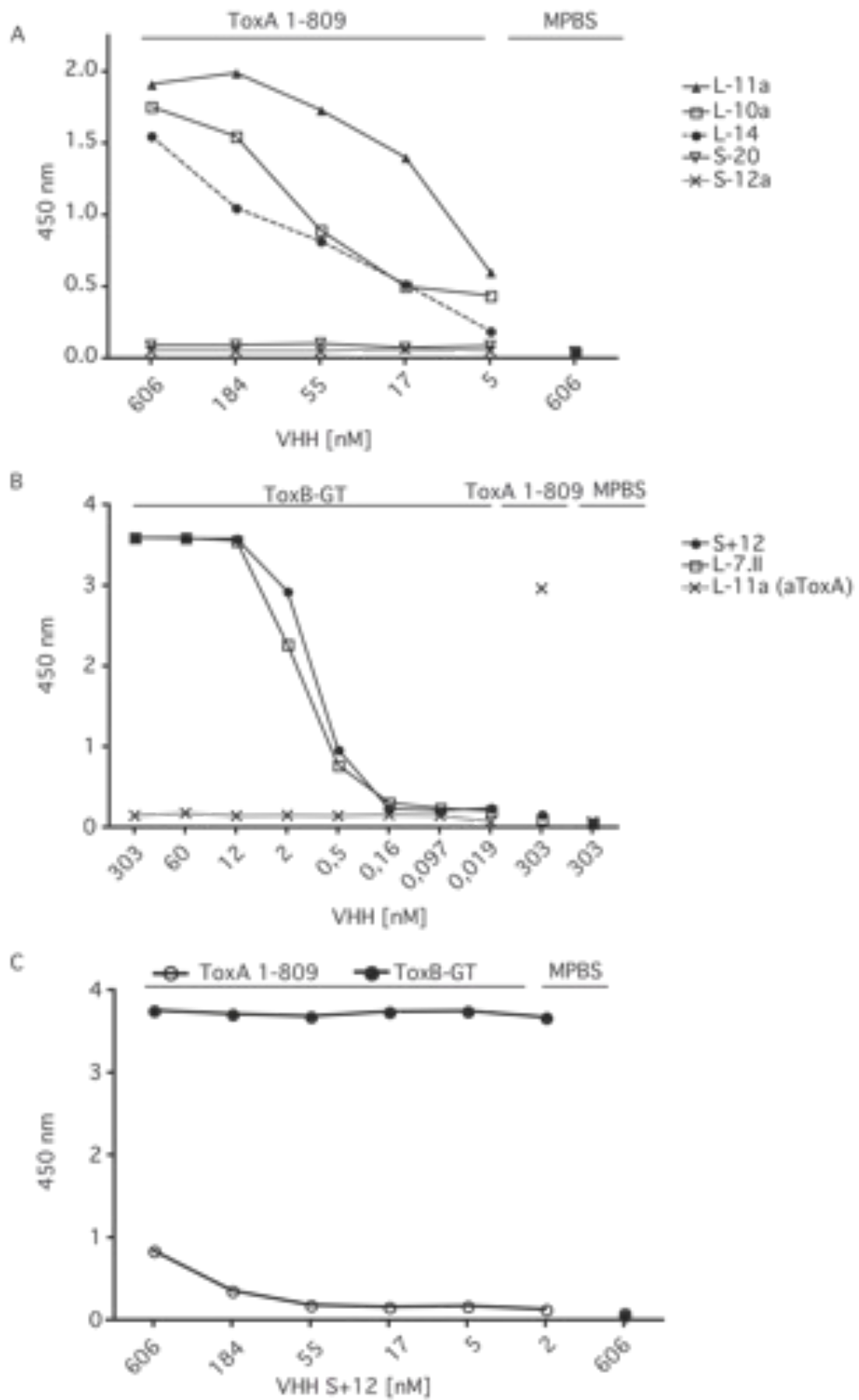


Abb. 4.2.3: ELISA-Analyse der Bindungsstärken von ToxA-CPD- und ToxB-GT-spezifischen VHHs in monovalentem Format. A). Über Nacht wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte bei 4 °C mit 300 ng ToxA 1-809 beschichtet und anschließend für 2 h bei RT mit 5% Milchpulver in PBS die freien Bindungsstellen blockiert. VHHs wurden in 1:3,3 Verdünnungsschritten (1 µg - 10 ng/100 µl) für eine Stunde zugegeben und die Näpfe dann gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden ein Maus anti-c-Myc-Antikörper (700 ng/100 µl) verwendet, der nach einstündiger Inkubation mit einem Schaf anti-Maus-IgG-PO Konjugat (1:5000, 1h bei RT) detektiert wurde. Die Farbentwicklung mit TMB wurde bei 450 nm am ELISA-reader vermessen. (B, C) ELISA-Analysen mit ToxB-GT-spezifischen VHHs wurden wie in (A) durchgeführt, jedoch nach Beschichtung der Vertiefungen mit 230 ng ToxB-GT bzw. 300 ng ToxA 1-809.

4.2.4 Inhibition der Cysteinprotease-Aktivität durch ToxA-CPD spezifische VHHs

Die ToxA-CPD spezifischen VHHs wurden auf die Fähigkeit zur Blockade der autokatalytischen Proteaseaktivität in Anwesenheit des allosterischen Aktivators Inositolhexakisphosphat (InsP₆) getestet. Durch InsP₆, das im Zytosol der Wirtszelle vorkommt, wurde die Prozessierung der Toxine A und B eingeleitet. Die enzymatisch aktive Glucosyltransferasedomäne wird von den C-terminalen Domänen des Toxins abgespalten und ins Zytosol entlassen (Reineke, Tenzer et al. 2007). Um zu testen, ob die selektionierten VHHs die autokatalytische Prozessierung inhibieren können, wurden ToxA 1-809 und ToxB 1-807 in konstanter Konzentration für 10 Minuten mit seriellen Verdünnungen (1:2) der VHHs vorinkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von InsP₆ eingeleitet und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über ein SDS-PAGE-Gel analysiert (Abb. 4.2.6). Die Prozessierung wurde durch die Spaltprodukte von ToxA 1-809 bzw. ToxB 1-807 (Glucosyltransferasedomäne + Cysteinproteasedomäne) in die einzelnen Domänen, die GT (63 kDa) und die CPD (30 kDa), sichtbar gemacht. VHH L-10a und VHH L-11a zeigten eine Dosis-abhängige Inhibition der CPD von Toxin A, jedoch nicht von Toxin B. Eine komplette Blockade der autokatalytischen Spaltung konnte durch einen siebenfachen molaren Überschuss der VHHs L-10a und L-11a erzielt werden.

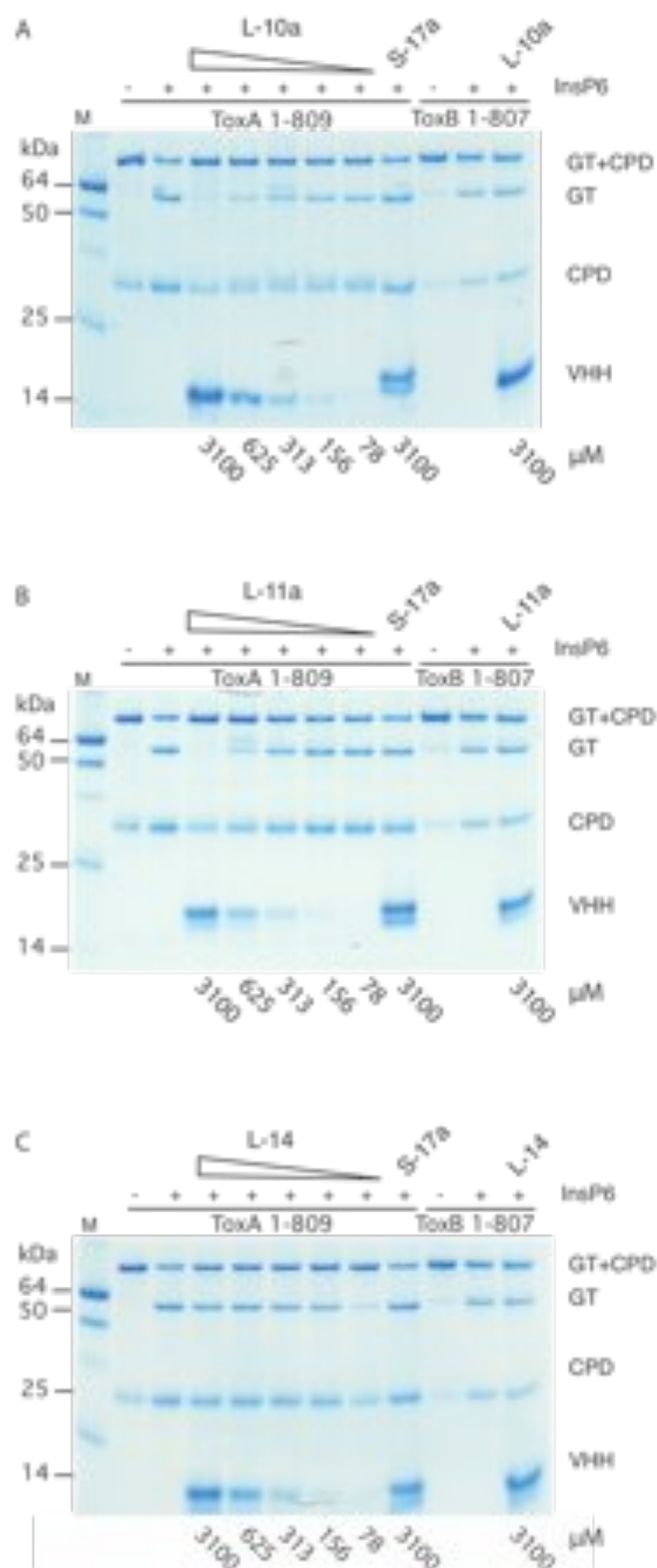


Abb. 4.2.4: Inhibition der autokatalytischen Spaltung von ToxA 1-809 durch die VHHs L-10 und L-11. ToxA 1-809 oder ToxB 1-807 (562 μM) wurden ohne (-) bzw. mit (+) anti-ToxA VHH (3100 μM - 78 μM) oder einer Kontroll-VHH (anti-CDTa S-17a, 3100 μM) für 1 h bei RT vorinkubiert. Die autoproteolytische Spaltung von ToxA 1-809 und ToxB 1-807 wurde durch Zugabe von 100 μM InsP_6 induziert und der Reaktionsansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dieser Versuch wurde von Moritz Strysio durchgeführt.

4.2.5 Selektionierte VHHs blockieren spezifisch die Glucosyltransferase-Aktivität von Toxin B

Die ToxB-GT spezifischen VHHs wurden auf ihre Fähigkeit, die Glucosylierung von Rac1 zu inhibieren, im Western Blot getestet. Die VHHs wurden mit ToxB 1-546 vorinkubiert und die Reaktion durch die Zugabe der Substrate UDP-Glucose und Rac1 eingeleitet. Die Reaktionsprodukte wurden über ein SDS-PAGE-Gel fraktioniert und die Glucosylierung von Rac1 durch die Verwendung von zwei Rac1-spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Der Antikörper Rac1 (23A8) erkennt sowohl das glucosylierte wie auch das unglucosylierte Rac1, während der zweite Rac1-Antikörper (Rac1/102) nur an das unglucosylierte Rac1 bindet (Abb. 4.2.5). In den Spuren mit den höchsten Konzentrationen an VHH L-7II (A) und VHH S+12 (B) ist eine deutliche, nicht glucosylierte Rac-Bande detektierbar, nicht jedoch bei den Kontrollansätzen mit einer anti-SpvB VHH. Dies spricht dafür, dass beide Tox-B spezifischen VHHs Dosis-abhängig eine partielle Inhibition der GT-Aktivität erreichen.

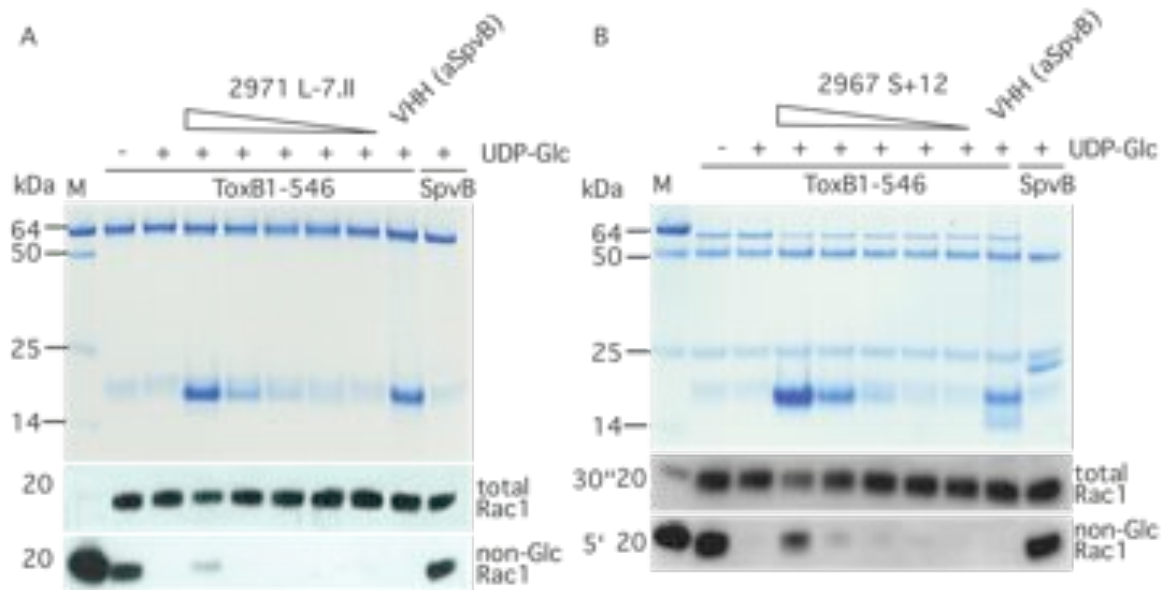


Abb. 4.2.5: Inhibition der ToxB vermittelten Rac1 Glucosylierung durch anti-ToxB VHHs L-7.II und S+12. ToxB-GT (300 ng) wurde mit den o.g. VHHs in einer 1:3,2 seriellen Verdünnung (2 mM - 0,685 mM) für 20 min bei RT vorinkubiert. 600 ng rekombinantes Rac1 und UDP-Glucose (10 μ M) wurden dem Reaktionsansatz zugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE Gel analysiert. Western Blots wurden mit zwei Rac1 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Ein Antikörper erkennt glucosyliertes und unglucosyliertes Rac1 (23A8), während der zweite Antikörper nur unglucosyliertes Rac1 binden kann (Rac1/102). Der Versuch wurde von Moritz Strydio durchgeführt.

4.3 Selektion und Charakterisierung CDTa-spezifischer VHHs aus Phagen-Display-Bibliotheken immunisierter Lamas

4.3.1 Die mit CDTa immunisierten Lamas zeigen spezifische Antikörper-Titer

Für die Induktion von anti-CDTa Schwereketten-Antikörpern wurden zwei Lamas, 6 und 5037, mit der rekombinanten enzymatisch aktiven Untereinheit des Toxins (Klaus Aktories, Freiburg) immunisiert. Für die Grundimmunisierung und die Boosts wurden 50 μ g des rekombinanten CDTa in Specol Adjuvans verwendet. Die Toxinuntereinheit wurde in 400 μ l PBS zu 500 μ l des Adjuvans gegeben und bei 4 °C dreimal kurz mit

Ultraschall behandelt. Die Injektionen erfolgten *sub cutan* in den Hals der Lamas. Das Lama 5037 wurde zusätzlich mit Fragmenten von Toxin A (Cysteinprotease-Domäne) und Toxin B (Glucosyltransferase-Domäne) aus *Clostridium difficile* immunisiert (Anhang: 8.3).

Die Induktion der humoralen Immunantwort wurde im ELISA analysiert. Verglichen wurden die Präimmunseren der Lamas 6 und 5037 (Lama 5037: Abb. 4.2.1) sowie die Immunseren nach dem dritten Boost. Zur Detektion der konventionellen und Schwereketten-Antikörper wurden monoklonale Maus anti-Lama-IgG1 bzw. Maus anti-Lama-IgG2c/2b Antikörper verwendet (Abb. 4.3.1). Das Präimmunserum zeigte keine Reaktivität gegen CDTa, während das Immunserum eine starke Reaktivität gegen CDTa zeigte. Die Reaktivität der Immunseren wurde sowohl durch die konventionellen Antikörper als auch die Schwereketten-Antikörper vermittelt.

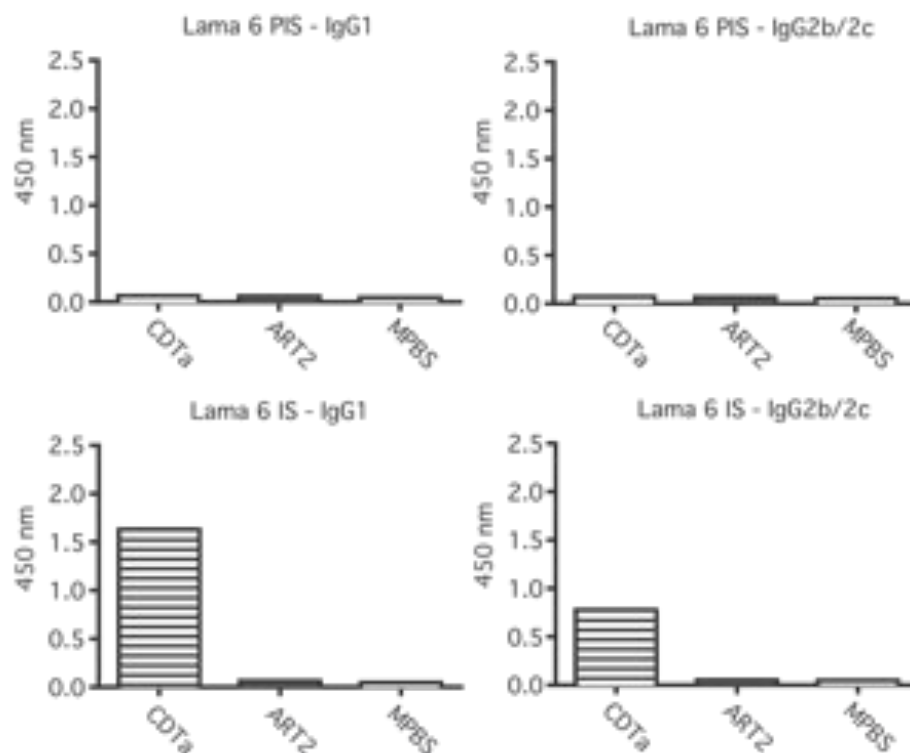


Abb. 4.3.1: ELISA-Analyse der Reaktivität des Immunserums von Lama 6. Untersucht wurde das Lama-Präimmunserum (PIS) und das Lama-Immunserum (IS) von einem mit CDTa immunisierten Lama (6). Reaktivitäten des mit dem "Toxin-Cocktail" immunisierten Lamas 5037 gegen CDTa wurden in Abb. 4.2.2 gezeigt. Über Nacht wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-

Platte bei 4 °C mit 500 ng Antigen/Napf (ART2 und 5% Milchpulver in PBS wurden als Kontrollen verwendet) beschichtet und anschließend die freien Bindungsstellen für 2 h bei RT mit 5% Milchpulver in PBS blockiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet und für 1 h bei RT in den Näpfen inkubiert. Zur Detektion der Antikörper wurden monoklonale Maus anti-Lama-IgG1 bzw. anti-Lama-IgG2c/2b Antikörper (100 µl Hybridoma-Überstand) verwendet. Als Tertiärantikörper wurde ein Schaf anti-Maus-IgG-PO Konjugat (1:5000) verwendet. Die Farbentwicklung mit TMB wurde bei 450 nm am ELISA-reader vermessen.

