



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Charakterisierung von B-Zell-Liganden im Kontext maligner und allergener Erkrankungen

Dissertation

vorgelegt von:

Andrea Michaela Barbara Diethers

1. Gutachter: Prof. Dr. Edzard Spillner
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

Institut für Biochemie

Erscheinungsjahr: 2014

Disputation am: 19. Dezember 2014

Meiner Mutter

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Oktober 2010 bis Juli 2014 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg, Department Chemie, im Arbeitskreis von Herrn Assoc. Prof. E. Spillner durchgeführt.

1. Gutachter: Assoc. Prof. E. Spillner

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Präfixe für Einheiten	IX
Einheiten	X
Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren.....	X
1 Einleitung.....	11
1.1 Die Entwicklung von B-Lymphozyten	12
1.1.1 Struktur und Funktion von B-Zell-Rezeptoren bzw. Antikörpern	15
1.1.2 Aktivierungsmodelle des B-Zell-Rezeptors.....	18
1.2 Die chronische lymphatische Leukämie (CLL).....	20
1.2.1 CLL und die Rolle des B-Zell-Rezeptors.....	21
1.3 Burkitt-Lymphom (BL).....	24
1.4 Allergie	25
1.4.1 Ablauf der IgE-vermittelten Hypersensibilitätsreaktion	26
1.4.2 Allergene	28
1.4.2.1 Das Gräserpollenallergen Phl p 5.....	29
1.5 Zielsetzungen	30
2 Material.....	31
2.1 Affinitätsmatrices	31
2.2 Antikörper	31
2.3 Bakterienstämme	31
2.4 Chemikalien und Bioreagenzien.....	32
2.5 Enzyme und Standards.....	32
2.6 Geräte	32
2.7 Kommerzielle Kits	33
2.8 Medien	33
2.9 Oligonukleotide	34
2.10 Puffer und Lösungen	34
2.11 Vektoren und Helferphagen	36
2.12 Verbrauchsmaterialien	37

2.13	Zelllinien und Zellkultur	37
3	Methoden	38
3.1	Molekularbiologische Methoden	38
3.1.1	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	38
3.1.2	Sequenzierung nach der <i>BigDye</i> -Terminator-Methode	40
3.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	40
3.1.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	41
3.1.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
3.1.6	Alkoholpräzipitation	42
3.1.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	42
3.1.8	Ligation	42
3.1.9	Transformation von <i>E. coli</i>	43
3.1.10	Lagerung von <i>E. coli</i> -Klonen.....	43
3.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA.....	43
3.1.12	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	44
3.1.13	Fusionsklonierung mittels <i>StarGate</i> -System	44
3.2	Zellbiologische Methoden	46
3.2.1	Kultivierung und Passagieren von Zellen	46
3.2.1.1	Kultivierung von HEK293-Zellen.....	46
3.2.1.2	Kultivierung von A431-Zellen	47
3.2.1.3	Kultivierung von Sf9-Insektenzellen	47
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	47
3.2.3	Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	47
3.2.4	Expression von Antikörperkonstrukten in HEK293-Zellen.....	48
3.2.4.1	Transiente Transfektion	48
3.2.4.2	Stabile Transfektion.....	49
3.2.5	Expression von Fab-Fragmenten in Sf9-Zellen.....	49
3.2.5.1	Transfektion von Sf9-Zellen	49
3.2.5.2	Herstellen von Baculovirus infizierten Insektenzellen	49
3.2.5.3	Testexpression.....	50
3.2.5.4	Expression in Sf9-Zellen	50
3.2.6	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC).....	50
3.3	Phage Display-Technologie.....	51
3.3.1	Darstellung rekombinanter Phagen	51
3.3.2	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) der Phagen.....	51

3.3.3	Selektion von Mimotopen	52
3.3.3.1	Kultivierung des Bakterienstammes ER2738	52
3.3.3.2	Titerbestimmung der M13 Bakteriophagen	52
3.3.3.3	Festphasenselektion der Phagenpeptidbibliothek (Panning).....	53
3.3.3.4	Negativselektion.....	54
3.3.3.5	Amplifikation selektierter Phagenklone.....	54
3.3.3.6	ELISA-Analyse	54
3.3.3.7	Phagen-DNA Präparation zum Sequenzierung.....	55
3.4	Peptidchemie.....	55
3.4.1	Peptidsynthese	55
3.4.2	HPLC (<i>high performance liquid chromatography</i>).....	56
3.4.3	Aufnahme von MALDI-TOF-Spektren.....	56
3.4.4	Biotinylierung von Peptiden.....	57
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	57
3.5.1	Periplasmatische Expression	57
3.5.2	Präparation des periplasmatischen Extraktes.....	57
3.5.3	Nativer Zellaufschluss	57
3.5.4	Affinitätschromatographische Verfahren.....	58
3.5.4.1	Affinitätschromatographie mittels Protein A	58
3.5.4.2	Affinitätschromatographie mittels Amylose-Matrix	58
3.5.4.3	Affinitätschromatographie mittels Chitin-Matrix.....	58
3.5.4.4	Affinitätschromatographie mittels KappaSelect Matrix	59
3.5.4.5	IMAC (<i>immobilized metallion affinity chromatography</i>)	59
3.5.4.6	Immunaaffinitätschromatographie.....	60
3.5.5	SDS-PAGE (<i>sodium dodecylsulfat-polyacrylamide gel electrophoresis</i>).....	60
3.5.6	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von Proteinen	61
3.5.7	Proteolytische Spaltung von Immunglobulinen.....	61
3.6	Immunologische Methoden.....	61
3.6.1	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	61
3.6.2	Immunoblot	62
3.7	Biophysikalische Methoden	62
3.7.1	SPR-Spektroskopie.....	62
3.7.2	Durchflusszytometrie	66
3.7.3	Dynamische Lichtstreuung.....	67

4	Ergebnisse.....	69
4.1	Rekombinante Darstellung und Reinigung der Antikörperkonstrukte.....	69
4.1.1	Sequenzinformationen der Lymphom-Rezeptoren.....	70
4.1.2	Darstellung als humane IgG1.....	72
4.1.2.1	Chromatographische Reinigung der humanen IgG1	73
4.1.3	Darstellung als humane Fab-Fragmente	75
4.1.3.1	Proteolytische Papain-Spaltung intakter Immunglobuline.....	76
4.1.3.1	Prokaryotische Expression der Fab-Fragmente.....	80
4.1.3.2	Eukaryotische Expression der Fab-Fragmente	83
4.1.4	Darstellung als membrangebundene IgM.....	85
4.1.5	Generierung von Affinitätsmatrices zur spezifischen Reinigung	89
4.2	Interaktionsanalysen der Antikörperkonstrukte.....	93
4.2.1	Selektion und Analyse von Mimotopen	93
4.2.2	Darstellung der Mimotope.....	97
4.2.2.1	Prokaryotische Expression der Mimotope	97
4.2.2.2	Chemische Synthese der Mimotope.....	99
4.2.3	SPR-spektroskopische Messungen zur Bestimmung der Affinität.....	103
4.2.3.1	Bindungsstudie in Form eines kompetitiven Assays	107
4.2.4	DLS-Messungen der Antikörperkonstrukte.....	109
4.2.5	Initiale Kristallisationsprozesse.....	112
4.3	Epitop-Analyse des Phl p 5-spezifischen Antikörpers.....	113
4.3.1	Darstellung und Analyse von Allergenderivaten	114
4.3.2	<i>Phage Display</i> des identifizierten Epitops.....	119
5	Diskussion.....	120
5.1	Rekombinante Darstellung und Reinigung der Antikörperkonstrukte.....	122
5.1.1	Darstellung als humane IgG1.....	123
5.1.2	Darstellung als humane Fab-Fragmente	124
5.1.3	Darstellung als membrangebundene IgM.....	127
5.1.4	Generierung von Affinitätsmatrices zur spezifischen Reinigung	128
5.2	Interaktionsanalysen der Antikörperkonstrukte.....	129
5.2.1	Darstellung und Analyse von Mimotopen.....	129
5.2.2	SPR-spektroskopische Messungen	133
5.2.3	DLS-Messungen und Kristallisation der Antikörperkonstrukte	136
5.3	Epitop-Charakterisierungen	137
5.3.1	Epitop-Analyse des Ig024-Lymphom-Antikörpers.....	137

5.3.2	Epitop-Analyse des Phl p 5-spezifischen Antikörpers	140
6	Zusammenfassung	143
7	Abstract.....	145
8	Literatur	147
9	Anhang	160
9.1	Sequenzdaten	160
9.2	Vektorkarten	174
9.3	Gefahrstoffe und Sicherheitsdaten gemäß GHS.....	175
9.4	Entsorgung	176

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C _H	konstante Domäne der schweren Kette
C _L	konstante Domäne der leichten Kette
CLL	<i>chronische lymphatische Leukämie</i>
CRIT	<i>component-resolved immunotherapy</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECP	<i>eosinophilic cationic protein</i>
EPO	<i>eosinophilic peroxidase</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Fab	antigenbindendes Fragment
Fc	kristallisierbares Fragment
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FKS	Fötales Kälberserum
Fmoc	N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl
F-Pilus	Fertilitäts-Pilus
Fv	<i>fragment variable</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMAC	<i>immobilized metallion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
MBP	<i>maltose binding protein</i>
MeCN	Acetonitril
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MW	<i>molecular weight</i>

MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPBS	Milchpulver-PBS
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
OAS	<i>oral allergy syndrom</i>
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PR	<i>pathogenesis-related</i>
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single chain Fv</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIT	spezifische Immuntherapie
SOB	<i>salt optimized broth</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
Strep	Streptomycin
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumtetrafluoroborat
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TIPS	Triisopropylsilan
TLR	<i>toll-like receptor</i>
T _M	<i>melting temperature</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNP	Trinitrophenol
TPBS	Tween-PBS
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaureat
UV	Ultraviolett
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

Präfixe für Einheiten

k	Kilo (10 ³ -fach)
m	Milli (10 ⁻³ -fach)
μ	Mikro (10 ⁻⁶ -fach)
n	Nano (10 ⁻⁹ -fach)
p	Piko (10 ⁻¹² -fach)

Einheiten

Å	Angström
bp	Basenpaare
Da	Dalton
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute(n)
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
U	<i>Unit</i>
V	Volt

Ein- und Dreibuchstaben-*Code* der Aminosäuren

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

1 Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Charakterisierung humaner Antigen-Rezeptoren von Lymphom- und Allergie-Patienten. Dabei werden erstmalig zugrundeliegende Rezeptor-Ligand-Interaktionen beschrieben und Epitope definiert.

B-Zell-Rezeptoren (BZR) sind hochspezifische Schlüsselmoleküle der Antigen-Erkennung und lösen bei lymphatischen Zellen schützende Immunreaktionen aus. Um neue Erkenntnisse zur pathophysiologischen Transformation der B-Lymphozyten zu erhalten, erfolgt in dieser Arbeit die Analyse einzelner repräsentativer Rezeptoren von entarteten Zellen hinsichtlich ihrer Bindungs-Spezifität und -Modalität. Das Verständnis dieser Interaktion von Rezeptor gegen spezifischen Ligand ist essentiell für ein tiefergehendes Wissen über die Entwicklung Rezeptor-abhängiger B-Zell-basierter Erkrankungen. Außerdem kann es einer erfolgreichen therapeutischen Intervention dienen.

In den folgenden Abschnitten werden einleitend die Mechanismen der B-Zell-Entwicklung mit besonderem Fokus auf den B-Zell-Rezeptor erläutert. Anschließend wird dargestellt wie die Dysbalance dieser physiologischen Prozesse in einer pathogenen Transformation von B-Zellen resultiert und zur Ausprägung von unterschiedlichen Erkrankungen führen kann. Zu den möglichen Krankheiten zählen die chronische lymphatische Leukämie, das Burkitt-Lymphom und die Entwicklung einer Allergie.

1.1 Die Entwicklung von B-Lymphozyten

Unser Immunsystem bewahrt uns vor Erkrankungen indem es Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen erkennt. Es löst eine Immunreaktion aus, die den krankmachenden Erreger eliminiert. Die B-Lymphozyten sind bei höheren Organismen eine wichtige Komponente des adaptiven Immunsystems, denn sie schützen vor Infektionen: Sie erkennen mit ihrem B-Zell-Rezeptor gezielt Antigene. Die BZR aktivieren B-Zellen und initiieren damit eine Proliferation sowie Differenzierung der Immunzellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen und langlebige Gedächtniszellen (Rajewsky, 1996). Studien mit Überlebenden der Influenza-Pandemie im Jahre 1918 zeigen, dass Antigen-spezifische Gedächtnis-B-Zellen über Jahrzehnte im Körper des Menschen erhalten bleiben (Yu *et al.*, 2008). Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen werden diese B-Zellen aktiviert und lösen in Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems innerhalb weniger Stunden eine Immunreaktion aus. Dabei werden Antikörper sezerniert, die spezifisch an das Antigen binden und es auf diese Weise neutralisieren.

Die B-Zelle entwickelt sich in zwei Stufen: zunächst erfolgt die Bildung und Überprüfung funktioneller B-Lymphozyten im Knochenmark. Danach induzieren Antigene eine Differenzierung in den sekundären lymphatischen Organen statt. Für beide Entwicklungsstufen ist der BZR das entscheidende Element der Differenzierung. Nur wenn der Rezeptor funktionsfähig ist und gleichzeitig die richtige Mikroumgebung und Wachstumsfaktoren gegeben sind, wird die jeweils nächste Entwicklungsstufe erreicht.

Im Körper des Menschen beginnt die graduelle Entwicklung der B-Lymphozyten in der fetalen Leber bzw. im Knochenmark, dem wichtigsten Organ der Hämatopoese (primäres lymphatisches Organ; Hardy & Hayakawa, 2001). Die Bezeichnung „B-Lymphozyt“ stammt ursprünglich von ihrem Bildungsort in der *Bursa Fabricii* bei Vögeln. Nachträglich erhielt der Buchstabe B die Bedeutung *bone marrow* (engl. Knochenmark). Zu Beginn des B-Zell-Differenzierungsprozesses bilden sich sogenannte pro-B-Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen. Nach einer Umgestaltung der Gene für die schweren Immunglobulin-Ketten werden diese Zellen als prä-B-Lymphozyten bezeichnet (Abb.1.1).

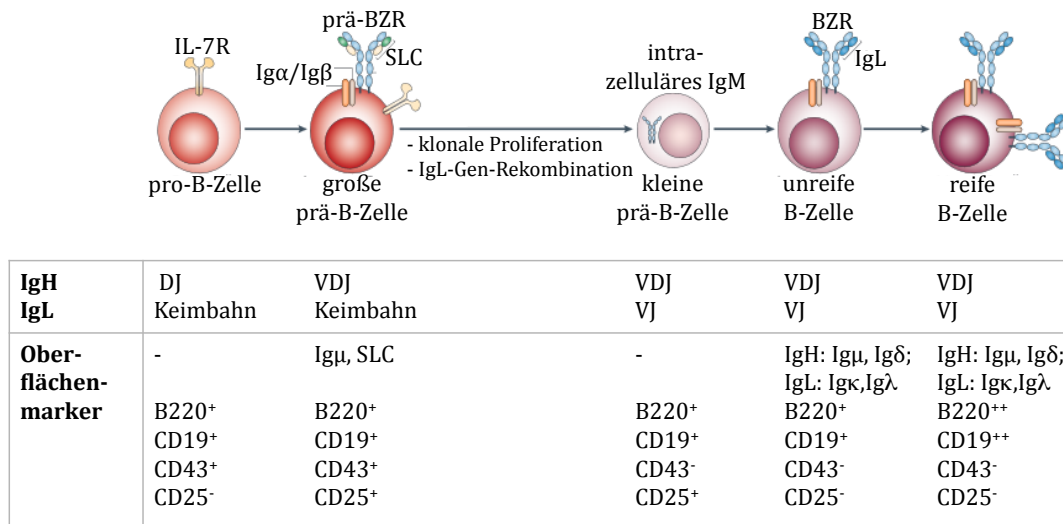


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Stadien der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark.

Die einzelnen Stufen der B-Zell-Entwicklung sind über den Status der Immunglobulin-Loci und die Expression von Oberflächenmarkern definiert. Eine erfolgreiche Umordnung des IgH-Genortes erlaubt die Expression des prä-BZR bestehend aus der schweren Igμ-Kette, der SLC (*surrogate light chain*; λ5V/preB) sowie den signalleitenden Untereinheiten Igα/Igβ. Nach der Umordnung des IgL-Genlocus wird ein BZR der Klasse IgM (Igμ, λ/κ, Igα/Igβ), später auch ein BZR der Klasse IgD (Igδ, λ/κ, Igα/Igβ) exprimiert. IgH: schwere Immunglobulin-Kette; IgL: leichte Immunglobulin-Kette.

Diese exprimieren typischerweise auf ihrer Zelloberfläche den prä-BZR, der sich aus der Igμ-Kette, der SLC-Kette (*surrogate light chain*) sowie der Igα/Igβ-Komponente zusammensetzt (Herzog, Reth & Juma, 2009). Es folgt eine Neuordnung der kodierenden Region für die leichten Immunglobulin-Ketten und nachfolgend die finale Expression des BZR der Klasse IgM auf der Zelloberfläche. In diesem Stadium werden die B-Zellen als unreife B-Lymphozyten bezeichnet. Die Zellen verlassen das Knochenmark und setzen ihre Entwicklung in der Milz fort wo sie sich in naive (reife B-Zellen, die noch keinen Kontakt zum Antigen hatten), folliculäre oder Marginalzonen B-Zellen differenzieren. Die reifen B-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch alternatives Spleißen auch IgD-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (Geisberger, Lamers, & Achatz, 2006).

Das Immunsystem unseres Körpers muss die richtige Balance finden, um einer enormen Vielzahl unterschiedlicher Antigene begegnen zu können ohne eine Autoreaktivität zu generieren. Im Verlauf des B-Zell-Entwicklungsprozesses sorgen verschiedene Mechanismen an bestimmten Kontrollpunkten (*Checkpoints*) für eine Eliminierung von etwa 75% der neu entwickelten B-Zellen aufgrund einer inkorrekten Immunglobulin Gen-Umordnung oder einer ausgeprägten Selbsterkennung (Abb. 1.2.; negative Selektion; Ollila & Vihinen, 2005).

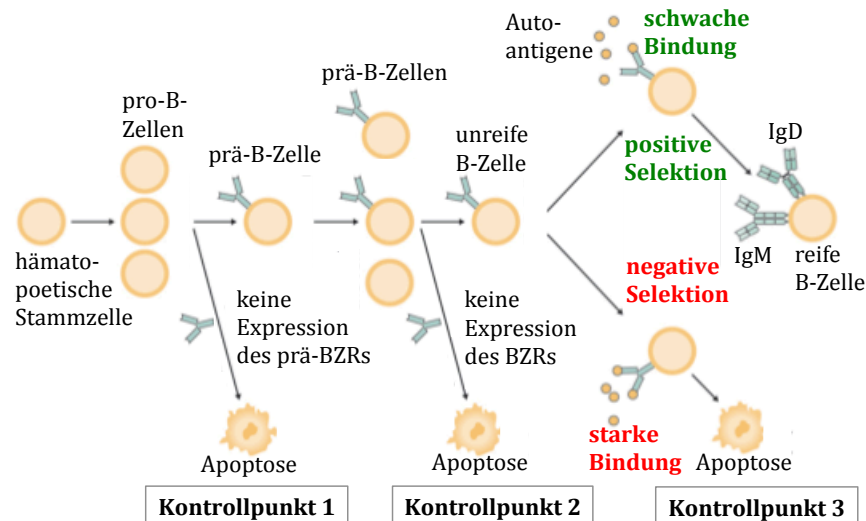


Abb. 1.2: Kontrollpunkte der B-Zell-Entwicklung.

B-Zellen, die keinen funktionellen prä-BZR bzw. BZR exprimieren, werden durch Apoptose eliminiert, da ihnen notwendige Überlebensstimuli fehlen (Kontrollpunkt 1 und 2). Unreife B-Lymphozyten werden ebenfalls eliminiert, wenn sie eine hohe Affinität zu Autoantigenen zeigen (Kontrollpunkt 3). Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014).

So führt die Expression eines hochaffinen autoreaktiven BZRs zum programmierten Zelltod der unreifen B-Zelle, noch bevor diese das Knochenmark verlassen kann.

Weiterhin werden Toleranzmechanismen wie die Rezeptoredition und die Anergie im Verlauf der B-Zell-Entwicklung beschrieben (Nemazee, 2006). Bei der Rezeptoredition werden die V- und J-Elemente der leichten Immunglobulin-Kette ein weiteres Mal rekombiniert. Diese neugenerierte leichte Kette kann möglicherweise gepaart mit der schweren Kette zu einer neuen Liganden-Spezifität des BZRs führen und auf diese Weise die Zelle vor dem programmierten Zelltod bewahren. Bei der Anergie kommt es durch das Abschalten der Immunantwort zu keiner Reaktion der B-Zelle auf Autoantigene, die mit geringer Affinität an den BZR binden.

Die reifen B-Zellen zirkulieren im Blut und im lymphatischen System. In den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Lymphfollikel, Milz, Tonsillen, Peyer-Plaques und dem Wurmfortsatz treffen Antigen und immun-kompetente Lymphozyten zusammen. Dabei werden weitere Differenzierungsschritte initiiert und eine spezifische Immunantwort generiert.

Während sich B-Zellen außerhalb des Knochenmarks entwickeln, exprimieren sie neben dem BZR weitere B-Zell-spezifische Oberflächenmoleküle (Kurosaki, 2002). Nach der Expression dieser Moleküle unterscheidet man zwischen B1-Zellen (CD5, IgM, IgD), die

vorwiegend für ein T-Zell-unabhängige Antikörper-Produktion verantwortlich sind sowie die B2-Zellen (CD45, CD19, CD40, MHCII), welche das Gros der B-Zellen ausmachen- Letztere sorgen für die T-Zell-abhängige Immunantwort sorgen. B2-Zellen finden sich vor allem in den sekundären Lymphorganen. Im Gegensatz zur T-Zell-abhängigen Immunantwort unterbleibt bei der T-Zell-unabhängigen Aktivierung der Klassenwechsel und es werden Antikörper der Klasse IgM sezerniert. Zudem differenzieren sich B1-Zellen nicht zu Gedächtniszellen.

Weitere Funktionen von B-Zellen umfassen die Antigen-Präsentation über MHC II-Moleküle, die Zytokin-Produktion und die Organisation von Lymphgeweben.

Eine Störung dieses hochkomplexen Entwicklungsprozesses der B-Lymphozyten kann im menschlichen Körper zu Autoimmunität, Malignität, Immundefizienz und Allergie führen.

1.1.1 Struktur und Funktion von B-Zell-Rezeptoren bzw. Antikörpern

B-Zellen tragen auf der Zelloberfläche ein spezifisches Immunglobulin, den B-Zell-Rezeptor (BZR). Dieser Antigenrezeptor ist membranverankert und spezifisch für den jeweiligen Zellklon (Chiorazzi, Hatzi, & Albesiano, 2005). Er vermittelt Signale und spielt dadurch eine wichtige Rolle für die Funktion und das Überleben einer B-Zelle (Lam, Kühn, & Rajewsky, 1997; Meffre & Nussenzweig, 2002; Niir & Clark, 2002). Zusätzlich internalisiert der BZR das Antigen und regt damit die Prozessierung mit nachfolgender Peptid-Präsentation an MHC II-Molekülen an (Gauld, Dal Porto, & Cambier, 2002).

In seiner monomeren Form ist der BZR ein 1:1-Komplex, der sich aus einer membrangebundenen Immunglobulin- sowie einer heterodimeren $Ig\alpha/Ig\beta$ -Komponente (CD79a/CD79b) zusammensetzt (Abb. 1.3; Schamel & Reth, 2000; Tolar, Sohn, & Pierce, 2005).

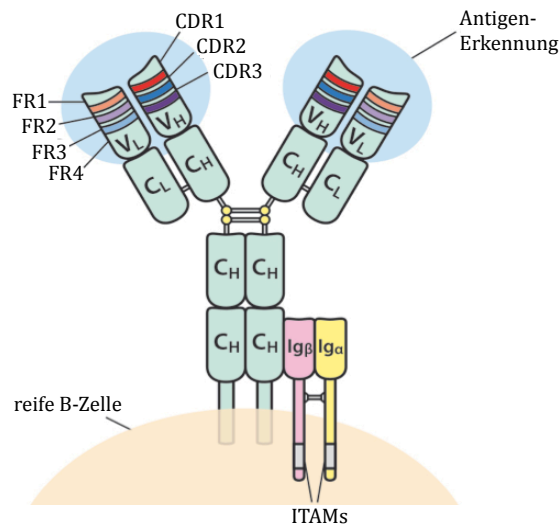


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des B-Zell-Rezeptors.

Der B-Zell-Rezeptor (BZR) ist ein membranverankerter Proteinkomplex aus zwei leichten und zwei schweren Immunglobulin-Ketten sowie der signalleitenden Ig α /Ig β -Komponente. FR: *framework*; CDR: *complementarity determining region*; ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*. Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014).

Wenn eine Zelle sich zur Plasmazelle ausdifferenziert, reagiert sie auf Antigene (*antibody generating*): Sie entfernt die Transmembrandomäne des BZR durch RNA-Spleißen. Daraufhin sezerniert die Plasmazelle lösliche Antikörper derselben Spezifität in das Blutplasma. Eine aktivierte Plasmazelle produziert bis zu 2000 Antikörpermoleküle pro Sekunde.

Diese löslichen Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind aus je zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen glykosylierten schweren Ketten aufgebaut (Edelmann & Pulik, 1962). Bei humanen Immunglobulinen werden zwei Typen der leichten Kette (κ , λ) und fünf Typen der schweren Kette (α , γ , μ , δ , ϵ) unterschieden. Nach ihrer schweren Kette werden Antikörper in die fünf Hauptklassen IgA, IgG, IgM, IgD und IgE eingeteilt. Die verschiedenen Antikörperklassen unterscheiden sich in ihrer Verteilung im Organismus und erfüllen unterschiedliche Effektorfunktionen. Jede leichte Kette ist über eine Disulfidbrücke mit einer schweren Kette verbunden, und die schweren Ketten sind wiederum durch mindestens eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Immunglobuline sind modular aus mehreren Immunglobulindomänen mit einer molekularen Masse von ca. 12,5 kDa pro Domäne aufgebaut.

Die leichten Ketten sind aus einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne aufgebaut. Die schweren Ketten bestehen aus einer variablen (V_H) und drei konstanten

Domänen bei IgG, IgA, IgD (C_{H1} bis C_{H3}) sowie vier konstanten Domänen bei IgE und IgM (C_{H1} bis C_{H4}). Innerhalb der konstanten Regionen der IgG-, IgA- und IgD-schweren Kette befindet sich die sogenannte *Hinge*-Region. Diese ist besonders reich an Cystein- und Prolinresten und machen die Segmente des Antikörpers flexibel. In der variablen Region der schweren und leichten Antikörper-Kette sind drei hypervariable Bereiche (CDR1 bis CDR3, *complementarity determining region*), die im gefalteten Protein jeweils drei nebeneinander liegende Schleifen binden. Die CDR der leichten und schweren Kette bilden zusammen die Kontaktzone für das Antigen und sind für die Spezifität der Antikörperbindung verantwortlich (Wu & Kabat, 1970). Dabei wird der CDR 3 der schweren Kette der größte Einfluss beigemessen wird (Barrios, Jirholt, & Ohlin, 2004). Eine ältere Bezeichnung für diese Antigen-Bindungsstelle ist Idiotyp (griech. *idio*: eigen) und betont deren Einzigartigkeit. Im Gegensatz dazu bezeichnet der Isotyp (griech. *iso*: gleich) den konstanten Bereich des Immunglobulins.

Wie Rodney Porter 1959 nachwies, kann man IgG-Antikörper durch limitierte proteolytische Einwirkung von Papain in drei Fragmente von jeweils 50 kDa spalten. Zwei davon binden das Antigen und werden als Fab bezeichnet (*fragment antigen binding*). Das andere Fragment, Fc (*crystallizable*), vermittelt die Effektorfunktionen. Jedes Fab-Fragment besteht aus einer vollständigen leichten Kette und den aminoterminalen Domänen einer schweren Kette (V_H und C_{H1}). Das Fc-Fragment dagegen enthält die carboxyterminalen Domänen der beiden schweren Ketten (C_{H2} bis C_{H3} bzw. C_{H4}). Die Domänenstruktur der Immunglobuline macht eine gezielte Isolierung der Bindungsregionen möglich. Diese können in geeignete Antikörperformate konvertiert und auf diese Weise sowohl experimentellen als auch therapeutischen und diagnostischen Applikationen zugänglich gemacht werden.

B-Lymphozyten können theoretisch 10^{13} verschiedene Antikörpermoleküle produzieren, wobei von etwa 10^6 verschiedenen Antikörper-Spezifitäten im menschlichen Körper ausgegangen wird (Jung & Alt, 2004). Dieses enorme Repertoire an unterschiedlichen Antikörperpartikeln wird durch den komplexen Mechanismus der V(D)J-Rekombination der Immunglobulin-Gene sowie weitere Prozesse wie die somatische Hypermutation, Genkonversion und Isotypenwechsel gewährleistet (Muramatsu *et al.*, 1999; Vihinen *et al.*, 2001). Eine V(D)J-Rekombination verknüpft die Immunglobulin-Genloci, die V-, D- und J-Elemente. Diese Segmente bilden den spezifischen Antigen-bindenden Teil des Immunglobulins aus.

1.1.2 Aktivierungsmodelle des B-Zell-Rezeptors

Eine B-Zelle exprimiert bis zu 120.000 BZR auf ihrer Zelloberfläche (Yang & Reth, 2010) und erkennt damit ihr Antigen. Die biochemischen Prozesse, die nach der Bindung des BZR-Liganden intrazellulär ablaufen, sind bereits charakterisiert worden (DeFranco, 1997; Gauld, Dal Porto, & Cambier, 2002). Allerdings ist der eigentliche Aktivierungsmechanismus bzw. der Status des unstimulierten BZR was seine Struktur, Dynamik und Organisation betrifft, bislang unklar und wird in der aktuellen Literatur viel diskutiert. Als erwiesen gilt, dass der BZR in der Regel nicht durch monovalente Liganden aktiviert wird. Darüber hinaus bestand lange Zeit die Theorie, dadurch dass die monomeren Rezeptoren über das Antigen quervernetzt werden, die Aktivierung der B-Zelle initiiert wird (Quervernetzungs-Modell; Metzger, 1992). Aufgrund dieser Rezeptor-Kopplung kommt es zu einer reziproken Phosphorylierung und Aktivierung der ITAM-assoziierten Kinasen (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Allerdings deuten aktuelle Forschungsdaten darauf hin, dass die Rezeptoren auf einen anderen Weg aktiviert werden. Unklar war beispielsweise bislang, in welcher Weise die Rezeptor-Aktivierung durch die hohe Vielzahl von Liganden ausgelöst werden kann, denn die Raumstruktur von Liganden weicht teilweise erheblich voneinander ab..

Um den B-Zell-Aktivierungsmodus zu entschlüsseln, wurde untersucht, wie inaktive B-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen angeordnet sind. Nach dem *Picket-Fence-Modell* begrenzt ein Aktin-Geflecht die Diffusionsräume der Zellmembran: Das Geflecht wirkt wie ein Zaun (*picket*), dessen Pfähle (*fence*) aus Transmembranproteinen in der Membran verankert sind. (Kusumi *et al.*, 2005). Dabei können monomere BZR ungehindert von einem Kompartiment ins nächste diffundieren. Oligomere sind hingegen in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt und in Nanocluster strukturiert (Lillemeier, Pfeiffer, Surviladze, Wilson, & Davis, 2006; Mattila *et al.*, 2013). Diese Immobilisierung der BZR scheint entscheidend für die Entstehung von intrazellulären Signalosomen zu sein (Yuseff, Pierobon, Reversat, & Lennon-Duménil, 2013).

Basierend auf aktuellen Forschungsdaten gibt es derzeit drei mögliche Aktivierungsvarianten-Modelle für den BZR: das Dissoziations-Aktivierungs-Modell (Abb. 1.4), das Konformations-induzierte Oligomerisierungs-Modell (Abb. 1.5) und das Kollisions-Kopplungs-Modell (Abb. 1.6).

Nach dem Dissoziations-Aktivierungs-Modell führt die Bindung eines multivalenten Liganden zur Aufhebung der Oligomerstruktur der BZR, sodass die ITAM-Sequenzen zur Phosphorylierung und somit Aktivierung der Signalkaskade zugänglich werden (Yang & Reth, 2010b). Für dieses Modell der BZR-Dissoziation spricht, dass die Raumstruktur der Liganden und somit sterische Effekte eine untergeordnete Rolle spielen.

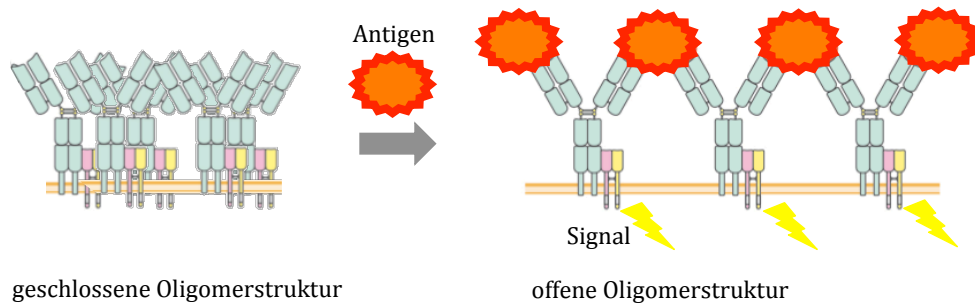


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Dissoziations-Aktivierungs-Modells.

Erst nach Aufhebung der geschlossenen Oligomerstruktur der BZR nach Bindung des Antigens, kommt es zur Aktivierung der B-Zelle durch die intrazelluläre Signalkaskade. Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014).

Konträr zu dem vorangegangenen Aktivierungsmechanismus geht das Konformations-induzierten Oligomerisierungs-Modell davon aus, dass sich die BZR in monomerer Form auf der Zelloberfläche befinden (Tolar & Pierce, 2010). Nach diesem Modell ist die C μ 4-Domäne in Abwesenheit des Antigens so strukturiert, dass sie keine BZR-Oligomerisierung erlaubt. Erst nach Antigen-Kontakt ändert sich die BZR strukturell und es wird den Rezeptoren möglich, sich zusammen zu lagern.

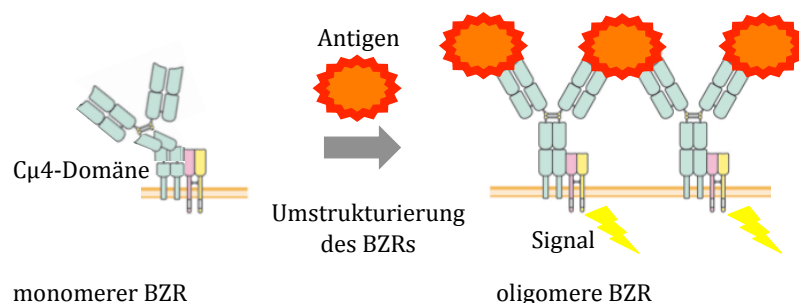


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Konformations-induzierten Oligomerisierungs-Modells.

Durch Bindung des Antigens wird die Struktur des BZRs geändert. Dadurch können die Rezeptoren Oligomere auf der Zelloberfläche bilden und die B-Zelle aktivieren. Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014)

Beim Kollisions-Kopplungs-Modell wird angenommen, dass der Zytoskelett-Zaun die BZR behindert – die BZR können deshalb nicht mit aktivierenden Korezeptoren und Kinasen interagieren. (Treanor *et al.*, 2010). Die Aktivierung des BZRs geht mit einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts einher, sodass die Rezeptoren mit den aktivierenden Elementen wechselwirken können.

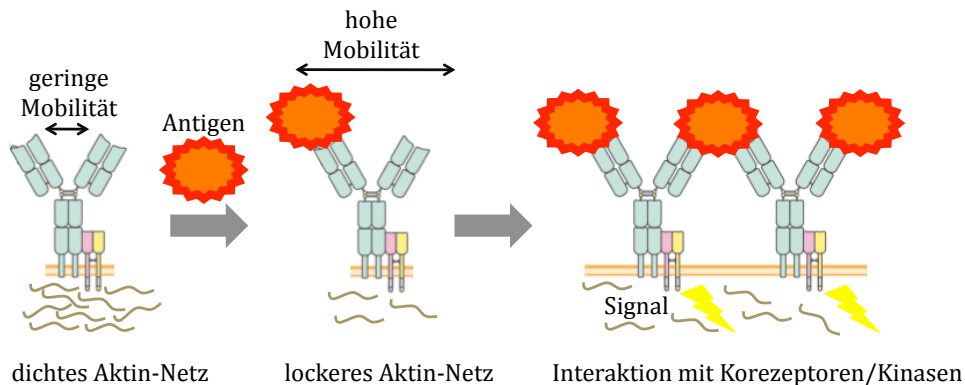


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Kollisions-Kopplungs-Modells.

Die Zellmembran ist durch das Aktin-Netz sowie weitere Transmembranproteine in verschiedene Kompartimente gegliedert (*Picket-Fence-Modell*). Nach Bindung des Antigens kommt es zu einer Umstrukturierung des Aktin-Geflechtes wodurch die Mobilität des BZRs erhöht wird. Daraufhin kann dieser mit Korezeptoren und Kinasen interagieren und die aktivierende Signaltransduktion ins Zellinnere wird initiiert. Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014).

1.2 Die chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) gehört zu den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe (Chiorazzi, Rai, & Ferrarini, 2005). Sie zeichnet sich durch kleine, morphologisch reif wirkende, jedoch immunologisch inkompetente B-Lymphozyten aus. Diese Zellen expandieren monoklonal und akkumulieren sich im Knochenmark, im peripheren Blut, in Lymphknoten und der Milz. . Die CLL ist mit einer Inzidenz von 0,7 – 21 pro 100.000 pro Jahr im Alter von 40 – 70 Jahren die in der westlichen Welt am häufigsten vorkommende Leukämieform (Chiorazzi, Rai, & Ferrarini, 2005). Die Erkrankung ist in der Regel nicht heilbar. Lediglich eine geringe Anzahl an Patienten kann durch eine allogene Stammzelltherapie behandelt werden. Die derzeit angewandten Therapien zielen auf eine Verminderung der Symptome sowie Verlängerung der Lebenszeit ab. Für die Pathogenese der Erkrankung spielt eine Antigenstimulation der BZR und eine Interaktion der CLL-Tumorzellen mit anderen Zellen des Lymphgewebes eine entscheidende Rolle. Der Krankheitsverlauf ist mit

chromosomalen Mutationen und Abnormitäten assoziiert, wodurch der Verlauf der Krankheit aggressiver wird und sich zudem Therapie-Resistenzen entwickeln können.

1.2.1 CLL und die Rolle des B-Zell-Rezeptors

Die Aktivierung des BZR ist entscheidend für die Entwicklung und Progression der CLL. Neuartige Therapeutika zielen vor allem auf diesen Rezeptor sowie die nachgeschalteten Signaltransduktionswege ab (Woyach, Johnson, & Byrd, 2012). Die wichtige Rolle des BZR-vermittelten Signalweges für die CLL-Entwicklung zeigt sich anhand folgender Begebenheiten:

- Das phänotypische Profil der CLL-Zelle entspricht dem einer Antigen-aktivierten B-Zelle (Damle *et al.*, 2002).
- CLL-Zellen zeigen ein Genexpressionsmuster, das Kennzeichen des Status der Antigenpräsentation trägt (Klein *et al.*, 2001).
- CLL-Fälle sind in zwei Gruppen unterteilt – basierend auf dem Status der somatischen Hypermutation des BZR (Hamblin, Davis, Gardiner, Oscier, & Stevenson, 1999).
- CLL-Zellen weisen ein eingeschränktes Genrepertoire für die variable Region der Immunglobuline auf (Fais *et al.*, 1998)
- Es existieren Untergruppen mit quasi-identischen (=stereotypen) BZR (Tobin *et al.*, 2003; Ghiotto *et al.*, 2004; Widhopf *et al.*, 2004).
- Die Therapien, die auf eine Blockierung des BZR-Signalweges abzielen, sind erfolgreich (Woyach, Johnson, & Byrd, 2012).

Der Immunphänotyp und das Genexpressionsmuster der CLL-Zellen sprechen für einen Kontakt mit Antigenen. Auf der Oberfläche der CLL-Zellen konnten Marker identifiziert werden, die auf eine Bindung des Antigens hindeuten. Dazu zählen beispielsweise die hohe Expression der Aktivierungsmarker CD23, CD25, CD69 und CD71 sowie eine niedrige Expression von Molekülen, die in charakteristischer Weise nach einer Aktivierung herunter reguliert werden wie z.B. CD22, Fcγ IIb, CD79b und IgD (Damle *et al.*, 2002).

Mitte der 90er Jahre wurde erstmals die enorme Bedeutung der Analyse der BZR-Gene für das Verständnis der CLL-Pathogenese erkannt. Ein wichtiger Meilenstein in der Erforschung der CLL war die Entdeckung, dass der Mutationsstatus der variablen

Region der schweren Immunglobulinkette (=IGHV) direkt eine Prognose für den Patienten erlaubt. Abhängig vom Grad der Mutation der IGHV-Gene werden CLL-Patienten in zwei Gruppen mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf unterteilt (Damle *et al.*, 1999; Hamblin *et al.*, 1999): U-CLL, d.h. Patienten mit unmutierten IGHV-Genen (Übereinstimmung zur Keimbahnsequenz >98%) und M-CLL, d.h. Patienten mit mutierten IGHV-Genen (Übereinstimmung zur Keimbahnsequenz <98%). In der Regel haben Patienten mit U-CLL eine schlechtere Prognose als M-CLL-Patienten (Abb. 1.7), wobei für den Patientenkreis mit U-CLL-Genen eine stärkere Aktivität der BZR-Signalwege nachgewiesen wurde (Guarini *et al.*, 2008; Mockridge *et al.*, 2007).

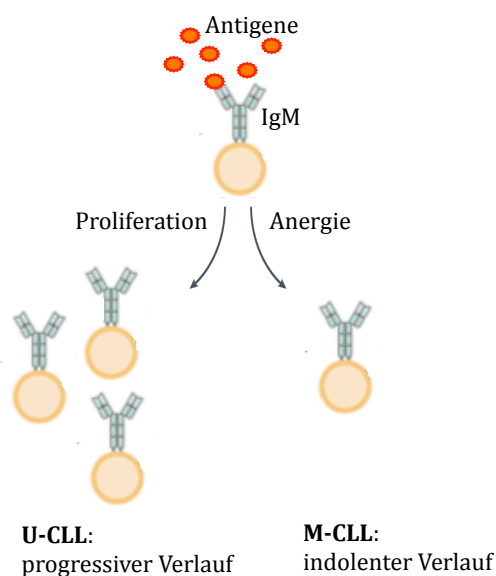


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der beiden CLL-Fälle.

CLL-Patienten können anhand der Sequenz ihrer BZR-Gene zwei CLL-Typen zugeordnet werden. U-CLL-Patienten weisen einen progressiveren Krankheitsverlauf auf als M-CLL-Patienten. Die U-CLL-Zellen stammen vermutlich von naiven B-Zellen ab, M-CLL-Zellen von post-GC-B-Zellen (GC, *germinal center*; Seifert *et al.*, 2012). Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014).

Darüber hinaus lassen bestimmte IGHV-Gene scheinbar unabhängig vom Mutationsstatus eine Prognose zu (Ghia *et al.*, 2005). So zeigen Patienten mit IGHV3-21- und IGHV3-23-Genen einen eher aggressiven Verlauf (Bomben *et al.*, 2010; Ghia *et al.*, 2005); hingegen Patienten mit IGHV3-30- und IGHV3-72-Genen einen indolenten Krankheitsverlauf (Capello *et al.*, 2006; Del Giudice *et al.*, 2009).

Weiterhin ergab die immungenetische Analyse bei malignen Zelleneinstark eingeschränktes Immunglobulin-Genrepertoire (Friedman *et al.*, 1992; Küppers, Gause, & Rajewsky, 1991; Meeker *et al.*, 1988; Cai, Humphries, Richardson, & Tucker, 1992; Ebeling, Schutte, & Logtenberg, 1993; Hashimoto, Wakai, Silver, & Chiorazzi, 1992).

Zudem wurde ermittelt, dass sich das Antikörper-Genrepertoire von dem normaler B-Zellen unterscheidet (Fais *et al.*, 1998). So exprimieren CLL-Zellen typischerweise die bestimmte IGHV-, IGHD- und IGHJ-Gene wie beispielsweise IGHV1-69, IGHV4-34 und IGHV3-7 (Murray *et al.*, 2008; Stamatopoulos *et al.*, 2007; Tobin *et al.*, 2004). Außerdem wurde bei der Gen-Umordnung beobachtet, dass bestimmte Gen-Kombinationen bevorzugt auftreten wie z.B. IGHV1-69 mit IGHD3-3 und IGHJ6-Gene.

Etwa ein Drittel aller CLL-Patienten weisen stereotype BZR auf (Agathangelidis *et al.*, 2012) und werden sequenzabhängig verschiedenen Gruppen zugeordnet (Abb. 1.8). „Stereotyp“ heißt hier, dass mindestens 60% der Aminosäuresequenz der CDR3-Region bei unterschiedlichen Patienten übereinstimmen (Messmer *et al.*, 2004). Betrachtet man diesen Sequenzbereich der BZR genauer, fällt auf, dass manche CLL-Gruppen nahezu identische V_H-CDR3-Regionen (CDR3 der variablen Domäne der schweren Antikörperkette) besitzen (z.B. Subgruppe 10, Abb. 1.8).

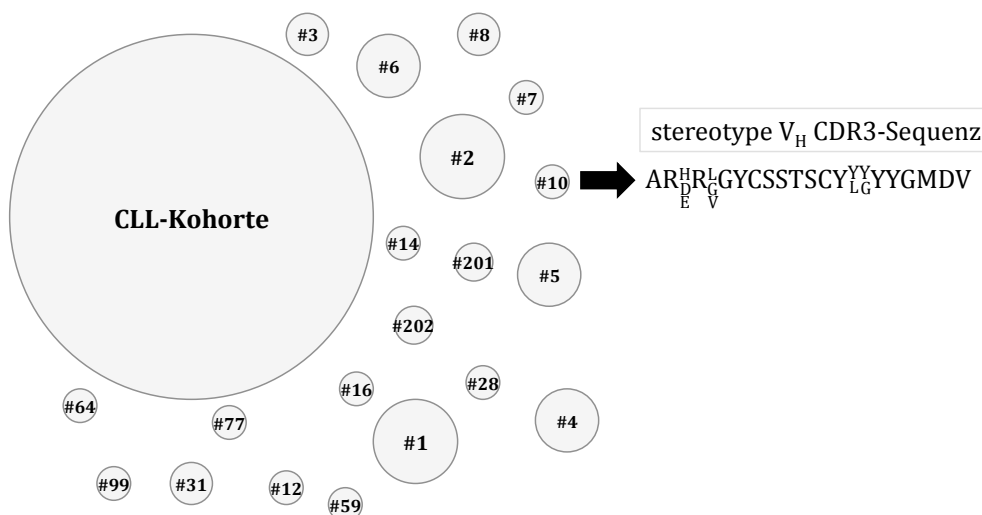


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der relativen Größe der Haupt-CLL-Subgruppen.

Mehr als 26% aller CLL-Patienten exprimieren nahezu identische B-Zell-Rezeptoren und lassen sich basierend auf der Analyse des Ig-Genrepertoires einer von bislang 110 charakterisierten Subgruppen zuordnen (Stamatopoulos *et al.*, 2007). Die größten Subgruppen sind dargestellt, diese machen 12% der CLL-Kohorte und 41% der stereotypen Fraktion aus. Subgruppe #1 und #2 sind die größten Untergruppen. Sie machen 5,5% der CLL-Kohorte aus. Die Aminosäuresequenz der V_H CDR3 von Vertretern der Subgruppe #10 ist dargestellt und veranschaulicht den hohen Grad der V_H CDR3-Sequenzübereinstimmung dieser Patienten-Gruppe.

Da die V_H-CDR3-Region als besonders entscheidend für die Antigenerkennung gilt, deutet diese Stereotypie auf die Erkennung bestimmter Epitope hin. Dabei liefern möglicherweise Autoantigene die nötigen Überlebenssignale für die Lymphom-Zelle. Eine weitere Hypothese ist die Antigen-unabhängige Stimulation der CLL-BZR. Dabei

aktivieren sich die malignen Lymphom-Zellen gegenseitig durch inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen des Paratops. So konnte die Arbeitsgruppe von Dühren von Minden erstmals die Selbsterkennung eines CLL-Antikörpers durch Bindung der HCDR3- Region an die FR2 der schweren Immunglobulin-Kette demonstrieren (Abb. 1.9; Dühren-von Minden *et al.*, 2012).

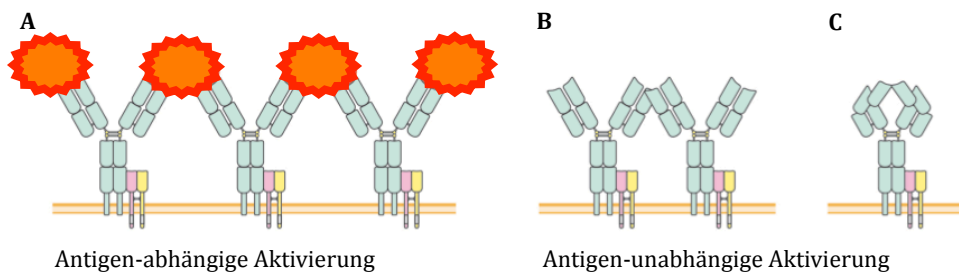


Abb. 1.9: Schematische Darstellung verschiedener Aktivierungsmodelle des CLL-BZRs.

A: Antigen-abhängiges BZR-Signal, verursacht durch (Auto)-Antigene.

B: Antigen-unabhängige BZR-Aktivierung durch eine intermolekulare Wechselwirkung der CDR3-Region der schweren Immunglobulin-Kette und der FR2-Region der V_H eines benachbarten BZRs.

C: Antigen-unabhängige BZR-Aktivierung durch eine intramolekulare Wechselwirkung der CDR3-Region der schweren Immunglobulin-Kette und der FR2-Region der V_H desselben BZRs.

FR: *framework*; CDR: *complementarity determining region*.

1.3 Burkitt-Lymphom (BL)

Das Burkitt-Lymphom gehört zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und weist eine der höchsten Teilungsraten unter den humanen Tumoren auf (Hecht & Aster, 2000). Die Bezeichnung der Lymphomart geht auf den britischen Chirurgen Denis Burkitt zurück, der diese Erkrankung 1958 erstmals beschrieb (Burkitt, 1958). Der maligne Tumor manifestiert sich vorwiegend in den Lymphknoten des Bauchraumes sowie des Ober- und Unterkieferknochens. Nach der WHO (*World Health Organization*) werden drei verschiedene Typen des BLs unterschieden. Das endemische BL tritt gehäuft in malarieverseuchten Gebieten Afrikas auf und betrifft vor allem Kinder im Alter von drei bis acht Jahren. Dabei sind 95% aller Fälle mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert (Lindström & Wiman, 2002). Die sporadische BL-Form kommt in den gemäßigten Klimazonen vor und weist nur selten eine EBV-Assoziation auf. Das HIV-assoziierte BL betrifft immundefiziente Menschen, die mit dem AIDS-Virus (*acquired immune deficiency syndrome virus*) infiziert sind oder unter einer Posttransplantations-lymphoproliferativen Erkrankung (*post transplant proliferative disorder*, PTLD) leiden. In Deutschland macht das BL etwa 4% aller NHL aus. Da die BL-Zellen somatisch

mutierte Ig-Gene aufweisen, wird von einer Abstammung von B-Lymphozyten aus dem Keimzentrum ausgegangen (Chapman, Wright, & Stevenson, 1998). Weiterhin wurde eine Translokation des c-Myc-Onkogens in einen der Ig-Genloci gezeigt (Hummel et al., 2006). Der BZR scheint bei der BL-Erkrankung mittels des Transkriptionsfaktors TCF-3 tonisch aktiviert zu sein (Schmitz, Ceribelli, Pittaluga, Wright, & Staudt, 2014; Fowler & Davis, 2013).

1.4 Allergie

Bei einer Allergie handelt es sich um eine spezifische Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems gegenüber den als Allergenen bezeichneten Auslösern. Der Begriff „Allergie“ setzt sich aus dem griechischen *allos* („anders“, „fremd“) und *ergon* („Reaktion“, „Arbeit“) zusammen. Die Hypersensibilisierung durch einen unbekannten Serumfaktor wurde im Jahre 1921 beschrieben (Prausnitz & Küstner, 1921) und führte 1967 schließlich zur Entdeckung des Immunglobulins E (Ishizaka *et al.*, 1967). Ein geringer Anteil hypersensibler Immunreaktionen ist nicht IgE-vermittelt und kann daher von dieser Allergieart abgegrenzt werden. Die heute gültige Klassifikation allergischer Erkrankungen erfolgte nach Gell und Combs (1963) und unterscheidet vier Allergie-Typen: IgE-vermittelter Soforttyp (Typ-I-Allergie), zytotoxischer Typ (Typ-II-Allergie), Immunkomplex-Typ (Typ-III-Allergie) und der Spättyp (Typ-IV-Allergie). Im engeren Sinne versteht man heute unter einer Allergie oft nur die Typ-I-Allergie.

Als im Jahre 1906 Clemens von Pirquet den Terminus „Allergie“ prägte, waren weniger als 1% der Bevölkerung von dieser Krankheit betroffen. Heute haben allergische Erkrankungen epidemischen Charakter gewonnen und mehr als 25% der Bevölkerung in den USA und Nordeuropa leiden unter Allergien (Vrtala *et al.*, 2008). Allergien können in jedem Alter auftreten, zeigen sich aber meist bereits in der Kindheit (Asher *et al.*, 2006). Klassische Manifestationen der IgE-abhängigen Hypersensibilität sind allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches *Asthma bronchiale*, atopische Dermatitis, Urtikaria und der anaphylaktische Schock als lebensbedrohliche Form einer allergischen Reaktion. Die Ätiologie allergischer Immunantworten ist komplex und bis heute nicht völlig geklärt. Die meisten Allergiker sind atopisch, d.h. genetisch prädisponiert eine Allergie auszubilden (Kay *et al.*, 2001). Allerdings ist es auch möglich, in Abwesenheit einer Atopie eine allergische Erkrankung zu entwickeln wie beispielsweise bei Wespen- und

Bienengiftallergien. Nach der sogenannten Hygiene-Hypothese wurde das Risiko an Allergien zu erkranken durch den westlichen Lebensstil mit seiner Vermeidungsstrategie gegenüber Krankheitserregern und durch frühe und wiederholte Antibiotikaeinnahme verstärkt (Geha *et al.*, 2003). Weiterhin scheint eine Vielzahl von Faktoren, die im Zusammenhang mit veränderten Lebensbedingungen stehen wie Umweltverschmutzung, erhöhte Allergen-Exposition und Ernährungsgewohnheiten, eine Rolle in der gesteigerten Prävalenz allergischer Erkrankungen zu spielen (Cookson *et al.*, 1999).

1.4.1 Ablauf der IgE-vermittelten Hypersensibilitätsreaktion

Die allergische Kaskade beginnt mit einer symptomfreien Sensibilisierungsphase (Abb. 1.10). Während dieser Phase führt die initiale Exposition eines Allergens zu dessen Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen (APC, *antigen-presenting cell*) wie dendritische Zellen und B-Zellen. Diese prozessieren das Allergen und präsentieren es naiven CD4⁺T-Helferzellen (CD, *cluster of differentiation*) in Form von Peptidfragmenten über MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC, *major histocompatibility complex*) auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 1.1). Der peptidbeladene MHC-II-Komplex wird über den T-Zell-Rezeptor (TCR, *T cell receptor*) von CD4⁺T-Helferzellen erkannt und führt in Gegenwart kostimulierender Faktoren zu deren Aktivierung und Differenzierung. Zwei Subtypen von CD4⁺T-Helferzellen sind T_H1- und T_H2-Zellen. Diese besitzen aufgrund charakteristischer Zytokinprofile unterschiedliche Effektorfunktionen (Romagnani *et al.*, 1999). Zytokine sind Peptidwirkstoffe, die über spezifische Rezeptoren als Signalstoffe zwischen Zellen wirken und in der Zielzelle pro- oder antiinflammatorische Effekte vermitteln.

