

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Abteilung für Molekulare Infektiologie  
Direktor Prof. Dr. Ulrich Schaible

**Untersuchung zur Kreuzreaktivität und Spezifität  
von Antikörpern gegen  
Lipopolysaccharide von Chlamydien**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -  
Dekan Prof. Dr. Jürgen Prestin

Vorgelegt von  
Sandra Gerstenbruch  
aus Schwerin  
Lübeck, 2009

1. Berichterstatter: PD Dr. Sven Müller-Loennies  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Peters  
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Enno Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2009

## Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Dissertation habe ich unter Anleitung meines Doktorvaters PD Dr. Sven Müller-Loennies am Forschungszentrum Borstel, Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften in der Abteilung für Molekulare Infektiologie bei Prof. Dr. Helmut Brade angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation bisher noch an keiner wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde und ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Lübeck, den 15.03.2009

Unterschrift.....

*Stärke entspringt nicht aus physischer Kraft,  
sondern aus einem unbeugsamen Willen.*

Mahatma Gandhi

# VERZEICHNISSE UND ERLÄUTERUNGEN

---

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
I.1.	Chlamydien	1
I.2.	Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	5
I.2.1	Die Bindung von Kohlenhydraten an Lektine.....	6
I.2.2	Struktur von Antikörpern .....	8
I.2.3	Herstellung von Antikörperfragmenten.....	9
I.2.4	Die Bindung von Kohlenhydraten an Antikörper.....	13
I.2.5	Antikörper gegen Lipopolysaccharid von Chlamydien.....	15
I.3.	Ermitteln von Bindungsaktivitäten über Biosensoren	20
I.3.1	SPR (Surface Plasmon Resonance)-Biosensoren .....	21
I.3.2	SAW (Surface Acoustic Wave)-Biosensoren.....	22
I.3.3	Immobilisierung von Proteinen auf einem Sensorchip .....	24
I.3.4	Bestimmung von Affinitäten über die BIAevaluation Software .....	25
I.4.	Ziel der Arbeit	30
II.	MATERIAL UND METHODEN	31
II.1.	Organismen, DNA-Konstrukte und Proteine	31
II.1.1	Elementarkörper von Chlamydien.....	31
II.1.2	Verwendete Organismen, Plasmide und Vektoren.....	31
II.1.3	Neoglycokonjugate.....	32
II.1.4	Monoklonale Antikörper .....	35
II.2.	Methoden zur DNA-Analyse und DNA-Modifikation	36
II.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36
II.2.2	Mutagenese-PCR.....	37
II.2.3	Umklonierung des scFv NH2240-19 in den Expressionsvektor pSJF8 .....	39
II.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	39
II.2.5	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	41
II.2.6	Reinigung von DNA.....	41
II.2.7	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	41
II.2.8	Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....	41
II.2.9	DNA-Restriktion für die Klonierung von DNA-Fragmenten.....	42
II.2.10	DNA-Restriktion nach Mutagenese-PCR.....	43
II.2.11	Ligation von DNA-Fragmenten.....	43
II.3.	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	44
II.3.1	Kultivierung und Selektion von <i>E. coli</i> in Standardmedien .....	44
II.3.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> für die Induktion der Proteinexpression .....	44
II.3.3	Stammhaltung.....	45
II.3.4	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	46
II.3.5	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	47
II.3.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	47
II.4.	Proteinanalytische und proteinpräparative Methoden	48
II.4.1	Proteinextraktion .....	48
II.4.2	Proteinnachweis über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)....	49
II.4.3	Proteinnachweis mittels Dot- und Western Blot .....	52
II.4.4	Dialyse von Proteinlösungen für die Affinitätschromatographie.....	54
II.4.5	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	54
II.4.6	Proteinreinigung mittels Größenausschlusschromatographie .....	56
II.4.7	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	57
II.4.8	Konzentrierung von Proteinlösungen .....	57

## VERZEICHNISSE UND ERLÄUTERUNGEN

---

II.4.9	Reinigung des monoklonalen Antikörpers S45-18.....	57
II.4.10	Quantitative photometrische BCA-Proteinbestimmung des S45-18.....	58
II.4.11	Herstellung von S45-18 Fab-Fragmenten mittels Papain Digestion.....	59
II.4.12	Reinigung von S45-18 Fab-Fragmenten nach dem Papain-Verdau.....	59
II.5.	Nachweis der Aktivität von Antikörpern und Antikörperfragmenten	60
II.5.1	Immunfluoreszenz.....	60
II.5.2	Beschichten von Mikrotiterplatten mit einem Liganden.....	61
II.5.3	ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay).....	63
II.5.4	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	65
II.5.5	Oberflächenakustikwellen-Biosensor (SAW).....	67
III.	ERGEBNISSE	69
III.1.	Mutagenese der scFv	69
III.2.	Bakterielle Expression der scFv	72
III.3.	Aufreinigung der scFv	73
III.4.	Darstellung von Fab-Fragmenten des mAk S45-18	75
III.5.	Biochemische Untersuchungen mit Chlamydien	78
III.5.1	Immunfluoreszenz.....	78
III.5.2	ELISA gegen isolierte Chlamydien.....	80
III.6.	Biochemische Untersuchungen mit isolierten Oligosacchariden und Neoglycokonjugaten im ELISA	81
III.6.1	Untersuchungen zum Einfluss der hydrophoben Wechselwirkung auf die Bindung verschiedener Kdo-Oligosaccharide.....	82
III.6.1.1	ELISA mit Kdo-haltigen Neoglycokonjugaten ohne Lipoid A-Grundgerüst .	82
III.6.1.2	ELISA mit Kdo-haltigen Neoglycokonjugaten mit Lipoid A-Grundgerüst	84
III.6.2	Untersuchungen zum Einfluss der CDR H3-Struktur auf die Bindung verschiedener Kdo-Oligosaccharide.....	86
III.6.2.1	ELISA mit Kdo-haltigen Neoglycokonjugaten ohne Lipoid A-Grundgerüst .	86
III.6.2.2	ELISA mit Kdo-haltigen Neoglycokonjugaten mit Lipoid A-Grundgerüst	88
III.7.	Bestimmung von Bindungskonstanten durch Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen (BIAcore)	89
III.8.	Bestimmung von Bindungskonstanten über Oberflächenakustische Wellen (SAW)	99
IV.	DISKUSSION	108
IV.1.	Herstellung rekombinanter Antikörper	108
IV.2.	Serologische Charakterisierung rekombinanter Antikörper	112
V.	ZUSAMMENFASSUNG	127
VI.	LITERATUR	129
VII.	ANHANG	141
VII.1.	Oligonukleotidsequenzen	141
VII.2.	Gen- und Proteinsequenzen	142
VII.3.	Molekulargewichte in Bindungsstudien verwendeter Proteine	143
	DANKSAGUNG	144
	LEBENS LAUF	145
	PUBLIKATIONEN	146
	POSTERPRÄSENTATIONEN	146

# VERZEICHNISSE UND ERLÄUTERUNGEN

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Chemische Struktur des LPS von Chlamydien.....	4
Abb. 2: Struktur von Antikörpern .....	9
Abb. 3: Der Phage-Display-Zyklus .....	12
Abb. 4: Räumliche Struktur zweier Kohlenhydrat-bindender Antikörper.....	14
Abb. 5: Vergleich der Primärstruktur der variablen Domänen VL und VH der Chlamydien-spezifischen mAk S25-2, S45-18, S69-4 .....	16
Abb. 6: Bindungstasche zweier Chlamydien-LPS-bindender Antikörper.....	17
Abb. 7: Vergleich der Struktur der CDR H3 des mAk S45-18 und des scFv NH2240-31.....	20
Abb. 8: Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	22
Abb. 9: Prinzip des SAW-Biosensors.....	23
Abb. 10: Aufbau einer Sensorchip-Oberfläche. ....	25
Abb. 11: Klonierungsvektor Phagemid pComb3XSS und Expressionsvektor pSJF8.....	32
Abb. 12: Strukturen der Konjugate aus Oligosacchariden des LPS von Chlamydien nach unterschiedlicher Konjugation.....	34
Abb. 13: Vergleich der Aminosäuresequenzen der variablen Domänen VL und VH der Wildtyp scFv und durch Mutation hergestellten Antikörper im Vergleich zum S45-18 .....	71
Abb. 14: SDS-PAGE und Western Blot nach Proteinexpression. ....	72
Abb. 15: Chromatogramm einer IMAC-Aufreinigung.....	74
Abb. 16: SDS-PAGE nach Affinitätschromatographie des scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> .....	74
Abb. 17: Chromatogramm eines Gelfiltrationslaufs einer scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> -Probe nach IMAC.....	74
Abb. 18: SDS-PAGE des S45-18 mAk und Fab .....	75
Abb. 19: Chromatogramm der Fab S45-18-Reinigung über DEAE-Sepharose .....	76
Abb. 20: SDS-PAGE einiger Elutionsfraktionen der DEAE-Aufreinigung nach Papainverdau.....	77
Abb. 21: Gelfiltration und SDS-PAGE einer Fab S45-18-Probe .....	78
Abb. 22: Fluoreszenznachweis von Chlamydien-Einschlüssen in Humanzellen .....	79
Abb. 23: ELISA von scFv- und Fab-Antikörperfragmenten gegen isolierte Chlamydien. ....	80
Abb. 24: ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokonjugate ohne Lipoid A-Grundgerüst. ScFv NH2240-31 WT, H <sub>3F</sub> , H <sub>3A</sub> und SAG506-01 WT .....	83
Abb. 25: ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokonjugate mit Lipoid A-Grundgerüst. ScFv NH2240-31 WT, H <sub>3F</sub> und H <sub>3A</sub> und SAG506-01 WT.....	85
Abb. 26: ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokonjugate mit Lipoid A-Grundgerüst. ScFv NH2240-31, H <sub>2p</sub> , L <sub>1N</sub> und H <sub>3FL1N</sub> .....	86
Abb. 27: ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokonjugate ohne Lipoid A-Grundgerüst. ScFv S69-4 WT, S69-4 H <sub>3ante</sub> , S69-4 H <sub>3post</sub> und 1:100 verdünnter Fab S45-18 .....	87
Abb. 28: ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokonjugate mit Lipoid A-Grundgerüst. ScFv S69-4 WT, S69-4 H <sub>3ante</sub> , S69-4 H <sub>3post</sub> und 1:100 verdünnter Fab S45-18 .....	89
Abb. 29: Sensorgramm einer Immobilisierung des scFv NH2240-31.....	90
Abb. 30: SPR-Bindungskurven der Interaktion von HS-BP mit immobilisiertem NH2240-31 .....	91
Abb. 31: SPR-Bindungsdaten der Interaktion scFv NH2240-31 gegen immobilisiertes HS-4P <sup>1</sup> .....	92
Abb. 32: SPR-Bindungsdaten der Interaktion scFv NH2240-31 gegen immobilisiertes HS-4P <sup>2</sup> .....	94
Abb. 33: SPR-Bindungsdaten der Interaktion scFv NH2240-31 gegen 2.4/2.4 PS-4P und 2.8/2.4 PS-4P .....	97
Abb. 34: SPR-Bindungsdaten der Interaktion Fab S25-2 gegen immobilisiertes 2.8/2.4 PS-4P.....	99
Abb. 35: SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P auf allen fünf Messzellen .....	100
Abb. 36: SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P <sup>2</sup> .....	101
Abb. 37: SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P <sup>2</sup> nach Referenzsubtraktion.....	102
Abb. 38: SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> gegen HS-4P <sup>1</sup> .....	103
Abb. 39: Kinetische Auswertung der Interaktion scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P <sup>1</sup> .....	105
Abb. 40: SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> und Fab S45-18 gegen HS-4P <sup>1</sup> und 2.4/2.4 PS-4P.....	106
Abb. 41: Gen- und Proteinsequenz des scFv NH2240-31 .....	142

# VERZEICHNISSE UND ERLÄUTERUNGEN

---

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Elementarkörper von Chlamydien für ELISA-Bindungsstudien.....	31
Tab. 2: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Bakterien. ....	31
Tab. 3: Neoglycokonjugate aus BSA und isolierten Oligosacchariden aus deacyliertem LPS .....	33
Tab. 4: ITC-Konjugate aus synthetisch hergestellten Oligosacchariden. ....	34
Tab. 5: DVS-Konjugat BBP.....	35
Tab. 6: Tabelle der verwendeten monoklonalen Antikörper und ihre Reinigung.....	35
Tab. 7: PCR-Standardprogramm. ....	37
Tab. 8: PCR-Programm für Mutagenese .....	39
Tab. 9: Zusammensetzung für zwei Polyacrylamidgele.....	50
Tab. 10: Übersicht der Antikörperfragmente.....	70
Tab. 11: Expressionsverhalten der untersuchten scFv und Menge an löslichem Protein.. ....	73
Tab. 12: OD-Werte eines ELISA mit Fab-Präparationen.....	77
Tab. 13: Bindungsraten der Interaktion scFv NH2240-31 und HS-4P <sup>1</sup> über SPR bestimmt.....	93
Tab. 14: Bindungsraten der Interaktionen scFv NH2240-31 und HS-4P <sup>2</sup> über SPR bestimmt .....	94
Tab. 15: Bindungsraten der Interaktionen diverser scFv und Fab mit HS-4P <sup>2</sup> über SPR bestimmt .....	95
Tab. 16: Belegungsraten aller immobilisierten Liganden.....	96
Tab. 17: Bindungsraten der Interaktionen diverser scFv und Fab mit 2.4/2.4 PS-4P über SPR bestimmt .....	98
Tab. 18: Bindungsraten der Interaktion scFv NH2240-31 H <sub>3F</sub> mit HS-4P <sup>1</sup> über SAW bestimmt .....	104
Tab. 19: Bindungsraten der Interaktion diverser scFv und Fab mit HS-4P <sup>1</sup> über SAW bestimmt .....	107
Tab. 20: Bindungsraten der Interaktion diverser scFv und Fab mit 2.4/2.4 PS-4P über SAW bestimmt.....	107
Tab. 21: Verwendete Oligonukleotide für die PCR.....	141
Tab. 22: Molekulargewichte der Antikörperfragmente .....	143
Tab. 23: Molekulargewichte der für Biacore- und SAW-Experimente verwendeten Neoglycokonjugate....	143

# VERZEICHNISSE UND ERLÄUTERUNGEN

---

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung(en)
ABTS	(2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Zirkulärer Dichroismus
CDR H	komplementaritätsbestimmende Region der schweren Kette eines Antikörpers
CDR L	komplementaritätsbestimmende Region der leichten Kette eines Antikörpers
CF	Komplementbindungsreaktion
<i>C. pecorum</i>	<i>Chlamydophila pecorum</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
<i>C. psittaci</i>	<i>Chlamydophila psittaci</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EB's	Elementarkörper (Elementary bodies)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
EtOH	Ethanol
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizing
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FZ	Forschungszentrum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HL	Hodgkin Lymphom
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Metall-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
$k_a$	Assoziationsrate
$k_d$	Dissoziationsrate
$K_D$	Dissoziationskonstante (Bindungsrate)
Kdo	2-Keto-3-desoxy- $\alpha$ -octonsäure
Kit	Zusammenstellung von Reagenzien eines Herstellers
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MIF	Mikroimmunfluoreszenz
MOMP	major outer membrane protein
OD <sub>260</sub> , OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 600 nm
ORF	offener Leserahmen
n.d.	nicht definiert
NMR	Kernspinresonanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## VERZEICHNISSE UND ERLÄUTERUNGEN

---

PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i> -Polymerase	<i>Pyrococcus furiosus</i> -Polymerase
pH	Wasserstoffionen-Konzentration (potentia hydrogenii)
pI	isoelektrischer Punkt
Primer	Oligonukleotid, das als Startfragment für eine DNA-Synthese dient
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R <sub>eq</sub>	Resonanzsignal im Gleichgewicht
R <sub>max</sub>	maximales Resonanzsignal
RT	Raumtemperatur
SAW	Oberflächenakustikwelle(n)
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
scFv	single chain Fragment variable
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
Tab.	Tabelle(n)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TB	terrific broth
TBST	Tris-NaCl-Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
üN	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
VL	variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
VH	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

### PRÄFIXE FÜR EINHEITEN

k	Kilo (10 <sup>3</sup> -fach)
M	Mega (10 <sup>6</sup> -fach)
m	Milli (10 <sup>-3</sup> -fach)
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> -fach)
n	Nano (10 <sup>-9</sup> -fach)
p	Piko (10 <sup>-12</sup> -fach)

### EINHEITEN

bp	Basenpaare(e)
d	Tag(e)
Da	Dalton
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hz	Herz
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute(n)

## VERZEICHNISSE UND ERLÄUTERUNGEN

---

rpm	Umdrehungen pro Minute
RU	Resonanzeinheit(en)
s	Sekunde(n)
U	Einheit der Enzymaktivität
V	Volt

### ABKÜRZUNGEN FÜR NUKLEOSIDE

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymin

### 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

### ERKLÄRUNG ENGLISCHER FACHTERMINI

Annealing	Hybridisierung einzelsträngiger, komplementärer DNA-Fragmente
Antisense primer	Oligonukleotid, das am 5'-3'-Strang der DNA bindet
Fitting	Kurvenanpassung
Linker	Verbindungssequenz
Panning	Schwenken
Primer	einzelsträngiges Oligonukleotid, das DNA-Polymerasen zur Initiation benötigen
Sense primer	Oligonukleotid, das am 3'-5'-Strang der DNA bindet
Spacer	Abstandhalter
Tag	ein definiertes Aminosäuremotiv



## I. EINLEITUNG

### I.1. Chlamydien

Bakterien der Familie *Chlamydiaceae* sind obligatorisch intrazelluläre Pathogene, die beim Menschen und im Tier infektiöse Erkrankungen auslösen können (Storz, 1971; Moulder, 1991). Chlamydien vermehren sich in einem einzigartigen Entwicklungszyklus. Metabolisch inaktive, aber infektiöse Elementarkörper, die das extrazelluläre Stadium bilden, differenzieren nach Eintritt in die Wirtszelle innerhalb eines endosomal Kompartiments in metabolisch aktive, nichtinfektiöse, multiplizierende Retikularkörper (Schachter und Caldwell, 1980; Abdelrahman und Belland, 2005). Auf diese Weise können Chlamydien persistierende chronische Infektionen auslösen (Moulder *et al.*, 1980). *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydophila pecorum* sind die am häufigsten auftretenden Mitglieder der Familie der *Chlamydiaceae* (Everett, 2000). Auslöser des Augentrachoms sind Infektionen mit bestimmten Serovaren von *C. trachomatis*, die besonders in Entwicklungsländern häufig sind und zur Erblindung führen können (Schachter, 1978; Burton, 2007). Die Serovare D bis K von *C. trachomatis* sind für sexuell übertragbare Krankheiten verantwortlich und sind die Hauptursache für Urethritis, eine der weltweit häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten überhaupt (Hobson, 1977; Gerbase *et al.*, 1998; Bradshaw *et al.*, 2006). Des Weiteren sind sie Erreger chronischer Entzündungen der Eileiter (Hobson, 1977) und die Hauptursache für Infertilität bei Frauen in Entwicklungsländern (Paavonen und Eggert-Kruse, 1999; Malik *et al.*, 2008). Neben Atemwegserkrankungen, wie Bronchitis oder Sinusitis, wurden *C. pneumoniae*-Infektionen mit Arteriosklerose in Verbindung gebracht (Grayston, 2000). Von veterinärmedizinischer Bedeutung ist *C. pecorum* als Ursache der Encephalomyelitis (McNutt und Waller, 1940), Polyarthrit (Storz *et al.*, 1966), Pneumonien (Wilson und Thomson, 1968) oder Enteritis (Doughri *et al.*, 1974) bei Rindern. Eine durch Übertragung von Papageien und anderen Vögeln auf den Menschen durch *C. psittaci* ausgelöste zoonotische Erkrankung ist die Psittakose (Ornithose), einer in Deutschland meldepflichtigen Erkrankung, die bei einer akuten Infektion zu Lungenentzündung, Endo- oder Myokarditis führen kann (RKI Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern Ausgabe 2007; Smith *et al.*, 2005). Das Serovar A von *C. psittaci* ist

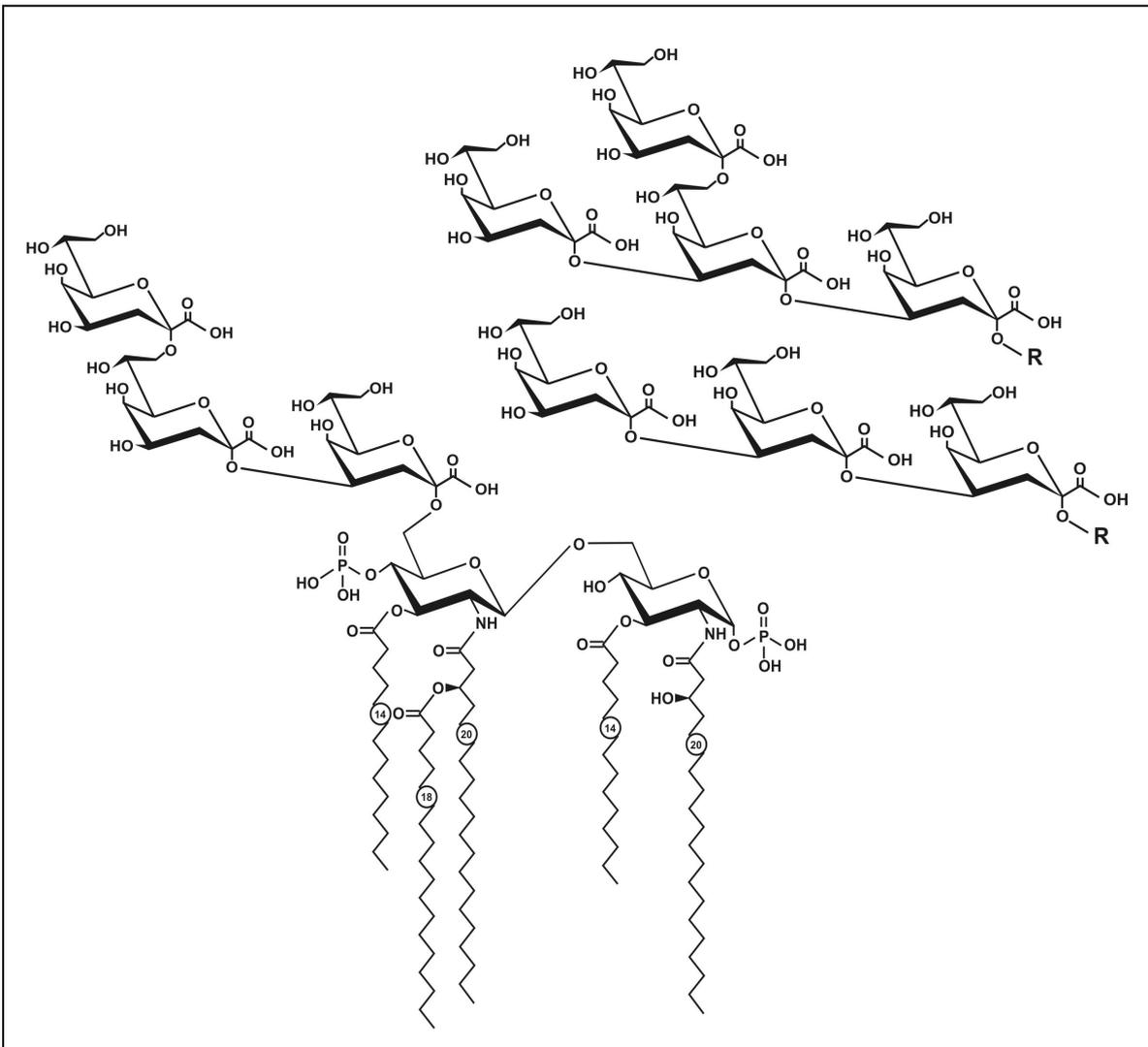
endemisch bei Papageienvögeln verbreitet und hat bekanntermaßen sporadische zoonotische Erkrankungen beim Menschen ausgelöst. Das Serovar B ist endemisch bei Tauben verbreitet und wurde als Ursache von Fehlgeburten bei Milchkühen identifiziert. Die Serovare C und D stellen eine potentielle Bedrohung für Arbeiter in Schlachthäusern dar. Isolate des Serovars E konnten von einer Reihe verschiedener avianer Spezies isoliert werden und werden mit Krankheitsausbrüchen zwischen den Jahren 1920 bis 1930 in Verbindung gebracht. Dennoch konnte bislang kein spezifisches Reservoir für dieses Serovar identifiziert werden. Aktuelle Berichte zeigen jedoch, dass neben den wirtschaftlichen Folgen durch Infektionen von Nutztieren (Vanrompay *et al.*, 1995) die Übertragung von *C. psittaci* auf den Menschen auch von humanmedizinischer Bedeutung ist (Berk *et al.*, 2008; Ciftçi *et al.*, 2008; Petrovay und Balla, 2008). In einer kürzlich erschienenen Publikation (Dean *et al.*, 2008) wurde der häufige Nachweis (~30%) von *C. pneumoniae* und *C. psittaci* aus Okularinfektionen berichtet. Somit erscheint es grundsätzlich möglich, dass außer *C. trachomatis* ebenfalls diese beiden Spezies für die Ausbildung eines aktiven Trachoms verantwortlich sein können. Sollte sich dieser Befund bestätigen würde dies den fehlenden Nachweis von *C. trachomatis* bei einer Anzahl von Trachomerkrankungen erklären können.

Die Diagnose von *C. psittaci* und anderer Chlamydien erfolgt heute serologisch oder über PCR (Petrovay und Balla, 2008). Obwohl die Nutzung der DNA-Amplifikation zur Identifizierung von Mikroorganismen in vielen mikrobiologischen Laboratorien zunimmt, bleiben besonders aufgrund neuer pathogener Chlamydien und Chlamydien-ähnlicher Bakterien, wie *Parachlamydia acanthamoebae* (Greub und Raoult, 2002) und *Simkania negevensis* (Friedman *et al.*, 2003), Antikörper für die Diagnostik von großer Wichtigkeit. Hier werden mittels Mikroimmunfluoreszenz (MIF) oder über die Komplementbindungsreaktion (CF: complement fixation test) hauptsächlich Antikörper gegen Lipopolysaccharid (LPS) (Medac GmbH, Wedel) oder gegen Oberflächenproteine von Chlamydien, wie MOMP (major outer membrane protein), im Serum der Patienten nachgewiesen (Stephens *et al.*, 1982; Hackstadt *et al.*, 1985). Jedoch sind diese Techniken schwierig zu standardisieren und werden durch eine aufwendige und komplizierte Kultivierung von Chlamydien erschwert und erfordert ein hohes Maß an Erfahrung bei der Interpretation der Ergebnisse (Kaltenboeck *et al.*, 1997). Zudem sind CF-Antikörper besonders bei chronischen Infektionen oder Reinfektion von *C. pneumoniae* nicht immer

nachweisbar (Grayston *et al.*, 1989; Chirgwin *et al.*, 1991). Die PCR-Diagnostik ist aufgrund falsch-positiver (Boman *et al.*, 1999) oder falsch-negativer Ergebnisse mit einer Unsicherheit behaftet, die zur Bestätigung eine aufwendige Anzucht der Bakterien in Zellkulturen erfordert (Dowel *et al.*, 2001; Berk *et al.*, 2008). Die Entwicklung zusätzlicher neuer schneller und zuverlässiger Nachweismethoden ist somit weiterhin von Bedeutung für die medizinische Diagnostik von Chlamydien. Hierbei erscheint eine Kombination molekularer und serologischer Techniken besonders sinnvoll (Corsaro und Greub, 2006). Solch eine Differenzierung zwischen Chlamydien-Spezies spielt nicht nur für die öffentliche Gesundheit eine Rolle, sondern ist auch für die richtige Wahl des Antibiotikums von Bedeutung (Kuo und Grayston, 1988; Grayston *et al.*, 1989), da Chlamydien eine unterschiedliche Empfindlichkeit aufweisen (Grayston, 1988; Sillis, 1992).