4.3.2 DNA-Sequenzierungen bestätigen ein breites VHH-Repertoire in den klonierten Phagen-Display-Bibliotheken

Zur Klonierung des VHH-Repertoires der immunisierten Lamas in Phagen-Display-Bibliotheken wurden periphere Blut-Lymphozyten zehn Tage nach dem dritten Boost für die Bibliothekserstellung abgenommen (Anhang: 8.3). Aus den Lymphozyten wurde zunächst RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus dieser wurden die VHH kodierenden Regionen der Schwereketten-Antikörper PCR-amplifiziert (SHF_xSHR, LHF_xLHR; Anhang: 8.2.3). Die VHH-Fragmente wurden in den Phagemid-Vektor pHEN2 kloniert. Für das Lama 6 konnte eine Primärbibliothek mit berechnet $9,7 \times 10^4$ *long hinge* (IgG2c) Klonen und für das Lama 5037 Primärbibliotheken mit etwa $4,3 \times 10^4$ *short hinge* (IgG2b) und $7,8 \times 10^4$ *long hinge* Klonen generiert werden (Tab. 4.3.1). DNA-Sequenz-Analysen aus jeweils 12 zufällig gewählten Klonen (Anhang: 8.5) bestätigten die erfolgreiche Klonierung eines breiten VHH-Repertoires der Bibliotheken (Tab. 4.3.2). Die VHHs wiesen CDR3-Längen zwischen drei und 20 Aminosäuren auf. Nur einer der sequenzierten Klone wies ein zusätzliches Cysteinpaar zwischen der CDR2 und der CDR3 auf. Alle weiteren Klone verfügten nur über das kanonische Cysteinpaar, das sich zwischen der FR1 und der FR3 ausbildet. Insgesamt konnten fünf von 36 abgegebenen Sequenzierungen waren nicht lesbar. Zwei der Klone verfügten über interne Stopcodons, zwei Klone wurden als Duplikate gefunden.

Tab. 4.3.1: Übersicht über die generierten *short hinge* (S) und *long hinge* (L) Primärbibliotheken aus dem mit CDTa immunisierten Lamas (6 und 5037). Es wurden jeweils 12 zufällig gewählte Klone sequenziert. #Seq gibt die Anzahl der sequenzierten Klone an, ORF (*open reading frame*) gibt an wie viele der Klone ein korrektes Leseraster aufwiesen, CDR3 gibt die Anzahl der Aminosäuren in derselbigen an. D: Duplikate, steht für Klone, die mehr als einmal

gefunden wurden. aCDTa gibt an wie viele der in der Primärbibliothek gefundenen Klone in den gefundenen Familien nach Selektion wiedergefunden werden konnten.

Lama	<i>hinge</i>	#Klone	#Seq	ORF	CDR3	D	aCDTa	
6	l	9,7x10 ⁴	12	12	3-20	2x2	0	
5037	s	4,3x10 ⁴	12	8	12-17	0	0	2x nicht lesbar, 2x Stopcodons
5037	l	7,8x10 ⁴	12	9	6-19	0	0	3x nicht lesbar
Summe		2,2x10⁵				2x2	0	

4.3.3 ELISA-Analysen zeigen die spezifische Bindung von fünf CDTa VHH-Familien

CDTa spezifische VHHs wurden über zwei unterschiedliche Selektionsstrategien der Phagen-Display-Technologie angereichert. Für das Festphasenpanning wurde das rekombinant in *E. coli* hergestellte CDTa in den Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte immobilisiert. Für das Biotinpanning wurde das CDTa biotiniliert und nach Phagen Bindung über Streptavidin beschichtete beads immobilisiert. Die Bibliotheken wurden zwei bis drei Selektionszyklen unterzogen. Nach jeder Runde wurden erneut 12 Klone sequenziert, um den Erfolg der Selektionsrunde zu überprüfen. Klone, die häufiger als einmal oder von denen mehrere Klone mit geringen Abweichungen in der Aminosäuresequenz der CDR3 gefunden werden konnten, wurden als VHH-Familien definiert. Es wurden jeweils sechs VHH-Familien aus Lama 6 und Lama 5037 an immobilisiertem CDTa selektioniert.

Tab. 4.3.2: Übersicht über die selektionierten VHH-Familien gegen CDTa. FP steht für Festphasenpanning, BP für Biotinpanning. Die Zahlen stehen für die Häufigkeit, mit der die Klone nach den einzelnen Selektionsrunden (RU) gefunden wurden. CDR3 zeigt die Abfolge der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code in derselbigen. Zusätzliche Cysteine in der CDR3 sind in rot hervorgehoben. nd steht für nicht durchgeführte Selektionsrunden bzw. wurden keine Sequenzierungen durchgeführt. Für VHHs die in rot dargestellt wurden, konnte neben der Bindung im ELISA auch die Blockade der Enzymaktivität *in vitro* bestätigt werden. Die VHH, die in rot fett dargestellt wurde, zeigte zusätzlich neutralisierende Wirkung in Intoxikationsversuchen an MDCK-II Zellen. Getestet wurde jeweils der am häufigsten gefundene Klon einer Familie.

Lama 6 (CDTa)

Name	Seqnr.	FP			BP			CDR3
		1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
L+8	2621	-	2	-	-	-	-	E CGGYGAH
L-14.1a	2200	-	1	-	-	-	-	GDWGAYTLNTAYAN
L-14.1b	2204	1	-	-	-	-	-	GDWGAYSLNTAYAN
L-14.2	2622	-	2	-	-	-	-	TYRPNTFTPAEYDY
L-15.1a	2169	2	1	-	-	-	-	GGFTEAYSGTYYPDS
L-15.1b	2618	1	-	-	-	-	-	GGFTEAYSGTYYPDS
L-15.2	2177	1	-	-	-	-	-	LGSGYGCILAYEFDY
L+18a	2173	1	1	-	-	-	-	LGSGYGC S LFTTTVGMDY
L+18b	2171	1	1	-	-	-	-	LGSGYGCYAFTPAYGMDY
L+18c	2615	-	1	-	-	-	-	LGSGYGCYLFTTTVGMDY
L+18d	2203	-	1	-	-	-	-	LGSGYGC S AFTTTVDMDY
L+18e	2168	1	-	-	-	-	-	LGSGYGCYLWTTTVDMDY
L+18f	2179	1	-	-	-	-	-	LGSGYGCYLFTTTVDMDY
einzel		10	9	nd	nd	nd	nd	
unlesb		1	10	12	nd	nd	nd	

Lama 5037 (CDTa, ToxA-CPD, ToxB-GT)

Name	Seqnr.	FP			BP			CDR3
		1. Ru	2. Ru	3. Ru	1. Ru	2. Ru	3. Ru	
S-14	2531	-	-	-	-	3	2	DRGTYGFDLDDFGS
S+/-15	2528	-	-	-	-	1	-	DRGLYQDSR C LRRYDY
S-15	2537	-	-	-	1	1	-	DKFMWRMVLPGDYDY
S+16	2348	-	1	-	-	1	-	DRGAYLTTG C LKRYDY
S-17a	2351	-	5	-	-	-	-	MGAIFAVPGTGVNEYDR
S-17b	2350	-	1	-	-	-	-	MGALFALPGTGINEYDI
S-20a	2352	-	4	-	1	3	5	ADQRVGYIEYSGSSGKEYDY
S-20b	2539	-	-	-	-	1	2	AAQRIGYIEYSGSSGKEYDY
S-20c	2529	-	-	-	-	1	-	ANQRIGYIEYSGNSGKEYDY
S-20d	2336	-	-	-	1	-	-	ADQRVGYIEYSGSSGKEYDY
einzel		nd	7	nd	10	4	1	
unlesb		nd	7	nd	2	2	2	

Die spezifische Bindung der selektionierten VHHs an CDTa wurde mittels ELISA in einem bivalenten VHH Format analysiert (nach Vorinkubation der VHHs mit einem monoklonalen anti-c-Myc-Antikörper in einem molaren Verhältnis von 1:7). Die Antigene wurden über Nacht in den Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte immobilisiert und nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit 5% Milchpulver in PBS, wurden die VHHs für 1 Stunde in den Vertiefungen inkubiert. Die Detektion erfolgte mit TMB und wurde durch die Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Farbentwicklung

mit TMB wurde bei 450 nm am ELISA-*reader* vermessen (Abb. 4.3.2). Fünf der 12 selektionierten anti-CDTa VHHs (L+8, L-14.2, L-15.1, L+18, S-20) zeigten eine spezifische Reaktivität. Als Kontrolle wurde SpvB verwendet, eine ADP-Ribosyltransferase, die - wie CDTa - Aktin an Arg-177 modifiziert. In der Coomassie-Färbung des Kontrollgels sind zum Teil Doppelbanden auf der für VHHs typischen Höhe (15-18 kDa) zu erkennen. Dies könnte auf eine Abspaltung des 6xHis/c-Myc-Tags durch Proteasen hinweisen.

Die Bindungsaffinität der selektionierten VHHs gegen CDTa wurde in einem monovalenten ELISA-Format semiquantitativ bestimmt (Abb. 4.3.3). Dazu wurde eine konstante Konzentration der Antigene immobilisiert und die VHHs in einer seriellen Verdünnung für die Detektion verwendet.

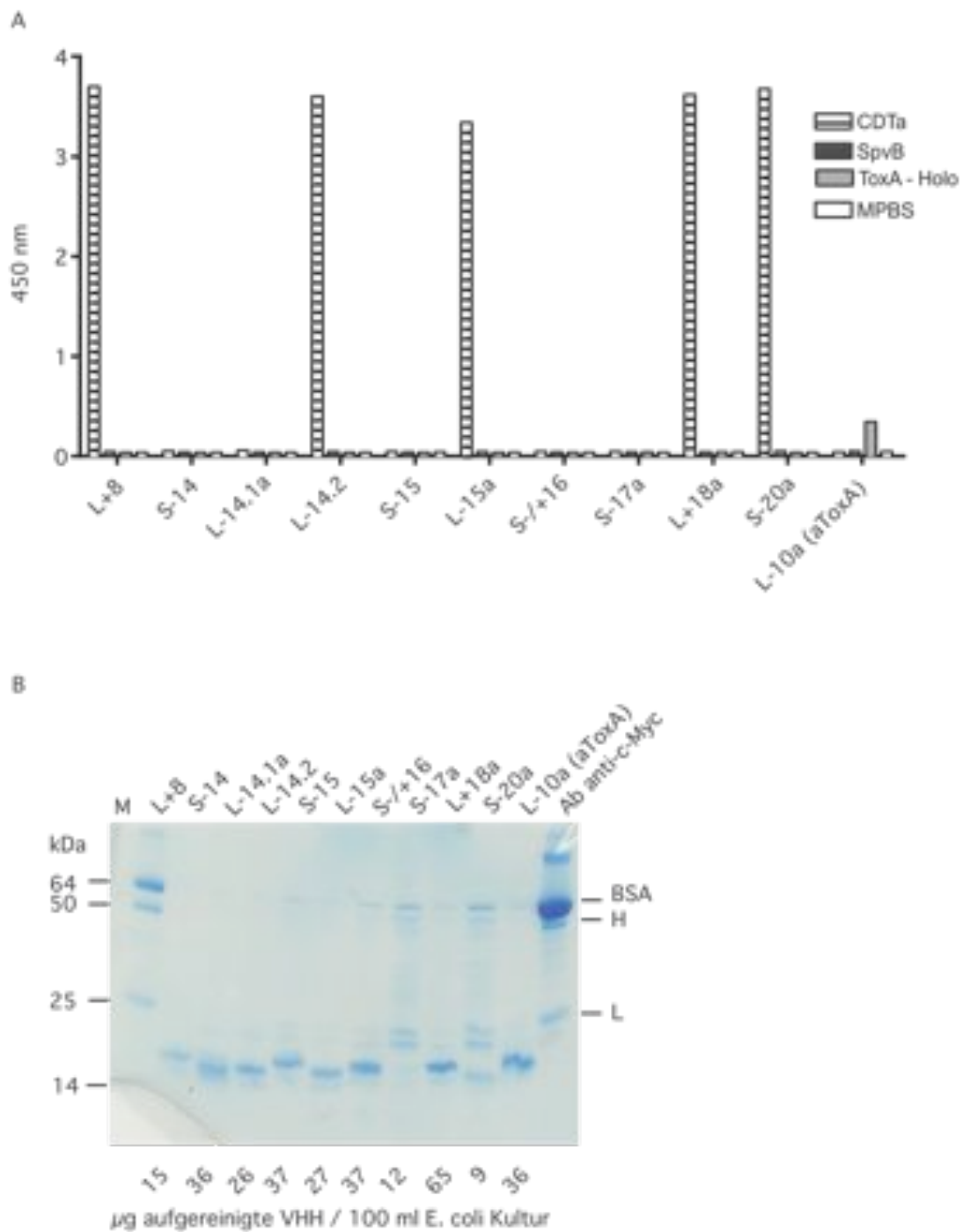


Abb. 4.3.2: ELISA-Analyse der Reaktivitäten der selektierten VHHs in einem bivalenten Format gegen CDTa. (A) Über Nacht wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte bei 4 °C mit 500 ng der Antigene beschichtet und anschließend für 2 h bei RT mit 5% Milchpulver in PBS die freien Bindungsstellen blockiert. 100 ng der VHHs wurden mit 700 ng eines Maus anti-c-Myc-Antikörpers für 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend für eine Stunde bei RT in die Vertiefungen der Mikrotiter-Platte gegeben. Als Tertiärantikörper wurde ein Schaf anti-ms-IgG-PO Konjugat (1:5000, 1h bei RT) verwendet. Die Farbentwicklung mit TMB wurde bei 450 nm am

ELISA-reader vermessen. (B) SDS-PAGE-Analyse der im ELISA eingesetzten Proteine. Zur Produktion der VHHs wurde der *E. coli*-Stamm HB2151 verwendet, der das Amber-Stopcodon zwischen VHH und dem gIII Kapsidprotein des M13-Phagen erkennt. Die Konzentration der mittels Nickel-NTA affinitätsgereinigten VHHs wurde spektrophotometrisch bestimmt. Es wurden jeweils 500 ng der Proteine pro Spur aufgetragen. Unter dem Bild ist die errechnete Gesamtausbeute an VHH aus 100 ml Kulturvolumen angegeben. . H = *heavy chain*. L = *light chain*. BSA = bovines Serumalbumin. M = Molekulargewichtsmarker.

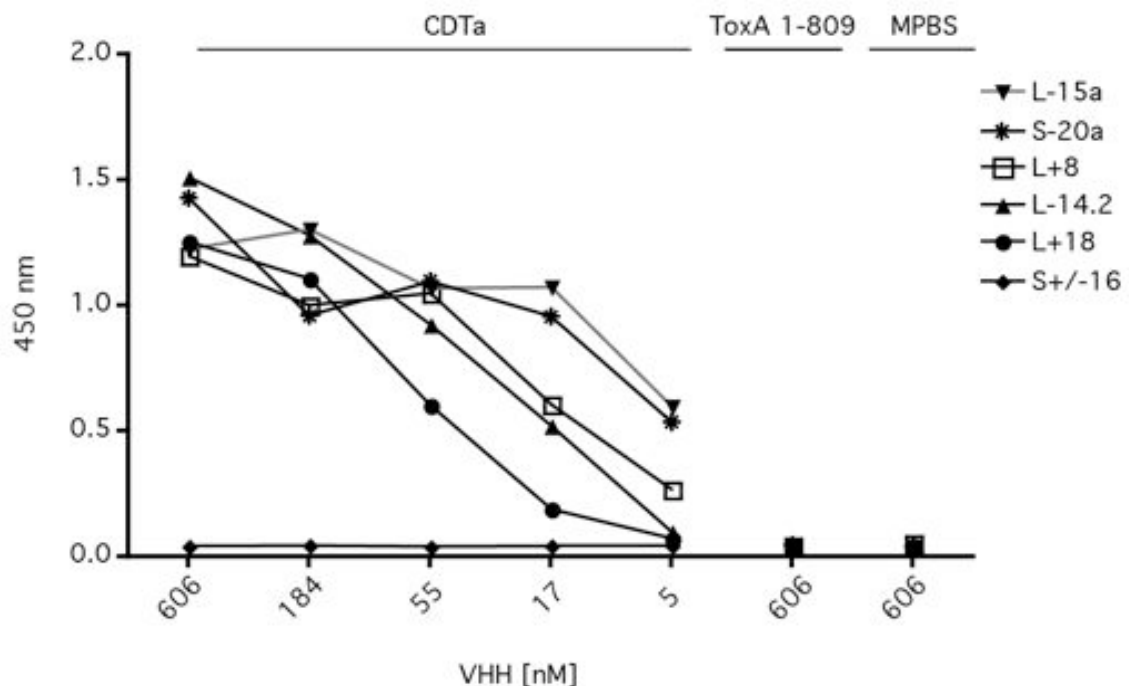


Abb. 4.3.3: Semiquantitative ELISA-Analyse der Bindungsstärke der CDTa-spezifischen VHHs in monovalentem Format. Über Nacht wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte bei 4 °C mit 500 ng der Antigene beschichtet und anschließend für 2 h bei RT mit 5% Milchpulver in PBS die freien Bindungsstellen blockiert. Die VHHs wurden in 1:3,3 Verdünnungsschritten (1 µg - 10 ng) für eine Stunde in den Vertiefungen der ELISA Platte inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein monoklonaler Sekundärantikörper gegen anti-c-Myc (700 ng) verwendet, der nach einstündiger Inkubation mit einem Schaf anti-ms-IgG PO Konjugat (1:5000, 1h bei RT) detektiert wurde. Die Farbentwicklung mit TMB wurde bei 450 nm am ELISA-reader vermessen.