Differenzieren sich T_H2-Zellen übermäßig aus, lässt dies auf eine allergische Erkrankung schließen, bei der die spezifische Immunantwort aus dem Gleichgewicht gebracht wurde (Georas *et al.*, 2005). T_H2-Zellen sezernieren hohe Mengen proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-3 (IL, Interleukin), IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). Diese Zytokine initiieren den Isotypenwechsel von IgM-präsentierenden B-Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen (IL-4, IL-13) sowie die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen der allergischen Entzündungsreaktion wie Mastzellen (IL-4, IL-9, IL-13), Eosinophile

(IL-3, IL-5, GM-CSF) und Basophile (IL-3, IL-4). T_H1-Zellen wirken hingegen durch die Sekretion von Interferon- γ (IFN, Interferon), das die IgE-Synthese und die Entwicklung von T_H2-Zellen inhibiert, antiinflammatorisch (Epstein *et al.*, 2006). Zudem ist für T_H1-Zellen die Sekretion von IL-2, sowie Tumornekrosefaktor- α und - β (TNF- α , - β) charakteristisch. Mittels dieser Zytokine sind T_H1-Zellen an der Zerstörung des Gewebes im entzündeten Organ beteiligt. T_H1-Zytokine induzieren eine Apoptose in den Gewebezellen der Haut, der Lunge und der Mukosa (Akdis *et al.*, 2004a).

T_H17- und T_{REG}-Zellen (T_{REG}, regulatorische T-Zellen) sind zwei weitere in jüngerer Zeit identifizierte Subtypen von CD4⁺T-Helferzellen (Seddiki *et al.*, 2006; Stockinger *et al.*, 2007). Während T_H17-Zellen an der chronischen Entzündung sowie an der Aktivierung von Mastzellen und Neutrophilen beteiligt sind (Schmidt-Weber *et al.*, 2007), vermitteln T_{REG}-Zellen durch die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine eine immunologische Toleranz (Bacchetta *et al.*, 2007; Larché *et al.*, 2007). Die T_{REG}-Zytokine IL-10 und TGF- β (*transforming growth factor- β*) unterdrücken die Proliferation und die Zytokinproduktion der proinflammatorischen Effektorzellen. Die Balance der unterschiedlichen T-Zell Subtypen ist entscheidend für die Ausprägung einer Allergie oder einer Toleranz (Akdis *et al.*, 2004b).

Nach der Sensibilisierung führt der erneute Kontakt mit dem Allergen zur Bindung an allergenspezifische IgE, die im Komplex mit hochaffinen IgE-Rezeptoren (Fc ϵ RI) an der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen gebunden werden. Eine daraus resultierende Quervernetzung der Fc ϵ RI bewirkt eine Degranulation der Zelle (Turner *et al.*, 1999). Es kommt zu einer schnellen Freisetzung bereits präformierter Mediatoren der allergischen Reaktion wie Histamin, Serotonin und der Proteasen Chymase und Trypsin. Anschließend bilden und sezernieren die aktivierten Zellen Leukotriene, Chemokine, Prostaglandine, Zytokine und den Plättchenaktivierenden Faktor. Innerhalb weniger Minuten nach Kontakt mit dem Allergen kommt es zur Sofortreaktion, bei der eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität, eine Kontraktion der glatten Muskulatur und eine gesteigerte Mukusproduktion erfolgt (Jutel *et al.*, 2006). Diese Prozesse rufen die bereits erwähnten klassischen allergischen Symptome hervor. Etwa 6 bis 72 Stunden nach dem Allergenkontakt wird die Spätreaktion ausgelöst. Diese ist durch eine Chemokin-vermittelte Rekrutierung weiterer immunkompetenter Zellen wie Eosinophile, Basophile und Makrophagen gekennzeichnet (Holgate *et al.*, 2008). Eosinophile sezernieren eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren, darunter

gewebetoxische Proteine wie basisches Myelin-Protein, eosinophiles kationisches Protein und eosinophile Peroxidase. Die von Eosinophilen freigesetzten Mediatoren unterhalten und chronifizieren die allergische Entzündung (Kay *et al.*, 1997).

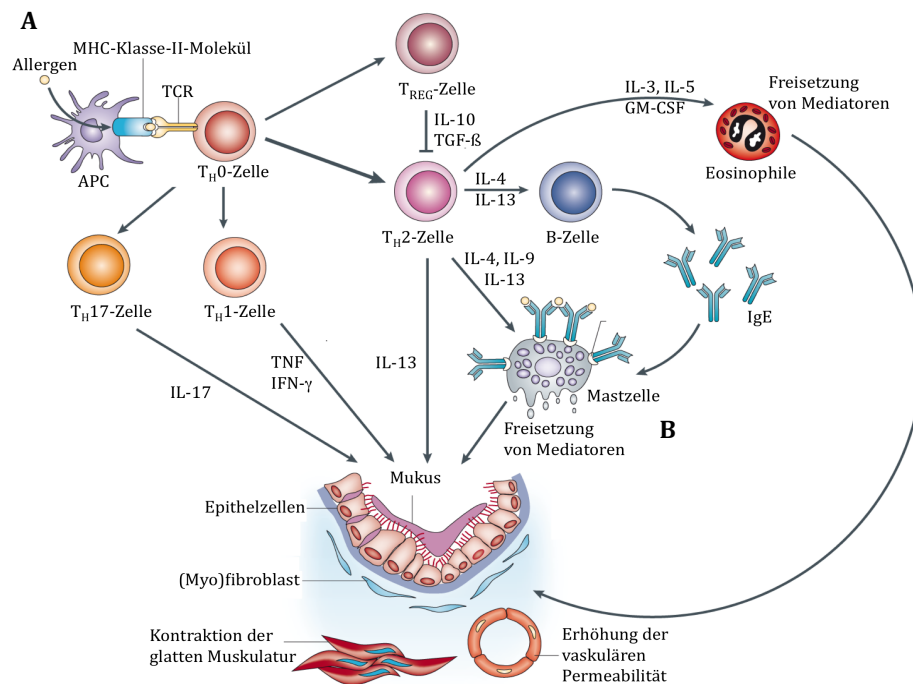


Abb. 1.1: Schematische Übersicht über den Ablauf der IgE-vermittelten Hypersensibilisierungsreaktion.

A: Sensibilisierung: Antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*) wie B-Zellen internalisieren das Antigen. Es erfolgt die proteolytische Spaltung des Antigens und die Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC, *major histocompatibility complex*) auf der Zelloberfläche. Im lymphatischen Gewebe erfolgt die Aktivierung und Differenzierung naiver CD4⁺ T_H0-Zellen zu verschiedenen Subtypen. Die Zytokine der T_H2-Zellen induzieren die Proliferation und den Klassenwechsel von B-Zellen zu IgE-sekretierenden Zellen.

B: Allergische Sofortreaktion: die Allergen-Bindung an spezifische IgE-Antikörper auf der Oberfläche von Mastzellen führt zur Degranulation der Zelle und zur Freisetzung der Mediatoren. Diese Moleküle führen innerhalb von Sekunden zu den typischen Symptomen, deren Schweregrad von der Dosis und dem Eintrittsweg der Allergene abhängt.

1.4.2 Allergene

Allergene sind an sich harmlose Umweltantigene, welche bei Allergikern eine heftige Immunreaktion auslösen. Charakteristisch für Allergene ist die Quervernetzung rezeptorgebundener IgE auf der Oberfläche von Effektorzellen. Eine Ausnahme stellen Haptene dar, die erst nach Bindung an ein Trägerprotein eine Immunreaktion hervorrufen können. Zudem werden bei niedermolekularen Allergenen Di- und Multimerisierungen als notwendiger Vorgang zur Kreuzvernetzung von IgE diskutiert

(Schöll *et al.*, 2005). Allergene sind häufig Proteine oder Glykoproteine (Valenta & Kraft, 2001). Sie sind strukturell sehr vielfältig und weisen keine gemeinsamen Motive auf, die eine Aussage über das immunogene Potenzial eines Antigens erlauben würden (Bredehorst & David, 2001). Ein Allergen gilt als Majorallergen, wenn es bei mindestens 50% der Patienten eine IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion auslöst (Bachert *et al.*, 2002). Nach Art des Kontakts mit dem Allergen kann zwischen Inhalationsallergenen (z.B. Pollen, Tierhaare, Pilzsporen, Hausstaub), Nahrungsmittelallergenen (z.B. Milch, Fisch, Obst, Eier), Kontaktallergenen (z.B. Wolle, Seide, Nickel, Latex, Teer) und Injektionsallergenen (z.B. Insektengift, Immunserum, Penizillin, Kontrastmittel) unterschieden werden.

1.4.2.1 Das Gräserpollenallergen Phl p 5

Pollen der Süßgräser (*Poaceae*) zählen zu den bedeutendsten Allergenquellen weltweit (Esch *et al.*, 2008). Mehr als 40% aller Patienten mit Typ-I-Allergie sind gegen Gräserpollen sensibilisiert (Suphioglu *et al.*, 2000). Nach ihren strukturellen und immunologischen Eigenschaften wurden Gräserpollenallergene in verschiedene Gruppen klassifiziert (Andersson & Lidholm, 2003), wobei Gruppe 1- und 5-Pollenallergene das größte allergische Potenzial aufweisen. Gruppe 5-Allergene besitzen eine Molekülmasse von 27 bis 33 kDa und sind nicht glykosyliert. Ein bedeutender Vertreter dieser Gruppe ist Phl p 5 (29 kDa), ein Hauptallergen des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*), das von 60% aller Patienten mit einer Gräserpollenallergie durch spezifische IgE erkannt wird (Vrtala *et al.*, 1993). Phl p 5 existiert natürlicherweise in zwei Isoformen, Phl p 5a und Phl p 5b. Diese weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Molekülmasse und biochemischen Eigenschaften (Becker *et al.*, 1995). Die biologische Funktion der beiden Isoformen ist bislang unklar, allerdings konnte bei Phl p 5b eine Ribonukleaseaktivität festgestellt werden (Bufe *et al.*, 1995).

1.5 Zielsetzungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Rezeptoren einzelner Lymphom- und Allergie-Patienten detailliert analysiert, bislang unbekannte Liganden identifiziert und Epitope definiert werden. Diese Informationen sind gegebenenfalls ein Schlüssel zum Verständnis der molekularen Interaktion und ihrer pathophysiologischen Konsequenzen. Für funktionelle und strukturgebende Analysen sollten daher die jeweiligen Interaktionspartner in geeignetem Format in ausreichender Menge und mit einem hohen Reinheitsgrad dargestellt werden. Hierzu sollten Strategien zur rekombinanten und synthetischen Darstellung der jeweiligen Moleküle evaluiert und optimiert werden. Weiterhin sollten durch die konvergente Anwendung immunbiochemischer Methoden und spektroskopischer Verfahren Bindungssequenzen und essenzielle Interaktionsstrukturen und Modi bestimmt sowie über Sequenzhomologien mögliche natürliche Liganden benannt werden.

2 Material

2.1 Affinitätsmatrices

Folgende Affinitätsmatrices wurden bezogen von:

QIAGEN (Hilden):	Ni-NTA-Agarose
NEB (Frankfurt):	Chitin Beads
	Amylose Beads
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	Protein A Agarose
GE Healthcare (Freiburg)	KappaSelect Matrix

2.2 Antikörper

Als primäre Antikörper, Direkt-Konjugate oder sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

GE Healthcare (Freiburg):	Anti-M13- HRP
NEB (Frankfurt):	Anti-CBD Antiserum (rabbit)
Sigma-Aldrich (Taufkirchen):	Anti-rabbit (whole molecule)-AP
	Anti-goat IgG (whole molecule)-AP
	Anti-human IgG (γ -chain-specific)-AP
	Anti-human IgE (ϵ -chain specific)-AP
	Anti-human κ (LC-chain specific)-AP
	Anti-Vimentin (mouse)
BD Bioscience (Heidelberg)	Anti-human IgM-FITC (mouse)
	Anti-human CD19-APC

2.3 Bakterienstämme

Bei den eingesetzten Bakterienstämmen handelte es sich um E. coli K12-Stämme. Für Klonierungen und Standard-Anwendungen molekularbiologischer Arbeiten wurden primär XL10-Gold-, XL1-Blue- und ER2566-Zellen eingesetzt. Zur Selektion von Mimotopen wurden bei den Amplifikationsrunden ER2738-Zellen eingesetzt. Zur Darstellung eines Peptids auf der Oberfläche des Phagen M13 wurde der F⁺supE-Stamm TG1 genutzt. Bei der Expression von Intein-CBD-Konstrukten und des Fab-Fragmentes wurde der Expressionsstamm BL21-RIL (DE3) verwendet.

2.4 Chemikalien und Bioreagenzien

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

2.5 Enzyme und Standards

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme und Standards wurden von nachstehend genannten Firmen bezogen: New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe). Enzyme als Bestandteil kommerziell erworbener Kits wurden bei dieser Auflistung nicht berücksichtigt.

2.6 Geräte

Eppendorf AG (Hamburg):	BioPhotometer Centrifuge 5417 C Centrifuge 5417 R Mastercycler gradient Mastercycler personal
SierraSensors (Hamburg):	SPR-2 Biosensor
BD Bioscience (Heidelberg):	FACS Aria™ III FACSCalibur™
Molecular Dimensions Inc (USA):	SpectroLight™300 SpectroLight™501
Bruker Daltonics (Bremen)	Biflex III
Heraeus Sepatech GmbH (Osterode/Harz):	Heraeus Megafuge 1.0
PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen):	Horizontal-Gelelektrophorese-system
New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen):	innova™ 4300 incubator shaker
SANYO Electric Co., Ltd. (Japan):	SANYO CO ₂ -Inkubator MCO-17AI

Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold):	CO ₂ -Begasungsinubator
Intas GmbH (Göttingen):	HERAsafe HS 18 Sicherheitswerkbank
TECAN Deutschland GmbH (Crailsheim):	Gel-Dokumentations-System
Thermo Hybaid (Heidelberg):	GENIOS Multi-Detektions-Reader
Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg):	Easy-Cast-Minigel-System
Bio-Rad Laboratories GmbH (München):	Electrophoresis power supply EPS 3500XL
Hofer Scientific Instruments (San Francisco, CA; USA):	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell
Fedegari Autoclavi S.p.A. (Albuzzano, Italien):	Minigel-Apparatur-SDS-PAGE
Millipore GmbH (Schwalbach):	Laborautoklav Modell FOB3
Sartorius AG (Göttingen):	Milli-Q Academic, Laborwasser-System
	Waagen

2.7 Kommerzielle Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden bezogen von:

Bethyl Lab Inc. (Montgomery, TX, USA)	Human IgG ELISA Quantitation Set
MBI Fermentas (St. Leon-Rot):	GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit
New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.):	IMPACT™ Kit
PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen):	peqGOLD Gel Extraction Kit
IBA-BioTAGnology (Göttingen):	StarGate-Combinatorial Cloning Kit
PAA Laboratories GmbH (Pasching)	Nanofectin Kit

2.8 Medien

Die folgenden Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert, wobei die Zugabe von Antibiotika oder anderen Zusätzen nach Abkühlen auf 50 °C erfolgte.

SOB-Medium:	20 g/l	Trypton
	0,5 g/l	NaCl
	0,5 g/l	Hefeextrakt
	2,5 mM	KCl
		pH 7,5; ad 1000 ml, autoklavieren
TYE-Medium-Platten:	10 mg	1 M MgCl ₂ (steril filtriert)
	10 g/l	Trypton
	8 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	15 g/l	Agar
2YT-Medium:	16 g/l	Trypton
	5 g/l	NaCl

10 g/l Hefeextrakt

2.9 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von metabion Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

2.10 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind mit ihren Zusammensetzungen nachfolgend aufgeführt. Puffer als Bestandteil käuflich erworbener Kits und Puffer für Restriktionsenzyme wurden bei dieser Auflistung nicht berücksichtigt.

Agarosegel-Auftragspuffer (6x):	0,09% (w/v)	Bromphenolblau
	0,09% (w/v)	Xylen Cyanol FF
	60% (w/v)	Glycerol
	60 mM	EDTA
AIW-Regenerierungspuffer	150 mM, 50 ml, 0,22 µm filtriert	
A-Anteil, pH 5:	0,68 g	Oxalsäure
	470 µl	Phosphosäure, 85%
	298 µl	Ameisensäure, 95%
	0,78 g	Malonsäure
	16 ml	ddH ₂ O
I-Anteil	2,24 g	Kaliumthiocyanat
	18,6 g	MgCl ₂
	2,76 g	Harnstoff
	8,74 g	Guanidiniumhydrochlorid
	16 ml	ddH ₂ O
W-Anteil	16,7 ml	ddH ₂ O
Ampicillin Stocklösung:	20 mg/ml	Ampicillin gelöst in 70% Ethanol steril filtriert, Lagerung bei -20 °C
AP-Detektionspuffer:	0,1 M	Tris-HCl, pH 9,5
	0,1 M	MgCl ₂
	0,1 M	NaCl
BCIP-Stocklösung:	0,5% (w/v)	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in DMF; Lagerung bei -20 °C
Citratpuffer:	50 mM	Zitronensäure, pH 4,0, steril
Coomassie-Färbelösung:	0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250
	1% (v/v)	Eisessig

	40% (v/v)	Methanol
Coomassie-Entfärbelösung:	20% (v/v)	Eisessig
	80% (v/v)	ddH ₂ O
Elutionspuffer: (für die Affinitätsmatrix)	20 mM	Zitronensäure, pH 5,0 bis pH 2,0,
Elutionspuffer: (für die Amylosematrix)	10 mM	Maltose in Säulenpuffer
Elutionspuffer: (für die Chitinsäule, IMPACT™)	50 mM	DTT im Säulenpuffer frisch ansetzen
Elutionspuffer: (für die NiNTA-Säule)	100 mM	Imidazol in PBS
FKS:		pH 7,5
		30 min bei 56 °C hitzeinaktivieren
		Lagerung bei -20 °C
Glucose-Stocklösung:	20% (w/v)	α-D-Glucose (wasserfrei) in ddH ₂ O lösen, steril filtrieren
HRP-Detektionspuffer:	15 ml	Citratpuffer, pH 4,0
	4 mg	ABTS
	30 µl	H ₂ O ₂ (30%)
Kanamycin-Stocklösung:	20 mg/ml	Kanamycin in ddH ₂ O lösen, steril filtrieren
		Lagerung bei -20 °C
NaAc-Lösung:	3 M	Natriumacetat, pH 5,2
NBT-Stocklösung:	0,1% (w/v)	NBT in 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5
		Lagerung bei -20 °C
Neutralisierungspuffer:	1 M	Tris-HCl, pH 7,5
PAGE-Probenpuffer (4x):	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	40% (v/v)	Glycerol
	8% (w/v)	SDS
	0,004% (w/v)	Bromphenolblau
PAGE-Sammelgel-Puffer (4x):	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4% (w/v)	SDS
		Lagerung bei 4 °C
PAGE-Tankpuffer (5x):	0,125 M	Tris-HCl, pH 8,3
	0,96 M	Glycin
	0,5% (w/v)	SDS
PAGE-Trenngel-Puffer (4x):	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4% (w/v)	SDS
		Lagerung bei 4 °C
PBS:	100 mM	NaCl
	33 mM	Na ₂ HPO ₄ wasserfrei
	17 mM	NaH ₂ PO ₄ -Monohydrat

		pH 7,4, autoklavieren
PEG/NaCl-Lösung:	20% (w/v)	Polyethylenglycol-6000
	2,5 M	NaCl
		autoklavieren
Phenol/Chloroform:	50% (v/v)	Phenol (Tris-gesättigt)
	50% (v/v)	Chloroform
Säulenpuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
(für die Amylose-Säule)	200 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Säulenpuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 8,5
(für die Chitin-Säule, IMPACT™)	500 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,1%	Triton X-100
TAE (50x):	2 M	Tris-Acetat
	50 mM	EDTA
		pH 8,5, autoklavieren
TPBS:	0,1% (v/v)	Tween 20 in PBS
Transferpuffer:	25 mM	Tris
	19,2 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
		pH 8,
Tris-Puffer:	1 M	Tris-HCl,
		pH 7,5 ; autoklavieren
TS-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	250 mM	Saccharose
Waschpuffer:	500 mM	NaCl
(für die NiNTA-Säule)	16,5 mM	Na ₂ HPO ₄ wasserfrei
	8,5 mM	NaH ₂ PO ₄ -Monohydrat
		pH 8,0, steril filtrieren

2.11 Vektoren und Helferphagen

Die Vektorkarten befinden sich im Anhang. Die E. coli-Expressionsvektoren pTXB1 und pMAL-c2X wurden von NEB (Frankfurt) kommerziell erworben. Die Vektoren pNFuse-IBA-hFab-One-Strep, pCFuse-IBA-hCLK1, pENTRY-IBA-20 und pASG-IBA-44 wurden von IBA-BioTAGnology (Göttingen) erhalten. Die Vektorsysteme pcDNA3.1+/Zeo und pBudCE4.1 zur eukaryotischen Expression in HEK293-Zellen sowie der Vektor pFastBac™ Dual für die Expression in Sf9-Zellen wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Der Phagemid-Vektor pHEN2 und der Helferphage pKM13 wurden

von G. Winter, MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

2.12 Verbrauchsmaterialien

Sämtliches Material sowie Plastikware für den Laborbedarf wurden bezogen von Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht), Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Eppendorf AG (Hamburg), Renner GmbH (Dannstadt), Millipore GmbH (Schwalbach), Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH (Hamburg), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg).

2.13 Zelllinien und Zellkultur

Zur rekombinanten Expression wurden die Mammalia-Zelllinie HEK293 und die Insekten-Zelllinie Sf9 (Invitrogen GmbH (Karlsruhe)) verwendet. Für FACS Analysen wurde die Burkitt-Lymphom-Linie RAMOS (Sigma-Aldrich (Taufkirchen)) eingesetzt. Zur Gewinnung von sEGFR wurde die Karzinom-Zelllinie A431 (Sigma-Aldrich (Taufkirchen)) genutzt.

Die Gewebekulturmedien DMEM und MEM sowie Kulturmediumzusätze (Penicillin G, Streptomycin) und Zeocin wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Das Insektenzellmedium Insect Xpress von Lonza BioWhittaker® (Wuppertal). Trypsin-EDTA (gebrauchsfertig) wurde von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bzw. PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen. Fötales Kälberserum (FKS) wurde von BIOCHROM AG (Berlin) und PAA Laboratories GmbH (Cölbe) erworben. Gewebekulturflaschen und Gewebekulturplatten wurden von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) geliefert.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Für alle wässrigen Puffer, Lösungen und Medien wurde hochreines Wasser aus der Filteranlage Milli-Q Academic verwendet. Einige Puffer und Lösungen wurden zusätzlich mit sterilen Einwegspritzen durch sterile Spritzenfilter (0,22 µm) filtriert und in einem sterilen PP-Röhrchen aufgefangen. Außerdem wurden einige Puffer, Lösungen und alle Medien in einem Autoklav durch wassergesättigten, unter Druck (5 bar) stehenden Dampf 20 min bei 120 °C sterilisiert.

3.1.1 PCR (*polymerase chain reaction*)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1989) dient der *in vitro*-Amplifikation kleinster DNA-Mengen unter Verwendung von Oligonukleotiden bekannter Sequenz. Diese Oligonukleotide werden so gewählt, dass sie das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Die Enden des Amplifikates tragen somit definierte Sequenzen und können auf diese Weise mit Modifikationen versehen werden. Die PCR lässt sich grundsätzlich in drei Reaktionsschritte unterteilen. Zunächst wird der eingesetzte DNA-Doppelstrang bei 94 °C denaturiert. Im nächsten Schritt (*Annealing*) wird die Temperatur erniedrigt und die spezifischen Oligonukleotide binden entsprechend ihrer Sequenz an die komplementäre Sequenz auf dem DNA-Strang, worauf die Synthese der Komplementärstränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart von freien dNTP beginnt (Elongationsphase). Durch eine zyklische Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes. Als DNA-Polymerase hat sich die thermostabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq) bewährt, die ein Temperatur-Optimum bei 72 °C besitzt. Sie besitzt eine hohe 5'-3'-Polymeraseaktivität, aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. In Einzelfällen wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt, um die Lesegenauigkeit zu erhöhen und damit das Risiko von Mutationen zu minimieren.

Als Elongationsgeschwindigkeit werden 1000 bp min⁻¹ zugrunde gelegt, so dass die Länge der Elongationsphase entsprechend der Länge der Matrize gewählt wurde. Für PCR-Reaktionen wurden 2-50 pg Plasmid-DNA mit 5 ml

Reaktionspuffer (10 x), 3 ml MgCl₂ (25 mM), 2 ml dNTP-Mix und jeweils 50 pMol der *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide versetzt, mit ddH₂O auf 50 ml aufgefüllt und mit 1 ml der DNA-Polymerase (1 U/ml) supplementiert. Anschließend wurde folgendes Standard-Programm durchgeführt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Standard-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Primärdenaturierung	94 °C	1 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	48-60 °C	0,5-1 min	30-35
Elongation	72 °C	1 min/1000 bp	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

Um DNA-Fragmente mit komplementären Enden zu einem Strang zusammen-zufügen, wurde eine Hybridisierungs-PCR durchgeführt (Tabelle 3.2). Bei dieser PCR werden erst nach sieben Zyklen die spezifischen Oligonukleotide, die am 5'-Ende des ersten Fragmentes und am 3'-Ende des zweiten Fragmentes hybridisieren, zum PCR-Ansatz dazu gegeben. In den ersten sieben Zyklen hybridisieren die überlappenden DNA-Fragmente und der komplementäre Strang wird durch die DNA-Polymerase synthetisiert. Anschließend wird durch Zugabe der Oligonukleotide die vollständige DNA-Sequenz amplifiziert.

Tabelle 3.2: Hybridisierungs-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Primärdenaturierung	94 °C	1 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	48-60 °C	1 min	7
Elongation	72 °C	1 min/1000 bp	
Denaturierung	94 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	48-60 °C	1 min	30
Elongation	72 °C	1 min/1000 bp	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

3.1.2 Sequenzierung nach der *BigDye*-Terminator-Methode

Die Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren beruht auf dem Prinzip der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1992). Bei der Sequenzierungsreaktion erfolgt der Abbruch der enzymatischen DNA-Synthese durch den Einbau von einem der vier ddNTPs, die unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Die so entstandenen unterschiedlich langen Oligonukleotide können anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert und auf diese Weise die DNA-Sequenz bestimmt werden. Für eine Sequenzierungsreaktion wurden 500 ng gereinigte Plasmid-DNA, 15 pmol Oligonukleotide, 2 µl *BigDye Reaction Buffer* (2,5x) und 2 µl *BigDye*-PCR-Reaktionsmix, in welchem die DNA-Polymerase, dNTPs und ddNTPs enthalten sind, in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Für die Amplifikation wurde ein Programm gewählt, welches 25 Zyklen mit einer Denaturierung von 30 s bei 96 °C, einem *Annealing* von 15 s bei der dem Oligonukleotid entsprechenden Temperatur und einer Elongation von 4 min bei 60 °C umfasst. Nach der PCR wurde der Ansatz mit ddH₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und die DNA durch eine Alkoholpräzipitation gefällt (s. 3.1.7). Die Sequenzierungsreaktion wurde anschließend am Universitätskrankenhaus Eppendorf (UKE, Hamburg) unter Verwendung des 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) und der Software *Sequencing Analysis* 5.1.1 (Applied Biosystems) analysiert.

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Trennung, Identifizierung und Isolierung von DNA-, bzw. RNA-Molekülen. Diese Methode findet sowohl im analytischen als auch im präparativen Bereich Anwendung. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen hergestellt wird. An das Agarosegel wird ein elektrisches Feld angelegt, durch dessen Poren die negativ geladenen DNA- bzw. RNA-Moleküle wandern. Da das Verhältnis der Nukleotide zur Anzahl der Ladungen eins beträgt und größeren Molekülen aufgrund der Gelstruktur ein höherer Widerstand entgegengesetzt wird, werden die DNA- bzw. RNA-Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Es wurden 1%ige, bzw. 2%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 0,5 g, bzw. 1g Agarose in 50 ml 0,5 x TAE Puffer gelöst, aufgeköcht und auf etwa 60 °C abgekühlt. Dann wurden 50 µl einer 0,25 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und die Lösung in eine Gießkammer überführt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine mit 0,5 x TAE Puffer gefüllte Laufkammer (*Easy-Cast-Minigel-System*, Thermo Hybaid, Heidelberg) gegeben und die

zu untersuchenden Proben mit der entsprechenden Menge 6 x Gel-Beladungspuffer versetzt. Nach dem Auftragen der Proben sowie eines DNA-Standards wurde eine Spannung von 120 V für etwa 20 min angelegt. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators konnte die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA visualisiert, mit einem *Video-Image*-System festgehalten und anschließend analysiert werden.

3.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *peqGOLD Gel Extraction Kits* (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Das Prinzip dieses *Kits* beruht auf der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an eine Silizium-dioxidmatrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Durch Zugabe von Lösungen mit einer geringen Salzkonzentration (z.B. ddH₂O) kann die DNA eluiert werden. Die identifizierten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit der gleichen Volumenmenge Bindepuffer XP versetzt und 10 min unter gelegentlichem Schütteln bei 55 °C inkubiert, bis das Gelstück vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Lösung auf eine HiBind®-Zentrifugensäule gegeben und zentrifugiert (1 min, RT, 10.000 x g). Der Durchlauf wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 750 µl SPW-Waschpuffer. Nachfolgend wurde die Säule durch Zentrifugation (1 min, RT, 10.000 x g) getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 40 µl ddH₂O und Zentrifugation (1 min, RT, 10.000 x g). Die isolierte DNA konnte direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.1.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung der Konstrukte wurden FastDigest®-Restriktionsendonukleasen (Fermentas) eingesetzt. Die FastDigest®-Enzymeinheit ist definiert als die Enzymmenge, die erforderlich ist, um 1 µg Standard-DNA (in der Regel λ-DNA) in 5 min bei 37 °C in 1x FastDigest®-Puffer zu schneiden. 1 µg DNA wurde mit 1 µl Restriktionsendonukleasen, 4 µl 1x FastDigest®-Puffer versetzt und mit ddH₂O auf 40 µl aufgefüllt. Nach dem Schneiden der DNA wurden die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und unter Verwendung des *peqGOLD Gel Extraction Kits* dem Gel isoliert.

3.1.6 Alkoholpräzipitation

Für die Alkoholpräzipitation zur Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA wurden zu einem Volumenteil DNA-Lösung drei Volumenanteile absolutes Ethanol und 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) gegeben. Der Alkohol bewirkt eine Dehydratisierung der DNA-Moleküle, die dadurch präzipitieren. Durch die Zugabe der Lösung monovalenter Kationen mit leicht saurem pH-Wert als Ladungskompensatoren kann die Löslichkeit der DNA erniedrigt und so die Effizienz der Fällung erhöht werden. Nach Vortexen und fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde die Lösung zentrifugiert (30 min, 4 °C, 21.500 x g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µl 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (30 min, 4 °C, 21.500 x g). Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet und in 10 µl ddH₂O aufgenommen.

3.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der FastAPTM (Fermentas) wurde die finale Phosphatgruppe eines DNA-Strangs abgespalten. Dazu wurde 1 µl der Phosphatase zum Restriktionsansatz gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die dephosphorylierte DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese und Extraktion mittels des *peqGOLD Gel Extraction Kits* isoliert und aufgereinigt.

3.1.8 Ligation

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten über deren kohäsive, bzw. stumpfe Enden werden sogenannte Ligasen, Enzyme, die unter ATP-Umsatz und Knüpfung einer neuen Phosphodiesterbindung 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatgruppen verbinden, verwendet. Als Ligase wurde die T4-DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 eingesetzt. Das zu insertierende DNA-Fragment und der Vektor wurden in einem Verhältnis von 3:1 bis 5:1 eingesetzt. Die Abschätzung des Verhältnisses beider DNA-Fragmente erfolgte anhand eines Agarosegels. Dem Ligationsansatz wurden weiterhin 2 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase zugefügt und mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte über 3 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C.

3.1.9 Transformation von *E. coli*

Die Transformationen wurden nach der Hitzeschockmethode oder durch Elektroporation durchgeführt. Chemisch kompetente Zellen, die mit Hilfe bivalenter Kationen eine erhöhte Fähigkeit besitzen, fremde DNA durch einen Hitzeschock aufzunehmen, wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit Vektor-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 40 s im Wasserbad (42 °C) durchgeführt und die Zellen anschließend sofort wieder auf Eis gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde auf TYE-Platten, die mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Für höhere Transformationseffizienzen wurde die Transformation durch Elektroporation durchgeführt. Hierbei werden durch kurzfristiges Anlegen einer Spannung Poren in der Zellwand aufgebrochen, die ein Eindringen zirkulärer DNA in die Zelle ermöglichen. Elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA versetzt. Nach Überführung des Transformationsansatzes in eine gekühlte Küvette wurde die Elektroporation im *Easy Ject* Elektroporator bei einer Spannung von 2.500 V und einem Widerstand von 201 Ω für 5 ms durchgeführt. Danach wurden die Zellen 1 min auf Eis gelagert, mit 1 ml SOB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf TYE-Platten, die mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.1.10 Lagerung von *E. coli*-Klonen

E. coli-Klone sind für einen Monat auf Agarplatten haltbar, wenn diese mit Parafilm verschlossen und invertiert bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur Langzeitlagerung wurde 1 ml *E. coli*-Kultur in einem Kryoröhrchen mit 250 μ l 87%igem Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das *GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) verwendet. Dabei werden die Zellen durch eine alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA anschließend selektiv an eine Siliziumdioxidmatrix absorbiert. Die Zellen einer 5 ml-Übernachtskultur wurden zentrifugiert (15 min, 4 °C, 4.000 x g) und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 250 μ l eiskalter RNase-supplimentierter

Resuspension Solution resuspendiert und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 250 µl *Lysis Solution* hinzu gegeben und kurz invertiert. Die Neutralisation des Lysates erfolgte durch Zugabe von 350 µl *Neutralization Solution*. Der Reaktionsansatz wurde invertiert und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 20.000 x g). Der Überstand wurde auf die Zentrifugationssäulen gegeben, zentrifugiert (1 min, RT, 20.000 x g) und der Durchfluss verworfen. Es wurde zweimal mit 500 µl *Wash Solution* gewaschen. Die Säule wurde anschließend durch Zentrifugation (1 min, RT, 20.000 x g) getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 40 µl ddH₂O und Zentrifugation (1 min, RT, 20.000 x g). Die Plasmid-DNA konnte direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.1.12 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA wurde am BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) vorgenommen und erfolgte unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Extinktionen bei 280 und 260 nm automatisch in µg/ml.

3.1.13 Fusionsklonierung mittels *StarGate*-System

Die *StarGate*-Technologie von IBA BioTAGnology nutzt die Kombination aus Typ-II-Restriktionsendonukleasen und Ligasen, um den Transfer von DNA, welche von sogenannten *combinatorial sites* flankiert ist, zwischen unterschiedlichen Vektorsystemen zu ermöglichen. Zur Klonierung eines Fab-Konstruktes mittels des *StarGate*-Fusionsklonierungssystems sind drei aufeinander folgende Reaktionsschritte notwendig: Insertion der V_H- und V_L-Sequenzen in den *Upstream*- bzw. *Downstream*-Vektor (pNFUSE-IBA bzw. pCFUSE-IBA), Ligation der V_HC_{H1}- und V_LC_L-Sequenzen in einen gemeinsamen Vektor (pENTRY-IBA) und abschließend der Transfer in den Expressionsvektor (pASG-IBA).

Für die Insertionsreaktion wurden zunächst die Zielgene mit Oligonukleotiden amplifiziert, welche die *combinatorial sites* an das 5'-Ende (ATTG) und an das 3'-Ende (GGGA) einführen. Das Amplifikat wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert und mittels *peqGOLD Gel Extraction Kits* isoliert. Anschließend erfolgte die Insertionsreaktion der V_H-Sequenz in pNFuse-IBA-hFab-One-Strep und der V_L-Sequenz in pCFuse-IBA-hCLK1 durch Zugabe der in Tab. 3.3 aufgeführten Reagenzien.

Tab. 3.3: Zusammensetzung Insertionsreaktion.

pNFuse-IBA-hFab-One-Strep bzw. pCFuse-IBA-hCLK1	10 µl
V _H - bzw. V _L -DNA mit <i>combinatorial sites</i> (2 ng/µl)	12 µl
<i>StarSolution</i> F1	1 µl
<i>StarSolution</i> F2	1 µl
<i>StarSolution</i> F3	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 30 °C inkubiert, *E. coli*-XL1-*Blue*-Zellen transformiert und auf TYE-Amp-IPTG-Xgal-Platten ausplattiert. Einzelne Klone wurden mittels PCR auf eine erfolgreiche Insertion hin überprüft. Positive Klone wurden in kleinem Maßstab kultiviert und einer Vektorpräparation unter Verwendung des *GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit* unterzogen. Der isolierte Vektor wurde für die Fusionsreaktion in pENTRY-IBA-20 eingesetzt (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Zusammensetzung Ligationsreaktion.

pENTRY-IBA-20	10 µl
pNFuse-IBA-hFab-One-Strep (4ng/µl)	6 µl
pCFuse-IBA-hCLK1 (4ng/µl)	6 µl
<i>StarSolution</i> F4	1 µl
<i>StarSolution</i> F5	1 µl
<i>StarSolution</i> F6	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 30 °C inkubiert, *E. coli*-XL1-*Blue*-Zellen transformiert und auf TYE-Kan-IPTG-X-Gal Platten ausgestrichen. Einzelne Klone wurden mittels PCR auf eine Insertion hin überprüft. Positive Klone wurden in kleinem Maßstab kultiviert und einer Vektorpräparation unter Verwendung des *GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit* unterzogen. Der isolierte Vektor wurde für die Transferreaktion in den Tet-induzierbaren *E. coli*-Vektor pASG-IBA-44, der N-terminal ein Strep-*Tag* und C-terminal ein Hexahistidin-*Tag* anfügt, eingesetzt:

Tab. 3.5: Zusammensetzung Transferreaktion.

pASG-IBA-44	10 µl
pENTRY-IBA-20 (2ng/µl)	12 µl
<i>StarSolution A1</i>	1 µl
<i>StarSolution A2</i>	1 µl
<i>StarSolution A3</i>	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 30 °C inkubiert, *E. coli*-XL1-*Blue*-Zellen transformiert und auf TYE-Amp-IPTG-X-Gal-Platten ausgestrichen. Einzelne Klone wurden mittels PCR auf eine erfolgreiche Insertion hin überprüft. Positive Klone wurden in kleinem Maßstab kultiviert und einer Vektorpräparation unter Verwendung des *GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit* unterzogen. Der isolierte Vektor wurde zur Transformation von kodonoptimierten BL21-Zellen eingesetzt. Die Expression wurde mit einer Tetracyclinkonzentration von 200 ng/ml induziert. Die Expression erfolgte wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank durchgeführt.

3.2.1.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Bei HEK293-Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende humane embryonale Nierenzelllinie, die über die Transformation mit dem Adenovirus Serotyp 5E1A immortalisiert werden konnte. Die Kultivierung der HEK-Zellen erfolgte in 75 cm² Gewebekulturflaschen in DMEM, supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin, in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

Das Passagieren der adhärent wachsenden Zellen erfolgte durch Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung. Diese wurde nach Entfernung des Kulturmediums in einem Volumenanteil von 1/5 zu den Zellen gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Zellsuspension in FKS-supplementiertes Zellkulturmedium überführt. Dieses enthält Serumproteine, die das Trypsin inhibieren und so die Reaktion terminieren. Während das EDTA mit zweiwertigen Kationen wie Calcium und Magnesium Komplexe bildet und so die Verbindung zum Gefäßboden schwächt, spaltet das Trypsin die Adhäsionsproteine.

3.2.1.2 Kultivierung von A431-Zellen

Die Kultivierung der A431-Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen in mit 10% hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml supplementiertem DMEM. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

Das Passagieren wurde analog zu den HEK-Zellen durchgeführt, wobei vor der Zugabe der Trypsin-EDTA-Lösung die Zellen zunächst zweimalig mit je 5 ml sterilem PBS gewaschen wurden.

3.2.1.3 Kultivierung von Sf9-Insektenzellen

Sf9-Zellen wurden in einem Inkubator bei 27°C und 95% Luftfeuchtigkeit in dem Kulturmedium InsectXpress (Lonza BioWhittaker (Wuppertal)), welches mit 10 µg/mL Gentamicin supplementiert wurde, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in geeigneten Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter.

Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Entfernen des ursprünglichen Kulturmediums und anschließender Zugabe einer adäquaten Menge frischen Kulturmediums durch Abklopfen der Zellen. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und ein geeignetes Volumen in eine neue Kulturflasche mit Kulturmedium überführt.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden trypsinierte Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 200 xg für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und 10 µl dieser Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermengt. 10 µl der Zellsuspension/Trypanblau-Mischung wurde in eine Neubauerzählkammer überführt und die vitalen (nichtgefärbten Zellen) in 16 Kleinquadraten unter dem Mikroskop ausgezählt. Über die Gleichung

$$\text{Zellzahl aus 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ [Zellen/ml]}$$

wurde die Zellzahl berechnet und die gewünschte Zellzahl pro Milliliter über Verdünnung mit Kulturmedium eingestellt.

3.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Lagerung von Zellen wurde eine Kryokonservierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach der Sedimentierung für 5 Minuten bei 1000 rpm wurden die Zellen in Einfriermedium (90 %

hitzeinaktiviertes FKS und 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst auf -20°C abgekühlt und nach 4 Stunden bei -80°C gelagert.

Zur Revitalisierung der Zellen wurden die Zellen bei RT aufgetaut und in 10 ml Kulturmedium überführt. Im Anschluss an die Sedimentierung der Zellen bei 1000 rpm und 4°C für 5 Minuten wurden sie in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt.

3.2.4 Expression von Antikörperkonstrukten in HEK293-Zellen

Für die Expression der Antikörperkonstrukte wurden HEK293-Zellen stabil transfiziert. Diese eukaryotische Zelllinie eignet sich für die homologe Expression rekombinanter Antikörper, da sie eine authentische posttranslationale Modifikation gewährleisten.

Zur Transfektion der HEK293-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Nanofectin verwendet. Das Nanofectin besteht aus zwei Komponenten: einem porösen Nanopartikel und einem positiv geladenen Polymer mit hoher DNA-Bindungskapazität, das sich in den Nanopartikel einlagert. Es bildet mit DNA DNA-Nanopartikel-Komplexe, die mit Proteoglykanen der Zelloberfläche interagieren und über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Außerdem schützen sie die DNA vor dem Abbau durch Nukleasen und erhöhen so die transiente Expression im Cytoplasma. Desweiteren ermöglicht Nanofectin eine effiziente stabile Transfektion, indem es den Transport der DNA durch die Kernmembran und somit die Integration in das eukaryotische Genom erleichtert.

3.2.4.1 Transiente Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden frisch passagierte HEK293-Zellen mit 2 ml Kulturmedium in eine 6-Well-Platte überführt. Die Transfektion wurde bei einer Konfluenz der Zellen von 50-90% unter Verwendung eines Nanofectin Kits (PAA). Gemäß den Angaben des Herstellers wurden 3 µg DNA sowie 9,2 µl Nanofectin jeweils mit 100 µl einer NaCl- Lösung (150 mM) vermengt. Anschließend wurden die Ansätze vereinigt, für 10 s gevortext und nach 30-minütiger Inkubation bei RT tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 72- stündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und mit ihm eine ELISA-Analyse durchgeführt um die transiente Expression der Antikörper nachzuweisen.

3.2.4.2 Stabile Transfektion

Zur Herstellung einer stabil exprimierenden Zelllinie wurden die Zellen 72 Stunden nach der Transfektion mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung aus den 6-Well-Platten abgelöst und in eine Kulturflasche mit 10 ml Kulturmedium überführt. Die Selektion positiv transfizierter Zellen erfolgte durch die Zugabe des Selektionsantibiotikums Zeocin (1 µg/ml). So wurden die Zellen für 2-4 Wochen bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert, wobei das Medium alle 3 Tage gewechselt wurde.

3.2.5 Expression von Fab-Fragmenten in Sf9-Zellen

Zur Expression der Fab-Fragmente wurde ein viral-basiertes System in Sf9-Insektenzellen gewählt, da für dieses eine hocheffiziente Erzeugung von humanen Fab-Fragmenten dokumentiert ist (Furuta, Ogawa, Katsuda, Fujii, & Yamaji, 2010; Furuta, Ogawa, & Yamaji, 2012). Sf9-Zellen sind immortalisierte Ovarzellen der Mottenart *Spodoptera frugiperda*. Diese Zellen lassen sich leicht mithilfe von Baculoviren infizieren. Da es sich um ein eukaryotisches Expressionssystem handelt, finden posttranslationale Proteinmodifikationen statt.

3.2.5.1 Transfektion von Sf9-Zellen

Es wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und diese anschließend durch Klopfen resuspendiert und ausgezählt. Es wurden dann 2×10^6 Zellen in einer 6-Well-Platte in einem Volumen von 1,6 ml Medium ausgebracht und für 60 min zur Adhäsion inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Transfektionsansatz hergestellt. Dazu wurden 100 µl 150 mM NaCl mit 9 µl Fectofly für 30 s gevortext und 100 µl 150 mM NaCl mit 9 µg Bacmid DNA gemischt. Anschließend wurde beides vereint um 30 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben und für 4 h bei 27 °C inkubiert. Danach wurde auf 3 ml mit Medium aufgefüllt. Es wurde für 72 h bei 27 °C inkubiert, dann der Überstand abgenommen und 5 min bei 500 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde gewonnen und in 15 ml-Falcons im Dunkeln als Virusstock P1 gelagert.

3.2.5.2 Herstellen von Baculovirus infizierten Insektenzellen

Es wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und diese anschließend durch Klopfen resuspendiert und ausgezählt. Es wurden dann $2,5 \times 10^7$ Zellen in eine 175 ml² Kulturflasche ausgebracht und zur Adhäsion für 60 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 400 µl des Virusstocks P1 und es wurde für 72 h bei 27 °C inkubiert. Der

Überstand wurde abgenommen und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen erneut abgeklopft, gezählt und bei 100 xg abzentrifugiert. 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml Aliquots sowie zwei 200 µl Test-Aliquots in Einfriermedium (45% frisches Medium, 45% konditioniertes Medium, 10% DMSO) aufgenommen und bei -80 °C weggefroren.

3.2.5.3 Testexpression

Es wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und diese anschließend durch Klopfen resuspendiert und ausgezählt. Dann wurden 1×10^6 Zellen in 2 ml pro Well in einer 6-Well-Platte ausgebracht und für 30 min zur Adhäsion inkubiert. Das 200 µl Test-Aliquot wurde in 10 ml Medium verdünnt und unterschiedliche Mengen (1 – 100 µl) zu den Zellen gegeben und für 72 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand auf die Expression getestet.

3.2.5.4 Expression in Sf9-Zellen

Es wurden Sf9-Zellen mit einer Dichte von 1.5×10^6 Zellen/mL in 400 mL Insektenzellmedium in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikane ausgesät. Es wurden in der Regel 3000 ml Expressionen angesetzt. Das Virus-Aliquot wurde 1/50 in Medium verdünnt und entsprechend der Testexpression zu den Sf9-Zellen gegeben. Es wurde für 72 h bei 27 °C exprimiert und anschließend der Überstand gewonnen. Dieser wurde mittels Cross-Flow-Filtration aufkonzentriert und abschließend die Reinigung des Zielproteins durchgeführt.

3.2.6 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Für eine phänotypische Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie wurden humane Lymphozyten aus dem Vollblut isoliert. Die PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) lassen sich mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Vollblut isolieren. Die Lymphozyten sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll (GE Healthcare) an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin.

Zur Isolierung der PBMCs wurden 15 ml heparinisiertes Vollblut mit 15 ml PBS (pH 7,4) verdünnt. Dann wurden 17 ml Ficoll (spez. Dichte 1.077 g/ml; LSM 1077; PAA (Cölbe))

mit der Zellsuspension im Falcon überschichtet und zentrifugiert (20 min, 2000 rpm, ohne Bremse). Der Interphasering wurde abgenommen und 2 mal mit PBS (pH 7,4) gewaschen (5 min, 1300 rpm). Die isolierten Zellen wurden in ungefärbtes Kulturmedium mit 10% FKS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie.

3.3 Phage Display-Technologie

3.3.1 Darstellung rekombinanter Phagen

E. coli-TG1-Zellen wurden in 500 ml 2YT-Medium, das Glukose (1%) und Ampicillin (100 µg/ml) enthielt, bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Bei dieser optischen Dichte, die einer Zellzahl von 4×10^8 Zellen entspricht, befinden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, in der es zur Ausbildung der F-Pili kommt. 25 ml der Kultur wurden mit Helferphagen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 10 infiziert. Es folgte eine Inkubation der Phagenlösung für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, RT, 1.000 x g), das Pellet resuspendiert und in eine 500 ml 2YT-Kultur mit Ampicillin und Kanamycin überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30 °C. Die Kultur wurde 30 min bei 3.000 x g pelletiert und die Phagen im Überstand mit 1/5 Volumenanteil PEG/NaCl-Lösung für 3 h auf Eis gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (30 min, 4 °C, 5.000 x g), das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert, Bakterienreste durch eine Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10.000 x g) sedimentiert und der Phagen-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Phagen erfolgte bei 4 °C.

3.3.2 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) der Phagen

Zur Reaktivitätsanalyse der Phagen wurde der rekombinante Antikörper (5 µg/ml) über Nacht bei 4 °C in den Vertiefungen einer ELISA-Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit PBS gewaschen und mit 300 µl 4% MPBS für einen Zeitraum von 2 h bei RT blockiert. Die Inkubation mit 100 µl verschiedener Verdünnungen der Phagenlösung in 4% MPBS erfolgte für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln. Die Platte wurde nachfolgend dreimal mit eiskaltem 0,1% TPBS und PBS gewaschen. Danach wurden die Vertiefungen mit 100 µl eines anti-M13-HRP-Konjugates (1:2000 in 4% MPBS verdünnt) belegt und für einen Zeitraum von weiteren 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit kaltem TPBS und PBS erfolgte

die Zugabe von 100 µl des HRP-Detektionspuffers und es wurde bis zur Grünfärbung inkubiert. Die Extinktion wurde bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer vermessen.

3.3.3 Selektion von Mimotopen

Die Selektion von Mimotopen wurde, soweit nicht anders beschrieben, nach dem Manual *Ph.D.TM Display Libraries* Version 1.0, Stand 1/11 durchgeführt. Verwendete Lösungen und Arbeitsgeräte wurden autoklaviert bzw. mit Ethanol sterilisiert. Durch Verwendung einer Bunsenbrennerflamme wurde die Arbeitsfläche von Kontaminationen aus der Luft freigehalten. Für alle wässrigen Puffer, Lösungen und Medien wurde hochreines Wasser aus dem Milli-Q Academic Laborwasser-System der Firma Millipore verwendet. Einige Puffer und Lösungen wurden zusätzlich durch einen sterilen Spritzenfilter, Filtrapur S (0,22µm) (Sarstedt) filtriert. Zusätzlich wurden für Pipettierschritte Filterpipettenspitzen *Safeguard* (PEQLAB) eingesetzt, um eine Aerosol- und Flüssigkeitskontamination zu verhindern.

3.3.3.1 Kultivierung des Bakterienstammes ER2738

Da die Infektion von Bakterien mit Bakteriophagen über den F-Pilus erfolgt, wurde der verwendete *E. coli* Stamm zuerst auf die Präsenz des F-Pilus selektiert. Der F-Faktor von ER2738 besitzt ein Minitransposon das eine Tetracyclin-Resistenz enthält. Daher fand die Kultivierung von *E. coli* ausschließlich in LB-Tet Medium statt. Der Glycerolstock von ER2738 wurde mit einer sterilen Pipettenspitze angekratzt und in 5ml LB-Tet-Medium für 6h kultiviert. Um einzelne Kolonien zu erhalten, erfolgte mit der Zellsuspension ein Impfösenausstrich auf LB-Tet-Platten. Die so kultivierten Bakterien wurden maximal für vier Wochen bei 4°C aufbewahrt. Diese Monokolonien wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zum Beimpfen von Flüssigkulturen herangezogen.

3.3.3.2 Titerbestimmung der M13 Bakteriophagen

Mit Hilfe einer Titerbestimmung wird zum einen die Infektiosität der M13-Phagen bestimmt und zum anderen das Vorhandensein von Phagen überprüft. Dazu wurden 5 ml LB-Tet- Medium mit *E. coli* ER2738 beimpft und bis zum Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Währenddessen wurde Top-Agar in der Mikrowelle aufgeköcht und in 5 ml Portionen in sterilen 15ml Röhrchen bei 47°C aufbewahrt. LB-IPTG-Xgal-Platten wurden bei 37°C vorgewärmt. Für Eluate amplifizierter Phagenkulturen wurden Verdünnungen im Bereich 10⁸-10¹¹ angesetzt. Für unamplifizierte Eluate der Affinitätsselektion lagen

die Verdünnungen im Bereich 10^1 - 10^4 . Zu 200 µl Bakterienkultur wurden 10 µl der jeweiligen Phagenverdünnung pipettiert, gevortext und nach 2 min zum Top-Agar gegeben. Nach erneutem Vortexen wurde die Mischung zügig auf LB-IPTG-Xgal-Platten gleichmäßig verteilt. Inkubiert wurde bei 37°C ü.N. Die Bestimmung der Phagenkonzentration erfolgte durch Auszählen der blauen Plaques auf Platten die nicht mehr als 100 Plaques aufwiesen. Die gezählte Zahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um den Phagentiter als PFU (*plaque forming unit*) pro 10 µl anzugeben.

3.3.3.3 Festphasenselektion der Phagenpeptidbibliothek (Panning)

Die Selektion der Phagen erfolgte auf einer Polystyroloberfläche einer 96-Well-Platte. Je eine Vertiefung wurde mit 100 µg/ml Zielantikörper Ig014 beschichtet und ü.N. bei 4°C in einer feuchten Kammer unter leichtem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Antikörperlösungen entfernt und die Wells mit Blockierungspuffer befüllt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Inkubiert wurde für mindestens 1 h bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde der Blockierungspuffer entfernt und die Platten sechsmal mit TBS-Tween (0,1 %) gewaschen. Es folgte die Zugabe der Peptidbibliothek, die in 100 µl TBS- Tween (0,1 %) so verdünnt wurde, dass stets ein PFU von 2×10^{11} vorlag. Inkubiert wurde bei RT für 1 h unter leichtem Schütteln, wobei mit jeder weiteren Runde die Inkubationsdauer um 20 min verringert wurde, um v.a. starkbindende Phagen zu selektieren. Unspezifische Phagen wurden durch zehnmal Waschen mit TBST-Tween (0,1 %) entfernt. Die Elution der Phagen erfolgte mit 100 µl 0.2 M Glycinpuffer pH 2,2 für 9 min bei RT auf dem Schüttler. Das Eluat wurde zur Neutralisation zügig in 17 µl vorgelegten 1 M Tris-HCl-Puffer pH 9,1 überführt. Es folgte eine Titerbestimmung. Zudem wurde das restliche unamplifizierte Eluat in 20 ml ER2738-Kultur ($OD_{600}=0,01$ - $0,05$) für 4,5 h amplifiziert. Als Sicherheitsrücklage erfolgte nach diesem Schritt das Anlegen von Glycerolstocks, die bei -80°C gelagert wurden. Nach dem Amplifizieren wurde die Kultur durch Zentrifugation für 30min bei 4000xg, 4°C von zellulären Bestandteilen befreit. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden 80 % des Überstandes in ein neues Gefäß überführt und die Phagen daraus nach Zugabe von 1/6 Volumenanteil PEG/NaCl-Lösung ü.N. bei 4°C gefällt. Anschließend wurde für 45 min bei 4000xg, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1ml TBS resuspendiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14000 rpm, 4°C wurde der phagenhaltige Überstand von restlichen zellulären Bestandteilen getrennt. Dem Überstand wurde 1/6 Volumenanteil PEG/NaCl-Lösung

zugegeben und 1h im Eisbad präzipitiert. Nach weiterer Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm, 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl TBS gelöst. Durch einminütige Zentrifugation wurden unlösliche Stoffe entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, das nun die amplifizierten Phagen enthielt. Es folgte eine Titerbestimmung der amplifizierten Phagen, um den Phagentiter für eine weitere Selektionsrunde zu erhalten. Ab der zweiten Runde wurde die Tween-Konzentration bei den Waschschritten auf 0,5% erhöht, um Phagen zu erhalten, die mit höherer Spezifität an das Zielprotein binden.