Für den serologischen Nachweis kommt neben dem Hauptoberflächenantigen MOMP (major outer membrane protein) insbesondere das LPS von Chlamydien als Antigen in Frage, da die Bildung spezifischer und hochaffiner Antikörper gegen diese Antigene bei Infektionen zuverlässig beobachtet wird (Schachter und Caldwell, 1980).

Lipopolysaccharide sind Glycolipide der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, die über einen Lipidanteil, das Lipoid A, in der Membran verankert sind. Das am häufigsten angetroffene Lipoid A besteht aus einem  $\beta(1\rightarrow6)$ -verknüpften, 1,4'-bisphosphorylierten GlcN-Disaccharid (Lipoid A-Grundgerüst), das in den Positionen 2, 2' (amidgebunden) und 3 und 3' (estergebunden) mit Hydroxy-Fettsäuren acyliert ist, die ihrerseits häufig mit sogenannten sekundären Fettsäuren verestert sind. Das LPS von Chlamydien enthält neben dem Lipoid A als Lipidanker ausschließlich 2-Keto-3-desoxy- $\alpha$ -octonsäure (Kdo) und ist somit ein sogenanntes R-Form LPS (Brade *et al.*, 1997a), das der Mutante R595 von *S. enterica* strukturell ähnlich ist (Brade *et al.*, 1987a,b; Nano und Caldwell, 1985). Während enterobakterielles Re-LPS ausschließlich ein  $\alpha(2\rightarrow4)$ -verknüpftes Kdo-Disaccharid enthält, das an die Position 6' des Lipoid A-Grundgerüsts gebunden ist, konnten im LPS von Chlamydien die linearen Trisaccharide  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo und  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo sowie ein verzweigtes Kdo-Tetrasaccharid  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)]- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo nachgewiesen werden (Abb. 1, Nurminen *et al.*, 1983; Brade *et al.*, 1987a; Holst *et al.*, 1995).



**Abb. 1:** Chemische Struktur des LPS von Chlamydien (Nurminen *et al.*, 1983; Brade *et al.*, 1987a; Holst *et al.*, 1995). Gezeigt ist das familienspezifische Epitop  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo gebunden an eine repräsentative Lipoid A-Struktur. Neben dieser kommen viele weitere Lipoid A vor, die sich in ihrer Acylierung unterscheiden. Die Kdo-Oligosaccharide  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo und  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)]- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo wurden ebenfalls in Chlamydien nachgewiesen. R = Lipoid A, Zahlen in den Kreisen = Länge der Fettsäuren.

Die Gene der Kdo-Transferasen von Chlamydien konnten heterolog in *S. enterica* und *E. coli* exprimiert werden (Nano und Caldwell, 1985; Brade *et al.*, 1987b; Belunis *et al.*, 1992; Mamat *et al.*, 1993; Holst *et al.*, 1993; Löbau *et al.*, 1995; Holst *et al.*, 1995). Später konnten die entsprechenden Strukturen auch im natürlich gebildeten LPS aus den Serotypen L<sub>2</sub> und E von *C. trachomatis* (Qureshi *et al.*, 1997; Rund *et al.*, 1999; Heine *et al.*, 2003) und *C. psittaci* 6BC (Rund *et al.*, 2000) analysiert werden. Strukturanalysen des LPS der Re-Mutanten von *S. enterica* und *E. coli*, die Kdo-Transferasen von Chlamydien exprimierten, zeigten zum einen, dass Kdo-Transferasen multifunktionelle Enzyme sind, die mehrere Kdo-Reste in  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)- und  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)-Bindung sequenziell

übertragen können und zum anderen, dass das verzweigte Kdo-Tetrasaccharid nur in *C. psittaci* gebildet wird (Holst *et al.*, 1995). Diese Beobachtung eröffnet prinzipiell die Möglichkeit Antikörper gegen diese Struktur für den Spezies-spezifischen serologischen Nachweis von *C. psittaci* einzusetzen (Müller-Loennies *et al.*, 2006). Neben ihrer medizinischen Bedeutung für die serologische Chlamydiendiagnostik sind diese Antikörper des Weiteren hervorragend als Modellsystem geeignet, um molekulare Grundlagen der Bindung Kohlenhydrat-spezifischer Antikörper zu untersuchen und um die Basis zu schaffen, möglicherweise allgemein gültige Aussagen für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen mit negativ geladenen Kohlenhydraten treffen zu können. Während Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen insbesondere von Lektinen sehr gut untersucht sind, ist über die Wechselwirkung mit Antikörpern auf struktureller Ebene relativ wenig bekannt, da die Kokristallisation von Antikörpern mit Kohlenhydraten auch heute noch große technische Schwierigkeiten bereitet.

### **I.2. Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen**

Aufgrund der möglichen strukturellen Vielfalt besitzen Kohlenhydrate besondere strukturelle und modulatorische Funktionen und sind in Form von Glycolipiden oder Glycoproteinen (N- und O-Glycanen) an wichtigen biologischen Vorgängen, wie z. B. der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, beteiligt. Die hohe Diversität und evolutionäre Veränderung von Glycanen hat eine große Bedeutung in Wirts-Pathogen-Wechselwirkungen, wie z. B. bei der Erkennung von Mikroorganismen durch Lektine oder Antikörper. Glycane spielen in vielen biologischen Systemen eine Rolle. Zu den Monosacchariden höherer Tiere zählen z. B. Sialinsäuren, Hexosen und Hexosamine, Pentosen und Uronsäuren während in Bakterien zudem Kdo, Rhamnose, Heptose und Muraminsäure zu finden sind. In Pflanzen kommen zusätzlich häufig Galacturonsäuren vor. Diese Monosaccharide bilden die Grundbausteine für eine Vielfalt komplexer Glycanstrukturen, welche zusätzlich durch Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung, Sulfurierung, Methylierung, *N*- bzw. *O*-Acetylierung oder Acylierung, verändert sein können und hierdurch ihre Diversität weiter erhöht wird. Neben reinen strukturgebenden Funktionen und Energiequelle werden viele Kohlenhydrate auch spezifisch durch Proteine, wie z. B. lösliche und membranassoziierte Rezeptoren, erkannt, wodurch sie an einer Vielzahl essentieller zellulärer Vorgänge beteiligt sind. Nicht-enzymatische Proteine, die

eine reversible Bindung mit Kohlenhydraten eingehen und keine Antikörper sind, werden als Lektine bezeichnet. Lektine kommen sowohl in Pflanzen und Tieren, als auch bei Viren und Bakterien vor (Janeway *et al.*, 2002). Viele der molekularen Grundlagen von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen in wässriger Umgebung sind am Beispiel von Lektinen untersucht worden (May *et al.*, 1998; Attrill *et al.*, 2006; Komath *et al.*, 2006). Im Gegensatz hierzu ist die Anzahl kristallisierter Antikörper im Komplex mit Kohlenhydratliganden sehr gering. Im Folgenden sollen kurz einige Charakteristika solcher Interaktionen erläutert werden.

### **I.2.1 Die Bindung von Kohlenhydraten an Lektine**

Die erste Kristallstruktur eines Kohlenhydrat-bindenden Proteins wurde für das Zellwand-abbauende Lysozym beschrieben (Phillips, 1967). Weitere biologisch bedeutsame Strukturaufklärungen wurden für das Concanavalin A (Hardman und Ainsworth, 1972) und das Influenzavirus-Hämagglutinin (Wilson *et al.*, 1981) veröffentlicht. Lemieux und Kabat trugen in diversen Studien über die Bindungsstellen von Kohlenhydrat-bindenden Lektinen und Antikörpern gegenüber spezifischen Blutgruppenantigenen wesentlich zur ersten Aufklärung der Mechanismen von Kohlenhydrat-Protein-Bindungen bei (Kabat *et al.*, 1978; 1981; Baker *et al.*, 1983; Lemieux *et al.*, 1984). Aus diesen Arbeiten ist bekannt, dass vor allem H-Brücken und hydrophobe Interaktionen eine wesentliche Rolle bei der Erkennung spielen. Diese Beobachtung ließ sich aus der natürlichen wässrigen Umgebung erklären, in der diese Bindungsreaktionen ablaufen. Die hohen Solvatisierungs- und Desolvatisierungsenergien sind auch der Grund für die schwierige Berechnung der Bindungsenergien hydrophiler Zuckermoleküle (Darby und Creighton, 1993).

Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen sind im Allgemeinen wenig affin und bewegen sich im Bereich von etwa  $10^{-4}$  M. Ein seltenes Beispiel für eine relativ starke Interaktion ist das Choleratoxin, dessen Kristallstruktur in Kombination mit dem G<sub>M1</sub>-Pentasaccharid aufgeklärt wurde (Merritt *et al.*, 1997). Die Ergebnisse zeigten eine Bindung von nur drei der fünf Zucker. Dies ist generell für solche Interaktionen typisch und erklärt neben der geringen Größe von Monosacchariden und den damit verbundenen wenigen Angriffspunkten die geringe Affinität. Die Bindungsreaktion des Choleratoxins mit dem G<sub>M1</sub>-Pentasaccharid ist vor allem durch H-Brücken sowie durch vermittelnde Wassermoleküle geprägt (Varki *et al.*, 1999). Zusätzlich kommt es zu Van der Waals-

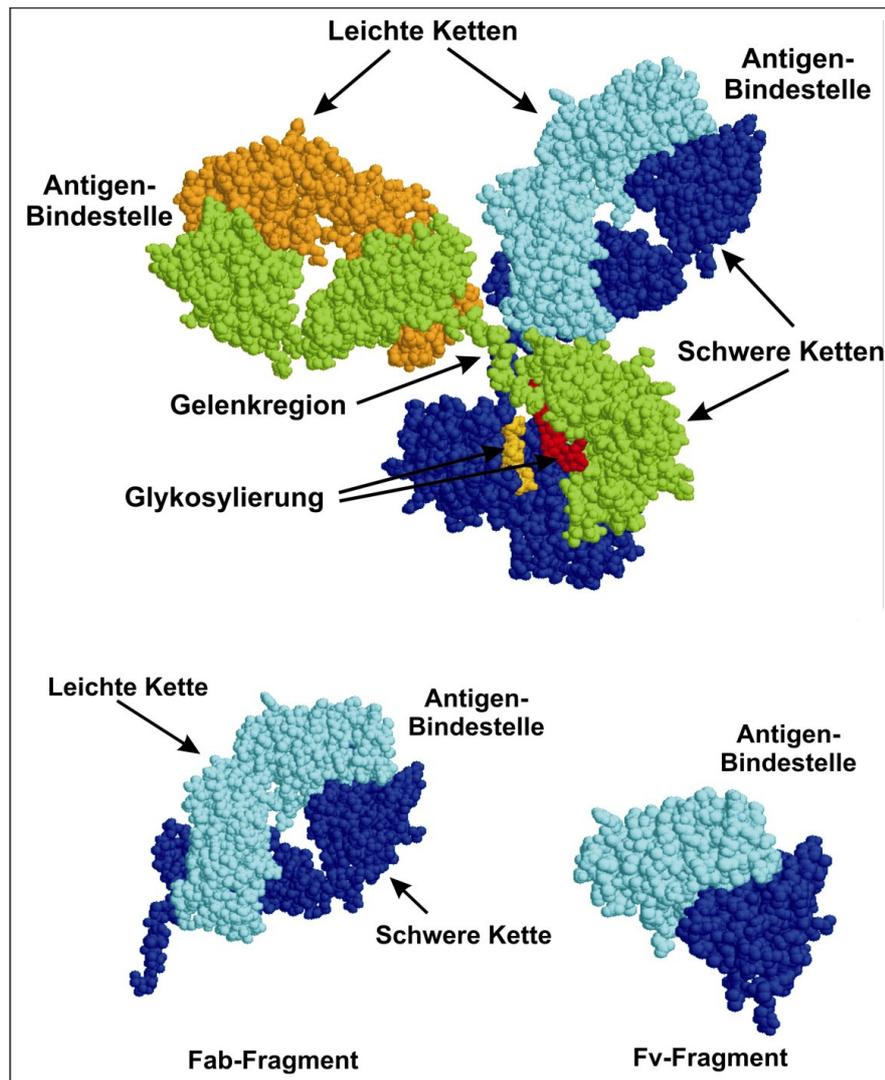
Interaktionen zwischen den unpolaren aromatischen Ringen eines Tryptophans an der Position 88 und dem terminalen  $\beta$ -verknüpften Galactoserest, was zu einer Bindungskonstante von etwa  $10^{-7}$  M führte und somit eines der stärksten Beispiele von monovalenten Kohlenhydrat-Protein-Bindungen darstellt. Die meisten monovalenten Lektin-Interaktionen mit N- oder O-Glycanen sind jedoch von geringer Affinität. Daher wird die Spezifität und Funktion bei natürlich vorkommenden Lektinen über Multivalenz durch nichtkovalente Assoziation oder Zusammenlagerung an der Zelloberfläche und damit einer steigenden Avidität erreicht (Varki *et al.*, 1999).

Um den Vergleich mit den in dieser Arbeit untersuchten Antikörpern gegen das stark negativ geladene LPS von Chlamydien zu ermöglichen, soll im folgenden Abschnitt kurz auf die Bindung von I-Typ Lektinen an Sialinsäure-haltige Liganden eingegangen werden. I-Typ Lektine gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Die meisten Mitglieder dieser Gruppe sind als Rezeptoren oder Zelladhäsionsmoleküle an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Varki *et al.*, 1999). Einige von ihnen binden Kohlenhydrate, wie z. B. die sogenannten Siglecs (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectines). Diese Transmembranproteine binden Sialinsäuren über eine Immunglobulin-ähnliche Bindungsdomäne und haben ihre Funktion in der Zelladhäsion (Crocker, 2002; Jones *et al.*, 2008). Die Bindungsdomäne besteht aus einer Reihe von  $\beta$ -Strängen, die durch hydrophobe Aminosäuren und Cysteinreste zusammengehalten werden (Varki *et al.*, 1999). Für die Antigenbindung wurden einige konservierte Argininreste nachgewiesen, die über Salzbrücken mit dem Antigen interagieren. Anhand von Mutanten des Sialoadhäsins und CD22 (cluster of differentiation-22) wurde gezeigt, dass diese Arginin-Reste essentiell für die Bindung sind, da der Kontakt über die Carboxylgruppen der Sialinsäure erfolgt. Die Kristallstruktur des Sialoadhäsins in Kombination mit der Sialyllactose ergab, neben der Ausbildung von Salzbrücken, die Präsenz von H-Brücken und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Sialinsäure und zwei konservierten aromatischen Tryptophanen (May *et al.*, 1998; Varki *et al.*, 1999). Ähnliche Bindungsmechanismen wurden für das Siglec-7, das  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)-disialinsäurehaltige Liganden bevorzugt bindet, gezeigt (Attrill *et al.*, 1996). Die Kristallstruktur des Siglec-7 in Kombination mit einem synthetisch hergestellten Oligosaccharid, welches dem  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)-Disialinsäure-Gangliosid GT1b entspricht, ergab zahlreiche Interaktionen mit der endständigen Sialinsäure, welche sowohl umfangreiche hydrophobe Kontakte durch Tryptophane als auch polare Schlüsselinteraktionen durch konservierte Arginine, die über die Carboxylationen der

Sialinsäure Salzbrücken bildeten, umfasste. Insbesondere wurde jedoch eine dramatische Konformationsänderung während der Ligandbindung beobachtet, die erst die Bindung des neutralen Glycankerns des Gangliosids ermöglichte (Crocker, 2002).

### **I.2.2 Struktur von Antikörpern**

Die molekulare Grundeinheit eines Antikörpers wird von einer sogenannten leichten Kette (25 kDa) und einer schweren Kette (50 kDa) gebildet, die jeweils eine variable Domäne (VL und VH) besitzen. An diese schließen sich in der leichten Kette eine (constant light, CL) und in der schweren Kette (constant heavy, CH) mehrere konstante Domänen an (Padlan, 1994). Jeweils eine leichte und eine schwere Kette sind über eine Disulfidbrücke miteinander zu einer funktionellen Einheit kovalent verknüpft und bilden mit ihren variablen amino(N)-terminalen Domänen eine Antigenbindungsstelle aus (Anand *et al.*, 1991). Im vollständigen Immunglobulin sind jeweils zwei identische dieser Einheiten ihrerseits über intermolekulare Disulfidbrücken in den konstanten Domänen der schweren Kette miteinander verknüpft. Aufgrund dieser Struktur besitzen die meisten Antikörper zwei identische Antigenbindungsstellen, wie z. B. Antikörper der Klasse IgG (Abb. 2). Antikörper der IgG-Klasse weisen ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa auf, wobei die leichten Ketten ca. 25 kDa und die schweren Ketten ca. 50 kDa besitzen. Antikörper der IgM-Klasse hingegen besitzen mehr als zwei Antigenbindungsstellen und zeichnen sich durch eine geringe Affinität zum Antigen aus. Dies liegt darin begründet, dass ihre Primärstruktur im Wesentlichen von Keimbahngenen determiniert ist, die keine Affinitätsreifung unter T-Zellhilfe durchlaufen haben. In Analogie zu den oben beschriebenen Lektinen bilden sie höhere Oligomere, wobei fünf vollständige Immunglobuline miteinander verknüpft sind und im IgM-Molekül somit zehn Antigenbindungsstellen ausbilden (Janeway, 2002). Die konstanten Bereiche der Antikörperketten sind für die Aktivierung des Komplementsystems von Bedeutung sowie für die Bindung an zelluläre Rezeptoren (Fc-Rezeptoren). Weiterhin sorgen sie für die korrekte Positionierung der Antigenbindungsstellen. Diese wird von sechs hypervariablen Peptidschleifen geformt, die auch als „complementarity determining regions“ (CDR) bezeichnet werden (Davies *et al.*, 1990). Jede Kette besitzt jeweils drei dieser CDR (H1-3 und L1-3). Die von ihnen gebildete dreidimensionale Struktur ist die molekulare Grundlage für die Spezifität von Antikörpern (Padlan, 1994).



**Abb. 2:** Struktur von Antikörpern. Gezeigt ist die Struktur eines Immunglobulins der Klasse G (IgG), aufgebaut aus jeweils zwei leichten (orange, türkis) und zwei schweren Ketten (grün, blau), deren variable Domänen die beiden Antigenbindungsstellen formen (oben). Papain spaltet den IgG in ein Fragment antigen binding (Fab, unten links) und in ein Fragment crystallizing (Fc). Unten rechts ist ein Fragment variable (Fv) dargestellt, welches nur aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette besteht (Padlan, 1994).

### I.2.3 Herstellung von Antikörperfragmenten

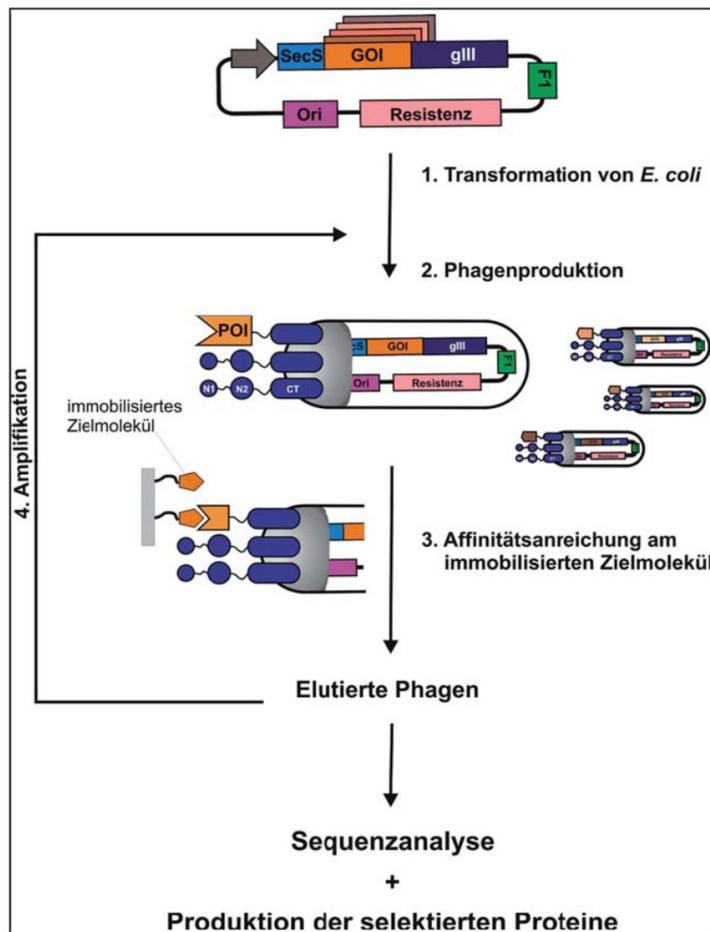
Die Gewinnung von Antikörpern kann über eine Immunisierung von Versuchstieren, wie Mäusen oder Ratten, mit dem entsprechenden Antigen erfolgen. Nachdem das Tier Antikörper gegen ein Antigen gebildet hat, können über eine Fusion der Milz-Lymphozyten mit einer Tumorzelllinie Hybridome konstruiert werden, die sich durch ein permanentes Zellwachstum auszeichnen und eine ständige Produktion der Antikörper gewährleisten (Köhler und Milstein, 1975). Diese Methode zur Gewinnung von Antikörpern ist jedoch sehr zeit- und kostenintensiv. Vollständige Antikörper sind zudem

besonders für Bindungsstudien und bei der Bestimmung von Affinitäten aufgrund der Avidität, resultierend aus den beiden Bindungsstellen der Antikörper, nur bedingt geeignet. Um Bindungsaffinitäten qualitativ und quantitativ vergleichen zu können, sind monovalente Antikörperfragmente von größerer Bedeutung. Auch hinsichtlich therapeutischer Anwendungen sind kleinere Fragmente von Immunglobulinen von Vorteil, da sie schneller aus dem Blutkreislauf entfernt werden können und eine geringere Immunogenität zeigen (Persson, 2001; Coleman und Mahler, 2003). Fragmente ohne Fc-Teil sind interessant, da sie nicht mehr in der Lage sind das Komplementsystem zu aktivieren und zusätzlich unspezifische Bindung reduzieren, was in der Diagnose und Behandlung von Bedeutung ist (Goding, 1986).

Mit Hilfe der Cysteinprotease Papain wird ein IgG-Antikörper in zwei 50 kDa große Antigen-bindende Fragmente (Fab: Fragment antigen binding) und das Fc-Teil (Fc: Fragment crystallizing) gespalten (Andrew und Titus, 2001). Durch die enzymatische Spaltung mit Pepsin hingegen, welches unterhalb der Disulfidbrücken spaltet, kann ein bivalentes  $F(ab')_2$  generiert werden (Andrew und Titus, 2001). Ein kleineres Fragment mit intakter Bindungsstelle ist das 25 kDa große scFv (single-chain Fragment variable). Dieser Miniantikörper besteht aus den Domänen VL und VH, die kovalent durch einen kurzen Peptidlinker verbunden sind (Creighton, 1997). Dieser Linker vereinfacht die funktionelle Faltung der Antigenbindungsstelle und verhindert ein Dissoziieren der Ketten in Lösung (Glockshuber *et al.*, 1990; Anand *et al.*, 1991). ScFv-Antikörper unterscheiden sich gegenüber Fab-Fragmenten durch das Fehlen der konstanten Domänen, falten sich aber in derselben Konformation wie die Fv-Domäne des parentalen Antikörpers (Zdanov *et al.*, 1994). Zudem besitzen Fv, scFv sowie Fab dieselben Bindungseigenschaften wie der vollständige Antikörper (Skerra und Plückthun, 1988; Glockshuber *et al.*, 1990; Skerra *et al.*, 1991) und gewinnen mit ihrer einfachen Darstellung in bakteriellen Systemen eine immer größere Bedeutung. Die ersten Studien, in denen scFv beschrieben wurden, stammen z. B. von Huston *et al.* (1988), Bird *et al.* (1988) und Condra *et al.* (1990). Auch als immunologische Agenzien für diverse Anwendungen in der Biologie, der klinischen Diagnose und Therapie, finden solche Fragmente Interesse (Creighton, 1997; Zhang *et al.*, 2007). Zudem besitzen scFv großes Potenzial für die Krebstherapie aufgrund ihrer geringen Größe und einer daraus resultierenden höheren Tumorpenetration und schnelleren Entfernung aus dem Kreislauf (Yokota *et al.*, 1992).

Die Generierung monovalenter Antikörperfragmente wird heute vorwiegend über rekombinante DNA-Technologie realisiert, da die Gewinnung solcher Fragmente durch proteolytischen Verdau vollständiger Antikörper oft nicht erfolgreich ist (Anand *et al.*, 1991). Die Klonierung und Expression von Antikörperfragmenten in bakteriellen Systemen hat die Entwicklung der Phagen-Display-Technik (Abb. 3) ermöglicht (Smith, 1985). Insbesondere die Expression der variablen Domänen VL und VH als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein pIII des filamentösen Phagen M13 ist besonders für diese Technik geeignet (Barbas III *et al.*, 2001). Hierbei werden zunächst mit Hilfe von RNA aus Milzzellen einer immunisierten Maus die Gene für die variablen Domänen der leichten und schweren Ketten (VLK und VH) der Antikörper mit einer Primermixtur amplifiziert. Durch die Wahl von geeigneten Primern können die für VL und VH kodierenden Genfragmente in diesem Schritt mit einer Sequenz versehen werden, die später im exprimierten Protein einen Peptidlinker zwischen VL und VH einführt. Eine häufig verwendete Linkersequenz ist die Peptidsequenz SS(G)<sub>4</sub>S(G)<sub>6</sub>SRSS. Die Gene der beiden Antikörperdomänen werden dann in einer PCR miteinander verbunden. Nach einer Klonierung dieser Genkonstrukte in einen Phagemid-Vektor und einer Transformation in *E. coli* produzieren diese nach einer Superinfektion mit einem T-Helferphagen filamentöse Phagen, die scFv als pIII-Fusionsproteine der Phagenhülle auf ihrer Oberfläche präsentieren. Beim sogenannten Panning können diese Phagen dann aus der Bibliothek an ein immobilisiertes Antigen binden und in mehreren Selektionsrunden amplifiziert und isoliert werden.