4.3.4 Fünf VHH-Familien blockieren die enzymatische ADP-Ribosylierung von Aktin durch CDTa

Zunächst wurde das System für die Untersuchung zur Inhibition der ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) etabliert. Unterschiedliche ARTs wurden mit den Proteinen eines HEK-Zelllysats als Substrat in der Gegenwart von ^{32}P -NAD inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die inkorporierte Radioaktivität mittels Autoradiographie detektiert (Abb. 4.3.4). In der Spur 1 zeigt die Proteine eines Lysats, dem keine exogene ART zugegeben. Im höher molekularen Bereich sind hier und in den anderen Spuren Banden zu erkennen, die auf eine Automodifikation endogener poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) zurückzuführen sein könnten, die bei der Präparation der Zelllysate aus dem Kern freigesetzt worden sein könnten. In Spur 2 sind viele, durch die promiskuitive murine ART2.2 modifizierte Proteine zu erkennen, in den Spuren 3 und 4 die spezifische ADP-Ribosylierung von Aktin (42 kDa) (an Arg-177) durch SpvB und CDTa, in Spur 6 und 7 ist die ADP-Ribosylierung von Rho (an Asn-41) durch EDIN und C3, und in Spur 8 die ADP-Ribosylierung von G α (an Cys) durch Pertussis Toxin zu sehen. In der Spur 9 sind keine markierten Banden zu erkennen. Hier wurde die NADase CD38 zugegeben. Die Hydrolyse des NADs verhindert die ADP-Ribosylierung, so dass hier auch keine durch endogene Enzyme verursachten Banden im höhermolekularen Bereich erscheinen

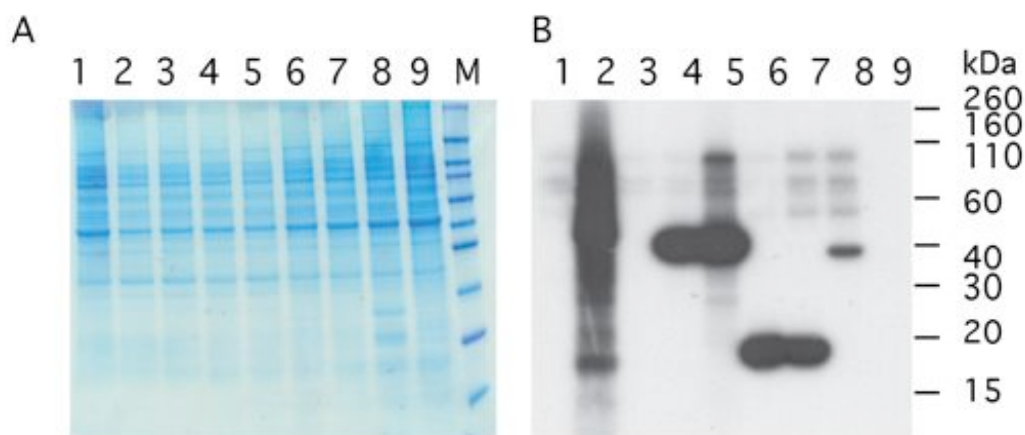


Abb. 4.3.4: Untersuchung der ADP-Ribosylierung unterschiedlicher Zielmoleküle durch rekombinante ADP-Ribosyltransferasen (ARTs). 100 ng der ARTs wurden mit 50 μl HEK-Zelllysats und ^{32}P -NAD (1 μCi /Ansatz) vermengt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion

wurde durch Zugabe von 15 µl Strataclear-Resin gestoppt. Die Proteine wurden durch die Matrix gebunden und durch Zentrifugation (30 s, 12000 rpm, RT) präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Erhitzen in 20 µl SDS-haltigem Probenpuffer gelöst, mittels SDS-PAGE analysiert und autoradiographisch ausgewertet. (A) Coomassie-Färbung des SDS-PAGE Gels. (B) Autoradiographie des Gels zur Detektion der radioaktiv markierten Proteine. (Spur 1: Kontrolle ohne zugesetztes Enzym, Spur 2: promiskuitive murine ART2.2, Spur 3: inaktives Choleratoxin aus *Vibrio Cholerae*, Spur 4: Aktin-spezifisches CDTa aus *Clostridium difficile*, Spur 5: Aktin-spezifisches SpvB aus *Salmonella entericae*, Spur 6: rho-spezifisches EDIN aus *Staphylococcus aureus*, Spur 7: rho-spezifisches C3-Toxin aus *Clostridium botulinum*, Spur 8: Gα-spezifisches Pertussis Toxin aus *Bordetella pertussis*, Spur 9: humanes CD38, eine NADase, M: Molekulargewichtsmarker.

Der gleiche Versuch wurde durchgeführt, um einen möglichen hemmenden Effekt der VHHs auf die CDTa-katalysierte ADP-Ribosylierung zu untersuchen. Dazu wurden 100 ng des rekombinanten CDTa mit unterschiedlichen Mengen der VHHs (für 20 min bei RT) vorinkubiert. Es folgte die Zugabe von HEK-Zelllysate und ³²P-NAD. Die Reaktionsprodukte wurden über eine SDS-PAGE-Analyse aufgetrennt und die ADP-Ribosylierung von Aktin durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 4.3.5). Die Ergebnisse zeigten bei den VHHs S-15 und S-17a, die bereits in ELISA-Analysen keine Reaktivität mit CDTa gezeigt hatten, selbst in großen Überschuss (16:1) eine ungeminderte Markierung der Aktinbande, während die Zugabe der VHHs S-20a, S-20c, L+8, L+18e, L-14.2 und L-15a dosisabhängig die ADP-Ribosylierung inhibierten. Zur Kontrolle des Mischverhältnisses von CDTa und VHH wurde ein Aliquot vor Zugabe zu den HEK-Zellen mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert. S-20a und S-20c zeigten eine 50%ige Hemmung der Aktin-ADP-Ribosylierung bei einem molaren Verhältnis zu CDTa von 4:1, die anderen VHHs (L+8, S-15, L+18 und L-14.2) bereits bei einem molaren Verhältnis von 2:1.

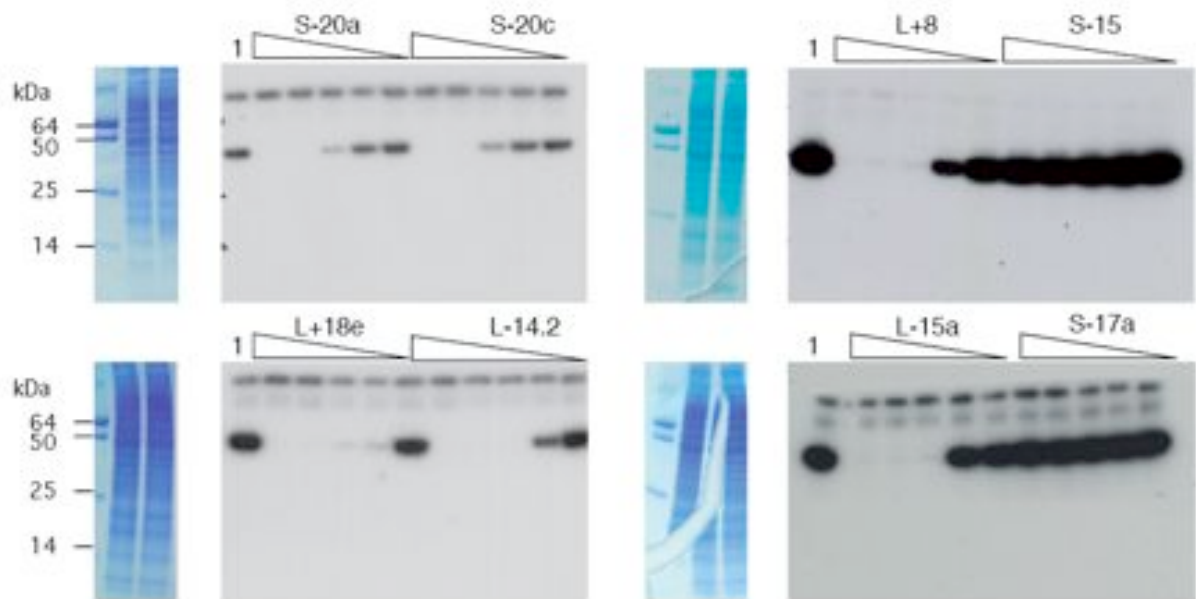


Abb. 4.3.5: Blockade der Aktin ^{32}P -ADP-Ribosylierung durch CDTa mit spezifischen VHHs. Fünf der fünf CDTa-spezifischen VHHs blockierten die Aktivität des Enzyms *in vitro*. 100 ng CDTa wurde mit verschiedenen Mengen der VHHs (330 - 21 ng) für 20 Minuten bei RT vorinkubiert (molares Verhältnis 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16; Spur 1: ohne VHH). Anschließend wurde dieser Reaktionsansatz mit ^{32}P -NAD (1 μCi /Ansatz) und den HEK-Zelllysaten (20 μl) als Substrat für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des SDS-PAGE-Probenpuffers und Inkubation für 15 min bei 70 °C gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (jeweils ein Ausschnitt links neben der Autoradiographie abgebildet) und die ADP-Ribosylierung von Aktin (42 kDa) autoradiographisch ausgewertet (jeweils der rechte Teil der Abbildung).

4.3.5 Die VHH L+8 inhibiert die CDTa vermittelte Zytotoxizität

Intoxikationsversuche an MDCK-II zeigen, dass die VHH L+8 die CDTa vermittelte Zytotoxizität inhibiert. Durch die Übertragung der ADP-Ribosegruppe auf Aktin kommt es *in vivo* zunächst zu Mikrotubuli basierten Ausstülpungen auf der Zelloberfläche und schließlich zu einem Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts. Der Effekt von CDTa auf das Aktinzytoskelett konnte durch Anfärbung fixierter Zellen mit Phalloidin sichtbar gemacht werden. 0,5 μg CDTa und 1 μg CDTb wurden für 30 Minuten mit 3 μg der VHHs vorinkubiert und für eine weitere Stunde mit den Zellen inkubiert. Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen gefärbt mit Phalloidin und Dapi (einem DNA-Farbstoff) und die Morphologie am

Immunfluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 4.3.6). In der Kontrolle ohne Toxin war die Struktur des Aktinzytoskeletts (rot) gut erkennbar. In den Toxin-behandelten Zellen war der Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts und ein Verlust von Zellen zu erkennen. Letzteres ist auf ein Abrunden der MDCK-II Zellen nach Zusammenbruch des Zytoskeletts zurückzuführen, die sich in Folge dessen vom Boden ablösen. Dieser Effekt konnte durch die Vorinkubation des Toxins mit der VHH L+8 verhindert werden. Die VHH L-14.1a, ebenso wie alle anderen getesteten VHHs anti-CDTa, zeigten diesen schützenden Effekt nicht.

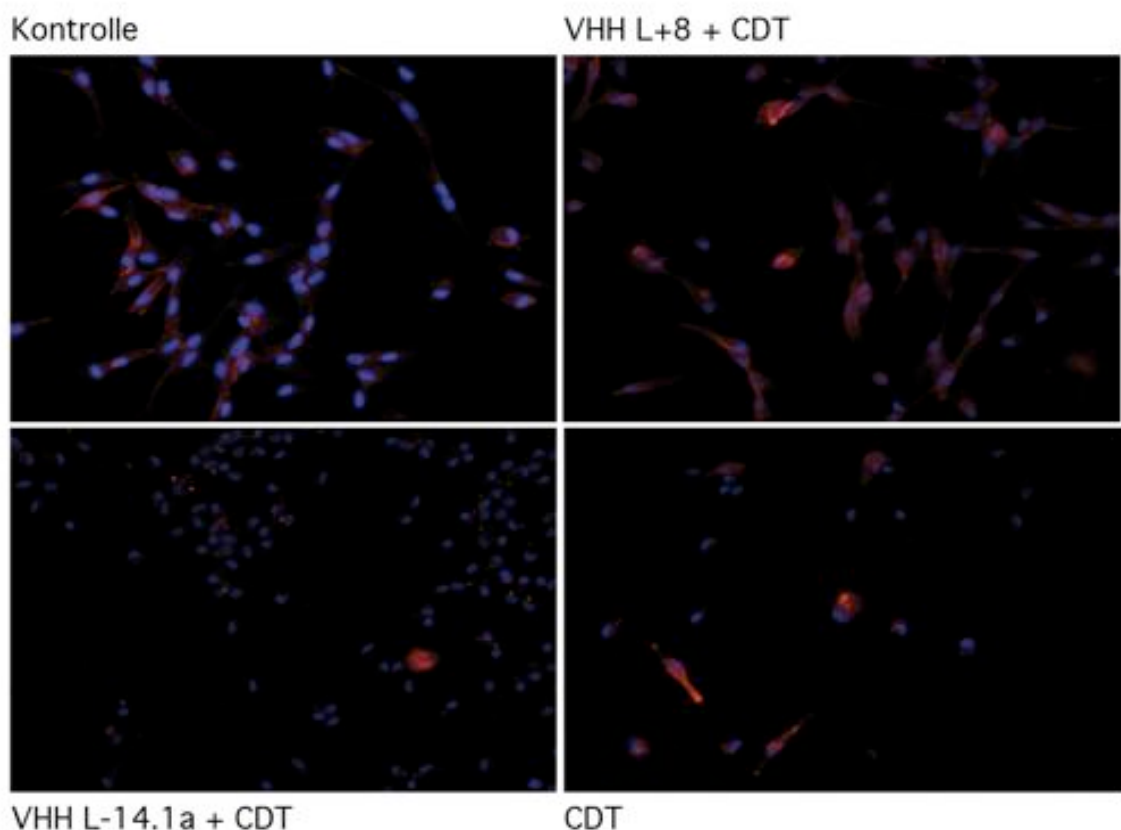


Abb. 4.3.6: Untersuchung zur Inhibition der Zytotoxizität von CDT an MDCK-II Zellen durch VHHs. 3 µg der VHHs wurden mit 0,5 µg CDTa und 1 µg CDTb für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Diese Lösung wurde dann für eine Stunde zu den MDCK-II Zellen gegeben. Nur mit Toxin bzw. unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Die Zellen wurden im Anschluss mit 4% Paraformaldehyd für 15 min bei 4 °C fixiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau), das Aktinzytoskelett mit Phalloidin (rot) für 15 min bei RT angefärbt und die Morphologie der Zellen nach Intoxikation wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M und dem Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8NA analysiert.

Der schützende Effekt der L+8 gegen CDT auf MDCK-II Zellen konnte auch im TEER (*transepithelial electrical resistance*) bestätigt werden. MDCK-II Zellen wurden bis zum Erreichen eines stabilen Zellverbands in den Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte des Transwell-Systems ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung des transepithelialen Widerstandes mit einem Volt-Ohm-Meter überprüft. Beim Erreichen eines stabilen Wertes zwischen 5000 und 10000 wurden die Experimente gestartet. Zunächst wurde die Toxinkonzentration titriert, bei dem ein gut sichtbarer toxischer Effekt zu erkennen war. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen nach 1, 3 und 6 Stunden durchgeführt. Von den Werten wurde der Hintergrund (nur Medium) zur Korrektur abgezogen. Um die Blockade des toxischen Effekts von CDT durch VHHs zu untersuchen, schien CDTa in einer finalen Konzentration von CDTa von 10 nM und CDTb 20 nM geeignet (nicht gezeigt). Im nächsten Versuch wurde das CDTa (10 nM) und CDTb (20 nM) für 20 Minuten bei 37 °C mit 6 µg der VHHs vorinkubiert und erst dann zu den MDCK-II Zellen gegeben. Als Kontrollen wurde nur das Toxin ohne VHHs und nur das Medium ohne Toxin verwendet. Es wurden die TEER-Werte über einen Zeitraum von sechs Stunden alle 60 Minuten gemessen (Abb. 4.3.7). In Abwesenheit des Toxins blieb der TEER-Wert über sechs Stunden konstant. Bei den Toxin behandelten Zellen kam es nach zwei Stunden zu einem deutlichen Abfall dieses Wertes, was auf eine Wirkung des Toxins auf das Aktinzytoskeletts deutet. Dieser Effekt konnte weitgehend durch die Zugabe der VHH L+8 reduziert werden. Wurde die VHH L-14.1a verwendet, konnte kein schützender Effekt nachgewiesen werden.

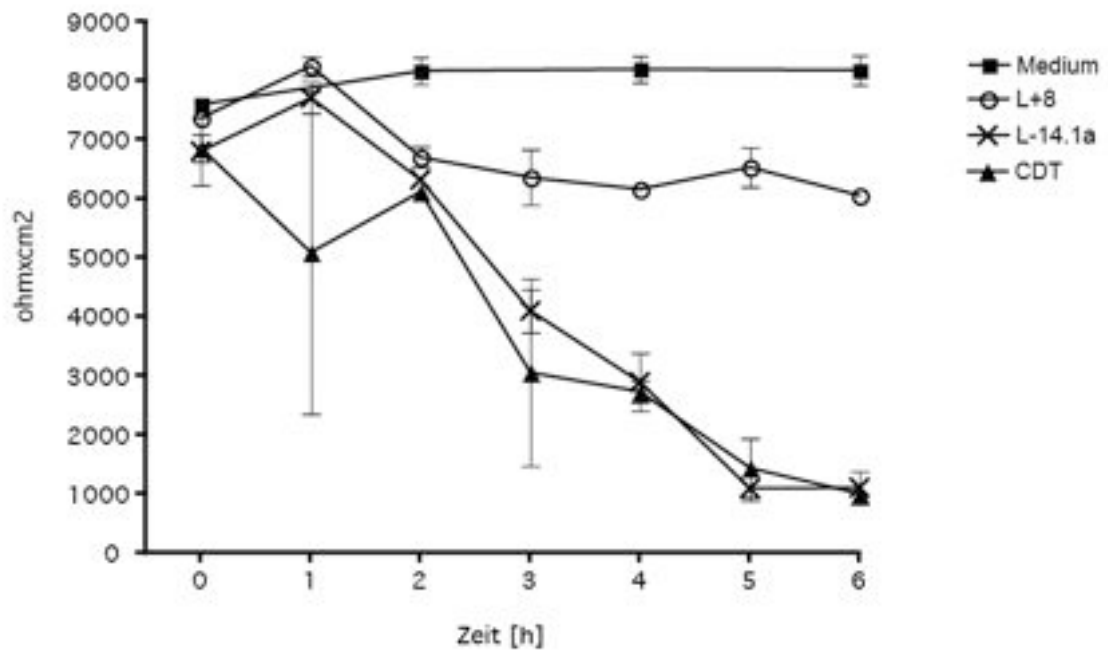


Abb. 4.3.7: VHH vermittelte Inhibition des toxischen Effekts von CDT auf MDCK-II Zellen. MDCK-II Zellen wurden bis zur Konfluenz und Erreichen eines stabilen TEER-Wertes auf Filterplatten mit 0,4 μ M Porengröße wachsen gelassen. CDTa (10 nM) und CDTb (20 nM) wurden mit 6 μ g der VHHs für 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Der TEER-Wert wurde stündlich für 6 Stunden (n=3) mit einem Volt-Ohm-Meter gemessen. Von den ermittelten Werten wurde der Hintergrundwert (nur Medium) subtrahiert. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit der AG Brandner (UKE) durchgeführt.

4.4 Reformatierung der VHHs in bi- und tetravalente Formate

Aufgrund ihrer guten Löslichkeit und hohen Stabilität als einzelne Domäne können VHHs relativ leicht reformatiert werden (Wesolowski, Alzogaray et al. 2009) und so deren Einsatz für verschiedene Anwendungsbereiche optimiert werden. In Abbildung 4.4.1 sind die im Rahmen dieser Arbeit generierten VHH-Varianten schematisch dargestellt (s. auch Abb. 1.4.1). Für die Klonierung wurden jeweils einige interessant erscheinende VHHs ausgewählt. Die Klonierung der Dimere (Abb. 4.4.1 B) erfolgte durch PCR-basiertes Einfügen eines *linkers* und nachfolgender Drei-Wege-Ligation. Konstrukte für AP (alkalische Phosphatase) - und Fc-Fusionsproteine (Abb. 4.4.1 C, D) wurden durch Umklonierung von PCR-Fragmenten in verfügbare Vektoren generiert.

Für die Klonierung der gezielt biotinilierbaren VHHs (Abb. 4.4.1 E) wurde eine synthetische cDNA entworfen und über die Firma Invitrogen (Geneart) bestellt.

1. VHH Homo- und Hetero-Dimere

Durch die Dimerisierung von zwei VHHs mit gleicher Spezifität kann die Avidität für ein multimeres Antigen, zum Beispiel für ein Membranprotein wie CD38, erhöht werden (Els Conrath, Lauwereys et al. 2001). Die Erhöhung der Avidität für ein lösliches, monomeres Antigen hingegen könnte durch Fusion von zwei VHHs, die verschiedene, nicht überlappende Epitope des Antigens erkennen, erreicht werden. Durch Fusion von zwei VHHs mit unterschiedlichen Antigenspezifitäten könnte zudem die Serum-Halbwertszeit *in vivo* - durch zusätzliche Bindung an Albumin oder IgG - verlängert werden (Coppieters, Dreier et al. 2006; Harmsen, Fijten et al. 2008).

Um die Exprimierbarkeit und Produktion von VHH-Dimeren zu testen, wurden zwei hochaffine VHHs gegen CD38 ausgewählt (L-15.1b und L-19.2a, Abb. 4.1.5). Homo und Hetero-Dimere Konstrukte dieser VHHs wurden mit einem Glycin-Serin-Linker PCR-basiert (Anhang: 8.2.5) generiert und über die Restriktionsschnittstellen *SfiI*, *NotI* und *BamHI* in den Phagemidvektor pHEN2 kloniert. Die korrekte Insertion wurde mittels Sequenzierung bestätigt. Die Dimere wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und über den C-terminalen 6xHis-Tag aufgereinigt. Eine Bande auf der erwarteten Höhe von etwa 35 kDa ist im SDS-PAGE-Gel sichtbar (Abb. 4.4.1 B). Im Vergleich zu monomeren VHHs, war die Ausbeute der Dimere jedoch meist um das zwei- bis 20-fache niedriger. FACS-Analysen bestätigten die Bindung der Dimere an CD38. In Untersuchungen zur Inhibierung der Enzymaktivitäten zeigten die Dimere, ebenso wenig wie die jeweiligen Monomer, keine inhibitorische Wirkung. Möglicherweise eignen sich diese anti-CD38 Dimere für eine sensitivere *in vivo imaging* Diagnostik von CD38-exprimierenden Leukämien (s. Abschnitt 5.2).