3.3.3.4 Negativselektion

Für die Negativselektion wurde wie unter 2.3.3.3. vorgegangen, mit dem Unterschied, dass die Wells mit poly-human IgG (Intratect, 100 µg/ml) beschichtet wurden. Zudem wurde nach 1 h Inkubation mit der Peptidbibliothek der amplifizierten dritten Selektionsrunde der Überstand der Wells gesammelt. Denn dieser enthielt die Ziel-Phagen, die nicht an die Oberfläche humane IgG gebunden haben.

3.3.3.5 Amplifikation selektierter Phagenklone

Die auf den Titerplatten gewachsenen Klone stellten die aus den einzelnen Selektionsrunden resultierenden Subbibliotheken dar, in denen eine starke Anreicherung spezifisch bindender Klone stattgefunden haben soll. Die Amplifikation erfolgte in *E. coli*. Dazu wurde eine ER2738 ü.N. Kultur 1:100 in LB-Tet-Medium verdünnt. Mit sterilen Pipettenspitzen wurden 10-20 Plaques von Titerplatten gepickt, die weniger als 100 Plaques aufwiesen, und in Kulturröhrchen mit je 1 ml Bakteriensuspension überführt. Die Inkubation erfolgte für 4.5-5 h bei 37°C. Anschließend wurde 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. 80 % des Überstands wurden in ein neues Gefäß überführt, das damit die amplifizierten Phagen selektierter Phagenklone enthielt. Diese amplifizierten Phagen wurden für ELISA-Auswertungen und für die weitere Präparation zu Sequenzierzwecken eingesetzt.

3.3.3.6 ELISA-Analyse

Ob die Anreicherung der Peptidbibliothek mit spezifisch bindenden Phagen durch die Selektionsrunden erfolgreich war, wurde durch Reaktivitätstestung der amplifizierten Phagenklone im ELISA untersucht. Dazu wurden die Zielproteine ü.N. in den Wells einer MTP bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden alle Wells mit

Blockierungspuffer für 2 h bei RT blockiert. Es wurde sechsmal mit TBS-Tween (0,5 %) gewaschen. Die Inkubation mit 100 µl Phagen (1:25 verdünnt in TBS) erfolgte bei RT für 2 h. Es folgte ein weiterer sechsfacher Waschschrift sowie die Inkubation mit je 200 µl anti-M13-HRP-Konjugat (1:2500 in Blockierungspuffer) für 1h bei RT auf dem Schüttler. Nach erneutem sechsfachem Waschen wurde die Farbentwicklung mit HRP-Substrat durchgeführt und nach 5-60 min bei 405 nm detektiert.

3.3.3.7 Phagen-DNA Präparation zum Sequenzierung

Zum Sequenzieren der Phagen-DNA wurde zu den amplifizierten Phagen 200 µl PEG/NaCl Lösung pipettiert. Nach mehrfachem invertieren wurde bei RT für 20 min inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde noch vorhandener Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 100µl Iodidpuffer resuspendiert. 250 µl eiskaltes 70%iges Ethanol wurden pipettiert und für 20min bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt, bei dem der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde mit 0,5 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Brutschrank kurz getrocknet, damit restlicher Ethanol verdampfen konnte. Das Pellet wurde in 30µl ddH₂O resuspendiert und die DNA- Konzentration am Nanodrop bestimmt.

3.4 Peptidchemie

3.4.1 Peptidsynthese

Die Peptidsynthese wurde mittels des vollautomatischen *LibertyTM Peptide-Synthesizers* durchgeführt (Merrifield *et al.*, 1977). Dabei wird der C-Terminus einer Aminosäure über einen *Linker* mit einem hochmolekularem Polystyrolharz verbunden und der N-Terminus verlängert. Die Aminofunktionen sowie reaktive Seitenketten der eingesetzten Aminosäuren wurden durch eine BOC-Gruppe geschützt. Als Schutzgruppe der terminalen Aminofunktion diente die Fmoc-Gruppe zur selektiven Kopplung der freien Carboxylfunktion. Diese lässt sich unter basischen Bedingungen (z.B. mit Piperidin/DMF) leicht abspalten. Mit Hilfe des Aktivators TBTU wurde die Peptidbindung unter milden Bedingungen geschlossen. Die Abspaltung des synthetisierten Peptids vom Harz (Fmoc-Rink-Amide-AM *Polystyrene Resin*) erfolgte durch Inkubation eines 95:5:2-Gemischs aus TFA, TIPS und ddH₂O für 90 min bei RT und 220 rpm.

3.4.2 HPLC (*high performance liquid chromatography*)

Zur Reinigung des Rohproduktes mittels HPLC wurde eine präparative Säule (21 mm Durchmesser, *reversed phase* C₁₈) verwendet. Das Lyophilisat wurde dazu in 1 ml eines 90:10:0.1-Gemischs aus ddH₂O, MeCN und TFA aufgenommen, für 5 min mit Ultraschall behandelt und unlösliche Bestandteile für 5 min bei 10.000 x g abgetrennt. Die Syntheseprodukte wurden unter Verwendung der Laufmittel A (95:5:0.1; ddH₂O/MeCN/TFA) und B (95:5:0.1; MeCN/ddH₂O/TFA) getrennt (Tab. 3.6). Dabei wurde für jedes Peptid ein individueller Gradient bestimmt. In Tab XXX ist exemplarisch ein Gradient gezeigt, der zu Beginn der Reinigung für das Rohprodukt genutzt wurde. Anschließend wurde der Gradient abhängig von den Eigenschaften des Peptides optimiert.

Tab. 3.6: HPLC-Programm

1.	0.5 SV von A/B 90:10 nach A/B 75:25
2.	2.0 SV von A/B 75:25 nach A/B 55:45
3.	0.5 SV von A/B 55:45 nach A/B 0:100
4.	1.0 SV 100 % B

Die Elution erfolgte bei RT und einer Flussrate von 20 ml/min. Die Fraktionen wurden mittels ESI-Scan überprüft, vereint und lyophyllisiert.

3.4.3 Aufnahme von MALDI-TOF-Spektren

Die MALDI-TOF-MS-Massenspektren wurden an einem *Biflex III*-Spektrometer bei einer Beschleunigungsspannung von 19kV und einer Spannung des Sekundär-Elektronen-Vervielfachers von 3425 V aufgenommen.

Auf den Probenträger wurden 0,5 µl einer Matrixlösung aufgetragen und im Luftstrom kristallisiert. Als Matrices wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (gesättigte Lösung in Methanol/Acetonitril (1:1)) sowie Ferulasäure (FA) (gesättigte Lösung in Wasser/Acetonitril (2:1)) verwendet. Anschließend wurden 0,5 µl der zu untersuchenden Probe mit einer Konzentration von etwa 10 pmol/µl aufgetragen und erneut im Luftstrom kristallisiert.

Nach Einbringung des Probenträgers in das Gerät erfolgte eine Kalibrierung mit einem Standardsubstanzgemisch (*ES Tuning Mix*). Die Messungen wurden bei einer Attenuierung von 25 bis 35 mit 50 bis 250 Laserpulsen durchgeführt. Signale der Matrixmoleküle im Bereich $m/z < 800$ wurden unterdrückt.

3.4.4 Biotinylierung von Peptiden

Zur Biotinylierung von Peptiden wurde das Reagenz EZ-LinkSulfo-NHS-SS-Biotin von PIERCE (Rockford, USA) eingesetzt. Bei der Biotinylierung mit dieser Substanz reagiert ein Sulfo-NHS-Ester mit primären Aminogruppen. Durch die Kopplung des Biotins über einen *Spacer*-Arm von 24.3 Å wird die sterische Freiheit des Zielmoleküls erhöht. Es wurde 1 mg Peptid in 1 ml PBS, pH 8.0 gelöst, mit einem zwanzigfachen molaren Überschuss von EZ-LinkSulfo-NHS-SS-Biotin vermischt und 2 h bei RT inkubiert. Nach Dialyse gegen PBS wurde das erhaltene Konjugat mittels ELISA-Analyse unter Verwendung von ExtrAvidin-HRP überprüft.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Periplasmatische Expression

Es wurden 5 ml 2YT-Medium mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml 2YT-Medium, das zudem Glukose (0.1%) und Ampicillin (100 µg/ml) enthielt, inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 220 rpm bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5$) kultiviert. Daraufhin wurde durch Zugabe von IPTG in einer finalen Konzentration von 1 mM die Proteinexpression induziert und die Kultur 3 h bei RT und 220 rpm inkubiert.

3.5.2 Präparation des periplasmatischen Extraktes

Der Expressionsansatz wurde auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (30 min, 4 °C, 4.000 x g). Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem TS-Puffer resuspendiert, nach 3 min mit weiteren 30 ml eiskaltem 0,25 x TS-Puffer versetzt und anschließend für 90 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde die Suspension alle 30 min invertiert. Der Zelldebris wurde dann zentrifugiert (15 min, 6.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, filtriert (0,45 µm) und zur Reinigung mittels Affinitäts-chromatographie eingesetzt.

3.5.3 Nativer Zellaufschluss

Der Expressionsansatz wurde zentrifugiert (30 min, 4 °C, 4.000 x g). Das Zellpellet wurde mit 10 ml PBS versetzt und auf Eis durch 7 Pulse von jeweils 30 s bei 12.000 microns sonifiziert. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 4.000 x g) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, filtriert (0,45 µm) und zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie eingesetzt.

3.5.4 Affinitätschromatographische Verfahren

3.5.4.1 Affinitätschromatographie mittels Protein A

Es wurde 500 µl einer Protein A-Agarose-Matrix in eine Durchflusssäule pipettiert und sedimentieren gelassen. Die Matrix wurde mit 10 ml PBS äquilibriert und anschließend der Kulturüberstand über die Säule gegeben. Dabei wurde eine Fließgeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/ min eingestellt. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 15 Volumenanteilen PBS (pH 7,4) entfernt und die Antikörper durch Erniedrigung des pH-Wertes mithilfe eines Glycinpuffers (200 mM, pH 2) in 1 ml-Schritten eluiert. Zur Neutralisation wurde in die Elutionsgefäße ein Trispuffer (1 M, pH 7,4) vorgelegt. Zur Regeneration der Protein A-Matrix wurden 20 Volumenanteile des Glycinpuffers und 5 ml PBS über die Matrix gegeben. Anschließend wurden 5 ml 20 % Ethanol über die Säule gegeben und die Matrix in diesem Puffer bei 4 °C gelagert.

3.5.4.2 Affinitätschromatographie mittels Amylose-Matrix

Zur Reinigung von MBP-Fusionsproteinen wurde eine Amylose-Matrix verwendet. Diese wurde in eine Durchflusssäule überführt und durch Waschen mit 10 ml Säulenpuffer äquilibriert. Nach Auftragen der Probe bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde mit 15 ml Säulenpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix zu entfernen. Die Elution des MBP-Fusionsproteins erfolgte unter sukzessiver Zugabe von Elutionspuffer, wobei Fraktionen zu je 1 ml gesammelt wurden. Die Elutionsfraktionen wurden mittels einer SDS-PAGE-Analyse auf eine erfolgreiche Reinigung hin untersucht. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereint und gegen PBS dialysiert.

3.5.4.3 Affinitätschromatographie mittels Chitin-Matrix

Die Reinigung von CBD-Intein-Fusionsproteinen erfolgte über eine Chitin-Matrix unter Verwendung des *IMPACT*TM-Systems. Dieses System nutzt die induzierbare Aktivität von Inteinen zur Selbstprozessierung, um das Zielprotein von dem Affinitäts-Tag abzuspalten. Dabei wird die Selbstprozessierung des Inteins durch Zugabe reduzierender Reagenzien wie beispielsweise DTT induziert.

Die Chitin-Matrix wurde in eine Durchflusssäule überführt und durch Waschen mit 10 SV Säulenpuffer äquilibriert. Nach Auftragen der Probe bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde mit 15 ml Säulenpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix zu entfernen. Zur Abspaltung des Zielproteins wurde die Säule

über Nacht bei 4 °C mit Elutionspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Elution des abgespaltenen Proteins unter sukzessiver Zugabe von Elutionspuffer, wobei Fraktionen zu je 1 ml gesammelt wurden. Die Elutionsfraktionen wurden durch eine SDS-PAGE-Analyse auf eine erfolgreiche Reinigung hin untersucht. Die Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereint und gegen PBS dialysiert.

3.5.4.4 Affinitätschromatographie mittels KappaSelect Matrix

Die Reinigung der rekombinanten Antikörper erfolgte über eine KappaSelect-Affinitätschromatographie. Bei der KappaSelect Matrix (GE Healthcare) handelt es sich um eine Agarose-basierte Matrix, die über einen langen, hydrophilen Linker mit einem *single chain*-Antikörperfragment modifiziert ist. Dieser immobilisierte Ligand bindet mit einer hohen Affinität an der konstanten Region der κ -leichten Kette von humanen Immunglobulinen.

Die Antikörper-enthaltenen HEK293-Zellkulturüberstände wurden zunächst zur Entfernung zellulärer Bestandteile für 45 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 μ m filtriert. Mit diesem wurde anschließend die KappaSelect-Säulenmatrix (500 μ l Volumen), die zuvor mit PBS äquilibriert wurde, beladen. Dabei wurde eine Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min eingestellt. Nach der Beladung der Säule wurden ungebundene Proteine über einen Waschschrift mit 50 ml PBS entfernt und die Antikörper durch Erniedrigung des pH-Wertes über die Zugabe von Glycinpuffer (0,2 M, pH 2) in Fraktionen von 1 ml eluiert. Zur Neutralisation wurden in die Elutionsgefäße 250 μ l eines Tris-Puffers (1 M Tris pH 7,5) vorgelegt. Im Anschluss an die Reinigung wurde die Säule nach Angaben des Herstellers gereinigt und in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

3.5.4.5 IMAC (*immobilized metallion affinity chromatography*)

Zur Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen wurde eine Ni-NTA-Matrix (*nickel-nitrilotriacetic acid*) verwendet. Diese wurde in eine Durchflusssäule überführt und durch Waschen mit 10 ml Säulenpuffer äquilibriert. Nach Auftragen der Probe bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde mit 15 ml Säulenpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix zu entfernen. Anschließend wurde das Zielprotein mit einem Imidazol-Gradienten (15 mM, 20 mM, 25 mM, 250 mM Imidazol in PBS, pH 7,4) von der Matrix eluiert, wobei Fraktionen zu je 1 ml gesammelt wurden. Die

Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE-Analyse auf eine erfolgreiche Reinigung hin untersucht. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereint und gegen PBS dialysiert.

3.5.4.6 Immunaффinitätschromatographie

Zur Reinigung des Phlp 5a-spezifischen hulgE-Konstruktes sowie sEGFR wurden zunächst Phlp 5a-F1 sowie anti-EGFR-scFv in *E. coli* ER2655 als CBD-Intein-Fusionsprotein exprimiert und die lösliche Proteinfraction gewonnen. Diese wurde steril filtriert und mit 1 ml Chitin-Matrix über Nacht bei 4 °C auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert. Die proteinbeladene Chitin-Matrix wurde anschließend zentrifugiert (700 g, 10 min, 4 °C), der Überstand entfernt, die Matrix in 5 ml Säulenpuffer resuspendiert und in eine Durchflusssäule gegeben. Nach Waschen der Matrix mit 20 ml Säulenpuffer wurde die pH-Stabilität der Chitin-Bindung überprüft. Dazu wurde der Elutionspuffer in einem pH-Gradienten (pH 5; pH 4,5; pH 4,0; pH 3,5; pH 3,0; pH 2,5; pH 2) über die Säule gegeben. Es wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und mit 200 µl Neutralisierungspuffer versetzt. Anschließend wurden die Fraktionen sowie die Proteinbeladung der Chitin-Matrix mittels einer SDS-PAGE-Analyse überprüft. Da die pH-Stabilität der Chitin-Bindung nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Reinigung des jeweiligen Zielmoleküls. Dazu wurde zunächst die Matrix mit 10 ml Säulenpuffer äquilibriert. Nach Auftragen des Überstandes bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde mit 30 ml Säulenpuffer gewaschen, um nicht selektiv bindendes Protein zu entfernen. Die Elution erfolgte unter sukzessiver Zugabe von Elutionspuffer (pH 5 bis pH 2), wobei Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und mit 200 µl Neutralisierungspuffer versetzt wurden. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE-Analyse auf eine erfolgreiche Reinigung hin untersucht. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereint und gegen PBS dialysiert.

3.5.5 SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfat-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Die SDS-PAGE wird unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS durchgeführt, einem Detergens, dessen Kohlenwasserstoffanteil an die Aminosäuren eines Proteins bindet. Durch die Abstoßung der anionischen Sulfatgruppen werden die nichtkovalenten Wechselwirkungen zerstört und die Proteine denaturiert. Die resultierende Nettoladung ist proportional zur Anzahl der Aminosäuren, wodurch die Mobilität der Proteine im elektrischen Feld dem Logarithmus ihrer Molekülmasse direkt

proportional wird. Die pH-Differenz zwischen Trenngel, Tankpuffer und Sammelgel, resultierend aus den unterschiedlichen Laufeigenschaften des eingesetzten Glycinats und der Chlorid-Ionen, bewirkt im Sammelgel eine Fokussierung der Proteine auf eine scharfe Bande (Laemmli *et al.*, 1970). Das Sammel- und Trenngel wurde unter Verwendung einer Acrylamid-Stammlösung (30%) mit einer finalen Polyacrylamidkonzentration von 10% mit einem Gehalt von 0.81% N,N'-Bismethylenacrylamidals Quervernetzer angefertigt. Die Konzentration des Radikalstarters Ammoniumpersulfat lag bei 0.03% und des Katalysators TEMED bei 0.075%. Die Proteinproben wurden unter Zugabe nicht reduzierendem Probenpuffer für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für etwa 60-90 min unter Wasserkühlung durchgeführt.

3.5.6 Coomassie-*Brilliant-Blue*-Färbung von Proteinen

Der Farbstoff Coomassie-*Brilliant-Blue* ermöglicht die Anfärbung von Proteinen nach der SDS-PAGE im Gel mit einer Nachweisempfindlichkeit von 0,1-1 µg. Das Gel wurde dazu nach der Elektrophorese für 30 min in Coomassie-Färbelösung überführt. Die Entfärbung der Gele erfolgte durch Inkubation in 20% (v/v) Essigsäure.

3.5.7 Proteolytische Spaltung von Immunglobulinen

Die Durchführung der Papain-Spaltung von Antikörpern erfolgte nach dem Protokoll von Coulter et al. (Coulter & Harris, 1983). Zu 1 mg des Vollantikörpers gelöst in 0,1 ml PBS (pH 7,4) wurden 20 µl Cystein-Hydrochlorid (16 mg/ml), 20 µl EDTA (8 mg/ml) und 0,1 mg Papain gegeben. Die Lösung wurde auf 200 µl κ-spezifische Matrix (GeE Healthcare (Freiburg)) gegeben. Das Gemisch wurde für 4 h – 6 h im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung nach dem Protokoll für die KappaSelect-Matrix.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Zur Reaktivitätsanalyse von Antikörperkonstrukten wurden die Antigenlösungen (100 µg/ml) in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde viermal mit PBS gewaschen und die Polystyroloberfläche für 1 h bei RT mit 4% MPBS oder 10% FKS/DMEM blockiert. Nach viermaligem Waschen

wurden 50 µl Antikörperlösungen (5 µg/ml) in die Vertiefungen gegeben und bei RT unter leichtem Schütteln für 1 h inkubiert. Es wurde viermal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine geeignete Verdünnung des Sekundär-AP-Konjugats (in 50 µl 4% MPBS, bzw. 10% FKS/DMEM), in die Vertiefungen gegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, erfolgte die Zugabe von 50 µl der Detektionslösung, bestehend aus pNPP (5 mg/ml) in AP-Detektionspuffer. Es wurde bis zur Gelbfärbung inkubiert und die Extinktion bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer vermessen.

3.6.2 Immunoblot

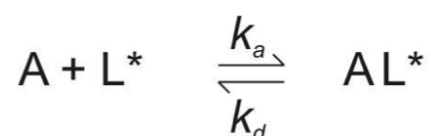
Nach dem elektrophoretischen Transfer wurde die Nitrocellulosemembran für 60 min in 4% MPBS bei RT blockiert. Danach wurde sie in eine 2%ige MPBS-Lösung überführt, die eine geeignete Primärantikörperkonzentration enthielt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Membran wurde nachfolgend dreimal unter leichtem Schütteln für je 5 min mit PBS gewaschen. Dann wurde die Membran mit einer geeigneten Verdünnung eines Sekundärantikörper-AP-Konjugates (in 2% MPBS) für 60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS. Die Membran wurde anschließend in die Färbelösung (10 ml AP-Detektionspuffer, 100 µl BCIP, 100 µl NBT) überführt. Die Färbung wurde unter Lichtausschluss bis zur Detektion der Banden durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.7 Biophysikalische Methoden

3.7.1 SPR-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) ist eine im Bereich der Biosensorik etablierte und weit verbreitete Methode, um Interaktionen von Biomolekülen in Echtzeit zu untersuchen. Darüber hinaus kann auf eine vorausgehende Markierung der zu untersuchenden Interaktionspartner verzichtet werden. In der Durchführung eines SPR-Experimentes wird der mit einer sehr dünnen Goldoberfläche ausgestattete Sensorchip mit dem als Ligand bezeichneten Biomolekül kovalent gekoppelt. Innerhalb einer mit dem Sensorchip in direktem Kontakt stehenden Flusszelle wird nun ein (potentieller) Interaktionspartner (Analyt) über die Goldoberfläche geleitet. Durch Wechselwirkung des Analyten mit dem Liganden kann es

zu einer Bindung und damit zu einer direkten Massenzunahme auf der Metalloberfläche kommen. Das Prinzip der SPR-Spektroskopie besteht nun darin, diese Massenänderung durch Ausnutzung des optischen Phänomens der Oberflächenplasmonenresonanz messbar zu machen. Als Messwert erhält man den SPR-Winkel, unter dem Oberflächenplasmonen angeregt werden können. Die zeitliche Änderung des SPR-Winkels ist abhängig von der Massenänderung auf der Oberfläche des Metalls und lässt somit Rückschlüsse auf das Interaktionsverhalten zwischen Ligand und Analyt zu. In der Praxis wird zweckmäßig die Einheit RU (*response unit*) gegen die Zeit in einem Sensorgramm aufgetragen; definitionsgemäß entspricht die Änderung des SPR-Winkels bei einer Änderung der Masse von einem Pikogramm bezogen auf einen Quadratmillimeter der Chipoberfläche 1 RU. Mit Hilfe der erhaltenen Sensorgramme lassen sich dann kinetische Daten als Charakteristik der Ligand-Analyt-Interaktion berechnen. Der Bindung eines Analyten an einen immobilisierten Liganden lässt sich darstellen durch:



Wenn sich die Konzentration des Analyten [A] erhöht, nimmt auch die Menge an Komplex [AL] zu. Bei genügend hohen Konzentrationen von [A] erfährt die gemessene Veränderung jedoch keine weitere Steigerung mehr, weil L* dann fast vollständig zu AL* umgesetzt ist bzw. die Bindung gesättigt ist. Dieses Erreichen eines dynamischen Gleichgewichts, bei der die Anzahl assoziierender und dissoziierender Analyten gleich ist, ist im Sensorgramm gekennzeichnet durch das Erreichen eines Plateaus aller Kurven. Im diesem Fall ergibt sich zwischen der Konzentration des Komplexes [AL] und der Konzentration an freiem Analyten [A] die Beziehung einer Langmuirschen Adsorptionsisotherme.

Für die Bindungskurve der RU-Werte zu diesem Zeitpunkt gegen [A] aufgetragen, kann eine Kurvenanpassung nach:

$$RU_{eq} = RU_{max} [A]/(K_D [A])$$

erfolgen und die Gleichgewichtsdissoziations- oder auch Bindungskonstante K_D (M) der Bindung ermittelt werden. Diese sogenannte *steady state*- Berechnung des K_D -Wertes erfordert jedoch das Erreichen des Gleichgewichtszustandes und erfolgt ohne Einbeziehung kinetischer, also zeitabhängiger Parameter.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Affinität kann durch eine Verfolgung der Bindungskinetik und der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation erfolgen (k_a und k_d oder k_{on} und k_{off}). Deren Quotient k_d/k_a liefert ebenfalls die Bindungskonstante K_D . In den Sensorgrammen der Echtzeitmessungen sind die zeitlichen Parameter von Assoziation und Dissoziation enthalten. Für eine kinetische Analyse werden Messungen unterschiedlicher Konzentrationen des Analyten durchgeführt. Anhand von Kurvenanpassungen an die Langmuirsche Adsorptionsisotherme können dann k_a und k_d und somit K_D erhalten werden. Hier ist außerdem eine Charakterisierung des Assoziations- und Dissoziationsverhaltens möglich.

Beide beschriebenen Berechnungen der Affinität, sowohl unter Annahme eines Gleichgewichtes als auch anhand kinetischer Messungen, erfolgen unter der Annahme einer monovalenten 1:1 Bindung zwischen immobilisiertem Liganden und frei beweglichem Analyten. Besitzt der sich in Lösung befindende Analyt jedoch mehr als eine Bindungsstelle für den Liganden wie im Falle eines bivalenten Antikörpers, unterliegt dem Sensorgramm eine weitaus komplexere Kinetik und eine Kurvenanpassung nach einem 1:1-Bindungsmodell ist nicht mehr möglich (Dmitriev et al., 2002). Formal kann eine bivalente Bindung in zwei monovalente Bindungen zerlegt werden, deren Bindungsstärke jeweils der eines monovalenten Analyten entspricht:



Jedoch kann daraus nicht ohne weiteres die Bindungsstärke der bivalenten Bindung abgeleitet werden. Eher gleicht die Wechselwirkung zwei aufeinanderfolgenden Bindungen, wobei zunächst eine monovalente Knüpfung erfolgt. Die darauffolgende Bindung der zweiten Bindungsstelle an einen weiteren Liganden ist nun abhängig von vielen Faktoren. So ist der Entropieverlust der zweiten Bindung geringer, da die zweite Bindungsstelle durch die erste Bindung bereits in räumliche Nähe zum Liganden arrangiert ist und somit mit einer höheren Wahrscheinlichkeit stattfindet. Andererseits muss berücksichtigt werden, ob und wie viele Bindungsstellen für den einfach gebundenen Analyten überhaupt erreichbar sind. Kriterien hierfür sind sowohl die Flexibilität des Analyten als auch die sterische Ausrichtung seiner Bindungsstellen sowie

die Anordnung und der Abstand von Ligandenmolekülen auf der Chipoberfläche (Plückthun & Pack, 1997). Da durch die Echtzeitmessungen mithilfe eines SPR-Biosensors auch die zeitlichen Parameter von Assoziation und Dissoziation ermittelt werden können, ist es durch Kurvenanpassung an ein bivalentes Bindungsmodell möglich die Geschwindigkeits-konstanten beider aufeinanderfolgenden Bindungen zu erhalten. Die Dissoziations-konstante der ersten, also der monovalenten Bindung, entspricht der K_{D1} . Die Bindungskonstante für die nachfolgende Knüpfung zur bivalenten Bindung entspricht K_{D2} , wobei diese wie beschrieben von vielen Faktoren abhängig ist und die Einheit mol/m^2 besitzt. Eine funktionelle Dissoziationskonstante K_{Dbi} beider Bindungen lässt sich berechnen, indem die Dichte des immobilisierten Liganden einbezogen wird:

$$K_{Dbi} = K_{D1} \times K_{D2} / (K_{D2} + 2 [L^*])$$

Wobei $[L^*]$ in diesem Fall die Einheit mol/m^2 besitzt. Bei SPR-spektroskopischen Messungen kann anhand des direkt proportionalen Verhältnisses von RU zu immobilisierter Masse von einer Ligandendichte von etwa $1 \text{ pg}/\text{mm}^2$ pro RU immobilisiertem Liganden ausgegangen werden (Schuck, 1997). Die Berechnung der K_{Dbi} , der funktionellen Affinität des Antikörpers, wird für den Fall, dass $2 [L^*] \ll K_{D2}$ ähnlich der K_{D1} . Der Quotient K_{Dbi}/K_{D1} wird auch als Steigerungsfaktor bezeichnet, da er angibt um welchen Faktor sich die Affinität der monovalenten Bindung im Falle eines bivalenten Moleküls steigert. Dieser Faktor kann jedoch je nach Experiment durch die starke Abhängigkeit der K_{D2} von zusätzlichen Faktoren stark abweichen.

Bei der Auswertung der durchgeführten SPR-spektroskopischen Messungen wurden sowohl monovalente als auch bivalente Kurvenanpassungen durchgeführt und die beschriebenen Bindungskonstanten berechnet. Dabei wurde neben den kinetischen Parametern der χ^2 -Wert erhalten. Dieser Wert stellt ein Maß für die Güte der Kurvenanpassung dar und gibt die Fläche zwischen dem gemessenen Sensorgramm und der über die Anpassung berechneten Kurve wieder. Je niedriger der χ^2 -Wert ist, umso besser stimmt die Kurvenanpassung mit den gemessenen Werten überein. Daher wurde die Kurvenanpassung so durchgeführt, dass ein möglichst niedriger χ^2 -Wert erhalten wurde. Bei einer guten Kurvenanpassung beträgt der χ^2 -Wert Wert $<10\%$ der RU_{max} .

Sämtliche Messungen erfolgten auf dem SPR-2 System der SierraSensors GmbH (Hamburg) unter Verwendung des Sensorchips SPR-2 Affinity Sensor Amine.

Zunächst erforderte die Vorbereitung des Sensorchips für die Messungen die kovalente

Im- mobilisierung des Liganden an die Dextranoberfläche. Hierzu wurde das System zunächst mit dem Laufpuffer (PBS pH 7.5, 0.01 % Tween, entgast) äquilibriert und der Chip eingesetzt. Nach erneuter Äquilibration wurde die Chipoberfläche bei einer Flussrate von 25 µl/min durch Injektion von 200 µL einer Mischung aus gelöstem EDC und NHS aktiviert (8 min). Die Liganden wurden auf 100 µg/ml in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 6) verdünnt und je 125 µl bei einer Flussrate von 25 µl/min über den entsprechenden Kanal der Flusszelle geleitet. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die immobilisierte Proteinmenge je ca. 1000 RU entsprach. Abschließend wurden 200 µl Ethanolamin (pH 8.5, 1 M) bei einer Flussrate von 25 µl/min zum Blockieren freier Bindungsstellen injiziert. Der Sensorchip konnte nun für die folgenden Messungen verwendet werden.

Vor den eigentlichen Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Antikörper-Antigen-Interaktion wurden die einzusetzenden Konzentrationsbereiche und die Bedingungen für die effiziente Regeneration des Chips analysiert. Zudem erfolgte eine Kontrolle durch bloße Injektion von Pufferlösung. Die zu untersuchenden Antikörper wurden in einer seriellen Konzentrationsreihe in dem Laufpuffer verdünnt. Für die Aufnahme des Sensorgramms erfolgte dann eine Injektion von 200 µl (Assoziationsdauer: 8 min). Die Dissoziation wurde durch Spülen des Systems mit dem Laufpuffer für 6 min erreicht. Regenerierungsschritte wurden durch Injektion von 50 - 150 µl AIW-Puffer vorgenommen. Dieser setzt sich nach Andersson et al. aus drei Anteilen heraus: aus einem Teil acidischen Puffer, einem Teil ionischen Puffer und einem Teil Wasser (Andersson, Areskoug, & Hardenborg, 1999). Alle Schritte der Messung wurden bei einer Flussrate von 25 µl/min durchgeführt.

Die Auswertung der SPR-Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Software TraceDrawer. Für die Regressionsanalysen wurden die RU_{\max} -Werte global ermittelt.

3.7.2 Durchflussszytometrie

Die Durchflussszytometrie ermöglicht eine schnelle Analyse einzelner Zellen aus Zellsuspensionen aufgrund ihrer Lichtstreuung oder auch Fluoreszenzeigenschaften. Sie ermöglicht die Messung der relativen Zellgröße sowie der Granularität. Dazu werden die Zellen zunächst fokussiert und anschließend durch einen Laserstrahl geleitet. Das von den Zellen gestreute Licht wird auf einen Detektor geleitet und dort ausgewertet. Dabei korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe und Komplexität der Zelle.

Desweiteren können über verschiedene Lasersysteme Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden. Die FACS-(*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse ermöglicht eine quantitative Bestimmung von zellulären Oberflächenproteinen oder daran bindenden Molekülen zumeist unter Verwendung von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern. Die Durchflusszytometrie-Analysen wurden am FACSAria™ III- und FACSCalibur™-Gerät durchgeführt und unter Verwendung von FACSDiva (BD Bioscience (Heidelberg)) bzw. CellQuest Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

Bei den Messungen wurden ein FITC-markierter anti-IgM-Antikörper (Fluoresceinisothiocyanat; Absorptionsmaximum: 495 nm; Emissionsmaximum: 517 nm) sowie ein APC-markierter anti-CD19-Antikörper (Allophycocyanin; Absorptionsmaximum: 650 nm; Emissionsmaximum: 660 nm) verwendet.

Zur Analyse der IgM-Präsentation auf der Zelloberfläche von transfizierten HEK293-Zellen wurde die Durchflusszytometrie genutzt. Um die Funktionalität des FITC-markierten anti-IgM zu überprüfen, wurde zudem eine Messung der IgM-positiven RAMOS-Zelllinie sowie mit isolierten PBMCs durchgeführt. Die HEK293- und RAMOS-Zellen aus einer 75 cm² Gewebekulturflasche wurden bei 1000 rpm für 5 Minuten und in Kulturmedium resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in Reaktionsgefäße überführt und mit dem primären Antikörper (10ng) eine Stunde im Dunkeln bei 4°C auf dem Taumelroller inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und für drei Minuten bei 50 xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 500 µl PBS resuspendiert und mit einem FITC-markierten anti-IgM-Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert. Nach 1-stündiger Inkubation auf dem Taumelroller bei 4°C wurden ungebundene Antikörper über einen 3-fachen Waschschrift mit 500 µl PBS entfernt. Nach Zentrifugation bei 50 xg für 1 Minute wurde das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen und bis zur Analyse am FACSAria™ III- bzw. FACSCalibur™ auf Eis im Dunkeln aufbewahrt.

3.7.3 Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe des Messverfahrens der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann der hydrodynamische Radius gelöster Biomoleküle bestimmt werden. Darüber hinaus lassen sich Fragen zu Komplexbildung, Stabilität, Aggregation und Konformation von Molekülen beantworten. Die Methode basiert auf der Streuung von eingefallenem Laserlicht durch Partikel. Der Messbereich liegt hierbei zwischen einigen Nanometern

bis zu einigen Mikrometern. Da alle Partikel in Lösung der Brownschen Molekularbewegung unterliegen, diffundieren sie ständig. In Relation zum Detektor kommt es dadurch zu Interferenzen, die sich konstruktiv oder destruktiv auf die Intensität des Streulichts auswirken können. Je schneller die Partikel diffundieren, desto schneller ändert sich die Intensität des Streulichts. Dabei steht die Veränderung in direkter Beziehung zur Größe der Teilchen. Die Bewegung der Partikel wird durch Temperatur, Viskosität und ihren Diffusionskoeffizienten beeinflusst. Vorausgesetzt die Parameter Temperatur und Viskosität sind bekannt und konstant, ist die Veränderung der Lichtstreuintensität unmittelbar vom Diffusionskoeffizienten und damit von der Molekülgröße abhängig. Daraus kann nun der hydrodynamische Radius abgeleitet werden (Some et al., 2013).

Die Vorteile der Methode liegen in der hohen Sensitivität, sodass nur geringe Proteinkonzentrationen benötigt werden und in der einfachen Durchführung. Die Messungen erfolgten am SpektroLight™ 300 und SpektroLight™ 501 (Molecular Dimensions Inc (USA)). Es wurden Proteinproben mit einer Konzentration von 200 ng/ml verwendet und jeweils 30 Messungen zur Bestimmung der hydrodynamischen Radian durchgeführt.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung humaner Antigen-Rezeptoren, denen eine Schlüsselfunktion bei der Entwicklung maligner Tumorerkrankungen bzw. der Allergie zukommt. Dieses Vorhaben umfasste zunächst die rekombinante Darstellung der entsprechenden Rezeptormoleküle in einem für die nachfolgenden Analysen geeignetem und möglichst naturidentischem Format. Nach erfolgreicher Darstellung der gewünschten Antikörpermoleküle boten diese die Möglichkeit über Bindungsanalysen die Liganden sowie Epitop-Strukturen auf der Oberfläche der Antigene zu bestimmen. Weiterhin wurden mithilfe der rekombinanten Rezeptormoleküle Experimente durchgeführt, die Erkenntnisse über die Spezifität, Affinität und sterischen Parameter der Interaktion von Rezeptor-Ligand lieferten.

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Darstellung der verschiedenen Antikörperkonstrukte dargestellt. Danach folgen die Resultate der Interaktionsanalysen mit den Rezeptormolekülen und abschließend die Daten zur Feindefinition des Phl p 5-spezifischen IgE-Epitops.

4.1 Rekombinante Darstellung und Reinigung der Antikörperkonstrukte

Für die Herstellung der rekombinanten Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe mit gängigen Verfahren zunächst die Gesamt-RNA der PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) von Patienten isoliert und diese über reverse Transkription cDNA überführt. Die Antigen-bindenden V_H- und V_L-Regionen wurden unter Verwendung Immunglobulin-spezifischer Oligonukleotide durch PCR amplifiziert und mit den erforderlichen Restriktionsschnittstellen versehen. Anschließend wurden diese bindungsbestimmenden Sequenzen in geeignete Vektorsysteme eingebracht. Dabei wurde ein Expressionsvektor für *Mammalia* zur Transfektion von HEK293-Zellen (*human embryonic kidney*) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen durchführen und daher ein geeignetes System zur humanen Antikörper-Produktion darstellen. Die

Expression heterotetramerer Immunglobuline basiert auf der simultanen Produktion und anschließenden Zusammenlagerung der schweren und leichten Antikörperkette. Für eine rekombinante Expression müssen somit zwei Zielproteine parallel exprimiert und korrekt zusammengelagert werden. Hierfür wurde der Vektor pBudCE4.1 verwendet. Eine schematische Darstellung der Konvertierung membrangebundener B-Zell-Rezeptoren in rekombinante Lymphom-Antikörper einschließlich des zugrundeliegenden Vektors ist in Abb. 4.1 gezeigt.

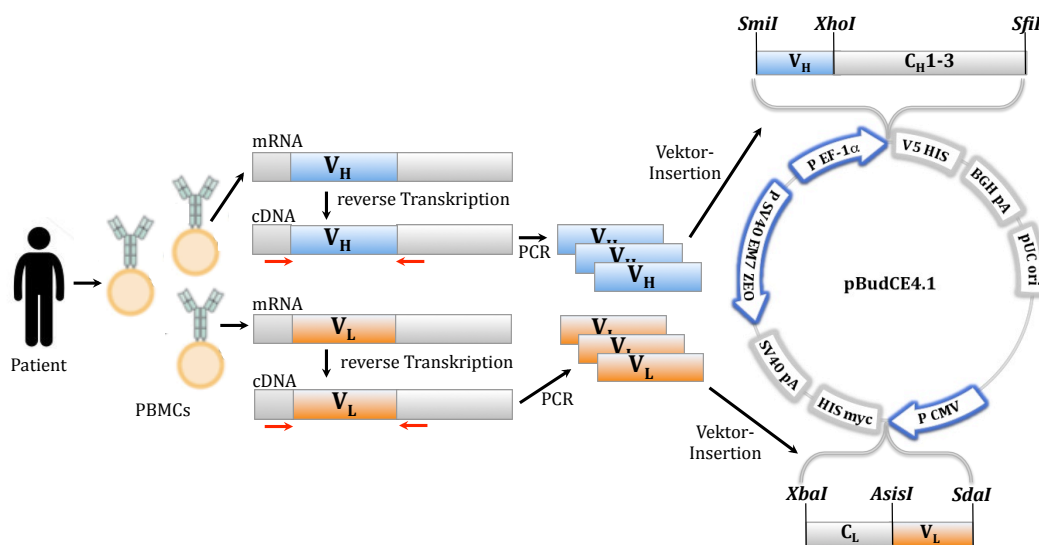


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Konvertierung membrangebundener BZR in rekombinante humane IgG1.

Die Gesamt-RNA wurde aus Lymphom-Zellen gewonnen und über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte mithilfe von Immunglobulin-spezifischen Oligonukleotiden die Amplifikation der V_H - und V_L -Sequenzen unter Einfügen der Restriktionsschnittstellen zur Insertion in den Zielvektor pBUDCE4.1. Nach stabiler Transfektion von HEK293-Zellen konnten die Lymphom-Antikörper als huIgG1-Antikörper aus dem Zellkulturüberstand gereinigt werden.

Die erfolgreiche Insertion der V_H - und V_L -Sequenzen in den Zielvektor wurde durch eine Sequenzierung verifiziert.

4.1.1 Sequenzinformationen der Lymphom-Rezeptoren

Die immungenetische Analyse von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) zeigte eine erstaunliche Übereinstimmung der bindungs-determinierenden B-Zell-Rezeptor-Regionen von Lymphom-Zellen. Nach der Sequenzinformation der variablen Rezeptor-Region werden CLL-Patienten bestimmten Subgruppen zugeordnet

(Stamatopoulos et al., 2007). Dabei konnte insbesondere für die CDR3-Region der schweren Kette ein hohes Maß an Sequenzähnlichkeit innerhalb abgrenzbarer Subgruppen beobachtet werden. Diese Region ist am wesentlichsten an der Epitop-Erkennung beteiligt.

In den beiden folgenden Tab. 4.1 und 4.2 sind die Sequenzdaten der in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren dargestellt. Es handelt sich um die Daten dreier CLL-BZR der Patienten mit der Bezeichnung 014, 024 und 044, eines BZR der immortalisierten humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ca46 und als Modell-Antikörper eines therapeutischen anti-EGFR-Immunglobulins (Matuzumab). Das Epitop des anti-EGFR-Antikörpers ist bekannt und wurde mittels Kokristallisation genau definiert (Schmiedel, Blaukat, Li, Knöchel, & Ferguson, 2008). In Tab. 4.1 und 4.2 sind die Aminosäuresequenzen der CDR3-Region der variablen schweren und leichten Immunglobulinkette sowie der Mutationsstatus der Rezeptoren aufgelistet. Zudem ist die Zugehörigkeit zur CLL-Subgruppe und der Typus der leichten Antikörper-Kette (κ - oder λ -leichte Kette) gezeigt.

Tabelle 4.1: Sequenzdaten der schweren Kette (V_H) der untersuchten rekombinanten Antikörper. Die Einteilung der CLL-BZR in Subgruppen bezieht sich auf die Klassifikation nach Stamatopoulos et al., 2007.

Bezeichnung des Antikörpers	V_H	CDR3-Sequenz	Mutationsstatus	Subgruppe
Ig014	1-2	ARDQWLTLGNYFDY	unmutiert	1
Ig024	3-9	AKGGARWIQLTVRSYYYYGMDV	unmutiert	-
Ig044	1-3	ARDQWLVLGMVFDYW	unmutiert	1
Ca46	-	FNRGGDY	mutiert	-
anti-EGFR	-	RDYDYDGRYFDY	mutiert	-

Tabelle 4.2: Sequenzdaten der leichten Kette (V_L) der untersuchten rekombinanten Antikörper.

Bezeichnung des Antikörpers	V_L	CDR3-Sequenz	Mutationsstatus
Ig014	3-20 κ	QQYGSSPGFT	unmutiert
Ig024	3-20 κ	QQYGRTF	unmutiert
Ig044	1-39 κ	QQYGSRTF	unmutiert
Ca46	κ	MQALQTPHT	mutiert
anti-EGFR	κ	QQWSSSHIFT	mutiert

4.1.2 Darstellung als humane IgG1

Die rekombinanten Lymphom-Antikörper wurden als humanes IgG1 exprimiert, da dieses neben hohen Ausbeuten ein nahezu naturidentisches System darstellt. Dazu erfolgte eine Insertion der V_H- und V_L-Sequenzen in den Vektor pBudCE4.1-huIgG1, in welchem zuvor die Sequenzen der konstanten Region der schweren und leichten Immunglobulinkette von humanem IgG1 eingefügt wurden. Anschließend wurde eine Sequenzierung und Transfektion von HEK293-Zellen mit den überprüften Vektoren durchgeführt. Es erfolgte eine Selektion von Transfektanten mittels Zeocin. Die Antikörper-Expression konnte in einer ELISA-Analyse mithilfe der Kulturüberstände stabiler Transfektanten nachgewiesen werden (s. Abb. 4.2).

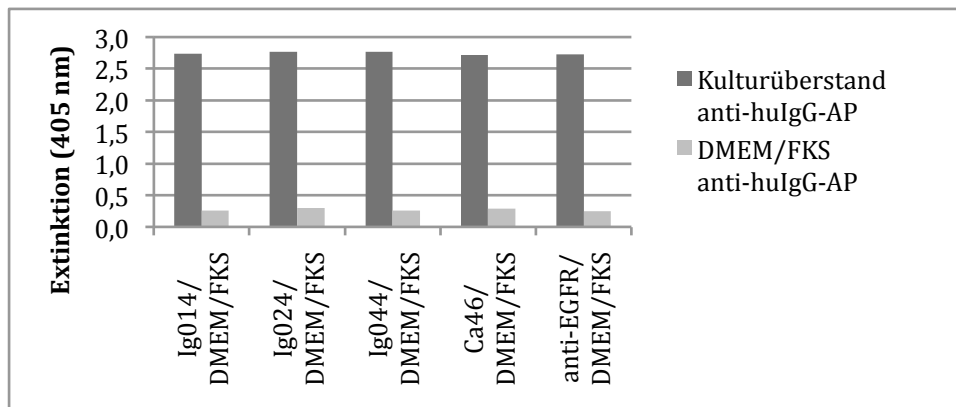


Abb. 4.2: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Expression der Lymphom-Antikörper als huIgG1-Konstrukt.

Die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte wurden über Nacht mit Ig014, Ig024, Ig044, Ca46 und anti-EGFR (jeweils Kulturüberstände) beschichtet. Nach Blockierung mit 10% DMEM/FKS folgte die Inkubation mit anti-huIgG-AP (1:5000) in 10% DMEM/FKS. Die Detektion erfolgte mittels anschließender Zugabe des Substrats pNPP. Die Farbentwicklung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen.

Die erfolgreiche Konvertierung der humanen Lymphom-Rezeptoren in monoklonale Antikörper als geeignete IgG1-Analysemoleküle konnte somit nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Quantifizierung der huIgG1-haltigen Zellkulturüberstände. Dazu wurde, auf dem Prinzip des *Sandwich*-ELISAS beruhend, unter Verwendung eines Antikörper-Quantifizierungskits mithilfe von Isotyp-spezifischen Fänger- und Detektionsantikörpern eine Konzentrations-bestimmung der Lymphom-Antikörper aus den HEK293-Überständen durchgeführt. Diese ergaben die in Tabelle 4.3 aufgeführten Konzentrationen der jeweiligen Antikörper im Zellkulturüberstand.

Tabelle 4.3: Quantifizierung der Antikörper aus Zellkulturüberständen.

Bezeichnung des Antikörpers	Konzentrationsbestimmung [ng/ml]
Ig014	2880
Ig024	1090
Ig044	2100
Ca46	1800
anti-EGFR	950

4.1.2.1 Chromatographische Reinigung der humanen IgG1

Für weitere Analysen wurden höhere Konzentrationen aufgereinigter Immunglobuline benötigt, sodass eine Proteinreinigung aus dem Kulturmedium erfolgte. Da die Antikörper mit einem Hexahistidin-*Tag* versehen waren, wurde zur Reinigung die Metallchelat-Affinitätschromatographie gewählt. Dabei wird eine Interaktion von zweiwertigen Metallionen wie Ni^{2+} -Ionen mit Histidin-reichen Proteinmotiven (*His-Tag*) genutzt, um selektiv Proteine an die Matrix zu binden. Der Imidazolring des Histidins bindet die Ni^{2+} -Ionen, die in Komplexen mit Nitriloessigsäure (NTA) an Agarose gekoppelt vorliegen. Die Elution erfolgt kompetitiv durch die Zugabe von gelöstem Imidazol. Es handelt sich um eine sehr schonende Reinigungsmethode, da die Proteine dabei keinem *pH-Shift* ausgesetzt werden. Bereits während der Klonierung wurden alle Antikörper mithilfe der verwendeten Oligonukleotide mit einem *His-Tag* versehen. In Abb. 4.3 ist exemplarisch das Ergebnis der Reinigung des Ig014-huIgG1 aus Zellkulturüberstand gezeigt. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol. Zuvor erfolgten Waschschrte mit steigender Imidazolkonzentration im Waschpuffer (10 mM, 20 mM, 25 mM Imidazol), um unspezifisch bindendes Protein des Mediums zu entfernen. Die Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie lieferte für das Ig014-huIgG1-Konstrukt mit *His-Tag* gute Ergebnisse und die Elutionsfraktionen zeigten eine deutliche Anreicherung des Zielantikörpers. Diese schonende Reinigungsmethode wurde ebenfalls zur Aufreinigung der anderen Lymphom-Antikörper genutzt. Abb. 4.4 zeigt das Ergebnis der Reinigung der huIgG1-Konstrukte. Es wurde eine Probe der zuvor vereinten und gegen PBS (pH 7,4) dialysierten Elutionsfraktionen aufgetragen und es erfolgte eine SDS-PAGE-Analyse mit nachfolgender Coomassie-Färbung.

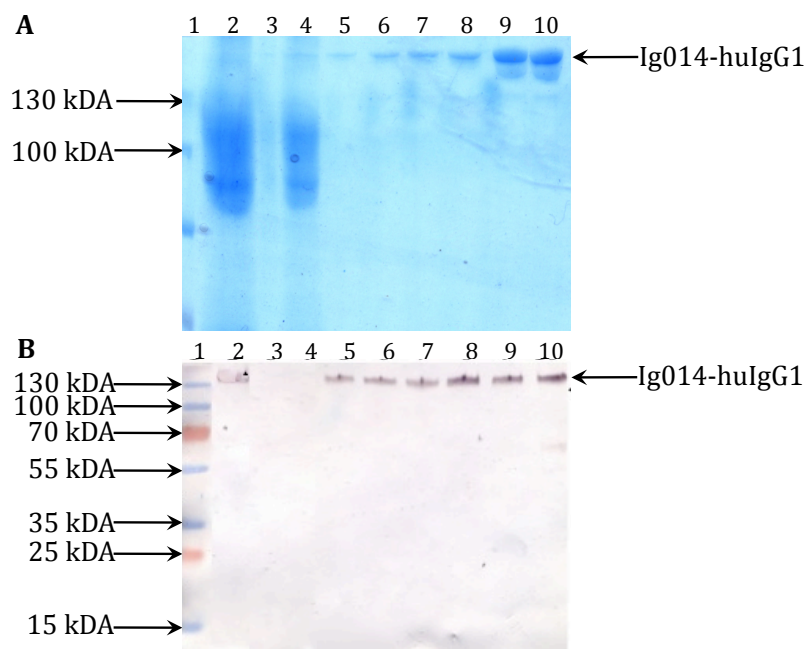


Abb. 4.3: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot der Reinigung von Ig014-huIgG1 aus HEK293-Zellkulturüberstand mithilfe von Ni-NTA-Sepharose.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (7,5%iges Tris-Glycin-PA-Gel). Bahn 1: Marker; Bahn 2: Zellkulturüberstand; Bahn 3: Waschfraktion; Bahn 4: Säulendurchlauf; Bahn 5-10: Elutionsfraktionen 1-6. **A: Coomassie-Färbung. B: Immunoblot.** Zur Detektion wurden anti-huIgG-AP (1:5000) und NBT/X-Phos als Substrat eingesetzt.

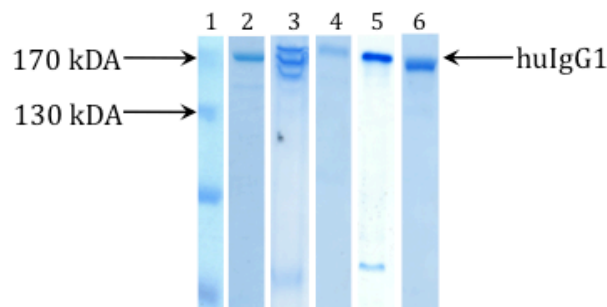


Abb. 4.4: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der Lymphom-Antikörper als huIgG1-Isotyp aus HEK293-Zellkulturüberstand mithilfe von Ni-NTA-Sepharose.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (7,5%iges Tris-Glycin-PA-Gel) und anschließende Coomassie-Färbung. Bahn 1: Marker Bahn 2: Ig014-huIgG1; Bahn 3: Ig024-huIgG1; Bahn 4: Ig044-huIgG1; Bahn 5: Ca46-huIgG1; Bahn 6: anti-EGFR-huIgG1.

Im Wesentlichen zeigten die Immunglobuline ein ihrem Molekulargewicht entsprechendes Laufverhalten und deutete auf eine korrekte Assemblierung der Immunglobulin-Ketten hin. Wie in Abb. 4.4 allerdings zu erkennen ist, zeigte der CLL-Antikörper Ig024-huIgG1 eine Dreifachbande im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel. Diese Dreifachbande war reproduzierbar und konnte durch

Änderung der Expressionsbedingungen nicht geändert werden. Zudem zeigte der Ig024-huIgG1 auch nach Reinigung über Protein A (Fc-spezifisch) sowie eine κ -spezifische Matrix (V_L -spezifisch) weiterhin die Ausbildung dieser Dreifachbande. Eine Fragmentierung des Antikörpers konnte daher weitgehend ausgeschlossen werden. Die Identität der einzelnen Banden des Ig024-huIgG1 blieb zunächst fraglich und sollte mithilfe weiterer Verfahren geklärt werden.

Zusammenfassend verlief die Konvertierung der Lymphom-Antikörper in lösliche Antikörper erfolgreich. Die Kultivierung der exprimierenden HEK293-Zellen sowie anschließende Reinigung des Zellkulturüberstandes zur Gewinnung der Zielmoleküle sind methodisch einfach und in kurzer Zeit durchführbar. Die Ausbeute der gereinigten monoklonalen Antikörper war ausreichend, um nachfolgend weitere Analysen durchzuführen.

4.1.3 Darstellung als humane Fab-Fragmente

Die Domänenstruktur von Antikörpern macht es möglich, gezielt Teilstrukturen des Proteins bei vollständigem Erhalt der natürlichen Konformation zu betrachten. Zur tiefergehenden strukturellen Analyse der Paratop-Region der Antikörper sollte neben dem Vollantikörper, eine Fc-deletierte Variante im Form eines Fab-Fragmentes dargestellt werden. Ein Fab-Fragment setzt sich aus den V_L - und V_H -Domänen sowie den C_L - und C_{H1} -Domänen eines Antikörpers zusammen (Abb. 4.5). Durch die Röntgenstrukturanalyse von Fab-Proteinkristallen erhält man sehr exakte Informationen über die dreidimensionale Anordnung des Proteinmoleküls. Darüber hinaus werden bei einer Kokristallisation von Antikörper-Ligand-Strukturen wertvolle Daten über die genauen Bindungsverhältnisse der beiden Interaktionspartner erhalten.