Die Phage-Display-Technik ist gegenüber der Hybridomtechnologie um ein Vielfaches schneller und ökonomischer (Creighton, 1997). Es sind zahlreiche Beispiele bekannt, in denen Antikörperfragmente erfolgreich über die Phagen-Technologie gewonnen werden konnten (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Garrard *et al.*, 1991).



**Abb. 3:** Der Phage-Display-Zyklus. Abbildung aus: Braun und Paschke: Phagen-Display auf neuen Wegen. BIOSpektrum 04.06, 12. Jahrgang, Seite 382. Genehmigung erteilt. SecS: Sec-abhängige Signalsequenz; GOI: Gene der zu präsentierenden Proteine; gIII: Gen des pIII; F1: Intergenische Region; Resistenz: Selektionsmarker; Ori: Replikationsursprung; POI: präsentiertes Protein; N1-N2-CT: Domänen des pIII.

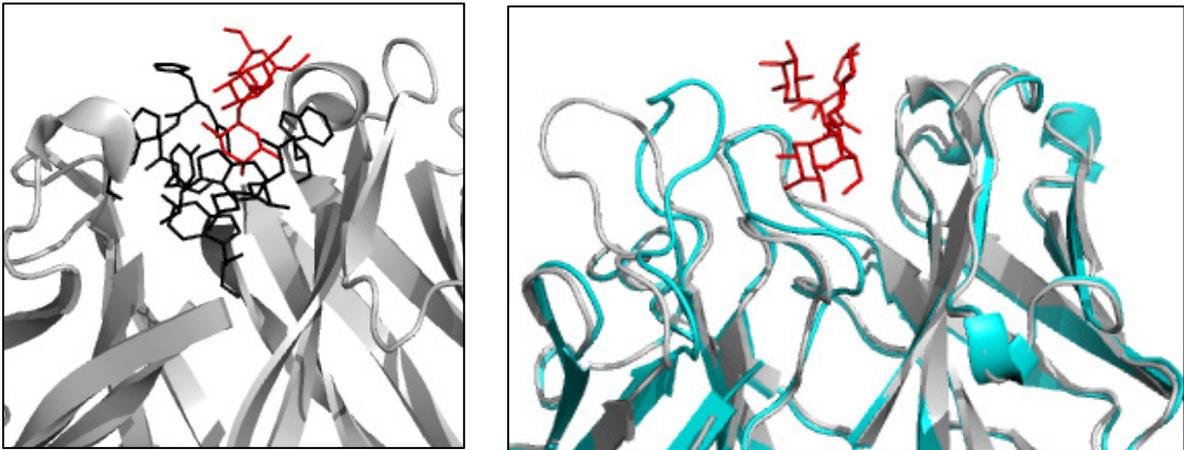
Durch sogenanntes Antikörper-Engineering, bei dem einzelne oder mehrere Aminosäuren durch Mutagenese ausgetauscht werden, können maßgeschneiderte Proteine mit definierter Spezifität und hoher Affinität hergestellt werden. Die Kombination beider Methoden ermöglicht zum einen die Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen in den variablen Domänen (Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 1998) und zum anderen prinzipiell die gezielte Herstellung von Antikörpern gewünschter Spezifität.

Eine exakte Vorhersage der dreidimensionalen Struktur einer Antigenbindungstasche anhand der Primärstruktur des Antikörpers bereitet jedoch oft Schwierigkeiten aufgrund der Rotationsmöglichkeit einer kovalenten Bindung und kann letztendlich erst durch eine eindeutige Bestimmung der Proteinstruktur des fertigen Antikörpers über CD-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie gelöst werden (Darby und Creighton, 1993). Die Vielzahl kristallisierter Antikörper und ihre häufig hohe Sequenz-Homologie ermöglichen eine Berechnung der Molekülstruktur (Homologie-Modelling) und lassen gewisse Vorhersagen über die wahrscheinliche Proteinstruktur zu

(Kazlauskas, 2000). Dennoch ist die Vorhersage molekularer Details der Komplexbildung bislang nur unzureichend möglich. Dennoch sind sie geeignet, Hinweise auf wichtige Aminosäuren zu geben und können Anhaltspunkte für ein rationales Proteindesign liefern. Auch wenn keine Informationen über die Primärstruktur vorliegen, kann mit Hilfe der direkten Evolution über Zufallsmutagenese des Gens (Bornscheuer und Pohl, 2001) eine Veränderung bzw. Verbesserung des Proteins erreicht werden. Diese Methode erfordert ein optimiertes Screening-System, um verbesserte Varianten der Mutanten-Bibliothek im Hochdurchsatzverfahren zu selektieren (Jones *et al.*, 2008).

## **I.2.4 Die Bindung von Kohlenhydraten an Antikörper**

Wie bereits für die Lektine beschrieben, sind monovalente Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen im Allgemeinen eher mit einer geringen Affinität verbunden. Die Bindungsstärke liegt hier im Bereich von etwa  $10^{-4}$  M (Varki *et al.*, 1999). Aus Kristallstrukturen zahlreicher Kohlenhydrat-Lektin-Interaktionen ist bekannt, dass neben dem Netzwerk aus H-Brücken und/oder vermittelnden Wassermolekülen auch hydrophobe Wechselwirkungen durch aromatische Aminosäuren bei der Erkennung eine Rolle spielen. Ähnliche Bindungsmechanismen wurden auch für Kohlenhydrat-bindende Antikörper gezeigt. Die CDR H3-Schleife von Antikörpern beinhaltet oft Tyrosinreste (Padlan, 1990), die sowohl über H-Brücken, als auch über ihren unpolaren aromatischen Ring mit dem Antigen interagieren. Bisher sind wenige Kristallstrukturen Kohlenhydrat-bindender Antikörper bekannt. Ein Beispiel ist die des *Salmonella*-Serogruppe B spezifischen monoklonalen Antikörpers Se155-4 in Kombination mit dem  $\alpha$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -D-Abel(1 $\rightarrow$ 3)] $\alpha$ -D-Manp1 $\rightarrow$ OMe-Trisaccharid. In diesem Antikörper ist die Bindungstasche von zahlreichen aromatischen Aminosäureresten dominiert (Abb. 4 links), die neben dem Netzwerk aus H-Brücken auch über Van der Waals-Kontakte mit dem Antigen interagieren (Cygler *et al.*, 1991; Zdanov *et al.*, 1994). Durch Titrationsmikrokalorimetrie wurden Bindungsstärken von  $1,3 \pm 0,5 \cdot 10^{-5}$  M für das scFv Se155-4 und  $2,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$  M für das Fab Se155-4 bestimmt (Deng *et al.*, 1994). Für das IgG Se155-4 ergaben SPR-Messungen einen  $K_D$ -Wert von  $2,3 \cdot 10^{-5}$  M bei einer Assoziationsrate von  $8,7 \cdot 10^4$  Ms $^{-1}$  und einer Dissoziationsrate von  $1,2 \cdot 10^{-2}$  s $^{-1}$  (MacKenzie *et al.*, 1996).



**Abb. 4:** Räumliche Struktur zweier Kohlenhydrat-bindender Antikörper. links: Bindungstasche des scFv Se155-4 (grau, schwarz = bindende Aminosäurereste) in Kombination mit dem  $\alpha$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -D-Abel(1 $\rightarrow$ 3)] $\alpha$ -D-Manp1 $\rightarrow$ OMe-Trisaccharid (rot) (pdb 1mfa). rechts: CDR-Schleifen des Fab BR96 ungebunden in grau (pdb 1ucb) und in Kombination mit dem nLeY-Tetrasaccharid (rot) in türkis (pdb 1cly).

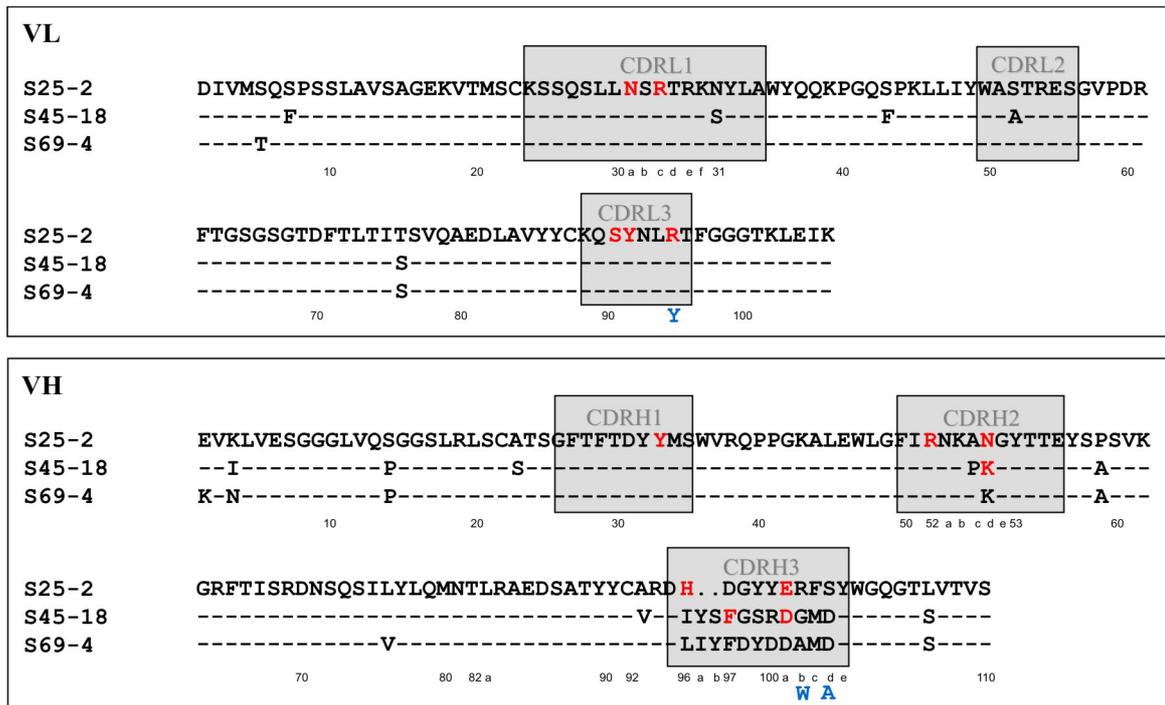
Ein weiterer Kohlenhydrat-bindender Antikörper, dessen Struktur in Kombination mit seinem Tumor-assoziierten Lewis Y-Oligosaccharidantigen aufgeklärt wurde, ist der BR96 (Sheriff *et al.*, 1996). Die Aufklärung dieses Komplexes hat gezeigt, dass auch bei Kohlenhydrat-spezifischen Antikörpern deutliche Bewegungen und Konformationsänderungen während der Antigenbindung beobachtet werden können. Im BR96 Antikörper wurde dies für die CDR-Schleifen L1, L3 und H2 nachgewiesen (Abb. 4 rechts). Überraschenderweise wurde eine derartige Anpassung nicht für die CDR H3 im Bindungsprozess beobachtet, obwohl dessen Aminosäurereste wesentliche Interaktionen mit dem Antigen eingehen (Zdanov *et al.*, 1994). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass durch die Bindung ein zu großer Entropieverlust entstände, der sich nachteilig auf die Affinität auswirkt. Dies würde erklären warum in diesem Antikörper durch die Einführung des 100<sub>aH</sub>W die Konformation und Position der CDR H3-Schleife stabilisiert ist, welches die Ausbildung zusätzlicher H-Brücken ermöglicht. Unter diesem Aspekt erwähnenswert ist die BR96-Mutante 53<sub>H</sub>G/D, die an der Position 53 der schweren Kette einen Austausch von Glycin nach Aspartat enthält. Diese Mutation führte zu einer Stabilisierung der gebundenen kanonischen Konformation der CDR H2-Schleife und einer höheren Affinität gegenüber dem Lewis Y-Antigen bei reduzierter Flexibilität (Yelton *et al.*, 1995).

### I.2.5 Antikörper gegen Lipopolysaccharid von Chlamydien

Antikörper gegen das LPS von Chlamydien entstehen zum einen während einer Infektion und können zum anderen durch Immunisierung mit isolierten Elementarkörpern und verschiedenen Neoglycokonjugaten erhalten werden (Caldwell und Hitchcock, 1984; Brade *et al.*, 1985; 1986; 1990; Fu *et al.*, 1992; Brade *et al.*, 2000). Immunisierungen mit Neoglycokonjugaten führten zu einer Generierung von Antikörpern mit einer 100fach höheren Affinität im Vergleich zu einer Bakterien-Immunisierung bei gleicher Epitopspezifität (Fu *et al.*, 1992). Die Charakterisierung der Immunantwort gegen diese Antigene in Bindungsstudien hat gezeigt, dass Kdo-Oligosaccharide trotz ihrer geringen Größe eine Reihe verschiedener Epitope ausbilden. Unter anderem wurde eine Kreuzreaktivität einiger Antikörper mit dem Re-LPS von *E. coli* beobachtet (Caldwell und Hitchcock, 1984; Brade *et al.*, 1990). Die Ursache hierfür liegt in dem Vorhandensein des  $\alpha$ -(2→4)-verknüpften Kdo-Disaccharidanteils im Chlamydien-LPS (Brade *et al.*, 1990). Durch die Immunisierung mit Chlamydien oder mit Neoglycokonjugaten strukturell definierter und zum Teil durch chemische Synthese (Kosma *et al.*, 1988; 1990; 1994; 1999; 2000; Müller-Loennies *et al.*, 2002) hergestellter Oligosaccharide konnten Antikörper gewonnen werden, die sich als Chlamydien-spezifisch erwiesen (Fu *et al.*, 1992). Die mAk S25-2 und S25-23 können als Prototyp-Antikörper angesehen werden. Ihre Spezifität für LPS-Strukturen von Chlamydien beruht auf der Erkennung der  $\alpha$ -(2→8)-verknüpften Kdo-Bindung. Diese war bis vor kurzem nur aus dem LPS von Chlamydien bekannt und konnte als charakteristisches Strukturmerkmal von *Chlamydiaceae* angesehen werden (Brade *et al.*, 1987a, Fu *et al.*, 1992; Brade *et al.*, 2000). Jedoch wurde im LPS von *Acinetobacter lwoffii* F78 kürzlich ebenfalls  $\alpha$ -Kdo-(2→8)- $\alpha$ -Kdo nachgewiesen (Hanuszkiewicz, 2008) und das isolierte LPS reagierte ebenfalls mit dem mAk S25-2. Im Allgemeinen besitzen Antikörper gegen Kdo eine für Kohlenhydrat-spezifische Proteine ungewöhnlich hohe Affinität (Müller-Loennies *et al.*, 2006) von  $6 \cdot 10^{-7}$  M ( $K_D$ ) für den Fab S25-2 und  $1,7 \cdot 10^{-7}$  M für den Fab S25-23 (Müller-Loennies *et al.*, 2000). Während für den S25-23 eine strikte Präferenz für das  $\alpha$ -Kdo-(2→8)- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo beschrieben wurde, ist der mAk S25-2 in der Lage mit ähnlicher Affinität verschiedene Disaccharide zu binden (Fu *et al.*, 1992; Müller-Loennies *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2008). Während die molekulare Grundlage für die strikte Spezifität des mAk S25-23 für das  $\alpha$ -(2→8)- $\alpha$ -(2→4)-Kdo-Trisaccharid bislang

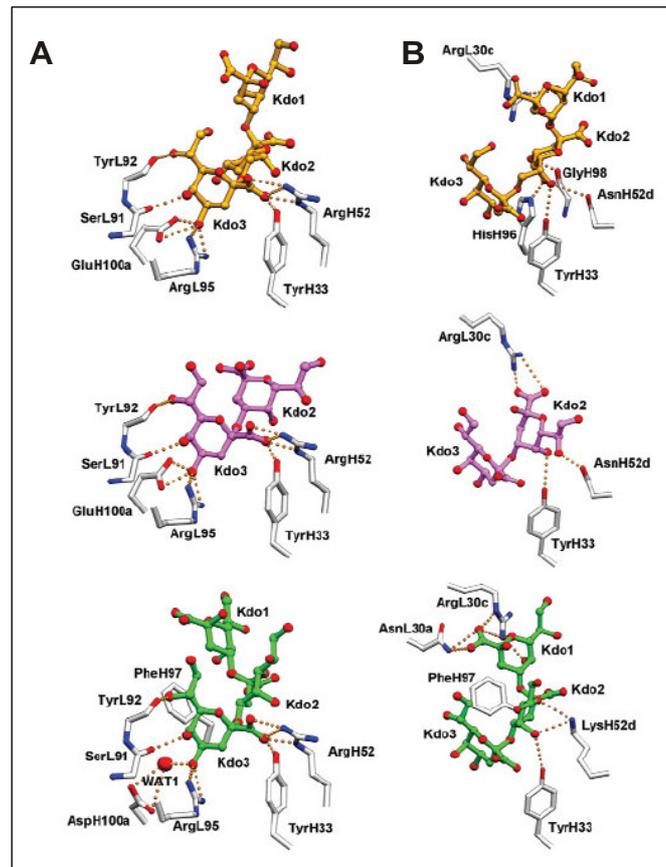
## EINLEITUNG

unbekannt ist, konnten Kristallstrukturen des mAk S25-2 im Komplex mit verschiedenen Oligosacchariden aufgeklärt werden (Nguyen *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2008). Ein Vergleich der Primärstruktur des mAk S25-2 mit Keimbahngenen ergab, dass nur geringfügige Abweichungen bestehen und dieser Antikörper als Keimbahnantikörper angesehen werden kann (Nguyen *et al.*, 2003, Abb. 5). Von der Keimbahn abweichende Aminosäuren sind lediglich 95<sub>L</sub>Y/R, 100<sub>H</sub>W/R und 100<sub>H</sub>A/S. Ein hiervon abgeleiteter Ak nach Affinitätsreifung ist der mAk S45-18.



**Abb. 5:** Vergleich der Primärstruktur der variablen Domänen VL und VH der Chlamydien-spezifischen mAk S25-2, S45-18 (pdb 1q9q und 1q9w) und S69-4 (Müller-Loennies *et al.*, 2006). Grau markiert sind die CDR's. Rot sind die aus den Kristallstrukturen des S25-2 und S45-18 bekannten, an der Antigenbindung beteiligten Aminosäurereste. Blau dargestellt sind die im S25-2 von der Keimbahn abweichenden Aminosäuren. Die Nummerierung und CDR's stammen aus Studien von Chothia (Chothia und Lesk, 1987; Chothia *et al.*, 1992; Al Lazikani *et al.*, 1997 und Kabat (Martin, 1996) wie beschrieben von Andrew C. Martin (University College London, Großbritannien, <http://www.bioinf.org.uk/>)

Die vergleichende Röntgenstrukturanalyse dieser Antikörper im Komplex mit verschiedenen Liganden ergab, dass in beiden Ak eine Bindungsstelle für ein Kdo Monosaccharid oder ein endständiges Kdo vorhanden ist, das über eine Vielzahl von H-Brücken gebunden wird. An der Ausbildung der H-Brücken sind insbesondere die CDR L1 und L3 beteiligt. Wie erwartet beruht die hohe Affinität auch auf ionischen Wechselwirkungen mit der Carboxylgruppe dieser Kdo durch ein konserviertes Arginin an Position 52<sub>H</sub> der schweren Kette in der CDR H2.



**Abb. 6:** Bindungstasche zweier Chlamydien-LPS-bindender Antikörper. Abbildung aus: Nguyen *et al.*, 2003. Germline antibody recognition of distinct carbohydrate epitopes. *Nat Struct Biol.* 10(12): p.1019-1025. Genehmigung erteilt. Dargestellt sind die an der Antigenbindung beteiligten Aminosäurereste aus den Kristallstrukturen der Chlamydien-spezifischen Antikörper S25-2 und S45-18: S25-2 gebunden an das  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo-Trisaccharid (gelb), S25-2 gebunden an das  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo-Disaccharid (magenta) und der S45-18 in Kombination mit dem  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo-Trisaccharid des Pentasaccharidantigens (grün). Gezeigt sind die an der Bindung des terminalen Kdo beteiligten Aminosäurereste (A) und die Aminosäurereste, die Interaktionen mit den übrigen Kdo eingehen (B).

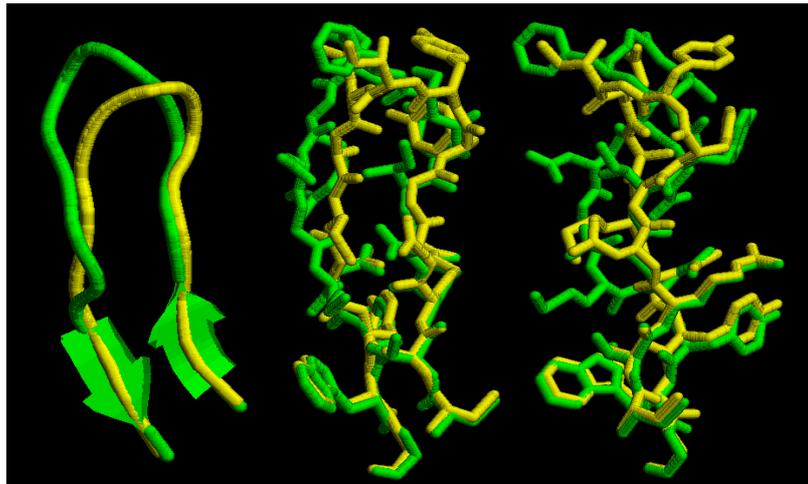
Die Erkennung von Kdo-Disacchariden und des  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Kdo-Trisaccharids durch den S25-2 wird zum einen durch die Komplexierung der weiteren Carboxylgruppen und zum anderen durch eine hohe Flexibilität der Seitenketten der an der Komplexierung beteiligten Aminosäuren erreicht. Diese scheint ein besonderes Merkmal dieses Keimbahnantikörpers zu sein. So bildet das 33<sub>H</sub>Y eine H-Brücke mit dem O5 des zweiten Kdo im Komplex mit dem  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Kdo-Disaccharid und mit dem O7 im  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo-Trisaccharid Komplex. Weitere H-Brücken werden mit dem O7 des zweiten Kdo im  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo-Trisaccharid und  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo-Disaccharid durch das 52<sub>H</sub>N gebildet. Des Weiteren ist 30<sub>C</sub>R an einer ionischen Wechselwirkung (zweizählige Salzbrücke) mit dem Carboxylation des zweiten Kdo im  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo-Disaccharid beteiligt, während diese Aminosäure im Komplex mit dem

$\alpha$ -(2→8)- $\alpha$ -(2→4)-Kdo-Trisaccharid eine H-Brücke mit dem O5 des 1. Kdo einget. Insbesondere ist auffallend, dass die CDR H3, die in vielen Antikörpern wesentlich zur Antigenbindung beiträgt, im S25-2 nicht an der Bindung beteiligt ist. Gleichmaßen fehlen diesem Antikörper hydrophobe Wechselwirkungen zur Antigenerkennung. Des Weiteren wurde der mAk S25-2 in zwei Strukturen erhalten, die eine Flexibilität der CDR L1 und CDR H3 belegen. Dies deutet darauf hin, dass dieser Keimbahnantikörper möglicherweise in der Lage ist, auch andere Antigene zu binden und ein Ausgangspunkt für die Bildung hochaffiner Ak anderer Spezifität darstellt, da im Komplex mit dem Antigen nur eine der beiden Formen gefunden wurde. Mit dieser Strategie stellt der S25-2 ein gutes Beispiel für die Balance zwischen vererbter Immunität und Anpassungsfähigkeit zum Schutz vor neuen Erregern dar.

Im Gegensatz zur Flexibilität des mAk S25-2 ist der mAk S45-18 hoch spezifisch für das  $\alpha$ -(2→4)- $\alpha$ -(2→4)-verknüpfte Kdo-Trisaccharid und reagiert nicht mit  $\alpha$ (2→8)-verknüpften Kdo-Strukturen (Nguyen *et al.*, 2003). Die Affinitätsreifung dieses Antikörpers, der sich aus dem mAk S25-2 ableiten lässt, hat fast ausschließlich zu Veränderungen in der schweren Kette, insbesondere in der CDR H3 geführt. Durch Einbau von zwei zusätzlichen Aminosäuren und eines Aspartats (100<sub>aH</sub>D) wurde diese CDR verlängert und bildet nun eine in vielen Antikörpern gefundene Salzbrücke aus (Chothia und Lesk, 1987), die eine stabilisierende Wirkung auf die Sekundärstruktur hat. Insbesondere der Einbau eines Phenylalanins an Position 97<sub>H</sub>, das sich zentral in der Bindungsstelle befindet, ermöglicht in diesem Antikörper die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen (= stacking interactions) mit allen drei Kdo des  $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo-(2→6)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-1,4'-bisphosphat (2.4/2.4 PS-4P, siehe II.1.3). Diese wurden als eine wesentliche Ursache für die hohe Spezifität und Affinität dieses Antikörpers angesehen (Nguyen *et al.*, 2003). Die Mutation 52<sub>dH</sub>N/K erlaubt z. B. eine zusätzliche H-Brücke zum O6 des 2. Kdo. Die Positionierung des 97<sub>H</sub>F wird durch die Mutation 100<sub>aH</sub>E/D, die zum Einbau eines strukturellen Wassermoleküls führt, unterstützt. Die hierdurch erreichte Stabilisierung der Konformation, unterstützt durch die längere CDR H3, verhindert wahrscheinlich eine Kreuzreaktivität mit  $\alpha$ -Kdo-(2→8) $\alpha$ -Kdo (Nguyen *et al.*, 2003). Das Beispiel des S45-18 zeigt die Anpassung eines Keimbahnantikörpers an sein Antigen und den Gewinn einer weitaus höheren Spezifität und Affinität durch einen Verlust der Flexibilität der Bindungstasche.

Grundsätzlich erscheint die Generierung spezifischer Antikörper gegen das  $\alpha$ -Kdo-(2→4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2→8)]- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo-(2→6)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-1,4'-bisphosphat (HSBP, siehe II.1.3) aufgrund der  $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo und  $\alpha$ -Kdo-(2→8)- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo Partialstrukturen im HSBP schwierig. Dennoch konnte mit dem mAk S69-4 ein solcher Ak isoliert werden. Die Sequenzierung ergab, dass er eine hohe Sequenzhomologie zum mAk S45-18 besitzt (Abb. 5, Müller-Loennies *et al.*, 2006). Die CDR H2 ist in beiden Antikörpern in gleicher Weise verändert. Strukturelle Abweichungen zum mAk S45-18 sind im Wesentlichen in der CDR H3 zu finden, in der bei gleicher Länge der Bindungsschleife acht Aminosäuren um das 97<sub>H</sub>F ausgetauscht waren. Bindungsstudien ergaben, dass die Affinität im Vergleich zum mAk S45-18 wesentlich geringer war ( $K_D \sim 10^{-5}$  M gegen HSBP, Müller-Loennies *et al.*, 2006). Hieraus ergab sich die Frage, ob eine höhere Selektivität grundsätzlich nur mit einer verringerten Affinität einhergeht.