2. PhoA-VHH-Fusionsproteine

Eine elegante Option zur Herstellung von nicht-kovalent verbundenen Dimeren ist die Fusion von VHHs an die bakterielle Alkalische Phosphatase (PhoA), die spontan dimerisiert (Muller, Chevrier et al. 1999). Die Kopplung an PhoA ermöglicht zudem den direkten Einsatz der Fusionsproteine in Enzym-

gekoppelten Immunoassays und ermöglicht somit die Verwendung in der Diagnostik und das *epitop-mapping*. Ein weiterer potentieller Vorteil der PhoA als Fusionspartner liegt darin begründet, dass sie ein natürlich vorkommendes, effizient produziertes Periplasmaprotein ist.

Um die Exprimierbarkeit und Produktion von VHH-PhoA Fusionsproteinen zu testen, wurden jeweils zwei hochaffine VHHs gegen CD38 (L-15.1b und L-19.2a, Abb. 4.1.5), ToxA-CPD (L-10a, L-11a, Abb. 4.2.3) und CDTa (L+8, S-20c, Abb. 4.3.3) ausgewählt. Die VHHs wurden nach Anfügen der Schnittstellen *Sall* und *NdeI* mittels PCR und anschließendem Verdau (Anhang: 8.2.4) in den Expressionsvektor pQUANTagen kloniert. Nach Transformation in *E. coli* XL-2 *blue* (die keine endogene PhoA Aktivität aufweist) konnten Klone mit *in frame* Insertion der VHHs einfach nach Zugabe des PhoA-Substrats BCIP durch Blaufärbung identifiziert werden. Die Fusionsproteine wurden rekombinant produziert. Das PhoA-Fusionsprotein war bereits ohne weitere Aufreinigung als prominenteste Bande im Periplasmalysat auf einer Höhe von etwa 64 kDa sichtbar (Abb. 5.4.1 C). Als Negativ-Kontrolle wurde ein 3000 bp Fragment aus dem Lama-Genom in den Vektor kloniert. Periplasmalysate aus mit diesem Konstrukt transformierten *E. coli* zeigten keine prominente Bande auf der Höhe der PhoA-Fusionsproteine. Die Bindung der VHH-PhoA-Fusionsproteine an die Zielantigene konnte im ELISA bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten an, dass die Produktionseffizienz durch Fusion an PhoA selbst im Vergleich zu den Monomeren noch gesteigert werden kann.

3. VHH-Fc-Fusionsproteine

Eine weitere Option zur Herstellung von bivalenten Formaten stellt die Fusion an den Fc-Teil konventioneller Antikörper dar, die über Disulfidbrücken in der *hinge*-Region kovalent verknüpfte Dimere ausbilden (Hmila, Abdallah et al. 2008). Durch den Fc-Teil wird zum einen die Serum-Halbwertszeit *in vivo* erhöht, da der Dimer mit einem Molekulargewicht von 75-80 kDa anders als VHH-Monomere und Dimere oberhalb der renalen Filtrationsgrenze liegt. Zum anderen können Effektorfunktionen über den Fc-Teil vermittelt werden, was für bestimmte therapeutische Applikationen bedeutsam sein kann. Fc-Fusionsproteine können aufgrund der Größe effizienter in Säugerzellen (z.B. HEK- oder CHO-Zellen) exprimiert werden als in *E. coli*. Trotz hoher Produktionskosten eignen sich in HEK-Zellen produzierte Antikörper-

Konstrukte besser für *in vivo* Anwendungen, da sich hier, anders als bei *E. coli* das Problem der Kontamination mit Lipopolysaccharid nicht ergibt.

Um die Exprimierbarkeit und Produktion von VHH-Fc-Fusionsproteinen zu testen, wurden die beiden hochaffinen VHHs (L-15.1b und L-19.2a, Abb. 4.1.5) gegen CD38 ausgewählt. Diese VHHs wurden nach Anfügen der Schnittstellen *BglII* und *XhoI* (Anhang: 8.2.6) über PCR in den pME-Vector kloniert. Die korrekte Insertion wurde über Sequenzierung bestätigt. Die VHH-Fc-Fusionsproteine wurden als sezernierte, N-terminal mit einem FLAG-Tag versehene Proteine, in transient transfizierten HEK-Zellen exprimiert. Über eine Affinitätsreinigung an immobilisiertem M2-anti-Flag Antikörper konnten Fc-Fusionsproteine gereinigt werden. Die SDS-PAGE Analyse zeigte deutliche Banden auf der erwarteten Höhe von 40 kDa unter reduzierenden Bedingungen.

4. Tetramerisierung biotinilierter VHHs an Streptavidin

Eine Strategie zur Multimerisierung von VHHs bietet die zielgerichtete Biotinilierung an einer Position der VHHs und die Tetramerisierung über Streptavidin, das vier Bindestellen für Biotin trägt. Für die Austestung dieses Systems wurden Toxin A und Toxin B spezifische VHHs ausgewählt. Hierzu wurde zunächst eine synthetische cDNA entworfen, die für eine von der AG Tanha publizierte ToxA-spezifische VHH kodiert (Hussack, Arbabi-Ghahroudi et al. 2011). Diese bindet an ein Epitop in den repetitiven Rezeptorbindenden Domänen des Holo-Toxins. An diese VHH wurde die kodierende Sequenz für den Avi-Tag angefügt, der eine Erkennungssequenz für die Biotin-Ligase BirA enthält (Kay, Thai et al. 2009). Das von Geneart gelieferte Insert wurde in den Vector pHEN2 umklontiert. Die VHH-avi-Tag Monomere wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und über den 6xHis-Tag gereinigt (Abb. 4.4.1 E). Die SDS-PAGE Analyse zeigt eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe von ca. 18 kDa bei einer Ausbeute, die vergleichbar mit den 6xHis-myc getagten Monomeren ist.

Nach enzymatischer Biotinilierung und Konjugation an Streptavidin beschichtete beads (Abb. 4.4.1 F) könnten hochmolekulare Strukturen für die Anreicherung aus Stuhlproben bzw. zur Neutralisierung im Darm generiert werden (Abb. 5.2).

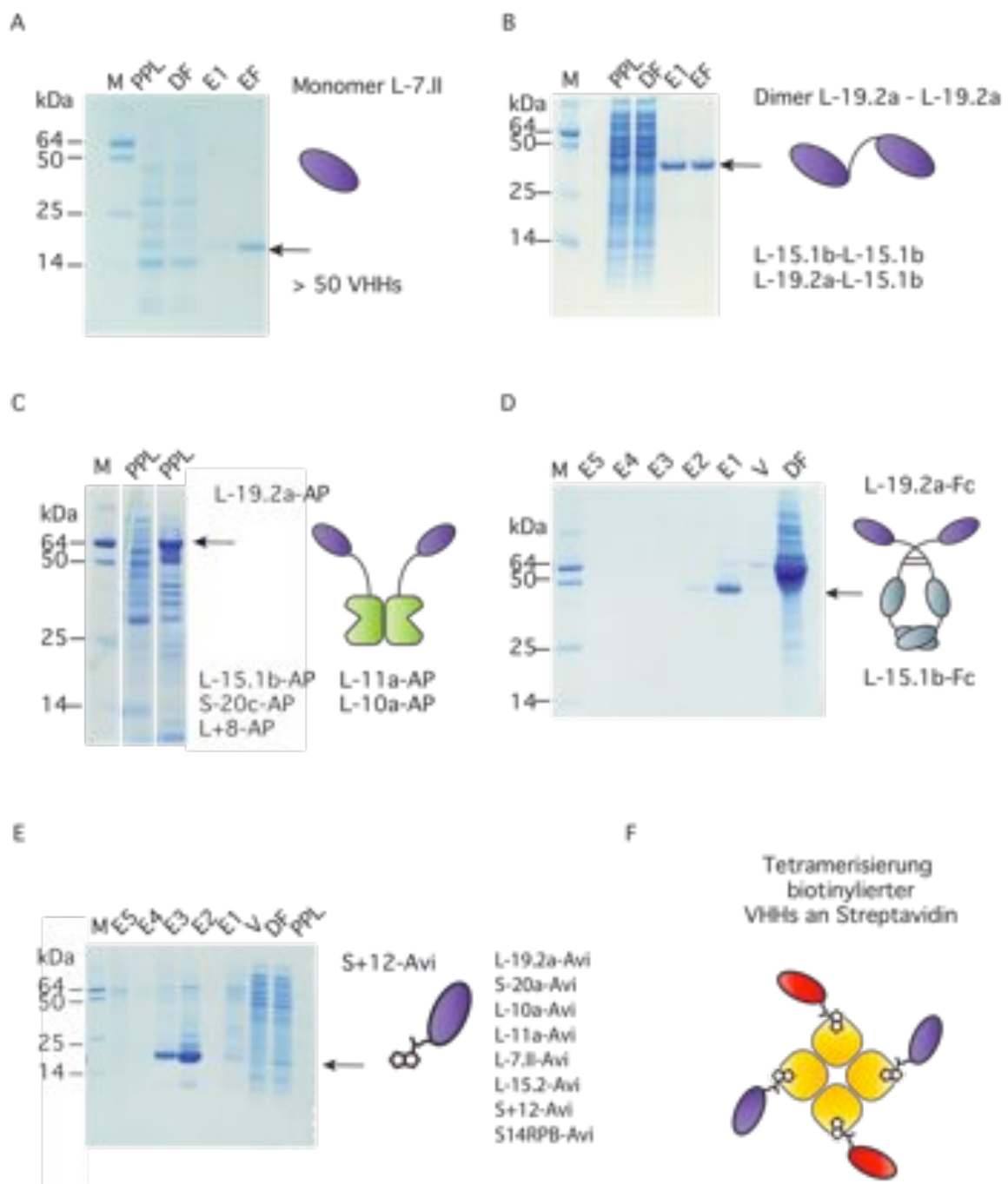


Abb. 4.4.1: Analyse der Expression von unterschiedlichen VHH-Konstrukten (A) Aufreinigungsprozess der VHH L-7.II und Analyse mittels SDS-PAGE. Zur Produktion der VHHs wurde der *E. coli*-Stamm HB2151 verwendet. Die transformierten *E. coli* wurden in 100 ml Kulturvolumen in 2xYT-Carb-Medium bis zu einer OD von 0,5 gezüchtet, bevor die Expression der VHHs durch Zugabe von IPTG (1 mM) für 3 h bei 37 °C induziert wurde. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation geerntet (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Für die Lyse wurden 5 ml TS-Puffer pro Gramm Bakterienpellet verwendet und nach Resuspension für 30 min auf Eis lysiert. Im Anschluss

wurde für 30 min bei 20000 rpm und bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde steril filtriert und die VHHs über den C-terminalen 6xHis-Tag an Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Je 10 µl des Periplasmalysats (PPLs) und des Durchflusses (DF) wurden auf das Gel aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 10 ml Waschpuffer (W) gewaschen und 10 µl wurden aufgetragen. Mit Elutionspuffer wurden je 900 µl *void* und 2 ml einer Elutionsfraktion aufgefangen und 10 µl aufs Gel aufgetragen. Die 2 ml Eluat wurden über Zentrifugationsröhrchen mit einem MWCO von 3500 Dalton umgepuffert und auf 500 µl eingeeengt. 10 µl des finalen Eluats (EF) wurden aufgetragen (B) Die Dimere wurden wie in (A) beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Das Kulturvolumen betrug jedoch 500 ml. (C) Für die VHH-AP Konstrukte wurden 5 ml einer über Nachtkultur in LB-Carb-Medium angesetzt. Davon wurden 240 µl zu 12 ml 2xYT-Carb-Medium zugegeben und bei 37 °C bis OD 0,5 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG für 3 h bei 37 °C induziert. Die Kultur wurde im Anschluss zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C) und 30 min auf Eis in TS-Puffer lysiert. Im Anschluss wurde für 10 min bei 4000 rpm bei 4 °C gefolgt von 13000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Es wurden jeweils 10 µl des Periplasmalysats (PPL) aufgetragen. (D) Aufreinigungsprozess der VHH-mFc-Konstrukte in HEK-Zellen und Analyse mittels SDS-PAGE. Zur Produktion wurden 4-8x10⁵ HEK-Zellen in 500 ml DMEM-Medium mittels Lipofektion mit 20 µg Plasmid-DNA (pME-Vektor) transfiziert. Der Überstand wurde nach fünf Tagen abgenommen, steril filtriert und die VHH-mFc-Fusionsproteine über den N-terminalen Flag-Tag an M2-Agarose Säulen aufgereinigt. Es wurden in jeder Spur 10 µl der Fraktionen aufgetragen. Spur 1: Periplasmalysat (PPL) nach M2-Säule, Spur 2: *void* (V), Spur 3-7: Eluat (E) 1-5. M = Molekulargewichtsmarker (E) Die VHHs mit Avi-Tag wurden wie die in (A) beschriebenen Monomere exprimiert und aufgereinigt. Das Kulturvolumen betrug 1 l.

5 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit selektionierten VHHs aus Phagen-Display-Bibliotheken immunisierter Lamas gegen CD38 und die drei Enzym-Toxine aus *Clostridium difficile* zeigen strukturelle und funktionelle Auffälligkeiten, die im ersten Abschnitt diskutiert werden. Ferner fällt auf, dass unter den Toxin-spezifischen VHHs ein hoher Anteil die Enzymaktivität inhibieren kann. Mögliche Gründe dafür werden im zweiten Abschnitt erörtert. Für die CD38-spezifischen VHHs konnte die Bindung an natives CD38 auf der Zelloberfläche von peripheren Blut-Leukozyten bestätigt werden. Damit ist die Grundlage für einen möglichen Einsatz dieser VHHs für das *in vivo imaging* der chronisch lymphatischen Leukämie gegeben und wird im dritten Abschnitt diskutiert. Die Mögliche Nutzung der Toxin-spezifischen VHHs für diagnostische und therapeutische Anwendungen wird im letzten Abschnitt evaluiert. Das Kapitel endet mit einem Ausblick für die Weiterführung der einzelnen Teilprojekte.

5.1 Die selektionierten VHH-Familien gegen die vier Enzym-Antigene zeigen einige strukturelle und funktionelle Auffälligkeiten

Aus den erfolgreich hergestellten Lama-Immunbibliotheken wurden über Panning (Smith 1985) spezifische VHHs gegen alle vier Antigene angereichert (an Polystyroloberflächen, auf transfizierten Zellen und an Streptavidin-Agarosekügelchen). Die selektionierten VHHs wurden sequenziert und konnten anhand von Sequenz-Ähnlichkeiten der CDR-Regionen in Familien eingeordnet werden (Tab. 4.1.1, Tab. 4.2.2, Tab. 4.3.2) Nach rekombinanter Expression in *E. coli* konnte die spezifische Bindung der VHHs im ELISA (Abb. 4.2.2, Abb. 4.3.2) bzw. mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4.1.5) sowohl für die Clostridien-Toxine als auch hCD38 bestätigt werden.

Tabelle 5.1.1 zeigt eine Gegenüberstellung der in dieser Arbeit selektionierten spezifischen VHHs. Für das humane CD38 wurden 12 Familien isoliert, von denen keine die Enzymaktivität hemmt. Für die drei bakteriellen Enzym-Toxine wurden jeweils nur wenige (3-5) VHH-Familien angereichert, unter denen 50-100% Enzym-

Inhibitoren vorzufinden waren. Die VHHs gegen alle vier Antigene zeigen ein breites Spektrum an CDR3-Längen (7-24 Aminosäuren).

Tab. 5.1.1: Gegenüberstellung der in dieser Arbeit selektierten Antigen-spezifischen VHH-Familien. Anzahl spezifischer Familien gibt die Anzahl derer an, deren Bindung durchflusszytometrisch bzw. im ELISA bestätigt wurde. CDR3-Längen gibt die Anzahl der Aminosäuren in der CDR3 an. Extra Disulfidbrücken gibt an, wie viele der Familien zusätzliche Cysteine aufweisen. Festphasen-, Biotin und Zellpanning geben die Anzahl der Familien an, die durch diese Selektionsmethode gefunden wurden; Enzyminhibitoren gibt an, wie viele der Familien die enzymatische Aktivität inhibieren können. nd bedeutet die Selektionsmethode wurde nicht durchgeführt.

VHHs anti-	ToxA-CPD	ToxB-GT	CDTa
Anzahl spez. VHH-Familien	3	4	5
CDR3-Längen (Aminosäuren)	10-14	7-14	8-20
extra Disulfidbrücke	0/3	1/4	2/5
Festphasenpanning	3	4	5
Biotinpanning	0	0	1
Zellpanning	nd	nd	nd
Enzyminhibitoren	2/3	2/4	5/5

Ein Vergleich der Sequenzen der selektierten Antigen-spezifischen VHHs mit denen der VHHs aus den Primärbibliotheken (Abb. 4.1.3, Anhang: 8.5) zeigt einige Auffälligkeiten. Unter den 145 zufällig sequenzierten Klonen der Primärbibliotheken fanden sich elf Klone (8%), die Familien zugeordnet werden konnten: vier Familien mit zwei Sequenzvarianten und eine Familie mit drei Sequenzvarianten. Die Tatsache, dass sich diese Sequenzen jeweils nur durch einige wenige Aminosäuresubstitutionen unterscheiden, lässt schließen, dass die Sequenzen aus unterschiedlichen, aber miteinander verwandten B-Zellen stammen. Auf das B-Zell-Repertoire hochgerechnet, scheinen somit jeweils etwa 5-15% der zirkulierenden B-Zellen aus einem expandierten Klon zu stammen. Möglicherweise handelt es sich dabei um das Ergebnis laufender oder vorangegangener Immunreaktionen. Es fällt ferner auf, dass keine, der in dieser Arbeit selektierten, für das Immunogen spezifischen VHHs, unter den zufällig ausgewählten Primärklonen zu finden war. Demzufolge machen die entsprechenden Immunogen-spezifischen Familien offensichtlich weniger als 5% des B-Zell-Repertoires aus. Um den Anteil der Antigen-spezifischen B-Zellen unter den

Gesamt-B-Zellen zum Zeitpunkt der Blutentnahme genauer zu bestimmen, müsste eine größere Anzahl von Klonen sequenziert werden. Mit den neuen kostengünstigen Sequenzierungstechnologien (Kamb 2011) wird es in naher Zukunft möglich sein, Primärbibliotheken vollständig zu sequenzieren.

Der Anteil von VHHs mit einer extra Disulfidbrücke weicht stark zwischen den einzelnen Lamas ab. 75% der zufällig sequenzierten Klone von Lama 5 weisen extra Cysteine auf, während beim Lama 6 der Anteil unter 5% liegt. Es fällt auf, dass wenn man den Anteil der Klone mit zusätzlichen Cysteinen bei Lama 10 und 25 aus den beiden generierten Bibliotheken vergleicht, so sind die %-Zahlen (25I: 22%, 25II 13% und 10I 37%, 10II 42%) in beiden generierten Bibliotheken untereinander vergleichbar. Die genaue Anzahl unterschiedlicher VHH Gen-Elemente beim Lama ist noch nicht bekannt. Bei anderen Säugetieren (Maus, Mensch) finden sich ca. 60-100 VH Gene (Wang, Jackson et al. 2011). Diese Vielfalt ist möglicherweise auch bei unterschiedlichen Lamas zu finden.

5.2 Ein hoher Anteil der Toxin-spezifischen VHHs inhibiert die Enzymaktivität gegen die zur Immunisierung verwendete Toxindomäne.