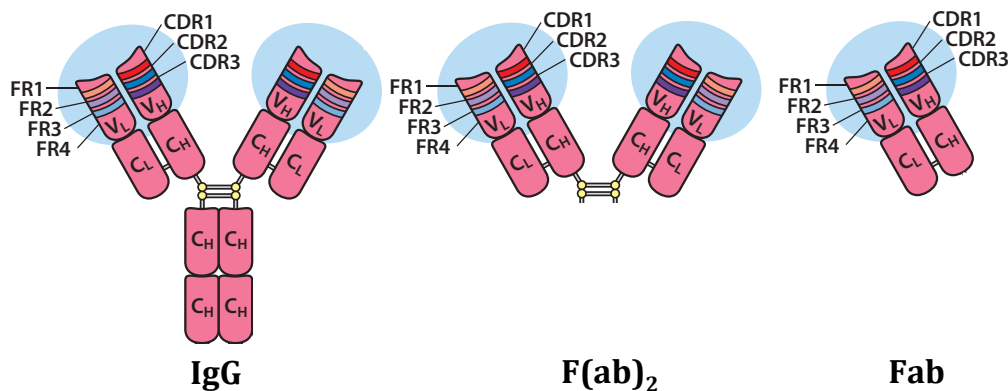


Abb. 4.5: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperformate.

Der IgG-Vollantikörper sowie das bivalente F(ab)₂- und das monovalente Fab-Fragment sind dargestellt. Durch die proteolytische Spaltung mit Papain werden Fab-Fragmente generiert. Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014).

Zur Darstellung der Fab-Fragmente wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt: die Produktion der Antikörperfragmente durch die proteolytische Spaltung von intakten Immunglobulinen sowie die Reklonierung der Voll-huIgG1-Konstrukte in das Fab-Format mit anschließender prokaryotischer bzw. eukaryotischer Expression. Es galt zu ermitteln, welche dieser drei Strategien die zielführendste Methode ist und möglichst hohe Ausbeuten des Zielproteins liefert. Für kristallographische Experimente sind in der Regel sehr hohe Substanzmengen erforderlich. Im Folgenden werden die Resultate der unterschiedlichen Strategien zur Produktion hoher Konzentrationen des Fab-Fragmentes aufgezeigt.

4.1.3.1 Proteolytische Papain-Spaltung intakter Immunglobuline

Nach der erfolgreichen rekombinanten Klonierung der Zielantikörper konnten diese prinzipiell in unbegrenzter Menge nachproduziert werden. Daher bot sich eine proteolytische Spaltung intakter Immunglobuline zur Erzeugung von Fab-Fragmenten an. Die Protease Papain trennt Aminosäure-Verbindungen in der *Hinge*-Region des Antikörpers auf. Durch diese Papain-Spaltung werden monovalente Fab-Fragmente erhalten.

Um die Praktikabilität dieser Papain-Spaltung zur Herstellung hoher Fab-Konzentrationen zu überprüfen, wurde exemplarisch ein Milligramm des Ig014-huIgG

enzymatisch geschnitten. Die Versuchsdurchführung erfolgte leicht modifiziert nach einem Standardprotokoll wie unter 2.5.7 erläutert. Die Spaltungsreaktion wurde direkt auf einer κ -spezifischen Matrix durchgeführt, um die Auftrennung in Fab- und Fc-Fragmente zu unterstützen. Das Ig014-huIgG1-Papain-Gemisch wurde für mindestens 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte um die abgespaltenen Antikörperfragmente zu entfernen und schließlich die Elution des Produktes von der κ -Matrix mithilfe von Glycin-HCL (0.1 M Glycin, pH 3). Die Spaltungsreaktion wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Detektion der Proteinfragmente durch eine Coomassie-Färbung des Gels sowie Immunoblot überprüft. In Abb. 4.6 sind die Ergebnisse der Papain-Spaltung von einem Milligramm Ig014-huIgG1 bei einer Inkubation von 4h bei 37°C und in Abb. 4.7 bei einer Inkubation von 6h bei 37°C dargestellt.

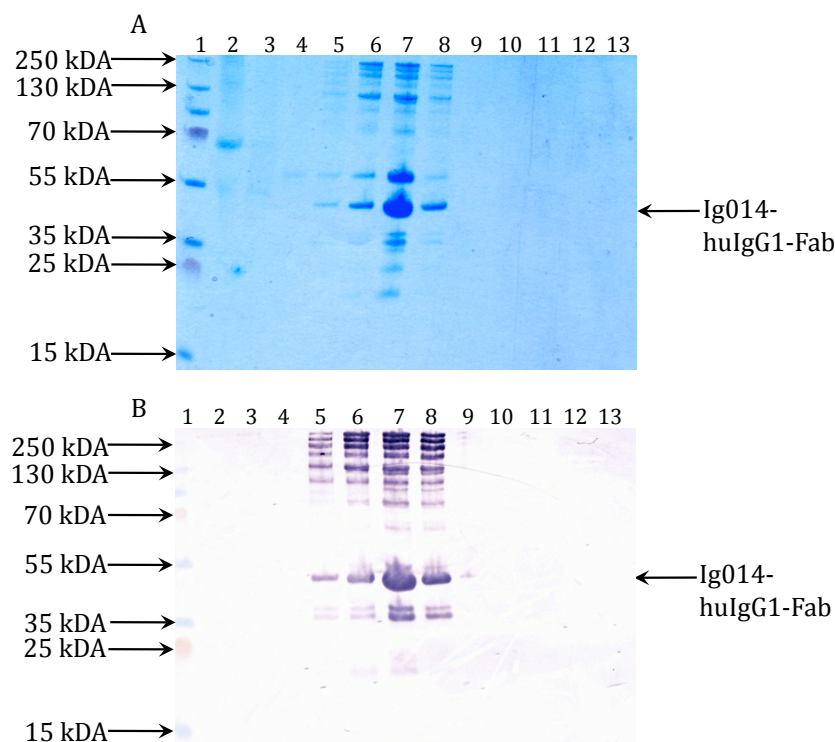


Abb. 4.6: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Fab-Abspaltung von Ig014-huIgG1 (4 h Spaltung).

Die Fab-Abspaltung erfolgte für 4 h bei 37°C. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (7,5%iges Tris-Glycin-PA-Gel). Bahn 1: *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*; Bahn 2: Waschfraktion; Bahn 3 – 13: Elutionsfraktionen 1-11.

A: Coomassie-Färbung.

B: Immunoblot. Zur Detektion wurde der Antikörper anti-huLC-kappa-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

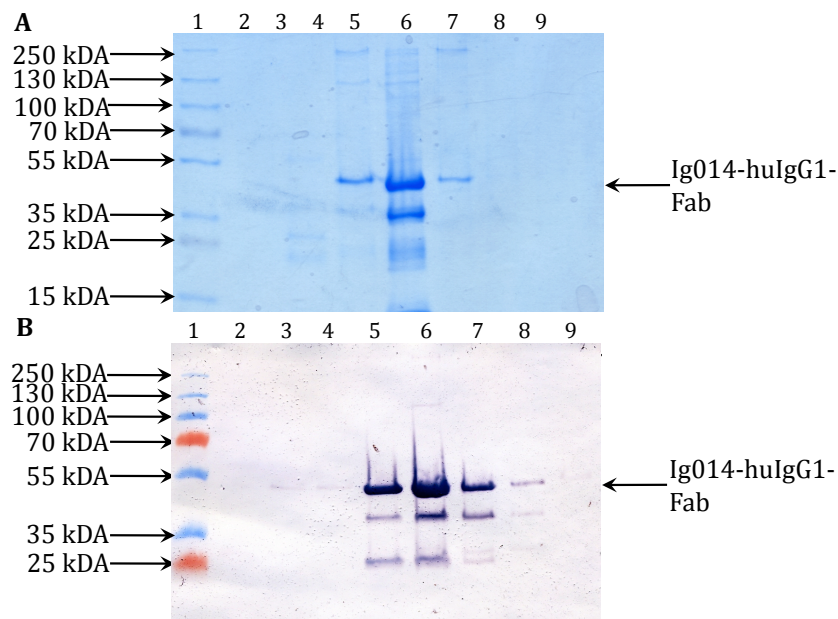


Abb. 4.7: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Fab-Abspaltung von Ig014-huIgG1 (6 h Spaltung).

Die Fab-Abspaltung erfolgte für 6 h bei 37°C. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (7,5%iges Tris-Glycin-PA-Gel). Bahn 1: Marker; Bahn 2: Waschfraktion; Bahn 3 – 9: Elutionsfraktionen 1-7.

A: Coomassie-Färbung.

B: Immunoblot. Zur Detektion wurden der Antikörper anti-huLC-kappa-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass die Elutionsfraktionen neben dem Zielprotein Ig014-huIgG1-Fab weiterhin unterschiedliche Fragmente des Ig014-huIgGs sowie den Volllängen-Antikörper enthielten. Dabei konnte der Anteil an dem Vollantikörper durch eine Verlängerung der Spaltungsreaktion um 2 Stunden deutlich reduziert werden. Um das Fab-Fragment in höherem Reinheitsgrad zu erhalten wurde an die κ -spezifische Reinigung eine Fc-spezifische-Reinigung unter Verwendung von Protein A angeschlossen. Dieses Protein, das ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt, besitzt eine hohe Affinität zur Fc-Region von humanem IgG1. Zur Entfernung der Fc-haltigen Antikörperfragmente wurden zwei aufeinanderfolgende Protein A-Reinigungen durchgeführt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse der Protein A-Reinigung der Ig014-Fab-Proben (Spaltungsreaktion 4 h) sind in Abb. 4.8 dargestellt.

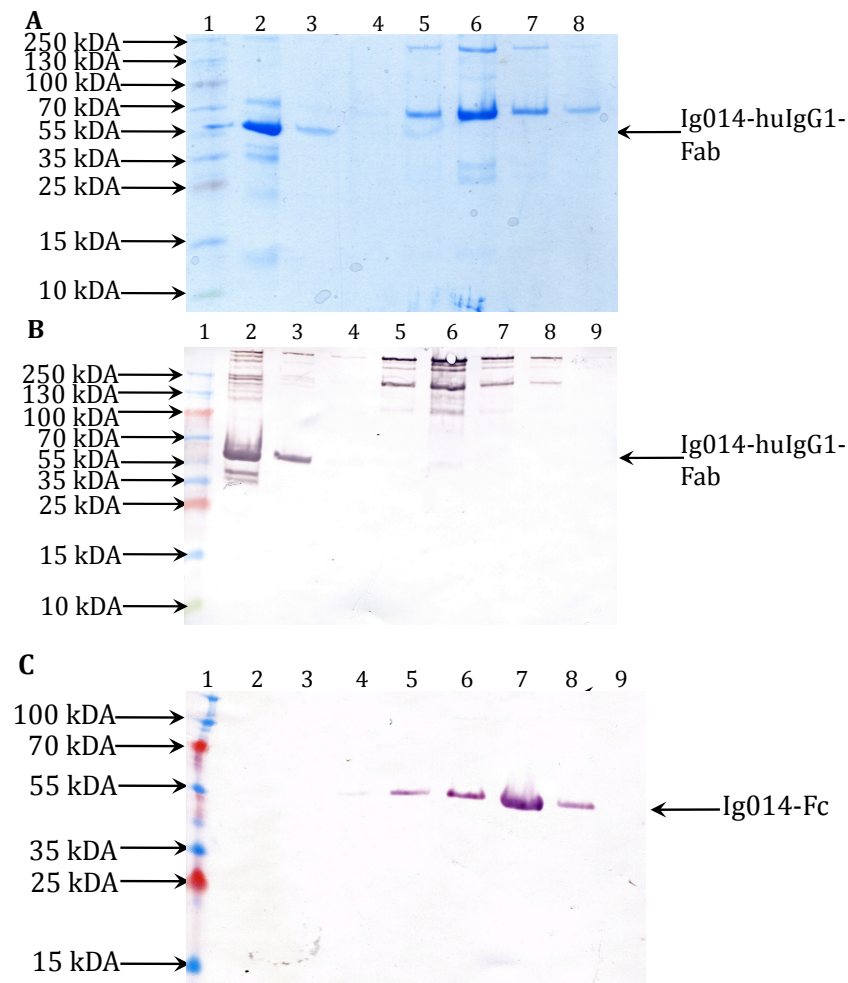


Abb. 4.8: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Fab-Reinigung mittels Protein A.

Protein A-Reinigung der Ig014-Fab-Fragmente der Spaltungsreaktion von 4 h. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (7,5%iges Tris-Glycin-PA-Gel). Bahn 1: Marker; Bahn 2: Fab-Probe vor der Reinigung, Bahn 3: Fab-Probe (Durchlauf), Bahn 4-9: Elutionsfraktionen 1-6.

A: Coomassie-Färbung.

B: Immunoblot. Zur Detektion wurden der Antikörper anti-huLC-kappa-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

C: Immunoblot. Zur Detektion wurden der Antikörper anti-huFc-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Durch die Protein A-Reinigung konnten die Fc-haltigen Antikörperfragmente deutlich reduziert werden. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass die Fab-Fraktion nach der Protein A-Reinigung lediglich in geringer Konzentration unterschiedliche Spaltungsprodukte enthielt. Die Ig014-Fab-haltigen Proben wurden vereint und gegen PBS (pH 7,4) dialysiert. In Abb. 4.9 die SDS-PAGE-Analyse der finalen Probe dargestellt.

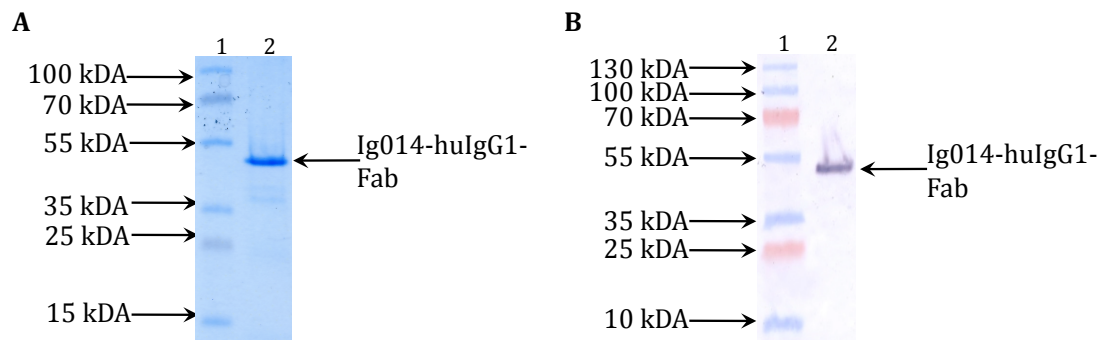


Abb. 4.9: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Fab-Darstellung.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (7,5%iges Tris-Glycin-PA-Gel). Bahn 1: *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*; Bahn 2: Ig014-Fab.

A: Coomassie-Färbung.

B: Immunoblot. Zur Detektion wurde der Antikörper anti-huLC-kappa-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Die erfolgreiche Darstellung des Ig014-Fab-Fragmentes durch die proteolytische Papain-Spaltung konnte gezeigt werden. Allerdings zeigte der Antikörper eine starke Fragmentierung wodurch die Ausbeute an Fab-Protein stark reduziert wurde und zum anderen waren zusätzliche Reinigungsschritte nötig, um diese unspezifischen Fragmente aus der Probe zu entfernen. Um diese Problematik zu umgehen, wurden die Antikörper als Fab-Fragmente kloniert.

4.1.3.1 Prokaryotische Expression der Fab-Fragmente

Generell ist die prokaryotische Expression in *E. coli*-Zellen eine technisch einfache, günstige und häufig zielführende Methode zur Darstellung einfacher Proteinstrukturen. Sie eignet sich hingegen nicht für eine Erzeugung von komplexeren Proteinen, die für ihre Funktion und Struktur posttranslationale Proteinmodifikation benötigen. Inwiefern sich die prokaryotische Expression zur Darstellung der humanen Fab-Proteine eignet, sollte ermittelt werden. Dabei wurde zur Generierung des Fab-Fragmentes auf ein spezielles Fusionsklonierungssystem zurück gegriffen (s. 2.1.13). Bei diesem System waren drei Klonierungsschritte notwendig, um die V_H - und V_L -Sequenzen in den finalen *E. coli*-Expressionsvektor pASG-IBA-44 einzubringen. Eine schematische Darstellung der Expressionskassette des Fab-Fragments ist in Abb. 4.10 gezeigt.

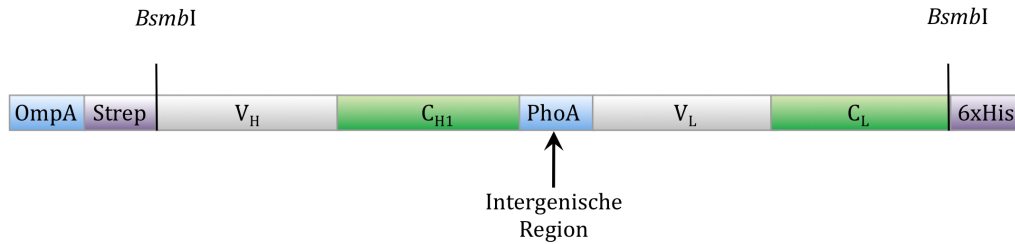


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Expressionskassette des Phl p 5a-spezifischen huIgG1-Fab-Fragmentes im Vektor pASG-IBA-44.

OmpA- und PhoA-Signalsequenzen: blau hinterlegt; Streptavidin-II- und Hexahistidin-Tag: lila hinterlegt; MBP: lila hinterlegt; V_H- und V_L-Domäne: grau hinterlegt; C_{H1}- und C_L-Domänen: grün hinterlegt. Zudem sind die, bei der Klonierung in den Vektor pASG-IBA-44 verwendeten Schnittstellen und die intergenische Region markiert.

Die erfolgreiche Klonierung des Phl p 5a-spezifischen huIgG1-Fab-Konstruktes konnte durch Sequenzierung verifiziert werden. Zur Expression des Phl p 5a-spezifischen huIgG1-Fab-Fragmentes wurden kodonoptimierte BL21-Zellen verwendet. Die Expression des Fab-Fragmentes erfolgte in zwei Expressionsansätzen über Nacht bei 30 °C und 37 °C. Die C-terminale Fusion des His-Tags ermöglichte die Reinigung des Fab-Fragmentes unter Verwendung einer Ni-NTA-Matrix. Der periplasmatische Extrakt sowie der Gesamtzellextrakt der Expressionsansätze wurde präpariert, das Fab-Fragment mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt und die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Abb. 4.11 zeigt repräsentativ für jeden Ansatz zwei Elutionsfraktionen.

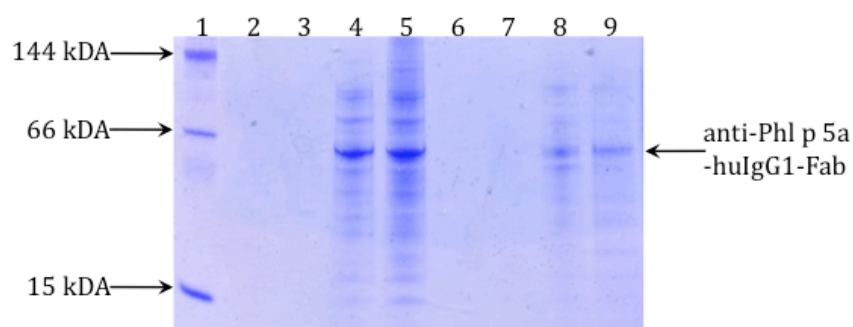


Abb. 4.11: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung des Phl p 5a-spezifischen huIgG1-Fab-Fragmentes aus dem periplasmatischen und Gesamtzellextrakt.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel) und anschließende Coomassie-Färbung. Bahn 1: Marker; Bahn 2-3: Elutionsfraktionen, periplasmatischer Extrakt, Expression bei 30 °C; Bahn 4-5: Elutionsfraktionen, Gesamtzellextrakt, Expression bei 30 °C; Bahn 6-7: Elutionsfraktionen, periplasmatischer Extrakt, Expression bei 37 °C; Bahn 8-9: Elutionsfraktionen, Gesamtzellextrakt, Expression bei 37 °C.

Die erfolgreiche Expression des Phl p 5a-spezifischen huIgG1-Fab-Fragmentes konnte mittels SDS-PAGE-Analyse nachgewiesen werden. Es wurden Banden der erwarteten Laufhöhe von etwa 52 kDa in den Fraktionen der Reinigung des Gesamtzellextraktes detektiert. Die Elutionsfraktionen wiesen allerdings eine hohe Verunreinigung mit unspezifisch gebundenem Protein auf. In den Proteinfractionen des periplasmatischen Extraktes konnte keine Anreicherung des Phl p 5a-spezifischen huIgG1-Fab-Fragmentes beobachtet werden. Zur Überprüfung der Reaktivität des anti-Phl p 5a-huIgG1-Fab-Konstruktes mit MBP-Phl p 5a wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Elutionsfraktionen vereint und gegen PBS (pH 7,4) dialysiert. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern *goat*-anti-huIgG und anti-*goat*-IgG-AP (Abb. 4.12).

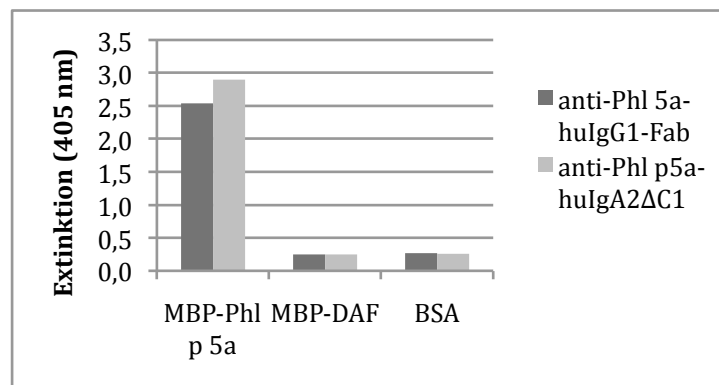


Abb. 4.12: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Reaktivität des Phl p 5a-spezifischen huIgG1-Fab-Fragmentes.

Nach Beschichtung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit MBP-Phl p 5a sowie als Negativkontrolle mit MBP-DAF und Blockierung mit 4% BSA folgte eine Inkubation mit anti-Phl p 5a-huIgG1-Fab sowie als Positivkontrolle mit anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ (5 µg/ml). Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-huIgG (1:2000) und anti-*goat*-AP-Konjugat in 4% BSA und pNPP als Substrat bei 405 nm.

Die ELISA-Analyse bestätigte die erfolgreiche Darstellung des Fab-Fragmentes und darüber hinaus die Reaktivität mit dem spezifischen Antigen. Dies zeigt die generelle Durchführbarkeit einer prokaryotischen Expression von funktionellen humanen Fab-Fragmenten. Es handelt sich folglich um ein vielversprechendes Verfahren zur Erzeugung von Fab-Molekülen, das allerdings einer weiteren Optimierung hinsichtlich der Ausbeute bedarf.

4.1.3.2 Eukaryotische Expression der Fab-Fragmente

Als dritte Strategie wurde die Expression in eukaryotischen Zellen gewählt, da dieses System der natürlichen Antikörper-Produktion am meisten ähnelt und daher womöglich die besten Expressionsraten liefert. In der Literatur wurde insbesondere von einer hohen Fab-Ausbeute bei der Verwendung von Insektenzellen berichtet (Furuta, Ogawa, Katsuda, Fujii, & Yamaji, 2010; Furuta, Ogawa, & Yamaji, 2012). Hierbei handelt es sich um ein viral-basiertes System, wodurch die hohe Syntheserate begründet sein könnte. Es wurde eine Expression des Zielmoleküls in Sf9-Zellen, einer immortalisierten Zelllinie aus den Ovarzellen der Mottenart *Spodoptera frugiperda*, durchgeführt. Sf9-Zellen werden effizient mit Baculoviren infiziert werden.

Zur Klonierung des Fab-Fragmentes wurde der Vektor *pFastBac™ Dual Expression Vector* verwendet. Dieser Vektor verfügt über zwei starke Promotoren für eine hohe Expression der beiden Fab-Proteinketten. Zur Expression des Ig014-huFabs wurden die zuvor kultivierten Sf9-Suspensionszellen mit dem virushaltigen Zellstock versetzt. Es wurde ein Expressionsvolumen von 3000 ml gewählt. Nach 72 Stunden Inkubation bei 27°C im Schüttler wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und das Gesamtvolumen der Expression mittels *Cross-Flow-Filtration* auf 600 ml reduziert. Anschließend wurde die Reinigung des Ig014-Fab-Fragmentes mittels Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die gereinigten Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE-Analyse überprüft, wobei jede zweite Fraktion aufgetragen wurde. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 4.13 dargestellt.

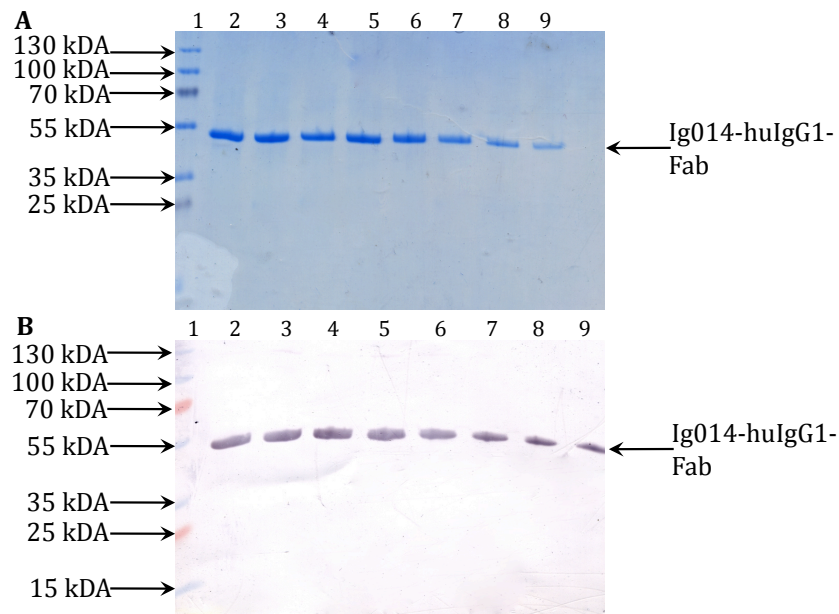


Abb. 4.13: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Fab-Expression in Sf9-Zellen.

Ni-NTA-Reinigung der Ig014-Fab-Fragmente aus einem 3000 ml Expressionsvolumen. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (7,5%iges Tris-Glycin-PA-Gel). Bahn 1: Marker; Bahn 2-9: exemplarisch aufgetragene Elutionsfraktionen.

A: Coomassie-Färbung.

B: Immunoblot. Zur Detektion wurden der Antikörper anti-huLC-kappa-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Es zeigte sich eine erstaunlich hohe Expression des Ig014-Fab-Fragmentes. Zudem wiesen die gereinigten Fraktionen bereits nach einer Einschritt-Reinigung ein hohes Maß an Reinheit auf. Die Ig014-Fab-Bande ist bei der erwarteten Fragmentgröße von ca. 52 kDa deutlich zu erkennen. Die gereinigten Fraktionen wurden vereint und einer Konzentrationsbestimmung unterzogen. Durch die Insektenzellexpression und nachfolgende Affinitätschromatographische Reinigung konnten etwa 12 mg Ig014-Fab bei einem Expressionsvolumen von 3000 ml erfolgreich dargestellt werden.

Zur Überprüfung der Reaktivität des Ig014-huFabs wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt. Dazu wurde das Antigen, ein spezifisch selektiertes Ig014-Mimotop, auf der Polysytroloberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Ig014-huFab und nach mehreren Waschschritten die Detektion gebundener Fab-Fragmente mittels *goat*-anti-huIgG und anti-*goat*-AP-Konjugat.

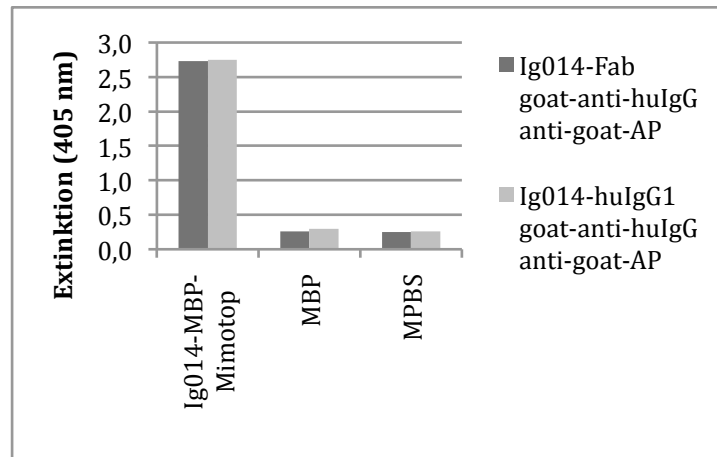


Abb. 4.14: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Reaktivität des Ig014-huIgG1-Fab-Fragmentes.

Nach Beschichtung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit Ig014-MBP-Mimotop (100 µg/ml) sowie als Negativkontrolle mit Ig024-MBP-Mimotop und Blockierung mit 4% BSA folgte eine Inkubation mit Ig014-huIgG1-Fab sowie als Positivkontrolle mit Ig014-huIgG1 (5 µg/ml). Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-huIgG (1:2000) und anti-goat-AP-Konjugat in 4% BSA und pNPP als Substrat bei 405 nm.

Die ELISA-Analyse zeigte, dass eine Reaktivität des Ig014-huIgG1-Fabs nachgewiesen werden konnte. Auf diese Weise wurde erstmalig gezeigt, dass die Expression in Sf9-Zellen ein höchst attraktives Verfahren zur Darstellung funktionaler humaner Rezeptoren ist. Weiterhin stellte sich die Strategie als optimal zur Darstellung der Fab-Fragmente heraus: die Ausbeute an Zielprotein war hoch, die Expressionszeit mit 72 h kurz und die nachfolgenden Reinigungsschritte waren methodisch einfach. Bei der Expression in Sf9-Zellen genügte bereits eine Einschnitt-Reinigung über eine Ni-NTA-Matrix, um hohe Konzentrationen reiner Proteinlösungen zu gewinnen. Zudem wurde die Funktionalität durch die ELISA-Analyse klar bestätigt. Da das zugrundeliegende Vektorkonstrukt nun vorlag, konnte nachfolgend mit einfachen Klonierungsschritten eine Konvertierung der weiteren Lymphom-Antikörper in das Fab-Format erfolgen. Dies wurde durchgeführt und vergleichbare Resultate erzielt. Die Fab-Proteine werden derzeit u.a. Kristallisationsprozessen unterzogen (s. S. 112, Abschnitt 4.2.5.).

4.1.4 Darstellung als membrangebundene IgM

Für Interaktionsanalysen von B-Zell-Rezeptoren sind neben den zugrundeliegenden Strukturen und Wechselwirkungen vor allem auch die Effekte der Interaktion in der

Zelle interessant. Um intrazelluläre Prozesse mittels Durchflusszytometrie durch Calcium-Flussmessungen studieren zu können, wurde die huIgG1-Antikörperkette des Expressionsvektors pBudCE4.1 in den Isotyp IgM konvertiert. Eine schematische Darstellung des membrangebundenen IgM sowie der kodierende Expressionsvektor ist in Abb. 4. 15 illustriert.

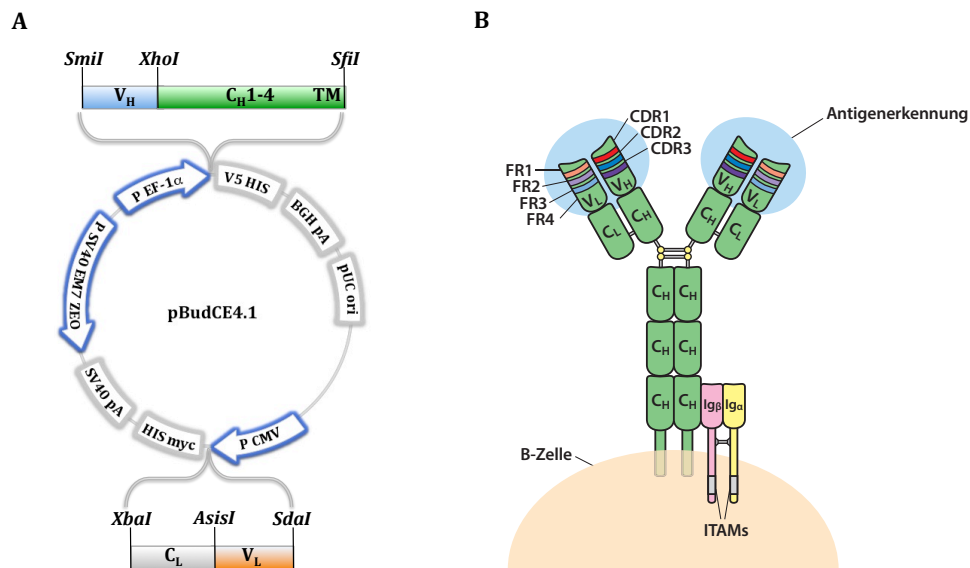


Abb. 4.15: Schematische Darstellung der Reklonierung von IgM.

A: Der Expressionsvektor pBudCE4.1 zur Produktion des IgM ist dargestellt. Die IgM-Sequenz mit Sequenz für die Transmembrandomäne (TM) wurde insertiert.

B: Schematische Darstellung des membranverankerten IgM auf der Oberfläche einer B-Zelle.

Zur Generierung der IgM-Sequenz mit Transmembrandomäne wurde eine reverse Transkription humaner RNA aus peripheren Lymphozyten mit IgM-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Das Amplifikat der PCR mit Schnittstellen-einfügenden Oligonukleotiden wurde in den Zielvektor Ig014-huIgG1-pBudCE4.1 insertiert. Anschließend wurde mit dem so entstandenen Vektor Ig014-huIgM-pBudCE4.1 eine Sequenzierung durchgeführt und so die erfolgreiche Klonierung verifiziert. Mit diesem Vektorkonstrukt erfolgte eine Transfektion von HEK293-Zellen.

Zur Analyse der transfizierten HEK293-Zellen wurde eine FACS-Analyse (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) durchgeführt. Dafür erfolgte zunächst eine Testmessung zur Überprüfung der Funktionalität der Detektionsantikörper. Es wurden humane PBMCs aus dem Vollblut isoliert und anschließend in Einzel- und

Doppelfärbungen sowohl der membrangebundene IgM als auch der B-Zell-Marker CD19 mit spezifischen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert. Dabei wurden als Negativkontrolle jeweils die ungefärbten Zellen analysiert. Die Ergebnisse der FACS-Analyse der isolierten PBMCs sind in Abb. 4.16 gezeigt.

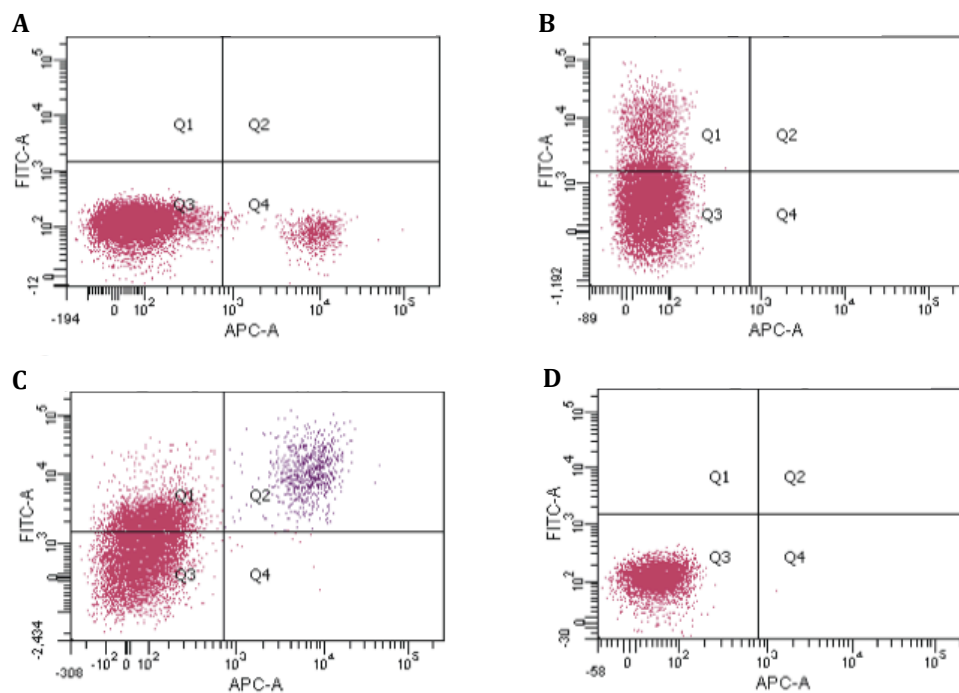


Abb. 4.16: Analyse IgM-exprimierender B-Zellen humaner PBMCs aus dem Vollblut.

Analyse der PBMCs aus dem Vollblut mithilfe einer Durchflusszytometrie. Die Messung erfolgte mittels des Gerätes *FACSaria™ III*.

A: Einzelfärbung der PBMCs mithilfe von *mouse anti-huCD19-IgG1-APC*.

B: Einzelfärbung der PBMCs mithilfe von *goat anti-IgM-IgG1-FITC*.

C: Doppelfärbung der PBMCs mithilfe von *mouse anti-huCD19-IgG1-APC* und *goat anti-IgM-IgG1-FITC*.

D: Negativkontrolle mit ungefärbten PBMCs.

In der Abb. 4.16 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse der isolierten PBMCs aus dem Vollblut gezeigt. Im Quadranten Q3 sind jeweils die ungefärbten Zellen zu sehen, welche also weder IgM- noch CD19-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Im Quadranten Q4 sind die APC-markierten CD19-positiven und im Quadranten Q1 die FITC-gefärbten IgM-positiven Zellen zu erkennen. Im Quadranten Q2 sind die doppelt positiven IgM⁺CD19⁺-B-Zellen der PBMCs dargestellt. Der Anteil CD19-positiver Zellen betrug 7% der Gesamt-PBMCs. Dieser Wert stimmt mit den Literaturdaten von 7-23% gut überein (Reichert *et al.*, 1991). Nachdem die Funktionalität der gewählten Detektionsantikörper bestätigt wurde, erfolgte eine Analyse sowie *Cell-Sorting* der IgM-

transfizierten HEK293-Zellen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 4.17 dargestellt.

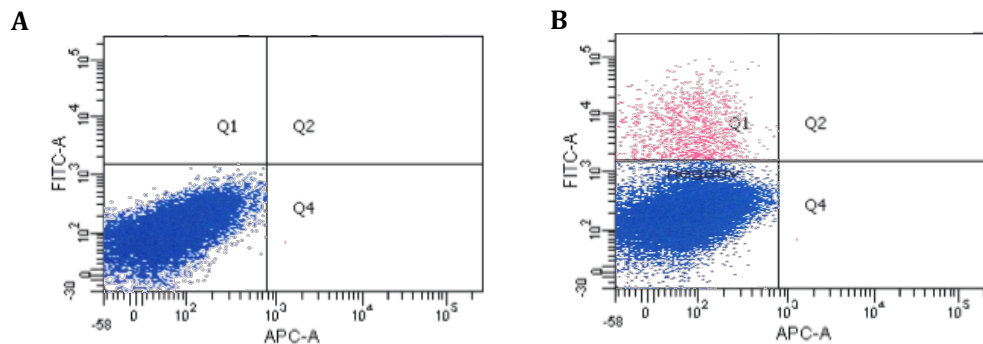


Abb. 4.17: Analyse IgM-exprimierender HEK293-Zellen.

Analyse der stabilen transfizierten HEK-293-Zellen mithilfe einer Durchflusszytometrie. Die Messung erfolgte mittels des Gerätes *FACSAria™ III*.

A: HEK293-Zellen ungefärbt.

B: Einzelfärbung der PBMCs mithilfe von *goat anti-IgM-IgG1-FITC*.

Mithilfe der FACS-Analyse konnten IgM-positive HEK293-Zellen identifiziert werden. Diese Zellen wurden mithilfe der *Cell-Sorting*-Funktion des *FACSAria™ III*-Gerätes unter sterilen Bedingungen isoliert und anschließend kultiviert. Abschließend erfolgte eine FACS-Analyse dieser Zellen unter Verwendung des *FACSCalibur™*-Gerätes. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 4.18 gezeigt. Im Vergleich zur Positivkontrolle, den IgM-präsentierenden RAMOS-Zellen (Burkitt Lymphom-Zellen), in Abb. 4.18, konnte für die isolierten und transfizierten HEK293-Zellen lediglich ein sehr basales positives Signal gemessen werden (Abb.4.18). Die isolierten schienen IgM nicht auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Eine Erklärung hierfür könnte der Vorgang der Zellsortierung sein, da hier starke Kräfte auf die Zellen einwirken, die möglicherweise die Vitalität der Zellen beeinflussen. Zudem sollte eine Kotransfektion mit der assoziierten Ig α /Ig β -Domäne erfolgen, um die IgM-Verankerung in der Membran zu fördern.

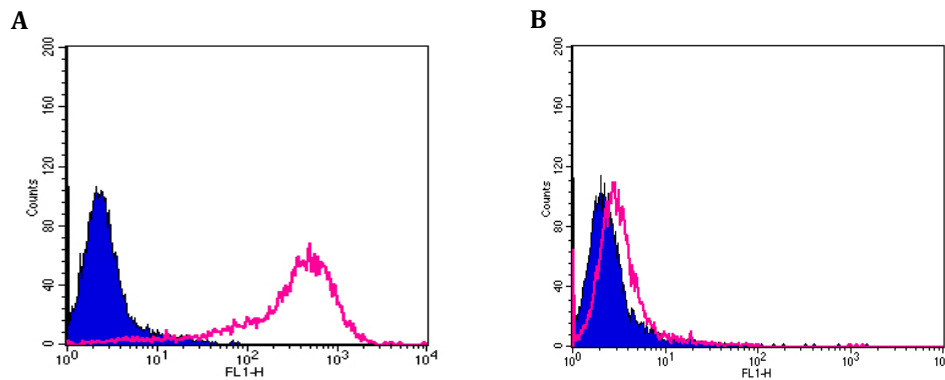


Abb. 4.18: Analyse isolierter IgM-expressierender HEK293-Zellen.

Die isolierten und weiterkultivierten IgM-positiven HEK293-Zellen wurden mithilfe einer Durchflusszytometrie analysiert. Die Färbung wurde mithilfe von *goat* anti-IgM-IgG1-FITC durchgeführt. Die Messung erfolgte mittels des Gerätes *FACSCalibur™*.

A: IgM-positive RAMOS-Zelllinie als Kontrolle.

B: HEK293-Zellen.

4.1.5 Generierung von Affinitätsmatrices zur spezifischen Reinigung

Für die Untersuchung von Protein-Kristallen mittels Röntgenbeugung sind Einkristalle hoher Qualität und Reinheit erforderlich. Zur Reinigung von Zielproteinen wird häufig eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (*immobilized metallion affinity chromatography*, IMAC) durchgeführt. Dabei wird eine Interaktion von zweiwertigen Metallionen wie Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} oder Cu^{2+} mit künstlich angefügten Histidin-reichen Proteinmotiven genutzt, um selektiv Proteine an die Matrix zu binden. Zur Bindung an immobilisierte Metallionen tragen allerdings alle in Polypeptiden vorhandenen Elektronendonoren bei; insbesondere die Seitenkette von Histidin, aber auch andere basische und saure Aminosäuren wie Arginin, Aspartat und Glutamat, sowie die Phosphatgruppe an der Seitenkette phosphorylierter Aminosäuren. Die Selektivität der IMAC ist daher in Bezug auf die gewünschte Reinheit des rekombinanten Antikörpers problematisch. Zur Illustration dieser Problematik sind in Abb. 4.19 die Ergebnisse der Reinigung von Ig024-huIgG1 mittels IMAC dargestellt. Die C-terminale Fusion eines Tetrahistidin-Tags ermöglichte die Reinigung des Antikörpers aus Zellkulturüberstand mit Hilfe einer Ni-NTA-Matrix. Die Elution des Antikörpers erfolgte durch einen Imidazol-Gradienten. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung sowie im Immunoblot überprüft. Die Detektion wurde dabei mit anti-huIgG-AP durchgeführt.

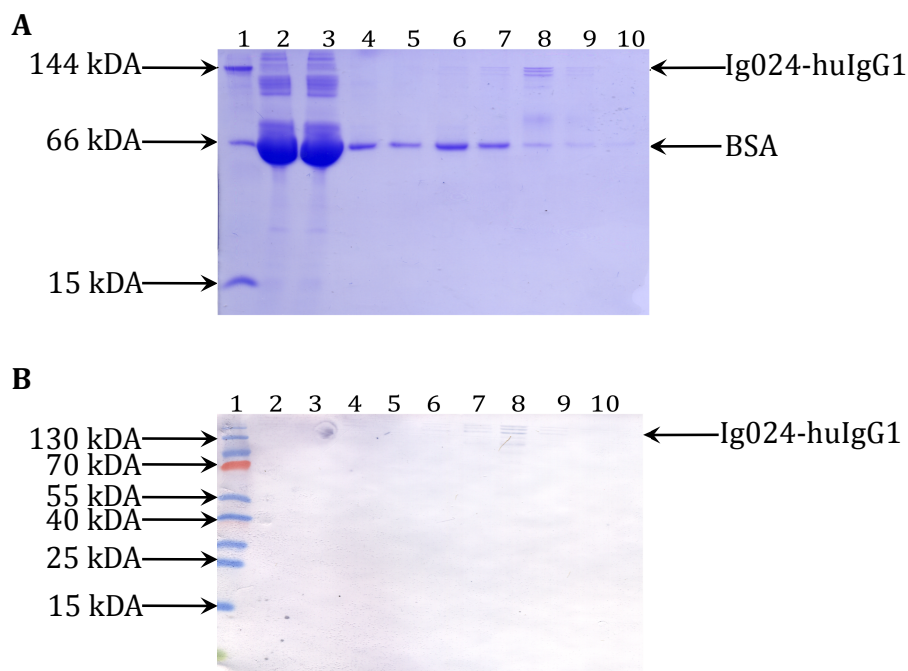


Abb. 4.19: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Reinigung von Ig024-huIgG1.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel). Bahn 1: Marker; Bahn 2: Gesamtzelllysate, löslich; Bahn 3: Durchlauf; Bahn 4: Waschfraktion; Bahn 5: Elution mit 15 mM Imidazol, Bahn 6: Elution mit 20 mM Imidazol, Bahn 7: Elution mit 25 mM Imidazol, Bahn 8-10: Elution mit 250 mM Imidazol.

A: Coomassie-Färbung.

B: Immunoblot. Zur Detektion wurden anti-huIgG-AP (1:5000) und NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass die Elutionsfraktionen mit BSA verunreinigt waren.

Ein primäres Ziel meiner Arbeit war die Darstellung hoher Mengen der Protein-Interaktionspartner für eine Röntgenstrukturanalyse. Um den dafür benötigten hohen Reinheitsgrad der Zielproteine gewährleisten zu können, sollte eine geeignete Reinigungsstrategie etabliert werden. Hierbei wurde die hochspezifische Antigen-Antikörper-Bindung für eine Immuno-Affinitätschromatographie der Zielproteine genutzt. Bei diesem Trennverfahren werden Antigen oder Antikörper an einer geeigneten Matrix immobilisiert und zur Reinigung des komplementären Bindungspartners genutzt.

Zur Etablierung der Methode wurde exemplarisch eine Reinigung eines Antikörpers (anti-Phl p 5-IgE) sowie eines Antigens (sEGFR) angestrebt.

Zur Immobilisierung der Interaktionspartner anti-EGFR-scFv bzw. Phl p 5a wurde die hohe Affinität der Chitin-Bindedomäne (CBD) zu Chitin genutzt. Dazu wurden die

Zielsequenzen in den *E. coli*-Expressionsvektor pTXB1 inseriert und auf diese Weise mit einem Intein und zwei Chitin-Bindedomänen fusioniert. Es erfolgte die Immobilisierung der Fusionsproteine CBD-CBD-Intein-anti-EGFR-scFv und CBD-CBD-Intein-Phl p 5a an eine Chitin-Matrix. Anschließend wurde die pH-Stabilität der Chitin-Bindung überprüft. Dazu wurde der Elutionspuffer mit einem pH-Wert von zwei über die Säule gegeben. Mithilfe einer SDS-PAGE-Analyse und nachfolgender Coomassie-Färbung konnte eine pH-stabile Bindung der CBD-CBD-Fusionsproteine an die Chitin-Matrix nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Reinigung der Zielproteine aus Zellkulturüberständen. Die lösliche Spleißvariante des EGFRs wird von der epidermalen Karzinomzelllinie A431 exprimiert. Um zu ermitteln, bei welchem pH-Wert eine Dissoziation des zu reinigenden Proteins erreicht wird, erfolgte die Elution unter sukzessiver Zugabe des Elutionspuffers mit einem pH-Gradienten von pH 5 bis pH 2. Die Elutionsfraktionen wurden anhand einer SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung sowie im Immunoblot analysiert (Abb. 4.20 und 4.21).

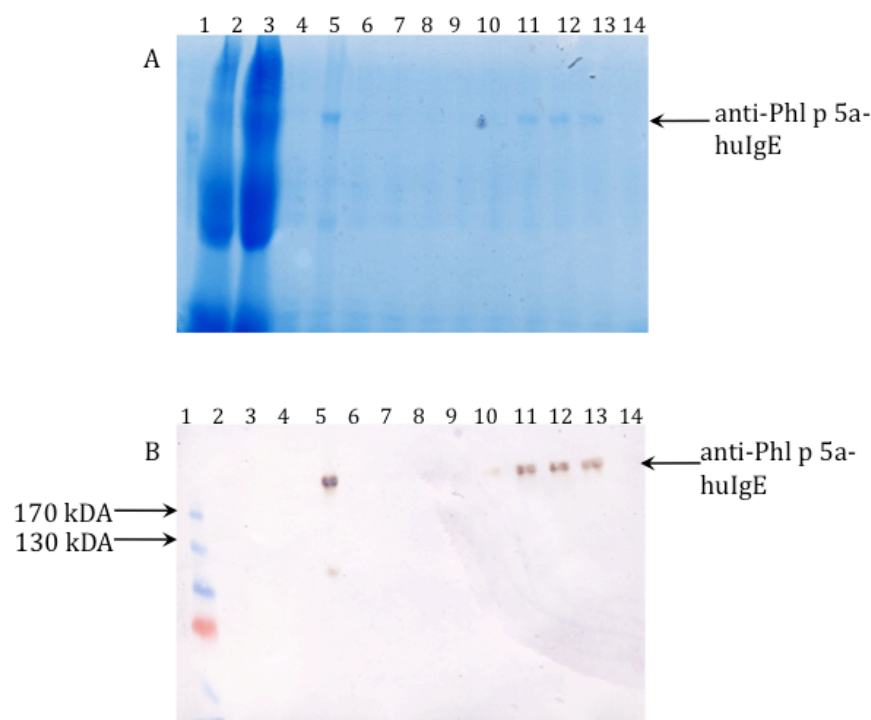


Abb. 4.20: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Reinigung von anti-Phl p 5a-huIgE.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel). Bahn 1: Marker; Bahn 2: Gesamtzelllysate, löslich; Bahn 3: Durchlauf; Bahn 4: Waschfraktion; Bahn 5: Chitin-Matrix vor Elution, Bahn 6-7: Elution bei pH 5,0; Bahn 8: Elution bei pH 4,5; Bahn 9-10: Elution bei pH 4,0; Bahn 11: Elution bei pH 3,5; Bahn 12: Elution bei pH 2,5; Bahn 13: Elution bei pH 2; Bahn 14: Chitin-Matrix nach der Elution. **A: Coomassie-Färbung.** **B: Immunoblot.** Zur Detektion wurden anti-huIgE-AP-Konjugat (1:2000) und NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

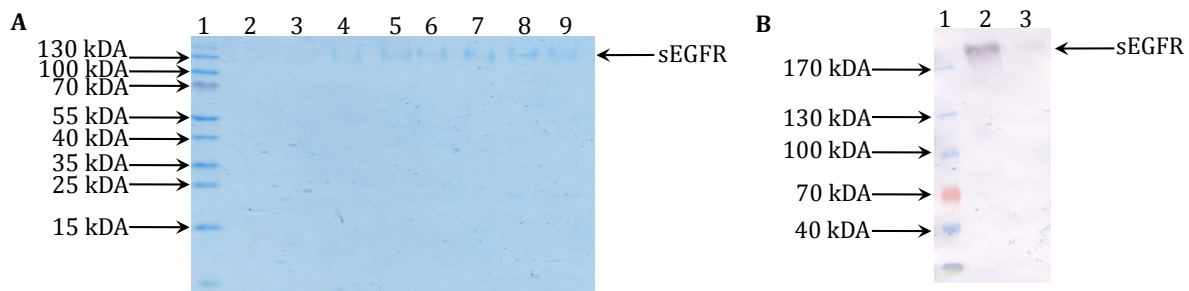


Abb. 4.21: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Reinigung von sEGFR.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel).

A: Coomassie-Färbung. Bahn 1: Marker; Bahn 2: Elution bei pH 4,0; Bahn 3: Elution bei pH 3,0; Bahn 4-9: Elution bei pH 2,5.

B: Immunoblot. Bahn 1: Marker; Bahn 2: vereinte sEGFR-Probe unverdünnt; Bahn 3: vereinte sEGFR-Probe 1:10 verdünnt. Zur Detektion wurden anti-EGFR-huIgG und anti-huIgG-AP-Konjugat (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Die erfolgreiche Reinigung von sEGFR sowie anti-Phl p 5a-huIgE konnte mittels SDS-PAGE-Analyse und im Immunoblot nachgewiesen werden. Die Elution des Antikörpers erfolgte bei einem pH-Wert von 3,5. Für das Antigen sEGFR wurde eine Elution bei einem pH-Wert von 2,5 ermittelt. Zur Neutralisation der Elutionsfraktionen wurde Tris-Puffer (1 M; pH 7,5) in den Auffanggefäßen vorgelegt. Die unscharfe Abgrenzung der sEGFR-Banden ist auf die intensive Rezeptor-Glykosylierung zurückzuführen. Zur Überprüfung der Reaktivität der gereinigten Zielmoleküle wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt (Abb. 4.22).

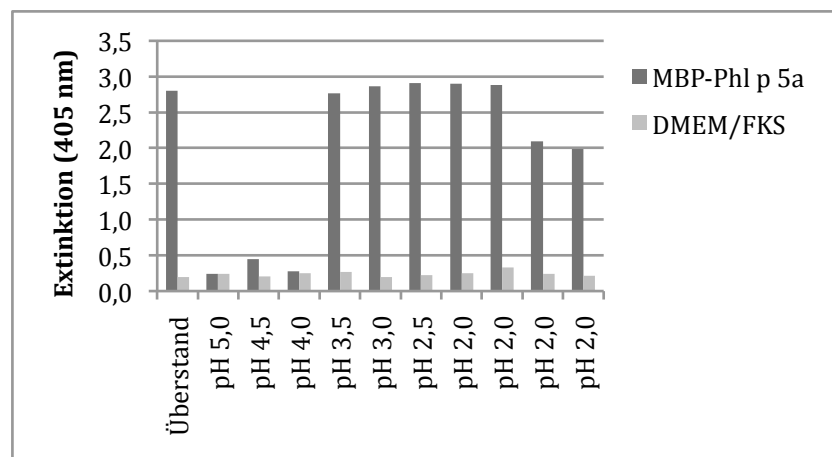


Abb. 4.22: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Reaktivität von anti-Phl p 5a-huIgE nach der Reinigung.