Durch Einsatz der Phage-Display-Technik konnte unterdessen ein weiterer Antikörper, das scFv NH2240-31, isoliert werden, das spezifisch *C. psittaci* bindet. Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) ergaben erste Hinweise, dass dieses scFv eine deutlich verbesserte Affinität gegenüber HSBP im Vergleich zum mAk S69-4 aufwies. Im Unterschied zu den beiden mAk S45-18 und S69-4 jedoch besaß dieses scFv eine verkürzte CDR H3 (Abb. 5) neben weiteren Veränderungen in den CDR L1 und H2. Homologie-Modelling auf Basis der Kristallstruktur des mAk S45-18 ergab, dass trotz der erheblichen Veränderungen in der Primärstruktur der CDR H3, die Funktion des 97<sub>H</sub>F von einem Isoleucin übernommen worden ist (Abb. 7, Dr. S. Müller-Loennies; persönliche Mitteilung). Hieraus ergibt sich die grundsätzliche Frage nach der Rolle dieser CDR für die Spezifität bzw. Kreuzreaktivität und Affinität von Antikörpern gegen Kdo-Oligosaccharide aus dem LPS von Chlamydien.



**Abb. 7:** Vergleich der Struktur der CDR H3 des mAk S45-18 (Kristallstruktur pdb 1q9w) in grün und in gelb die durch Homologie-Modelling berechnete Struktur des scFv NH2240-31 (Dr. S. Müller-Loennies; persönliche Mitteilung).

### I.3. Ermitteln von Bindungsaktivitäten über Biosensoren

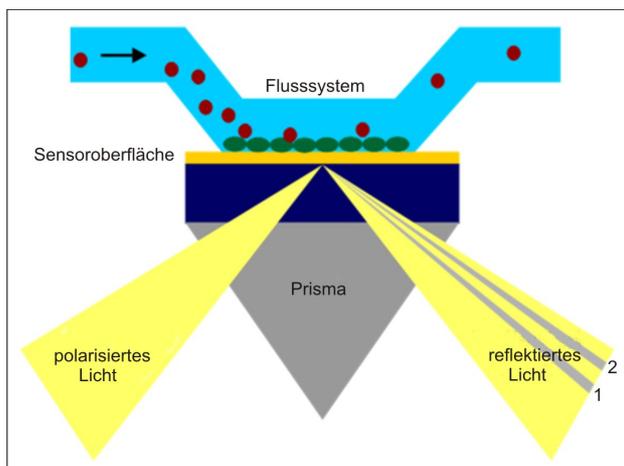
Erste Untersuchungen zur Entwicklung von Biosensoren sind aus den 80er Jahren bekannt (Liedberg *et al.*, 1995). In der vergangenen Dekade haben sie immer mehr an Popularität gewonnen (Gronewold 2007; Schuck 1996). Der Vorteil gegenüber anderen Festphasenanalysen, wie dem ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay), ist die Möglichkeit, Interaktionen zwischen Biomolekülen direkt zu charakterisieren, ohne einen der Reaktionspartner radioaktiv, durch Fluorophore oder Enzyme markieren zu müssen (Liedberg *et al.*, 1995). Markierungsfreie Detektionsmechanismen sind von besonderem Interesse, da Marker sich während des Bindungsprozesses störend auswirken können (Schlecht *et al.*, 2007). Die Technik ist sehr vielfältig. Neben Protein-Protein- oder Protein-Peptid-Wechselwirkungen (Johne *et al.*, 1993; Catimel *et al.*, 1997) können auch Interaktionen zwischen Proteinen und DNA (Bondeson *et al.*, 1993; Fisher und Fivash, 1994), sogar ganze Zellen (MacKenzie und Jennings, 2003) untersucht werden (Karlsson and Larsson, 2004; Fisher und Fivash, 1994; Malmberg und Borrebaeck, 1995). Biosensoren eignen sich auch für serologische Screenings und sind aufgrund ihrer Automatisierung zeitsparender und reproduzierbarer im Vergleich zum ELISA (Severs und Schasfoort, 1993). Weitere Anwendungen finden sich in der Nahrungsmittelkontrolle. Bokken *et al.* (2003) beschrieben die erfolgreiche Identifizierung von Salmonellen mit Hilfe von immobilisierten Antikörpern.

Unter den Biosensoren spielt die SPR (Surface Plasmon Resonance)-Technologie, die molekulare Interaktionen über optische Parameter misst, aufgrund ihrer hohen Entwicklung und Verfügbarkeit bisher die größte Rolle (Gronewold, 2007). Eine Alternative stellt die QCM (Quartz Crystal Microbalance)-Technologie sowie das SAW (Surface Acoustic Wave)-System dar, die piezoelektrische Materialien nutzen, um Interaktionen über akustische Oberflächenwellen zu detektieren (Gronewold, 2007). In allen diesen Technologien werden Bindungsreaktionen zwischen Biomolekülen untersucht, indem einer der Reaktionspartner, der als Ligand bezeichnet wird, auf einer sensitiven Oberfläche immobilisiert wird, währenddessen der andere Reaktand, Analyt genannt, über ein mikrofluides System unter konstantem Pufferstrom in Kontakt mit dem Liganden tritt. Durch diesen Fluss sind Biosensoren in der Lage, molekulare Bindung in Echtzeit zu überwachen, die sie auf einem Monitor in Form einer Bindungskurve in einem sogenannten Sensorgramm darstellen (Karlsson and Larsson, 2004). Die Methodik der Detektion von Bindungsreaktionen über Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) und Oberflächenakustikwellen (SAW) sowie die Bestimmung von Affinitäten molekularer Wechselwirkungen soll im Folgenden näher erläutert werden.

### **I.3.1 SPR (Surface Plasmon Resonance)-Biosensoren**

Die SPR-Technologie findet sich vor allem in BIAcore-Systemen (Jönsson *et al.*, 1991; Karlsson, 2004). Das erste automatisierte BIAcore-Gerät brachte die Firma Pharmacia Biosensor 1990 auf den Markt (Liedberg *et al.*, 1995). Diese Biosensoren bestehen hauptsächlich aus einer Lichtquelle, einem Photodetektor und einem Flussinjektionssystem (IFC) (Kretschmann und Raether, 1968). Polarisiertes Licht aus einer Lichtquelle strahlt durch ein Glasprisma und die Reflektion des Lichts resultiert in einer charakteristischen Absorption. Das Prisma steht in Verbindung mit einem Sensorchip, der auf einer Glasscheibe eine 50 nm dünne Goldschicht trägt, die in Kontakt mit dem Flusssystem kommt (Karlsson und Larsson, 2004). Bei einem bestimmten Winkel des einfallenden Lichts, dem SPR-Winkel, werden freie Elektronen in dem Goldfilm durch die Wechselwirkung mit Photonen zu einer Schwingung, auch Plasmon genannt, angeregt, die zur Ausbildung eines vergänglichen elektromagnetischen Feldes führt, welches sich exponentiell von der Goldoberfläche in das angrenzende Medium ausbreitet (Stenberg *et al.*, 1991; Harrick 1967). Dieses optische Phänomen nennt man Oberflächen-

plasmonenresonanz. Der Winkel und die Intensität des reflektierten Lichts sind vom SPR-Winkel abhängig (Stenberg *et al.*, 1991; Karlsson und Larsson, 2004), der seinerseits durch die optischen Eigenschaften der Flüssigkeit, die in Kontakt mit dem Metall steht, beeinflusst wird und somit sensitiv gegenüber Veränderungen im Brechungsindex ist (Stenberg *et al.*, 1991; Karlsson und Larsson, 2004). Bei einer Injektion von Biomolekülen in den Pufferstrom und einer Anlagerung dieser in der Nähe der Goldoberfläche wird der Brechungsindex verändert, was zu einer Verschiebung des SPR-Winkels führt. Die einhergehende Veränderung des Winkels des reflektierten Lichts wird als Resonanzsignal definiert (Stenberg *et al.*, 1991), welches direkt proportional zum Anstieg der molekularen Masse auf der Oberfläche ist (Stenberg *et al.*, 1991; Karlsson und Larsson, 2004). Eine Resonanzeinheit RU entspricht der Änderung von  $10^{-6}$  Brechungsindexeinheiten (Karlsson und Larsson, 2004) und einer auf der Oberfläche gebundenen Molekülmasse von etwa  $1 \text{ pg/mm}^2$  (Stenberg *et al.*, 1991). Das Detektionslimit liegt für BIAcore-Sensoren bei  $10 \text{ pg/mm}^2$  (Fägerstam *et al.*, 1992).



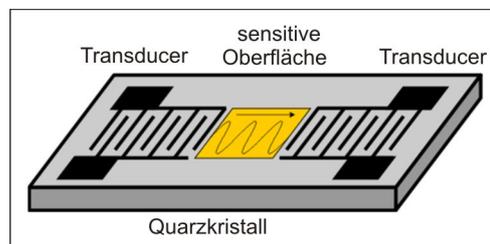
**Abb. 8:** Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR). Licht fällt in einer bestimmten Kombination aus Winkel und Wellenlänge auf eine Sensorchip-Oberfläche, was zu einer Anregung von Plasmonen in einer Goldoberfläche (Metall/Flüssigkeitsgrenzfläche) führt und die Reflexion des Lichts in einer charakteristischen Absorption resultiert.

### I.3.2 SAW (Surface Acoustic Wave)-Biosensoren

Es sind eine Reihe weiterer Biosensoren entwickelt worden, die neben der optischen Detektion molekulare Wechselwirkungen über akustische oder elektronische Signale messen (Mirkin *et al.*, 1996; Katz und Willner, 2003). Zu den akustischen Biosensoren zählen die QCM (Quartz Crystal Microbalance)- und SAW (Surface Acoustic Wave)-Sensoren. Der bisher sensitivste akustische Sensor ist der Love-wave SAW-Sensor (Gronewold, 2007). Freudenberg *et al.* (2001) zeigten erfolgreich eine Antikörper-

Derivatisierung eines Love-wave Biosensors. Neben Protein-Protein-Wechselwirkungen können, wie in den BIAcore-Systemen auch, DNA-DNA-Interaktionen sensitiv gemessen werden, was für diagnostische Anwendungen interessant ist (Gronewold *et al.*, 2006).

Durch ein elektrisches Feld an einem interdigitalen Transducer (IDT) werden akustische Oberflächenwellen generiert, die sich entlang der Oberfläche von piezoelektrischen Materialien, wie z. B. einem Quarzkristall, ausbreiten. Diese horizontalen Scherwellen werden an einem zweiten IDT wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt und erfasst (Gronewold, 2007). In Verbindung mit einer sensitiven Oberfläche, wie z. B. Gold, und einem Flusssystem ist die Ausbreitung akustischer Wellen sehr sensitiv gegenüber Veränderungen auf dieser Oberfläche (Gronewold, 2007). Bei einer Anlagerung von Masse auf der Sensorchip-Oberfläche sinkt die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Wellen, was in einer Änderung der Phasenverschiebung der Wellen resultiert (Schlensog *et al.*, 2004). Die Messung der Phase erfolgt bei einer konstanten Frequenz zwischen 25 und 500 MHz (Gronewold, 2007), die Intensität des SAW-Signals nimmt dabei exponentiell mit der Eindringtiefe ab (Shiba *et al.*, 2005). SAW-Sensoren sind nicht nur sensitiv gegenüber Veränderungen der Masse auf der Sensorchip-Oberfläche, sondern auch gegenüber den viskoelastischen Eigenschaften der umgebenden Lösung (Gronewold *et al.*, 2006). Die Veränderung der Viskosität  $\Delta\eta$  wird ebenfalls gemessen und aufgezeichnet, was eine Diskriminierung zwischen Masseneffekten und realer Bindung erlaubt (Gronewold, 2007). Beide Messparameter werden in Kombination mit einem Computersystem auf dem Monitor in Echtzeit in einem Sensorgramm dargestellt. Die Veränderung der Phase um  $1^\circ$  entspricht einer Massenlagerung von  $24 \text{ pg/mm}^2$  (Gronewold *et al.*, 2005). Für einen Love-wave Biosensor wurde ein Detektionslimit von  $0,75 \text{ pg/mm}^2$  beschrieben (Schlensog *et al.*, 2004).

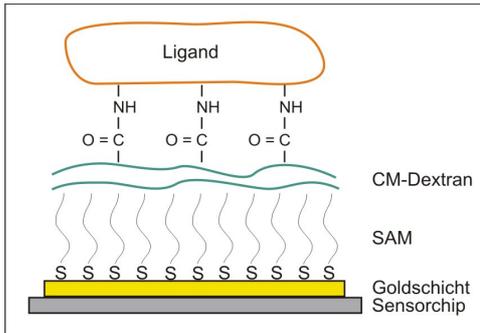


**Abb. 9:** Prinzip des SAW-Biosensors. Ausgehend von einem interdigitalen Transducer (IDT) werden akustische Oberflächenwellen generiert, die sich als horizontale Scherwellen an der Oberfläche eines piezoelektrischen Quarzkristalls ausbreiten und durch einen weiteren IDT in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Die Bindung von Biomolekülen auf einer Goldoberfläche, die in Kontakt mit der Welle kommt, wird als Phasenverschiebung der Welle detektiert.

### I.3.3 Immobilisierung von Proteinen auf einem Sensorchip

Im BIAcore-Biosensor wird eine Massenveränderung in der Nähe der Goldoberfläche eines Sensorchips über die Änderung im Brechungsindex gemessen, im SAW-System erfolgt dies über eine Phasenverschiebung der akustischen Oberflächenwellen. Für die Messung molekularer Interaktionen wird ein Ligand auf der der Flusszelle zugewandten Seite der Goldoberfläche eines Sensorchips immobilisiert, der andere Reaktand (Analyt) gelangt über den konstanten Pufferstrom in Kontakt mit dem Liganden. Eine Immobilisierung des Liganden über elektrostatische Wechselwirkungen direkt auf der Gold-Oberfläche (Stenberg *et al.*, 1991) kann zu einer Denaturierung der Proteine führen (Löfås und Johnsson, 1990). Daher wurde eine Reihe von Sensoroberflächen für eine kovalente Immobilisierung entwickelt, individuell für diverse Anwendungen. Die in dieser Arbeit verwendeten BIAcore-CM5-Sensorchips und auch die S-sens<sup>®</sup> K5 Sensorchips für das SAW-System verfügen über eine carboxymethylierte (CM)-Dextranmatrix. Auf der Basis einer selbstaufbauenden Einzelschicht (SAM, self-assembled monolayer) entsteht mit Hilfe von 16-Mercapto-1-hexadecanol über Adsorption eine einlagige Thiolspacerschicht auf der Goldoberfläche (Löfås und Johnsson, 1990), dessen Hydroxylgruppen unter basischen Bedingungen mit Epichlorohydrin derivatisiert wurden, um anschließend ein Dextranpolymer mit einem Molekulargewicht von 500 kDa kovalent zu binden (Abb. 10). Die Einführung von Carboxymethylgruppen in das Dextranpolymer mit Hilfe von Bromessigsäure führte zu einer Modifikation von einer Carboxylgruppe pro Glucoseeinheit (Löfås und Johnsson, 1990). Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit des Dextranpolymers ergibt sich eine ausgedehnte offene Struktur, eine Art Hydrogel von etwa 100 nm, abhängig vom Puffer und seiner ionischen Stärke. Aufgrund der hohen Flexibilität des Dextranhydrogels ist es möglich, Liganden nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch innerhalb der Dextranmatrix zu immobilisieren (Löfås und Johnsson, 1990). Zudem zeichnet sie sich durch eine hohe chemische Stabilität (Löfås und Johnsson, 1990) und eine geringe unspezifische Bindung bei Verwendung von Puffern mit hoher ionischen Stärke aus (Andrade und Hlady, 1986). Die Immobilisierung eines Liganden an der negativ geladenen Dextranschicht kann über seine Amino-, Thiol- oder Carboxylgruppen erreicht werden (Karlsson und Larsson, 2004). Bei der Aminkopplung werden die Carboxylgruppen der Matrix mit einem Gemisch aus N-ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) und N-hydroxy-succinimid (NHS) in reaktive

NHS-Ester umgewandelt, wodurch positiv geladene Aminosäuren des Liganden, wie Lysin oder dessen N-Termini, kovalent an die NHS-Ester gebunden werden können (Johnsson *et al.*, 1991). Eine Behandlung der Oberfläche nach der Immobilisierung mit Ethanolamin-HCl pH 8,5 ist notwendig, um die verbleibenden reaktiven NHS-Ester zu blockieren, indem sie zum Amid reagieren (Johnsson *et al.*, 1991). Dies löst auch locker gebundenen Liganden von der Dextranschicht (Löfås und Johnsson, 1990).



**Abb. 10:** Aufbau einer Sensorchip-Oberfläche. Die Sensorchip-Oberfläche ist mit einer Goldschicht versehen auf der sich basierend auf einer SAM (self-assembled monolayer) eine carboxymethylierte Dextranmatrix anlagert, an der Protein-Liganden kovalent gebunden werden können.

### I.3.4 Bestimmung von Affinitäten über die BIAevaluation Software

Um Bindungsreaktionen im BIAcore zu untersuchen, werden verschiedene Konzentrationen des Analyten in aufeinander folgenden Zyklen in das Flusssystem injiziert. Das abhängig von der Zeit aufgezeichnete Resonanzsignal entspricht dabei direkt der Menge an gebundenen Molekülen auf der Chip-Oberfläche (Stenberg *et al.*, 1991) und wird als Bindungskurve in einem Sensorgramm dargestellt. Die Basislinie steigt während der Assoziation an und mündet bei einer ausreichenden Konzentration des Analyten in eine Sättigung der Bindungsstellen des Liganden, welche ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation aufzeigt. Da der durch den konstanten Pufferstrom dissoziierte Analyt stetig aus dem Flusssystem entfernt wird, fällt nach Injektionsstopp während der Dissoziation die Basislinie wieder ab. Bei einer hohen Stabilität des Bindungskomplexes ist eine Regenerierung der Oberfläche nach jedem Injektionszyklus notwendig, um den gebundenen Analyten vollständig vom Liganden abzulösen, nicht zuletzt, um die Dissoziation zu verkürzen und somit die Analysezeit zu minimieren. Hier können sowohl basische, wie z. B. 1 – 100 nM NaOH, als auch saure Reagenzien verwendet werden (Karlsson und Larsson, 2004). Um die Assoziation und die Dissoziation einer Bindungsreaktion über das Resonanzsignal exakt abbilden zu können, müssen die Reaktionsbedingungen sorgfältig gewählt werden. Dazu gehört unter anderem eine Gewährleistung der Stabilität des Liganden. Diese kann durch die Einführung von sich

wiederholenden Konzentrationen innerhalb einer Messung beobachtet werden und dient auch der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Karlsson und Larsson, 2004). Um die Bindungskurven einer Messung vergleichen zu können, ist nicht nur eine stabile Basislinie im Verlauf der Messung, sondern auch eine geeignete Referenz von erheblicher Bedeutung. Das kann entweder eine nichtimmobilisierte oder eine aktivierte und anschließend gesättigte Sensorchip-Oberfläche oder auch eine Immobilisierung mit einem nichtbindenden Liganden sein (Karlsson und Larsson, 2004). Bei Verwendung der BIAcore-Sensorchips, die aus vier hintereinander geschalteten Zellen bestehen, die einzeln oder paarweise angesteuert werden können, ist eine parallele Messung auf dem Referenzliganden und dem aktiven Liganden möglich. Als Blindwert wird Laufpuffer injiziert und dessen Resonanzsignal von den Bindungskurven subtrahiert, um systematische Instrumentvariationen rauszurechnen (Karlsson und Larsson, 2004). Nach der Subtraktion des Blindwertes und der Referenzantwort, die der Korrektur der Bulk-Antwort und der unspezifischen Wechselwirkungen des Analyten mit der Sensorchip-Oberfläche dient (Karlsson und Larsson, 2004), können aus den Bindungskurven mit Hilfe der lokalen Konzentration des Analyten kinetische Parameter, wie Assoziations- und Dissoziationsraten, für Interaktionen kalkuliert werden (Glaser, 1993; Malmborg und Borrebaeck, 1995). Aus dem Verhältnis der Reaktionsraten wird dann die Bindungsrate bestimmt. Dies kann seit der Einführung der BIAevaluation Software Version 3.0 1997 automatisiert auch für globale Analysen von Datensätzen erfolgen (Karlsson, 2004). Die Berechnungen beruhen auf dem Modell von Morton *et al.* (1995). Demnach kann die Bindung eines Analyten A an einen Liganden B zu einem Komplex AB mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$dAB/dt = k_a * A * B - k_d * AB \quad (1),$$

wobei die Konzentration AB am Startpunkt 0 gleich 0 ist und A sowie B ihren maximalen Wert besitzen. Die Assoziationsrate  $k_a$  und die Dissoziationsrate  $k_d$  beschreiben dabei die Geschwindigkeit dieser Hin- und Rückreaktion. Da nun die Konzentration der Moleküle auf der Oberfläche mit dem Resonanzsignal R zum Zeitpunkt t korreliert und das höchst mögliche Resonanzsignal in der Sättigung  $R_{max}$  proportional zur Anfangskonzentration von B ist, entsteht daraus die Bindungsrate als Funktion des SPR-Signals:

$$dR/dt = k_a * C * R_{max} - (k_a * C + k_d) * R \quad (2).$$

C ist dabei die Konzentration des injizierten Analyten A. Eine Bestimmung der kinetischen Reaktionsraten über die Kurvenanstiege kann auf verschiedene Weise z. B. mit Hilfe der

linearen Regression oder über ein Kurvenfitting geschehen (Morton *et al.*, 1995). Erstere wird im Folgenden erläutert. Die Dissoziation kann mit einer einfachen exponentiellen Funktion beschrieben werden:

$$R = -k_d \cdot R_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}, \text{ die Auflösung dieser Gleichung ergibt } \ln(R_0/R) = k_d \cdot t.$$

Ein Diagramm von  $\ln(R_0/R)$  aus der Bindungskurve mit der höchsten Analytkonzentration aufgetragen gegen die Zeit führt zu einer Geraden, dessen Anstieg dem  $k_d$ -Wert entspricht. Die Beschreibung der Assoziation durch lineare Regression kann über eine grafische Darstellung von  $dR/dt$  gegen  $R$  für jede Bindungskurve erfolgen. Die Steigung der Geraden entspricht dem Term  $-k_a \cdot C + k_d$  und stellt den Wert  $-k_s$  dar. Aufgrund der Abhängigkeit der Assoziationsgeschwindigkeit von der Analytkonzentration werden diese Werte gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Der Anstieg der dabei entstehenden Gerade stellt dann die Assoziationsrate dar. Der Quotient aus  $k_d$  und  $k_a$  reflektiert schließlich die Bindungskonstante  $K_D$ . Um einen zuverlässigen Wert für die Bindungskonstante zu erhalten, ist es wichtig, mindestens vier bis sechs verschiedene Analytkonzentrationen zu messen, die im Bereich von  $0,1 \cdot K_D$  bis  $10 \cdot K_D$  liegen (Karlsson und Larsson, 2004). Außerdem sollten Konzentrationen gewählt werden, die nicht in einem sehr schnellen Erreichen des Gleichgewichts resultieren, da zu wenige Datenpunkte für  $R$  zu Ungenauigkeiten in der Berechnung führen (Panayotou *et al.*, 1993).

Neben der linearen Regression kann die Analyse der Daten auch über ein Kurvenfitting mit integrierter Ratengleichung erfolgen (Morton *et al.*, 1995). Die Auswertung ohne Linearisierung ist genauer, da während der linearen Regression eventuelle Fehler mit weitergetragen werden und somit nicht mehr die Fehler des gemessenen Resonanzsignals reflektieren (O'Shannessy *et al.*, 1993). Die nichtlineare Auswertung der Bindungskurven basiert auf dem Langmuir-Modell mit der Gleichung:

$$R = C \cdot k_a \cdot R_{\max} \cdot (1 - e^{-((C \cdot k_a + k_d) \cdot t)}) / (C \cdot k_a + k_d) \quad (\text{O'Shannessy } et al., 1993).$$

$R$  ist dabei gleich 0. Nun entspricht aufgrund der Diffusion des Analyten senkrecht zur laminaren Strömung von der Dextranmatrix weg als auch in sie hinein die Konzentration in der Nähe der Sensorchip-Oberfläche  $A_s$  nicht exakt der Konzentration des injizierten Analyten  $C$ . Wenn die Konzentration auf der Oberfläche  $A_s$  signifikant geringer ist als die injizierte Analytkonzentration, spricht man von einer Transportlimitierung. Das bedeutet, dass die Bindungsreaktion viel schneller abläuft als der Transport des Analyten durch die Diffusionsschicht auf die Oberfläche (Glaser, 1993). Wenn eine transportlimitierte wie eine reaktionslimitierte Kinetik behandelt wird, wobei die Konzentrationen gleich sind und

bei der Kalkulierung der Reaktionsraten die Injektionskonzentration verwendet wird, weichen diese von den realen Reaktionsraten der Bindungsreaktion besonders bei geringen Konzentrationen ab (Glaser, 1993). Um die Signifikanz der errechneten kinetischen Reaktionsraten zu gewährleisten, muss eine Transportlimitierung ausgeschlossen werden (Glaser, 1993). Dafür wird ein flussunabhängiger Transportkoeffizient  $k_t$  in die Gleichung eingefügt (Karlsson und Larsson, 2004). Die Veränderung der Analytkonzentration  $A_s$  gegenüber der Zeit hieße dann

$$dA_s/dt = f^{1/3} * k_t * (C - A_s) - (k_a * A_s * B - k_d * AB) \quad (\text{Karlsson und Larsson, 2004}),$$

wobei  $f^{1/3}$  eine Flusskonstante bezeichnet. Der  $k_t$ -Wert als Maß für eine Transportlimitierung sollte sich zwischen  $10^8$  bis  $5 * 10^9$  RU/Ms bewegen und bei Vorliegen einer Transportlimitierung einen Wert über  $10^{11}$  aufweisen (Karlsson und Larsson, 2004). Durch kürzere Diffusionsabstände kann das Problem der Transportlimitierung umgangen werden (Fiore *et al.*, 1988).

Mit Hilfe der BIAevaluation Software ist eine Kurvenanpassung, ein sogenanntes Fitting der Bindungskurven anhand des Langmuir-Modells möglich. Die festgelegten Anfangsparameter  $k_a$  und  $k_d$  werden in einem lokalen Fit solange variiert bis diese die gemessenen Bindungskurven so nah wie möglich beschreiben (Morton *et al.*, 1995; Roden und Myszka, 1996). In einem globalen Fitting geschieht das für ein ganzes Kurvenset, wobei  $R_{max}$  ebenfalls als variabler Parameter gesetzt wird. Die Abweichungen zwischen gemessener und theoretischer Bindungskurve werden in einer Residuengrafik angezeigt und reflektieren die Flächendifferenz der Kurven, also das Flächenquadrat der Abweichung ( $\chi^2$ ). Dieser Wert sollte nach allgemeiner Vorstellung in Anbetracht der Höhe der Resonanzantwort 0,5 % des maximalen Resonanzsignals nicht überschreiten.