Ein beschriebener Vorteil von VHHs gegenüber konventionellen Antikörpern ist der hohe Anteil an Enzym-Inhibitoren. Während konventionelle Antikörper in der Regel nicht in der Lage sind, die Aktivität des Zielenzyms zu hemmen, inhibierten sechs von acht selektierten VHHs das Hühnereiweiß-Lysozym, fünf von fünf der in unserer Arbeitsgruppe selektierten VHHs das Salmonellen Toxin SpvB und drei von vier der in unserer Arbeitsgruppe selektierten VHHs das Toxin-verwandte T-Zell Ekto-Enzym ART2 die jeweilige Enzymaktivität (De Genst, Silence et al. 2006; Koch-Nolte, Reyelt et al. 2007; Alzogaray, Danquah et al. 2011). Auch bei den in dieser Arbeit gegen drei bakterielle Toxin-Enzyme selektierten VHHs zeigte sich ein hoher Anteil an Inhibitoren (Tab. 5.1), während keine von 12 isolierten VHH-Familien die Enzymaktivität von humanem CD38 hemmen konnte.

Die Interaktion konventioneller Antikörper ist zumeist flach oder konkav (Williams, Michan et al. 1994). Da die katalytisch aktiven Aminosäuren meist in einem katalytischen Spalt liegen, werden selten Enzym-Inhibitoren gefunden. Bei den Schwereketten-Antikörpern gibt es häufig eine lange CDR3, die aus der Oberfläche herausragt (Abb. 1.1.3). Diese ist in der Lage in das aktive Zentrum von Enzymen einzudringen und deren Aktivität zu blockieren (Lauwereys, Arbabi Ghahroudi et al. 1998). Bei den hier gefundenen VHHs konnte ein hoher Prozentsatz an inhibierenden VHHs gefunden werden. Die Aussage, dass es sich hierbei um einen Effekt der langen CDR3 handelt, kann nicht bestätigt werden. In Abb. 5.2.1 sind die CDR3-Längen der bindenden und inhibierenden VHHs (mit * gekennzeichnet) gegeneinander aufgetragen. Die Länge der CDR3 scheint nicht entscheidend für die Fähigkeit zur Inhibition der enzymatischen Aktivität zu sein.

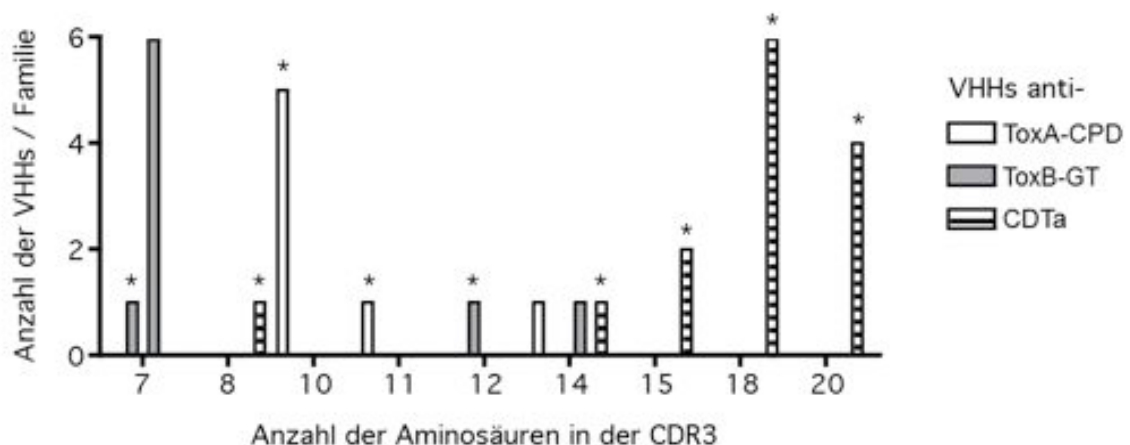


Abb. 5.2.1: Inhibierende VHH-Domänen verteilen sich über das Spektrum der CDR3-Längen.

Die Sequenzen der bindenden und inhibierenden (mit einem * gekennzeichnet) VHHs wurden im Hinblick auf die Länge der CDR3 untersucht. Die Höhe der Säule gibt die Anzahl der gefundenen Klone wieder, die über die darunter angegebene Anzahl von Aminosäuren in der CDR3 verfügen.

Ein hoher Anteil der Toxin-spezifischen VHHs inhibiert die Enzymaktivität gegen die zur Immunisierung verwendete Toxindomäne. Zwei der drei selektionierten VHHs gegen ToxA-CPD inhibieren die autokatalytische Proteaseaktivität von Toxin A (Abb. 4.2.4), zwei der vier selektionierten VHHs inhibieren die Glucosyltransferase Aktivität von Toxin B (Abb. 4.2.5) und fünf der fünf selektionierten Familien gegen CDTa inhibieren die ADP-Ribosylierung von Aktin durch CDT (Abb. 4.3.5). Der hohe Anteil

an Enzym-inhibierenden VHHs im Falle der Toxine - im Gegensatz zu humanem CD38 - könnte durch den größeren phylogenetischen Abstand (Woese, Kandler et al. 1990) erklärt werden. Zudem könnte im Falle der Toxine eine Hemmung der Enzymaktivität durch Bindung an zwei oder mehr Bereiche des Toxins beeinflusst werden. Die Glucosyltransferasedomäne und die ADP-Ribosyltransferase haben jeweils eine niedermolekulare Verbindung und ein Protein als Substrat (UDP-Glucose und Rac, bzw. NAD* und Aktin). Die VHHs können einerseits im aktiven Zentrum der Toxin-Enzyme binden und die Bindung von UDP-Glucose oder NAD inhibieren bzw. die Zugänglichkeit von Rac oder Aktin sterisch blockieren. Im Falle der Cysteinprotease-Domäne würde sowohl eine allosterische Blockade des Peptid-Substrats als auch eine Blockade der Bindung des allosterisch wirksamen Liganden (InsP₆) die Enzymaktivität inhibieren können. Um ein genaues Bild der Interaktion von Enzym-Toxin und VHH zu erhalten, wäre die Auflösung der Struktur über Co-Kristallisation aufschlussreich (Desmyter, Transue et al. 1996).

Keine der zwölf isolierten anti-CD38 VHH-Familien konnten die NAD-Hydrolase-Aktivität inhibieren. Eine Ursache dafür könnte in der Struktur des hochkonservierten enzymatischen Zentrums von CD38 im Menschen und im Lama liegen. In Abb. 5.2.2 ist ein Sequenzvergleich von CD38 aus dem Alpaka mit dem humanen und murinen Protein gezeigt. Es ist eine hohe Konservierung der Aminosäuren, die an der Bindung (gelb hinterlegt) und Katalyse von NAD (magenta hinterlegt) beteiligt sind, zu erkennen (Liu, Kriksunov et al. 2006). Es findet sich nur eine Aminosäuresubstitution an Position 124 (Leucin-Phenylalanin). In Abb. 5.2.3 ist die Lokalisation dieser Aminosäure (grün) sichtbar gemacht. Es ist zu erkennen, dass sich diese sehr weit hinten im katalytischen Spalt befindet. Es kann vermutet werden, dass zum einen durch den hohen Konservierungsgrad und zum anderen durch die Unzugänglichkeit der einzigen nicht konservierten Aminosäure keine inhibierenden VHHs *in vivo* generiert werden konnten.

```

human  MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVV-----PRWRQOWSGPG 54
mouse  ---YEFSQVSGDRPGCRLSRKAQIGLVGLLVLIALLVVGIVVIL---LRPRSLLVWTGEP 54
alpaca  -----LSRRAQICLCVFLCLLVGVIIIAVVAGVRLWHQPLKHREWNGTG 43
          ***:**: * * : **: **: * . * **

human  TTKRFPETVLARCVKYTEIH-PEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLG 113
mouse  TTKHFSDIFLGRCLIIYTQILRPEMRDQNCQEILSTFKGAFVSKNPCNITREDYAPLVKLV 114
alpaca  STAHFQDIFLGRCYIYTQLVQPEFRDRDCKKIEETFRNAFIFKDPCEVTEEDYHPLMELT 103
          :* :* : .*.** **: : **:*. :*: : :*: :*.**:*.** *:*:

```

human	TQTVPCNKIL	LWSRIK	DLAHQFTQVQ	QVQDMFTLE	DTLLGYLAD	DLTWC	GEFNTSKINYQSC	173
mouse	TQTI	PCNKTL	FWSKSK	HLAHQYTWI	QGMFTLE	DTLLGYIAD	DLRWCGDPSTSDMNYVSC	174
alpaca	SQTVPCDKTV	FWSRTK	ELAHQYTWV	RQEMFTLE	NTLLGYVAD	GLTWC	GDSGSSEINYQSC	163
	::*	::**:	*.:*	::	.*****:*****:*.*	***:	..*::** **	
human	PDWRKDCSNNPV	SVFWKTV	SR	FAEAACDVVH	VLNGSR	SKIFDKN	STFGSVEVHNLOPE	233
mouse	PHWSENC	PNNPITV	FWKVIS	QKFAEDACGV	VQVMLNGSL	REP	FYKNSTFGSVEVFS	234
alpaca	PDWRKDC	KNNSV	SVFWKVL	SKTFAENACGM	VQVVLNGSL	SNAFSKD	STFGSVEVHNHPE	223
	.	::*	**::	*****:*	***	**::	*****:***	:
human	KVQ	TLEAWVIHGG	REDSRDLCQ	DP	TIKELESII	SKRNIQF	SCKNIYRPDKFLQCVKNPED	293
mouse	KVHKLQ	AWVMHDIEG	ASSNACSS	SSLNELKMIV	QKRNMIFAC	V	VDNYRPARFLQCVKNPEH	294
alpaca	KVHTLQ	AWVMHDIGK	SPSDLC	SGSSIMDLK	SIMSK-NIK	FTCQDNY-P	VKFLQCVRNPED	281
	::	*:*:*	.	:	*.....	::	*:.* *	:*: * * :*****:***.
human	SSCTSEI	300						
mouse	PSCRLNT	301						
alpaca	SSCSLRM	288						

Abb. 5.2.2: Sequenzalignment von CD38 aus dem Alpaka (Ensembl: ENSVPAT00000002127) mit dem humanen (Universal Protein Resource: P28907) und murinen (Universal Protein Resource: Q4FJL8). Der intrazelluläre N-Terminus ist durch die Schriftfarbe rot, der helikale Bereich durch die Schriftfarbe grün und die extrazelluläre Domäne durch die Schriftfarbe schwarz markiert. Gelb hinterlegt sind die Aminosäuren, die an der Bindung des NAD beteiligt sind, in magenta die katalytischen Aminosäuren und in türkis die abweichende Aminosäure beim Alpaka, die für die Bindung des NAD essentiell ist. Der Grad der Konservierung ist unter dem Sequenzalignment angegeben (* = identisch, : = sehr ähnlich, . = ähnlich). Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW erzeugt.

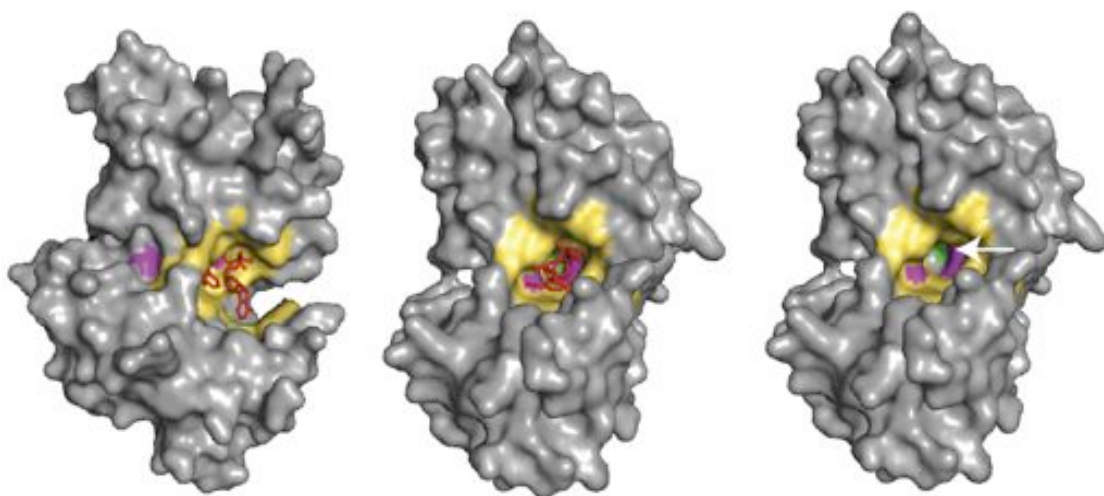


Abb. 5.2.3: Schematische Darstellung der Aminosäuren von CD38 die an der Bindung (gelb) und Katalyse (magenta) von NAD beteiligt sind. In rot ist das Substrat NAD dargestellt und in

grün, die Aminosäure, die an der NAD Bindung beteiligt ist und beim Alpaka abweicht L124 (nach Phenylalanin). Abbildung erstellt mit PyMOL unter Verwendung des pdb-codes: 2i65.

Eine Möglichkeit zur Generierung inhibierender VHHs wäre die Durchmusterung einer naiven oder synthetischen VHH-Bibliothek. Dabei könnte das VHH-Repertoire durch unterschiedliche Methoden erhöht werden, z. B. durch die Verwendung von Mutator-Stämmen (Low, Holliger et al. 1996), durch *error-prone* PCR (Hawkins, Russell et al. 1992), *chain shuffling* (Marks, Griffiths et al. 1992) oder *DNA shuffling* (Cramer, Cwirla et al. 1996). Im Falle des SBE A Enzyms aus dem Stärkestoffwechsel der Kartoffel gelang es der Firma Unilever, eine (von acht bindenden) inhibierende VHH aus einer großen synthetischen VHH-Bibliothek zu isolieren (Jobling, Jarman et al. 2003).

5.3 CD38-spezifische VHHs könnten für das *in vivo imaging* geeignet sein

CD38 ist ein multifunktionelles Ekto-Enzym, das NAD in Calcium-mobilisierende *second messenger* konvertiert (Kawamura, Aswad et al. 2005; Krebs, Adriouch et al. 2005). Klinisch ist CD38 als Protein relevant, das auf der Oberfläche von vielen lymphoiden Tumoren, Myelomen und in einigen AIDS-assoziierten Lymphomen in hoher Epitopdichte exprimiert wird (Hoffmann, Tiemann et al. 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Selektion von CD38-spezifischen VHHs angestrebt, um deren Potential für das *in vivo imaging* der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zu evaluieren. Des Weiteren sollte die Selektion CD38-inhibierender Einzeldomänen-Antikörper als experimentelles Werkzeug zur Analyse der Funktion von CD38 an der Modulation der Immunantwort angestrebt werden (Hubert, Rissiek et al. 2010).

Für CD38 konnten über zwei unterschiedliche Selektionsstrategien spezifische VHHs angereichert werden. Zum einen wurden die Bibliotheken über das Festphasenpanning (FP) selektioniert. Dies ist die am häufigsten angewendete Methode, um spezifische Antikörperfragmente anzureichern (McCafferty, Hoogenboom et al. 1996). Zum anderen wurde ein Panning (ZP) auf der Oberfläche von stabil mit CD38 transfizierten NIH-3T3 Zellen durchgeführt (Hawkins, Russell et

al. 1992) (Vaughan, Williams et al. 1996). Vergleicht man die VHHs, die durch diese beiden Methoden gefunden wurden, so fällt zunächst auf, dass alle sechs VHH-Familien, die im Festphasenpanning gefunden wurden (S-14, S-15, L+/-15, L-9, L-15.1, L-15.2), ebenfalls im Zellpanning selektioniert wurden (Tab. 4.1.2). Zusätzlich wurden sechs weitere Familien nur über das ZP selektioniert. Dies lässt vermuten, dass es beim FP durch spezifische Orientierung des Proteins bei der Immobilisierung zu einer Einschränkung der verfügbaren Epitope gekommen ist (Tab. 4.1.2).

Die Bindungsstärke der CD38-spezifischen VHHs wurde mit zwei unterschiedlichen Strategien evaluiert. Vergleicht man die Ergebnisse der semiquantitativen durchflusszytometrischen Titration der VHHs auf humanen Blut mit den MST-Messungen, so zeigen die Ergebnisse - bis auf zwei Ausnahmen - eine gute Korrelation. Mit beiden Messverfahren zeigten 4 VHHs (L-15.2, L-15.3, L-19.1, L-19.2) hohe Affinitäten (Abb. 4.1.5, 4.1.6). Die VHH L-9.1 zeigte in der durchflusszytometrischen Titration eine deutlich höhere Affinität als bei der MST-Messung. Es ist möglich, dass die Glykosylierung des nativen CD38 auf der Oberfläche der Lymphozyten eine stärkere Bindung ermöglicht. Für die MST-Messungen wurde das rekombinant in *E. coli* exprimierte nicht-glykosylierte Protein verwendet. Die L-15.1 zeigt eine höhere Affinität bei den MST-Messungen, was durch das Erkennen eines Epitops nahe der Zellmembran erklärt werden kann, dessen Bindung auf der Zelloberfläche durch Glykosylierung von CD38 oder andere Proteine erschwert sein kann.

Die Ergebnisse von Kreuzblockade-Versuchen zeigen, dass die selektionierten VHHs mindestens zwei verschiedene Epitope erkennen (Abb. 4.1.8). Interessanterweise erkennen die beiden hochaffinen VHH-Familien mit den 19 Aminosäuren langen CDR3-Regionen (L-19.1 und L-19.2) ein überlappendes Epitop, ebenso wie die drei hochaffinen VHHs mit 15 Aminosäuren langen CDR3-Regionen (L-15.1, L-15.2, L-15.3) und eine Familie mit neun Aminosäure in der CDR3 (L-9.1).

Es stellt sich die Frage, ob die *nanobodies* mit ähnlicher Epitop-Spezifität aus dem selben B-Zell-Klon stammen. Abbildung 5.3.1 zeigt ein Sequenzalignment dieser VHH-Familien sowie die Häufigkeit mit der die Klone isoliert wurden und den Ursprung der Blutabnahmen (Lama 10, Lama 25, I = nach dem zweiten Boost, II = nach dem dritten Boost). Die konservierten Aminosäuren in den CDR-Regionen sind türkis hervorgehoben. L-9.1 und L-15.3 zeigen stark abweichende Sequenzen in allen drei CDR-Regionen. Somit stammen diese VHH Familien mit Sicherheit aus verschiedenen B-Zell-Klonen. (L-15.3 stammt zudem aus einem anderen Lama). Die VHH-Familien L-

15.1 und L-15.2 zeigen auffällige Ähnlichkeiten in den CDR-Regionen, ebenso wie die VHH Familien L-19.1 und L-19.2. Andererseits enthalten die VHHs viele Abweichungen (grau hinterlegt) und vereinzelt Insertionen und Deletionen (pink hinterlegt). Möglicherweise handelt es sich hier um eine Art konvergente Selektion, bei der ein antigenes Epitop verschiedene B-Zellen mit strukturell ähnlichen VHHs induziert hat.