Nach Beschichtung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit MBP-Phl p 5a und Blockierung mit 10%DMEM/FKS folgte eine Inkubation mit den 10 Elutionsfraktionen der Reinigung von anti-Phl p 5a-huIgE. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-huIgE-AP-Konjugat (1:2000) in 10% DMEM/FKS und pNPP als Substrat bei 405 nm.

Die Ergebnisse in Abb. 4.22 zeigen, dass der Phl p 5-spezifische IgE Reaktivität mit seinem Antigen aufwies; analoge Ergebnisse wurden für das Antigen sEGFR erhalten

(Daten nicht gezeigt). Die gereinigten Fraktionen wurden vereint und gegen PBS (pH 7,4) dialysiert und standen für weitere Analysen zur Verfügung. Zusammenfassend handelt es sich bei der hier dargestellten Strategie um eine elegante und effiziente Methode zur Darstellung von Affinitätsmatrices, die gute Reinigungs-Ergebnisse liefern. Ist folglich das Antigen bekannt, kann mit diesem Verfahren eine hochspezifische Alternative zu den gängigen Reinigungsverfahren ausgeschöpft werden.

4.2 Interaktionsanalysen der Antikörperkonstrukte

4.2.1 Selektion und Analyse von Mimotopen

Nach erfolgreicher Darstellung und Reinigung der Lymphom-Antikörper konnten diese für weitere Untersuchungen verwendet werden. Eine zielführende Methode zur Identifikation von Epitopen ist die Selektion von Phagen-Peptid-Bibliotheken (Huang, He, & Zhou, 2014). Auf diese Weise werden Mimotope identifiziert. Hierbei handelt es sich um Peptidsequenzen, welche die Konformation des Epitops imitieren und dadurch einen Rückschluss auf das natürliche Epitop des untersuchten Antikörpers zulassen. Bei der *Phage Display*-Methode wird ein Peptid in Fusion mit einem Kapsidprotein des Bakteriophagen exprimiert. Dieses fusionierte Peptid wird folglich auf der Oberfläche des Phagens präsentiert und ist für Antikörper-Interaktionen gut zugänglich (s. Abb. 4.23). Die DNA, die für das Fusionspeptid kodiert, bleibt als Teil des viralen Genoms im Innern des Virions. Bei der *Phage Display*-Methode handelt sich um eine elegante Methode bei welcher der Phänotyp des Bakteriophagen mit dem Genotyp verknüpft ist. Die Sequenzierung selektierter Phagen ermöglicht die Identifizierung der bindenden Peptidsequenz.

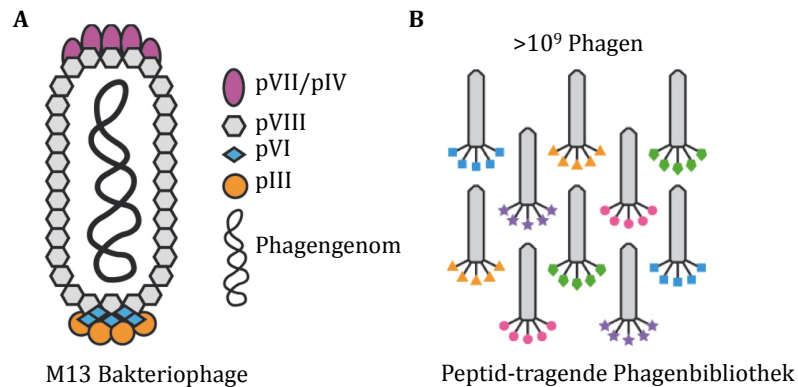


Abb. 4.23: Schematische Darstellung des M13 Bakteriophagen und der Phagenbibliothek.

A: Aufbau des M13 Bakteriophagen.

B: Durch die Fusion des pIII-Phagenhüllproteins mit Peptidsequenzen werden diese auf der Oberfläche des Bakteriophagen präsentiert und sind für Interaktionen zugänglich. Die Diversität der verwendeten Phagen-Peptid-Bibliothek betrug mehr als 10^9 Phagenklone. Die Abbildung wurde verändert nach Krapf (2014).

Die in dieser Arbeit verwendete Phagen-Peptid-Bank *Ph.D.TM 12 Phage Display Peptide Library* bestand aus einem Phagenkollektiv, welches auf seiner Oberfläche Peptide mit randomisierter 12er-Aminosäuresequenz exprimierte. Die Ausgangsbibliothek umfasste mehr als 10^9 verschiedene Phagenklone. Mit dieser Phagen-Peptid-Bibliothek wurde eine *in vitro*-Selektion gegen die immobilisierten Lymphom-Antikörper durchgeführt. Dabei wurden die Antikörper in einer Konzentration von 100 µg/ml auf der Polystyroloberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Es folgte eine Inkubation mit den Peptid-tragenden Phagen. Anschließend wurden nicht-gebundene Phagen durch stringente Waschschritte entfernt und spezifische Binder durch pH-Erniedrigung eluiert. Die eluierten Phagen wurden in Wirtsbakterien amplifiziert. Auf diese Weise werden die bindenden Phagen nach jeder Selektionsrunde angereichert und können einer erneuten Selektion unterzogen werden. Bei der Durchführung der Phagen-Selektion wurden die besten Resultate durch drei Positiv-Selektionsrunden auf dem Zielantikörper sowie einer Negativ-Selektionsrunde auf einer Isotyp-Kontrolle erhalten. Für die Negativkontrolle wurde poly-human IgG eingesetzt (Intratec®).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Mimotop-Selektion unter Verwendung des Ig014-huIgG1 dargestellt. Eine erfolgreiche Anreicherung spezifischer Peptid-Phagen konnte mittels eines polyklonalen Phagen-ELISA gezeigt werden. Die Ergebnisse in Abb. 4.24 zeigten einen deutlichen Anstieg Ig014-huIgG1-bindender Phagen bis zur finalen vierten Selektionsrunde. Anschließend wurden einzelne Phagenklone der vierten

Selektionsrunde isoliert, amplifiziert und mittels einer ELISA-Analyse auf ihre Ig014-huIgG1-Spezifität überprüft. In Abb. 4.25 sind die Daten der Analyse 20 monoklonaler Phagen der Ig014-huIgG1-Peptid-Selektion dargestellt.

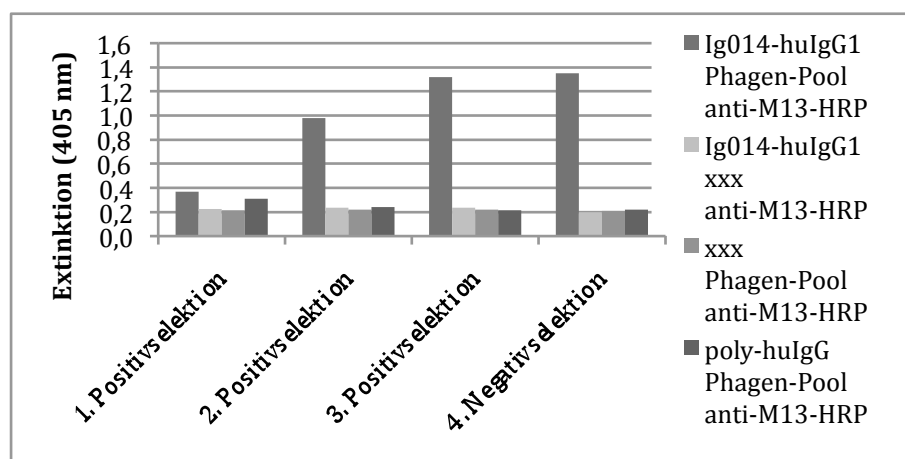


Abb. 4.24: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung polyklonaler Phagen der Ph.D.TM 12 Phage Display Peptid Library nach Selektion gegen Ig014-huIgG1.

Die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte wurden über Nacht mit Ig014-huIgG1 (100 µg/ml; blau und rot markiert) sowie als Negativkontrolle mit Intratect® (poly-human-IgG 100 µg/ml; violett markiert) bzw. Blockierungspuffer (0,1 M NaHCO (pH 8,6), 5 mg/ml BSA ; grün markiert) beschichtet. Nach Blockierung mit 0,1 M NaHCO (pH 8,6), 5 mg/ml BSA folgte die Inkubation mit den unterschiedlichen Phagen-Pools der Selektionsrunden 1.-4. in Tween-TBS. Die Detektion erfolgte mittels anti-M13-HRP (1:5000), ABTS und Wasserstoffperoxid als Substratlösung. Eine Kontrolle ohne Phagen-Pool (rot markiert) wurde ebenfalls mitbearbeitet. Die Farbentwicklung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen.

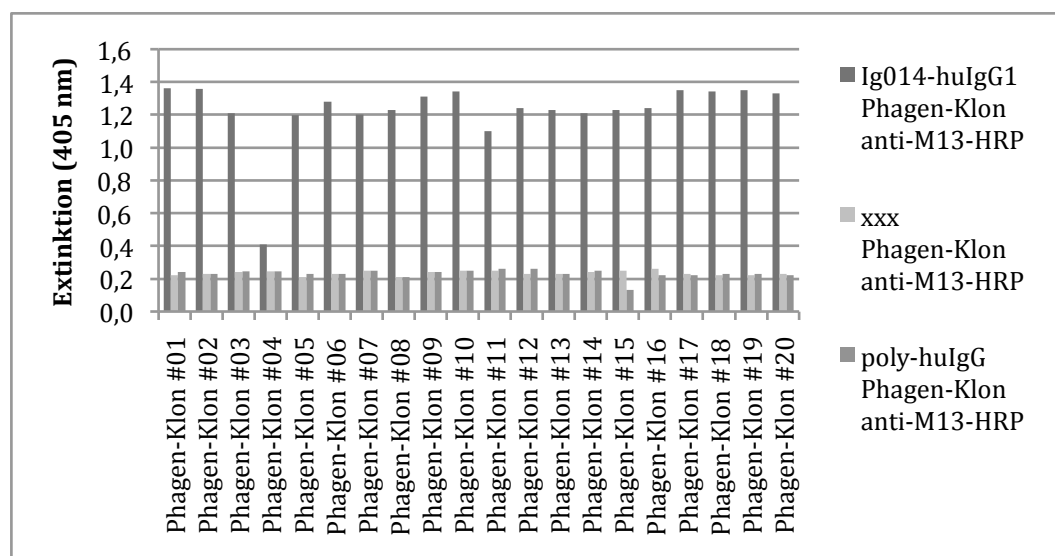


Abb. 4.25: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung monoklonaler Phagen der Ph.D.TM 12 Phage Display Peptid Library nach Selektion gegen Ig014-huIgG1.

Die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte wurden über Nacht mit Ig014-huIgG1 (50 µg/ml; blau markiert) sowie als Negativkontrolle mit Intratect® (poly-human-IgG 50 µg/ml; grün markiert) bzw. Blockierungspuffer (0,1 M NaHCO (pH 8,6), 5 mg/ml BSA ; rot markiert) beschichtet. Nach Blockierung mit 0,1 M NaHCO (pH 8,6), 5 mg/ml BSA folgte die Inkubation mit den monoklonalen Phagen-Klonen #01-20 in Tween-TBS. Die Detektion erfolgte mittels anti-M13-HRP (1:5000), ABTS und Wasserstoffperoxid als Substratlösung. Die Farbentwicklung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen.

Die Daten in Abb. 4.25 zeigen, dass 19 der 20 untersuchten Phagen-Klone ein positives Reaktivitätssignal mit dem Zielprotein Ig014-huIgG1 zeigten. Die Ig014-huIgG1-reaktiven Phagen-Klone wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Tabelle 4.4 zeigt die erhaltenen 12er-Peptid-Sequenzen der sequenzierten Phagen-Klone.

Tabelle 4.4: Aminosäuresequenzen der selektierten 12er-Peptide mit Spezifität für Ig014-huIgG1.
Aminosäuren, die in allen Phagen-Klonen identisch sind, wurden gelb hinterlegt; saure Aminosäuren sind rot und basische Aminosäuren sind blau markiert.

Anzahl der Phagen-Klone	Aminosäuresequenz
6	DGRYRVD ^{DR} QH
3	SGRYRVD ^{DR} QH
4	DWRSRVD ^{DR} QH
3	DWSSWVY RD PQT
3	DWSSGVY RD PQS
Konsensussequenz	DGRSRVD ^{DR} QH

Das Sequenzalignment der erhaltenen Aminosäuresequenz-Daten zeigte einen hohen Grad an Übereinstimmung für definierte Aminosäurepositionen. Es wurde eine Datenbankanalyse mithilfe von BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) durchgeführt, um mögliche natürliche Liganden zu identifizieren. Auf diese Weise konnte ein Sequenzmotiv ermittelt werden, das eine exakte Übereinstimmung zu einer Sequenz der β -Kette des T-Zell-Rezeptors (Sequenz: DRDRQH) aufweist. Für den Ig014-huIgG1 wurde bereits eine Interaktion mit Vimentin, einem Typ-3-Intermediärfilament, gezeigt (Binder et al., 2010). Es konnte allerdings keine Sequenzübereinstimmung der identifizierten Peptidsequenz zu Vimentin gefunden werden.

In analoger Weise wurde eine Peptidselektion für den Ig024-, Ca46- und anti-EGFR-huIgG1 durchgeführt (Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Trepel). Dabei konnte für den Ig024-huIgG1 die Konsensuspeptidsequenz YLPWW identifiziert werden, die eine exakte Sequenzübereinstimmung zu dem GLP-2-Rezeptor (*Glucagon-like peptide 2 receptor*) aufweist. Für Ca46-huIgG1 wurde die Mimotop-Sequenz AKYNPWLTPLL und für anti-EGFR-huIgG1 die Aminosäuresequenz WLDYSTSPRINR ermittelt. Für die beiden letztgenannten selektierten Aminosäuresequenzen ergab die Datenbankanalyse allerdings keine hohe und eindeutige Sequenzübereinstimmung. Die Interaktion des anti-EGFR-Antikörpers mit seinem Liganden EGFR wurde bereits detailliert untersucht. Durch die Kokristallisation des Fab-Fragmentes mit der

extrazellulären Domäne III von EGFR konnten die Aminosäuren bestimmt werden, die entscheidend für die Antikörper-Ligand-Wechselwirkung sind (Schmiedel, Blaukat, Li, Knöchel, & Ferguson, 2008). Dabei wurden insbesondere vier Schlüsselaminosäuren des EGFR-Moleküls für diese Interaktion benannt: WKKLFG**TS**GQ**K**T. Vergleicht man diese Sequenz mit der erhaltenen Peptidsequenz erkennt man eine hohe Übereinstimmung in den drei dieser Schlüsselaminosäuren. Lediglich eine positiv geladene Aminosäure am N-terminalen Ende der Sequenz fehlt (WLDY**S**TSPRIN**R**).

4.2.2 Darstellung der Mimotope

Nach erfolgreicher Identifizierung unterschiedlicher Mimotope für die Lymphom-Antikörper wurden die ermittelten Liganden zum einen als MBP-Fusionsprotein sowie als freies Peptid über eine Festphasensynthese dargestellt. Mithilfe dieser Liganden sollte die Interaktion zu den Immunglobulinen verifiziert und darüber hinaus unter Anwendung verschiedener Methoden wie beispielsweise einer SPR-Analyse charakterisiert werden.

4.2.2.1 Prokaryotische Expression der Mimotope

Die identifizierten Mimotopsequenzen der Lymphom-Antikörper und des anti-EGFR-Antikörpers wurden als MBP-Fusionsproteine dargestellt. Die Abb. 4.26 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse mit nachfolgender Coomassie-Färbung sowie die Ergebnisse der verschiedenen Immunoblots unter Verwendung der Lymphom-Antikörper bzw. des anti-EGFR-huIgG1.

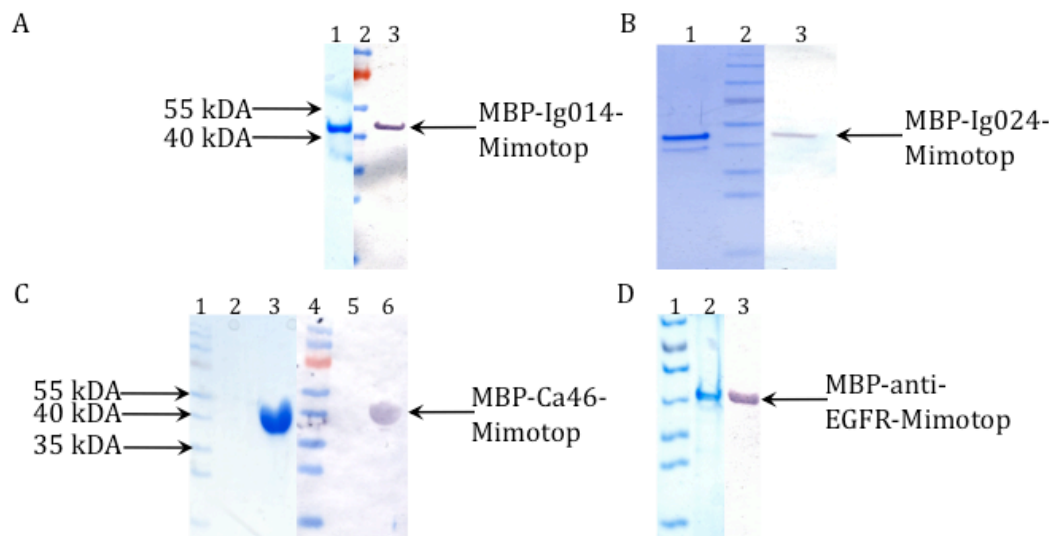


Abb. 4.26: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot der Reinigung der MBP-Mimotope zur Überprüfung der Reaktivität mit den Lymphom-Antikörpern.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel) und anschließende Coomassie-Färbung bzw. Immunoblot.

A: Bahn 1: **Coomassie-Färbung:** MBP-Ig014-Mimotops; Bahn 2: Marker;

Immunoblot: MBP-Ig014-Mimotops.

B: Bahn 1: **Coomassie-Färbung:** MBP-Ig024-Mimotops; Bahn 2: Marker;

Immunoblot: MBP-Ig024-Mimotops.

C: Bahn 1: **Coomassie-Färbung:** MBP-Ca46-Mimotops; Bahn 2: Marker;

Immunoblot: MBP-Ca46-Mimotops.

D: Bahn 1: **Coomassie-Färbung:** MBP-anti-EGFR-Mimotops; Bahn 2: Marker;

Immunoblot: MBP-anti-EGFR-Mimotops.

Mithilfe der Immunoblot-Analyse konnte eine deutliche Reaktivität der MBP-Fusionsproteine mit den jeweiligen Lymphom-Antikörpern bzw. dem Kontroll-Antikörper anti-EGFR-huIgG1 nachgewiesen werden. Nachfolgend wurden die MBP-Zielpoteine für weitere Interaktionsanalysen mit den entsprechenden Immunglobulinen in größerem Maßstab in *E. coli* exprimiert.

Für die Immunglobuline Ig014- und Ig044-huIgG1 wurde bereits eine Interaktion mit dem Typ 3-Intermediärfilament Vimentin nachgewiesen (Binder et al., 2010). Um dies zu überprüfen wurden die periplasmatischen Extrakte von humanen Fibroblasten gewonnen und mittels Immunoblot überprüft. In Abb. 4.27 sind die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse und nachfolgendem Immunoblot mittels Ig014-huIgG1 dargestellt.

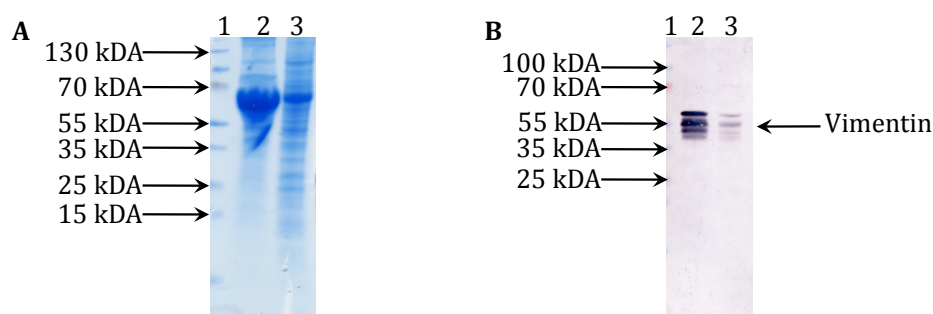


Abb. 4.27: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Reaktivität von Ig014-huIgG1 mit Vimentin.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel). Bahn 1: Marker; Bahn 2: Proteinextrakt humaner Fibroblasten unverdünnt; Bahn 3: Proteinextrakt humaner Fibroblasten 1/10 verdünnt.

A: Coomassie-Färbung.

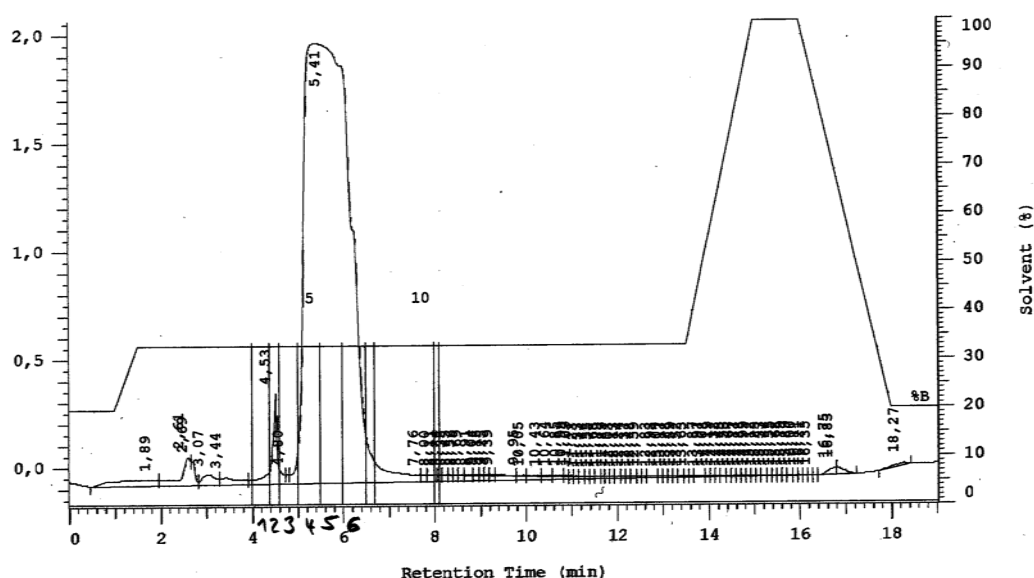
B: Immunoblot. Zur Detektion wurden Ig014-huIgG1 und anti-huIgG-AP-Konjugat (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Die Ergebnisse in Abb. 4.27 verifizierten die Interaktion des Ig014-huIgG1 mit dem Zytoskelett-Protein Vimentin. Die Identität des Vimentins wurde parallel mit einem anti-Vimentin-Antikörper überprüft und analoge Ergebnisse wurden bei Verwendung des Ig044-huIgG1s erhalten (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für weitere Interaktionsanalysen ebenfalls das Volllängen-Vimentin sowie verkürzte Fragmente des Proteins als MBP-Fusionsprotein dargestellt.

4.2.2.2 Chemische Synthese der Mimotope

Um deutlich höhere Ausbeuten der identifizierten Mimotope im Vergleich zur rekombinanten Expression zu erhalten, wurde weiterhin eine Festphasensynthesen der Peptidmoleküle durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwei Varianten des Peptides synthetisiert: das unmodifizierte Peptid sowie eine biotinylierte Variante.

Die identifizierten Mimotope wurden automatisiert durch eine Fmoc-basierte Festphasensynthese mithilfe des mikrowellenunterstützten *LibertyTM Peptide Synthesizers* dargestellt. Als Trägermolekül für die zu synthetisierenden Peptide fungierte das Fmoc-Rink-Amid-Harz. Dieses Polystyrolharz war mit einem Linker funktionalisiert, der die Abspaltung der Peptide unter sauren Bedingungen C-terminal als Carbonsäureamid ermöglichte. Der N-Terminus der synthetisierten Peptide lag als Amin vor. Die verwendeten Fmoc-Aminosäuren wurden seitenkettengeschützt eingesetzt. Diese Seitenkettenschutzgruppen wurden so gewählt, dass sie gleichzeitig



Zur finalen Reinigung des hergestellten Ca46-Peptides wurde ein flacher Gradient genutzt. Die peptidhaltige Lösung wurde in einzelnen Fraktionen aufgefangen und analysiert.

Die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe von Fraktionssammlern aufgefangen und einer Analyse mittels MALDI-TOF-MS unterzogen. Dafür wurde 0,5 µl der Matrixlösung 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) auf den Probenträger aufgetragen und im Luftstrom kristallisiert. Anschließend wurden 0,5 µl der zu untersuchenden Probe mit einer Konzentration von etwa 10 pmol/µl aufgetragen und erneut im Luftstrom kristallisiert. Nach Einbringung des Probenträgers in das Bruker Biflex III-Spektrometer erfolgte zunächst eine Kalibrierung mit einem Standardsubstanzgemisch (ES-TOF Tuning Mix) und anschließend die Messung bei einer Attenuierung von 25 bis 35 mit 50 bis 250 Laserpulsen. Die Signale der Matrixmoleküle im Bereich $m/z < 800$ wurden unterdrückt.

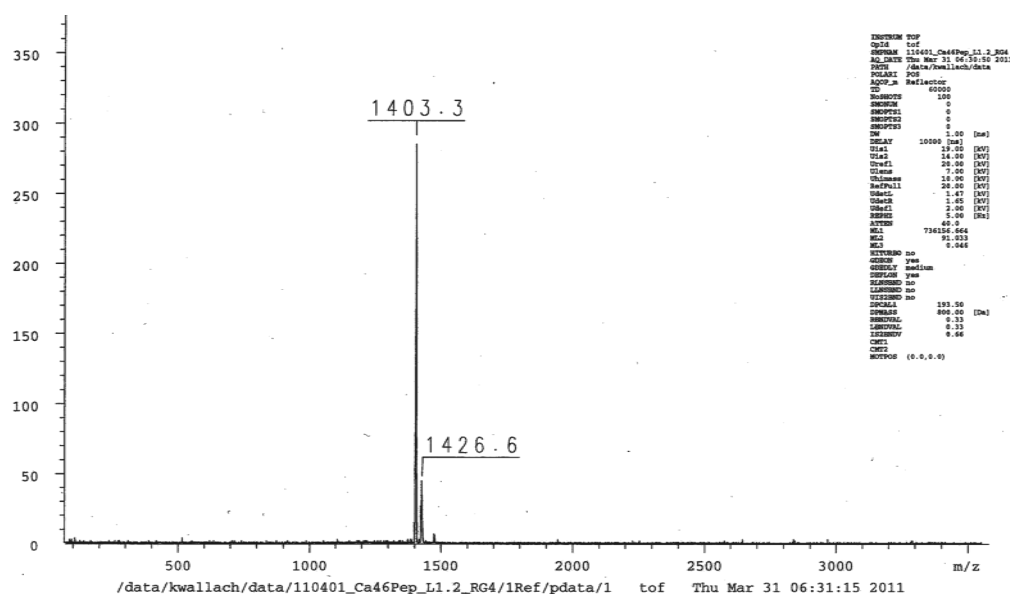


Abb. 4.29: MALDI-TOF-MS-Spektrum einer produkthaltigen HPLC-Fraktion.
Massesignal des Ca46-Peptides: 1403.3.

Das detektierte Massesignal von 1403.3 stimmt mit der berechneten molekularen Masse des Ca46-Mimotops von 1402.6 sehr gut überein. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereint, das Acetonitril unter vermindertem Druck destillativ entfernt und die Produkte gefriergetrocknet. Zeigten die synthetisierten Peptide noch keine zufriedenstellende Reinheit, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels HPLC mit verändertem Gradienten durchgeführt.

Ein Teil des peptidbeladenen Harzes wurde vor der Abspaltung mit dem Reagenz EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin nach den Angaben des Herstellers N-terminal biotinyliert. Die erhaltenen Konjugate wurden mittels ELISA-Analyse überprüft (Abb. 4.30 und 4.31). Die Detektion erfolgte dabei mit dem entsprechenden Lymphom-Antikörper und anti-IgG-AP sowie ExtrAvidin-HRP und nachfolgender Substratumsetzung.

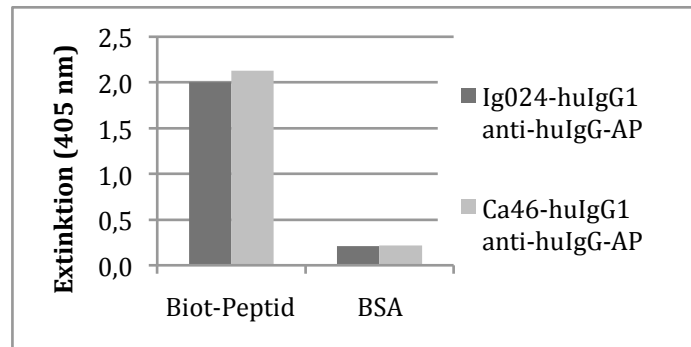


Abb. 4.30: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Reaktivität von Ca46- und Ig024-huIgG1 sowie der Biotinylierung der synthetisierten Peptide.

Nach Beschichtung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit Streptavidin und Blockierung mit 4% BSA folgte eine Inkubation mit dem biotinylierten Peptid. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit Ig024-huIgG1 bzw. Ca46-huIgG1 (5 µg/ml) und anti-huIgG-AP (1:5000) in 4% BSA und pNPP als Substrat bei 405 nm.

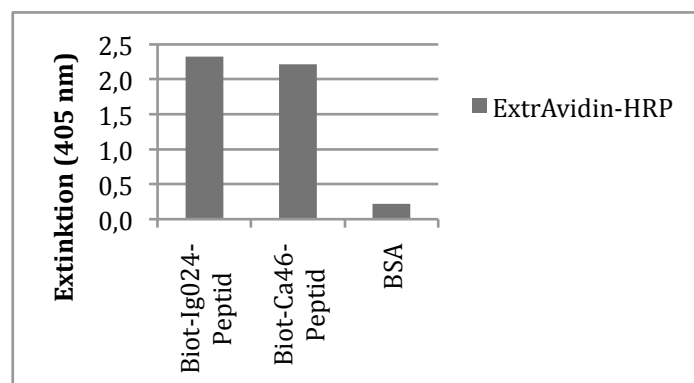


Abb. 4.31: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Reaktivität von Ca46- und Ig024-huIgG1 sowie der Biotinylierung der synthetisierten Peptide.

Nach Beschichtung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit dem biotinylierten Peptid und Blockierung mit 4% BSA folgte eine Inkubation mit ExtrAvidin-HRP (1:2000). Anschließend erfolgte die Detektion durch Zugabe von H₂O₂/ABTS als Substrat bei 405 nm.

Die Reaktivität der monoklonalen humanen Lymphom-Antikörper mit den synthetisierten, biotinylierten Peptiden konnte mittels ELISA-Analyse nachgewiesen werden. Die Biotinylierung der Peptide wurde durch eine Detektion mit ExtrAvidin-HRP gezeigt. Die identifizierten Mimotope konnten somit erfolgreich für weitere Analysen dargestellt werden. In der folgenden Tab. 4.5 sind die Sequenzen sowie Menge der dargestellten Peptide aufgeführt.

Tabelle 4.5: Aminosäuresequenzen und Menge der synthetisierten Peptide.

Die mit * markierten Peptide wurden aus Zeitgründen nicht von mir synthetisiert.

Bezeichnung des Peptides	Sequenz	Menge
biot-Ig014-Peptid*	biot.-GGRELRRQVDQLTNDK	15 mg
Ig024-Peptid	YLPWW	14 mg
Ig024-Peptid2	KKGTEYLPWWDE	6 mg
biot-Ig024-Peptid	biot.-KKGTEYLPWWDE	7 mg
Ca46-Peptid	AKYNPWLTPLL	9 mg
biot.-Ca46-Peptid	biot.-AKYNPWLTPLL	6 mg
anti-EGFR-Peptid*	WLDYSTSPRINR	14 mg
biot.-anti-EGFR-Peptid*	biot.-WLDYSTSPRINR	14 mg

Die Reaktivität dieser Peptide mit den entsprechenden Immunglobulinen wurde mittels ELISA-Analyse verifiziert, sodass diese Moleküle in ausreichender Menge für weitere Analysen zur Verfügung standen.

4.2.3 SPR-spektroskopische Messungen zur Bestimmung der Affinität

Die Oberflächenplasmonenresonanz- oder SPR-Spektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*) ist eine Biosensortechnik, die eine Messung der funktionellen Wechselwirkung zwischen Biomolekülen wie beispielsweise Antikörpern und ihren Liganden ermöglicht. Mithilfe dieser Methode konnten die Bindungsereignisse Rezeptor-Ligand in Echtzeit unter annähernd physiologischen Bedingungen in einem wässrigen Pufferflusssystem verfolgt werden. Eine Markierung der zu untersuchenden Biomoleküle beispielsweise durch Fluoreszenzfarbstoffe war hierbei nicht notwendig. Zudem ermöglichte die hohe Empfindlichkeit dieser Methode eine Durchführung der Experimente mit niedermolekularen Verbindungen und sehr geringen Stoffmengen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der SPR-Messungen der Lymphom-Antikörper mit den jeweiligen Liganden dargestellt. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde abhängig von der Versuchsdurchführung eine monovalente oder bivalente Kurvenanpassung durchgeführt und die beschriebenen Bindungskonstanten berechnet.

Die Goldoberfläche des verwendeten *Sierra Sensors SPR-2 Affinity Sensor-Chips* wurde für die Immobilisierung des Bindungspartners abhängig vom jeweiligen Versuchsdesign

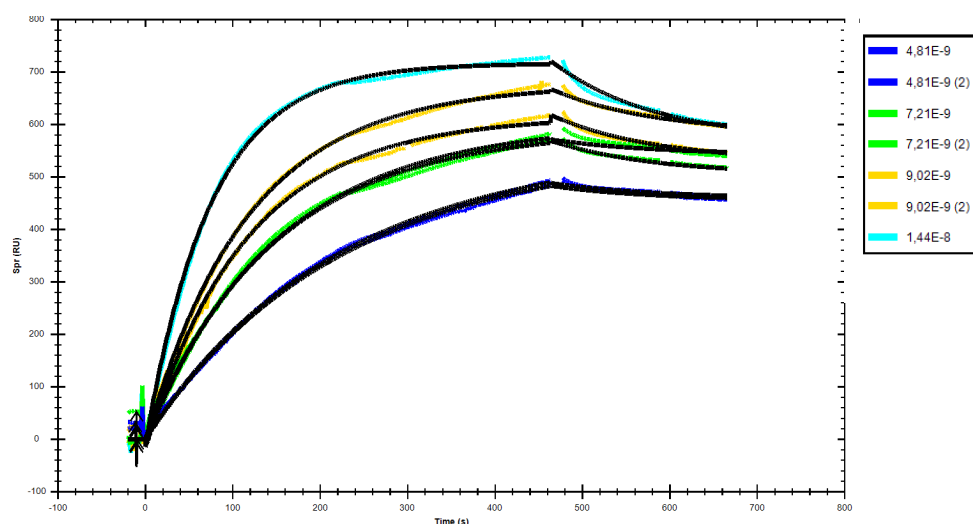
unterschiedlich funktionalisiert. Zur Bestimmung der Affinität der Lymphom-Antikörper zu den identifizierten Peptid-Mimotopen eignete sich die Immobilisierung der biotinylierten Peptide über eine Bindung an Streptavidin. Dieses Protein weist eine sehr hohe Affinität zu Biotin auf und erlaubt auf diese Weise eine Immobilisierung der biotinylierten Peptide. Hierzu wurde Streptavidin nach EDC/NHS-Aktivierung mittels Amidkupplung auf der Biosensor-Chipoberfläche immobilisiert. Auf der Referenzzelle wurden ebenfalls Streptavidin sowie ein Kontrollpeptid immobilisiert. Anschließend wurden Bindungsanalysen mit ansteigenden Konzentrationen der Lymphom-Antikörper durchgeführt. Die benötigten Antikörper-Konzentrationen zur Affinitätsbestimmung wurden zuvor in Testmessungen ermittelt. Der Ligand wurde nach jeder Messung mit einem milden Regenerationspuffer, AIW-Puffer (Zusammensetzung s. S. 34), regeneriert. In Abb. 4.32 sind die Ergebnisse der SPR-Messung des Ig024-huIgG1 dargestellt. Es erfolgte die Berechnung der Affinität anhand kinetischer Messungen unter der Annahme einer bivalenten 1:2 Bindung zwischen immobilisiertem Liganden und frei beweglichem bivalenten Antikörper. Die erhaltenen kinetischen Parameter sowie berechneten Bindungskonstanten sind in Tab. 4.6 dargestellt. Anhand der Messung konnte eine Bindungskonstanten von $6,6 \times 10^{-9}$ M für den Ig024-huIgG gegen das Peptid-Mimotop erhalten werden. Dieser Wert im nanomolaren Bereich stimmt mit dem Ergebnis der Messung Ca46-huIgG1 gegen das entsprechende Peptid-Mimotop überein. Für den Ca46-huIgG1 wurde eine Affinität von $1,5 \times 10^{-9}$ M gegen das selektierte Ca46-Peptid bestimmt.

Weiterhin wurden SPR-Messungen mit den exprimierten und gereinigten MBP-Fusionsproteinen durchgeführt. Im Unterschied zu den vorangegangenen Messungen wurden bei diesen Experimenten die entsprechenden Antikörper auf der Oberfläche des *Sierra Sensors SPR-2 Affinity Sensor-Chips* immobilisiert. Daher handelte es sich um 1:1 Bindungsereignisse zwischen immobilisierten Liganden und Analyt und dies wurde bei der Bestimmung der Affinität der Lymphom-Antikörper berücksichtigt. Zur Kontrolle wurde die Referenz-Biosensorzelle bei jeder Messung mit einem nicht-bindenden huIgG1 belegt. In Abb. 4.32 ist das Differenzensorgramm der Messung des anti-EGFR-Antikörpers gegen das selektierte MBP-Mimotop dargestellt. Neben dem dargestellten MPB-Fusionsprotein wurde zudem eine SPR-Messung mit dem natürlichen Liganden des Antikörpers in der löslichen Variante, das sEGFR (*soluble*), für anti-EGFR-huIgG1 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in der Tab 4.6 dargestellt. Die Analyse

der Differenzsensorgramme ergab eine Bindungskonstante von 9×10^{-7} M für das generierte anti-EGFR-huIgG1-Mimotop sowie $3,7 \times 10^{-8}$ M für den natürlichen Liganden sEGFR. Die SPR-Daten des Ig014-Antikörpers gegen das selektierte MBP-Mimotop ergaben eine Affinität von $7,5 \times 10^{-8}$ M sowie eine niedrigere Affinität von $2,8 \times 10^{-7}$ M des Ig014-Antikörpers gegen das MBP-Vimentin-Konstrukt.

Tab. 4.6 : Berechnete kinetische Parameter der Bindungsreaktionen. Die Bindungskonstanten K_D1 und K_D2 wurden wie in Kapitel 3.7.1 (S. 62) beschrieben berechnet. K_{Dbi} bezeichnet die Bindungskonstante der bivalenten Bindung.

Ligand	Analyt	K_a1 [1/(M*s)]	k_d1 [1/s]	K_D1 [M]	k_a2 [1/R U*s]	k_d2 [1/s]	K_D2 [mol /m ²]	K_{Dbi} [M]	Chi ² [RU]
Biotinyliertes Mimotop	Ig024-huIgG1	$4,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^{-3}$	$6,6 \times 10^{-9}$	$6,7 \times 10^{-3}$	1,6	238	$6,6 \times 10^{-9}$	63
Biotinyliertes Mimotop	Ca46-huIgG1	$7,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-9}$	$6,3 \times 10^{-3}$	1,4	222	$1,5 \times 10^{-9}$	11
Anti-EGFR-huIgG1	MBP-Mimotop	$4,6 \times 10^3$	$4,1 \times 10^{-3}$	9×10^{-7}	11,24	-	-	-	-
Anti-EGFR-huIgG1	sEGFR	$1,4 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-8}$	23,56	-	-	-	-
Ig014-huIgG1	MBP-Mimotop	$3,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-8}$	56,98	-	-	-	-
Ig014-huIgG1	MBP-Vimentin	$2,7 \times 10^5$	$7,7 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-8}$	23,56	-	-	-	-

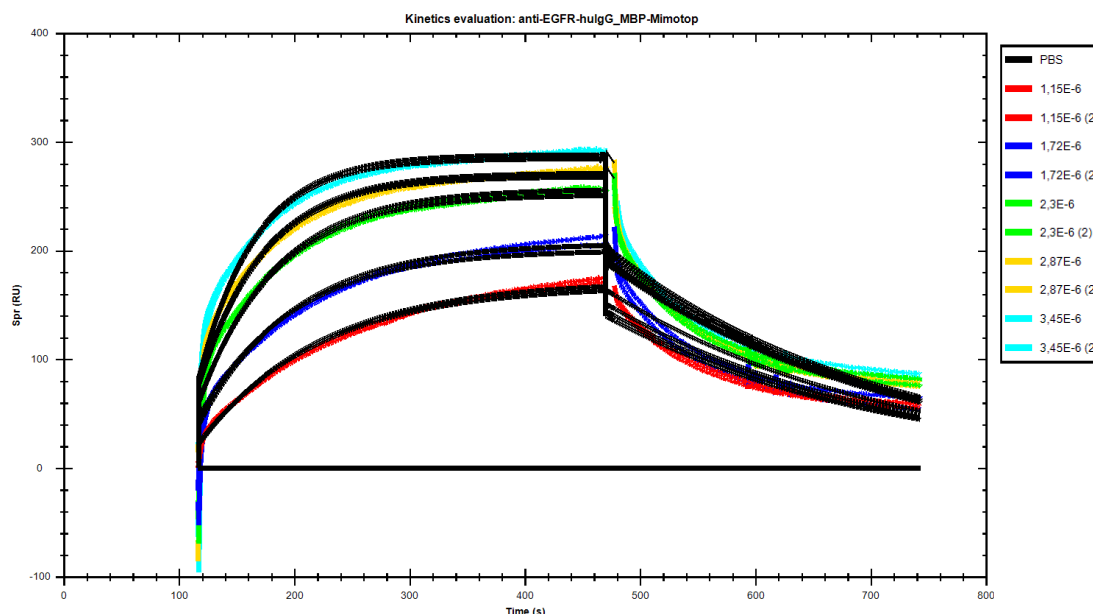


K_a1 [1/(M*s)]	k_d1 [1/s]	K_D1 [M]	k_a2 [1/RU*s]	k_d2 [1/s]	K_D2 [mol/m ²]	K_{Dbi} [M]	χ^2 [RU]
$4,44 \times 10^5$	$2,93 \times 10^{-3}$	$6,6 \times 10^{-9}$	$6,7 \times 10^{-3}$	1,6	238,8	$6,6 \times 10^{-9}$	63,42

Abb. 4.32: Differenzsensorgramme der SPR-Messungen des Ig024-huIgG1s gegen das mittels Streptavidin immobilisierte biotinylierte Mimotop.

Die Messung erfolgte an einem *Sierra Sensors*-Biosensor und die Auswertung mittels des *TraceDrawer*-Programms. Der Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen für 8 min mit einer Fließgeschwindigkeit von 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Liganden geleitet. Die Immobilisierung des Liganden erfolgte auf dem *Sierra Sensors SPR-2 Affinity Sensor-Chip*. Die Puffer-Referenzsensorgramme wurden von den Messkurven subtrahiert.

Dargestellt sind Differenzsensorgramme der Echtzeitmessung bei Bindung des Antikörpers in unterschiedlichen Konzentrationen (farblich markierte Kurven) an das biotinylierte Ig024-Mimotop. Hierbei wurden die erhaltenen Resonanzsignale [RU] gegen die Zeit [s] aufgetragen. Die Überlagerung der Sensorgramme mit der Kurvenanpassung ist schwarz markiert. Für die Kurvenanpassung wurde ein bivalentes Bindungsmodell gewählt. Weiterhin sind die berechneten kinetischen Parameter tabellarisch gezeigt. Anhand der Kurvenanpassungen konnten die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d der Bindungen beider Antikörperbindungsstellen an den Liganden bestimmt werden (k_{a1} , k_{d1} , k_{a2} , k_{d2}). Die Bindungskonstanten K_{D1} und K_{D2} wurden wie in Kapitel 3.7.1 (S.62) beschrieben berechnet. K_{Dbi} bezeichnet die Bindungskonstante der bivalenten Bindung.



K_a [1/(M*s)]	k_d [1/s]	K_D [M]	χ^2 [RU]
$4,63 \times 10^3$	$4,17 \times 10^{-3}$	9×10^{-7}	11,24

Abb. 4.33: Differenzsensorgramme der SPR-Messungen des MBP-anti-EGFR-Mimotops gegen den immobilisierten anti-EGFR-huIgG1.

Die Messung erfolgte an einem *Sierra Sensors*-Biosensor und die Auswertung mittels des *TraceDrawer*-Programms. Der Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen für 8 min mit einer Fließgeschwindigkeit von 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Liganden geleitet. Die Immobilisierung des Liganden erfolgte auf dem *Sierra Sensors SPR-2 Affinity Sensor-Chip*. Die Puffer-Referenzsensorgramme wurden von den Messkurven subtrahiert.

Dargestellt sind die Differenzsensorgramme der Echtzeitmessung bei Bindung des Mimotops in unterschiedlichen Konzentrationen (farblich markierte Kurven) an den Antikörper anti-EGFR-huIgG1. Hierbei wurden die erhaltenen Resonanzsignale [RU] gegen die Zeit [s] aufgetragen. Die Überlagerung der Sensorgramme mit der Kurvenanpassung ist schwarz markiert. Für die Kurvenanpassung wurde ein monovalentes Bindungsmodell gewählt. Weiterhin sind die berechneten kinetischen Parameter tabellarisch gezeigt. Anhand der Kurvenanpassungen konnten die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d der Bindung an den Liganden bestimmt werden. Die Bindungskonstante K_D wurde wie in Kapitel 3.7.1 (S.62) beschrieben berechnet.

4.2.3.1 Bindungsstudie in Form eines kompetitiven Assays

Mithilfe des synthetisierten Mimotops des anti-EGFR-huIgG1s wurde überprüft, ob dieses Peptid die Interaktion der Antikörper mit dem Antigen sEGFR blockieren kann. Um dies nachzuweisen, wurde ein kompetitiver Assay-Ansatz gewählt. Hierbei wurde zunächst der Ligand auf der Polystyroloberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Parallel hierzu wurde der jeweilige Antikörper mit unterschiedlichen Konzentrationen des unbiotinylierten Peptides inkubiert. Anschließend wurde dieses Antikörper-Peptid-

Gemisch zu dem immobilisierten Liganden gegeben. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Detektion reaktiver Antikörper. Die ELISA-Analyse in Abb. 4.34 zeigt die Ergebnisse des durchgeführten kompetitiven Assays.

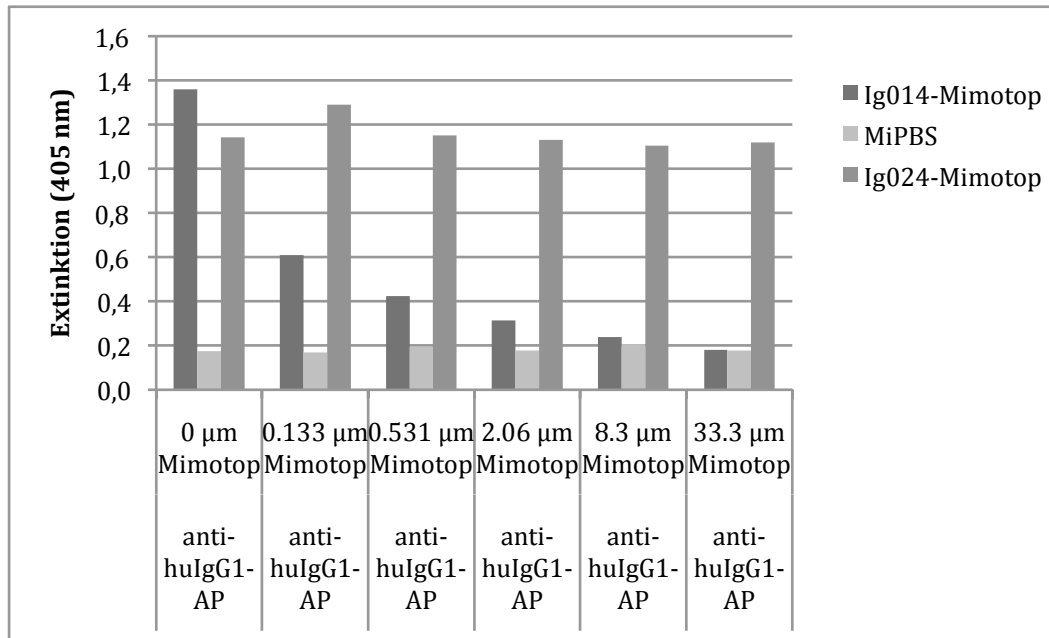


Abb. 4.34: Graphische Darstellung der kompetitiven ELISA-Analyse zur Überprüfung der Blockierung der anti-EGFR-huIgG1-sEGFR-Interaktion unter Verwendung des synthetisierten Peptides.

Die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte wurden über Nacht mit sEGFR (100 μg/ml) beschichtet. Nach Blockierung mit 4% MiPBS folgte die Zugabe des vorinkubierten anti-EGFR-huIgG1-Mimotop-Gemisches. Danach erfolgte die Detektion mit anti-huIgG-AP (1:5000) in 4% MiPBS und anschließender Zugabe des Substrats pNPP. Die Farbentwicklung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen.

Die Daten in Abb. 4.34 zeigen, dass das identifizierte Mimotop des anti-EGFR-huIgGs die Antikörper-Bindung verhindern kann. Durch diesen kompetitiven Assay-Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Selektion von Mimotopen überaus geeignet ist Liganden zu identifizieren, die mit der Paratop-Region des Antikörpers spezifisch reagieren. Diese Erkenntnis macht die nun anstehende strukturelle Analyse der Peptid-Fab-Interaktion besonders bedeutend und sollte essentielle Interaktionsstrukturen aufdecken. Weiterhin zeigt dieser kompetitive Assay-Ansatz, dass sich die Mimotope für eine zielgerichtete Blockierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion eignen. Sie können durch eine Modifizierung in toxische Peptide konvertiert werden, die eine gezielte Bekämpfung der Lymphom-Zellen erlauben.

4.2.4 DLS-Messungen der Antikörperkonstrukte

Die dynamische Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, DLS) ist eine Methode, die eine Analyse von Proteinmolekülen hinsichtlich ihrer Stabilität, Aggregation, Komplexbildung und Konformation erlaubt. Bei dieser Technik betrachtet man die Veränderung der Streulichtintensität des von den Proteinmolekülen einer Probe emittierten Lichtes als eine Funktion der Zeit. Diese Fluktuation der Streulichtintensität wird von Detektoren gemessen. Durch die unterschiedlich schnellen Bewegungen von großen und kleinen Molekülen nach der Brown'schen Molekularbewegung entsteht eine definierte Korrelationsfunktion aus der über einen mathematischen Fit der Diffusionskoeffizient der Zielmoleküle bestimmt werden kann. Aus diesem kann wiederum der hydrodynamische Radius der Moleküle ermittelt werden.

In den Abb. 4.35, 4.36 und 4.38 sind die Ergebnisse der DLS-Analyse des Ig014-, Ig024-huIgG1 sowie Ig014-Fab dargestellt. Zur Kontrolle wurde zudem eine DLS-Analyse mit dem therapeutischen Antikörper Xolair® (Omalizumab) durchgeführt (Abb. 4.37).

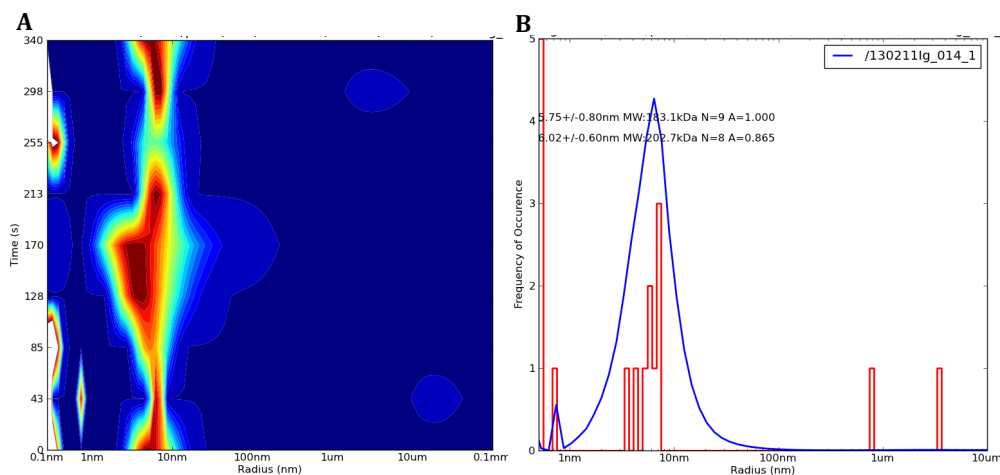


Abb. 4.35: DLS-Messung des Ig014-huIgG1.

A: Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit von der Zeit.

B: Häufigkeitsverteilung des hydrodynamischen Radius.

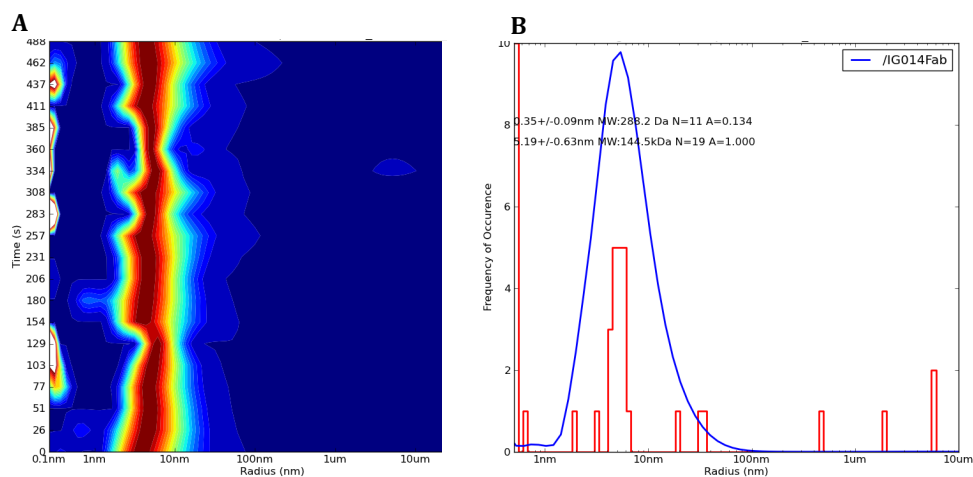


Abb. 4.36: DLS-Messung des Ig014-Fab-Fragmentes.

A: Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit von der Zeit.

B: Häufigkeitsverteilung des hydrodynamischen Radius.

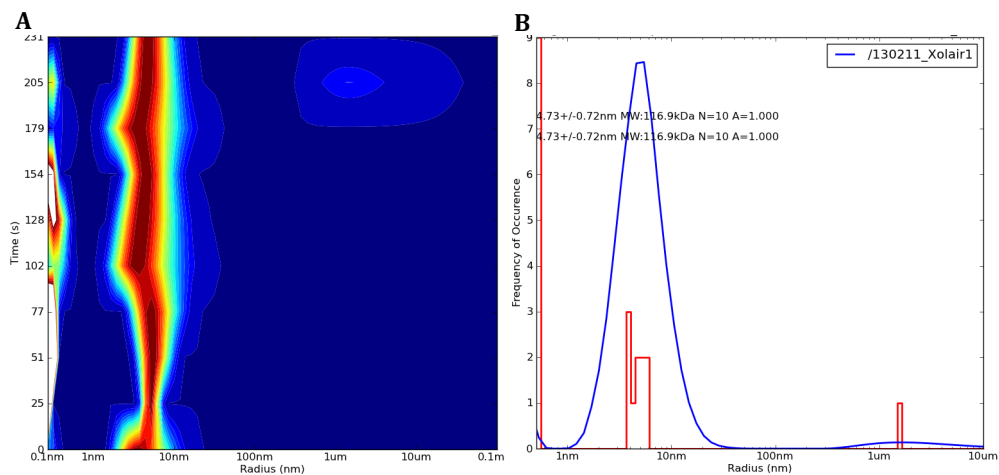


Abb. 4.37: DLS-Messung des therapeutischen Antikörpers Xolair.