Wenn eine Bestimmung der Affinität über die kinetischen Reaktionsraten nicht möglich ist, kann, analog zum Michaelis-Menten-Modell über das höchste Resonanzsignal im Gleichgewicht und die Analytkonzentration ein  $K_D$ -Wert mit Hilfe der Gleichung

$$R_{eq} = C * R_{max} / (C + K_D) \quad (\text{Karlsson und Larsson, 2004})$$

ermittelt werden, sofern die Bindungsreaktionen während der Injektion das Gleichgewicht (Steady State) erreichen (Karlsson und Larsson, 2004). Bei Auftragen der maximalen Antwort im Gleichgewicht  $R_{eq}$  der Bindungskurven gegen die Analytkonzentration  $C$  ist  $R_{max}/2$  in Bezug auf die höchste Konzentration äquivalent zum  $K_D$ -Wert, also zur Konzentration bei der die Hälfte der Bindungsstellen belegt ist. Da beide eben beschriebenen Möglichkeiten der Affinitätsbestimmung auf demselben 1:1-Interaktions-

modell basieren, sollten die  $K_D$ -Werte identisch sein (Karlsson und Larsson, 2004). Sobald kein 1:1-Bindungsmodell vorliegt, sind die Gleichungen nicht mehr anwendbar. Bei mehreren Bindungsstellen, wie z. B. im Falle von vollständigen Antikörpern, dessen Komplexstabilität aufgrund der Avidität stabiler ist, müssen komplexere Modelle angewendet werden, jedoch nur dann wenn ein biochemischer Grund vorliegt (Karlsson und Larsson, 2004). Der BIAcore-Biosensor stellt ein automatisiertes komplexes System zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten dar. Mit Hilfe der SPR-Technologie können millimolare bis hin zu pikomolaren Affinitäten bestimmt werden, bei Assoziationsraten zwischen  $10^3$  bis  $10^8$  1/Ms und Dissoziationsraten von  $10^{-5}$  bis 1 1/s (Karlsson und Larsson, 2004). Für monoklonale Antikörper und dessen Fragmente wurden Assoziationsraten zwischen  $4 \cdot 10^4$  bis  $10^6$  1/Ms beschrieben (Glaser, 1993).

#### I.4. Ziel der Arbeit

Chlamydien besitzen Lipopolysaccharide mit unterschiedlichen Oligosaccharidstrukturen aus 2-Keto-3-desoxy- $\alpha$ -octonsäure (Kdo). Während in allen Chlamydien die Trisaccharide  $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ Kdo und  $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)-Kdo gefunden wurden, enthält nur *Chlamydophila psittaci* ein verzweigtes  $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)[ $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)]- $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ Kdo-Tetrasaccharid. Auf der Basis von Kristallstrukturen, Bindungsdaten und Primärstrukturanalysen verschiedener Antikörper gegen diese Strukturen, sollte durch zielgerichtete Mutagenese der Einfluss der Antikörperstruktur auf Spezifität und Kreuzreaktivität untersucht werden. Im Hinblick auf eine Verbesserung der Chlamydien-Diagnostik sollten Antikörper generiert und untersucht werden, die in der Lage sind das verzweigte Kdo-Tetrasaccharid aus *C. psittaci* spezifisch zu erkennen, ohne Kreuzreaktivität mit anderen Strukturen des Chlamydien-LPS aufzuweisen. Hier war insbesondere die Aufhebung der Kreuzreaktivität mit  $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ Kdo von Bedeutung. Um eine biochemische Charakterisierung in Bindungsstudien und eine Mutagenese der Antikörper in ihren Bindungsstellen zu ermöglichen, sollten diese als Miniantikörper (single-chain Fragment variable, scFv) kloniert, in *Escherichia coli* exprimiert und als monovalente Fragmente isoliert werden.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, einen tieferen Einblick in den generellen Mechanismus von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zu gewinnen und den Zusammenhang zwischen Affinität, Spezifität und Kreuzreaktivität von Antikörpern besser zu verstehen. Insbesondere sollte ein Vergleich verschiedener Antikörper in Bindungsstudien Aufschluss über den Einfluss der hydrophoben Wechselwirkung auf die Interaktion mit negativ geladenen Liganden geben.

## II. MATERIAL UND METHODEN

Für alle Lösungen und Medien wurde gefiltertes entionisiertes reines Wasser, im Folgenden H<sub>2</sub>O genannt, aus einer Milli-Q academic Q-Gard<sup>®</sup> 2- Anlage von Millipore verwendet.

### II.1. Organismen, DNA-Konstrukte und Proteine

#### II.1.1 Elementarkörper von Chlamydien

---

##### Organismus

---

*Chlamydia trachomatis* Serotyp L<sub>2</sub>, CH-1039  
*Chlamydophila pneumoniae* Stamm TW-183, CH-1033  
*Chlamydophila psittaci* Stamm 6BC, CH-1155

---

**Tab. 1:** Elementarkörper von Chlamydien für ELISA-Bindungsstudien.

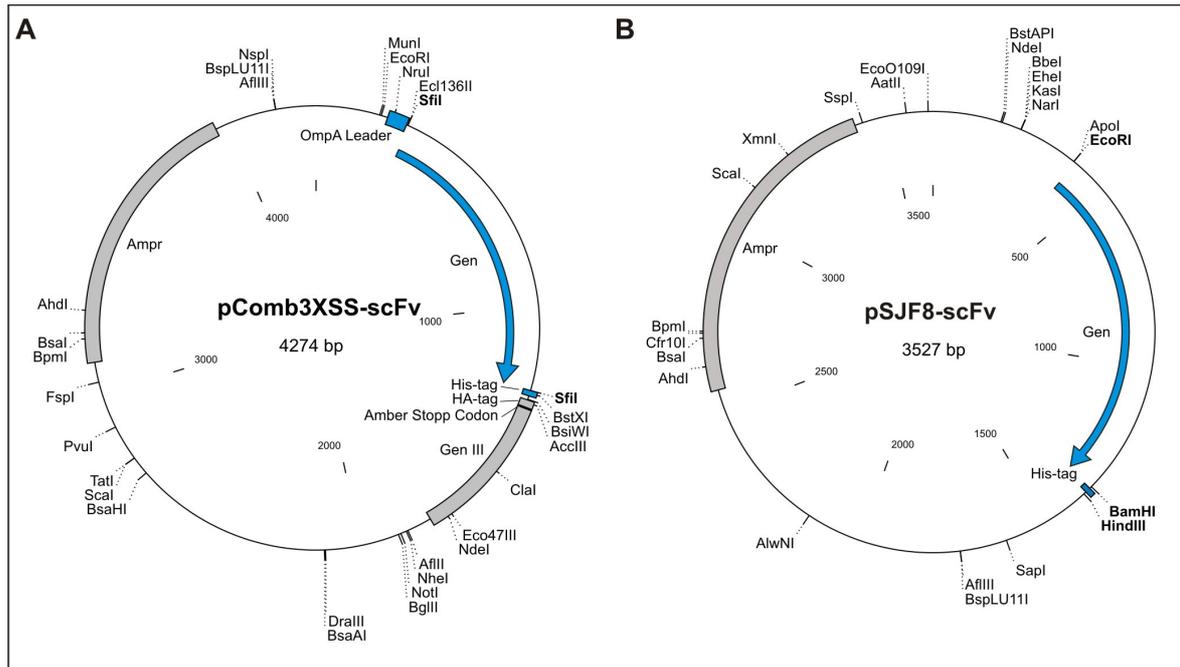
Die Bakterien wurden von Prof. Dr. H. Brade zur Verfügung gestellt und stammten aus einer Isolierung aus Chlamydien-infizierten L929-Zellen (Rund *et al.*, 1999, 2000; Brade *et al.*, 2000).

#### II.1.2 Verwendete Organismen, Plasmide und Vektoren

Organismus	Beschreibung
<i>E. coli</i> TG1 <sup>1</sup>	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5</i> , (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ), [F' <i>traD36 proAB lacI</i> <sup>q</sup> ZΔM15]
NH2588-44 <sup>2</sup>	pSJF8 <sup>2</sup> mit klonierter cDNA-Sequenz der VL- und VH-Gene des scFv NH2240-31 in <i>E. coli</i> TG1
NH2592-05 <sup>2</sup>	pSJF8 mit klonierter cDNA-Sequenz der VL- und VH-Gene des scFv S69-4 in <i>E. coli</i> TG1
NH3829-04 <sup>2</sup>	pSJF8 mit klonierter cDNA-Sequenz der VL- und VH-Gene des scFv S45-18 in <i>E. coli</i> TG1
NH2240-19 <sup>2</sup>	pComb3XSS mit klonierter cDNA-Sequenz der VL- und VH-Gene des scFv SAG506-01 in <i>E. coli</i> TG1

---

**Tab. 2:** Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Bakterien. <sup>1</sup> Referenz: Gibson, 1984, <sup>2</sup> von Prof. Dr. H. Brade zur Verfügung gestellt.



**Abb. 11:** Klonierungsvektor Phagemid pComb3XSS und Expressionsvektor pSJF8.

A: pComb3XSS (Barbas III et al., 2001) mit lac Promotor und Ampicillin-Resistenzgen. Klonierung der Gene für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette VLK und VH als scFv über zwei SfiI-Schnittstellen, verbunden durch einen Peptidlinker der Sequenz SS(G)<sub>4</sub>S(G)<sub>6</sub>SSRSS mittels Überlappungs-PCR. Anfügen eines OmpA-Leaderpeptids MKKTAIAIAVALAGFATVAQAA.

B: pSJF8 mit lac Promotor und Ampicillin-Resistenzgen (Dr. John Nash, basierend auf dem pUCE8-Vektor (Narang et al., 1987). Umklonierung der scFv aus pComb3XSS inklusive OmpA-Leader über die Schnittstellen EcoRI und BamHI mittels Primer (VII.1), die die Schnittstellen enthielten und am Carboxylterminus einen c-Myc-Tag vor dem Vektor-internen His<sub>(5)</sub>-Tag einfügen. Eine genaue DNA- und Proteinsequenz des klonierten scFv NH2240-31 findet sich im Anhang.

### II.1.3 Neoglykokonjugate

Für die Bindungsstudien in der vorliegenden Arbeit fanden Neoglykokonjugate Anwendung, die mir von Prof. Dr. Brade zur Verfügung gestellt wurden. Dies sind strukturell definierte Oligosaccharide, die Kohlenhydratepitope von bakteriellen Lipopolysacchariden darstellen und über diverse Methoden an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt sind. Die aufgeführten Neoglykokonjugate standen vor Beginn meiner Arbeit zur Verfügung, ihre Herkunft ist vermerkt. Die Konjugate hatten jeweils eine BSA-Konzentration von 1 mg/ml und wurden bei - 20 °C aufbewahrt.

ITC (Isothiocyanat)- Konjugate: natürliche Oligosaccharide enzymatisch oder chemisch modifiziert

Die in Tab. 3 aufgeführten Kdo-(3-deoxy- $\alpha$ -D-manno-oct-2-ulosonsäure) BSA-Konjugate wurden wie folgt konstruiert. Die rekombinant in *E. coli* F515-140 hergestellten und anschließend acetylierten Ausgangsprodukte  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-1,4'-bisphosphat (TSBP-NAc),  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-1,4'-bisphosphat (2.8/2.4 PS-BP-NAc),  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-1,4'-bisphosphat (2.4/2.4 PSBP-NAc) und  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)]- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-1,4'-bisphosphat (HSBP-NAc) (Holst *et al.*, 1995) wurden zunächst mit alkalischer Phosphatase behandelt, was zu einer Abspaltung des 1-Phosphat am GlcNAc<sub>1</sub> führte, anschließend am C<sub>1</sub>-Atom allylaminieren und mit NaBH<sub>4</sub> reduziert. Dann erfolgte die Substitution eines Cysteaminspacers sowie eine Behandlung mit Thiophosgen. Die entstandenen Isothiocyanat-Derivate wurden dann über Aminogruppen des BSA an dieses gekoppelt (Müller-Loennies *et al.*, 2002). Die Konjugate besitzen somit die Struktur R-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-CS-NH-BSA (R-Allyl-Cys-ITC-BSA), wobei R den Glycosylrest darstellt. Als Beispiel für die Struktur ist in Abb. 10A das HS-4P gezeigt.

R (Glycosylrest)	Abkürzung
$\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)]- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-4P-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-	HS-4P <sup>1,2</sup>
$\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-4P-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-	2.4/2.4 PS-4P <sup>3</sup>
$\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-4P-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-	2.8/2.4 PS-4P <sup>4</sup>
$\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAc-4P-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcNAc-	TS-4P <sup>5</sup>

**Tab. 3:** Neoglycokonjugate aus BSA und isolierten Oligosacchariden aus deacyliertem LPS. Die Oligosaccharide wurden nach enzymatischer Dephosphorylierung und Derivatisierung mit Allylamin an BSA konjugiert.

<sup>1</sup> hergestellt von Veronika Susott (FZ Borstel), Belegung 92,0 nmol Ligand/ml  
<sup>2</sup> hergestellt von Veronika Susott (FZ Borstel), Belegung 65,0 nmol Ligand/ml  
<sup>3</sup> hergestellt von Veronika Susott (FZ Borstel), Belegung 96,7 nmol Ligand/ml  
<sup>4</sup> hergestellt von Veronika Susott (FZ Borstel), Belegung 127,9 nmol Ligand/ml  
<sup>5</sup> hergestellt von Veronika Susott (FZ Borstel), Belegung 121,5 nmol Ligand/ml

ITC- (Isothiocyanat) Konjugate: synthetisch hergestellte Oligosaccharide

Diese Oligosaccharide (Tab. 3) (Kosma *et al.*, 2000) waren, wie oben beschrieben, ebenfalls an BSA über ein Allyl-Cys-ITC-Spacer (R-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-CS-NH-

BSA) an das Kdo-C<sub>2</sub>- oder das GlcNAc<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-Atom gekoppelt, wobei in dieser Methode eine Reduktion des BSA-verknüpften Zuckers nicht notwendig ist. R bezeichnet hier wieder den Glycosylrest. Als Beispiel ist in Abb. 12B das α-Kdo-(2→8)-α-Kdo-Allyl-Cys-ITC-BSA dargestellt.

R (Glycosylrest)	Abkürzung	Belegung
α-Kdo-	Kdo <sub>1</sub>	167,0 nmol Ligand/ml
α-Kdo-(2→4)-α-Kdo-	2.4 Kdo <sub>2</sub>	136,0 nmol Ligand/ml
α-Kdo-(2→4)-α-Kdo-(2→4)-α-Kdo-	2.4/2.4 Kdo <sub>3</sub>	52,7 nmol Ligand/ml
α-Kdo-(2→8)-α-Kdo-	2.8 Kdo <sub>2</sub>	130,0 nmol Ligand/ml
α-Kdo-(2→8)-α-Kdo-(2→4)-α-Kdo-	2.8/2.4 Kdo <sub>3</sub>	82,3 nmol Ligand/ml
α-Kdo-(2→4)-[α-Kdo-(2→8)]-α-Kdo-(2→4)-α-Kdo-	2.4[2.8]2.4 Kdo <sub>4</sub>	97,1 nmol Ligand/ml
<b>carboxylreduzierte Derivate:</b>		
α-Kdo-(2→8)-α-Kdo <sub>C1-red</sub> -	2.8 Kdo <sub>2C1-red</sub>	127,0 nmol Ligand/ml
α-Kdo-(2→4)-α-Kdo <sub>C1-red</sub> -	2.4 Kdo <sub>2C1-red</sub>	85,0 nmol Ligand/ml

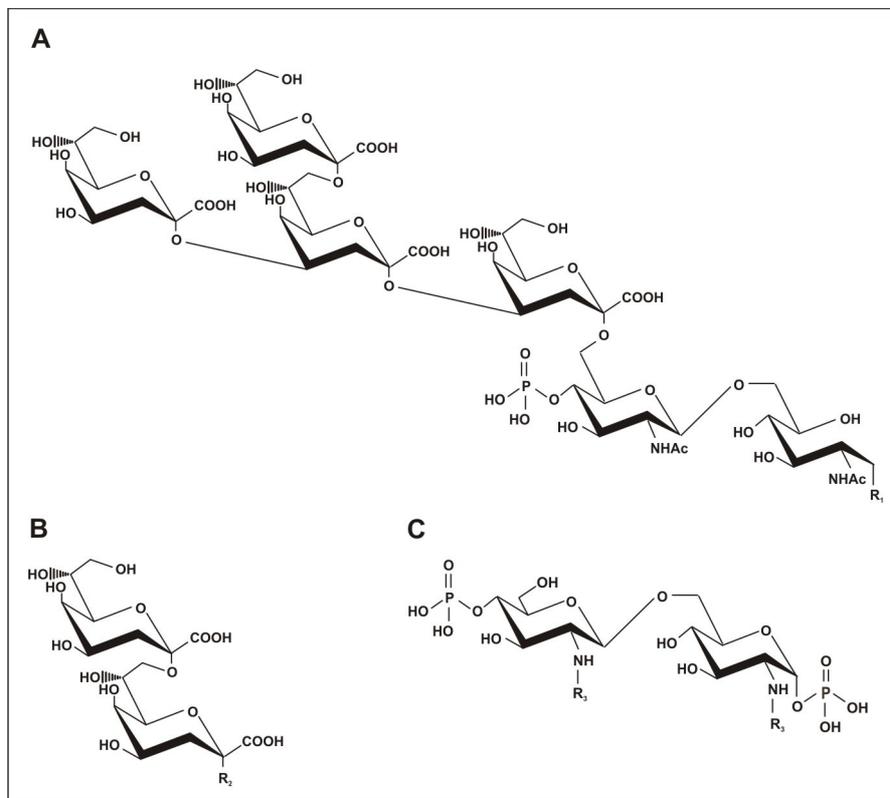
**Tab. 4:** ITC-Konjugate aus synthetisch hergestellten Oligosacchariden.

<sup>1</sup> Synthese der Allylglycoside und Konjugation nach Kosma *et al.*, 2000

<sup>2</sup> Synthese des Allylglycosids D`Souza *et al.*, 1994

<sup>3</sup> Synthese des Allylglycosids Kosma *et al.*, 1999

<sup>4</sup> Synthese des Allylglycosids Kosma *et al.*, 1988



**Abb. 12:** Strukturen der Konjugate aus Oligosacchariden des LPS von Chlamydien nach unterschiedlicher Konjugation. A: HS-4P siehe Tab. 3; B: 2.8 Kdo<sub>2</sub> siehe Tab. 4; C: BBP siehe Tab. 5. R<sub>1</sub> = -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-CS-NH-BSA, R<sub>2</sub> = -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-CS-NH-BSA, R<sub>3</sub> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-BSA.

DVS- (Divinylsulfon) Konjugat

Bei diesem Konjugat diente deacetyliertes Lipoid A ( $\beta$ -D-GlcN-4P-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcN-1P) aus *E. coli* 515 als Ausgangsprodukt. Nach einer Aktivierung des BSA mit Divinylsulfon (DVS) wurde das BBP über die Aminogruppen der Glucosamine an BSA kovalent gebunden (BBP-DVS-BSA, Abb. 12C) (Houen and Jensen, 1995).

R (Glycosylrest)	Abkürzung
$\beta$ -D-GlcN-4P-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcN-1P-	BBP

**Tab. 5:** DVS-Konjugat BBP, Belegung 114,5 nmol Ligand/ml.

**II.1.4 Monoklonale Antikörper**

Antikörper	Reinigung
S45-18	ungereinigter Hybridoma-Überstand aus einer Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-BSA (Brade <i>et al.</i> , 2000)
S69-4	gereinigt aus Hybridoma-Überstand aus einer Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-BSA (Müller-Loennies <i>et al.</i> , 2006)
S25-2	gereinigt aus Hybridoma-Überstand einer Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-GlcNAc-BSA (Fu <i>et al.</i> , 1992)
WN1 222-5	gereinigt aus Hybridoma-Überstand aus einer Immunisierung von NZB-Mäusen mit hitzeinaktivierten <i>E. coli</i> und <i>Salmonella</i> -Stämmen (Di Padova <i>et al.</i> , 1993)

**Tab. 6:** Tabelle der verwendeten monoklonalen Antikörper und ihre Reinigung. Alle Antikörper wurden von Dr. L. Brade (FZ Borstel) zur Verfügung gestellt.

## II.2. Methoden zur DNA-Analyse und DNA-Modifikation

### II.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation definierter DNA-Abschnitte, die von bekannten Sequenzen flankiert werden (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1992). Dabei wird der zu amplifizierende DNA-Strang zunächst bei 94 °C denaturiert, so dass an die entstehenden DNA-Einzelstränge je ein komplementäres Oligonukleotid hybridisieren kann (Annealing). Mit Hilfe dieser Primer ist die DNA-Polymerase in der Lage, jeden Einzelstrang wieder zum Doppelstrang aufzufüllen (Elongation). Durch erneute Denaturierung kann unter Hybridisierung neuer Primermoleküle der Vorgang zyklisch wiederholt werden, was zu einer exponentiellen Vervielfachung des DNA-Fragments führt.

Die Pipettierarbeiten für sämtliche PCR-Reaktionen wurden in dünnwandigen Multiply<sup>®</sup>-Pro 0,5 ml PP- Gefäßen (Sarstedt, AG & Co., Nümbrecht) unter einer mit UV-Licht behandelten Arbeitsfläche durchgeführt (Clean Spot-PCR/UV work station, COY Laboratory Products, Michigan, USA). Für die PCR wurden thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt, entweder die *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl, Roche Diagnostics – Applied Science, Mannheim) oder die *Pfu* DNA-Polymerase (3 U/µl, Promega GmbH, Mannheim), die eine zusätzliche 3'→5' Exonuklease-Aktivität besitzt, die eine Korrektur erlaubt (proofreading). Beide Polymerasen wurden jeweils in Kombination mit dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Informationen zu den verwendeten Oligonukleotiden befinden sich unter VII.1.

#### Reaktionsansatz für eine Standard-PCR

5,0 µl	10 x PCR-Reaktionspuffer
4,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Roche)
1,0 µl	10 pmol/µl 5'-Oligonukleotide (Sense-Primer)
1,0 µl	10 pmol/µl 3'-Oligonukleotide (Antisense-Primer)
1,0 µl	DNA-Ausgangsprodukt (Plasmid-DNA) 100-500 ng/µl
0,5 µl	DNA-Polymerase (1,5 - 2,5 U)
	auffüllen auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O

Die jeweiligen PCR wurden in einem automatischen T3 Thermocycler der Firma Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen durchgeführt und wie folgt programmiert:

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit
<b>initiale Denaturierung</b>	1	94	3 min
<b>Denaturierung</b>	29	94	30 s
<b>Annealing</b>		46	30 s
<b>Verlängerung</b>		72	1 min
<b>Finale Verlängerung</b>	1	72	10 min

**Tab. 7:** PCR-Standardprogramm.

Das Programm wurde bei Bedarf im Hinblick auf die Schmelztemperatur und Spezifität der jeweiligen Primer (VII.1) modifiziert. Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren, wurden 5 oder 10 µl des Reaktionsansatzes auf einem 0,8 oder 1,2 %igen Agarose-Gel (II.2.4) elektrophoretisch getrennt.

#### Reaktionsansatz für die Amplifikation von Genfragmenten direkt aus *E. coli*-Zellen

- 1,0 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer
- 0,8 µl dNTP-Mix (je 10 mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Roche)
- 0,2 µl 10 pmol/µl 5'-Oligonukleotide (Sense-Primer)
- 0,2 µl 10 pmol/µl 3'-Oligonukleotide (Antisense-Primer)
- 0,5 µl DNA-Polymerase (5 U/µl)
- auffüllen auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O

Um zu überprüfen, ob *E. coli*-Klone nach einer Transformation (II.3.5) das gewünschte Plasmid enthalten, wurde für die PCR unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse etwas Koloniematerial abgenommen und in den Reaktionsansatz überführt. Die Dauer der initialen Denaturierung wurde hier auf 5 min erhöht, um einen vollständigen Aufschluss der Zellen zu gewährleisten.

## II.2.2 Mutagenese-PCR

Der Austausch einer einzelnen oder mehrerer Aminosäuren in einem Protein kann *in vitro* auf DNA-Ebene über eine positionsgerichtete Mutagenese realisiert werden (Smith, 1985b). In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür das QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed

Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Kanada) verwendet. Jeweils zwei Oligonukleotid-Primer wurden entworfen, die jeweils an derselben Sequenz jedoch an dem entgegengesetzten Strang des Plasmids hybridisieren und die Mutation tragen. Der Entwurf der Mutagenese-Primer erfolgte mit Hilfe der Software PrimerSelect™, DNASTAR Inc., Wisconsin, USA. Dabei wurde, gemäß dem Protokoll von Stratagene, darauf geachtet, dass die Länge der Oligonukleotide zwischen 25 und 45 bp betrug, die Schmelztemperatur bei 78 °C oder höher lag, die gewünschte Mutation sich im Mittelbereich der Oligonukleotidsequenz befand, die Sequenz einen GC-Gehalt von über 40 % besaß sowie am Anfang und Ende der Sequenz ein Guanin oder ein Cytosin auftrat. Außerdem wurden beim Primerdesign seltene *E. coli*-Codons vermieden, um die Translation nicht zu erschweren. Um den Erfolg der PCR zu maximieren, erfolgte gegebenenfalls eine Modifikation der Primersequenz dahingehend, dass selbstkomplementäre Bereiche, die die Ausbildung von Sekundärstrukturen begünstigen, minimiert wurden, ohne dabei die Proteinsequenz zu verändern. Die verwendeten Primer sind unter VII.1 aufgeführt.

Als Ausgangsprodukt für die Mutagenese-PCR dienten jeweils die in den Expressionsvektor pSJF8 klonierten scFv-Antikörperfragmente NH2240-31, S69-4 und S45-18 (II.1.2). Während der PCR umläuft die *PfuTurbo*®-DNA-Polymerase (2,5 U/μl, Stratagene) die gesamte Sequenz des Ursprungsplasmids, amplifiziert an die Primer beide DNA-Stränge und generiert somit ein Tochterplasmid, welches die Mutation trägt. Es folgte im Anschluss eine Behandlung mit der Endonuklease *DpnI* (II.2.10), um das methylierte Ursprungsplasmid abzubauen. Das von der Polymerase amplifizierte Tochterplasmid mit der Mutation bleibt dabei unberührt. Nach der Transformation in kompetente *E. coli* TG1-Zellen mittels Elektroporation (II.3.5), wurde über Amplifikation des scFv-Genkonstruktes direkt aus Zellmaterial mit den Primern NH1543-01 und NH1543-02 (VII.2) überprüft, ob die Klone das Genfragment von etwa 1 kb enthielten.

### Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR

5,0 μl	10 x PCR-Reaktionspuffer (Stratagene)
1,0 μl	dNTP-Mix (je 10 mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Roche)
1,0 μl	10 pmol/μl 5'-Oligonukleotide
1,0 μl	10 pmol/μl 3'-Oligonukleotide
0,5 μl	Plasmid-DNA (50 ng)
1 μl	<i>PfuTurbo</i> ®-DNA- Polymerase (2,5 U/μl)
	auffüllen auf 50 μl mit H <sub>2</sub> O

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit
initiale Denaturierung	1	95	30 s
Denaturierung	12-18	95	30 s
Annealing		x	1 min
Verlängerung		68	1 min
Finale Verlängerung	1	68	10 min

**Tab. 8:** PCR-Programm für Mutagenese. Die Annealing-Temperatur wurde jeweils den Mutagenese-Primern (VII.1) angepasst.

### II.2.3 Umklonierung des scFv NH2240-19 in den Expressionsvektor pSJF8

Die pSJF8-Plasmide mit den klonierten Genen des scFv NH2240-31, mAk S45-18 und mAk S69-4 standen vor Beginn der vorliegenden Arbeit zur Verfügung (II.1.2). Das scFv NH2240-19 lag im Vektor pComb3XSS vor und wurde in den Expressionsvektor pSJF8 (II.1.2) wie folgt umkloniert. Nach der Amplifikation des scFv in pComb3XSS mit den Primern NH2160-04 und NH1971-03 (VII.1), die am 5' Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle und am 3' Ende den c-Myc-Tag und eine *BamHI*-Schnittstelle einfügten, wurde das PCR-Produkt gereinigt (II.2.6), mit den Endonukleasen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten (II.2.9) und erneut gereinigt. Mit dem pSJF8-Leervektor wurde ebenso verfahren. Nach einer Extraktion des geschnittenen Vektors aus dem Agarosegel (II.2.5), erfolgte eine Konzentrationsabschätzung von Vektor und Gen auf einem Agarosegel (II.2.7) mit anschließender Ligation beider Fragmente (II.2.11). Das scFv, kloniert in den pSJF8-Vektor, wird für eine bessere Unterscheidung im Folgenden mit der Bezeichnung SAG506-01 weitergeführt.

### II.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um DNA und RNA nach ihrer Größe zu trennen. In der vorliegenden Arbeit diente sie der Kontrolle von PCR-Produkten, isolierter Plasmid-DNA sowie der Auftrennung der durch Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Abhängig von der erwarteten Fragmentgröße der DNA wurden Gele mit einer Agarosekonzentration (Agarose Molekularer Reinheitsgrad,

Eurogentec) von 0,8 bzw. 1,2 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer unter Kochen gelöst und anschließend das Gel gegossen. Zur Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht erfolgte bereits vor dem Gießen des Geles eine Zugabe von 0,5 µg/ml Endkonzentration Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Zum Auftragen der DNA wurde die Probe mit 1/5 Volumen Probenpuffer gemischt und in die Geltasche pipettiert. Der Kontrolle der Fragmentgrößen dienten jeweils 2 µl eines Größenstandards. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer vom Typ Mini-Sub<sup>®</sup> cell GT oder Wide Mini-Sub<sup>®</sup> cell GT (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer Spannung von 90 V (Netzgerät Power Pac 300, Bio-Rad) für 40 min. Die Gele wurden dann mit Hilfe eines UV-Geldokumentationssystems (GelDoc XR, Bio-Rad, Software Quantity One) ausgewertet.

### 1 x TAE-Puffer

40 mM Tris

0,1 % Eisessig

1 mM EDTA pH 8,0

### Probenpuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau (Merck)

30,0 % (v/v) Glycerin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

### Größenstandards

1 kb DNA Ladder 323-2S, 500 µg/ml      Fragmentgrößen:  
10002, 8001, 6001, 5001, 4001, 3001, 2000, 1500, 1000, 500 bp

DNA Ladder 323-1L, 500 µg/ml      Fragmentgrößen:  
1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

Beide Größenstandards wurden von New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main bezogen.

### II.2.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach einer Restriktion sollte das gewünschte DNA-Fragment nach der Gelelektrophorese (II.2.4) aus der Agarose eluiert werden. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten, gewogen und die DNA mit Hilfe des QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus den Gelstücken isoliert.

### II.2.6 Reinigung von DNA

Die Reinigung von PCR-Produkten und restringierter DNA erfolgte mit Hilfe von Säulchen des QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde jeweils in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### II.2.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

DNA-Konzentrationen wurden über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Lichtstrahlhöhe 8,5 mm) in einer Präzisionsküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 10 mm (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) bestimmt. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach der Gleichung:

$$c_{\text{(DNA)}} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Abschätzung geringer DNA-Mengen, die photometrisch nicht mehr erfasst werden konnten, wurden nach Auftragen der Proben auf ein Agarosegel als Bezugspunkte für die Konzentration die Banden der Molekulargewichts-Größenstandards (II.2.4) herangezogen.

### II.2.8 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Nach Einbringen rekombinanter Plasmid-DNA in *E. coli* (II.3.5) und einer Kontrolle der Klone über PCR (II.2.1) erfolgte eine Sequenzierung des gewünschten Genfragments

einiger positiver Klone. Dazu wurde Plasmid-DNA isoliert (II.3.6) und je 1 µg für je eine Sequenzierungsreaktion wie folgt präzipitiert. Nach einer Konzentrationsbestimmung (II.2.7) wurde die entsprechende Menge DNA auf 100 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt, mit 250 µl eiskaltem 100 % reinem Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 sowie 1 µl einer 20 mg/ml- Glycogenlösung (Roche Diagnostics –Applied Science, Mannheim) versetzt und für 30 min bei - 70 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Präzipitation der DNA für 30 min bei 4 °C in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus Holding GmbH, Hanau) und ein Waschschriff von 10 min mit 70 % reinem Ethanol. Zum Schluss wurde die DNA in einer Savant Speed-Vac<sup>®</sup>Plus unter Vakuum (Global Medical Instrumentation, Inc., Ramsey, USA) getrocknet. Die Sequenzierungsreaktionen erfolgte bei der Firma Eurofins MWG GmbH, Martinsried durchgeführt.

### **II.2.9 DNA-Restriktion für die Klonierung von DNA-Fragmenten**

Typ II-Restriktionsendonukleasen katalysieren eine sequenzspezifische Spaltung von DNA. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Restriktion von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten unter den vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Bedingungen in dem mitgelieferten Reaktionspuffer. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Restriktionsenzyme von der Firma New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main bezogen.

#### Standard-Restriktionsansatz

5 µl 10 x Reaktionspuffer  
1 µg DNA  
20 U Restriktionsenzym  
auffüllen auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O

Bei abweichenden DNA-Mengen sowie Restriktionen mit zwei Enzymen in gleichem Puffer wurde der Standardansatz dementsprechend modifiziert. Die Vollständigkeit von Restriktionen von Plasmid-DNA wurde gelelektrophoretisch (II.2.4) überprüft.

### II.2.10 DNA-Restriktion nach Mutagenese-PCR

Bevor das mutagenisierte Plasmid (II.2.2) in elektrokompetente *E. coli*- TG1 Zellen transformiert wurde (II.3.5), sollte die Ausgangsplasmid-DNA aus der Lösung entfernt werden. Dies wurde mit Hilfe der Endonuklease *DpnI* (Stratagene, La Jolla, Kanada) realisiert. Plasmide aus *E. coli* *dam*<sup>+</sup>- Stämmen, wie TG1, sind im Gegensatz zu der neusynthetisierten DNA methyliert. *DpnI* ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA und baut die parentale DNA ab, wobei das mutagenisierte Plasmid von der Restriktion verschont bleibt. Jeweils 1 µl des Enzyms (10 U) wurde in den 50 µl-Ansatz pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

### II.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe von DNA-Ligasen können kompatible Enden restringierter DNA-Fragmente kovalent miteinander verbunden werden. Um PCR-Produkte in Vektoren einzubringen, wurden diese und die entsprechende Vektor-DNA mit passenden Restriktionsenzymen geschnitten (II.2.9). Danach wurde der restringierte Vektor aus einem Agarosegel isoliert (II.2.5) und das zu ligierende PCR-Produkt, wie in II.2.6 beschrieben, gereinigt. Die Konzentration der DNA wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt (II.2.7) und für eine erfolgreiche Ligation das zu ligierende Fragment in einem vierfachen molaren Überschuss bezüglich der Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte üN bei RT oder bei 16 °C im T3 Thermocycler (Biometra®).

#### Standard-Ligationsansatz:

4 µl 5 x Ligasepuffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)  
1 µl geschnittene Vektor-DNA (30 ng)  
4 µl zu ligierendes DNA-Fragment (45 ng)  
1 µl T4 DNA-Ligase ( 1 U/µl, Invitrogen)  
auffüllen auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O

## **II.3. Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*)**

### **II.3.1 Kultivierung und Selektion von *E. coli* in Standardmedien**

Alle Arbeiten mit *E. coli* wurden unter einer sterilen Arbeitsbank (Cleanbench Typ Lamin Air<sup>®</sup> HLB 2472, Heraeus) sowie in autoklavierten Gefäßen durchgeführt. Die verwendeten Nähr- und Selektionsmedien waren zuvor 30 min bei 120 °C autoklaviert worden (Autoklav Westima-Sauter). Antibiotika und alle anderen Zusätze wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und dem Medium nach dem Autoklavieren zugesetzt.

#### LB-Amp (Luria Bertani-Ampicillin) Agar

Für die Herstellung von LB-Amp Agar wurde eine Fertigmischung (Luria-Miller, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) verwendet und für die Selektion von Transformanden 100 µg/ml Ampicillin (Ampicillin-Natriumsalz, Carl Roth GmbH + Co. KG) zugesetzt.

#### 2 x YT Medium (Yeast Extract Tryptone) + Glucose

5 g NaCl

16 g Trypton/Pepton aus Casein (Carl Roth GmbH + Co. KG)

10 g Hefeextrakt (Carl Roth GmbH + Co. KG)

auffüllen auf 900 ml mit H<sub>2</sub>O, pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen, auffüllen auf 1000 ml H<sub>2</sub>O

nach dem Autoklavieren 0,1 % Endkonzentration Glucose dazugeben

### **II.3.2 Kultivierung von *E. coli* für die Induktion der Proteinexpression**

Für die Expression von Proteinen wurde zunächst aus einer Glycerinkultur (II.3.3) eines *E. coli*-Klones, der das Plasmid mit dem gewünschten Gen enthält, etwas Material abgenommen und auf einer LB-Amp Agarplatte (II.3.1) ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C in einem Brutschrank (Typ Dargatz, Heraeus Holding GmbH, Hanau) wurden 10 ml 1 x M9-Amp Medium in einem 10 ml Reagenzglas mit etwas Material einer Einzelkolonie von der Platte mit Hilfe einer Impföse beimpft und diese Vorkultur dann üN im Inkubator (Typ Certomat<sup>®</sup>BS-1, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) bei 24 °C und 220 rpm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurde 1 l 1 x M9-Amp Medium in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit den 10 ml der

Vorkultur 24 h bei 24 °C und 150 rpm angezogen. Die Proteinexpression wurde dann mit 1 mM IPTG (Carl Roth GmbH + Co. KG) induziert und die Kultur nach Zugabe von 100 ml 10 x TB Medium für 72 h bei 24 °C und 150 rpm geschüttelt. IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) ist ein Strukturanalogon der Lactose und ist somit in der Lage den *lac*-Repressor von *E. coli* zu binden und die Transkription des *lac*-Operons zu induzieren. Die Kulturen wurden dann, wie in II.3.1 beschrieben, geerntet.

### 1 x M9-Amp (Minimal-) Medium

6,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
3,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,0 g NH<sub>4</sub>Cl  
0,5 g NaCl                      auffüllen auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Zusätze sterilfiltriert und dem Medium stets frisch zugefügt.

1,0 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM CaCl<sub>2</sub>  
5,0  $\mu$ g/ml Thiaminchlorid-hydrochlorid (Vitamin B<sub>1</sub>-hydrochlorid, Merck KGaA, Darmstadt)  
0,1 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz (Carl Roth GmbH + Co. KG)  
0,2 % alpha-D-Glucose (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
0,4 % Pepton Nr. 5 Caseinhydrolysat, säurehydrolysiert (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

### 10 x TB (Terrific Broth) Medium

24 g Hefeextrakt (Carl Roth GmbH + Co. KG)  
12 g Trypton/Pepton aus Casein (Carl Roth GmbH + Co. KG)  
4 ml v/v Glycerin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
auf 100 ml auffüllen und autoklavieren

### **II.3.3 Stammhaltung**

Für eine längerfristige Stammhaltung erfolgte die Aufbewahrung von *E. coli*-Wildtypstämmen und rekombinanten Klonen als Glycerindauerkulturen. Dazu wurden 5 ml 2 x YT Medium + Glucose (II.3.1), bei rekombinanten Klonen mit entsprechendem Antibiotikum mit etwas Bakterienmaterial von einer Agarplatte beimpft und üN bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 750  $\mu$ l der Kultur wurden dann mit 250  $\mu$ l 87 %igen v/v autoklaviertem Glycerin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in einem

Reaktionsgefäß (Nunc<sup>TM</sup>cryoTube<sup>TM</sup> vials, NuncA/S Roskilde, Dänemark) gemischt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

### II.3.4 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Es gibt verschiedene Methoden *E. coli*-Zellen für eine DNA-Aufnahme kompetent zu machen. Da die Zellen in der vorliegenden Arbeit für eine Transformation mittels Elektroporation (II.3.5) bestimmt waren, also die DNA physikalisch in die Zellen eingebracht werden sollte, beschreibt die folgende Methode lediglich, wie die Salze aus dem Medium nach der Anzucht der *E. coli*-Zellen herausgewaschen wurden, da eine Erhöhung der Leitfähigkeit zu einem Funkenschlag in der Küvette führen würde.

Zunächst wurde aus einer Glycerindauerkultur (II.3.3) etwas Material auf einer LB Agarplatte (II.3.1) ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Die Anzucht der *E. coli*-Vorkultur erfolgte in 20 ml LB Medium (Fertigmischung Lennox, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) üN bei 37 °C. Dann wurde 1 l LB-Medium mit der Vorkultur in einem 5 l Schikanekolben ca. 2 h bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 inkubiert. Bei dieser optischen Dichte befinden sich die Zellen noch in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Kultur wurde 30 min auf Eis abgekühlt und in 500 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4 °C und 5000 rpm (Typ J2-21, Rotor JA10, 17696 x g, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) und die Bakteriensedimente wurden in 1 l eiskaltem autoklaviertem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm wurden die Bakteriensedimente erneut in insgesamt 500 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und wiederum 15 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Für eine längerfristige Lagerung folgte ein erneutes Resuspendieren des Sediments in 50 ml eiskaltem autoklaviertem 10 %igen Glycerin und ein weiterer Zentrifugationsschritt von 30 min bei 4 °C und 5500 rpm (Typ J2-21, Rotor JA20, 12096 x g, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Nach einem Aufnehmen des Sediments in 3 ml Glycerin wurden jeweils 100 µl Zellsuspension in Reaktionsgefäßen (Nunc<sup>TM</sup>cryoTube<sup>TM</sup> vials, NuncA/S Roskilde, Dänemark) aliquotiert und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70 °C bis zur Transformation (II.3.5) aufbewahrt.

### II.3.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine der Möglichkeiten, um ringförmige DNA in *E. coli*-Zellen einzuschleusen. Durch einen kurzen elektrischen Impuls wird die Zellmembran temporär permeabilisiert und die DNA kann über Diffusion in die Zelle gelangen (Crowley, 1973; Neumann and Rosenheck, 1972; Weaver 2000; Zimmermann *et al.*, 1974; Tsong 1991). Für die Elektroporation wurden 50 µl elektrokompetente *E. coli*-Zellen (II.3.4) auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 1 µl Plasmid-DNA in einer vorgekühlten Küvette (Gene Pulser<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) vermischt und 2 min inkubiert. Der elektrische Impuls erfolgte in einem Elektroporator (Gene Pulser XCell<sup>™</sup>, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 2500 V, 25 µF und 200 Ω für 5 ms. Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtem SOC Medium für 1 h bei 37 °C vorsichtig rührend inkubiert. Jeweils 10 und 50 µl wurden dann auf LB-Amp Agarplatten (II.3.1) ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert.

#### SOC Medium

20,0 g Trypton

5,0 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

auffüllen auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O, pH 7,0 einstellen und nach dem Autoklavieren sterilfiltriertes 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Glucose dazugeben

### II.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um größere Mengen reiner Plasmid-DNA zu erhalten, wurden zunächst 5 ml 2 x YT Medium + Glucose und entsprechendem Antibiotikum mit etwas *E. coli*-Material von einer LB-Amp Platte (II.3.1) oder direkt aus der Glycerinkultur (II.3.3) beimpft und üN bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep-Kits (Qiagen, Hilden) oder des E.Z.N.A. Plasmid Mini Kits I (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Dazu wurden jeweils 3 ml der üN-Kultur bei 7000 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco oder Biofuge pico, Heraeus Holding GmbH, Hanau) zentrifugiert und nach dem Protokoll des Herstellers weiter verfahren.

## II.4. Proteinanalytische und proteinpräparative Methoden

### II.4.1 Proteinextraktion

Nach der Induktion der Proteinexpression in *E. coli* (II.3.2) wurden von der Kultur zunächst 100 µl abgenommen, 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer (II.3.2) vermischt und für den späteren Proteinnachweis (II.4.2) bei -20 °C aufbewahrt. Die Kultur wurde in 1 l Kunststoffflaschen (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) in einer Kühlzentrifuge (Typ Avanti™ J-20, Rotor JLA 8.1000, 6238 x g, Beckman Coulter GmbH) bei 5000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 50 % Ammoniumsulfat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) versetzt und bei 4 °C 4 h oder üN gerührt. Die hohe Salzkonzentration führt zu einem Verlust der Hydrathülle der Proteine, wodurch ihre hydrophoben Bestandteile aggregieren und die Proteine ausfallen (Englard und Seifter, 1990). Nach der Fällung wurde die Proteinlösung in 1 l Kunststoffflaschen in der Kühlzentrifuge bei 5000 rpm zentrifugiert und das Sediment in 100 ml 1 x PBS mit Hilfe einer 25 ml Kunststoffpipette resuspendiert, gegen 1 x PBS üN oder länger bei 4 °C dialysiert und die Proteinlösung bis zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (II.4.5) bei 4 °C aufbewahrt.

Das Bakteriensediment aus der Kultur wurde gewogen, mit 2 ml pro g Sediment MAPS®II Elutionspuffer (Bio-Rad Laboratories, München) und 2 ml pro g Sediment einer 10 mg/ml Polymyxin B Sulfatlösung (BioChemika, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) versetzt und 4 h bei 4 °C gerührt. Polymyxin B ist ein antimikrobielles Peptid und führt zu einer Permeabilisierung der äußeren Bakterienmembran und somit zum Zelltod (Palmer und Rifkind, 1974). Durch diese Behandlung gelangen Proteine aus dem periplasmatischen Raum in den Überstand des Extraktes. Die mit Polymyxin B behandelte Bakterienlösung wurde bei 5000 rpm und 4 °C (Zentrifuge Typ J2-21, Rotor JA14, 3836 x g, Beckman Coulter GmbH) zentrifugiert und das Extrakt bei 4 °C aufbewahrt. Diese Prozedur der Extraktion erfolgte jeweils dreimal, wobei mindestens eine der 3 Extraktionen üN durchgeführt werden sollte. Für eine längere Lagerung der Extrakte wurde 0,1 % NaN<sub>3</sub> und 5 mM EDTA zugefügt, um einer Proteindegradation vorzubeugen.

#### MAPS®II Elutionspuffer

2,2 g Elutionsreagenz (Bio-Rad Laboratories, München)

auffüllen auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O, pH 6,8 einstellen mit 1 M Tris

### II.4.2 Proteinnachweis über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ist eine Standardmethode zur Auftrennung von Proteinen einer Probe nach ihrem Molekulargewicht. Am häufigsten wird das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) mit Tris-Glycin-Puffern eingesetzt. Als Gelmatrix verwendet man Acrylamid, das durch radikalische Polymerisation mit bifunktionellem N,N'-Methylen-bis-acrylamid quervernetzt wird. Die Polymerisation des Gels wird durch Ammoniumpersulfat (APS) ausgelöst, als Katalysator dient dabei N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Weiterhin wird Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Denaturierung der Proteine zugesetzt. SDS bindet Proteine und sorgt dafür, dass alle ein konstantes Ladungs-/Masseverhältnis besitzen, damit die Wanderungsgeschwindigkeit ausschließlich von der Proteingröße abhängt.

In der vorliegenden Arbeit fanden 4 % Acrylamid-Sammelgele und 12,5 % Acrylamid-Trenngele Anwendung, deren Herstellung erfolgte mit Hilfe einer Gießapparatur (Bio-Rad Laboratories, München). Dazu wurden die Glasplatten zunächst mit 96 % Ethanol gereinigt und die Apparatur laut Herstellerangaben aufgebaut. Acrylamid (Bio-Rad Laboratories), Trispuffer und H<sub>2</sub>O des Trenngels (Tab. 11) wurden gemischt und 5 min mit einer Wasserstrahlpumpe unter Vakuum entgast. Nach Zugabe von SDS, APS und Temed (Bio-Rad Laboratories) erfolgte ein zügiges luftblasenfreies Pipettieren zwischen die Glasplatten. Die Gele wurden mit 96 % Ethanol überschichtet, um ein Austrocknen der Ränder zu verhindern. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels (ca. 20 min), wurde das Ethanol abgegossen und das Sammelgel (Tab. 11) ebenso hergestellt. Dies wurde dann ebenfalls zwischen die Glasplatten pipettiert und die Kämme eingesetzt. Nach erneuter Polymerisation von 20 min wurden die Gele in die Elektrophoresekammer (Mini Protean II™, Bio-Rad Laboratories) eingesetzt, die Kammer mit SDS-Laufpuffer befüllt, die Kämme entfernt und die Geltaschen mit Puffer ausgespült.

Für das Auftragen der Proteinproben auf das Acrylamid-Gel wurden jeweils 15 µl Proteinlösung 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer vermischt und für 5 min im Wasserbad aufgeköcht. Davon wurden dann jeweils 20 µl in die Geltaschen pipettiert. Auf jedes Gel wurden jeweils 3,5 µl eines Proteinstandards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit Hilfe eines Netzgerätes (Typ PowerPAC 200 oder 300, Bio-Rad Laboratories) anfangs bei 100 V und nachdem das Bromphenolblau das Trenngel erreicht hat bei 150 V. Die

## MATERIAL UND METHODEN

---

Proteingele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau R-250 gefärbt oder die Proteine auf eine PVDF-Membran (II.4.3) übertragen.

### SDS-PAGE Laufpuffer

15 g Tris (Pufferan® >99,9 % p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

72 g Glycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

0,5 % SDS (Electrophoresis purity, Bio-Rad Laboratories, München)

auffüllen auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O

### 2 x SDS-Probenpuffer

122 mM Tris-HCl

4 % SDS

20 % Glycerin

15 % Bromphenolblau (Merck KGaA, Darmstadt)

### 10 % APS-Lösung

Lösung aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren

### Proteinstandard

Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range (Bio-Rad Laboratories)

Proteingrößen: Phosphorylase (106,488 kDa), BSA (97,599 kDa), Ovalbumin (50,238 kDa), carbonische Anhydrase (36,899 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (28,878 kDa), Lysozym (19,893 kDa)

Bestandteile	für 10 ml eines 12,5 %igen Trenngels [µl]	für 7,5 ml eines 4 %igen Sammelgels [µl]
H <sub>2</sub> O	3230	4500
30 % Acrylamid/Bis	4120	1000
1,5 M Tris pH 8,8	2500	----
0,5 M Tris pH 6,8	----	1900
10 % SDS	100	80
10 % APS	50	40
Temed	5	8

**Tab. 9:** Zusammensetzung für zwei Polyacrylamidgelle.

### **Proteinnachweis durch Coomassie Blau-Färbung**

Durch die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250 können Proteine im Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden. Der Coomassie-Farbstoff dringt in die Zwischenräume von Proteinen ein und lagert sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an. Die Färbung erfolgte für 30 min unter leichtem

Schwenken bei RT. Da der Farbstoff in das gesamte Gel eindringt, wurde die Hintergrundfärbung herausgewaschen, indem das Gel für 2 h in Entfärberlösung schüttelnd inkubiert wurde. Zur Aufbewahrung und Dokumentation des Gels wurde dies für 30 min in Konservierungslösung geschwenkt und in Trocknungsfolien (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) mit Hilfe von Trocknungsrahmen eingepackt.

### Coomassie Brilliant Blue R-250

2 g Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blau R-250 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

40 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

auf 1000 ml auffüllen mit H<sub>2</sub>O

### Entfärberlösung

30 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt)

### Konservierungslösung

22 % (v/v) Ethanol

5 % (v/v) Glycerin aus Pflanzen (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

## **SDS-PAGE mit dem PhastSystem**

Um ein schnelles Ergebnis des Proteinnachweises über SDS-PAGE zu erzielen, bot sich das PhastSystem an. Dies ist ein automatisiertes System zum Auftrennen von Proteinlösungen mit integrierter Färbekammer (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden).

### Coomassie Färbelösung

1 Tablette PhastGel<sup>™</sup>BlueR (Coomassie R350, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden)

auffüllen auf 80 ml mit H<sub>2</sub>O

120 ml Methanol

22 ml Essigsäure

auf 1000 ml auffüllen mit H<sub>2</sub>O und filtrieren (Faltenfilter 595, 240 mm, Schleicher und Schuell, Dassel)

### Entfärberlösung

30 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt)

### Konservierungslösung

10 % (v/v) Essigsäure

5 % (v/v) Glycerin aus Pflanzen (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

### **II.4.3 Proteinnachweis mittels Dot- und Western Blot**

Das Immunblotting ist eine gängige Methode, um spezifisch Proteine nachzuweisen, die zuvor auf eine Membran übertragen wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membranen verwendet (Gültekin und Heermann, 1988). Der Dot Blot macht es möglich, auf schnelle Art und Weise ein bestimmtes Protein zu detektieren, indem die Proteinlösung direkt als Dot auf die Membran aufgetragen wird. Bei dieser Methode kann ausschließlich das Vorhandensein des gesuchten Proteins nachgewiesen werden, jedoch ist keine Bestimmung des Molekulargewichts möglich. Beim Western Blot wird zunächst eine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE durchgeführt (II.4.2). Anschließend überträgt man die Proteine auf die Membran, wodurch die Größe der Proteine mit Hilfe des Proteinstandards bestimmt werden kann.