A VHHs, die die Bindung von L-15.1b blockieren

L-9.1a	6	DVQLQASGGGSVQAGGSLTLS	CRYSGGFVFRVSSMGWYRQAPGNORELIATITVGGKT
L-9.1b	4	DVQLQESGGGSVQAGGSLTLS	CTASG-LLFRLASMGWYRQAPGKERELIATITVGGKT
L-15.1a	3	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLS	CAPSGGTFDAYDMGWYREAPGKKR-QFVAAVRSGGG-
L-15.1b	2	DVQLQASGGGSVQEGESLKL	CVGSGRTFSDWAMGWYRQAPGKDR-EFVAAVSGAGRG
L-15.2a	7	DVQLQESGGGLVQAGGSLRLS	CAASGVSFSTRYTMGWYREVPGKERREFVAAVRPSGD-
L-15.2b	1	DVQLQASGGGLVQTGDSLTVS	CAASGLSFTRYTMGWYREVPGKERREFVAAVKPPAGD-
L-15.3	5	DVQLQESGGGLVQAGGSLRLS	CTGSGRTFRNYPMAWFRQAPGKER-EFVAGITWVGA-
L-9.1a		NYKDSVQGRFIIISRNDT	-----TVTLQMNRLQPEDTAVYYCNLASTAVGADT-----
L-9.1b		NYKDSVQGRFIIITRDNTGDNTKSTVTLQMNRLKPEDTAVYYCN	ASPAVGADT-----
L-15.1a		--TTRYADSVKGRFTISRDDAKDTVFLQMNLSLKPEDTALYY	CAADRWGLFSLSIATPT
L-15.1b		G-KPSYANSVKGRFTVSRDNAKNTVYLQMDNLKPEDTAVYY	CAADRLVLVALSIADPG
L-15.2a		--STYYGNSVKGRFSISRDDDKNIVYLQMNLSLKPEDTAVYY	CAAGFPVLVALSIADPD
L-15.2b		--SAYYGASVKGRFTASRDNAKNTVTLQMNLSLKPEDTALYY	CAAGFPVLTALHIADPD
L-15.3		--STLYADFAKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYS	CAAGRGIVAGRIPA EYA
L-9.1a		-WGQGTQVTVSS	L25II
L-9.1b		-WGQGTQVTVSS	L25II
L-15.1a		HWGQGTQVTVSS	L25I
L-15.1b		FWGQGTQVTVSS	L25I
L-15.2a		YWGQGTQVTVST	L25I
L-15.2b		YWGQGTQVTVSP	L25II
L-15.3		DWGQGTQVTVSS	L10I

B VHHs, die die Bindung von L-19.2a blockieren

L-19.1a	7	DVQLQESGGGLVQAGSSLRLS	CAVSGVRLDNYAMGWFRQAPGKERESVAGISWSSGT
L-19.1b	1	DVQLQESGGGLVQAGDSLRLS	CAASGPHFNYYAIGWFRQAPGKEREFVAGISWSSGS
L-19.2a	3	DVQLQESGGGLVQAGDSLRLS	CVGSGRRFDNYAMAWFRQAPGKERTFVAAGISWSSGT
L-19.2b	1	DVQLQESGGGLVQAGHSLRLS	CVGSGSRFDNYAMGWFRQAPGKEREFVAGISWSSGT
L-19.1a		LLYSDSVKGRFAISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYY	CAAQYQDRYYDEFTWKEKDMD
L-19.1b		LLYSDSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTALYY	CAAQYQERYYSDFSLKEKGME
L-19.2a		TRYLDTVKGRFTISRDNKSTVYLQMNLSLKPEDTAVYY	CAARYQPRYYDSGDMGGEYE
L-19.2b		TRYLDTVKGRFTISRDNKSTVYLQMNLSLKPEDTAVYY	CAARYQPRYYDSGDMGGEYD
L-19.1a		YWGKGTQVTVSS	L25II
L-19.1b		YWGKGTQVTVSS	L25I
L-19.2a		FWGQGTQVTVSS	L25I
L-19.2b		NWGQGTQVTVSS	L25II

Abb. 5.3.1: Aminosäuresequenz-Alignment der VHHs, die die Bindung von L-15.1b (A) bzw. L-19.2a (B) blockieren. Die CDR-Regionen sind in roten, grünen und blauen Buchstaben gekennzeichnet. Von der Konsensussequenz abweichende Aminosäuren sind grau hervorgehoben. In den CDR-Regionen konservierte Aminosäuren sind türkis hervorgehoben. Insertionen und Deletionen sind pink hervorgehoben. Die Zahlen vor den Sequenzen geben an, wie häufig unabhängige Isolate des jeweiligen Klon unter den selektierten VHHs gefunden wurden. L25 und L10 geben die Bezeichnung des Lamas an, aus dem die Klone stammen, die römischen Ziffern den Zeitpunkt der Blutentnahme (I = nach dem zweiten Boost, II = nach dem dritten Boost).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen, dass die selektierten VHHs CD38 spezifisch auf der Oberfläche von Lymphozyten im Blut binden können (Abb. 4.1.5). Aufgrund ihrer höheren Affinität erfüllen die VHH-Familien L-15 und L-19 am ehesten die Voraussetzungen für Applikationen im *in vivo imaging*. Für diese Familien konnten durch Fusion bereits relativ kleine bivalente und bispezifische Reagenzien erzeugt werden, ebenso wie größere bivalente Fc-Fusionsproteine, die strukturell Schwereketten-Antikörpern ähneln (Abb. 4.4.1). Ob diese Homo- und Hetero-Dimere höhere Bindungsaffinitäten haben als die Monomere muss noch geklärt werden.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass VHHs aufgrund ihrer niedrigen Größe für das *in vivo imaging* besonders geeignet sind (Gainkam, Huang et al. 2008; Oliveira, van Dongen et al. 2011). Abbildung 5.3.2 illustriert schematisch die Verteilung von Tumor-spezifischen VHHs im Vergleich zu Tumor-spezifischen monoklonalen Antikörpern nach intravenöser Applikation in einem Tumormodell. Mit 15 kDa sind die VHHs die kleinsten antigenbindenden Fragmente, die von einem Antikörper erhalten werden können (Muyldermans 2001). Durch die geringe Größe haben diese eine kurze Halbwertszeit im Körper und werden schnell über die Nieren ausgeschieden (Wesolowski, Alzogaray et al. 2009). Trotz der geringen Größe liegen die Affinitäten im unteren nanomolaren Bereich, wie für die VHHs gegen CD38 über MST-Messungen gezeigt werden konnte (Abb. 4.1.6). Sie weisen durch hydrophile Aminosäuresubstitutionen in der *framework 2* eine hohe Löslichkeit auf (Davies and Riechmann 1996) und im Vergleich zu den konventionellen Antikörpern behalten die VHHs ihre Funktionalität auch bei hohen Temperaturen bei (van der Linden, Frenken et al. 1999; Perez, Renisio et al. 2001). Für chemische Modifikationen, wie die Konjugation von Fluorochromen oder radioaktiven Substanzen, eignen sich die

nanobodies daher besonders gut. *In vivo* zeigen die VHHs eine rasche Verteilung und tiefe Penetration in dichte Gewebe. Dies wurde für VHHs gegen den humanen *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gezeigt, der auf vielen Tumoren hochexprimiert wird (Gaijkam, Huang et al. 2008; Oliveira, van Dongen et al. 2011). Mit einer Kombination der monovalenten VHHs und den hier generierten bivalenten mFc-Fusionsproteinen (Abb. 4.4.1) kann eine hohe Tumورpenetration mit den Effektorfunktionen durch den Fc-Teil gekoppelt werden. Die Fusion eines Toxins an die VHH könnte die Therapie unterstützen (Malavasi, Deaglio et al. 2008). Die VHHs stellen somit möglicherweise auch für den therapeutischen Einsatz eine interessante Option dar.

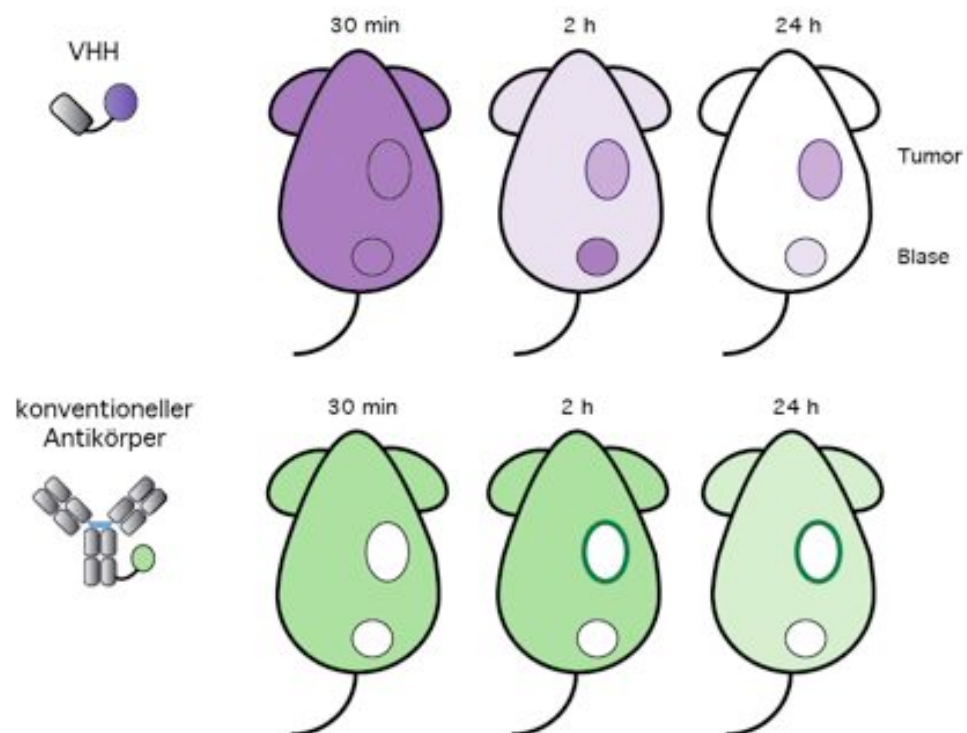


Abb. 5.3.2: Schematische Darstellung der Vorteile von VHHs beim *in vivo imaging* im Vergleich zu konventionellen IgG-Antikörpern. Die VHHs erreichen den Tumor schneller und zeigen aufgrund der geringeren Größe eine bessere Penetration des Tumors. Mit 15 kDa haben die VHHs nur eine kurze Halbwertszeit im Körper und werden rasch über die Niere ausgeschieden. Histologische Untersuchungen zeigten, dass konventionelle Antikörper langsamer und nur bis in die unmittelbare Umgebung von Gefäßen eindringen. Zudem verweilen nicht gebundene

konventionelle Antikörper in der Zirkulation. Dadurch kommt es bei konventionellen Antikörpern zu einem höheren Hintergrund (Oliveira, van Dongen et al. 2011).

5.4 Mögliche Nutzung der Toxin-spezifischen VHHs für diagnostische und therapeutische Anwendungen

Clostridium difficile ist ein Endosporen-bildendes gram-positives Bakterium, das für 20% der Fälle von Antibiotika-assoziiierter Diarrhö, für 75% der Fälle der Antibiotika assoziierten Colitis Fälle und für nahezu alle Fälle der pseudomembranösen Colitis verantwortlich ist (Bartlett 2008). Die Symptome einer Infektion mit *Clostridium difficile* (CDI) werden durch die Toxine A und B hervorgerufen, die kleine GTPasen glucosylieren. 20% der Bakterienstämme produzieren ein zusätzliches binäres Toxin, CDT, das zu einer erhöhten Adhärenz der Bakterien im Darm führt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit selektionieren VHHs könnten für den diagnostischen und therapeutischen Einsatz der CDI nützlich sein.

Gegen alle drei Toxine von *Clostridium difficile* konnten erfolgreich spezifische VHHs aus den Lama-Immunbibliotheken über Festphasen- und Biotinpanning selektioniert werden. Das Biotinpanning wurde mit Streptavidin-Agarose im *batch*-Verfahren durchgeführt. Die Verwendung der biotinilierten Antigene erlaubt die Interaktion zwischen rekombinanten Phagen und Antigen in Lösung (Hawkins, Russell et al. 1992). Über das Biotinpanning konnte nur eine VHH-Familie für CDTa selektioniert werden. Ein Grund hierfür könnte ein unzureichender Grad der Biotinilierung der Antigene bzw. der in der SDS-PAGE sichtbare schlechte Zustand der Antigene nach Biotinilierung gewesen sein (Ergebnis nicht gezeigt). Alle weiteren Familien wurden über das Festphasenpanning an immobilisiertem rekombinantem Protein (CDTa) bzw. definierten Protein-Domänen (ToxA-CPD, ToxB-GT) gefunden (Tab. 4.2.2 und 4.3.2). Zwei der drei selektionierten VHH-Familien gegen ToxA-CPD (L-10 und L-11) inhibieren die durch InsP_6 induzierte autokatalytische Spaltung von ToxA-GT-CPD zwischen der GT und CPD Domäne (Abb. 4.2.4). Diese beiden VHHs reagieren in ELISA Untersuchungen ebenfalls mit dem Holo-Toxin A (Abb. 4.2.2 A). (Die deutlich schwächeren Signale mit dem Holo-Toxin in diesem Versuch könnten in der 10fach niedrigeren Menge des beschichteten Antigens begründet sein). Beide VHHs zeigen bei Titrationsversuchen relativ hohe Affinitäten für ToxA-CPD (Abb. 4.2.3). Selbst bei

hohen Konzentrationen reagieren sie jedoch nicht mit ToxB (Abb. 4.2.2 A) und zeigen auch keinen Einfluss auf die Proteaseaktivität von ToxB (Abb. 4.2.4).

Keine der selektionierten ToxA-spezifischen VHHs zeigt im monomeren Format einen Einfluss auf die Zytotoxizität von Toxin A auf Vero oder MDCK-II Zellen (nicht gezeigt). Dies deutet an, dass die VHHs weder die Translokation des Toxins in die Zelle verhindern noch selbst in ausreichenden Mengen "huckepack" in die Zellen gelangen können. Es müsste noch geklärt werden, ob die Expression der VHHs in Form von "intrabodies" im Zytosol die InsP_6 induzierte Aktivierung der GT-CPD Spaltung hemmen und Zellen so vor der Wirkung von Toxin A schützen können. Dieser Mechanismus konnte kürzlich im Falle des Salmonellen SpvB Toxins für eine in den Zellen als zytosolisches Protein exprimierte VHH gezeigt werden (Alzogaray, Danquah et al. 2011). Für die Generierung von Toxin-neutralisierenden VHHs wäre als Ziel-Epitop die Verwendung einer Domäne, die die Translokation des Toxins in die Zelle vermittelt, besser geeignet. Hussack et al. sind diesem Ansatz nachgegangen und konnten VHHs gegen die rezeptorbindenden-*repeat*-Domänen am C-Terminus von Toxin A generieren (Hussack, Arbabi-Ghahroudi et al. 2011). Diese VHHs konnten in hoher Dosierung tatsächlich die Zytotoxizität von Toxin A reduzieren. Problematisch bei dieser Strategie ist, dass der C-Terminus von Toxin A 37 und von Toxin B 19 repetitive Oligopeptidstrukturen, sogenannte CROPs aufweist (von Eichel-Streiber, Laufenberg-Feldmann et al. 1992). Zudem kann Toxin A selbst nach Deletion dieser Kohlehydrat-bindenden Domänen in geringem Umfang in die Zelle gelangen (Olling, Goy et al. 2011). Für die Blockade waren daher höhere Mengen an VHHs erforderlich. Zwei der vier selektierten VHHs gegen ToxB-GT (L-7.II und S+12) inhibierten die Glucosyltransferase Aktivität von Toxin B (Abb. 4.2.5). Diese beiden VHHs zeigten hohe Bindungsaffinitäten (Abb. 4.2.3 B) für ToxB-GT und reagierten ebenfalls deutlich mit dem Holotoxin (Abb. 4.2.2 B). Die VHH S+12 zeigt ferner eine schwache Reaktion mit der Glucosyltransferase-Domäne von Toxin A (Abb. 4.2.2 B), die eine Aminosäuresequenz-Identität zu ToxB-GT von etwa 45% zeigt (Aktories 1997). Eine Testung der Neutralisierung der Zellzytotoxizität durch diese VHHs steht noch aus.

Für fünf von zehn gegen CD-Ta selektionierte VHH-Familien konnte in bivalentem Format mittels ELISA eine spezifische Bindung an CD-Ta bestätigt werden (Abb. 4.3.2). Diese fünf Familien zeigten bei ELISA-basierten Tritrationsversuchen in monovalentem Format hohe Affinitäten für CD-Ta (Abb. 4.3.3) (geschätzte K_D von 5-50 nM). Alle Familien zeigten ferner eine Inhibition der enzymatischen Aktivität in einem

ADP-Ribosylierungsversuch mit radioaktivem ^{32}P -NAD. Hierbei wird die Übertragung der ADP-Ribose-Gruppe von NAD⁺ auf Arg-177 von Aktin in einem HEK-Zelllysat analysiert. Eine Titration der *nanobodies* zeigte, dass diese die enzymatische Aktivität von CDTa bereits in einem molaren Verhältnis von zwei zu eins blockierten (Abb. 4.3.5).

Für die VHH L+8 anti-CDTa konnte zusätzlich eine Inhibition der Zytotoxizität von exogen zugefügtem CDTa/CDTb gezeigt werden (Abb. 4.3.6, Abb. 4.3.7). Es ist denkbar, dass die Bindung der VHH L+8 sowohl die katalytische Aktivität von CDTa als auch deren Interaktion mit der Untereinheit CDTb, die für die Translokation des Toxins ins Zytosol der Zelle verantwortlich ist, blockiert.

Im Zuge des Auftretens neuer hypervirulenter *C. difficile* Stämme des Ribotyps-027 (RKI, Epidemiologisches Bulletin. 2007), der alle drei hier untersuchten Toxine produziert, sind die in dieser Arbeit generierten VHHs von besonderem Interesse. Der Ribotyp zeichnet sich durch einen besonders schweren klinischen Verlauf, eine hohe Rückfallquote und schlechtes Ansprechen auf Antibiotika aus (Dawson, Valiente et al. 2011).

Für die Diagnostik der CDI wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die sich teilweise hinsichtlich der Sensitivität, Spezifität, zeitlichem Aufwand und Kosten erheblich unterscheiden. Als erstes Verfahren wurde ein Zytotoxizitäts-Test entwickelt, der dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren ähnelt. Dafür wurden Stuhlproben filtriert, um die Bakterien zu entfernen und der zytotoxische Effekt des Filtrats auf kultivierten Zellen in An- und Abwesenheit von polyklonalen Anti-Toxin Seren getestet (Merz, Kramer et al. 1994). Dieser Nachweis ist sehr spezifisch, erfordert jedoch einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand (24-48 Stunden). Es wurden alternative Nachweisverfahren für die Detektion der drei Toxine entwickelt, die jedoch meist eine vorangeschaltete Kultivierung der Bakterien erfordert. Hierzu gehören der Latex-Partikel Agglutinations-Test (Shahrabadi, Bryan et al. 1984), der dot-Immunoblot (Kurzynski, Kimball et al. 1992), PCR basierter Nachweis der Toxin-kodierenden Gene (Kuhl, Tang et al. 1993), Ausstrich von Stuhlproben auf selektivem Medium (Mundy, Shanholtzer et al. 1995) und der ELISA (Laughon, Viscidi et al. 1984). Der ELISA hat sich als Standardmethode etabliert, zeigt jedoch eine 25% geringere Sensitivität verglichen mit dem Zytotoxizitäts-Test (Viscidi, Yolken et al. 1983; Manabe, Vinetz et al. 1995). Daher werden für die gesicherte Diagnose häufig verschiedene Tests durchgeführt. Die dadurch verursachten Kosten für das

Gesundheitssystem und der Zeitaufwand sind beachtlich (Kuijper, Coignard et al. 2006). Die in dieser Arbeit isolierten VHHs könnten möglicherweise die Diagnostik vereinfachen. VHHs lassen sich im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern effizient in prokaryotischen Systemen exprimieren. Es konnten in unseren rekombinanten Produktionen bis zu 10 mg VHH aus einem Liter *E. coli* Kultur isoliert werden (Abb. 3.1.4). Diese Ausbeute könnte durch Optimierung z.B. des Expressionsvektors, des Promotors oder eines anderen Bakterienstamms noch weiter erhöht werden (Rahbarizadeh, Rasaee et al. 2006). Durch die Verwendung von Hefen kann die Produktion auf 1 g/l gesteigert werden (Frenken, van der Linden et al. 2000). Somit stellen VHHs eine kostengünstige Alternative zu konventionellen Antikörpern dar.