A: Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit von der Zeit.

B: Häufigkeitsverteilung des hydrodynamischen Radius.

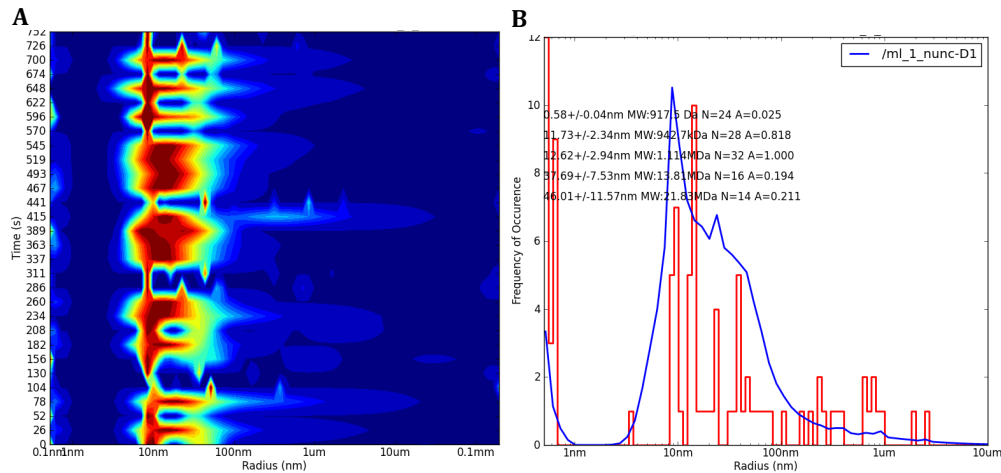


Abb. 4.38: DLS-Messung von Ig024-huIgG1.

A: Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit von der Zeit.

B: Häufigkeitsverteilung des hydrodynamischen Radius.

Die Abb. 4.35 bis 4.38 zeigen jeweils die aus 30 Messungen gemittelte Korrelationsfunktion und die daraus berechnete Verteilung der hydrodynamischen Radien der Proteinprobe. Für den Ig014-huIgG1 wurde ein Hauptpeak des Streulichtes bei einem mittleren hydrodynamischen Radius von $5.75 \text{ nm} \pm 0.80 \text{ nm}$ gefunden. Die DLS-Daten zeigten, dass es sich um eine monodisperse Probe handelte. Die Ergebnisse der DLS-Analyse lassen weiterhin auf eine Monodispersität des Ig014-huIgG1-Fab schließen. Der hydrodynamische Radius betrug $5.19 \text{ nm} \pm 0.63 \text{ nm}$. Ein solches Resultat deutet auf eine gute Kristallisierbarkeit des Proteinmoleküls hin. Für den therapeutischen IgG-Antikörper Xolair® wurde ebenfalls die Monodispersität gezeigt und ein Hauptpeak des Streulichtes gefunden. Der ermittelte hydrodynamische Radius des humanisierten Antikörpers betrug $4.73 \text{ nm} \pm 0.72 \text{ nm}$.

Die DLS-Ergebnisse der Ig024-huIgG1-Probe unterschieden sich deutlich von den Ergebnissen des Ig014-huIgG1 und Xolair®-Antikörpers (Abb. 4.38). Hier ist ein Hauptpeak bei einem hydrodynamischen Radius von $11.73 \text{ nm} \pm 2.34 \text{ nm}$ zu erkennen. Gleichzeitig sind aber weitere Peaks bei $12.62 \text{ nm} \pm 2.94 \text{ nm}$ und $37.69 \text{ nm} \pm 7.53 \text{ nm}$ mit einer breiten Verteilung zu erkennen. Diese Daten deuten auf eine Oligomerisierung der Ig024-huIgG-Antikörper hin. Die erhaltenen Daten der DLS-Analyse stimmen mit dem unterschiedlichen Laufverhalten der beiden Lymphom-Antikörper im SDS-PA-Gel überein.

4.2.5 Initiale Kristallisationsprozesse

Mit den dargestellten Lymphom-Fab-Fragmenten werden derzeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Andersen (Universität Aarhus) die Bedingungen für eine Fab-Kristallisation ermittelt. Dazu wurden die Proteine in 96-Well-Platten pipettiert, wobei jedes Well der Mikotiterplatte ein spezielles Kristallisationsmilieu liefert. Typisch ist hierbei eine Variation in Polymeren mit unterschiedlichen Molekulargewichten und im pH-Wert. Auf diese Weise können effizient verschiedene Bedingungen gescreent werden. In Abb. 4.39 sind erste Resultate dieser Untersuchung der Kristallisationsbedingungen für die Fab-Fragmente dargestellt. Es konnten erste Kristallstrukturen beobachtet werden. Inwiefern es sich dabei um das Protein handelt oder möglicherweise Artefakte in Form von Salzpräzipitaten muss ermittelt werden. Zudem muss geklärt werden, ob es sich um auswertbare Kristalle handelt.

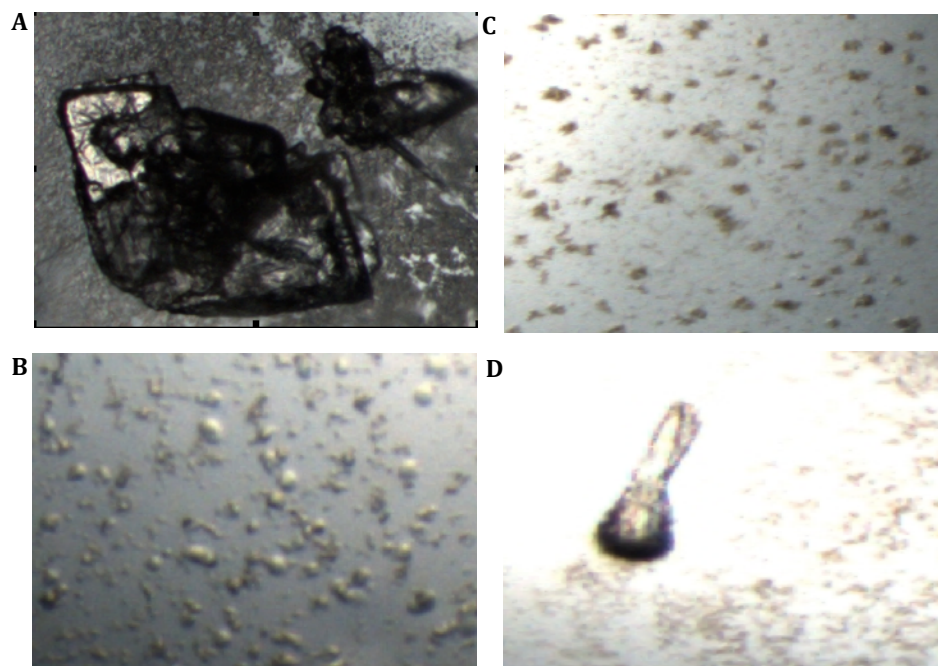


Abb. 4.39: Ig014-Fab-Kristallisation unter Verwendung von PEG RX 1+2.

A: 0,05 M CaCl_2 Dihydrat; 0,1 MES Monohydrat; 45% v/v PEG 200; pH 6.0.

B: 0,2 M KNO_3 , 20% w/v PEG 3500, pH 6.8.

C: 0.2 Natriumformat; 0,1 M BICINE; 20% w/v PEG Monomethyl Ether 5000; pH 8.5.

D: 4% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-Pentandiol; 0,1 M Zitronensäure; 20% w/v PEG 1500; pH 3.5.

4.3 Epitop-Analyse des Phl p 5-spezifischen Antikörpers

Phl p 5 ist ein Hauptallergen des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*). Es kommt in den zwei Isoformen Phl p 5a und b vor (Andersson und Lidholm, 2003). In einer früheren Arbeit konnte eine Spezifität des Antikörpers für Phl p 5a nachgewiesen werden. Aufgrund der selektiven Bindung des Antikörpers an Phl p 5a wurde eine Sequenz- und Strukturanalyse der beiden Isoformen zur Identifizierung möglicher Erkennungssequenzen des Antikörpers durchgeführt. Beide Isoformen besitzen zwei Alanin-reiche Regionen, die jeweils eine globuläre Domäne aus vier α -Helices formen. Phl p 5b weist in der N-terminalen Domäne eine Deletion von 14 Aminosäuren auf (Abb. 4.40). In der dreidimensionalen Struktur von Phl p 5a sind diese Aminosäuren Teil eines *Loops* zwischen der zweiten und dritten α -Helix der N-terminalen Domäne und bilden für den monoklonalen humanen Antikörper eine gut zugängliche Bindungsregion (Abb. 4.41).

		$\alpha 1$
Phl p 5b	ADLGYPATPAAPAAGYAPATPAAAG--AEAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVP	
Phl p 5a	ADLGYPATPAAPPAGYTPATPAAPAGAEPAGKAT TEEQKLI EKINAGFKAA ALAA AGVP	
Phl p 5a-F1	-----AGKATTEEQKLI EKINAGFKAA ALAAAGVP	
	$\alpha 2$	$\alpha 3$
Phl p 5b	AADKFKTF AAFTSSS ----- TA TAK PGL VPKLDAAYSVAYKAA T GATP	
Phl p 5a	PADKYRT FVATFCAAS NKAF AEGLSGEPKG AA SSS AA LTSKLDAA YKLAYKTA T GATP	
Phl p 5a-F1	PADKYRT FVATFCAAS NKAF AEGLSGEPKG AA SSS AA LTSKLDAA YKLAYKTA T GATP	
	$\alpha 4$	$\alpha 5$
Phl p 5b	EAKFDSFVASL TEALR VIAGALEVHAVKPVTEEPGM AKI PAGELQIIDKIDAAFKVAATA	
Phl p 5a	EAKYDAYVATLSEALRI IAGTLEVHAVKPAAEE--VKVIPAGELQVIEK VDAA FKVAATA	
Phl p 5a-F1	EAKYDAYVATLSEALRIAG-----	
	$\alpha 6$	$\alpha 7$
Phl p 5b	A TAPADDKFTVF EAAFN KA IK STGGAYDTYK IP SLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAV	
Phl p 5a	ANAAPANDKFTVF EAAFNDA IKAST GGAYESYK IP ALEAAVKQAYAATVAT AEV KYTV	
Phl p 5a-F1	-----	
	$\alpha 8$	
Phl p 5b	FEALTKAITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAA TAT GAASGAATVAAGGYKV	
Phl p 5a	FETAL KKAITVMSE AQKAA KPAAAA TATAT ---AAVGAATGAATAATGGYKV	
Phl p 5a-F1	-----	

Abb. 4.40: Darstellung der Aminosäuresequenz der Isoformen Phl p 5a und Phl p 5b sowie der Deletionsmutante Phl p 5a-F1.

Die Sequenzunterschiede sind farblich markiert. Deletionen sind grau und nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen sind rot unterlegt. Die Sequenz des *Loops* zwischen der zweiten und dritten α -Helix ist blau markiert. Die Sekundärstrukturelemente von Phl p 5a sind durch fettgedruckte Buchstaben markiert und über der Sequenz benannt. Die Deletionsmutante Phl p 5a-F1 repräsentiert die N-terminale Domäne von Phl p 5a.

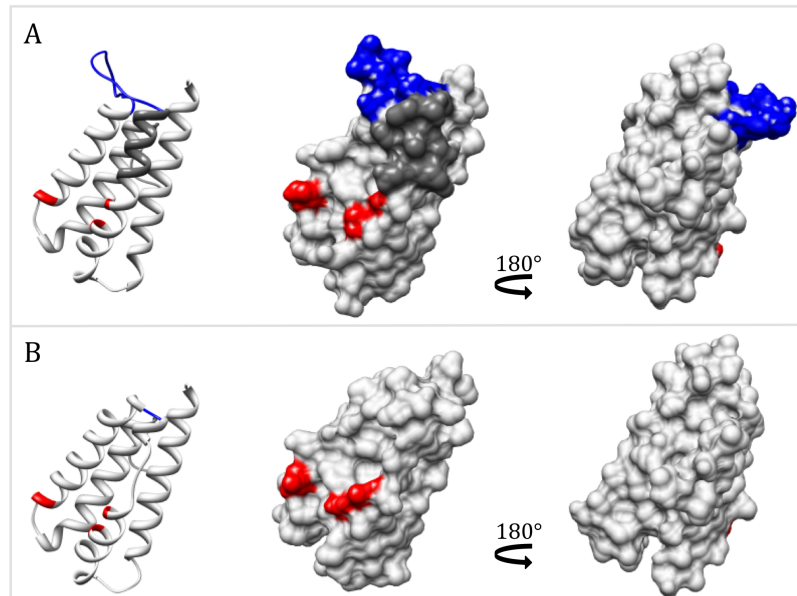


Abb. 4.41: Dreidimensionale Struktur der N-terminalen Domäne von Phl p 5a und Phl p 5b.

Die Raum- und Oberflächenstrukturen der N-terminalen Domäne von Phl p 5a (A) und von Phl p 5b (B) sind dargestellt. Die blaue Region markiert den *Loop* zwischen der zweiten und dritten α -Helix der N-terminalen Domäne von Phl p 5a. Bei den schwarz unterlegten Strukturen handelt es sich um deletierte Sequenzen, die in Phl p 5b nicht zu finden sind. Nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen sind rot dagesellt. Die Oberflächendarstellung rechts außen wurde um 180° gedreht. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von SWISS-MODEL und UCSF Chimera (PDB: 1I3pA; 1nIxG).

Zur Eingrenzung des Epitops des Phl p 5a-spezifischen humanen Antikörpers, welcher als IgA2 Δ C₁-Konstrukt vorlag, sollten Deletionsmutanten von Phl p 5a generiert und auf eine Reaktivität mit dem Antikörper geprüft werden. Dabei lag der Fokus auf der *Loop*-Region als mögliche Zielstruktur des rekombinanten humanen Antikörpers.

4.3.1 Darstellung und Analyse von Allergenderivaten

Die Deletionsmutante Phl p 5a-F1 lag bereits in klonierter Form vor. Bei dieser Mutante handelte es sich um ein N-terminales Fragment von Phl p 5a, welches die vier α -Helices der ersten Alanin-reichen Region umfasst (Abb. 4.40 und Abb. 4.41). Zunächst sollte die in den Vektor pTXB1 klonierte Deletionsmutante Phl p 5a-F1 in *E. coli* ER2655-Zellen als CBD-Intein-Fusionsprotein exprimiert werden (Abb. 4.42).



Abb. 4.42: Schematische Darstellung der Expressionskassette von CBD-Intein-Phl p 5a im Vektor pTXB1.

Phl p 5a-F1: grau hinterlegt, Intein: blau hinterlegt, Chitin-Bindedomäne (CBD): lila hinterlegt; *NdeI* und *SapI*: die bei der Klonierung verwendeten Schnittstellen.

Die Reinigung des Proteins aus dem Zellextrakt erfolgte nach dem Protokoll des *IMPACT™ Kits* mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Chitin-Matrix. Das *IMPACT™*-System nutzt die induzierbare Aktivität von Inteinen, um das Protein von seinem Affinitäts-Tag (CBD) abzuspalten. Der Erfolg der Proteinreinigung wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 4.43 A). Zudem wurde die Reaktivität des monoklonalen humanen Antikörpers mittels Immunoblot getestet (Abb. 4.43 B).

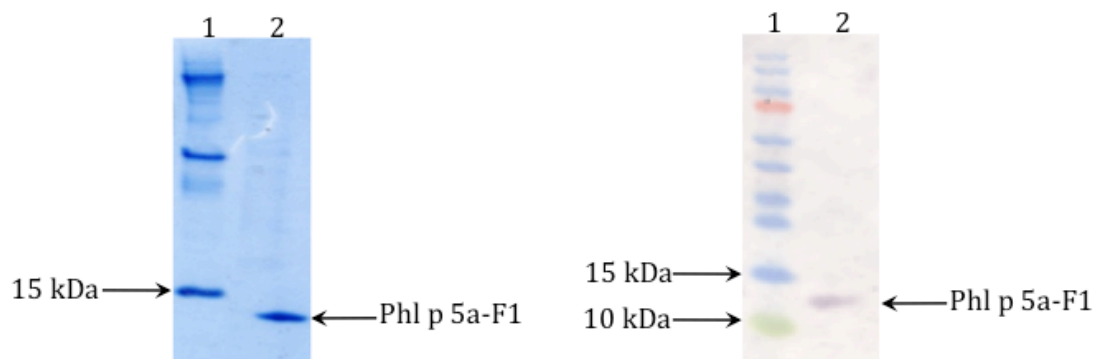


Abb. 4.43: SDS-PAGE-Analyse und Immunoblot zur Überprüfung der Reinigung von Phl p 5a-F1 und der Reaktivität mit anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel).

A: Coomassie-Färbung. Bahn 1: Marker; Bahn 2: Phl p 5a-F1.

B: Immunoblot. Bahn 1: Marker; Bahn 2: Phl p 5a-F1. Zur Detektion wurden die Antikörper anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ (5 µg/ml) und anti-huIgA-AP-Konjugat (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

Die Reaktivität des Phl p 5a-spezifischen humanen Antikörpers mit der Deletionsmutante Phl p 5a-F1 konnte im Immunoblot nachgewiesen werden. Es wurde eine Bande der erwarteten Laufhöhe von etwa 12 kDa detektiert. Dieses Resultat zeigte, dass die C-terminale Domäne von Phl p 5a nicht an der Bindung des Antikörpers beteiligt zu sein scheint. Zur weiteren Eingrenzung des Epitops von Phl p 5a sollten verkürzte Fragmente von Phl p 5a-F1 hergestellt werden. Das zentrale Element dieser Mutanten war der *Loop* zwischen der zweiten und dritten α -Helix der N-terminalen Domäne (Abb. 4.44). Die dreidimensionale Struktur der Deletionsmutanten ist in Abb. 4.45 dargestellt.

	$\alpha 1$	$\alpha 2$
Phl p 5a-F1	AGKAT TEEQ KLIEKINAGFKAAALAAAGVPPAD KYRTF VATF GAAS NKAFAEGL SGEPKG	
Phl p 5a-F2	-----KYRTFVATF GAAS NKAFAEGL SGEPKG	
Phl p 5a-F3	AGKAT TEEQ KLIEKINAGFKAAALAAAGVPPAD KYRTF VATF GAAS NKAFAEGL SGEPKG	
Phl p 5a-F4	-----KYRTFVATF GAAS NKAFAEGL SGEPKG	
	$\alpha 3$	$\alpha 4$
Phl p 5a-F1	AAESSSKAAL TSKLDAA YK LAYKT A GAT PEAKYDAY VATLSEALRIIAG	
Phl p 5a-F2	AAESSSKAAL TSKLDAA YK LAYKT A GAT PEAKYDAY VATLSEALRIIAG	
Phl p 5a-F3	AAESSSKAAL TSKLDAA YK -----	
Phl p 5a-F4	AAESSSKAAL TSKLDAA YK -----	

Abb. 4.44: Darstellung der Aminosäuresequenz der Deletionsmutanten Phl p 5a-F1, Phl p 5a-F2, Phl p 5a-F3 und Phl p 5a-F4.

Die Sequenz des *Loops* zwischen der zweiten und dritten α -Helix ist blau markiert. Die Region der Deletion von Phl p 5b ist grau markiert. Nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen sind rot unterlegt. Die Sekundärstrukturelemente von Phl p 5a sind durch fettgedruckte Buchstaben markiert und über der Sequenz bezeichnet.

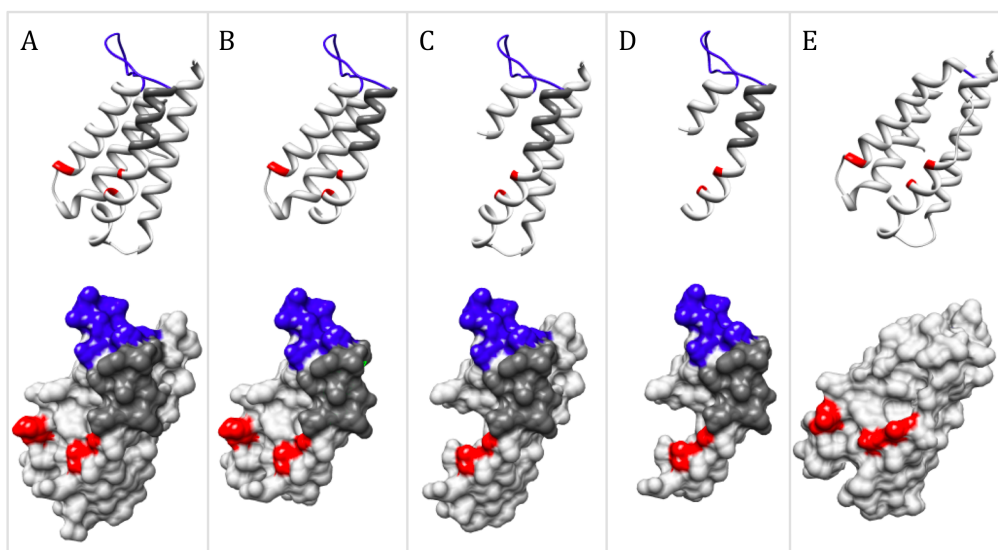


Abb. 4.45: Dreidimensionale Struktur der N-terminalen Domäne von Phl p 5a und Phl p 5b sowie der Deletionsmutanten Phl p 5a-F2, Phl p 5a-F3 und Phl p 5a-F4.

Die Raum- und Oberflächenstrukturen von Phl p 5a-F1 (A), Phl p 5a-F2 (B), Phl p 5a-F3 (C), Phl p 5a-F4 (D) und der N-terminalen Domäne von Phl p 5b (E) sind dargestellt. Die blaue Region markiert den *Loop* zwischen der zweiten und dritten α -Helix der N-terminalen Domäne von Phl p 5a. Bei den schwarz unterlegten Strukturen handelt es sich um deletierte Sequenzen, die in Phl p 5b nicht zu finden sind. Nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen sind rot dargelegt. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von SWISS-MODEL und UCSF Chimera (PDB: 1I3pA; 1nIxG).

Zur Expression der Phl p 5a-Deletionsmutanten wurden ER2655-Zellen transformiert. Es folgte die Analyse von Zelllysaten nicht-induzierter und induzierter Zellen anhand einer SDS-PAGE und nachfolgendem Immunoblot. Die Detektion wurde dabei mit anti-Phl p 5a-huIgA2 Δ C₁ und anti-huIgA-IgG-AP sowie zur Kontrolle mit polyklonalen anti-CBD-rbtIgG und anti-rbt-IgG-AP und nachfolgender Substratumsetzung durchgeführt (Abb. 4.46 und Abb. 4.47). Die Analyse im Immunoblot zeigte, dass der Phl p 5a-spezifische rekombinante Antikörper eine Reaktivität mit Phl p 5a-F2 und Phl p 5a-F3

besitzt. Es wurden Banden der erwarteten Laufhöhe von etwa 36 kDa detektiert. Es konnte keine Bindung des monoklonalen rekombinanten Antikörpers an das kleinste Fragment von Phl p 5a, die Deletionsmutante Phl p 5a-F4, nachgewiesen werden. Die Expression des Proteins wurde durch Detektion mittels anti-CBD-rbtIgG bewiesen. Anschließend erfolgte die Reinigung und Intein-Abspaltung von Phl p 5a-F2 und Phl p 5a-F3 nach dem Protokoll des *IMPACT™ Kits* mittels Affinitäts-chromatographie unter Verwendung einer Chitin-Matrix. Die Proteinreinigung wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 4.48 A und B).

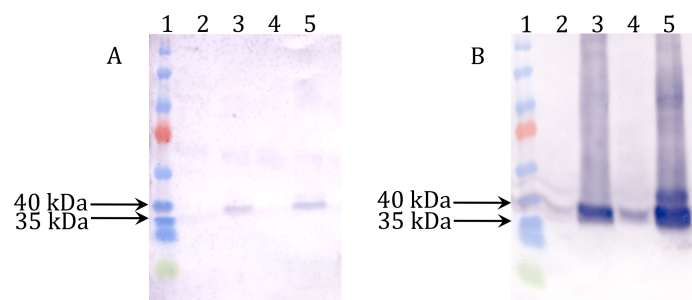


Abb. 4.46: Immunoblot zur Überprüfung der Reaktivität von anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ mit CBD-Intein-Phl p 5a-F2 und CBD-Intein-Phl p 5a-F3.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel) und anschließender Immunoblot. Bahn 1: Marker; Bahn 2: nicht induziert Phl p 5a-F2; Bahn 3: induziert Phl p 5a-F2; Bahn 4: nicht induziert Phl p 5a-F3; Bahn 5: induziert Phl p 5a-F3.

A: Zur Detektion wurden die Antikörper anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ (5 µg/ml) und anti-huIgA-AP-Konjugat (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

B: Kontrolle. Zur Detektion wurden die Antikörper polyklonaler anti-CBD-rbtIgG (1:2000) und anti-rbt-IgG-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

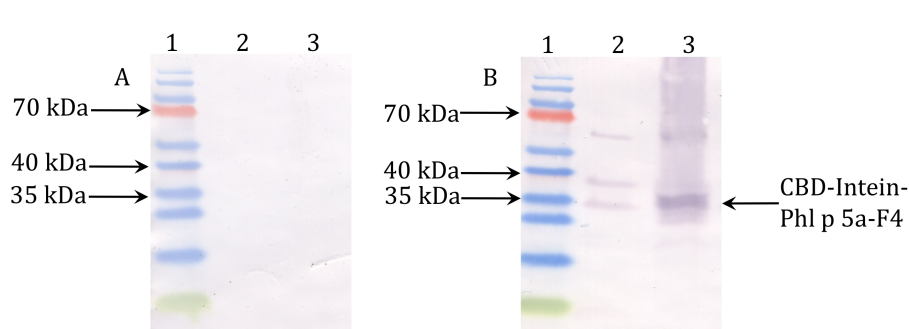


Abb. 4.47: Immunoblot zur Überprüfung der Reaktivität von anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ mit CBD-Intein-Phl p 5a-F4.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel) und anschließender Immunoblot.

A: Bahn 1: Marker; Bahn 2: nicht induziert; Bahn 3: induziert. Zur Detektion wurden die Antikörper anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ (5 µg/ml) und anti-huIgA-AP-Konjugat (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

B: Bahn 1: Marker; Bahn 2: nicht induziert; Bahn 3: induziert. Zur Detektion wurden polyklonale anti-CBD-rbtIgG (1:2000) und anti-rbt-IgG-AP (1:5000) sowie NBT/BCIP als Substrat eingesetzt.

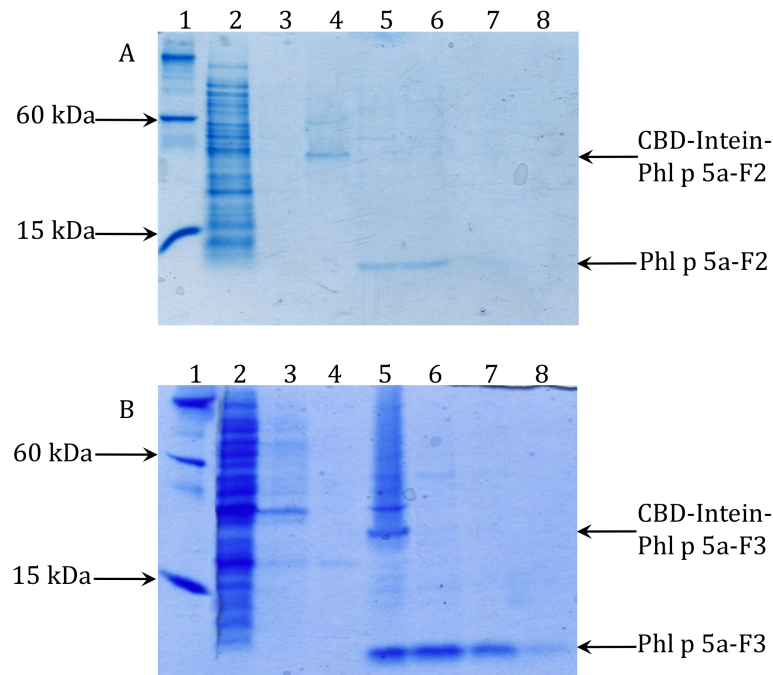


Abb. 4.48: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von Phl p 5a-F2 und Phl p 5a-F3.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (10%iges Tris-Tricin-PA-Gel) und anschließender Coomassie-Färbung. **A:** Reinigung Phl p 5a-F2. **B:** Reinigung Phl p 5a-F3. Bahn 1: Proteinmarker; Bahn 2: Gesamtzelllysatz, löslich; Bahn 3: Durchlauf; Bahn 4: Waschfraktion; Bahn 5-10: Elutionsfraktionen 1-6.

Die erfolgreiche Expression und Reinigung von Phl p 5a-F2 und Phl p 5a-F3 konnte mittels SDS-PAGE-Analyse bestätigt werden. Im Anschluss erfolgte die ELISA-Analyse der gereinigten Proteine (Abb. 4.49).

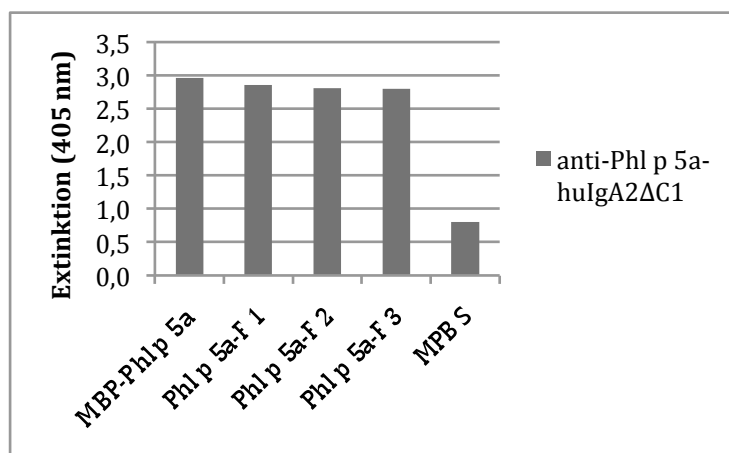


Abb. 4.49: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Reaktivität von anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC1 mit Phl p 5a-F2 und Phl p 5a-F3.

Nach Beschichtung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit MBP-Phl p 5a, Phl p 5a-F1, Phl p 5a-F2, Phl p 5a-F3 (100 µg/ml) und Blockierung mit 4% MPBS folgte eine Inkubation von anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC1 (5 µg/ml). Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-huIgA-AP (1:2000) in 4% MPBS und pNPP als Substrat bei 405 nm.

Die Reaktivität des allergenspezifischen humanen Antikörperkonstruktes mit Phl p 5a-F2 und Phl p 5a-F3 konnte mittels ELISA-Analyse verifiziert werden.

4.3.2 Phage Display des identifizierten Epitops

Um die natürliche Konformation des *Loops* in der N-terminalen Domäne von Phl p 5a auch nach einer Deletion der umgebenden stabilisierenden α -Helices zu erhalten, sollte ein entsprechendes Peptid über flankierende Cystein-Reste zyklisiert werden. Die *Phage Display*-Technologie wurde verwendet, um dieses Peptid an der Oberfläche des M13-Bakteriophagen zu präsentieren. Die Darstellung des *Loop*-präsentierenden Phagen wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Detektion bindender Phagen wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Detektion bindender Phagen erfolgte mit Hilfe eines anti-M13-HRP-Konjugates und nachfolgender Substratumsetzung (Abb. 4.50).

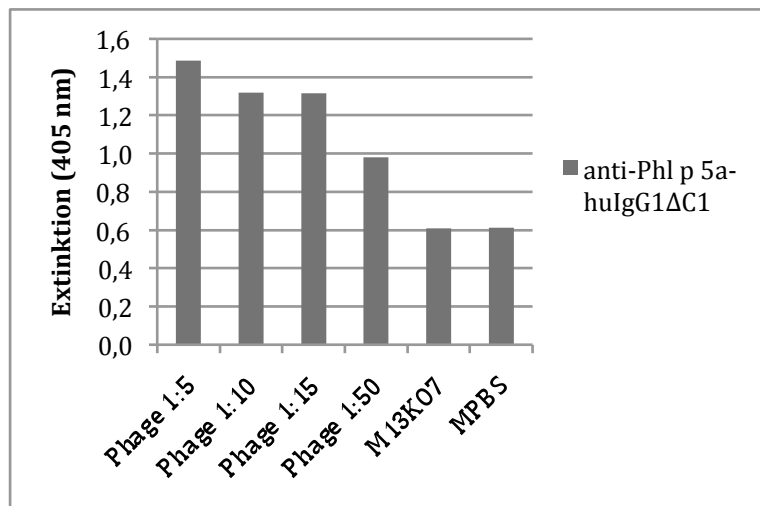


Abb. 4.50: Graphische Darstellung der ELISA-Analyse zur Überprüfung der Reaktivität von anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ mit dem *Loop*-präsentierenden Phagen.

Nach Beschichtung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit anti-Phl p 5a-huIgA2ΔC₁ und Blockierung mit 4% MPBS folgte eine Inkubation mit Phagenlösungen in Verdünnungen von jeweils 1:5, 1:10, 1:15 und 1:50 sowie als Negativkontrolle mit dem M13KO7 Helferphagen (100 µg/ml). Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-M13-HRP-Konjugat (1:2000) in 4% MPBS und H₂O₂/ABTS als Substrat bei 405 nm.

Die Resultate der ELISA-Analyse in Abb. 4.50 zeigen eine signifikante Reaktivität des Phl p 5a-spezifischen humanen Antikörperkonstruktes mit den *Loop*-präsentierenden Phagen. Damit konnte nachgewiesen werden, dass dieser Sequenzabschnitt von Phl p 5a in seiner natürlichen Konformation für die Bindung des Phl p 5a-spezifischen rekombinanten Antikörpers entscheidend ist.

5 Diskussion

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die am häufigsten vorkommende Leukämieform in der westlichen Welt (Rozman & Montserrat, 1995). Allergien betreffen rund 25% der Bevölkerung in den USA und Nordeuropa (Vrtala, 2008). Verbindendes Element beider Erkrankungen ist die spezifische Erkennung von Antigenen durch Rezeptoren. Über die molekularen Wechselwirkungen sowie Epitop-Strukturen der Rezeptor-Ligand-Interaktion ist wenig bekannt. Dies ist vor allem in der limitierten Verfügbarkeit monoklonaler humaner Rezeptoren sowie dem noch unzureichenden Kenntnisstand über die grundlegende Biologie der Erkrankungen begründet.

Trotzdem hat sich das Verständnis der Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie in der letzten Dekade fundamental gewandelt. Als Ursache der B-Zell-Neoplasien wurden inhärente, genetische Faktoren wie chromosomale Aberrationen angesehen (Döhner *et al.*, 2000). Obwohl eine genetische Prädisposition entscheidend dafür ist, wie sich diese Erkrankungen entwickeln, sind auch andere, exogene Faktoren essentiell für die Ausprägung der CLL (Ghia & Caligaris-Cappio, 2000). Diese Faktoren wurden anfänglich unter dem Terminus „Mikromilieu“ unspezifisch zusammengefasst und konnten erst durch Studien in jüngerer Zeit näher definiert werden. Die Akkumulation der CLL-Zellen erfordert die Interaktion mit zellulären Komponenten, den Bindegewebszellen und T-Lymphozyten sowie mit löslichen Faktoren (Ghia *et al.*, 2005; Lagneaux, Delforge, Bron, De Bruyn, & Stryckmans, 1998; Panayiotidis, Jones, Ganeshaguru, Foroni, & Hoffbrand, 1996; Ranheim & Kipps, 1993). Dabei mehren sich Hinweise, dass insbesondere die Antigen-Stimulation ausschlaggebend für die Pathogenese der CLL ist. So wurde gezeigt, dass CLL-Zellen phänotypisch einer Antigen-stimulierten B-Zelle ähneln (Damle *et al.*, 2002) und zudem das gleiche Expressionsprofil aufweisen (Klein *et al.*, 2001). Im Unterschied zu normalen B-Zellen exprimieren CLL-Zellen Rezeptoren, deren variable schwere Immunglobulin-Kette einem limitierten Genrepertoire entstammt (Ghiotto *et al.*, 2006; Stamatopoulos, 2005; Tobin *et al.*, 2003). Des Weiteren zeigen mehr als 20% aller CLL-Patienten stereotype BZR (Stamatopoulos *et al.*, 2007), die zu einer von etwa 150 verschiedenen Subgruppen von homologen BZR zugeordnet werden können. Die Einteilung der Subgruppen beruht auf Sequenzdaten der CDR3-Region der schweren Immunglobulin-Kette. Da dieser

Antikörper-Sequenz eine besonders hohe Bedeutung bei der Bindung des Antigens zukommt (Barrios, Jirholt, & Ohlin, 2004), stellt sich die Frage, ob sich gemeinsame Epitop-Erkennungsstrukturen für einzelne CLL-Subgruppen definieren lassen. Erste Studien unterstützen diese Hypothese und zeigen, dass die Antigen-Erkennung der Lymphom-Zellen homogener ist, als bislang vermutet (Binder *et al.*, 2011) und CLL-Klone durch bestimmte, wiederkehrende antigene Determinanten selektiert werden (Messmer *et al.*, 2004; Tobin *et al.*, 2004).

Die Frage nach typischen Epitop-Erkennungsmustern stellt sich wie im Kontext maligner Erkrankungen auch im Kontext der Allergie. Hier gilt zu klären, ob bestimmte und falls ja, welche biochemischen Charakteristika und strukturellen Eigenschaften ein Antigen zu einem Allergen machen. Ein Unterscheidungskriterium zwischen immunogenen und allergenen Proteinen stellt die Bindung durch IgE-Antikörper dar, die im Zuge der Sensibilisierung sezerniert werden. Eine Charakterisierung dieser IgE-Epitope bietet daher die Möglichkeit spezifische Merkmale der Proteinstruktur von Allergenen zu beschreiben. Die Analyse von IgE-Epitopen war jedoch lange Zeit durch die mangelnde Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper als Analyse-Molekül kaum möglich. Die physiologische IgE-Konzentration im Humanserum ist mit 10 bis 400 ng/ml äußerst niedrig (Steinberger, Kraft, & Valenta, 1996) und erlaubt keine Isolierung substantieller Mengen allergenspezifischer IgE, die eine genaue Charakterisierung der Zielmoleküle ermöglichen. Mit Hilfe der Hybridom-Technik nach Köhler *et al.* (1975) können zwar monoklonale Antikörper hergestellt werden, allerdings nicht der IgE-Isotyp. Somit geht der Kontext zur Allergie verloren. Erst durch die Etablierung von Verfahren wie der Selektion von ϵ -spezifischen humanen Immunbibliotheken konnten originäre IgE-Antikörper dargestellt werden. Immunbibliotheken werden aus dem B-Zell-Repertoire von Spendern gewonnen. Sie sind in der Regel mit Antigen-spezifischen Antikörpern angereichert, die durch die Affinitätsreifung einen massiven Anstieg der Bindungsaffinität erfahren haben. Bislang wurde nur in wenigen Studien von einer erfolgreichen Klonierung Allergen-spezifischer IgE berichtet (Flicker *et al.*, 2000; Jakobsen, Bodtger, Kristensen, Poulsen, & Roggen, 2004; Laukkanen *et al.*, 2003). Aus diesem Grund war die Epitop-Charakterisierung des hier untersuchten Phl p 5-spezifischen Antikörpers, der einer ϵ -spezifischen kombinatorischen humanen Fab-Bibliothek entstammt, methodologisch und inhaltlich besonders interessant.

5.1 Rekombinante Darstellung und Reinigung der Antikörperkonstrukte

Für alle durchgeführten Untersuchungen war eine Konvertierung der B-Zell-Rezeptoren in rekombinante monoklonale Antikörper eine Grundvoraussetzung, da nur so homogene Zielmoleküle in prinzipiell unbegrenzter Menge produziert werden konnten. Dabei erfolgte für unterschiedliche Applikationen eine Darstellung der Lymphom-Antikörper als lösliche Vollantikörper des IgG-Isotyps, als verkürztes Fab-Fragment sowie als membrangebundener Vollantikörper des IgM-Isotyps. Zur Definition eines IgE-Epitops lag der Phl p 5-spezifische Antikörper bereits in unterschiedlichen Isotypen vor. Für strukturgebende Experimente erfolgte allerdings die Konvertierung in das Fab-Format.

Zur Darstellung der Lymphom-Antikörper konnte in dieser Arbeit auf Rezeptor-Sequenzen einzelner Patienten zurückgegriffen werden. Dazu wurde im Vorfeld basierend auf Patientenmaterial mithilfe geeigneter Oligonukleotide die Amplifikation der spezifitäts-determinierenden V_H- und V_L-Sequenzen durchgeführt. Somit standen für die Epitop-Definition der Lymphom-Antikörper Sequenzen der CLL-Patienten 014, 024 und 044, der immortalisierten Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ca46 sowie als Modell-Antikörper des therapeutischen Antikörpers anti-EGFR-huIgG1 (Matuzumab) zur Verfügung.

Eine Betrachtung der Rezeptor-Sequenzen ließ eine erste Einordnung und Gruppierung der Zielmoleküle zu (S. 71; Tab. 4.1 und 4.2). Der Status aller in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren war unmutiert. Der Krankheitsverlauf von Patienten mit unmutierten CLL-BZR ist in der Regel aggressiver und die Prognose schlechter als bei Patienten mit mutierten BZR. Die Antikörper Ig014- und Ig044-huIgG1 ließen sich aufgrund ihrer Sequenzinformation der CLL-Subgruppe #1 zuordnen, eine der fallmäßig größten Subgruppen der CLL-Kohorte (Stamatopoulos *et al.*, 2007).

5.1.1 Darstellung als humane IgG1

Die Lymphom-Antikörper wurden als humane IgG1-Vollantikörper dargestellt, da dieser Isotyp über ein hohes Expressionsniveau in HEK293-Zellen verfügt und ein nahezu naturidentisches System aufweist. Die erfolgreiche Expression der humanen IgG1 konnte mit ELISA- und Immunoblot-Analysen nachgewiesen werden. Dabei wurden hohe Expressionsraten im Bereich von 950 ng/ml bis 2877 ng/ml für die einzelnen Lymphom-Antikörper beobachtet (S. 73; Tab. 4.3).

Für die nachfolgenden immunbiochemischen sowie strukturellen Analysen war eine Reinigung der Antikörper aus dem Zellkulturüberstand notwendig, um störende Proteine aus dem Kulturmedium zu entfernen. Dafür ist eine Metallchelate-Affinitätschromatographie der mit Histidin fusionierten Proteine über eine Ni-NTA-Matrix geeignet. Hierbei zeigten sich zunächst Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen, die durch die Verwendung eines Imidazol-Gradienten während der Elution stark reduziert werden konnten. Um den Reinheitsgrad der Antikörper weiter zu erhöhen, wurden parallel Affinitätsmatrices unter Verwendung spezifischer Antigene dargestellt. Für die geplanten Analysen war der Reinheitsgrad der Proben ausreichend. Die SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Coomassie-Färbung der gereinigten und vereinten Elutionsfraktionen lieferte im Wesentlichen die erwarteten Ergebnisse. Die Immunglobuline zeigten ein ihrem Molekulargewicht entsprechendes Laufverhalten bei etwa 160 kDa im SDS-PAGE-Gel. Diese Ergebnisse deuteten auf eine korrekte Assemblierung der heterotetrameren Immunglobuline in HEK293-Zellen hin. Lediglich der Ig024-huIgG1 zeigte ein abweichendes Laufverhalten und bildete eine Dreifachbande aus. Auch durch weitere Reinigungsschritte der Ig024-Probe über Protein A und G (Fc-spezifische Matrices) sowie über eine κ -spezifische Matrix konnten diese nicht entfernt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung deutete auf die Ausbildung oligomerer Strukturen hin. Möglichkeiten zur Ausbildung dieser oligomeren Strukturen könnte eine Selbsterkennung des Rezeptors sein. Denkbar wäre auch eine Protein-Degradation oder eine falsche Zusammenlagerung der Antikörper-Ketten.

5.1.2 Darstellung als humane Fab-Fragmente

Ein Fab-Fragment (*fragment antigen-binding*) bildet eine antigenbindende Einheit, die sich aus der leichten Immunglobulinkette (V_L) sowie der V_H - und C_{H1} -Domäne der schweren Kette zusammensetzt. Es handelt sich damit um ein monovalentes Bindungsmolekül. Bleibt die Disulfidbrücke zwischen den beiden Antikörper-Fragmenten bestehen, werden bivalente $F(ab)_2$ -Fragmente generiert. Durch die Ermittlung der Raumstruktur eines Antigen-Fab-Komplexes nach einer Kokristallisation können detaillierte Informationen über die Relevanz einzelner Aminosäuren für die Wechselwirkung beider Bindungspartner gewonnen werden. Aufgrund ihrer starren Struktur eignen sich Fab-Fragmente besonders für eine Analyse von Epitopen. Dabei kristallisieren sie aus und werden mit einer Röntgenstrukturanalyse untersucht. ScFv-Fragmente (*single chain variable fragment*), eine der kleinstmöglichen Bindungs-determinierenden Antikörper-Einheit, sind für derartige Analysen oft zu flexibel.

Zur Herstellung der Fab-Fragmente wurden drei verschiedene Strategien verfolgt: die proteolytische Spaltung von Vollantikörpern, sowie die prokaryotische und eukaryotische Expression.

Da hinter der Darstellung rekombinanter humaner Fab-Fragmente ein kompliziertes wie auch zeit- und kostenaufwändiges Ineinandergreifen verschiedener molekularbiologischer Methoden wie der Entwicklung geeigneter Klonierungs- und Expressionsstrategien steht, wurde zur Produktion der Fab-Fragmente zunächst die Spaltung intakter Immunglobuline angewendet. Immunglobulin-Domänen sind *per se* vergleichsweise inert gegen enzymatische Spaltungsreaktionen. Allerdings können in der flexiblen *Hinge*-Region des Antikörpers mithilfe der Cysteinpotease Papain (die Frucht Papaya enthält hohe Konzentrationen des Enzyms) Aminosäure-Verbindungen aufgetrennt werden. Zur Darstellung von Fab-Fragmenten erfolgte die Papain-Spaltung von jeweils einem Milligramm gereinigtem Antikörper. Dabei wurde die enzymatische Spaltungsdauer variiert. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 4 Stunden auf 6 Stunden wurde der Anteil an ungespaltenem IgG-Antikörper deutlich verringert, allerdings zeigte die Analyse im Immunoblot bereits bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden eine unerwünschte Fragmentierung des Antikörpers. Um Nebenprodukte aus der Probe zu entfernen, wurde an die Reinigung mittels κ -spezifischer Matrix eine Aufreinigung über Protein A angeschlossen. Durch dieses Vorgehen konnte die

Konzentration unerwünschter Nebenprodukte deutlich reduziert werden. Zusammenfassend war jedoch die Ausbeute des Fab-Fragmentes aufgrund der Bildung der Nebenprodukte zu gering und der Aufwand bedingt durch aufeinanderfolgende Reinigungsschritte vergleichsweise hoch. Eine präparative Darstellung würde außerordentlich hohe Mengen von IgG erfordern, was eine Anwendung als generelle Strategie als unrealistisch erscheinen lässt. Aus diesem Grunde erfolgte als alternative Strategie eine Reklonierung der Antikörper in das Fab-Format.

Der Vorteil einer Fab-Expression im prokaryotischen System liegt in einer Zeit- und Kostenersparnis. Zur Darstellung eines Fab-Fragmentes im prokaryotischen System wurde das *StarGate*-Fusionsklonierungssystem von *IBA BioTAGnology* verwendet. Dieses System erlaubt in drei aufeinander folgenden Reaktionsschritten eine Assemblierung der $V_H C_{H1}$ - und $V_L C_L$ -Sequenzen in den gewünschten Expressionsvektor. Obgleich die Fab-Expression in Bakterien ein fest etabliertes Verfahren darstellt, lieferte die initiale Expression des Antikörperfragmentes hier nur eine geringe Ausbeute. Zur Optimierung der Darstellung des Fab-Fragmentes wurden anschließend unterschiedliche Expressionsbedingungen geprüft. Zudem wurde neben dem periplasmatischen Extrakt auch der Gesamtzellextrakt gewonnen und das Fab-Fragment mittels Reinigung über Ni-NTA-Matrix isoliert. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass lediglich in den Fraktionen des Gesamtzellextraktes das Fab-Fragment detektiert werden konnte. Die Expression über Nacht bei 30 °C und 220 rpm lieferte die höchste Ausbeute, welche jedoch noch weiter optimiert werden müsste. Die nachfolgende ELISA-Analyse des dargestellten Fab-Fragmentes ergab eine signifikante Reaktivität mit Phl p 5a und bestätigte die erfolgreiche Darstellung des Phl p 5a-spezifischen Fab-Fragmentes.

Zur Optimierung der prokaryotischen Expression könnte gegebenenfalls ein alternativer Expressionsvektor eingesetzt werden. Der verwendete *E. coli*-Expressionsvektor pASG-IBA-44 besitzt einen Tet-Promotor, welcher in seiner Expressionsstärke nicht mit dem starken T7-Promotor vergleichbar ist. Zudem zeigte die SDS-PAGE-Analyse, dass aus dem periplasmatischen Raum kein Fab-Fragment isoliert werden konnte. Dies deutet auf eine fehlerhafte Translokation des Antikörperfragmentes hin. Eine andere Signalsequenz könnte sich daher positiv auf die funktionelle Expression des Fab-Fragmentes auswirken. Die Expressionskassette des Phl p 5a-spezifischen Fab-Konstruktes in pASG-IBA-44 enthält N-terminal von der V_H -Sequenz eine OmpA- und N-

terminal von der V_L-Sequenz eine PhoA-Signalsequenz. Diese bewirken über das Sec-System (Sec, *secretion*) von *E. coli* die posttranslationale Protein-translokation. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von SRP-Signalsequenzen (SRP, *signal recognition particle*) eine bis zu 700fache Steigerung der Translokation ermöglichen (Steiner *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu dem Sec-System vermitteln SRP-Signalsequenzen eine kotranslationale Zielsteuerung der Proteine. Insgesamt erscheint jedoch die prokaryotische Expression als schwierig. Auch inwieweit die hier erhaltenen Proteine von homogener Qualität sind, was jedoch von entscheidender Bedeutung wäre, ist auf der Grundlage der hier erhaltenen Daten kaum zu beurteilen.

Als zielführendste Strategie stellte sich jedoch die Expression in eukaryotischen Sf9-Insektenzellen heraus. Hierzu erfolgte u.a. eine Optimierung des zugrundeliegenden Expressionsvektors. Dieser verfügte anfänglich über zwei identische gp67-Signalsequenzen. Durch die Modifikation einer der beiden gp67-Sequenzen in Form einer Optimierung der Kodons konnte die Expressionsrate signifikant gesteigert werden. Bei Expressionen von Fab-Fragmenten wurden die Proteine in den Überstand sezerniert und lagen als korrekt gefaltetes Heterodimer in funktioneller Form vor, was durch ELISA-Analyse bestätigt werden konnte. Durch affinitätschromatographische Verfahren konnten bis zu 12 mg des Zielproteins aus 3 l Kulturvolumen erhalten werden.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Expression in Insektenzellen eine ausgezeichnete Strategie darstellt, um hohe Mengen funktioneller Fab-Fragmente zu erhalten. Gründe für diese Überlegenheit gegenüber anderen Verfahren sind sicher in der im Vergleich zu höheren Wirtssystemen wie Säugerzellen erhöhten Expressionsrate, der reduzierten Faltungskontrolle, und der Einfachheit der Kultivierung zu sehen. So erleichtert die Abwesenheit von Serum die nachfolgenden Reinigungsschritte signifikant. Obgleich eine Expression von Fab-Fragmenten in Insektenzellen dokumentiert ist, wird bislang wenig Gebrauch von dieser Strategie gemacht. Dies mag verwundern, allerdings ist eine Realisierung aufwändiger, insbesondere auch finanziell. Die im Rahmen dieser Arbeit für unterschiedliche Fab-Fragmente erhaltenen Ausbeuten bestätigen jedoch die allgemeine Anwendbarkeit. Damit eröffnet das hier etablierte Verfahren die Möglichkeit, substantielle Quantitäten von Fab-Fragmenten darzustellen, die in zukünftigen und derzeit laufenden kristallographische Analysen hinsichtlich ihrer strukturellen Besonderheiten charakterisiert werden.

5.1.3 Darstellung als membrangebundene IgM

Für die Analyse der Interaktion identifizierter Liganden sind grundsätzlich die Affinität, die Spezifität, die sterischen Parameter und die Effekte einer Interaktion zu berücksichtigen. Um ein System zu schaffen indem die zellulären Effekte der Interaktion beobachtet und analysiert werden können, erfolgte die Konvertierung der Lymphom-Antikörper in membrangebundenes IgM. Dies umfasste die Konstruktion eines entsprechenden Expressionsvektors, welcher die vollständige IgM-Sequenz zur Präsentation des Rezeptors auf der Zelloberfläche enthielt. Zur Generierung der IgM-Sequenz mit Transmembrandomäne erfolgte die reverse Transkription von humaner Gesamt-RNA in cDNA und anschließend die Amplifikation mithilfe spezifischer Oligonukleotide. Die einzelnen Klonierungsschritte erforderten eine Optimierung der Temperatur-Bedingungen zur spezifischen Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente. Die Amplifikation der Zielsequenzen konnte durch die Durchführung von Gradienten-PCR-Reaktionen gewährleistet werden. Die erfolgreiche Darstellung der humanen IgM-Sequenz wurde durch Sequenzierung und Vergleich mit Sequenzinformationen der UniProt-Datenbank verifiziert. Es erfolgte eine Transformation von HEK293-Zellen mit dem dargestellten Expressionsvektor. Anschließend wurde durch eine FACS-Analyse überprüft, ob der IgM auf der Oberfläche der Zelle exprimiert wird. Hier konnten IgM-positive Zellen detektiert werden, die mithilfe der *Cell-Sorting*-Funktion des *FACS Aria™ III-Gerätes* steril isoliert und weiterkultiviert wurden. Eine nachfolgende Analyse der Einzelklone ergab allerdings kein positives Ergebnis und die Zellen schienen kein IgM auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Die Ursache hierfür ist vermutlich in der fehlenden Koexpression der IgM-assoziierten Igα/Igβ-Komponente zu sehen. Die Kotransfektion von HEK293-Zellen von IgM- sowie CD79a/CD79b-Vektoren sollte die stabile Expression von IgM-Molekülen ermöglichen. Mithilfe positiver stabiler Transfektanten könnten dann aufschlussreiche zelluläre Assays durchgeführt werden, bei denen funktionelle Untersuchungen der Interaktion mit Liganden durch Ca²⁺-Messungen realisiert werden könnten.