### Dot Blot

Der Dot Blot wurde dazu verwendet, das gewünschte Protein in den Fraktionen einer Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie (II.4.5) zu detektieren. Je nach Konzentration der Proteinproben wurden jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen und jeweils 50 und 100 µl der Durchlauf- und Waschfraktion direkt auf eine PVDF-Membran (Immun-Blot™ 0,2 µm, Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen, die zuvor kurz in Methanol eingetaucht und mit H<sub>2</sub>O gespült wurde. Die feuchte Membran wurde auf ein Filterpapier gelegt und mit Hilfe des Minifold I Dot Blot- Systems (SRC 96, Whatman / Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel) und einer Wasserstrahlpumpe die Flüssigkeit der Proben in die Membran gesaugt. Anschließend erfolgte eine Blockierung der Membran für 30 min in 1 % BSA (PAA Laboratories GmbH, Pasching) in TBST-Puffer (Tris-NaCl-Tween 20) + 0,01 % NaN<sub>3</sub> (Merck), um die freien Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Spezifische Antikörper erlauben nun eine Identifizierung des gewünschten Proteins. In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine entsprechende Sequenz in der multiplen Klonierungsstelle (MCS: multiple cloning site) des pSJF8-Vektors (II.1.2) am C-Terminus der scFv-Antikörpergene ein c-Myc-Tag angefügt. Die

Detektion der scFv erfolgte über einen anti-c-Myc-Antikörper (humaner monoklonaler Antikörper aus Ascitesüberstand einer Maus, 1:50 verdünnt in TBST-Puffer, Dr. C. R. MacKenzie, National Research Council, Ottawa, Kanada), der für 1 h oder üN bei 4 °C in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST-Puffer mit der Membran inkubiert wurde. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einem AP-(alkalische Phosphatase) konjugierten sekundären Antikörper (AffiniPure Goat anti-mouse IgG H+L, 0,6 mg/ml, Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova Hamburg) in einer Konzentration von 1:1000 in TBST-Puffer. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer für jeweils 5 min wurde die Membran mit dem Substrat für die alkalische Phosphatase inkubiert (je 100 µl Lösung A und B des AP Conjugate Substrate Kit in 10 ml AP-Entwicklungspuffer, Bio-Rad Laboratories, München). Die durch die alkalische Phosphatase katalysierte Umsetzung des Substrates BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) wird in einer blau-violetten Ablagerung an den Reaktionsstellen sichtbar ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Die Reaktion wurde nach 4 min mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Alle hier aufgeführten Inkubations- und Waschschrte wurden, wenn nicht anders angegeben, unter leichtem Schütteln bei RT durchgeführt.

### TBST- (tris buffered saline Tween 20) Puffer

500 mM NaCl

20 mM Tris pH 7,5 (Pufferan<sup>®</sup> > 99,9 % p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

0,05 % Tween 20

### Western Blot

Der Western Blot diente in der vorliegenden Arbeit der Detektion der ScFv nach einer Kultivierung. Nach der SDS-PAGE (II.4.2) zur Auftrennung der Proteine aus der Kultur, wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen, welche ebenso vorbehandelt wurde wie beim Dot Blot. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Polyacrylamid-Gel gelegt und zwischen zwei mit TBST-Puffer getränkten Filterpapieren in eine Bio-Rad Mini Protean II<sup>™</sup> Apparatur für Western Blots eingehängt. Der Transfer erfolgte für 30 min bei 100 V in Transferpuffer. Im Anschluss daran wurde die Membran, wie beim Dot Blot, blockiert, mit dem primären und sekundären Antikörper inkubiert, sowie die Farbreaktion durch die Entwicklung mit dem Substrat für die alkalische Phosphatase eingeleitet.

### Transferpuffer

25 mM Tris (Pufferan® >99,9 % p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

192 mM Glycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

4 % Methanol

pH 8,2 einstellen

### **II.4.4 Dialyse von Proteinlösungen für die Affinitätschromatographie**

Mit Hilfe der Dialyse durch eine semipermeable Membran können Lösungen und Puffer ausgetauscht bzw. störende kleinere Moleküle aus einer Lösung entfernt werden. Für die Proteinaufreinigung über Nickel-Affinitätschromatographie (II.4.5) war es erforderlich, die Proteinlösungen nach einer Proteinextraktion (II.4.1) mindestens dreimal gegen 1 x PBS pH 7,2 (II.4.5) jeweils 4 h oder  $\infty$  zu dialysieren, da der MAPS®II Elutionspuffer zu einer Elution der Nickelionen führen würde. Auch der gefällte Überstand (II.4.1) wurde mindestens 1 x  $\infty$  ebenso dialysiert, um eine große Menge des Kulturmediums zu entfernen. So wird einem Verstopfen der Matrix vorgebeugt. Es fanden Dialyseschläuche mit einer 10 kDa-Ausschlussgröße Anwendung (ZelluTrans, Carl Roth GmbH, Karlsruhe), die zuvor für 10 min in 2 % Natriumhydrogencarbonat mit 1 mM EDTA und im Anschluss nochmals 10 min in H<sub>2</sub>O gekocht. Aufbewahrt wurden die Schläuche in 0,1 % Natriumazid bei 4 °C.

### **II.4.5 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie ist eine der vielen Möglichkeiten das gewünschte Protein von anderen im Gemisch enthaltenen Proteinen zu trennen. Porath *et al.* führte 1975 erstmals die Metall-Affinitätschromatographie (IMAC: Immobilized Metal Affinity Chromatography) ein. Hier können Proteine erfasst werden, die einen Polyhistidin (His)-Tag tragen. Die Methode basiert auf der Fähigkeit der Histidine aufgrund ihrer Elektronendonorguppen im Imidazolring mit Metallionen, wie z. B. Nickel, Cobalt, Zink, Eisen oder Kupfer, die als Chelatkomplexe an einer Matrix gebunden sind, zu interagieren (Terpe, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der pSJF8-Expressionsvektor verwendet (II.1.2), der am C-Terminus der scFv-Antikörpergene ein His<sub>(5)</sub>-Tag anfügt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte dann mit Hilfe von vorgefertigten Affinitätssäulen

(5 ml HisTrap<sup>TM</sup>HP, 5 ml HiTrap Chelating HP oder 1 ml HisTrap<sup>TM</sup>FF crude, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden). Die Säulen enthalten eine Sepharose<sup>TM</sup> Matrix, die mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladen werden kann. Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4 °C mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Typ Pump P-500, Liquid Chromatography Controller LCC-500, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Mit dieser Anlage können während des Probendurchfließens mit Hilfe der UV-Einheit (UV-MII, GE Healthcare Biosciences AB) Proteine bei 280 nm detektiert werden, was sich in einer Veränderung der Basislinie bemerkbar macht. Dies wird durch einen Schreiber (2210 Recorder 2-Channel) dokumentiert. Dieser lief mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min. Alle an der FPLC-Anlage verwendeten Puffer wurden durch Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Membranfilter Whatman<sup>®</sup>, Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel) filtriert und 10 min mit Helium entgast. Nach dem Waschen der Matrix mit 5 x Vol. H<sub>2</sub>O bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde diese mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladen, indem eine 21 mM NiCl<sub>2</sub>-Lösung (NiCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O, Merck) über die Säule gegeben wurde. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift in gleicher Weise. Für die Aufreinigung der His-Tag- Proteine wurde die Matrix der Affinitätssäule mit Laufpuffer (Puffer A + 2 % Puffer B) äquilibriert bis eine stabile Basislinie erreicht war. Imidazol diente während der gesamten Aufreinigung der Minimierung unspezifischer Bindung an der Matrix. Die dialysierte Proteinlösung (II.4.4) wurde nach mindestens 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm (Zentrifuge Typ J2-21, Rotor JA14, 30074 x g, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bei 0,5 ml/min oder üN mit weniger Flussrate über die Affinitätssäule gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen. Danach erfolgte ein Waschen der Säule bei 1 ml/min mit Laufpuffer, der Durchlauf wurde hier ebenfalls aufgefangen. Die Elution erfolgte bei 0,5 ml/min Flussrate mit einem Imidazol-Gradienten von 10 bis 500 mM innerhalb von 45 min. Imidazol besteht, genau wie Histidin, aus einem Indolring, wobei der Stickstoff aufgrund der freien Elektronen Bindungen mit den Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Matrix eingehen kann. Auf diese Weise konkurriert Imidazol mit dem His-Tag um die Nickel-Chelat-Bindungsstellen, was zu einer Elution der Histidinreste von der Matrix führt (Rehm, 2002). Der Gradient beinhaltete im Anschluss ein Absinken der Puffer B-Konzentration auf 2 % innerhalb von 15 min, sodass wieder eine stabile Basislinie erreicht wurde. Die Fraktionen der Elution wurden in einem Fraktionssammler (Fraction Collector Frac-100) in einem Volumen von jeweils 0,5 ml aufgefangen, um sie später weiter zu analysieren. Um die Affinitätssäulen für die Aufreinigung von anderen Proteinen zu

verwenden, wurden diese mit 50 mM EDTA für 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min gespült und anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Durch das EDTA werden die Ni<sup>2+</sup>-Ionen und somit alle gebundenen Proteinreste von der Matrix gewaschen, die Säulen konnten dann wieder neu mit Nickel beladen werden.

### Puffer A: 1 x PBS pH 7,2

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24 g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

auffüllen auf 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,2 einstellen mit 25 % HCl

### Puffer B: 1 x PBS pH 7,2 + 500 mM Imidazol

Imidazol (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

## **II.4.6 Proteinreinigung mittels Größenausschlusschromatographie**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gelfiltration angewendet, um Proteine nach der Größe zu trennen oder einen Pufferwechsel vorzunehmen. Es kam eine HiLoad<sup>TM</sup>16/60 Superdex<sup>TM</sup> 75 prep grade- Säule (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) zum Einsatz. Die Probe wurde mit Hilfe einer FPLC-Anlage (II.4.5 oder Äkta Prime Plus + Rec 112, GE Healthcare Biosciences AB) über eine 4 oder 5 ml-Schleife auf die Säule aufgetragen. Große Moleküle laufen schneller durch die Matrix, kleine Moleküle hingegen durchwandern deren Zwischenräume und eluieren daher später. Alle an der FPLC-Anlage verwendeten Puffer wurden durch Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Membranfilter Whatman<sup>®</sup>, Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel) filtriert und 10 min mit Helium entgast. Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4 °C und einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Nach der Äquilibration der Säulenmatrix mit mindestens 150 ml Laufpuffer (1 x PBS pH 7,2, II.4.5 oder 1 x HBS-EP pH 7,2 II.5.4) bis zu einer stabilen Basislinie, erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation der Probe bei 4 °C und 13000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge fresco, 16060 x g, Heraeus Holding GmbH, Hanau). Dann wurde sie über die Schleife auf die Säule aufgetragen und jeweils 1 ml-Fractionen für eine spätere Analyse aufgefangen. Eine langfristige Aufbewahrung der Proteinlösungen erfolgte bei 4 °C oder - 20 °C nach Zugabe von 0,05 % NaN<sub>3</sub> (Merck KGaA, Darmstadt) und 5 mM EDTA.

### II.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem Photometer (Typ Helios  $\beta$ , Thermo Electron Corporation, Cambridge, Großbritannien) gegen einen entsprechenden Pufferblindwert in einer Quarzküvette (10 mm, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) gemessen. Aus der optischen Dichte kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  -anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes ( $E = \epsilon * C * d$ )-, die molare Konzentration  $C$  und dann über das Molekulargewicht die Konzentration, die der Extinktion entspricht, berechnet werden. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  wird dabei für jedes Protein individuell aus der Addition der Extinktionskoeffizienten für Tryptophan, Tyrosin und Cystein bei 280 nm multipliziert mit der Anzahl dieser Aminosäuren in der Sequenz bestimmt.

### II.4.8 Konzentrierung von Proteinlösungen

Für einige Experimente war es notwendig, die Proteinlösungen einzuengen. Dies geschah mit Hilfe von Mikrokonzentratoren (Centriprep YM-10, Amicon, Millipore, Irland) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Zentrifugiert wurde je nach gewünschter Volumeneinengung mehrere Male für 15 min bei 2800 rpm (1142 x g, Zentrifuge Hettich Rotixa/KS, Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen).

### II.4.9 Reinigung des monoklonalen Antikörpers S45-18

Für die Herstellung von Fab-Fragmenten (II.4.11) sollte zunächst der mAk S45-18 aus Hybridoma-Kulturüberstand (II.1.4) über Affinitäts-chromatographie gereinigt werden. Hierfür wurde eine Säule mit einer AH-Sepharose 4B-Matrix verwendet, an die HSBP (II.1.3) über die Glutardialdehyd-Methode (Brade *et al.*, 2002) konjugiert war. Das HSBP wird vom S45-18 gebunden und der Antikörper kann nun auf diese Weise von anderen Proteinen im Überstand getrennt werden. Alle Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4 °C. Zunächst wurden 20 ml Überstand im Verhältnis 1:15 in Laufpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5) verdünnt und ein 100  $\mu$ l-Aliquot für einen späteren ELISA-Test abgenommen. Die Antikörperlösung wurde dann an einer FPLC-Anlage (II.4.5) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min über die in Laufpuffer äquilibrierte Affinitätssäule

gegeben, wobei der Durchlauf für spätere Tests in 5 ml-Fractionen aufgefangen und dessen optische Dichte über den Detektor und den Schreiber (II.4.5) dokumentiert wurde. Die Säule wurde dann bei 1 ml/min mit 80 ml Laufpuffer und 80 ml Laufpuffer + 200 mM NaCl gewaschen und jeweils 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Elution des Proteins erfolgte mit 20 ml 0,1 M Glycin-HCl pH 3,2 und 10 ml 0,1 M Glycin-HCl pH 2,7 bei 0,5 ml/min. Hier wurden 1 ml-Fractionen aufgefangen. Um die Stabilität des Antikörpers nicht zu gefährden, wurden die Fractionen sofort auf einen pH-Wert von 4,0 mit Hilfe von 1 M NaHCO<sub>3</sub> eingestellt. Im Anschluss wurde die Säule mit 20 ml 0,1 M Glycin-HCl pH 2,7, 20 ml 0,1 M Glycin-HCl pH 2,3 und 20 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 x PBS pH 7,2 (II.4.5) + 0,02 % NaN<sub>3</sub> bei 4 °C gelagert.

### **II.4.10 Quantitative photometrische BCA-Proteinbestimmung des S45-18**

Dieser Proteinassay nutzt die Fähigkeit der Proteine Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu reduzieren. Die dabei entstehenden Cu<sup>1+</sup>-Ionen reagieren mit dem BCA in der Lösung zu einer violetten Komplexverbindung. Die Absorption des Farbkomplexes kann dann mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen werden. Dabei entspricht die Intensität des Farbstoffes direkt der Konzentration der reagierenden Gruppen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe aus Ratten-IgG (2 mg/ml in 0,1 M Glycin pH 5,0, Sigma St. Louis, USA) in H<sub>2</sub>O nach 5-minütigem Ultraschallen hergestellt und 8 Konzentrationen von 2,5 bis 20 µg/Vertiefung in einem Volumen von 10 µl in eine 96 well-Flachbodenplatte (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden) als Doppelbestimmung pipettiert. Das Auftragen der Fractionen aus der Proteinaufreinigung (II.4.9) erfolgte in Einpunktdoppelbestimmungen unverdünnt in einem Volumen von 10 µl. Als Blindwert diente eine Vertiefung der Platte ohne Protein nur mit 10 µl H<sub>2</sub>O als Probe. Nun wurden 50 Vol. BCA<sup>TM</sup>Protein Assay-Reagenz A mit 1 Vol. BCA<sup>TM</sup>Protein Assay-Reagenz B (Pierce: Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) gemischt und jeweils 200 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 550 nm (Testfilter) und 630 nm (Referenzfilter) mit einem Mikrotiterplatten-Filterphotometer (ELISA Reader Dynatech MR 5000, Dynatech Denkendorf). Eine Berechnung der Proteinkonzentration der Proben ist dann anhand der Standardkurve möglich. Fractionen mit einer Proteinkonzentration von über 100 ng/ml wurden vereinigt, aufgrund der geringen Stabilität des S45-18 Antikörpers

in neutralem Milieu gegen 10 mM Natriumacetat pH 4,5 dialysiert und bei 4 °C aufbewahrt.

### **II.4.11 Herstellung von S45-18 Fab-Fragmenten mittels Papain Digestion**

Aus dem gereinigten monoklonalen Antikörper S45-18 (II.4.9, II.4.10) sollten mit Hilfe der Cysteinprotease Papain, welche die Disulfidbrücken des Antikörpers spaltet, Fab-Fragmente hergestellt werden. Nach der Reinigung und Proteinbestimmung des mAk S45-18 erfolgte der Papain-Verdau nach Parham *et al.* (1982) mit einigen Modifikationen. In eine konzentrierte Antikörperlösung (mind. 3 mg/ml) wurde Papain (aus *Papaya latex* in 0,05 M Natriumacetat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) im Verhältnis 1:50 zur Antikörperkonzentration gegeben. Der Aktivierung des Papains diene die Zugabe von 1 mM Endkonzentration DTT (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) sowie 1 mM Endkonzentration EDTA. Der pH-Wert des Gemisches sollte bei pH 5,5 liegen. Die Lösung wurde dann für 5 h im 37 °C Wasserbad inkubiert und die Reaktion anschließend mit 30 mM Endkonzentration Iodacetamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gestoppt. Der Erfolg des proteolytischen Verdauens wurde dann auf einem SDS-Gel (II.4.2) kontrolliert, auch unter reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von 30 mM Endkonzentration DTT pro Probe.

### **II.4.12 Reinigung von S45-18 Fab-Fragmenten nach dem Papain-Verdau**

Für eine korrekte Proteinbestimmung der S45-18 Fab-Fragmente nach der Papain Digestion (II.4.11) sollte nun der Fc-Teil abgetrennt werden. Dies kann über eine Anionenaustauscher-Chromatographie realisiert werden. Die Trennung der Proteine basiert dabei auf deren Ladung (Rossomando, 1990; Choudhary und Horvath, 1996). In der vorliegenden Arbeit fand eine fertige Säule mit einer DEAE-Sepharosematrix Anwendung (HiTrap<sup>TM</sup> 1 ml DEAE FF, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden). DEAE ist eine Agarose mit kationischen Diethylaminoethylgruppen. Über elektrostatische Wechselwirkungen können nun bei einer schwachen Ionenstärke des Puffers negativ geladene Proteine an die Matrix binden. Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll von Liu *et al.* (1999). Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C mit Hilfe einer FPLC-Anlage (II.4.5) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Dialyse des Papain-Verdauens aus II.4.11 gegen

den Laufpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0). Diese wurde dann bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die in Laufpuffer äquilibrierte Säule gegeben und der Durchlauf in 1 ml-Fractionen gesammelt. Dann folgte ein Waschschrift mit dem Laufpuffer bis wieder eine stabile Basislinie erreicht war. Die Elution der Proteine von der Säulenmatrix wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 mM NaCl im Laufpuffer innerhalb von 60 min erreicht. Mit steigender Salzkonzentration konkurrieren die negativ geladenen Ionen des Puffers mit den Proteinmolekülen und entlassen diese von der Matrix. Die Elutionsfraktionen wurden in einem Volumen von 1 ml für eine spätere Analyse aufgefangen.

### **II.5. Nachweis der Aktivität von Antikörpern und Antikörperfragmenten**

Um zu gewährleisten, dass die Bindungstests ausschließlich mit monovalenten scFv- und Fab-Antikörper erfolgten, wurden diese direkt vor den Experimenten über Gelfiltration gereinigt (II.4.6) und im Bindungsexperiment nur Fraktionen des hinteren Peakabschnittes verwendet.

#### **II.5.1 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz (IF) dient dem Nachweis bakterieller Erreger mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern. Es wurden Mikrotiterplatten (96 well-Flachbodenplatte, Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden) verwendet (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Brade), auf denen Chlamydien (II.1.1)-infizierte Zellmonolayer aus Mausfibroblasten (L929-Zellen) sowie HL-Zellen (humane Zelllinie aus Hodgkin Lymphom) immobilisiert waren (Protokoll nach Müller-Loennies *et al.*, 2006). Jeweils 3 Reihen mit je 12 Vertiefungen der Mikrotiterplatte enthielten HL-Zellen, wobei 2 Reihen davon mit Elementarkörper von *C. pneumoniae* TW-183 inokuliert waren. Die dritte Reihe wurde nicht infiziert und diente im Fluoreszenzversuch als Negativkontrolle. 5 Reihen der Mikrotiterplatte waren mit der L929-Zelllinie beschichtet, wobei je 2 davon mit *C. trachomatis* L<sub>2</sub> und *C. psittaci* 6BC inokuliert waren. Eine L929-Reihe blieb ebenfalls als Negativkontrolle frei. Für den Fluoreszenzversuch wurde zunächst das Methanol abgekippt und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte 3 x 5 min mit 1 x PBS pH 7,2 (II.4.5) vorsichtig schüttelnd gewaschen. Das Auftragen des zu untersuchenden Antikörpers in die

Vertiefungen der Platte erfolgte in einem Vol. von 100  $\mu$ l einer 1:1-Verdünnungsreihe von 0,6 und 40  $\mu$ g/ml in 1 x PBS pH 7,2. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C ohne Schütteln wurde erneut 6 x 5 min mit 1 x PBS pH 7,2 gewaschen. Der Nachweis der Antikörper erfolgte über eine 1-stündige Inkubation bei 37 °C mit 100  $\mu$ l/Vertiefung eines anti-c-Myc Antikörpers (II.4.3, Ascites Dr. C. R. MacKenzie) in einer Verdünnung von 1:50 in 1 x PBS pH 7,2 mit einem anschließenden Waschschrift. Nun wurde ein FITC- (Fluorescein-Isothiocyanat) markierter Antikörper (AffiniPure Goat anti-mouse IgG H+L~FITC, 1,5 mg/ml, Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova Hamburg) in 1 x PBS pH 7,2 1:50 in einem Vol. von 100  $\mu$ l/Vertiefung dazugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Bei einem Nachweis von Fab-Fragmenten ist die Inkubation mit dem anti-c-Myc Antikörper nicht notwendig, da der FITC-Antikörper direkt bindet. Nach dem Waschen erfolgte eine Zugabe von je 200  $\mu$ l 1 x PBS pH 7,2 in die Vertiefungen und die Dokumentation unter einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot 300, Kamera: Polaroid DMC2 Digital Microscope Camera, Software-Version V2.01).

### **II.5.2 Beschichten von Mikrotiterplatten mit einem Liganden**

Um die Antikörper in ELISA-Bindungsstudien zu untersuchen, wurden entsprechende Liganden in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten immobilisiert. Proteine, wie das BSA der Neoglycokonjugate (II.1.3), adsorbieren aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an die unpolare Kunststoff-Oberfläche. In der vorliegenden Arbeit wurden neben Neoglycokonjugaten auch Elementarkörper von Chlamydien (II.1.2) als Liganden auf Mikrotiterplatten (96 well MaxiSorp, U-Form, Sarstedt, Nümbrecht) gebunden.

#### Immobilisierung von Elementarkörper von Chlamydien

Die Elementarkörper von Chlamydien wurden nach einer 5-minütigen Behandlung im Ultraschallbad in 50 mM Carbonatpuffer auf eine Konzentration von 5  $\mu$ l/ml verdünnt und jeweils 50  $\mu$ l in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Eine Vertiefung pro Platte blieb frei für den späteren Blindwert. Danach folgte eine Inkubationszeit von 2 d bei 4 °C in einer feuchten Umgebung. Die Platten wurden nach der Inkubation mit den Elementarkörpern zweimal mit PBS-Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 h bei 37 °C mit Blockierungslösung inkubiert. Dabei war zu beachten, dass die Vertiefungen

vollständig gefüllt sind (200 µl/Vertiefung), um alle freien Bindungsstellen abzusättigen. Nach einmaligem Waschen mit PBS-Waschpuffer wurden die Mikrotiterplatten für 10 min mit 20 % (v/v) Sorbitol (Sorbisirup, Bernd Kraft GmbH, Duisburg) + 0,01 % (w) Thimerosal (Merck KGaA, Darmstadt) behandelt, die Flüssigkeit vollständig ausgeschlagen und für eine längerfristige Lagerung 1 h bei RT und eine weitere Stunde bei 37 °C getrocknet. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte luftdicht verschlossen in einer Aluminiumtüte mit einer Trocknungspappe bei 4 °C. Alle Waschschritte wurden mit Hilfe eines automatisierten Waschgeräts (PW 96 v2.20-Tecan, Tecan GmbH, Crailsheim) durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit und höchste Genauigkeit zu gewährleisten. Das exakte Beladen der Vertiefungen erfolgte mit Hilfe einer Multipette<sup>®</sup>pro (Eppendorf AG, Hamburg).

### Carbonatpuffer

1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,75 frisch ansetzen  
1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 12 frisch ansetzen  
beide Lösungen 1:20 auf 50 mM verdünnen  
50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9,2 einstellen mit 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,01 % (w)Thimerosal (Merck KGaA, Darmstadt)  
sterilfiltrieren

### PBS-Waschpuffer

136,9 mM NaCl  
2,68 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
auf pH 7,2 einstellen mit 500 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01 % (w)Thimerosal (Merck KGaA, Darmstadt)

### Blockierungslösung

25 mg Casein (Sigma St. Louis, USA) in 400 ml 300mM NaOH lösen  
pH 7,5 einstellen mit 25 % HCl  
1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7,3 exakt einstellen tropfenweise mit 25 % HCl  
0,01 % (w)Thimerosal (Merck KGaA, Darmstadt)  
auffüllen auf 1000 ml

### Immobilisierung von Neoglykokonjugaten

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Neoglykokonjugaten (II.1.3) erfolgte auf gleiche Weise wie für die Elementarkörper beschrieben. Die Konjugate wurden vor Gebrauch 5 min ins Ultraschallbad getan, in entsprechender Konzentration (10 – 50 pmol/Vertiefung) basierend auf der Menge der Liganden in dem Glykokonjugat in Carbonatpuffer verdünnt und jeweils 50 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Für alle weiteren Schritte wurden im Gegensatz zur Immobilisierung mit Chlamydien PBS-Waschpuffer und die Blockierungslösung mit 0,05 % (w) Tween 20 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet.

### **II.5.3 ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay)**

Die Methode, die als ELISA bekannt ist, wurde 1971 von Engvall und Perlmann eingeführt. Zeitgleich entwickelten Van Weemen und Schuurs den EIA (Enzyme Immuno Assay). Diese Methoden dienen dem Nachweis von sich in einer Lösung befindenden Antikörpern gegen definierte Antigene, die an der Kunststoff-Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden sind (II.5.2).