Die Immobilisierung von VHHs unterschiedlicher Epitopspezifitäten auf Polymeren könnte eine Grundlage für eine sensitivere Diagnostik und effektivere Toxin-Neutralisation im Darm darstellen. Durch die genetische Fusion einer VHH an einen Avi-Tag, d.h. eine Erkennungssequenz für die Biotin-Ligase BirA (Kay, Thai et al. 2009) wird die Grundlage für die Herstellung multivalenter VHH-Reagenzien im LEGO-Baukasten Prinzip geschaffen (Abb. 5.4.1). Streptavidin besitzt vier hochaffine Biotin-Bindungsstellen. Die Inkubation einer durch BirA an einem einzigen Lysinrest biotinylierten VHH mit Streptavidin in einem vier zu eins Verhältnis resultiert in einem tetravalenten Bindungsmodul. Die Inkubation von zwei unterschiedlichen einfach-biotinylierten VHHs mit Streptavidin ergibt ein bivalentes bispezifisches Bindungsmodul. Auf diese Weise können Streptavidin-Eisenoxidkügelchen-Konjugate und Streptavidin-Enzym-Konjugate mit Toxin-spezifischen *nanobodies* ummantelt werden. VHH-beschichtete Polymere können für die Anreicherung von Toxinen aus Stuhlproben und bakteriellen Kulturen eingesetzt werden, VHH-Enzym-Konjugate (VHH-PhoA Fusionsproteine) für den sensitiven Nachweis der angereicherten Toxine. Die in dieser Arbeit durchgeführten Pilotexperimente zeigen, dass VHHs effizient in *E. coli* als Fusionsproteine sowohl mit einem Avi-Tag als auch mit bakterieller alkalischer Phosphatase (PhoA) produziert werden können (Abb. 4.4.1).

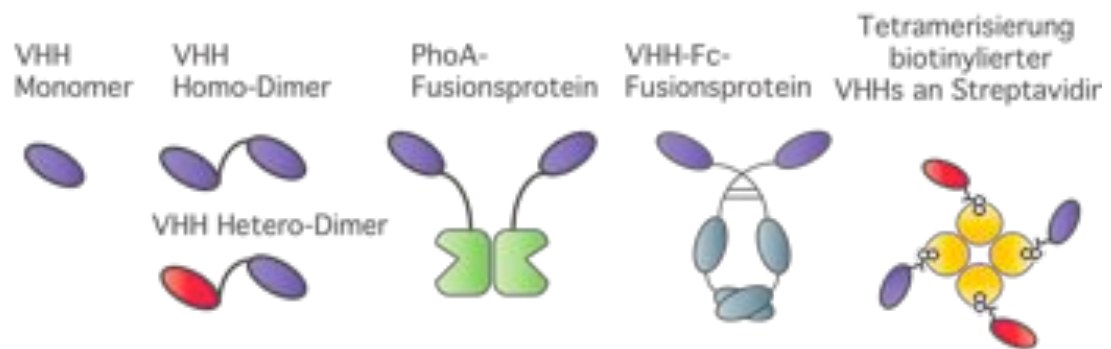


Abb. 5.4.1: schematische Darstellung der Adsorption von Toxinen an VHH-beschichtete Polymere durch Biotinylierung der VHHs und Kopplung an Streptavidin.

Auf ähnliche Weise können Streptavidin-Polymer-Konjugate mit Toxin-spezifischen VHHs ummantelt werden, um Toxine im Darm und in anderen biologischen Flüssigkeiten zu absorbieren (zielgerichtete Kohletablette). Durch die Verwendung der von uns selektierten VHHs in Kombination mit VHHs, die die RBD von Toxin A binden, könnte unter Umständen eine noch effektivere Neutralisierung der Toxizität durch VHH-beschichtete Polymere erreicht werden.

Für die direkte orale Applikation stellt der obere Gastrointestinaltrakt mit niedrigem pH-Wert und Proteasen eine Hürde dar. Um die Passage in den Darm zu gewährleisten gibt es zwei Möglichkeiten. Hussack *et al.* konnten durch die Einführung einer zusätzlichen Disulfidbrücke durch Mutagenese von Ala/Gly54Cys und Ile78Cys die Stabilität der VHHs gegenüber Proteasen und niedrigem pH-Wert erhöhen (Hussack, Hiram et al. 2011). Eine weitere Möglichkeit ist die Verabreichung der VHHs in verkapseltem Format, z.B. einer Chitosan-Alginat-Mikrokapsel, die eine Abgabe der VHHs im Darm ermöglicht. (Li, Jin et al. 2009). Mit der Neutralisierung der Toxine im Darm könnte zudem die Vergabe von Antibiotika reduziert und die Erhaltung der übrigen Darmflora gewährleistet werden und somit die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen reduziert werden (Clatworthy, Pierson et al. 2007). Weitere Vorteile dieser Verabreichungsform gegenüber einer systemischen Verabreichung wären geringere Nebenwirkungen und geringere Immunogenität (Lowy, Molrine et al. 2010).

Auch für systemische Applikationen stellen Toxin-spezifische VHHs möglicherweise eine Option dar. Es wurden bereits humane neutralisierende Antikörper gegen die Clostridien Toxine A und B hergestellt und systemisch eingesetzt. Diese Antikörper binden an die rezeptorbindende-Domäne der Toxine (Babcock, Broering et al. 2006), ähnlich der von Hussack beschriebenen Toxin A neutralisierenden VHHs (Hussack, Arbabi-Ghahroudi et al. 2011). Die intravenöse Injektion von zwei monoklonalen humanen Antikörpern gegen Toxin A und Toxin B in einer einmaligen hohen Dosis (10 mg/kg Körpergewicht) führte bei der Mehrzahl von 101 behandelten Patienten zu einer raschen Verminderung der klinischen Symptomatik (Lowy, Molrine et al. 2010). Mögliche Vorteile von VHHs gegenüber konventionellen monoklonalen humanen Antikörpern bei systemischen Applikationen sind die bessere Gewebepenetration sowie die erheblich niedrigeren Produktionskosten, ein möglicher Nachteil ihre potentielle Immunogenität. VHHs zeigen allerdings eine hohe Ähnlichkeit zur humanen VH3. Um die Möglichkeit einer Immunantwort weiter zu minimieren, könnten VHHs durch Aminosäuresubstitutionen weiter humanisiert werden (Padlan 1991). Bisherige Studien deuten allerdings an, dass VHHs ohnehin eine geringe Immunogenität besitzen. Multiple Injektionen von VHHs in der Maus konnten keine Immunantwort gegen die Antikörperfragmente hervorrufen (Coppieters, Dreier et al. 2006).

VHHs wurden bereits für klinische Studien an Menschen zugelassen. Ablynx ist eine in Belgien gegründete Biotechnologie Firma, die sich auf die Entwicklung von Einzeldomänen-Antikörpern für den therapeutischen Einsatz spezialisiert hat. Die VHH ALX-0061 gegen den Interleukin-6 Rezeptor (rheumatoide Arthritis), VHH ALX-0081 gegen den von Willebrand-Faktor (Thromboseprophylaxe) und die VHH ATN-103 gegen TNF-alpha (Autoimmunerkrankungen) sind bereits in Phase II klinischer Studien angelangt (Ulrichs, Silence et al. 2011). Aufgrund der genannten Argumente stellen die in dieser Arbeit generierten VHHs unter Umständen einen vielversprechenden Ansatz dar.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit erfolgreich generierten VHHs gegen das humane Ecto-Enzym CD38 und gegen die *Clostridium difficile* Toxine stellen neue experimentelle Werkzeuge bereit, und bereiten die Grundlage für interessante weiterführende

Untersuchungen und praktische Anwendungen. Mit der hier etablierten experimentellen Strategie könnten durch neue Lama-Immunisierungen weitere VHHs gegen unterschiedliche Zielantigene / Domänen hergestellt werden. Die CD38-spezifischen VHHs könnten für das *in vivo imaging* von CD38-exprimierenden chronisch lymphatischen Leukämien eingesetzt werden. Für eine sensitivere Diagnostik einer Infektion mit *Clostridium difficile* könnten die einfach-biotinylierten VHHs auf Streptavidin-konjugierten Magnetkügelchen immobilisiert werden, um damit Toxine aus Stuhlproben anzureichern. VHHs, die andere Epitope der Toxine binden, könnten als alkalische Phosphatase Fusionsproteine oder über Streptavidin an Peroxidase konjugiert werden, um die gebundenen Toxine zu detektieren. VHH-ummantelte Polymere könnten zudem in Zellkultur-Modellen und einem etablierten CDI-Mausmodell auf therapeutische Wirksamkeit getestet werden. Hierbei könnten VHH-beschichtete Polymere in verkapselter Form oral appliziert werden, monovalente oder bivalente VHHs systemisch verabreicht werden.

6 Zusammenfassung

Gegen CD38 des Menschen sowie die drei Clostridien Toxine A, Toxin B und CDT wurden spezifische Einzeldomänen-Antikörper aus immunisierten Lamas mittels der Phagen-Display-Technologie selektioniert. Nach Bestätigung der erfolgreichen Induktion einer humoralen Immunantwort mittels ELISA-Analysen, wurde RNA aus Blut-Lymphozyten isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die kodierenden Regionen für die Antigen-bindenden Domänen (das Immunrepertoire der B-Zellen) PCR-amplifiziert. Nach der Klonierung in ein geeignetes Phagen-Display Vektorsystem, der Erstellung von Bibliotheken, der Verifikation der Diversität durch Sequenzierung, wurden spezifische VHH-exprimierende Phagen über unterschiedliche Selektionsstrategien (Panning) angereichert.

Für CD38 wurden über Zell- und Festphasenpanning 12 spezifische VHH-Familien selektioniert. Toxin-spezifische VHHs wurden über Festphasen- und Biotinpanning angereichert. Für die Cysteinproteasedomäne von Toxin A konnten drei spezifische Familien gefunden werden, von denen zwei die enzymatische Aktivität inhibieren. Für die Glucosyltransferasedomäne von Toxin B wurden vier Familien selektioniert, von denen zwei die Enzymaktivität inhibieren. Und für CDTa wurden fünf Familien isoliert, die alle die Enzymaktivität inhibieren.

Langfristiges Ziel ist der Einsatz der selektionierten VHHs für diagnostische und therapeutische Anwendungen. Dafür wurden interessante VHHs in unterschiedliche bi- und multivalente Formate umklontiert: Zur Erhöhung der Bindungsavidität wurden bivalente Homo- und Hetero-VHH-Dimere generiert, für einen sensitiven Nachweis VHH-PhoA-Fusionsproteine, für eine erhöhte *in vivo* Halbwertszeit und für die Vermittlung von Fc-basierten Effektorfunktionen VHH-Fc-Fusionsproteine. Im Falle von CD38 könnten derartige Konstrukte künftig etwa für ein effizienteres *imaging* von CD38-exprimierenden Tumoren genutzt werden. Für eine bessere Adsorption von Toxinen wurden schließlich tetra- und höhervalente Konstrukte durch Fusion einer Signalsequenz (Avi-Tag) vorbereitet, die die enzymatische Biotinilierung an einem Lysin-Rest durch das Enzym-BirA ermöglicht. Mittels Streptavidin, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, können nun VHH-Tetramere generiert werden, die gleiche oder unterschiedliche Epitope erkennen, mit Streptavidin-beschichteten Polymeren (*magnetic beads*, *sepharose beads*) könnte künftig eine effizientere Absorption von Toxinen für diagnostische und therapeutische Zwecke erzielt werden.

7 Abstract

Using phage display technology, specific single domain antibodies against human CD38 and three *Clostridium difficile* toxins were generated from immunized llamas. RNA was prepared from peripheral blood lymphocytes 10-23 days after the last immunization and reversed transcribed into cDNA. The coding region for the antigen-binding domain (VHH) of heavy chain antibodies (the immune repertoire of B-cells) was PCR-amplified and cloned into a phage-display vector. A high clone diversity in the generated libraries was verified by sequencing of randomly picked clones. Enrichment of antigen-specific VHH-expressing phages was achieved by successive cycles of panning on immobilized antigens.

Twelve CD38-specific VHH families were selected by panning on CD38-transfected cells and on the nonglycosylated, recombinant ectodomain of CD38 immobilized in a 96-well ELISA-plate. Toxin-specific VHHs were selected on recombinant toxin-domains immobilized in 96-well plates or - via biotin - on streptavidin coated beads. Three VHH families targeting the cysteine protease domain of Toxin A were selected, two of which inhibited the Inositolhexakisphosphate-induced auto-catalytic activity. Four VHH families specific for the glucosyltransferase domain of Toxin B were selected, two of which inhibited glucosylation of rac mediated by this domain. Moreover, five CDTa-specific VHH families were selected, all of which inhibited ADP-ribosylation of actin by this subunit.

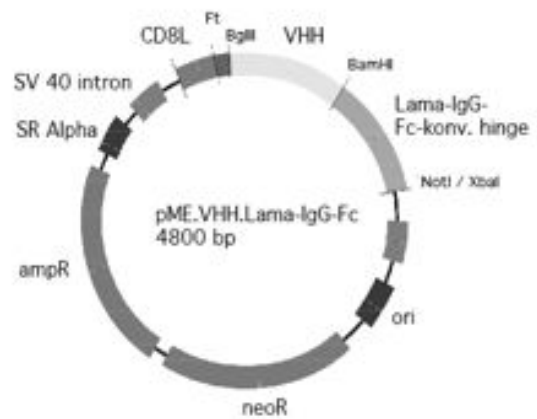
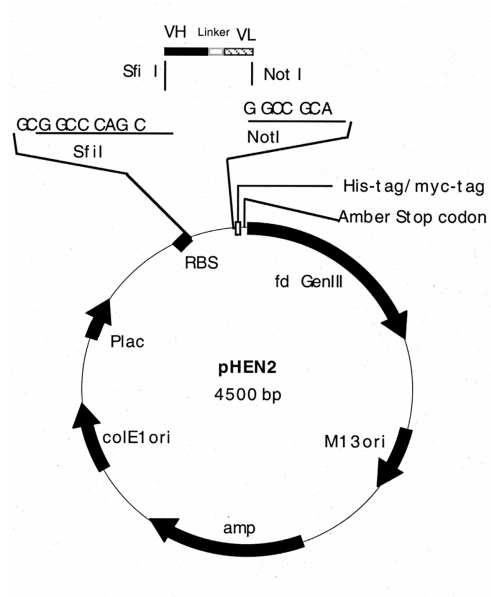
A long-term goal is to adapt the selected VHHs for diagnostics and therapeutic applications. To this end, selected VHHs were reformatted into bi- and multivalent constructs and tested for expression in bacterial or mammalian cells. Homomeric and heteromeric VHH dimers were generated in order to improve binding avidities; VHH-PhoA fusion proteins were developed for epitope mapping and sensitive detection; VHH-Fc fusion proteins were generated for *in vivo* half life extension and induction of effector functions. Such constructs could be used for improved imaging of CD38-expressing tumors. For high efficiency adsorption of toxins, tetra- and higher valency formats were constructed by fusing the Avi-tag C-terminally to toxin-specific VHHs. The Avi-tag allows the enzymatic biotinylation of a lysine residue by BirA, permitting the assembly of homo- and heteromeric VHH-streptavidin complexes. In combination with streptavidin-coated polymers (magnetic beads, sepharose beads) such single biotinylated VHHs may permit more efficient adsorption of toxins for diagnostic and therapeutic purposes.

8 Anhang

8.1 Plasmidkarten

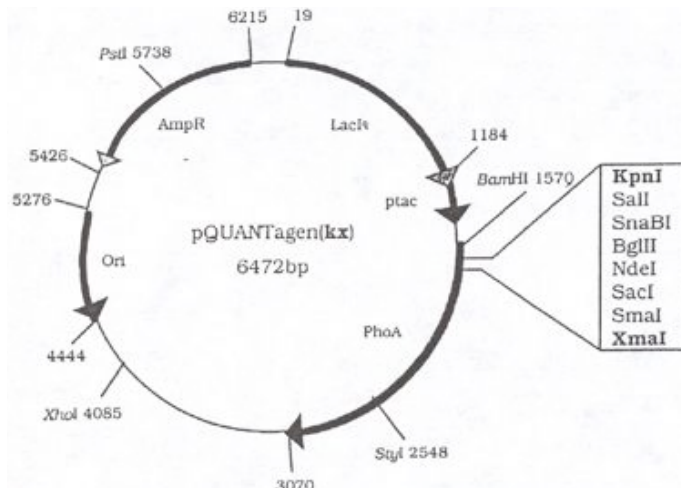
8.1.1 Phagemid-Vektor pHEN2 und pME Vektor.

Der Vektor pHEN2 diente der Expression der Phagenbibliotheken und der monomeren VHHs sowie der VHH-Dimere. Der pME-Vector diente der Expression der VHH-mFc-Konstrukte in HEK-293 Zellen.



8.1.2 pQuantagen Vektor

Der Vector pQuantagen wurde zur Expression der dimeren PhoA-Fusionsproteine.