5.1.4 Generierung von Affinitätsmatrices zur spezifischen Reinigung

Affinitätschromatographien mit dem spezifischen Antigen haben das Potential, Proteinlösungen mit sehr hoher Reinheit, Qualität und Konzentration des Zielproteins zu liefern. Aus diesem Grund wurde in zwei Ansätzen exemplarisch Affinitätsmatrices für das Antigen sEGFR sowie den Zielantikörper Phl p 5-IgE generiert. Auf diese Weise sollte die generelle Durchführbarkeit einer hochspezifischen Reinigung sowohl von Antikörper als auch Ligand gezeigt werden. Zur Darstellung der Affinitätsmatrices wurde die hohe Affinität der Chitin-Bindedomäne (CBD) zu Chitin genutzt. Dazu erfolgte die Insertion der Sequenzen von anti-EGFR-scFv sowie Phl p 5a in den CBD-Vektor. Durch diese Fusion von CBD mit dem Interaktionsmolekül, Phl p 5a bzw. anti-EGFR-scFv, wurden Bindungselemente generiert, welches durch Kopplung an immobilisiertes Chitin die Darstellung einer Affinitätsmatrix erlaubte. Die Stabilität dieser Bindung konnte für saure pH-Werte nachgewiesen und der pH-Wert zur Antikörper-Elution ermittelt werden. Eine Proteinfärbung zeigte einen sehr hohen Reinheitsgrad der Elutionsfraktionen und die Reaktivität des Antikörpers wurde im ELISA bestätigt. Eine vergleichende IMAC-Reinigung eines Antikörperkonstruktes aus HEK293-Zellen zeigte hingegen eine deutliche Verunreinigung durch BSA. Ein eventueller Reaktivitätsverlust durch die sauren Elutionsbedingungen ist jedoch nur bedingt zu überprüfen. Durch die Immobilisierung des spezifischen Antigens an die Chitinmatrix über die Bindungsdomäne CBD konnte somit eine effiziente spezifische Methode als Alternative zur Metallchelate-Affinitätschromatographie etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch diese Methode sowohl Antigen als Antikörper spezifisch reinigen lassen. Zur Darstellung weiterer Affinitätsmatrices können die zugrundeliegenden Vektorelemente durch einfache Klonierungsschritte angepasst werden.

5.2 Interaktionsanalysen der Antikörperkonstrukte

5.2.1 Darstellung und Analyse von Mimotopen

Zur Bestimmung von CLL-BZR-Liganden wurden u.a. Bindungsstudien mit definierten Proteinlösungen wie beispielsweise Extrakten bestimmter Zellen durchgeführt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass CLL-Antikörper gemeinsame Epitop-Erkennungsmuster aufweisen (Catera *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2008). Als Antigene wurden dabei vor allem Autoantigene, welche auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen präsentiert werden, sowie bakterielle Liganden identifiziert. Allerdings erscheinen diese Studien in Anbetracht der außerordentlich hohen Anzahl möglicher Antigen-Kandidaten als nicht ausreichend, um die Bindungs-Spezifität von CLL-BZR vollständig zu klären.

Um das Spektrum potentieller Liganden zu erhöhen, wurde daher in dieser Dissertation die Selektion einer artifiziellen, randomisierten Phagen-Peptid-Bibliothek gegen die Zielrezeptoren durchgeführt. Auf diese Weise wurden Peptidliganden identifiziert, sog. Mimotope, welche die Konformation des natürlichen B-Zell-Epitops imitieren (engl. *mimic*, nachahmen; Epitop). Mithilfe dieser Mimotope kann indirekt oftmals über Sequenzhomologien das natürliche Epitop identifiziert werden (Hantusch *et al.*, 2004; Irving, Pan, & Scott, 2001; Mintz *et al.*, 2003; Riemer, Kraml, Scheiner, Zielinski, & Jensen-Jarolim, 2005; Wang & Yu, 2004). Zudem lassen sich anhand der Sammlung ähnlicher, jedoch nicht identischer Peptidsequenzen häufig essentielle Aminosäuren für die Interaktion zu dem Rezeptor ableiten.

Zur Identifikation der CLL-BZR-Epitope wurden Selektionen einer Phagen-Peptid-Bibliothek durchgeführt, welche eine Phagenkollektiv von mehr als 10^9 individuellen Klonen umfasste. Auf der Oberfläche dieser Phagenklone wurden 12er-Peptidsequenzen präsentiert. Die Selektion wurde hierbei so durchgeführt, dass gezielt Phagen isoliert und vermehrt wurden, die in der Paratop-Region des Antikörpers gebunden wurden. Dazu erfolgten bei der Durchführung der Selektion neben drei Positivselektionen auf dem Zielantikörper eine Negativselektion auf einer Isotyp-Kontrolle in Form einer Proteinlösung polyklonaler humaner IgG (Intratect®). Die erfolgreiche Anreicherung spezifisch bindender Phagenklone wurde durch eine polyklonale ELISA-Analyse gezeigt.

Nach der finalen Selektionsrunde wurden einzelne Phagenklone isoliert, amplifiziert und auf ihre Spezifität gegen das Zielmolekül überprüft. Diese positiven Phagenklone wurden einer Sequenzierung unterzogen und so bindende 12er-Peptidsequenzen erhalten. Aus diesen wurden Konsensussequenzen abgeleitet und näher analysiert.

Um initial eine Aussage treffen zu können, inwiefern sich spezifische Phagen unter Verwendung rekombinanter monoklonaler Antikörper anreichern lassen und sich die daraus erhaltenen Peptid-Sequenzen für eine Epitop-Bestimmung eignen, wurde eine Phagen-Selektion gegen den anti-EGFR-Antikörper durchgeführt. Da das Epitop sowie die zugrundeliegende Liganden-Interaktion dieses Antikörpers umfangreich über Röntgenstrukturanalysen von Proteinkristallen charakterisiert wurde (Schmiedel, Blaukat, Li, Knöchel, & Ferguson, 2008), konnten die nach der Selektion erhaltenen Sequenzinformationen mit diesen Daten verglichen werden. Als Schlüsselaminosäuren der anti-EGFR-Ligand-Interaktion wurden nach Schmiedel et al. vier Aminosäuren benannt: **K**454, **T**459; **S**460; **K**463 in der EGFR-Aminosäuresequenz **WK**KLFG**TS**GQ**K**T. Die beiden zentralen Threonin- und Serin-Aminosäuren bilden über ihre Hydroxyl-Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Antikörper-Paratop aus und die umgebenden positiv geladenen Lysin-Reste gehen starke Ionenbindungen mit dem Rezeptormolekül ein. Ein Vergleich dieser Sequenz zur ermittelten Mimotopsequenz **WLDYSTSPRINR** zeigte das hohe Maß an Sequenzübereinstimmung der Peptide insbesondere in den entscheidenden Aminosäureresten. Auch hier sind die zentralen Threonin- und Serin-Reste zu finden; statt eines Lysin-Restes ist in der Mimotop-Sequenz ein positiv geladener Arginin-Rest zu finden. Lediglich der N-terminal gelegene positiv geladene Rest fehlt in der identifizierten Mimotop-Sequenz. Diese Ergebnisse bestätigten die generelle Eignung der Phagen-Peptid-Selektion zur Definition bindungsbestimmender Aminosäurestrukturen.

In analoger Weise wurden Peptidselektionen gegen den Ig014-, Ig024- und Ca46-huIgG1 durchgeführt und für jeden dieser Antikörper Konsensuspeptidsequenzen ermittelt. Für den Ig014-huIgG1 lieferte eine Datenbankanalyse dieser Sequenzen eine Übereinstimmung zu der β -Kette des T-Zell-Rezeptors. Charakteristisch für die CLL ist die Ausbildung von Proliferationszentren in denen ein enger CLL-T-Zell-Kontakt besteht (Ghia *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang könnten die T-Zellen selbst als Antigen-Reservoir für CLL-Zellen fungieren und diese so zur Proliferation anregen.

Ein Vergleich der identifizierten Konsensusmotive des Ig024- und Ca46-huIgG1s lieferte keine eindeutigen Sequenzübereinstimmungen mit Proteinsequenzen der *BLAST*-Datenbank. Dies könnte darin begründet liegen, dass durch die Selektion von Phagen-Peptid-Bibliotheken konformationelle Epitop-Sequenzen erhalten werden. Generell lassen sich bei B-Zell-Epitopen lineare und konformationelle Epitope unterscheiden. Während lineare Epitope einem Abschnitt der Primärsequenz des Antigens entsprechen, werden konformationelle Epitope von Aminosäuren gebildet, die erst durch Faltung der Proteinkette in räumliche Nähe geraten. Ein Beispiel hierfür ist das Epitop des anti-EGFR-Antikörpers. Konformationelle Epitope erschweren die Datenbankanalyse und erfordern eine Anpassung des zugrundeliegenden Algorithmus bei dem beispielsweise die Zugänglichkeit einzelner Aminosäuren mit einbezogen werden sollte.

Um zu verifizieren, dass die beobachtete spezifische Bindung tatsächlich durch das exprimierte Peptid auf der Oberfläche des M13-Bakteriophagen und nicht durch andere Eigenschaften des Phagens vermittelt ist, wurden die Peptide rekombinant sowie synthetisch in einem anderen (Protein)-Kontext produziert.

Die Peptidsequenzen wurden N-terminal mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) fusioniert. Diese Fusion mit MBP bringt einige Vorteile gegenüber den nicht-fusionierten Peptidsequenzen mit sich. Durch die unmittelbare Nachbarschaft der ribosomalen Bindungsstelle im 5'-Bereich der MBP-kodierenden Sequenz wird eine effiziente Initiierung der Translation erreicht, wodurch eine hohe Expressionsrate des MBP-Fusionsproteins im Zytoplasma von *E. coli* erreicht wird und somit zu einer hohen Ausbeute des Zielproteins führt. Ein weiterer Vorteil der MBP-Fusion ist die Löslichkeit-vermittelnde Eigenschaft (Kapust & Waugh, 1999). In der Regel zeigten die untersuchten Peptide eine gute Löslichkeit in Wasser. Lediglich die durch Ig024-huIgG1 identifizierte Bindungs-Sequenz YLPWW besitzt einen isoelektrischen Punkt von pH 5,9 und zeigt eine geringe Löslichkeit in Wasser. In diesem Fall konnte die Löslichkeit durch die Fusion mit dem MBP gewährleistet werden. Bei Abspaltung von MBP könnte das freie Peptid durch eine Anpassung des Lösungsmittels in Form einer pH- bzw. Temperatur-Änderung oder durch die Zugabe eines organischen Lösungsmittels wie DMSO (Dimethylsulfoxid) in Lösung gebracht werden. Weitere Vorteile in der Fusion der Mimotope mit MBP lagen in einer möglichen Detektion mittels eines spezifischen anti-MBP-Antikörpers sowie einer Erhöhung des Molekulargewichtes was eine SDS-PAGE-Analyse der Fusionsproteine ermöglichte.

Um die Zugänglichkeit der Peptidsequenz für die Interaktion zu gewährleisten erfolgte eine Insertion eines Serin-Glycin-Linkers. Die Klonierung der Mimotop-Sequenzen wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Anschließend erfolgte die Expression im prokaryotischen System sowie die Reinigung der MBP-Fusionsproteine unter nativen, nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Expression und Reinigung der MBP-Fusionsproteine ergab in sehr hoher Konzentration vorliegende lösliche Proteine. Durch eine SDS-PAGE-Analyse und nachfolgendem Immunoblot konnte abschließend erfolgreich die Interaktion der Lymphom-Antikörper mit den ermittelten Peptidsequenzen bestätigt werden. Somit standen diese Liganden für weitere Untersuchungen wie beispielsweise SPR-Messungen zur Verfügung, um die zugrundeliegenden Interaktionen weiter zu analysieren.

Um substantielle Mengen der Peptide zu erhalten erfolgte eine chemische Festphasensynthese der Peptide. Hierbei wurden die Peptidsequenzen in zwei Varianten dargestellt: der biotinylierten und unbiotinylierten Form. Die Biotinylierung sollte eine gezielte Immobilisierung des Peptides über die hochaffine Bindung an Streptavidin ermöglichen. Das reine Peptid hingegen eignet sich für eine Anwendung in strukturellen Analysen wie STD-NMR-Analysen oder kristallographischen Analysen. Durch aufeinanderfolgende HPLC-Reinigungen des Peptid-Rohproduktes über eine *reversed phase* C₁₈-Säule konnten Verunreinigungen in den Proben wie Abbruchfragmente erfolgreich entfernt werden. Hierbei erfolgte bei jeder HPLC-Reinigung eine Anpassung des Gradienten, welcher für jedes Peptid individuell ermittelt werden musste. Mithilfe der Maldi-TOF-MS-Analyse wurde der Erfolg der HPLC-Reinigung überprüft. Abschließend wurde die Reaktivität der synthetisierten Peptide mittels einer ELISA-Analyse gezeigt. Durch die chemische Festphasensynthese konnten mehrere Milligramm des Peptides hohen Reinheitsgrades dargestellt werden. Allerdings ist der Aufwand der chemischen Festphasensynthese insbesondere aufgrund der zahlreichen notwendigen HPLC-Reinigungsschritte als ungleich höher im Vergleich zur prokaryotischen Expression zu bewerten.

5.2.2 SPR-spektroskopische Messungen

Eine der entscheidenden Größen in der Funktion von Immunoglobulinen ist sicherlich ihre Affinität zu den jeweiligen Zielstrukturen. Die Affinität der vorliegenden Antikörper für ihre Liganden wurde hier mittels SPR-Verfahren bestimmt. Dabei diente die Analyse der Interaktion zwischen dem Antigen sEGFR und dem Antikörper anti-EGFR-huIgG1 (Matuzumab) der Evaluation der SPR-Messbedingungen, da die Bindungskonstante für die Wechselwirkung dieser Interaktionspartner bekannt ist (Schmiedel, Blaukat, Li, Knöchel, & Ferguson, 2008). Hierbei wurden verschiedene Reagenzien zur effektiven Aufhebung der Rezeptor-Ligand-Interaktion untersucht (Daten nicht gezeigt). Weit verbreitet ist die Auflösung dieser Interaktion durch eine kurzfristige Änderung des pH-Wertes. Allerdings führt ein derartiger pH-*Shift* häufig zum Verlust der Epitop- bzw. Paratop-Funktionalität aufgrund einer Zerstörung der natürlichen Konformation des Proteins, was in einer drastischen Abnahme der Reaktivität der Bindungspartner resultiert und somit die Messergebnisse verfälscht. Aus diesem Grund wurden alternative Puffer zur Regenerierung freier Interaktionsmoleküle überprüft. Eine Möglichkeit zur Aufhebung der Wechselwirkungen ist die Änderung der Ionenstärke in Kombination mit chaotropen Effekten. Als chaotrop werden chemische Substanzen bezeichnet, die geordnete Wasserstoffbrückenbindungen auflösen. Dadurch vermindern sie hydrophobe Effekte und wirken denaturierend auf Proteine. Als chaotropes Reagenz wurde Magnesiumchlorid gewählt. Es wurden Magnesiumchlorid-Lösungen in einem Bereich von 1 M bis 4,5 M zur Aufhebung der sEGFR/anti-EGFR-huIgG1-Interaktion getestet. Es konnte allerdings keine vollständige Regeneration des Antikörpers mithilfe dieser Substanzlösungen erzielt werden, was vermutlich in der hohen Affinität begründet liegt. Daraufhin wurde basierend auf der Publikation von Andersson et al. eine Reihe verschiedener Elutionspuffer auf ihre Effekte hin untersucht. Am zielführendsten stellte sich dabei ein Puffer aus drei Anteilen heraus, der AIW-Puffer, der sich aus einem Teil acidischen Puffer, einem Teil ionischen Puffer und einem Teil Wasser zusammen setzte (Andersson, Areskoug, & Hardenborg, 1999). Dieser Puffer gewährleistete eine Aufhebung der Interaktion von Rezeptor und Ligand unter milden Bedingungen und bei vollständigem Funktionserhalt von Epitop und Paratop. Daher wurde der AIW-Puffer für alle weiteren hier durchgeführten Messungen eingesetzt.

Die SPR-Messung des anti-EGFR-huIgG1s gegen sEGFR ergab eine Bindungskonstante von 37 nM. Dieser Wert stimmt mit der Bindungskonstante von 43 nM der Arbeitsgruppe von Schmiedel et al. sehr gut überein. Bei dem anti-EGFR-Antikörper handelt es sich um einen humanisierten therapeutischen Antikörper, d.h. lediglich die Antigen-Bindungsstellen sind murinen Ursprungs. Der ursprüngliche Antikörper hat in der immunisierten Maus eine Affinitätsreifung erfahren. Dabei steigt die Affinität der murinen Antikörper mit zunehmender Immunreaktion aufgrund der somatischen Mutationen in den Antikörper-Molekülen und der folgenden Selektion der höher affinen Antikörper.

Bei der Bindung des Antikörpers an das MBP-Mimotop wurde eine geringere Bindungskonstante von 900 nM bestimmt. Diese niedrigere Bindungsaffinität des Antikörpers zu der Mimotop-Sequenz ist gegebenenfalls darin begründet, dass eine der vier Antikörper-Antigen-Schlüsselinteraktionen nicht ausgebildet werden kann. Im Unterschied zur EGFR-Epitop-Sequenz ist in der Mimotop-Sequenz N-terminal keine positiv geladene Aminosäure zu finden (sEGFR-Sequenz: WKKLFG**TS**GQ**K**T; Mimotop-Sequenz: WLDYST**TS**PRIN**R**). Daher würden sich weitere Bindungsstudien mit modifizierten Mimotop-Sequenzen anbieten, in denen die vier Schlüsselaminosäuren gezielt verändert wurden. Durch einen kompetitiven ELISA-Assay konnte zudem gezeigt werden, dass die Liganden sEGFR sowie die Mimotop-Sequenz von derselben Paratop-Region des Antikörpers gebunden werden. Diese Daten bestätigen klar die Hypothese eines Bindungsmodus, der für sEGFR und das Mimotop vergleichbar ist.

Die höchsten Affinitäten wurden für den Ca46-huIgG1 gegen das Mimotop ermittelt mit einer Bindungskonstante von 1,5 nM sowie für den Ig024-huIgG1 gegen das Mimotop mit einer Bindungskonstante von 6,6 nM. Diese hohen Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich deuten auf eine ausgesprochen hohe Spezifität der Rezeptor-Ligand-Interaktion hin. Dieses Erkenntnis ist für den Erhalt der entscheidenden Interaktionsstrukturen von Bedeutung, die sich in der Konservierung spezifischer Aminosäuren innerhalb der erhaltenen Peptidsequenzen und den daraus abgeleiteten Konsensussequenzen widerspiegeln. Sie unterstützt damit die Selektion von Peptid-Liganden als zielführenden Ansatz zur Identifizierung von antigenen Strukturen. Weiterhin waren die erhaltenen hohen SPR-Affinitäten zu erwarten, da die Peptide unter stringenten Bedingungen selektiert worden waren und somit nur die Bindungssequenzen mit starken Wechselwirkungen isoliert und für weitere

Selektionsrunden amplifiziert wurden. Es könnte nun ermittelt werden inwiefern sich diese Affinitäten durch die Selektion alternativer Bibliotheken möglicherweise steigern lassen. Die Paratop-Region jedes Antikörpers ist Klon-spezifisch sowie höchst individuell und könnte Peptiden verschiedener Länge und bestimmter Konformation unterschiedlich gut zugänglich sein. So konnte beispielsweise für das Epitop des in dieser Arbeit untersuchten Phl p 5-spezifischen Antikörpers gezeigt werden, dass es sich bei der Erkennungsregion des Antikörpers um ein konformationelles Epitop handelt. Wird diese Konformation zerstört, findet keine Bindung des Antikörpers statt. Weiterhin haben Banken längerer Peptide theoretisch den grundsätzlichen Vorteil, dass sie höhere Bindungsaffinitäten ermöglichen sollten. Allerdings geht bei Verlängerung der präsentierten Peptidsequenz die Diversität der Bibliotheken zurück und die einzelnen Aminosäurepositionen werden nur noch unzureichend randomisiert, da die maximale Phagenklonzahl einer Bibliothek etwa 10^9 beträgt.

Eine Steigerung der Affinität der CLL-Antikörper für spezifische Peptide wäre insofern interessant, da durch die Fusion mit Toxinen die entarteten Lymphom-Zellen gezielt eliminiert werden könnten.

Der Ig014-huIgG1 zeigte für die Bindung an das MBP-Mimotop eine geringere Affinität mit einer Bindungskonstante von 75 nM und für MBP-Vimentin 280 nM. Diese geringere Affinität könnte zum einen darin begründet liegen, dass wie bereits erläutert eine andere Phagen-Bibliothek für die Selektion mit diesem Antikörper geeigneter gewesen wäre. Zum anderen könnte es an der Fusion des Peptides an das MBP-Protein liegen. Dieser *Tag* könnte die Zugänglichkeit zu der kurzen Peptidsequenz limitieren und sich dadurch nachteilig auf die Interaktion zum Antikörper auswirken. Vimentin wurde von Binder et al. mittels 2D-Gelelektrophorese von Proteinextrakten als Interaktionspartner des Ig014-huIgG1 identifiziert. Die geringe Affinität zu diesem Zytoskelett-Protein könnte daraus resultieren, dass der Ig014-Antikörper keine Affinitätsreifung zu seinem Antigen erfahren hat. Die unmutierten CLL-Antikörper zeigen häufig ein polyreaktives Erkennungsmuster, wobei den einzelnen Subgruppen spezifische Reaktivitätsprofile zugeordnet werden konnten (Agathangelidis, Ntoufa, & Stamatopoulos, 2013). Eine weitere Ursache für die niedrige Bindungskonstante des Ig014-huIgG1 zu MBP-Vimentin könnte sein, dass Vimentin in seinem natürlichen zellulären Milieu posttranslationale Modifikationen erfährt. Typisch ist die Phosphorylierung sowie Citrullinierung von Vimentin. Bei der Citrullinierung von Proteinen wird die Aminosäure

Arginin in die atypische Aminosäure Citrullin umgewandelt. Derartig modifizierte Proteine werden häufig vom Immunsystem als körperfremd erkannt und lösen Autoimmunreaktionen aus. So ist die Citrullinierung des Vimentins wesentlich an der Entwicklung der *Rheumatoiden Arthritis* beteiligt. Bei der Betrachtung der Ig014-Mimotop-Sequenz fällt der hohe Anteil der Aminosäure Arginin auf. Um das Epitop des Ig014-huIgG1 näher zu definieren, bietet sich eine Citrullinierung der Mimotop- sowie Vimentin-Sequenz an. Weiterhin sollten Bindungsstudien mit T-Zell-Rezeptor-Fragmenten erfolgen, um eine Reaktivität mit diesem Antigen zu untersuchen.

5.2.3 DLS-Messungen und Kristallisation der Antikörperkonstrukte

Um Daten zum Vorliegen von sich selbst ausbildenden Struktur der Antikörper im wässrigen Milieu unter nicht-denaturierenden Bedingungen zu erhalten, wurden DLS-Analysen der Lymphom-Antikörper durchgeführt. Für den Ig014-huIgG1 sowie den therapeutischen Antikörper Xolair® konnte die Monodispersität der Antikörper-Moleküle klar gezeigt werden. Der Ig024-huIgG1 zeigte bei dieser Analyse abweichende hydrodynamische Radien. Interessanterweise deuten diese Daten klar auf eine Oligomerisierung des Ig024-huIgG1 hin. Vergleichend wurden für das rekombinant dargestellte Ig014-Fab-Fragment DLS-Messung durchgeführt, um Kriterien für die Kristallisierbarkeit des Proteins zu bestimmen. Auch hierbei konnte die Monodispersität des Ig014-huIgG1-Fabs nachgewiesen werden, was zum einen ein Kriterium für eine Kristallisierbarkeit des Proteins ist und zum anderen bestätigt, dass das Format des Antikörpers nicht von Bedeutung für eine Aggregation ist. Damit unterstützen die Daten die Außergewöhnlichkeit des Verhalten des Ig024-huIgG1s. Die Darstellung von Proteinkristallen der Fab-Fragmente für die finale Röntgenstrukturanalyse wird derzeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Andersen der Universität Aarhus durchgeführt und erste Kristallstrukturen der Zielproteine deuten auf die Kristallisierbarkeit der Proteine hin (S. 112).

5.3 Epitop-Charakterisierungen

5.3.1 Epitop-Analyse des Ig024-Lymphom-Antikörpers

Die Daten der SDS-PAGE-Analyse sowie der DLS-Messung belegen klar, dass der Ig024-huIgG1 eine abweichendes Verhalten gegenüber den anderen Antikörpern zeigt, und lassen eine Ausbildung oligomerer Strukturen vermuten. Im Einklang mit dieser Beobachtung publizierten Dühren von Minden et al. die Selbsterkennung eines CLL-BZRs durch Bindung der CDR3-Region an die Aminosäuresequenz VRQ in der FR2-Region der V_H-Domäne (Dühren-von Minden et al., 2012). Durch eine Mutagenese dieser spezifischen V_H-Sequenz wurde die Liganden-unabhängige Aktivierung verhindert und somit das Epitop verifiziert. Dazu erfolgten Ca²⁺-Messungen, die indirekt auf eine Aktivierung der Rezeptor-tragenden Zelle schließen ließen. Ein Vergleich der Sequenzinformationen des in der Veröffentlichung von Dühren von Minden et al. untersuchten CLL-BZRs zu dem in dieser Dissertation untersuchten Lymphom-Antikörper Ig024-huIgG1 zeigte interessanterweise eine vollkommene Identität der bindungs-determinierenden V_H-CDR3-Region. Aus diesem Grund erfolgte eine genauere Analyse der VRQ-Sequenz, um beurteilen zu können inwiefern diese Sequenz möglicherweise ebenfalls entscheidend für eine Interaktion mit dem Ig024-Paratop ist. Ein Vergleich der Sequenz zu den Daten der IMGT-Datenbank (*immunogenetics*, IMGT) zeigte die hohe Konservierung der VRQ-Sequenz in der humanen V_H-Domäne: 70 % (V); 93 % (R); 96 % (Q). Der Ig024-huIgG weist diese VRQ-Sequenz ebenfalls in seiner V_H-Domäne auf (Abb. 5.1).

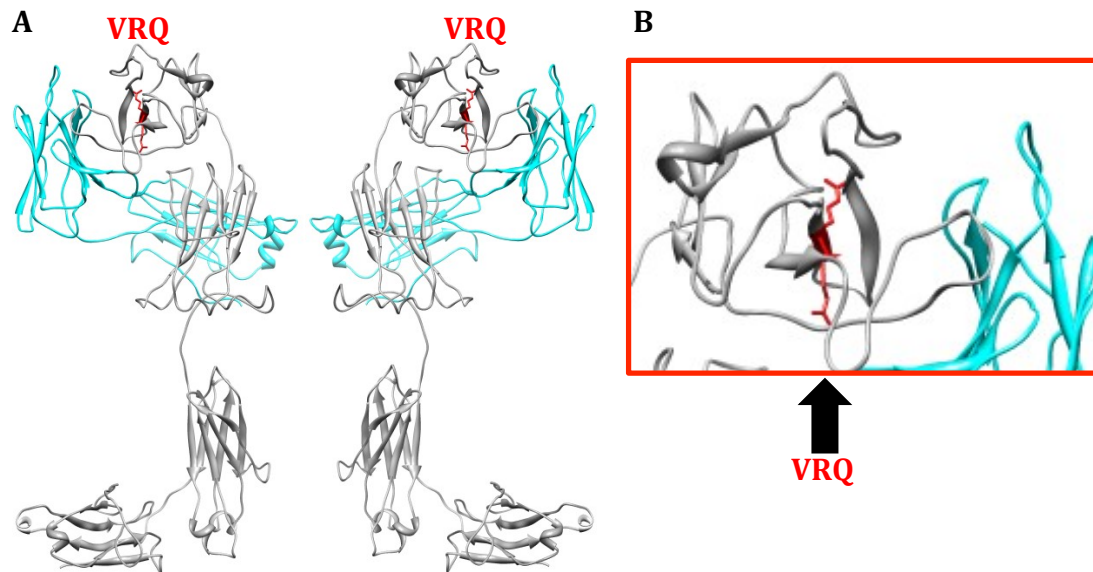


Abb. 5.1: Epitop-Aminosäuresequenz VRQ in der Raumstruktur des Ig024-huIgG1.

A: Die Raumstruktur des humanen Ig024-Vollantikörpers ist gezeigt. Die schwere Immunglobulin-Kette ist grau, die leichte Immunglobulin-Kette türkis dargestellt. Die VRQ-Sequenz innerhalb der V_H -Domäne ist rot markiert. Die Darstellung erfolgte mithilfe von SWISS-MODEL und UCSF Chimera.

B: Vergrößerung der Paratop-Region des Antikörpers. Die VRQ-Sequenz ist rot markiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit selektierte Mimotop-Sequenz des Ig024-huIgG1 lautet YLPWW. Ein Vergleich dieser Sequenz zur Antikörper-Sequenz zeigte eine hohe Sequenzübereinstimmung zu einer YLAWY-Sequenz in der FR2 der V_L -Domäne. Diese Aminosäurereste sind nach der IMGT-Datenbank ebenfalls stark in der humanen Antikörper-Sequenz konserviert: 67 % (Y); 96 % (L); 46 % (A); 100 % (W); 87 % (Y). Eine Betrachtung beider Sequenzen, der VRQ- sowie YLAWY-Sequenz, im dreidimensionalen Strukturmodell des Ig024-huIgG1 zeigte den engen Kontakt dieser Regionen, sodass eine gemeinsame Bildung eines Epitops denkbar ist (Abb. 5.2).

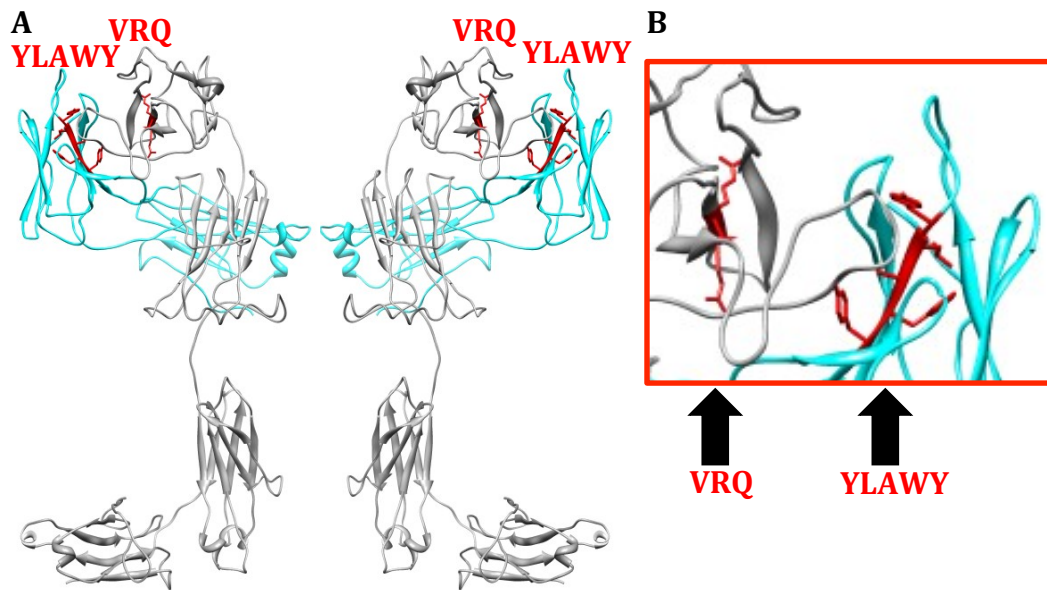


Abb. 5.2: Epitop-Aminosäuresequenzen VRQ und YLAWY in der Raumstruktur des Ig024-huIgG1.

A: Die Raumstruktur des humanen Ig024-Vollantikörpers ist gezeigt. Die schwere Immunglobulin-Kette ist grau, die leichte Immunglobulin-Kette türkis dargestellt. Die VRQ-Sequenz innerhalb der V_H -Domäne ist rot markiert. Die Darstellung erfolgte mithilfe von SWISS-MODEL und UCSF Chimera.

B: Vergrößerung der Paratop-Region des Antikörpers. Die VRQ-Sequenz ist rot markiert.

Um die Hypothese dieses Epitops zu verifizieren, sollte eine gezielte Mutagenese der einzelnen Aminosäuren in Ig024-huIgG1-Sequenz durchgeführt werden. Dafür bietet sich eine serielle Substitution der geladenen und hydrophoben Aminosäuren der VRQ- bzw. YLAWY-Sequenz in eine unpolare Aminosäure wie Alanin an. Dieser Alanin-Scan sollte weiteren Aufschluss über die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die Rezeptor-Interaktion liefern.

Anschließend bleibt zudem zu klären, in welcher Weise die Ig024-BZR bei einer Selbsterkennung miteinander interagieren. So wäre sowohl eine inter- als auch intramolekulare Interaktion der BZR denkbar.

Das Laufverhalten des Ig024-Antikörpers bei der SDS-PAGE-Analyse, die Daten der DLS- und SPR-Messung sowie die Tatsache, dass mit dem CLL-Antikörper eine Peptid-Selektion durchgeführt werden konnte, dokumentierten intermolekulare Interaktionen und lassen daher eine primär intramolekulare Wechselwirkung als unwahrscheinlich erscheinen. Bei einer intramolekularen Interaktion der BZR sind die Rezeptor-Bindungsstellen besetzt und für weitere Interaktionen mit Peptiden bzw. Rezeptoren nicht zugänglich. In diesem Fall wäre die Detektion oligomerer Strukturen, die Bestimmung von Affinitäten und Selektion von Peptiden nicht möglich gewesen.

Eine Betrachtung der dreidimensionalen Struktur humaner Antikörper zeigt, dass die Zugänglichkeit der VRQ- und YLA_{WY}-Motive eingeschränkt ist. Allerdings basieren die analysierten Strukturmodelle auf Daten humaner Antikörper und der Kontext zu B-Zell-Rezeptor-gesteuerten lymphatischen Erkrankungen fehlt. Die tatsächliche Struktur von CLL-BZR ist bislang unbekannt. Die Sequenzanalyse der CDR3-Region der schweren Immunglobulin-Kette zeigt, dass diese Region bei CLL-Patienten mit $19,6 \pm 3$ Aminosäuren deutlich länger als beim Durchschnitt nicht entarteten B-Zellen ist ($14,6 \pm 4,3$ Aminosäuren; Agathangelidis, Ntoufa, & Stamatopoulos, 2013). Die CDR3-Region des Ig024-huIgG1 umfasst sogar 23 Aminosäuren. Die CDR3-Regionen sind häufig sehr hydrophobe Sequenzen und beeinflussen die Struktur der variablen Antikörper-Regionen maßgeblich. Hydrophobe Sequenzen haben generell die Tendenz sich mit hydrophoben Sequenzen zusammenzulagern. Hiermit übereinstimmend besitzt die selektierte Ig024-Bindungssequenz mit einem Leucin-, einem Prolin- und zwei Tryptophan-Resten stark hydrophoben Charakter (YLPWW). Um weitere Erkenntnisse zur Pathogenese der CLL zu erhalten, ist daher die Ermittlung der Struktur des Ig024-Antikörpers von hoher Relevanz. Mithilfe strukturgebender Techniken wie einer NMR- oder Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen könnte die Frage der inter- oder intramolekularen Wechselwirkung klar beantwortet werden. Darüber hinaus könnten aus den Strukturdaten des Ig024-Antikörpers Erkenntnisse hinsichtlich der generellen Aktivierung von B-Zell-Rezeptoren gewonnen werden.

5.3.2 Epitop-Analyse des Phl p 5-spezifischen Antikörpers

Die Quervernetzung von rezeptorgebundenen IgE-Antikörpern durch Allergene ist das Schlüsselereignis der Typ-I-Allergie. Die Charakterisierung von B-Zell-Epitopen ist daher sowohl für die Diagnostik als auch die kurative und präventive spezifische Immuntherapie allergischer Erkrankungen von außerordentlichem Interesse. Zur Analyse IgE-reaktiver Strukturen stand in der vorliegenden Arbeit ein Phl p 5-spezifisches humanes Antikörperkonstrukt zur Verfügung. Phl p 5 ist ein Majorallergen des Wiesenlieschgrases und kommt in den Isoformen Phl p 5a und Phl p 5b vor.

Zur Charakterisierung des Epitops wurde zunächst die Mutante Phl p 5a-F1, die der N-terminalen Domäne von Phl p 5a entspricht, exprimiert und auf eine Reaktivität mit dem

monoklonalen Antikörperkonstrukt geprüft. Mit Hilfe des *IMPACT*TM-Systems wurde Phl p 5a-F1 als CBD-Intein-Fusionskonstrukt dargestellt und rekombinant in *E. coli* ER2655-Zellen exprimiert. Dieses System erlaubt die Thiol-induzierte Abspaltung des CBD-Intein-Tags und macht so eine einfache Isolation des reinen Proteins ohne Affinitäts-Tags möglich. Einschränkungen ergeben sich allerdings beim Molekulargewicht eines Proteins bzw. Peptids, das ausreichend groß sein sollte, um es nachfolgend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder einer ähnlichen Methode nachweisen zu können. Nach Reinigung von Phl p 5a-F1 erfolgte die Analyse der Antikörper-Reaktivität mittels Immunoblot. Es konnte eine Bindung des allergenspezifischen Antikörperkonstruktes an Phl p 5a-F1 nachgewiesen und somit die Epitop-Struktur auf die N-terminale Domäne von Phl p 5a eingegrenzt werden.

Anschließend erfolgte zur weiteren Eingrenzung der Erkennungsregion des allergenspezifischen humanen Antikörperkonstruktes die Konstruktion dreier Phl p 5a-Deletionsmutanten. Phl p 5b weist im Vergleich zu Phl p 5a N-terminal eine Deletion von 14 Aminosäuren auf. Diese bildet bei Phl p 5a eine *Loop*-Struktur zwischen der zweiten und dritten α -Helix der N-terminalen Domäne und wäre für eine Antikörperbindung gut zugänglich. Um die Relevanz dieser Struktur für die Erkennung des rekombinanten humanen Antikörpers zu überprüfen, enthielten die generierten Mutanten diesen Bereich als zentrales Element. Dabei wurden weitestgehend die umgebenden α -helikalen Sequenzen erhalten, um die natürliche Konformation des *Loops* zu gewährleisten. Die Klonierung und Expression der Deletionsmutanten erfolgte analog zu Phl p 5a-F1 als CBD-Intein-Fusionsprotein in *E. coli* ER2655-Zellen. Mittels Immunoblot wurden Zelllysate nicht-induzierter und induzierter Zellen der drei Deletionsmutanten auf eine Reaktivität mit dem allergenspezifischen humanen Antikörperkonstrukt geprüft. Es konnte die Bindung des rekombinanten humanen Antikörpers an CBD-Intein-Phl p 5a-F2 und CBD-Intein-Phl p 5a-F3 detektiert werden; CBD-Intein-Phl p 5a-F4 zeigte hingegen keine Reaktivität. Die Expression von CBD-Intein-Phl p 5a-F4 konnte jedoch mit Hilfe des polyklonalen *rabbit* anti-CBD-IgG nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren insofern bemerkenswert, weil die Mutante Phl p 5a-F4 exakt den überlappenden Sequenzbereich der Mutanten Phl p 5a-F2 und Phl p 5a-F3 repräsentierte. Eine mögliche Erklärung war, dass die umgebenden α -helikalen Sequenzabschnitte nicht ausreichten, um die *Loop*-Konformation zu erhalten.

Aus diesem Grunde wurde nachfolgend ein Peptid aus 29 Aminosäuren über flankierende Cystein-Reste zyklisiert und als pIII-Fusionsprotein auf der Oberfläche des M13-Bakteriophagen präsentiert. Auf diese Weise konnte die natürliche Konformation des *Loops* auch nach einer Deletion der umgebenden stabilisierenden α -Helices erhalten werden. Durch die gezielte Präsentation auf der Oberfläche des Phagen wurde zudem die Zugänglichkeit des Peptids ermöglicht. Zur Herstellung dieser Phagen wurde die *Loop*-kodierende Sequenz in den Vektor pHEN2 kloniert. Nach der Darstellung und Isolierung der *Loop*-präsentierenden Phagen wurde die Reaktivität des allergenspezifischen humanen Antikörperkonstruktes mittels einer ELISA-Analyse überprüft. Es konnte eine signifikante Bindung des rekombinanten humanen Antikörpers an die *Loop*-präsentierenden Phagen nachgewiesen werden. Um die Relevanz der *Loop*-Region für die Antikörpererkennung zu untermauern, bietet sich nun eine lösliche Expression des zyklischen *Loops* und anschließende Konkurrenzexperimente mit Phl p 5a-F1 an. Des Weiteren könnte eine systematische Mutationsanalyse Aufschluss über die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Antigen-Antikörper-Interaktion liefern. Charakteristisch für B-Zell-Epitope sind geladene und hydrophobe Aminosäuren (Mine und Wei Zhang, 2002). Bufe *et al.* (2006) publizierten weiterführend, dass insbesondere Lysinresten eine Bedeutung in der Allergen-Antikörper-Interaktion zukommen könnte. Durch die gezielte Mutagenese einzelner Lysinreste in der C-terminalen Domäne von Phl p 5b konnten Bufe *et al.* die Allergenität des Proteins wesentlich verringern. In der Sequenz des Peptids, das in dieser Arbeit auf der Oberfläche des Phagen präsentiert wurde, sind drei Lysin-Reste zu finden. Diese könnten in Vollängen-Mutanten substituiert und anschließend die Reaktivität der Mutanten mit dem Phl p 5a-spezifischen Antikörperkonstrukt überprüft werden. Nach dieser Eingrenzung des Epitops sollte eine Beurteilung der klinischen Relevanz folgen.

Insgesamt konnten somit Schlüsselansätze zur Identifizierung von authentischen IgE-Epitopen erfolgreich angewandt werden. Die Identifizierung derartiger IgE-Epitope ermöglicht die Generierung von hypoallergenischen Derivaten, die sich bei weitgehendem Erhalt der T-Zell-Reaktivität durch ein reduziertes IgE-Bindungsvermögen auszeichnen. Sie sind daher insbesondere für die spezifische Immuntherapie geeignet.

6 Zusammenfassung

Ein Meilenstein in der Erforschung der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) war die Entdeckung, dass etwa ein Drittel aller CLL-Fälle quasi-identische, stereotype B-Zell-Rezeptoren exprimiert. Die Rezeptoren weisen hohe Übereinstimmungen in der CDR3-Region der schweren Immunglobulin-Kette auf. Diese Homologien immungenetischer Parameter führen zu der Annahme, dass es bestimmte Gruppen von Antigenen gibt, die durch die B-Zell-Rezeptoren der Lymphom-Zellen erkannt werden und so zu deren Überleben und Proliferation entscheidend beitragen.

Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Dissertation für Rezeptoren bestimmter Lymphom-Patienten überprüft, bislang unbekannte Epitope identifiziert und Bindungsmuster definiert werden. Dazu wurden basierend auf den Rezeptor-Sequenzdaten monoklonale Antikörper generiert. Mit Hilfe dieser Rezeptormoleküle wurden Phagen-Peptid-Bibliotheken selektiert, um Mimotope zu identifizieren. Dabei handelt es sich um synthetische Peptide, welche die Konformation des Epitops imitieren. Die Sequenz- und Datenbank-Analyse mit den Mimotopen führte zur Identifikation essentieller Interaktionsstrukturen sowie potenzieller natürlicher Antigene, die durch die Lymphomzellen gebunden werden. Es wurden autoantigene Strukturen in Form der β -Kette des T-Zell-Rezeptors sowie ein Sequenzmotiv in der FR2 der V_L-Domäne der Immunglobulin-Kette als Bindungsstrukturen ermittelt, wobei die letztere Bindungsreaktion in einer Selbsterkennung des Rezeptors resultierte.

Weiterhin dokumentierten Interaktionsanalysen mit SPR-basierten Verfahren erstmalig die hohe Affinität der B-Zell-Rezeptoren zu ihren Liganden. Ein Befund, der eine vergleichsweise hohe Rezeptor-Spezifität nahelegt. Diese Erkenntnis ist für den Erhalt der entscheidenden Interaktionsmoleküle zwischen Rezeptor und Ligand von Bedeutung. Sie unterstützt die erfolgreiche Selektion synthetischer Peptid-Liganden und damit eine Methode mit der antigene Strukturen ermittelt werden können.

Eine außerordentliche Rezeptor-Spezifität sowie -Affinität ist ein verbindendes Element beider Erkrankungen, welche sich auch im Kontext der Typ-I-Allergie zeigt: hier ist die Quervernetzung von rezeptorgebundenen IgE-Antikörpern durch Allergene das Schlüsselereignis der allergischen Reaktion.

Um ein IgE-Epitop zu definieren, wurde ein humaner Antikörper genutzt, der eine Spezifität zu dem Gräserpollen-Majorallergen Phl p 5 aufwies. Eine rekombinante Konstruktion verschiedener Allergen-Varianten ermöglichte, dass essenzielle Strukturen der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung bestimmt werden konnten. So wurde erstmalig ein originäres Phl p 5-IgE-Epitop bestimmt.

Abschließend sollte durch die Anwendung strukturgebender Techniken eine Feindefinition der ermittelten Epitope erfolgen. Dazu wurde die Darstellung von Fab-Fragmenten mittels proteolytischer Spaltung intakter Immunglobuline sowie prokaryotischer und eukaryotischer Expression etabliert und evaluiert. Weiterhin wurden zur spezifischen Reinigung der Zielmoleküle Affinitätsmatrices generiert und Peptidliganden synthetisiert

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse von Rezeptor-Epitopen und -Interaktionen trägt in erheblichem Maße zum Verständnis der Erkrankungen bei. Darüber hinaus bieten die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse großes Potenzial für neue und hochspezifische Therapien. So stellen die in dieser Arbeit untersuchten B-Zell-Rezeptoren entarteter Lymphomzellen aufgrund ihrer hohen Liganden-Affinität und -Spezifität optimale therapeutische Zielstrukturen für toxische Peptide dar. Bei Allergien ermöglicht die Identifizierung von IgE-Epitopen des Weiteren die Herstellung von Allergen-Varianten für eine sicherere und effektivere spezifische Immuntherapie, als dies bisher möglich war.

7 Abstract

A milestone in the research on chronic lymphocytic leukemia (CLL) was the discovery that about a third of all cases of CLL express practically identical, stereotype B-cell receptors. These receptors show high similarities in the CDR3 region of the heavy chain domain in immunoglobulins. These homologies in immunogenetic parameters lead to the assumption that certain groups of antigens are recognized by the B-cell receptors of lymphoma cells, thereby contributing decisively to their survival and proliferation.

In this dissertation, this hypothesis was examined to test for receptors in selected lymphoma patients, identify previously unknown epitopes, and define patterns of binding. For this purpose, monoclonal antibodies were generated based on receptor sequence data. These receptor molecules were used to select phage display peptide libraries in order to identify mimotopes. These are synthetic peptides that mimic the conformation of the epitope. The sequence and database analysis with mimotopes led to the identification of essential interaction structures and potential natural antigens that are bound by lymphoma cells. Autoantigen binders were found in the form of the beta chain of T-cell receptors, and in a sequence pattern in the FR2 of the VL domain of the immunoglobulin chain, whereby the latter binding reaction resulted in self-recognition of the receptor.

Interaction analyses using SPR-based methods also documented for the first time the high affinity of B-cell receptors to their ligands. This finding suggests that there is comparatively high receptor specificity. This insight is important for preserving the crucial interaction molecules between receptors and ligands. It supports the successful selection of synthetic peptide ligands and thereby a method for determining antigenic structures.

An extraordinary receptor specificity and affinity is a unifying element for both diseases, also seen in the context of Type I allergies. Here the cross-linking of receptor-bound IgE antibodies by allergens is the key event in allergic reactions.

To identify an IgE epitope, a human antibody was used that has specificity to the major allergen from grass pollen, Phl p 5. A recombinant construction of different allergen

variants made it possible to determine essential structures of receptor-ligand interaction. In this way, an original Phl p 5 IgE epitope was identified for the first time.

Finally, structure-lending techniques were applied to attain a fine definition of the epitope. For this purpose, the generation/production of Fab fragments by means of proteolytic cleavage of intact immunoglobulins as well as prokaryotic and eukaryotic expression was established and evaluated. Furthermore, affinity matrices were generated for the specific purification of target molecules, and peptide ligands were synthesized.

The analysis of receptor epitopes and receptor interactions carried out during the work on this dissertation contributes significantly to understanding the diseases. Furthermore, the insights gained offer great potential for new and highly specific medical treatment. Due to their high ligand affinity and specificity, the B-cell receptors of the abnormal lymphoma cells that were studied are optimal therapeutic target structures for toxic peptides. Regarding allergies, the identification of IgE epitopes makes it possible to design allergen variants for safer and more effective immunotherapy than was previously possible.

8 Literatur

- Agathangelidis, A., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Brochet, X., Murray, F., Yan, X.-J., Stamatopoulos, K. (2012). „Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies.“ *Blood*, 119(19), 4467–75. doi:10.1182/blood-2011-11-393694.
- Akdis, Cezmi A; Blaser, Kurt; Akdis, Mübeccel (2004a): „Apoptosis in tissue inflammation and allergic disease.“ In: *Current opinion in immunology*. 16 (6), pp. 717-23.
- Akdis, Mübeccel *et al.* (2004b): „Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells.“ In: *The Journal of experimental medicine*. 199 (11), pp. 1567-75.
- Akdis, Cezmi A; Valenta, Rudolf (2006): „Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy.“ In: *Nature*. 6 , pp. 761-771.
- Andersson, Kerstin; Lidholm, Jonas (2003): „Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 130 (2), pp. 87-107.
- Asher, M Innes *et al.* (2006): „Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys.“ In: *The Lancet*. 368 (9537), pp. 733-743.
- Ball, T *et al.* (2009): „Reducing allergenicity by altering allergen fold: a mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination.“ In: *Allergy*. 64 (4), pp. 569-80.
- Bacchetta, Rosa; *et al.*, (2007): „Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 120 (2), pp. 227-35; quiz 236-7.
- Bachert C, Wiesmüller A. 2002. Allergie und Umwelt. 1. Auflage Bremen: UNI-MED SCIENCE.
- Barrios, Yvelise; Jirholt, Pernilla; Ohlin, Mats (2004): „Length of the antibody heavy chain complementarity determining region 3 as a specificity-determining factor.“ In: *Journal of molecular recognition: JMR*. 17 (4), pp. 332-8.
- Becker, W M *et al.* (1995): „Molecular characterization of timothy grass pollen group V allergens.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 107 (1-3), pp. 242-4.
- Beretta, B *et al.* (2001): „Antigenic determinants of bovine serum albumin.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 126 (3), pp. 188-95.

- Berzofsky, J A (1985): „Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure.“ In: *Science (New York, N.Y.)*. 229 (4717), pp. 932-40.
- Bjorkman, P J; Parham, P (1990): „Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules.“ In: *Annual review of biochemistry*. 59 , pp. 253-88.
- Bomben, R., Dal-Bo, M., Benedetti, D., Capello, D., Forconi, F., Marconi, D., Gattei, V. (2010). „Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features.“ *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(2), 620–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1638
- Bousquet, J; et al.,(1998): „Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 102, pp. 558-62.
- Bredehorst, R; David, K (2001): „What establishes a protein as an allergen?“ In: *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 756 (1-2), pp. 33-40.
- Bufe, A *et al.* (1995): „Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase.“ In: *FEBS letters*. 363 (1-2), pp. 6-12.
- Bufe, A *et al.* (1996): „Crystallization and preliminary diffraction data of a major pollen allergen. Crystal growth separates a low molecular weight form with elevated biological activity.“ In: *The Journal of biological chemistry*. 271 (44), pp. 27193-6.
- Bufe, A *et al.* (2006): „Lysine as a critical amino acid for IgE binding in Phl p 5b C terminus.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 140 (4), pp. 285-94.
- Burkitt, D. (1958). „A sarcoma involving the jaws in African children.“ *The British Journal of Surgery*, 46(197), 218–23.
- Cai, J., Humphries, C., Richardson, A., & Tucker, P. W. (1992). „Extensive and selective mutation of a rearranged V_H5 gene in human B cell chronic lymphocytic leukemia.“ *The Journal of Experimental Medicine*, 176(4), 1073–81.
- Capello, D., Zucchetto, A., Degan, M., Bomben, R., Dal Bo, M., Efremov, D. G., Gattei, V. (2006). „Immunophenotypic characterization of IgVH3-72 B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL).“ *Leukemia Research*, 30(9), 1197–9. doi:10.1016/j.leukres.2005.11.019.
- Chapman, C. J., Wright, D., & Stevenson, F. K. (1998). „Insight into Burkitt's lymphoma from immunoglobulin variable region gene analysis.“ *Leukemia & Lymphoma*, 30(3-4), 257–67. doi:10.3109/10428199809057539
- Chiorazzi, N., Hatzi, K., & Albesiano, E. (2005). „B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens.“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1062, 1–12. doi:10.1196/annals.1358.002
- Chiorazzi, N., Rai, K. R., & Ferrarini, M. (2005). „Chronic lymphocytic leukemia.“ *The New England Journal of Medicine*, 352(8), 804–15. doi:10.1056/NEJMra041720

- Cookson, W (1999): „The alliance of genes and environment in asthma and allergy.“ In: *Nature*. 402 (6760 Suppl), pp. B5-11.
- Damle, R. N., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Fais, F., Yan, X.-J., Chiorazzi, N. (2002). „B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes.“ *Blood*, 99(11), 4087–93.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Chiorazzi, N. (1999). „Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.“ *Blood*, 94(6), 1840–7.
- DeFranco, A. L. (1997). „The complexity of signaling pathways activated by the BCR.“ *Current Opinion in Immunology*, 9(3), 296–308.
- Del Giudice, I., Chiaretti, S., Tavoraro, S., De Propriis, M. S., Maggio, R., Mancini, F., Foà, R. (2009). „Spontaneous regression of chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic features of 9 cases.“ *Blood*, 114(3), 638–46. doi:10.1182/blood-2008-12-196568.
- Dühren-von Minden, M., Übelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M. P., Buchner, M., Jumaa, H. (2012). „Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling.“ *Nature*, 489(7415), 309–12. doi:10.1038/nature11309.
- D'Amato, G *et al.* (2007): „Allergenic pollen and pollen allergy in Europe.“ In: *Allergy*. 62 (9), pp. 976-90.
- Ebeling, S. B., Schutte, M. E., & Logtenberg, T. (1993). „Molecular analysis of VH and VL regions expressed in IgG-bearing chronic lymphocytic leukemia (CLL): further evidence that CLL is a heterogeneous group of tumors.“ *Blood*, 82(5), 1626–31.
- Edelman, G M; Poulik, M D (1961): „Studies on structural units of the gamma-globulins.“ In: *The Journal of experimental medicine*. 113 , pp. 861-84.
- Epstein, Michelle M (2006): „Targeting memory Th2 cells for the treatment of allergic asthma.“ In: *Pharmacology & Therapeutics*. 109 , pp. 107 - 136.
- Esch, Robert E (2006): „Evaluation of allergen vaccine potency.“ In: *Current allergy and asthma reports*. 6 (5), pp. 402-6.
- Esch, Robert E (2008): „Grass pollen allergens.“ In: *Clinical allergy and immunology*. 21 , pp. 107.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., Chiorazzi, N. (1998). „Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors.“ *The Journal of Clinical Investigation*, 102(8), 1515–25. doi:10.1172/JCI3009.
- Flicker, S *et al.* (2000): „A human monoclonal IgE antibody defines a highly allergenic fragment of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5: molecular, immunological, and structural characterization of the epitope-containing domain.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 165 (7), pp. 3849-59.

- Flicker, Sabine; Valenta, Rudolf (2003): „Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 132 (1), pp. 13-24.
- Fowler, N., & Davis, E. (2013). „Targeting B-cell receptor signaling: changing the paradigm. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*.“ *American Society of Hematology. Education Program, 2013*, 553–60. doi:10.1182/asheducation-2013.1.553.
- Friedman, D. F., Moore, J. S., Erikson, J., Manz, J., Goldman, J., Nowell, P. C., & Silberstein, L. E. (1992). „Variable region gene analysis of an isotype-switched (IgA) variant of chronic lymphocytic leukemia.“ *Blood*, 80(9), 2287–97.
- Gabrielsson, S *et al.* (2001): „Specific immunotherapy prevents increased levels of allergen-specific IL-4- and IL-13-producing cells during pollen season.“ In: *Allergy*. 56 (4), pp. 293-300.
- Gauld, S. B., Dal Porto, J. M., & Cambier, J. C. (2002). „B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease.“ *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1641–2. doi:10.1126/science.1071546.
- Geha, R (2003): „Allergy and hypersensitivity Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity.“ In: *Current Opinion in Immunology*. 15 (6), pp. 603-608.
- Gehlhar, K *et al.* (1999): „Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome.“ In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*.
- Geisberger, R., Lamers, M., & Achatz, G. (2006). „The riddle of the dual expression of IgM and IgD.“ *Immunology*, 118(4), 429–37. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02386.
- Gell, P. & Coombs, R. (1963): „The classification of allergic reactions underlying disease.“ In: *Clinical Aspects of Immunology*.
- Georas, S N *et al.* (2005): „T-helper cell type-2 regulation in allergic disease.“ In: *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 26 (6), pp. 1119-37.
- Ghia, P., Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Stella, S., Guida, G., Davi, F. (2005). „Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene.“ *Blood*, 105(4), 1678–85. doi:10.1182/blood-2004-07-2606.
- Ghiotto, F., Fais, F., Valetto, A., Albesiano, E., Hashimoto, S., Dono, M., Chiorazzi, N. (2004). „Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia.“ *The Journal of Clinical Investigation*, 113(7), 1008–16. doi:10.1172/JCI19399.