8.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide

8.2.1 Oligonukleotide zur Erstellung der cDNA

RH6 nnnnnn

8.2.2 Universelle Sequenzier-Oligonukleotide

Fdseq1 (pHEN2, for)	gaa ttt tct gta tga
Lmb3 (pHEN2, reverse)	cag gaa aca gct atg ac
K2 (pME, for)	tcc tca gtg gat gtt gcc
PhoA Seq for (pQuantagen, for)	gca ctg gca ctc tta ccg tta c
PhoA Seq rev (pQuantagen, reverse)	cag tct gat cac ccg tta aac

8.2.3 Oligonukleotide für die Klonierung der Lama-Immunbibliotheken aus cDNA

SHF (IgG2c, for)	tcg cgg ccc agc cgg cca tgg cgc agg tsm arc tgc agg agt cwg g
SHR (IgG2c, reverse)	atg gtg atg atg att gtg cgg ccg cgc tgg ggc ctt cgc tgt ggt ggc
LHF (IgG2b, for)	tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg atg tgc agc tgc agg mgt cwg grg gag g
LHR (IgG2b, reverse)	atg gtg atg atg atg tgc ggc cgc tgg ttg tgg ttt tgg tgt ctt ggg

8.2.4 Oligonukleotide für die Klonierung in den Vektor pQUANTagen des PhoA Color Systems

PhoA_SH_for	gat gat gtc gac sak gtg cag ctg cag g
PhoA_SH_rev	ctt agc ata tgt cgc gct ggg gtc ttc gct
g	
PhoA_LH_for	gat gat gtc gac gat gtg cag ctg cag g
PhoA_LH_rev	tgg ttc ata tgt tgg ttg tgg ttt tg

8.2.5 Oligonukleotide für die Klonierung von VHH-Dimeren

VHH1 rev 20 GS	acc cgg atc ccc gcc acc gct gcc tcc acc gcc gct acc ccc gcc acc gct gcc tcc acc gcc cga gga gac ggt gac gac ctg ggt ccc
VHH2 for 15 GS	tct tgg atc cgg cgg ggg agg tag tgg ggg tgg ggg ctc agg tgg cgg cat ggc cga tgt gca gct g

8.2.6 Oligonukleotide für die Klonierung in den Vektor pME

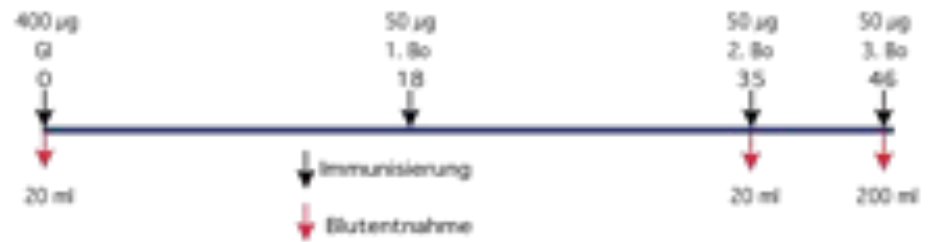
VHH.pME_for_BglII	cga gat cta tgg ccg atg tgc agc tgc ag
VHH.pME_rev_XhoI	gcc tcg agt gak gag acg gtg ac

8.3 Schema der Immunisierung und Blutentnahmen der Lamas 5, 5026 und 5037

Lama 5

ToxA-CPD

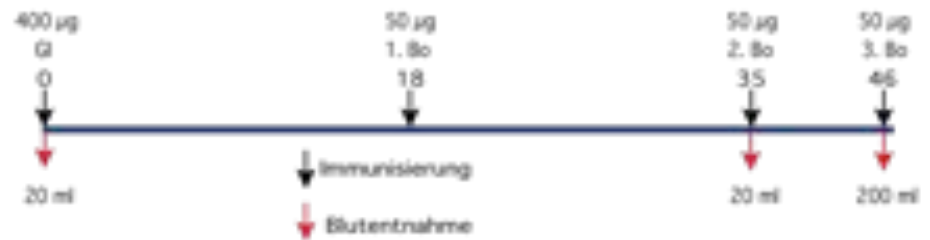
Tag



Lama 5026

ToxB-GT

Tag



Lama 5037

ToxA-CPD/ToxB-GT
CDTa

Tag



Lama	Grund-immunisierung	1. Boost	2. Boost	3. Boost	Blut > ELISA	Blut
5 /5026	12.12.08	30.12.08	16.01.09	-	16.01.09	27.01.09
5037	12.12.08	30.12.08	17.03.09	6.04.06	6.04.09	16.04.09

Lama 6 und Lama 5037

CDT
CDT/ToxA/ToxB

Tag



Grundimmunisierung	1. Boost	2. Boost	3. Boost	Blut > ELISA	Blut
12.12.08	30.12.08	17.03.09	6.04.09	6.04.09	16.04.09

8.4 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8.5 Primärbibliotheken

Lama 25 I (CD38)

```

L-4  CSASGSISSINAMG---WYRnnKERELVASIFSTGSIYYGnnCKSPLGE-----WGQ
L-9  CAASGSFLGLMDMG---RYRnnKERDQVALVSNRGRATYTnnCYVKTPYENPY-----WGQ
L-9  CTASGSITAVRTMG---WYRnnKQRLVATIGRDGSKSYAnnCNVRSFYDY-----WGQ
L-13 CSASGSIDSIIVMG---WYRnnKQREVVARITKGGVANYAnnCHAHGINIETVSGMDY-----WGR
L-14 CAASGRFTFSRSAMG---WFRnnKEREFVGAIRWSDGSAYnnCAAGGGDTLVDMTLYDY-----WGQ
L+16 CAASRFTLDYYPYG---WFRnnKEREGVSCISSDGSSTYYnnCATTPYRCGRLRPGDDY-----WGQ
L-16 CAASGRTYNPTYMG---WFRnnKEREFVAGISVGLSTYYnnCAAITSRGVPVSAQDYAY-----WGQ
L-18 CLASDLTFTNDAWHTMAWFRnnKEREFVAAIKWSGWRGGLnnCAAKSRSYSGENVALESEYFY-----WGQ
L+19 CAASGATLHYAIG---WFRnnKEREGVSCIGTIDGRTYYnnCATDTTSILLGSSCLPSQYFY-----WGQ

```

Lama 25 II (CD38)

```

S-6  CAASGTIFGIGAMG---WYRnnKQRELVAIISGGSPHYAnnCNAFINKMY-----WGQ
L-7  CAASGSIPSSSTM---GYnnMAREFVASISSGGSTRYHnnCNVRVWKDY-----WGQ
L-7  CTADRSIFTFNRMG---WYRnnKQREMVATITSTGNSNYAnnCSMSDYFMDF-----WEG 2
S-8  CAASGEIFSHAIMA---WVRnnKQRELVARITIGGRADVAnnCNVVTPLGLE-----WGQ
L-8  CVASGNHGNIDTMVMGWYRnnKQRELVATITSSGATNYAnnCNLRWSWGTGY-----WGQ
S-11 CAASGNRFPIVSMG---WYRnnKQRELVATITSSGGTNYAnnCNAVSGELRVTLDH-----WGQ
S+/-12 CVASGFPFNYYIG---WVRnnKPREGVSCFSSSDGATYYnnEMS NFLGVQVTHYDY-----WGQ
L-13 CAASGRSFSTNAMV---WFXnnKNREYVGVIADGVTFYAnnCAAGTRGDYTIPTSKWTY-----WGQ 2
S-14 CAASGNIFSFNAMG---WYRnnKRELVAVIASGGTNYAYnnCNVKMTRRTGYTGQYEF-----WGQ
L-14 CAASGSILSMNHMG---WYRnnKQRELVAVIASSGSTKYAnnCVLGPRWTTVVRGTPDY-----WGQ
S-15 CAVSGRPISTFAMG---WFRnnKERKFVASMTKSSGSTAYnnCAADHTVITSLTITATPSY-----WGQ
L-15 CAASGRTISRMYAMG---WFRnnKEREFVAAISWSASTFYAnnCAADRSYGLSTHPDEYDY-----WGQ
L-15 CTASGRSFSNMG---WFRnnKEREFVAAINWSGTYYnnCAATSSGGVYKYNNYPY-----WGQ
S-16 CVRSGREPGRNAMA---WFRnnNEREFVGAIAWGRPIYYnnCAADPATSTSRFGWTFDGA-----WGQ
L-19 CAASGRFTFSYAMG---WFRnnKEREFVAAIRSEGTYYnnCAASRLGNLGSVAGRHTAYDY-----WGQ
S+/-22 CALSGSTQDYAIG---WFRnnKEREFVAVSICSSDGSSTYYnnCAADPVDVYSGSIFFRAGWYEFDY-----WGQ

```

Lama 5 (ToxA-CPD)

L-6 CAASGRIFTLNGMG--WYRnnKQRELVASFSTGGSTNYAnnCNAVrmvvy-----WGQ
 S-8 CVGSGFTFRSDWMT--WARnnKGLEWLSEINPDGDKWInnCARGRDHAFDY-----WGQ
 S-9 CAVSRSGNPINVMG--WYRnnKQREEREFEVALIGSGGRnnCKVALLVGGVDY-----WGK
 S+12 CAASGFSLEDYATG--WFRnnKEREGISCINSDDGTYYTnnCAVDPLGYCSDVMDY-----WGQ
 L-13 CAASGRTFTTYTMG--WFRnnKEREFVAAINWSGKSTYYnnCAAGTSVVVAGRGPYDY-----WGQ
 S+14 CETSGFTFNESSIG--WFRnnKQREGIACIIHNPGSTSYnnCAADLQIKRCSGFGWDY-----WGQ
 S-/+14 CVASGSVPRSNMT--WYRnnKEREFVASVSTSDTNYRnnCGVLGTCSDEVETAFDI-----WGQ
 L+14 CVASGFTFADGAIG--WFRnnKEREELSCISSDDGITYYnnCAAESPPCYSDYGYDEI-----WGQ
 S+15 CAASGFILDDYAIA--WLRnnKEREGVSCISRAEGADMAnnCAAERAPCMDYRLRRPDY-----WGQ
 S-15 CAGSGFTFGRYDMS--WVRnnKGSFVWVGINSDDGTDDYnnCAAVDGPFRRTTELEDYDY-----WGR
 S+16 CVAAGLTDDYTIG--WFRnnKKEGVSCINSRRGGTYYnnCAVAKWFWCSDVDIGLLDY-----RGQ
 S+16 CAASGFSFDDYAIG--WFRnnKKEGVSCLRSSGSTWYnnCAASAVEMPYCRDYAFFDS-----WGQ
 S+18 CTASGFTFDDYAIY--WVRnnKKEGVSCIHNSDDTPKYnnCAVDYAPYNAYCYLPPVDLEF-----WGQ
 L+18 CAASGFTFDDYAIH--WFRnnKKEGVSCIHSSDDTPDYnnCAVDYAPFTSDCYLSPADLEV-----WGQ
 L+18 CAASGFTFDDYAIH--WFRnnKKEGVSCIHSDNGTPKYnnCAVDYAPWNXYCYLSPGDLDF-----WGR
 L+18 CAASGFTFDDYAIH--WFRnnKKEGVSCIHSSDDTPDYnnCAVDYAPFSSYCYLSPGDLLE-----WGX
 L+19 CVASGFNFDDYNIG--WFRnnKKEGVSCIDHSDGSTYYnnCAADPGWGHCRDLFDEYRILEV-----WGX
 L+19 CATSGFNFDYIAIG--WFRnnKGRQGLTCTTNRIPGSTYnnCAADLSWRVYCXDSGDIIFYGS-----WGX
 S+20 CANSGFNFDDYIAIG--WFRnnKKEGVACSTTNDGRAYnnCAADAPPWTIPEAYCSDSSHFDRL-----WGQ
 L+21 CAASGVTLNQFDVG--WFRnnKKEGVSCINMGSSSFYYnnCAAVGSWTRSTSDVNMCAPEHYDL-----WGQ

Lama 5037 (CDTa, ToxA-CPD, ToxB-GT)

L-6 CVVSGTTFRLKDMA--WYRnnKQRMVATITFGGTTWYAnnCNNPRSPFP-----WGQ
 L-8 CAASESVWGMNAMG--WYRnnHPRELVARTTSGGSSNYAnnCNFVPIKIGSDV-----WGQ
 L-9 CVASGSIFGINVMG--WYRnnKQRELVAAISSGGSTNYAnnCNAVRTTWGINY-----WGQ
 S-12 CKASGSGFSIIALR--WVRnnKQRELVAGLTDDTALYAnnCNADVADASTTYVDL-----WGR
 S-12 CVAPGSFAFSIIALR--WYRnnKQRELVAGLTDDDTLYPnnCNADVEDSSTMYTDL-----WGQ
 S-12 CTVSGIVSKIRMG--WYRnnKQRELVAKITMSGVPMYAnnCGADQGSNFYGM DY-----WAK
 S-13 CAVSGDTRDRYMA--WFRnnKEREFVAAINWSGGPQYnnCATDNREDPKGDNTVR-----GXG
 L-13 CASSTPTFTSYAVG--WFRnnKEREFVAAIHWSGEDTSVnnCAARLLVESRELSDP-----WGQ
 S-14 CAASGSDVSIDTMG--FVRnnKEREFVAIISWGPTEYnnCARSNSWPAQRPSQYAN-----WGQ
 S-14 CAASGHSISIDTVG--FVRnnKEREFVGAISWHDPTTEYnnCARSNSWPAQRPSQYAN-----WGQ
 S-15 CVASGEIVSISGMG--WYRnnKQRELVAFITKGGSTNYAnnCNARYTEGDGVLPDFGS-----WGQ
 L-15 CAASGRIFSSYVMG--WFRnnKEREFVAGISWSGSTRYnnCAARLNMMVVTTSAPAYEY-----WGQ
 L-16 CKASGSTLSIVAMG--WVRnnKEREVATITRDGTNTAnnCNALTYDDYDNIQDYGMHY-----WGK
 S-17 CVASGGTFSGYAMG--WFRnnKEREFVAIVISYSGKTTYnnCAADLAYSIDPTTAISGMDY-----WGK
 L-18 CATSETIFTSYTMA--WYRnnKQREFVARITRAGNTKYAnnCAHGNTYYYTAHPNSNEDEYDY-----WGQ
 L-19 CVVSGLSFGVYDMG--WFRnnKEREFVEAISWSGQLTSAnnCAARYRRRVGDYVSANADEYDY-----WGQ
 L-19 CAPSGRTFTMFAMG--WFRnnKEREFVAAINWNRGSTYYnnCAAPGGDNYYYTNPNAYEYTY-----WGQ

Lama 5026 (ToxB-GT)

S-9 CTASFSSSIRSMG--WYRnnKQREMVAEVGGHNLAArynnCHLDPGWGRDNI-----WGQ
 L-11 CTNTRARFAVNTMG--WFRnnKQRELVAATLSTHGDTNIAnnCYARGDTESGRLEL-----WGQ
 L-11 CASTSIRFVIRVMA--WYRnnKQRELVARITNGGSTIIAnnCNAQTTEIGYLEV-----WGQ
 L-11 CATSGSFFLTMA--WYRnnKQRELVAMITGRRDTRYHnnCNVQVPGDWGLKDY-----WGQ
 S-12 CVASRRISSINAMA--WYRnnSRRELVASILQDGTQYnnCNADLDTEMWQALDA-----WGQ
 L-12 CAASVSSYRDDDMG--WFRnnKQRELVAWISGSGHTKYAnnCNLRLSYNPFDSY-----WGQ
 S-13 CVASGSTGIVEIMG--WYRnnKQRELVANIERDARTKYnnCNVIVDYVDTSRMAEY-----WGQ
 S-13 CAASGRTNKMFGGLG--WFRnnGERDFVAGIRWNGRSEMYnnCAEMDMDWGTSEYDH-----WGQ
 S-13 CVATGRTQKLLGLG--WFRnnKERDFVAGIRWSGRNLYnnCAEMDMDWGTTEYDY-----WGQ
 S-16 CVASGPPYSTSTYTLGWFRnnKEREFVASITRSGSSRYnnCAADPAMLELSAYDWKNAY-----WGQ
 S-16 CVASGSTSHINSMG--WFRnnKRELVAGITMDGRPNYVnnCNADTDGDPGEENEYDY-----YGQ
 L-16 CGVSGRTFSDYAMG--WFRnnKERDVVAAISWTGGATYYnnCAADRRWLGLPLTNAADFQF-----WGQ
 L-16 CAASGGTINSYTMG--WFRnnKEREFLAASGGSGGTTNnnCVAKSPWRGNIRLAASYDY-----WGQ
 S+17 CVASGFSLETYAIG--WFRnnKREGVGCIRSSDGSSTFYnnCAADPFGCWVGEDENVMEY-----WGK
 S+17 CAATGFTLDYWAIG--WFRnnNEREGVACISSDENTYYEnnCATAPYGLGYQCAVSDKYDY-----WGQ
 L-18 CAASPSVFTITMA--WYRnnQORTLVASISEGGITEYAnnCNADYRPPWGSDDLRLRLS-----WGQ
 L-19 CAASGRSFVTNPMG--WFRnnKSEFVAGISWGGGTAKYnnCAADYSSGSRDWIPLQESSYEF-----WGR
 L-20 CAVSGRTFGNYNMA--WFRnnQEREFVAAIRWITSGTNYnnCAVDAKGTSTILQVRRTPDSYEF-----WGQ
 L-20 CAASGMIFSDYFGG--WFRnnREREFVAALSWTGGRTLYnnCAADRRPPTWTQPVGRTWDEYDY-----WGQ
 L-20 CVASGRSVVESGGMG--WFRnnKEREFVAAISADGSTTYnnCAADPDGPPSGTGWLKYEVAIDY-----WGQ
 L-23 CTASGSILDGYAIS--WFRnnKEREAVSLIRRRDGSTYYnnCAKDSNYGGNDFFAGRLWMNEEFYDTWGQ

L 6 (CDTa) LH

L-3 CAASGSRLFNMTMG--WYRnnKQRELVASITLDGTTNYRnnCNTPGY-----WGQ
 L-5 CAASGSIVSISTMA--WYRnnKQREWVASITSGGSTNYAnnCNSLRYNY-----WGQ
 L-6 CAASGSTLSIKAMG--WYRnnKQRELVAAIIGGGSPTYnnCNADPPWWD-----WGQ

```

L-8    CAASGNIRSFESMG--WYRnnKQRELVADITSSGSTNYHnnCNVEDFDEYDY-----WGQ
L+11   CVGFGSQLEYVA--WYRnnKEREKVSCISPRELVYADnnCATRNYGCSGAPNY-----WGK 2
L-13   CAASGSTLSIKAMG--WYRnnKQRELVAAGGGGSPYSnnCYARRGDYGSPLRFD-----WGQ 2
L-13   CAASGSTLSIKAMG--WYRnnKQRELVAAGGGGSPYSnnCYAXRGDYGSPNLHFD-----WGQ
L-14   CAASGRTFEDVAWA--WYRnnKEREVFAAISRGATPHYAnnCAAGATYGYASPSRYTY-----WGQ
L-15   CAASGSTFSINPMG--WYRnnKQRELVAHISGGSSNYAnnCYLLGFRMGESDYEEAEY-----WGQ
L-20   CAISGSIFNINAMG--WYRnnKQRELVALITSSGSTNYnnCHAESAQRVGDGTGPVQYRRHEH----WGQ

Lama 5037 (CDTa, ToxA-CPD, ToxB-GT)
L-9    CIAPRGILSFESMG--WYRnnKQRESVAVMTRGGISTYAnnCNARDPYVSVDY-----WGR
L-10   CVASGSTFSLNMG--WYRnnKQREMVARISSLSRTYAnnCKKEADPRDSRSY-----WGQ
L-11   CMARGWAFTVGYMG--WYRnnKQRELVAIIRTGDTTRYGDnnCAEVETEAGRSTQ-----QGR 2
L-11   CAASGSISRNPNG--WYRnnKEREVFAAISDRSSSTRYnnCVGDRVLVTSTSDW-----WGQ
L-13   CAASGGIRVINAMA--WYRnnKQRELVAAGHDAPPLMYAnnCNARGLRTGSVRPFV-----WGQ
L-14   CAGSGRASSGDGMG--WYRnnKEREVFAIITWNTGTPYYnnCGVFMGGNIYYTSSRY-----WGP
L-14   CAASGRSFSTYVA--WYRnnKEREVFAAIDWAGGRKEYnnCAAVRSYYGSDSHQYSD-----WGQ
L-14   CAASGPTYSRNTMA--WYRnnKEREVFAHIRWNVGYTDYnnCAAGNPNLGLRANEYIY-----WGQ
S-15   CVASGRAFGSYGMG--WYRnnQREVFAAISWSGGGRKYnnCAADYFGTGSASRDGYEY-----WGQ
L-15   CAASGDTFGMNPNG--WYRnnKEREVFAAITWGEVPHYAnnCARARDLSVTHLRAHYDV-----WGQ
L-15   CAASGSIFSVDHMA--WYRnnKQRELVAIRAKGGDTKYTnnCNAIISTNEHVGVVAYTY-----WGQ
L-15   CVASGRIFTPHAMA--WYRnnKEREVFAFVNWSGGITYYnnCAARDGDAYYRTENRYDN-----WGQ
L-16   CVVSGLTFSNYNMG--WYRnnKEREVFAALTTSGRSTNYnnCAADRIRVGIRTSRASMY-----WGQ
L+19   CAASGFTLEHYDIA--WYRnnKREGISCISSRHLEYTnnCAADTEGLGAGYLESRYVWDI----YGQ
L+22   CAASGFSDNDYVIG--WYRnnKEREKVSCIAASDTLTWYnnCGARSQIIALYRSGNGDGPCGGMDY--WGK

```

Abb. 8.5.1: Aminosäuresequenz-Vergleich in verkürzter Darstellung von zufällig gewählten Klonen aus den VHH-Bibliotheken der immunisierten Lamas gegen CD38 (25), ToxA-CPD (5, 5037), ToxB-GT (5026, 5037) und CDTa (6, 5037). Die drei CDR-Regionen (CDR1: rot, CDR2: grün und CDR3: blau) sowie die für VHHs typischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen in der FR2 sind farbig (magenta) hervorgehoben. Gelb hinterlegt sind das kanonische sowie ein zuweilen zusätzlich auftretendes Cysteinpaar (CDR2, CDR3). Die Namensgebung der Sequenzen reflektiert das Vorkommen einer *short hinge* bzw. *long hinge* (S/L), das Vorkommen eines extra Cysteinpaares (-/+) gefolgt von der Anzahl der Aminosäuren in der CDR3.