- Guarini, A., Chiaretti, S., Tavoraro, S., Maggio, R., Peragine, N., Citarella, F., Foà, R. (2008). „BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV_H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells.“ *Blood*, 112(3), 782–92. doi:10.1182/blood-2007-12-127688.
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). „Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia.“ *Blood*, 94(6), 1848–54.
- Hantusch, Brigitte *et al.* (2004): „Mapping of conformational IgE epitopes on Phl p 5a by using mimotopes from a phage display library.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 114 (6), pp. 1294-300.
- Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2001). „B cell development pathways.“ *Annual Review of Immunology*, 19, 595–621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595.
- Hartl, A *et al.* (1999): „Isoforms of the major allergen of birch pollen induce different immune responses after genetic immunization.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 120 (1), pp. 17-29.
- Harwanegg, C *et al.* (2003): „Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy.“ In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 33 (1), pp. 7-13.
- Haselden, B M; Kay, A B; Larché, M (1999): „Immunoglobulin E-independent major histocompatibility complex-restricted T cell peptide epitope-induced late asthmatic reactions.“ In: *The Journal of experimental medicine*. 189 (12), pp. 1885-94.
- Hashimoto, S., Wakai, M., Silver, J., & Chiorazzi, N. (1992). „Biased usage of variable and constant-region Ig genes by IgG⁺, CD5⁺ human leukemic B cells.“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, 651, 477–9.
- Hecht, J. L., & Aster, J. C. (2000). „Molecular biology of Burkitt's lymphoma.“ *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(21), 3707–21.
- Herzog, S., Reth, M., & Jumaa, H. (2009). „Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling.“ *Nature Reviews. Immunology*, 9(3), 195–205. doi:10.1038/nri2491.
- Hiller, Reinhard *et al.* (2002): „Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment.“ In: *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16 (3), pp. 414-6.
- Holgate, Stephen T; Polosa, Riccardo (2008): „Treatment strategies for allergy and asthma.“ In: *Nature reviews. Immunology*. 8 (3), pp. 218-30.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T. F. E., Siebert, R. (2006). „A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling.“ *The New England Journal of Medicine*, 354(23), 2419–30. doi:10.1056/NEJMoa055351.

- Ishizaka, K; Ishizaka, T; Hornbrook, M M (1967): „Allergen-binding activity of gamma-E, gamma-G and gamma-A antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurements of reaginic antibody.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 98 (3), pp. 490-501
- Jacobsen, L *et al.* (1997): „Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. IV. Results from long-term (6-year) follow-up.“ In: *Allergy*. 52 (9), pp. 914-20.
- Jans, D. A. (1992). „The mobile receptor hypothesis revisited: a mechanistic role for hormone receptor lateral mobility in signal transduction.“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 1113(3-4), 271–6.
- Jensen-Jarolim, E *et al.* (1998): „Peptide mimotopes displayed by phage inhibit antibody binding to bet v 1, the major birch pollen allergen, and induce specific IgG response in mice.“ In: *The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 12 (15), pp. 1635-42.
- Jung, D., & Alt, F. W. (2004). „Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation.“ *Cell*, 116(2), 299–311.
- Jutel, M *et al.* (2006): „Mechanisms of allergen specific immunotherapy-T-cell tolerance and more.“ In: *Allergy*. 61 (7), pp. 796-807.
- Kay, A B *et al.* (1997): „Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 113 (1-3), pp. 196-9.
- Kay AB (2001): „Allergy and allergic diseases. Second of two parts.“ In: *N Engl J Med* 344: 109–113.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Dalla-Favera, R. (2001). „Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells.“ *The Journal of Experimental Medicine*, 194(11), 1625–38.
- Kohama, Y *et al.* (1999): „Immunostimulatory oligodeoxynucleotide induces TH1 immune response and inhibition of IgE antibody production to cedar pollen allergens in mice.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 104 (6), pp. 1231-8.
- Köhler, G; Milstein, C (2005): „Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 174 (5), pp. 2453-5.
- Küppers, R., Gause, A., & Rajewsky, K. (1991). „B cells of chronic lymphatic leukemia express V genes in unmutated form.“ *Leukemia Research*, 15(6), 487–96.
- Kurosaki, T. (2002). „Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins.“ *Nature Reviews. Immunology*, 2(5), 354–63. doi:10.1038/nri801.

- Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Fujiwara, T. (2005). „Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules.“ *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34, 351–78. doi:10.1146/annurev.biophys.34.040204.144637.
- Krapf, A., Illustration & Design, Hamburg, 2014.
- Laemmli, U K (1970): „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ In: *Nature*. 227 (5259), pp. 680-5.
- Lam, K. P., Kühn, R., & Rajewsky, K. (1997). „In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death.“ *Cell*, 90(6), 1073–83.
- Laukkanen, Marja-Leena *et al.* (2003): „Hevein-specific recombinant IgE antibodies from human single-chain antibody phage display libraries.“ In: *Journal of immunological methods*. 278 (1-2), pp. 271-81.
- Larché, Mark (2007): „Regulatory T cells in allergy and asthma.“ In: *Chest*. 132 (3), pp. 1007-14.
- Li, Mi *et al.* (2008): „Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody.“ In: *The Journal of biological chemistry*. 283 (33), pp. 22806-14.
- Lillemeier, B. F., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Wilson, B. S., & Davis, M. M. (2006). „Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 18992–7. doi:10.1073/pnas.0609009103
- Lindström, M. S., & Wiman, K. G. (2002). „Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma.“ *Seminars in Cancer Biology*, 12(5), 381–7.
- Linhart, Birgit; Valenta, Rudolf (2005a): „Molecular design of allergy vaccines.“ In: *Current opinion in immunology*. 17 (6), pp. 646-55.
- Linhart, Birgit *et al.* (2005b): „A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 115 (5), pp. 1010-6.
- Linhart, Birgit; Valenta, Rudolf (2004): „Vaccine engineering improved by hybrid technology.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 134 (4), pp. 324-31.
- Lorenz, a R *et al.* (2001): „Recombinant food allergens.“ In: *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 756 (1-2), pp. 255-79.

- Mattila, P. K., Feest, C., Depoil, D., Treanor, B., Montaner, B., Otipoby, K. L., Batista, F. D. (2013). „The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling.“ *Immunity*, 38(3), 461–74. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.019
- Meeker, T. C., Grimaldi, J. C., O'Rourke, R., Loeb, J., Juliusson, G., & Einhorn, S. (1988). „Lack of detectable somatic hypermutation in the V region of the Ig H chain gene of a human chronic B lymphocytic leukemia.“ *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(11), 3994–8.
- Meffre, E., & Nussenzweig, M. C. (2002). „Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11334–9. doi:10.1073/pnas.172369999
- Merrifield, R B; Gisin, B F; Bach, A N (1977): „The limits of reaction of radioactive dicyclohexylcarbodiimide with amino groups during solid-phase peptide synthesis.“ In: *The Journal of organic chemistry*. 42 (8), pp. 1291-5.
- Messmer, B. T., Albesiano, E., Efremov, D. G., Ghiotto, F., Allen, S. L., Kolitz, J., Chiorazzi, N. (2004). „Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia.“ *The Journal of Experimental Medicine*, 200(4), 519–25. doi:10.1084/jem.20040544
- Metzger, H. (1992). „Transmembrane signaling: the joy of aggregation.“ *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(5), 1477–87.
- Mine, Yoshinori; Wei Zhang, Jie (2002): „Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid.“ In: *Biochemical and biophysical research communications*. 292 (4), pp. 1070-4.
- Mockridge, C. I., Potter, K. N., Wheatley, I., Neville, L. A., Packham, G., & Stevenson, F. K. (2007). „Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by V_H-gene mutational status.“ *Blood*, 109(10), 4424–31. doi:10.1182/blood-2006-11-056648.
- Mothes, Nadine; Horak, Friedrich; Valenta, Rudolf (2004): „Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy.“ In: *International archives of allergy and immunology*. 135 (4), pp. 357-73.
- Mutschlechner, S; Deifl, S; Bohle, B (2009): „Genetic allergen modification in the development of novel approaches to specific immunotherapy.“ In: *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 39 (11), pp. 1635-42.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., & Honjo, T. (1999). „Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18470–6.
- Murray, F., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Tobin, G., Boudjogra, M., Scielzo, C., Stamatopoulos, K. (2008). „Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role

- of antigen selection in leukemogenesis." *Blood*, 111(3), 1524–33. doi:10.1182/blood-2007-07-099564.
- Möller, Christian *et al.* (2002): „Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study).“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 109 (2), pp. 251-6.
- Müller, U *et al.* (1998): „Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 101 (6 Pt 1), pp. 747-54.
- Nemazee, D. (2006). „Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance.“ *Nature Reviews. Immunology*, 6(10), 728–40. doi:10.1038/nri1939.
- Neudecker, P. *et al.* (2003): „Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure.“ In: *The Biochemical journal*. 376 (Pt 1), pp. 97-107.
- Niederberger, V *et al.* (2004): „Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 Suppl , pp. 14677-82.
- Niemi, Merja *et al.* (2008): „Characterization and crystallization of a recombinant IgE Fab fragment in complex with the bovine beta-lactoglobulin allergen.“ In: *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*. 64 (Pt 1), pp. 25-8.
- Niirö, H., & Clark, E. A. (2002). „Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals.“ *Nature Reviews. Immunology*, 2(12), 945–56. doi:10.1038/nri955.
- Ollila, J., & Vihinen, M. (2005). „B cells.“ *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(3), 518–23. doi:10.1016/j.biocel.2004.09.007.
- Padavattan, Sivaraman *et al.* (2009): „High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 182 (4), pp. 2141-51.
- Padavattan, S. *et al.* (2007): „Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab.“ In: *Journal of molecular biology*. 368 (3), pp. 742-52.
- Pilette, C *et al.* (2007): „Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF- β expression.“ In: *J. Immunol.* 178 , pp. 4658-4666.
- Pirquet, C. v. Allergie. (1908).
- Prausnitz, C. & Küstner, H. (1921): „Studien über die Überempfindlichkeit.“ *Zbl Bakt* 86, 160.

- Purello-D'Ambrosio, F *et al.* (2001): „Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study.“ In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 31.
- Rajewsky, K. (1996). „Clonal selection and learning in the antibody system.“ *Nature*, 381(6585), 751–8. doi:10.1038/381751a0.
- Reese, G *et al.* (2001): „Characterization and identification of allergen epitopes: recombinant peptide libraries and synthetic, overlapping peptides.“ In: *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 756 (1-2), pp. 157-63.
- Romagnani, S (1999): „Th1/Th2 cells.“ In: *Inflammatory bowel diseases*. 5 (4), pp. 285-94.
- Saiki, R K *et al.* (1989): „Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes.“ In: *Nature*. 324 (6093), pp. 163-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989): „Molecular Cloning: A Laboratory Manual.“ In: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, A R (1992): „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.“ In: *Biotechnology (Reading, Mass.)*. 24 , pp. 104-8.
- Schamel, W. W., & Reth, M. (2000). „Stability of the B cell antigen receptor complex.“ *Molecular Immunology*, 37(5), 253–9.
- Schmidt-Weber, Carsten B; Akdis, Mübeccel; Akdis, Cezmi A (2007): „TH17 cells in the big picture of immunology.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 120 (2), pp. 247-54.
- Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G., & Staudt, L. M. (2014). „Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma.“ *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(2). doi:10.1101/cshperspect.a014282.
- Seddiki, Nabila *et al.* (2006): „Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells.“ In: *The Journal of experimental medicine*. 203 (7), pp. 1693-700.
- Shanti, K N *et al.* (1993): „Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes.“ In: *Journal of immunology*. 151, pp. 5354-63.
- Shirota, H *et al.* (2000): „Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 164 (11), pp. 5575-82.
- Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Boudjograh, M., Guida, G., Smilevska, T., Davi, F. (2007). „Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry

- stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations." *Blood*, 109(1), 259–70. doi:10.1182/blood-2006-03-012948.
- Steinberger, P; Kraft, D; Valenta, R (1996): „Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. Isolation and characterization of human IgE Fabs with specificity for the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5." In: *The Journal of biological chemistry*.
- Steiner, Daniel *et al.* (2006): „Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display." In: *Nature biotechnology*. 24 (7), pp. 823-31.
- Stockinger, B. *et al.*, (2007): „Th17 cells: An orphan with influence." In: *Immunology and cell biology*. 85 (2), pp. 83-4.
- Suphioglu, C (2000): „What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease?" In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 30 (10), pp. 1335-41.
- Suphioglu, C *et al.* (2001): „A novel grass pollen allergen mimotope identified by phage display peptide library inhibits allergen-human IgE antibody interaction." In: *FEBS letters*. 502 (1-2), pp. 46-52.
- Sur, S *et al.* (1999): „Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides." In: *Journal of immunology*; 162 (10), pp. 6284-93.
- Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2007): „Toll-like receptors." In: *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*. Chapter 14 , p. Unit 14.12.
- Till, Stephen J *et al.* (2004): „Mechanisms of immunotherapy." In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 113 (6), pp. 1025-34; quiz 1035.
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Eriksson, I., Söderberg, O., Karlsson, K., Rosenquist, R. (2003). „Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope." *Blood*, 101(12), 4952–7. doi:10.1182/blood-2002-11-3485.
- Tobin, G., Thunberg, U., Karlsson, K., Murray, F., Laurell, A., Willander, K., Rosenquist, R. (2004). „Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia." *Blood*, 104(9), 2879–85. doi:10.1182/blood-2004-01-0132.
- Tolar, P., & Pierce, S. K. (2010). „A conformation-induced oligomerization model for B cell receptor microclustering and signaling." *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 340, 155–69. doi:10.1007/978-3-642-03858-7_8.
- Tolar, P., Sohn, H. W., & Pierce, S. K. (2005). „The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer." *Nature Immunology*, 6(11), 1168–76. doi:10.1038/ni1262.

- Treanor, B., Depoil, D., Gonzalez-Granja, A., Barral, P., Weber, M., Dushek, O., Batista, F. D. (2010). „The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor.“ *Immunity*, 32(2), 187–99. doi:10.1016/j.immuni.2009.12.005.
- Turner, Hel.; *et al.*, (1999): „Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI.“ In: *Nature*. 402
- Valenta, R *et al.* (1999): „The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT).“ In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 29 (7), pp. 896-904.
- Valenta, R; Kraft, D (2001): „Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation.“ In: *Immunol. Rev.* 179 , pp. 119-127.
- Valenta, Rudolf; Kraft, Dietrich (2002): „From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy.“ In: *Current opinion in immunology*. 14 (6), pp. 718-27.
- Vieths, Stefan; *et al.*, (2002): „Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen.“ In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 964 , pp. 47-68.
- Vihinen, M., Arredondo-Vega, F. X., Casanova, J. L., Etzioni, A., Giliani, S., Hammarström, L., Smith, C. I. (2001). „Primary immunodeficiency mutation databases.“ *Advances in Genetics*, 43, 103–88.
- Vrtala, S *et al.* (1993): „cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; characterization of the recombinant Phl p V allergen.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 151 (9), pp. 4773-81.
- Vrtala, S (2008): „From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment.“ In: *Allergy*. 63 (3), pp. 299-309.
- Wachholz, P A; Durham, S R (2003): „Induction of 'blocking' IgG antibodies during immunotherapy.“ In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 33 (9), pp. 1171-4.
- Wiche, Regina *et al.* (2005): „Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a second cross-reactive IgE epitope on Pru av 1, the major cherry (*Prunus avium*) allergen.“ In: *The Biochemical journal*. 385 (Pt 1), pp. 319-27.
- Widhopf, G. F., Rassenti, L. Z., Toy, T. L., Gribben, J. G., Wierda, W. G., & Kipps, T. J. (2004). „Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins.“ *Blood*, 104(8), 2499–504. doi:10.1182/blood-2004-03-0818.
- Wild, C *et al.* (2007): „A recombinant allergen chimera as novel mucosal vaccine candidate for prevention of multi-sensitivities.“ In: *Allergy*. 62 (1), pp. 33-41.

- Winther, L *et al.* (2006): „Side-effects of allergen-specific immunotherapy: a prospective multi-centre study.“ In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 36 (3), pp. 254-60.
- Woyach, J. A., Johnson, A. J., & Byrd, J. C. (2012). „The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL.“ *Blood*, 120(6), 1175–84. doi:10.1182/blood-2012-02-362624.
- Wu, T T; Kabat, E A (1970): „An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity.“ In: *The Journal of experimental medicine*. 132 (2), pp. 211-50.
- Yang, J., & Reth, M. (2010a). „Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells.“ *Nature*, 467(7314), 465–9. doi:10.1038/nature09357.
- Yang, J., & Reth, M. (2010b). „The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering.“ *FEBS Letters*, 584(24), 4872–7. doi:10.1016/j.febslet.2010.09.045.
- Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P. A., House, F. S., Keefer, C. J., Hicar, M. D., Crowe, J. E. (2008). „Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors.“ *Nature*, 455(7212), 532–6. doi:10.1038/nature07231.
- Yuseff, M.-I., Pierobon, P., Reversat, A., & Lennon-Duménil, A.-M. (2013). „How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity.“ *Nature Reviews. Immunology*, 13(7), 475–86. doi:10.1038/nri3469.

9 Anhang

9.1 Sequenzdaten

Innerhalb der Sequenzdaten sind die CDR-Regionen der V_H-Domäne gelb, die der V_L-Domäne türkis unterlegt sowie Serin-Glycin-Linker grau dargestellt.

Ig014

V_H-Sequenz

```
caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggctc
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
tcctgcaaggcttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcc
S C K A S G Y T F T G Y Y M H W V R Q A
cctggacaagggttgagtggatgggacggatcaaccctaacagtgggtggcacaactat
P G Q G L E W M G R I N P N S G G T N Y
gcacagaagtttcagggcagggtcaccatgaccagggacacgtccatcagcacagcctac
A Q K F Q G R V T M T R D T S I S T A Y
atggagctgagcagggtgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgagagatcag
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R D Q
tggctgacactaggaactactttgactactggggccaggggaaccctgggtcaccgtctcg
W L T L G N Y F D Y W G Q G T L V T V S
agc
S
```

V_L-Sequenz

```
gaaattgtgttgacgcagtcctcaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc
E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
ctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcagctacttagcctgggtaccagcagaaa
L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K
cctggccagggtcccagggtcctcatctatgggtgcatccagcaggggccactggcatcca
P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
gacaggttcagtggcagtggttctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag
D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
cctgaagattttgagtggtattactgtcagcagtatggtagctcaccgggttcactttc
```


P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P G F T F
 ggccctgggaccaagtgatatacaacgaactgtg
 G P G T K V D I K R T V

Ig024

V_H-Sequenz

gaagtgcagctggtggagtctgggggaggccttggtacagcctggcaggtccctgagactc
 E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L
 tcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgcactgggtccggcaagct
 S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A
 ccaggggaagggcctggagtgggtctcaggtattagttggaatagtggttagcataggctat
 P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y
 gcggactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccagaactccctgtat
 A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
 ctgcaaatgaacagtctgagagctgaggacacggccttgattactgtgcaaaaggaggg
 L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K G G
 gcgcggtggatacagctgaccgtccggtcatactactactactacggtatggacgtctgg
 A R W I Q L T V R S Y Y Y Y Y G M D V W
 ggccaagggaccacggtcaccgtc
 G Q G T T V T V

V_L-Sequenz

gaaattgtgttgacgcagtcctcaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
 ctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcagctacttagcctggtaccagcagaaa
 L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K
 cctggccagggtcccaggctcctcatctatggtgcatccagcagggccactggcatccca
 P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
 gacaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag
 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
 cctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagtatggtaggacgttcggccaagggacc
 P E D F A V Y Y C Q Q Y G R T F G Q G T
 aaagtggatatcaaacgaactgtg
 K V D I K R T V

Ca26**V_H-Sequenz**

gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccgaggagtctctgaagatc
 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I
 tcctgtaagggttctggatacagctttaccagctactggatcggctgggtgcgccagatg
 S C K G S G Y S F T S Y W I G W V R Q M
 cccgggaaaggcctggagtggatggggatcatctatcctggtgactctgataccagatac
 P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y
 agcccgctccttccaaggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgcctac
 S P S F Q G Q V T I S A D K S I S T A Y
 ctgcagtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagatttaac
 L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R F N
 aggggcggtgactactggggccagggaaccctgggtcacccgtc
 R G G D Y W G Q G T L V T V

V_L-Sequenz

gatattgtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccctggagagccggcctcc
 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S
 atctcctgcaggtctagtcagagcctcctgcataagtaatggatacaactatttggttgg
 I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D W
 tacctgcagaagccagggcagtctccacagctcctgatctatttggttctaatacgggcc
 Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A
 tccgggggtccctgacaggttcagtggcagtggatcaggcacagattttacactgaaaatc
 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 agcagagtggaggctgaggatggtgggggttcattactgcatgcaagctctacaaactcct
 S R V E A E D V G V H Y C M Q A L Q T P
 cacacttttggccaagggaccaaagtggatatcaaacgaactgtg
 H T F G Q G T K V D I K R T V

anti-EGFR-scFv

gaagtgcaactgcagcagtctggggctgaactggtgaagcctggggcttcagtgaagttg
 E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L
 tcctgcaaggcttccggctacaccttcaccagccactggatgcactgggtgaagcagagg
 S C K A S G Y T F T S H W M H W V K Q R

gctggacaaggccttgagtggatcgagaggtttaatcccagcaacggccgtactaactac
 A G Q G L E W I G E F N P S N G R T N Y
 aatgagaaattcaagagcaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctat
 N E K F K S K A T L T V D K S S S T A Y
 atgcaactcagtagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgccagtcgggac
 M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A S R D
 tatgattacgacggacgggtactttgactactggggccaagggaccacgggtcacgcgtctcc
 Y D Y D G R Y F D Y W G Q G T T V T V S
 tcaggtggcgggtggctcgggcgggtgggtgggtcgggtggcggcggtatctgacatcgagctc
 S G G G G S G G G G S G G G G S D I E L
 acccagttctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcactatgacctgcagt
 T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S
 gccagctcaagtgttaacttacatgtattggtaccagcagaagccaggatcctccccaga
 A S S S V T Y M Y W Y Q Q K P G S S P R
 ctctgtatttatgacacatccaacctggcttctggagtcacctgttcgtttcagtggcagt
 L L I Y D T S N L A S G V P V R F S G S
 gggctctgggacctcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccact
 G S G T S Y S L T I S R M E A E D A A T
 tattactgccagcagtgaggtagtcacatattcacgttcgggtcggggacagaactcgaa
 Y Y C Q Q W S S H I F T F G S G T E L E
 atcaaa
 I K

anti-Phl p 5a-scFv

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggccttggtacagcctgggggggtccctgagactc
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
 tcctgtgcagcctctggattcaccttttagcagctatgaaatataactgggtccgccaggct
 S C A A S G F T F S S Y E I Y W V R Q A
 ccaggcaaggggtgggtggcaatgatataatgatgaaaccaataaacattacgcagac
 P G K G W V A M I S I D E T N K H Y A D
 tccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaa
 S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q
 atgaacagcctgagagccgaggacacggccggtgtattactgtgcaagatggaacaactgg
 M N S L R A E D T A V Y Y C A R W N N W
 aaccaccgggggatgggtttttgctttttgatctctggggccaagggtaccctgggtcacgcgc
 N H R G M V F A F D L W G Q G T L V T V

tcgagtgggtggaggcggttcaggcggaggtggctctggcggtagtgcacttgagctcacc
 S S G G G G S G G G G S G G S A L E L T
 cagtctccatcttccgtgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcg
 Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A
 agtcagggtatttagcagttggtttagcctgggtatcagcagaaaccagggaagcccctaaa
 S Q G I S S W L A W Y Q Q K P G K A P K
 ctctgatctattctgcatccagtttgcaaagtggggtcccgtcaagggttcagcggcagt
 L L I Y S A S S L Q S G V P S R F S G S
 ggatctgggacagatttcagtctcaccatcagcagcctgcaacctgaagattttgcaact
 G S G T D F S L T I S S L Q P E D F A T
 tactattgtcaacaggctaacagtttcccgtacacttttgccaggggaccaagggtggaa
 Y Y C Q Q A N S F P Y T F G Q G T K V E
 atcaaa
 I K

Sequenzen schwerer konstanter Immunglobulin-Domänen

IgG1C_{H1-3}

gcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 ggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcg
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 tggaactcaggcgccttgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctca
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 ggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttggggacccagacc
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagaaagttgagccc
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
 aaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggga
 K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 ccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccct
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
 gaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgg
 E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaac
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N

agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag
 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 gagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgag
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
 ctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgcacatc
 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtg
 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 ctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
 cagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 cagaagagcctctccctgtctccgggtaaataga
 Q K S L S L S P G K -

IgMC_{H1-4}

tcctcgagcgggagtgcatccgcccccaacccttttccccctcgtctcctgtgagaattcc
 S S S G S A S A P T L F P L V S C E N S
 ccgtcggatacagagcagcgtggccgttggctgcctcgcacaggacttccttcccgactcc
 P S D T S S V A V G C L A Q D F L P D S
 atcacttttctccttggaataacaagaacaactctgacatcagcagcaccgggggcttcca
 I T F S W K Y K N N S D I S S T R G F P
 tcagtcctgagagggggcaagtacgcagccacctcacagggtgctgctgccttccaaggac
 S V L R G G K Y A A T S Q V L L P S K D
 gtcatgcagggcacagacgaacacgtggtgtgcaaagtccagcaccccaacggcaacaaa
 V M Q G T D E H V V C K V Q H P N G N K
 gaaaagaacgtgcctcttccagtgattgccgagctgcctcccaaagtgagcgtcttcgtc
 E K N V P L P V I A E L P P K V S V F V
 ccaccccgcgacggcttcttcggcaacccccgcaagtccaagctcatctgccaggccacg
 P P R D G F F G N P R K S K L I C Q A T
 ggtttcagtcccccggcagattcaggtgtcctggctgcgcgaggggaagcaggtggggtct
 G F S P R Q I Q V S W L R E G K Q V G S
 ggcgtcaccacggaccaggtgcaggctgaggccaaagagtctgggcccacgacctacaag
 G V T T D Q V Q A E A K E S G P T T Y K

gtgaccagcacactgaccatcaaagagagcgactgggtcagccagagcatgttcacctgc
V T S T L T I K E S D W L S Q S M F T C
cgcggtggatcacaggggaccttccagcagaatgcgctcctccatgtgtgtccccgat
R V D H R G L T F Q Q N A S S M C V P D
caagacacagccatccgggtcttcgccatccccccatcctttgccagcatcttcctcacc
Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T
aagtccaccaagttgacctgcctgggtcacagacctgaccacctatgacagcgtgaccatc
K S T K L T C L V T D L T T Y D S V T I
tcctggaccgcgagaatggcgaagctgtgaaaaccacaccaacatctccgagagccac
S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H
cccaatgccactttcagcgccgtgggtgaggccagcatctgcgaggatgactggaattcc
P N A T F S A V G E A S I C E D D W N S
ggggagaggttcacgtgcaccgtgaccacacagacctgccctcgccactgaagcagacc
G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T
atctcccggcccaagggggtggccctgcacaggcccgatgtctacttgctgccaccagcc
I S R P K G V A L H R P D V Y L L P P A
cgggagcagctgaacctgcgggagtcggccaccatcacgtgcctgggtgacgggcttctct
R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S
cccgcggacgtcttcgtgcagtggtatgcagagggggcagcccttgctccccggagaagtat
P A D V F V Q W M Q R G Q P L S P E K Y
gtgaccagcgccccaatgcctgagccccaggccccaggccggtacttcgcccacagcatc
V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I
ctgaccgtgtccgaagaggaatggaacacgggggagacctacacctgcgtggtggcccat
L T V S E E E W N T G E T Y T C V V A H
gagggcctgcccacaggggtcaccgagaggacctggacaagtccaccgaggggggaggtg
E G L P N R V T E R T V D K S T E G E V
agcgccgacgaggagggtttgagaacctgtgggccaccgcctccaccttcacgtcctc
S A D E E G F E N L W A T A S T F I V L
ttcctcctgagcctcttctacagtaccaccggtcaccttgttcaaggtgaaatga
F L L S L F Y S T T V T L F K V K -

Sequenzen leichter konstanter Immunglobulin-Domänen

κ -C_L

cgaactgtggctgcaccatctgtcttcattcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
 R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
 ggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 tggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggac
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
 agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
 aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag
 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
 agcttcaacaggggagagtgt
 S F N R G E C

Sequenzen der Mimotope

Mimotop	Konsensussequenz
Ig014	DGRSRVDRDRQH
Ig024	YLPWW
Ca46	AKYNPWLTPLL
anti-EGFR	WLDYSTSPRINR

Sequenzen der Liganden und Ligandenfragmente

Vimentin

atgagcaccgcgagcgtgagcagcagcagctatcgccgcatgtttggcgggcccgggcacc
 M S T R S V S S S S Y R R M F G G P G T
 gcgagccgccccgagcagcagccgcagctatgtgaccaccagcaccgcacctatagcctg
 A S R P S S S R S Y V T T S T R T Y S L
 ggcagcgcgctgcgcccagcaccagccgcagcctgtatgcgagcagcccgggcggcgtg
 G S A L R P S T S R S L Y A S S P G G V
 tatgcgaccgcgagcagcgcggtgcgcctgcgcagcagcgtgccgggcggtgcgcctgctg
 Y A T R S S A V R L R S S V P G V R L L
 caggatagcgtggatttttagcctggcggatgcgattaacaccgaattttaaaacacccgc

Q D S V D F S L A D A I N T E F K N T R
accaacgaaaaagtggaaactgcaggaactgaacgatcgctttgCGAACTATATTGATAAA
T N E K V E L Q E L N D R F A N Y I D K
gtgCGCTTTCTGGAACAGCAGAACAAAATTCTGCTGGCGGAACGGAAACAGCTGAAAGGC
V R F L E Q Q N K I L L A E L E Q L K G
cagggcaaaagccgcctgggCGATCTGTATGAAGAAGAAATGCGCGAACTGCGCCGCCAG
Q G K S R L G D L Y E E E M R E L R R Q
gtggatcagctgaccaacgataaagCGCGCGTGGAAAGTGGAAACGCGATAACCTGGCGGAA
V D Q L T N D K A R V E V E R D N L A E
gatattatgCGCCTGCGCGAAAAACTGCAGGAAGAAATGCTGCAGCGCGAAGAAGCGGAA
D I M R L R E K L Q E E M L Q R E E A E
aacaccctgcagagctttcGCCAGGATGTGGATAACGCGAGCCTGGCGCGCTGGATCTG
N T L Q S F R Q D V D N A S L A R L D L
gaacgcaaagtggaaagcctgcaggaagaaattgCGTTTCTGAAAAAACTGCATGAAGAA
E R K V E S L Q E E I A F L K K L H E E
gaaattcaggaactgcaggCGCAGATTCAGGAACAGCATGTGCAGATTGATGTGGATGTG
E I Q E L Q A Q I Q E Q H V Q I D V D V
agcaaaccggatctgaccgCGGCGCTGCGCGATGTGCGCCAGCAGTATGAAAGCGTGGCG
S K P D L T A A L R D V R Q Q Y E S V A
gcgaaaaacctgcaggaagCGGAAGAATGGTATAAAAGCAAATTTGCGGATCTGAGCGAA
A K N L Q E A E E W Y K S K F A D L S E
gcgCGGAACCGCAACAACGATGCGCTGCGCCAGGCGAAACAGGAAAGCACCGAATATCGC
A A N R N N D A L R Q A K Q E S T E Y R
CGCCAGGTGCAGAGCCTGACCTGCGAAGTGGATGCGCTGAAAGGCACCAACGAAAGCCTG
R Q V Q S L T C E V D A L K G T N E S L
gaacGCCAGATGCGCGAAATGGAAGAAAACCTTTGCGGTGGAAGCGGCGAACTATCAGGAT
E R Q M R E M E E N F A V E A A N Y Q D
accattggccgcctgcaggatgaaattcagaacatgaaagaagaaatggCGCGCCATCTG
T I G R L Q D E I Q N M K E E M A R H L
CGCGAATATCAGGATCTGCTGAACGTGAAAATGGCGCTGGATATTGAAATTGCGACCTAT
R E Y Q D L L N V K M A L D I E I A T Y
CGCAAACCTGCTGGAAGGCGAAGAAAGCCGCATTAGCCTGCCGCTGCCGAACCTTAGCAGC
R K L L E G E E S R I S L P L P N F S S
CTGAACCTGCGCGAAACCAACCTGGATAGCCTGCCGCTGGTGGATACCCATAGCAAACGC
L N L R E T N L D S L P L V D T H S K R
accctgctgattaaaaccgtggaaacccgCGATGGCCAGGTGATTAAACGAAACCAGCCAG

T L L I K T V E T R D G Q V I N E T S Q
catcatgatgatctggaa
H H D D L E

sEGFR

atgcgccccgagcggcaccgcgggcgcggcgctgctggcgctgctggcgcgctgtgcccg
M R P S G T A G A A L L A L L A A L C P
gcgagccgcgcgctggaagaaaaaaaaagtgtgccagggcaccagcaacaaactgacccag
A S R A L E E K K V C Q G T S N K L T Q
ctgggcacctttgaagatcatttttctgagcctgcagcgcgatgtttaacaactgcgaagtg
L G T F E D H F L S L Q R M F N N C E V
gtgctgggcaacctggaaattacctatgtgcagcgcgaactatgatctgagcttttctgaaa
V L G N L E I T Y V Q R N Y D L S F L K
accattcaggaagtggcgggctatgtgctgattgcgctgaacaccgtggaacgcattccg
T I Q E V A G Y V L I A L N T V E R I P
ctggaaaacctgcagattatttcgcggcaacatgtattatgaaaacagctatgcgctggcg
L E N L Q I I R G N M Y Y E N S Y A L A
gtgctgagcaactatgatgcgaacaaaaccggcctgaaagaactgccgatgcgcaacctg
V L S N Y D A N K T G L K E L P M R N L
caggaaattctgcattggcgcggtgcgcttttagcaacaacccggcgctgtgcaacgtggaa
Q E I L H G A V R F S N N P A L C N V E
agcattcagtggcgcgatattgtgagcagcgcatttttctgagcaacatgagcatggatttt
S I Q W R D I V S S D F L S N M S M D F
cagaaccatctgggcagctgccagaaatgcgatccgagctgccgaacggcagctgctgg
Q N H L G S C Q K C D P S C P N G S C W
ggcgcgggcgaagaaaactgccagaaactgacaaaaattatttgcgcgcagcagtgagc
G A G E E N C Q K L T K I I C A Q Q C S
ggccgctgccgcggcaaaagcccgagcgcattgctgccataaccagtgcgcgggcggtgc
G R C R G K S P S D C C H N Q C A A G C
accggccccgcgcgaaagcgattgcctggtgtgccgcaaatttgcgcgatgaagcgacctgc
T G P R E S D C L V C R K F R D E A T C
aaagataacctgcccgcgcgtgatgctgtataaccgcaccacctatcagatggatgtgaac
K D T C P P L M L Y N P T T Y Q M D V N
ccggaaggcaaatatagctttggcgcgacctgcgtgaaaaaatgccgcgcgaactatgtg
P E G K Y S F G A T C V K K C P R N Y V
gtgaccgatcatggcagctgcgtgcgcgcgtgcggcgcgatagctatgaaatggaagaa
V T D H G S C V R A C G A D S Y E M E E
gatggcgtgcgcaaattgcaaaaaatgcgaaggcccgctgccgcaaagtgtgcaacggcatt
D G V R K C K K C E G P C R K V C N G I
ggcattggcgaatttaagatagcctgagcattaacgcgaccaacattaaacatttttaa
G I G E F K D S L S I N A T N I K H F K
aactgcaccagcattagcggcgatctgcataattctgccggtggcgtttcgcggcgatagc
N C T S I S G D L H I L P V A F R G D S
tttaccataaccccgccgctggatccgcaggaactggatatttctgaaaacctgaaagaa
F T H T P P L D P Q E L D I L K T V K E
attaccggcttttctgctgattcaggcggtggccggaaaaccgcaccgatctgcattgcgttt
I T G F L L I Q A W P E N R T D L H A F
gaaaacctggaaattatttcgcggccgcaccaaacagcatggccagtttagcctggcggtg
E N L E I I R G R T K Q H G Q F S L A V

gtgagcctgaacattaccagcctgggcctgcgagcctgaaagaaattagcgatggcgat
 V S L N I T S L G L R S L K E I S D G D
 gtgattattagcggaacaaaaacctgtgctatggaacaccattaactggaaaaactg
 V I I S G N K N L C Y A N T I N W K K L
 tttggcaccagcgccagaaaaacaaaattattagcaaccgcgccgaaaacagctgcaaa
 F G T S G Q K T K I I S N R G E N S C K
 gcgaccggccaggtgtgccatgcgctgtgcagcccgaaggctgctggggcccgaaccg
 A T G Q V C H A L C S P E G C W G P E P
 cgcgattgctgagctgccgcaacgtgagccgcgccggaatgctggataaatgcaac
 R D C V S C R N V S R G R E C V D K C N
 ctgctggaaggcgaaccgcggaattttgtgaaaacagcgaatgcattcagtgccatccg
 L L E G E P R E F V E N S E C I Q C H P
 gaatgcctgccgcaggcgatgaacattacctgcaccggccgcgcccgataactgcatt
 E C L P Q A M N I T C T G R G P D N C I
 cagtgcgcgcattatattgatggcccgcatcgctgaaaacctgcccggcgggcgatg
 Q C A H Y I D G P H C V K T C P A G V M
 ggcgaaaacaacaccctggtgtggaatatgcgatgcgggccatgtgtgccatctgtgc
 G E N N T L V W K Y A D A G H V C H L C
 catccgaactgcacctatggcccgggcaacgaaagcctgaaagcgatgctgttttgctg
 H P N C T Y G P G N E S L K A M L F C L
 tttaaactgagcagctgcaaccagagcaacgatggcagcgtgagccatcagagcggcagc
 F K L S S C N Q S N D G S V S H Q S G S
 ccggcgggcgaggaagctgcctgggctggattccgagcctgctgccgagcgaatttcag
 P A A Q E S C L G W I P S L L P S E F Q
 ctgggctggggcggtgcagccatctgcctgctggccgagcgcgagcgtgattattacc
 L G W G G C S H L H A W P S A S V I I T
 gcgagcagctgccat
 A S S C H

Phl p 5a

gccgatctaggctacggcccggccaccccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc
 A D L G Y G P A T P A A P A A G Y T P A
 Gccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgacgaccgaggagcagaagctgatcgag
 A P A G A E P A G K A T T E E Q K L I E
 aagatcaacgccggcttcaaggcgcccttgccgctgcccggcgctcccgccagcggac
 K I N A G F K A A L A A A A G V P P A D
 aagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttcgcggagggc
 K Y R T F V A T F G A A S N K A F A E G
 ctctcggggcgagcccaagggcgccgccaatccagctccaaggccgcgctcacctccaag
 L S G E P K G A A E S S S K A A L T S K
 ctcgacgccgcctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcctgaggccaag
 L D A A Y K L A Y K T A E G A T P E A K
 tacgacgcctacgtcgccaccctaagcgaggcgctccgcacatcgccggcaccctcgag
 Y D A Y V A T L S E A L R I I A G T L E

gtccacgccgtcaagcccgcggccgaggaggtcaaggttatccctgccggcgagctgcag
 V H A V K P A A E E V K V I P A G E L Q
 gtcacgcgagaaggtcgacgccgccttcaaggctcgctgccaccgccgccaacgccgcgccc
 V I E K V D A A F K V A A T A A N A A P
 gccaacgacaagttcacctgtcttcgaggccgccttcaacaacgccatcaaggcgagcacg
 A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T
 ggcgggcgcttacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcgtcaagcaggcc
 G G A Y E S Y K F I P A L E A A V K Q A
 tacgccgccaccgtcgccaccgcgcggagggtcaagtacaccgtctttgagaccgcgctg
 Y A A T V A T A P E V K Y T V F E T A L
 aaaaaggccatcacccgccatgtccgaggcccagaaggctgccaaagcccgtgcccgtgcc
 K K A I T A M S E A Q K A A K P A A A A
 accgccaccgcaacctccgccgttggcgcgggccaccggcgccgccaccgccgctactggt
 T A T A T S A V G A A T G A A T A A T G
 ggctacaaagtc
 G Y K V

Phl p 5a-F1

gcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaagctgatcgagaagatcaacgccggccttcaag
 A G K A T T E E Q K L I E K I N A G F K
 gcggccttggccgctgccgccggcggtcccgccagcggacaagtacaggacgttcgtcgca
 A A L A A A A G V P P A D K Y R T F V A
 accttcggcgcggcctccaacaaggccttcgcggagggcctctcgggagagcccaagggc
 T F G A A S N K A F A E G L S G E P K G
 gccgccgaatccagctccaaggccgcgctcacctccaagctcgacgccgcctacaagctc
 A A E S S S K A A L T S K L D A A Y K L
 gcctacaagacagccgagggcgcgacgcctgaggccaagtacgacgcctacgtcgccacc
 A Y K T A E G A T P E A K Y D A Y V A T
 ctaagcgaggcgctccgcacatcatcgccggc
 L S E A L R I I A G

Phl p 5a-F2

aagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcggcctccaacaaggccttcgcgaggaggc
 K Y R T F V A T F G A A S N K A F A E G
 ctctcgggcgagcccaagggcgccgccgaatccagctccaaggccgcgctcacctccaag
 L S G E P K G A A E S S S K A A L T S K
 ctcgacgccgcctacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgacgcctgaggccaag
 L D A A Y K L A Y K T A E G A T P E A K
 tacgacgcctacgtcgccaccctaagcgaggcgctccgcatcatcgccggc
 Y D A Y V A T L S E A L R I I A G

Phl p 5a-F3

gcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaagctgatcgagaagatcaacgccggccttcaag
 A G K A T T E E Q K L I E K I N A G F K
 gcggccttgggcgctgccgccggcggtcccgccagcggacaagtacaggacgttcgtcgca
 A A L A A A A G V P P A D K Y R T F V A
 accttcggcgcggcctccaacaaggccttcgcgaggggcctctcgggcgagcccaagggc
 T F G A A S N K A F A E G L S G E P K G
 gccgccgaatccagctccaaggccgcgctcacctccaagctcgacgccgcctacaag
 A A E S S S K A A L T S K L D A A Y K

Phl p 5a-F4

aagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcggcctccaacaaggccttcgcgaggaggc
 K Y R T F V A T F G A A S N K A F A E G
 ctctcgggcgagcccaagggcgccgccgaatccagctccaaggccgcgctcacctccaag
 L S G E P K G A A E S S S K A A L T S K
 ctcgacgccgcctacaag
 L D A A Y K

Phl p 5a-Loop

tgttccaacaaggccttcgcgaggaggcctctcgggcgagcccaagggcgccgccgaatcc
 C S N K A F A E G L S G E P K G A A E S
 agctccaaggccgcgctcacctcctgt
 S S K A A L T S C

Phl p 5b

gccgatgccggctacgccccggccacccccggctgcggccggagcggaggcaggggaaggcg
A D A G Y A P A T P A A A G A E A G K A
acgaccgaggagcagaagctgatcgaggacatcaacgtcggccttcaaggcggccgtggcc
T T E E Q K L I E D I N V G F K A A V A
gccgcccgcagcgtccctgcggcagacaagttcaagaccttcgaggccgccttcacctcg
A A A S V P A A D K F K T F E A A F T S
tcatccaaggccgctaccgccaaggcgcccggcctcgttcccaagctcgacgcccgcctac
S S K A A T A K A P G L V P K L D A A Y
agcgtcgcctacaaggccgcccgtcggcgccacccccgaggccaagttcgactccttcgtc
S V A Y K A A V G A T P E A K F D S F V
gcctccctcaccgaggcgctccgcgtcatcgccggcgcccttgagggtccacgcccgtcaag
A S L T E A L R V I A G A L E V H A V K
cccgtcaccgaggagcccggcatggccaagatccccgcccggcgagctgcagatcatcgac
P V T E E P G M A K I P A G E L Q I I D
aagatcgatgccgccttcaaggctcgccgccaccgcccggccaccgccccagccgacgac
K I D A A F K V A A T A A A T A P A D D
aagttcacctgtcttcgaggccgccttcaacaaggccatcaaggagagcacccggcgccgccc
K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A
tacgacacctacaagtgcatcccatccctcgaggccgcccgtcaagcaggcctacgcccgc
Y D T Y K C I P S L E A A V K Q A Y A A
accgtcgcggccgcgcccgcaggtcaaatacgccgtctttgaggccgcgctgaccaaggcc
T V A A A P Q V K Y A V F E A A L T K A
atcacccgcatgtccgaggtacagaaggtcagccagcccggccaccggtgctgcaaccgtc
I T A M S E V Q K V S Q P A T G A A T V
gccgcccgtgctgcaaccaccgccaactgggtgctgcctccggcgctgccaccgtcgctgcc
A A G A A T T A T G A A S G A A T V A A
ggtggctataaagtc
G G Y K V

9.2 Vektorkarten

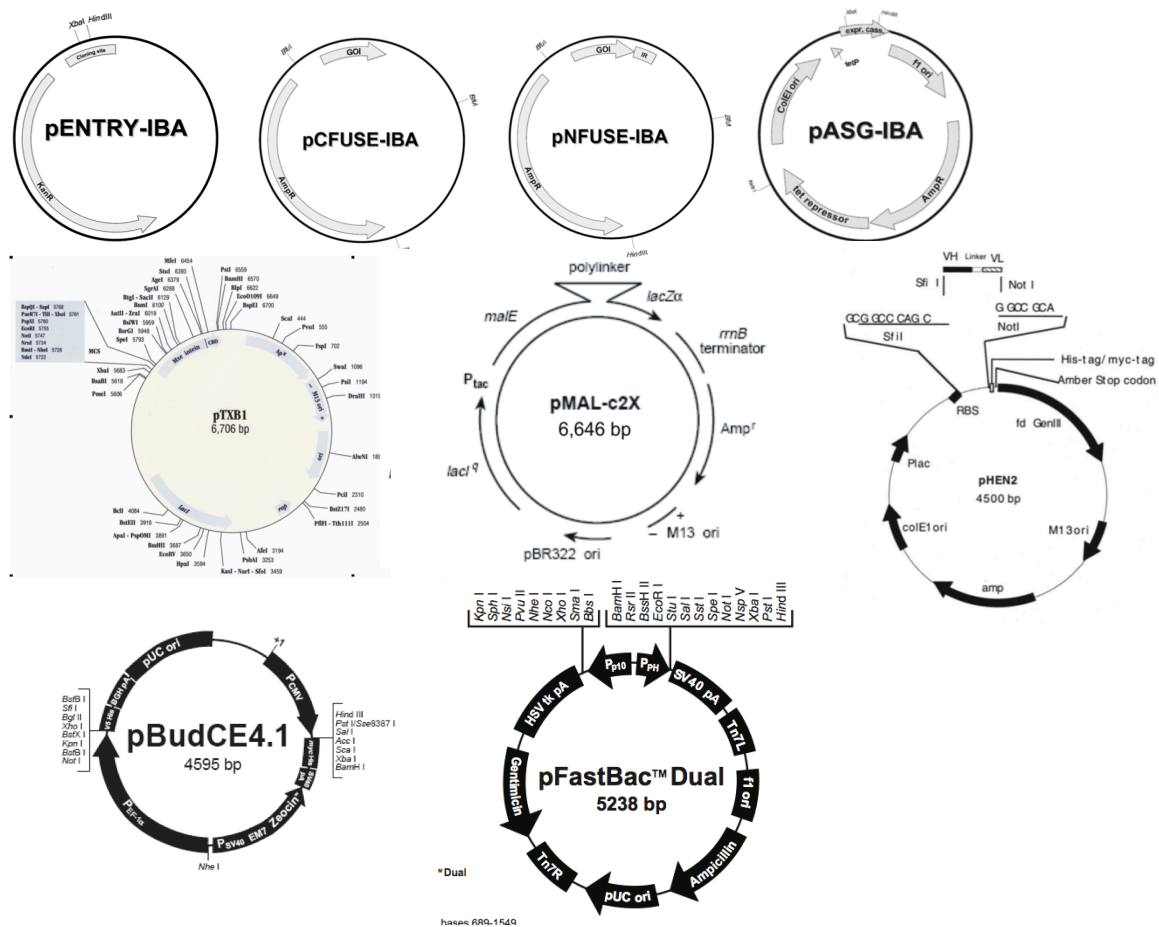


Abb. 9.1: Die verwendeten Vektoren sind dargestellt.

Obere Reihe: Die *StarGate*-Fusionsklonierungsvektoren pENTRY-; pCFUSE-, pNFUSE- und der Expressionsvektor pASG-IBA für die prokaryotische Expression in *E. coli* sind dargestellt.

Mittlere Reihe: Die Vektoren pTXB1 und pMAL-c2X wurden zur prokaryotischen Expression in *E. coli* genutzt, pHEN2 zu Präsentation des Peptides auf der Oberfläche des M13-Bakteriophage.

Untere Reihe: Die Vektoren pBUDCE4.1 und pFastBac™Dual wurden zur eukaryotischen Expression in HEK293- und Sf9-Zellen verwendet.

9.3 Gefahrstoffe und Sicherheitsdaten gemäß GHS

Gefahrensymbole, Gefahrenhinweise (H-Sätze, *Hazard Statements*) und Sicherheitsratschläge (P-Sätze, *Precautionary Statements*) verwendeter Substanzen nach dem GHS-System.

Verbindung	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
ABTS	GHS07	315/319/335	261/305+351+338
Acrylamid	GHS06/08	350/340/361/301/372 332/312/319/317	201/280/301/310/ 305+351+338/308+313
Ammoniumpersulfat	GHS02/07/08	272/302/315/319/335/ 334/317	280/305+351+338/302+ 352/304+341/342+311
Ampicillin	GHS07/08	315/317/319/334/335	261/280/305+351+338/ 342+311
EDTA	GHS07	319	305/351/338
Eisessig	GHS02/05	226-314	280- 301+330+331/307/310
Ethanol	GHS02	225	210
Ethidiumbromid	GHS06/08	341/330/302	281/302/352/ 305+351+338/304+340 309/310
Imidazol	GHS05/07/08	302/314/361d	280/301+331/ 305+351+338/309/310
Kanamycinsulfat	GHS08	360d	281/201/ 305+351+338 308+313
Methanol	GHS02/06/08	225/331/311/301/370	210/233/280/302+352
Natronlauge	GHS05	314	301+330+331/310 305+351+338
Nickelsulfat	GHS08/07/09	350i/341/360d/372/ 332/302/315/334/317	201/280/273/308+313 342+311/302+352 301+330+331/309/310 305+351+338
2-Propanol	GHS02/07	225/319/336	210/233/305+351+338
Salzsäure	GHS05/07	314/335	260/301+330+331 361+353/305+351+338 405/501
SDS	GHS06/02	228/331/302/335/315 319	210/280/304+340/ 305+351+338/309+310
TEMED	GHS02/05/07	225/332/302/314	210/233/280 301+330+331 305+351+338/309+310
Tris	GHS07	315/319/335	216/305+351+338
Wasserstoffperoxid	GHS03/05/07	271/332/302/314	220/261/280 305+351+338/310
Zitronensäure	GHS05	318	305+351+338

9.4 Entsorgung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden den jeweiligen H- und P- Sätzen entsprechend gehandhabt und gemäß Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) entsorgt.

Ethidiumbromid-haltige Abfälle wurden in gesonderten Behältern gesammelt und der Entsorgung zugeführt.

Der Umgang mit humanen Zellen wurde ausschließlich auf Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 nach §7 GenTG beschränkt. In S1-Laboratorien angefallene Abfälle insbesondere durch gentechnisch veränderte Organismen kontaminierte Abfälle wurden vor der Entsorgung vorzugsweise in einem Autoklaven durch Einleiten gespannten Wasserdampfes sterilisiert (120 °C, 5 bar, 20 min).

- Herrn Assoc Prof. Dr. Edzard Spillner danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die kreativen Ideen, Strategien und Diskussionen, die eine maßgebliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit waren.
- Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.
- Mein besonderer Dank gilt Henning für die stete Unterstützung und die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Allen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppen Bredehorst und Spillner danke ich für die angenehme Atmosphäre und die entgegengebrachte Hilfestellung.
- Yvonne, Julia, Hélène, Anna, Thorsten, Dirk und Tim danke ich für die Hilfsbereitschaft, die witzigen, interessanten und manchmal sogar tiefgründigen Gespräche und die schönen Pausen zwischendurch.
- Danke an Katharina für die Unterstützung bei der Peptidsynthese.
- Ein großes Dankeschön geht an Laura und Anita, die im Rahmen ihres Studiums Bachelorarbeiten geschrieben und durch ihren Fleiß zu dieser Arbeit beigetragen haben.
- Ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, meiner Schwester Gabi und meinem Bruder Karsten für die Unterstützung und Motivation während dieser nicht immer leichten Zeit des Promotionsstudiums.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Literaturverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Weiterhin erkläre ich, dass keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind, oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg,

Andrea Diethers

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andrea Michaela Barbara Diethers
Adresse	Heckscherstraße 9b, 20253 Hamburg
Geburtsdatum/-ort	21.11.1984 in Soest
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig

Ausbildung

10/2010 bis heute	Doktorarbeit an der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Assoc. Prof. E. Spillner, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Schwerpunkt: Charakterisierung von B-Zell-Liganden im Kontext maligner Erkrankungen und allergener Erkrankungen.
10/2004 bis 06/2010	Biologie-Studium an der Universität Hamburg; Hauptfach Biochemie, Abschluss: Diplom.
08/1995 bis 06/2004	Städtisches Gymnasium in Bad Segeberg, Abschluss: Abitur.

Publikationen und prämierte Vorträge

- Hecker J, **Diethers A**, Schulz D, Sabri A, Plum M, Michel Y, Mempel M, Ollert M, Blank S, Braren I, Spillner E, "Generation and epitope analysis of human monoclonal antibody isotypes with specificity for the Timothy grass major allergen Phl p 5a.", *mMolecular Immunology*, 2011.
- Hecker J, **Diethers A**, Etzold S, Seismann H, Michel Y, Plum M, Bredehorst R, Blank S, Braren I, Spillner E, "A human monoclonal IgE derived from hybrid repertoire libraries defines an epitope genuine for Bet v 1 and fagales PR10 proteins", *Allergy* 2012 Dec;48(9-10):1236-44.
- Plum M, Michel Y, Wallach K, Raiber T, Blank S, Bantleon FI, **Diethers A**, Greunke K, Braren I, Hackl T, Meyer B, Spillner E, "Close-up of the Immunogenic α 1,3-Galactose Epitope as Defined by a Monoclonal Chimeric Immunoglobulin E and Human Serum Using Saturation Transfer Difference (STD) NMR", *Journal of Biological Chemistry* 2011 Dec 16;286(50):43103-11.
- **Präsentationen und Auszeichnungen**
 - 23. Mainzer Allergie-Workshop, Auszeichnung für die Präsentation und Einladung zum 6. Deutschen Allergiekongress
 - 6. Deutscher Allergiekongress, Auszeichnung für die Präsentation
 - internationaler Kongress in Genf, (EAACI)-Congress, Kurzvortrag und Posterpräsentation