#### EB-ELISA

Die mit den Elementarkörpern von Chlamydien beschichteten Platten aus II.5.2 wurden zunächst zweimal mit PBS-Waschpuffer gewaschen und für 10 min mit demselben Puffer inkubiert, um das Sorbitol herauszuwaschen. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurde der zu untersuchende Antikörper in gewünschter Startkonzentration in jeweils 50 µl ELISA-Probenpuffer direkt auf der Platte 1:1 von Vertiefung zu Vertiefung verdünnt oder die Verdünnungsreihe zuvor in 5 ml- Reagenzgläsern angesetzt und mit Hilfe der Multipette®pro (Eppendorf AG, Hamburg) in die Vertiefungen pipettiert. Es folgte ein Inkubationsschritt von 1 h bei 37 °C im Brutschrank schwenkend in einer feuchten Kammer. Die Platten wurden anschließend zweimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Für den Nachweis der scFv-Antikörper wurde hier ein weiterer Schritt eingefügt, in welchem 1 h bei 37 °C in der feuchten Kammer mit einem anti-c-Myc Antikörper (II.4.3) in einer Verdünnung von 1:1000 in ELISA-Probenpuffer jeweils 50 µl/Vertiefung inkubiert und im Anschluss wiederum gewaschen wurde. Als sekundärer Antikörper diente

ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter IgG (AffiniPure Goat anti-mouse IgG-HRP H+L, 0,8 mg/ml, Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova, Hamburg), der für 1 h bei 37 °C in der feuchten Kammer in einer Konzentration von 1:1000 in ELISA-Probenpuffer jeweils 50 µl/Vertiefung inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe des frisch angesetzten Peroxidase-Substrats ABTS in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung und ein Inkubationsschritt von 30 min leicht schwenkend im 37 °C Brutschrank in der feuchten Kammer. Die von der Peroxidase katalysierte Oxidation von ABTS in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu einer stabilen grünen Färbung (Gallati, 1979). Die Reaktion wurde mit 50 µl/Vertiefung 2 % (w/v) Oxalsäure (Oxalsäure-Dihydrat, Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz) gestoppt und die Extinktion in einem Mikrotiterplatten-Filterphotometer (ELISA Reader Sunrise Tecan, Tecan GmbH, Crailsheim) bei 405 nm (Testfilter) und 490 nm (Referenzfilter) gemessen. Als Blindwert diente eine Vertiefung der Platte, die keinen Kontakt zum Antigen hatte und ausschließlich mit dem Substrat und der Oxalsäure befüllt war. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne den zu untersuchenden Antikörper sowie solche ohne anti-c-Myc Antikörper. Für alle Waschschritte wurde wie in II.5.2 das automatisierte Waschgerät (PW 96 v2.20-Tecan, Tecan GmbH, Crailsheim) verwendet.

### Konjugat-ELISA

Der Nachweis von Antikörpern gegen Neoglycokonjugate (II.1.3), die auf Mikrotiterplatten immobilisiert waren (II.5.2), wurde in gleicher Weise wie der EB-ELISA durchgeführt mit dem Unterschied, dass der PBS-Waschpuffer sowie der ELISA-Probenpuffer 0,05 % (w) Tween 20 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) beinhaltete.

### PBS-Waschpuffer siehe II.5.2

### ELISA-Probenpuffer

Blockierungslösung (II.5.2) + 5 % BSA (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

### Peroxidase- Substrat

1 mg/ml (w/v) ABTS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in Citratpuffer

3 min ins Ultraschallbad

+ 25 µl 0,1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn)

### Citratpuffer

100 mM Na-Citrat (tri-Natriumcitrat-dihydrat, Merck)  
pH 4,5 einstellen mit 2,5 M Zitronensäure-Monohydrat (Merck)

### **II.5.4 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)**

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR - Surface Plasmon Resonance) können molekulare Interaktionen in Echtzeit untersucht und Bindungsaffinitäten ermittelt werden (I.5). In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionen zwischen Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten und Neoglykokonjugaten (II.1.3) mit Hilfe eines Biacore T100 Biosensors (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) untersucht. Die Durchführung aller Experimente am T100 erfolgte bei 25 °C in Biacore-Laufpuffer, der vor Gebrauch sterilfiltriert und mindestens 30 min über Vakuum oder Ultraschall entgast wurde.

### BIAcore-Laufpuffer

1 x HBS-EP pH 7,4 (BIAcore, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden)  
enthält 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Surfactant P20, 3 mM EDTA

### Immobilisierung von Proteinen auf der Sensorchip-Oberfläche

In der vorliegenden Arbeit wurden CM5-Sensorchips (research grade, BIAcore, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Diese bestehen laut Herstellerangaben aus einer carboxymethylierten Dextranschicht, die über Thiol-Spacer an einer Goldoberfläche gebunden sind. Die kovalente Immobilisierung von Proteinen auf dieser Dextranschicht erfolgte über die Aminkopplung (I.5.3). Der Sensorchip wurde nach dem Einsetzen in das BIAcore T100-Gerät zunächst mit BIAcore-Laufpuffer gespült und im Anschluss mit 120 µl 70 % Glycerin (BIAnormalizing solution, BIAcore) behandelt. Für sämtliche Liganden erfolgte vor der Immobilisierung ein Test, bei welchem pH-Wert sich diese am stärksten elektrostatisch an der carboxymethylierten Dextranmatrix anlagern, was eine erfolgreiche kovalente Immobilisierung begünstigen sollte. Der pH-Wert für die Immobilisierung sollte dabei unter dem pI-Wert des Proteins liegen damit dieses eine positive Gesamtladung aufweist (Gianazza und Righetti, 1980). Die Liganden wurden auf eine Konzentration von 50 µg/ml in 10 mM Natriumacetat verschiedener pH-Werte von 3,72 bis 5,5 verdünnt und 20 µl davon bei einer Flussrate von 10 µl/min injiziert. Der

pH-Wert, bei dem die höchste Resonanzantwort zu messen war, wurde für die Immobilisierung ausgewählt. Die Liganden konnten im Anschluss mit 20  $\mu$ l 10 mM NaOH vollständig von der Oberfläche abgewaschen werden.

Die Aktivierung der Oberfläche einer Flusszelle erfolgte mit einem Gemisch aus 200 mM N-ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) und 50 mM N-hydroxy-succinimid (NHS). Beide Reagenzien waren Feststoffe der Firma Merck KGaA, Darmstadt und wurden als 400 mM EDC- und 100 mM NHS-Lösungen getrennt voneinander und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Für den Gebrauch wurden die Lösungen 1:1 gemischt und für 210 s bei einer Flussrate von 10  $\mu$ l/min (Resonanzsignal 100 RU) über den Sensorchip gegeben. Das EDC/NHS-Gemisch dient der Umwandlung der Carboxylgruppen auf der Matrix in reaktive NHS-Ester (Johnsson *et al.*, 1991). Für die Immobilisierung der Liganden wurden diese in der gewünschten Konzentration (5-10  $\mu$ g/ml) in 10 mM Natriumacetat des ermittelten pH-Wertes verdünnt und solange auf die Sensorchip-Oberfläche injiziert bis das gewünschte Signal erreicht war. Anschließend folgte eine Behandlung der Oberfläche mit 120  $\mu$ l 1 M Ethanolamin-HCl pH 8,5 (BIAcore), um die verbleibenden reaktiven NHS-Ester zu blockieren, indem sie zum Amid reagieren. Danach wurde die Oberfläche für 6 s mit 10 mM NaOH bei einer Flussrate von 20  $\mu$ l/min behandelt, um eventuell nichtkovalent gebundenen Liganden von der Oberfläche zu entfernen.

### Bindungsstudien im Biacore

In den Bindungsexperimenten wurden mit Hilfe des Kinetic Wizards der BIAcore-Software verschiedene Analytkonzentrationen in aufeinanderfolgenden Zyklen über den Sensorchip gegeben. Dieser sah vor jedem Bindungsexperiment die Äquilibrierung der Oberfläche in 3 Zyklen mit 100 nM des zu untersuchenden Analyten vor. Die Verdünnung des Analyten erfolgte in BIAcore-Laufpuffer. Die zu injizierenden Proben wurden dann in 96er Mikrotiterplatten (BIAcore) pipettiert und mit einer Folie (BIAcore) verschlossen. Nach jeder Injektion erfolgte ein Waschschriff mit Laufpuffer. Wenn Antikörper und Antikörperfragmente als Analyten eingesetzt wurden, erfolgte direkt vor der Messung im T100 eine Gelfiltration (II.4.6) im Laufpuffer, um eventuelle Störungssignale durch Pufferabweichungen zu vermeiden und Aggregate, Dimere und größere Oligomere aus der Probe zu entfernen. In allen Bindungstests dienten je zwei Pufferinjektionen als Blindwert

und je zwei Konzentrationswiederholungen der Kontrolle. Die Auswertung der Bindungskurven erfolgte, wie in I.5.4 beschrieben, mit Hilfe der BIAevaluation Software.

### **II.5.5 Oberflächenakustikwellen-Biosensor (SAW)**

Der SAW-(surface acoustic wave) Biosensor misst Interaktionen zwischen Biomolekülen über akustische Oberflächenwellen (I.5.2). In der vorliegenden Arbeit wurde ein S-sens<sup>®</sup> K5 Biosensor (Nanofilm Technologie GmbH, Göttingen) in Kombination mit den Sensorchips derselben Firma verwendet. Auf der Goldoberfläche der Sensorchips wurde von C. Hamann (FZ Borstel) nach dem Protokoll von Löfås und Johnsson (1990) modifiziert nach Dr. J. Andrä (Publikation eingereicht) eine carboxymethylierte Dextranschicht aufgebracht. Für alle Experimente wurde BIAcore-Laufpuffer (II.5.4) verwendet, der sterilfiltriert und ausreichend entgast war. Für die Injektion der Proben fanden 0,3 ml PP-Mikroflaschen (32 x 11.6 mm, Kurzgewinde) und die dazugehörigen Schraubkappen (9 mm mit NK/PTFE-Sept., 1,0 mm) des Herstellers Duratec Analysetechnik GmbH Anwendung. Vor der ersten Benutzung der Sensorchips wurde 5 % Glycerin verdünnt in Laufpuffer für 5 min bei einer Flussrate von 20 µl/min injiziert. Die Sensorchips bestehen aus 5 hintereinander geschalteten Zellen, wodurch bei Verwendung des Flusssystems für die Immobilisierung eine Referenz- und eine Messzelle auf demselben Sensorchip nicht möglich ist. Die Flussrate wurde im Vergleich zu den SPR-Experimenten jeweils höher gewählt, aufgrund der größeren Dimensionen der Sensorchipoberfläche. Die Aktivierung der Dextranoberfläche erfolgte mit 350 µl einer frisch gemischten EDC/NHS-Lösung (200 mM N-ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimid, 50 mM N-hydroxy-succinimid, Pierce: Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) für 18 min bei einer Flussrate von 20 µl/min.

Für die Immobilisierung der Neoglycokonjugate wurden diese in einer Konzentration von 50 µg/ml in 10 mM Natriumacetat pH 4,0 (BIAcore) verdünnt und für 18 min bei einer Flussrate von 20 µl/min injiziert. Nach einer 18 minütigen Injektion mit 1 M Ethanolamin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) bei 20 µl/min wurde die Oberfläche für 1 min mit 10 mM NaOH (40 µl/min) behandelt. Die Bindungsexperimente erfolgten unter gleichen Bedingungen wie für die SPR-Experimente beschrieben (II.5.4), jedoch mit einer Flussrate von 40 µl/min. Die Kontaktzeit der Analyte betrug jeweils 5 min und die Dissoziationszeit 9 min. Nach jedem Zyklus erfolgte ein Regenerierungsschritt mit 10 mM

NaOH für 75 s bei 40  $\mu\text{l}/\text{min}$ . In allen Messungen wurden mehrere Pufferinjektionen integriert, die als Blindwert fungierten.

### Auswertung der Bindungskurven

Die Auswertung der Bindungskurven erfolgte mit Hilfe der Microcal Origin<sup>TM</sup>6.0G Software für die Assoziation und Dissoziation getrennt und zunächst für jede Bindungskurve einzeln. Für das Fitting der Dissoziation wurde ein einfacher exponentieller Abfall mit der Gleichung  $y = y_0 + A_1 \cdot \exp(-(x-x_0)/t_1)$  und für die Assoziation ein sigmoides Boltzmann-Modell mit der Formel  $y = (A_1 - A_2)/(1 + \exp(x-x_0)/dx) + A_2$  verwendet. In beiden Fällen wurde eine Zeitkonstante bestimmt, welche den Anstieg der Kurve beschreibt. Die Dissoziationsrate berechnete sich dann aus der Division des natürlichen Logarithmus von 2 und der Zeitkonstante  $t_1$  ( $k_d = \ln 2/t_1$ ). Die konzentrationsabhängige Assoziationsrate wurde aus der Division des natürlichen Logarithmus von 2 und der Zeitkonstante  $dx$ , mit anschließender Subtraktion der Dissoziationsrate und Division durch die Konzentration bestimmt ( $k_a = (\ln 2/dx - k_d)/c$ ). Der  $K_D$ -Wert berechnet sich dann aus der Division der Dissoziations- und Assoziationsrate ( $K_D = k_d/k_a$ ).

### III. ERGEBNISSE

#### III.1. Mutagenese der scFv

Als Grundvoraussetzung für eine anschließende positionsgerichtete Mutagenese und die Herstellung monovalenter Antikörperfragmente für die geplanten Bindungsstudien der in Frage kommenden Antikörper, sollte zunächst untersucht werden, ob diese im bakteriellen Expressionssystem als lösliche scFv in ausreichender Menge produziert und gereinigt werden können. Von Antikörpern auf die dieses nicht zutraf, sollten durch Papain-Verdau Fab-Fragmente hergestellt werden. Ausgehend von der vergleichenden Primärstrukturanalyse der mAk S25-2, S45-18 und S69-4 (Abb. 5) und ihren Bindungseigenschaften (I.2.5) wurde für die Bindungsstudien der mAk S45-18 herangezogen. Von diesem mAk sind Kristallstrukturen bekannt (pdb 1q9w; Nguyen *et al.*, 2003). Der S45-18 bindet mit einer sehr hohen Affinität  $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo und  $\alpha$ -Kdo-(2→4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2→8)]- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo und ist nicht in der Lage zwischen diesen beiden Antigenen zu differenzieren. Der mAk S69-4 besitzt eine ähnliche Primärstruktur und reagiert ebenfalls mit diesen beiden Liganden. Dieser mAk ist jedoch in der Lage zwischen diesen beiden Liganden in einem bestimmten Konzentrationsbereich zu differenzieren. Des Weiteren wurden zwei aus dem Phage-Display-Verfahren isolierte scFv (scFv NH2240-31 und SAG506-01) untersucht. Von dem scFv NH2240-31 war bekannt, dass es sehr gut zwischen den Liganden  $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo und  $\alpha$ -Kdo-(2→4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2→8)]- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo differenziert und eine relativ hohe Affinität aufwies (Dr. S. Müller-Loennies; persönliche Mitteilung). Erste Bindungsstudien ergaben für das scFv NH2240-31 eine Affinität von  $2 \cdot 10^{-7}$  M gegenüber dem HSBP (II.1.3) und  $2 \cdot 10^{-6}$  M gegenüber dem 2.4/2.4 PSBP (durchgeführt von Dr. C. R. MacKenzie am National Research Council, Ottawa, Kanada; persönliche Mitteilung). Die Bindungsstärken waren somit deutlich höher als die des S69-4, die gegenüber HSBP bei ca.  $1 \cdot 10^{-5}$  M lag (Müller-Loennies *et al.*, 2006).

Das scFv SAG506-01 zeigte in seiner Primärstruktur eine hohe Homologie zum scFv NH2240-31. Jedoch war im Vergleich eine konservative Mutation Ile/Val an der Position 97 der schweren Kette (Position 97<sub>H</sub>) vorhanden, die auf der Basis der Ergebnisse eines Homologie-Modellings und der Kristallstruktur des mAk S45-18 bedeutsam für die Interaktion mit dem Liganden sein könnte (I.2.5). Durch den Vergleich dieser Antikörper

## ERGEBNISSE

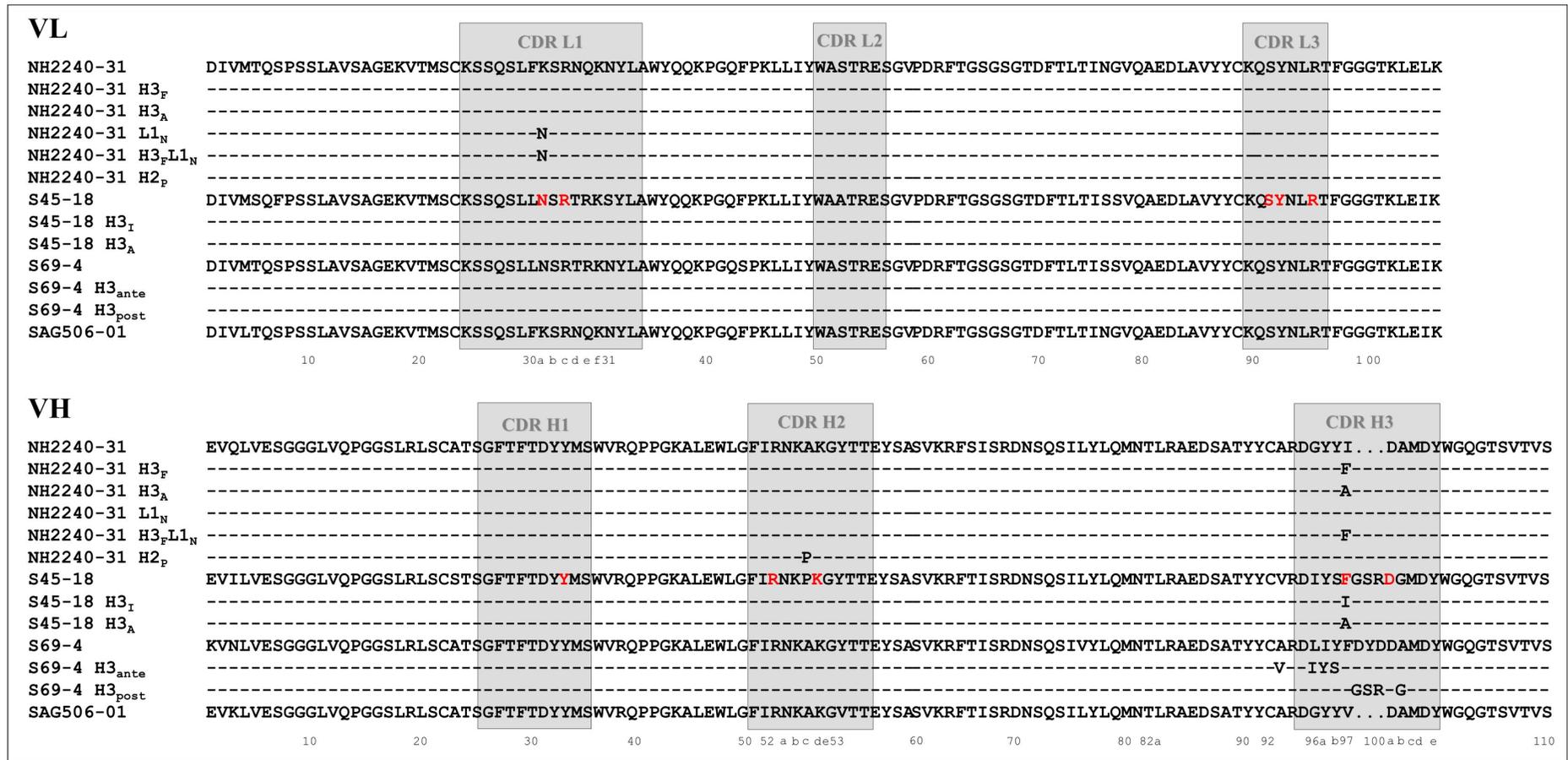
kann somit der Einfluss der hydrophoben Wechselwirkung und generell der CDR H3 auf die Interaktion mit geladenen Liganden untersucht werden.

Für die geplanten Bindungsstudien wurden die Mutationen 97<sub>H</sub>I/A und 97<sub>H</sub>I/F in das scFv NH2240-31 und die Mutationen 97<sub>H</sub>F/I und 97<sub>H</sub>F/A in ein zu generierendes scFv des mAk S45-18 eingeführt. Weitere Mutationen umfassten Positionen, die im Vergleich zum mAk S45-18 entweder im Kristallkomplex an der Bindung des Liganden direkt beteiligt waren (30a<sub>L</sub>N/K, CDR L1) oder die Sekundärstruktur erheblich beeinflussen könnten (52c<sub>H</sub>P/A CDR H2). Um den Einfluss der größeren Seitenkette eines Lysins in Anwesenheit eines 97<sub>H</sub>F auf die Bindung zu untersuchen, wurde diese Mutation zusätzlich in die 30a<sub>L</sub>N/K Mutante des scFv NH2240-31 eingeführt. Der Einfluss der CDR H3 auf die Bindungseigenschaften sollte weiter untersucht werden, indem acht von der Sequenz des S45-18 abweichende Aminosäuren um das 97<sub>H</sub>F in das scFv S69-4 eingeführt wurden (93,96-96b ALIY/VIYS, 98-100b DYDDA/GSRDG).

scFv	Mutation	CDR	neue Bezeichnung <sup>b</sup>
NH2240-31	WT		
	97 <sub>H</sub> I/F	H3	NH2240-31 H3 <sub>F</sub>
	97 <sub>H</sub> I/A	H3	NH2240-31 H3 <sub>A</sub>
	30a <sub>L</sub> K/N	L1	NH2240-31 L1 <sub>N</sub>
	97 <sub>H</sub> I/F und 30a <sub>L</sub> K/N	L1, H3	NH2240-31 H3 <sub>F</sub> L1 <sub>N</sub>
	52c <sub>H</sub> A/P	H2	NH2240-31 H2 <sub>p</sub>
S45-18	WT		
	97 <sub>H</sub> F/I	H3	S45-18 H3 <sub>I</sub>
	97 <sub>H</sub> F/A	H3	S45-18 H3 <sub>A</sub>
S69-4	WT		
	93,96-96b ALIY/VIYS	H3	S69-4 H3 <sub>ante</sub>
	98-100b DYDDA/GSRDG	H3	S69-4 H3 <sub>post</sub>
SAG506-01	WT		

**Tab. 10:** Übersicht der Antikörperfragmente, die durch Klonierung als scFv oder durch Papain-Verdau als Fab hergestellt wurden. Die vollständigen Sequenzen der variablen Domänen sind in Abb. 12 dargestellt. WT = Wildtyp; b = für die neue Bezeichnung wurde die mutierte CDR und die eingeführte Aminosäure angegeben, ante und post bezeichnen die Position relativ zur Position 97<sub>H</sub>.

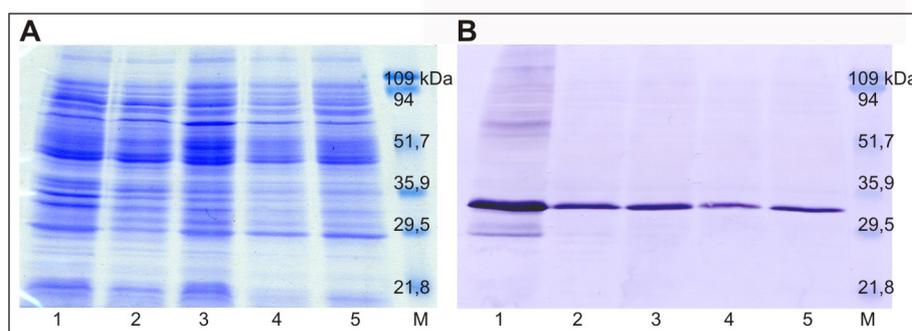
# ERGEBNISSE



**Abb. 13:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der variablen Domänen VL und VH der Wildtyp scFv und durch Mutation hergestellten Antikörper im Vergleich zum S45-18 (1q9w). Grau markiert sind die CDR. Rot sind die aus der Kristallstruktur des S45-18 bekannten an der Antigenbindung beteiligten Aminosäuren (Nguyen *et al.*, 2003). Die Nummerierung und CDR-Benennung stammt aus Studien von Chothia (Chothia und Lesk, 1987; Chothia *et al.*, 1992; Al Lazikani *et al.*, 1997) und Kabat database (Martin, 1996) wie beschrieben von Andrew C. Martin (University College London, UK, <http://www.bioinf.org.uk/>)

### III.2. Bakterielle Expression der scFv

Die als scFv klonierten rekombinanten Antikörper wurden periplasmatisch in *E. coli* TG-1 überexprimiert (II.3.2). Der Erfolg der Expression wurde auf einem Polyacrylamidgel (Abb. 14A) und mittels Western Blot (Abb. 14B) kontrolliert.



**Abb. 14:** SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) nach Proteineexpression. A: Färbung mit Coomassie Brilliant Blau (A) und Western Blot (B) nach Expression des scFv NH2240-31 H<sub>3F</sub> in *E. coli* TG-1. Der Nachweis im Blot erfolgte gegen den c-Myc-Tag mit einem anti-c-Myc Antikörper und Ziege-anti-Maus IgG H+L-AP auf einer PVDF-Membran. Spur 1-5: je 10 µl Bakterienkultur, Kulturüberstand und Überstände nach drei Polymyxin B-Extraktionen, M: Größenstandard.

In Abb. 14 ist exemplarisch die Expression des sehr gut exprimierten und löslichen scFv NH2240-31 H<sub>3F</sub> gezeigt. Der c-Myc-spezifische Nachweis im Blot zeigte eine Hauptbande mit der aufgrund der Gensequenz erwarteten Größe von ca. 30 kDa. Lösliches Protein ließ sich sowohl in den Extrakten nach Inkubation mit Polymyxin B (periplasmatisches Proteine) als auch im Kulturüberstand nachweisen. Die Ergebnisse der Expression aller untersuchten scFv sind in Tab. 10 aufgeführt.

Alle scFv wurden in *E. coli* TG-1 sehr gut exprimiert und hierbei waren relativ geringe Unterschiede im Expressionsgrad und in der Menge an löslichem Protein festzustellen. Im Gegensatz zu allen anderen scFv konnte jedoch das scFv S45-18 und seine Mutante H<sub>3I</sub> trotz der hohen Homologie zum S69-4 nicht löslich exprimiert werden. Die Expression der Mutante S45-18 H<sub>3A</sub> ergab eine geringe Menge löslichen Proteins. Variationen der Kultivierungsbedingungen hinsichtlich der Zelldichte und des Sauerstoffeintrags hatte keine verbesserte lösliche Expression zur Folge. Auch die Verwendung des Expressionsstammes *E. coli*-BL21, die kälteinduzierbare Expression mittels pColdIII-Vektor und das T7-Expressionssystem mit Hilfe des pET12c-Vektors (Invitrogen) in Kombination mit *E. coli* BL21 (DE3) pLys-S hatte keinen Erfolg.

## ERGEBNISSE

scFv	Expressionsgrad	Menge an löslichem Protein	Ausbeute in mg/l Kultur
NH2240-31 WT	+++	++	0,5
NH2240-31 H3 <sub>F</sub>	+++	++	1,0
NH2240-31 H3 <sub>A</sub>	+++	+++	1,2
NH2240-31 L1 <sub>N</sub>	+++	+++	1,0
NH2240-31 H3 <sub>F</sub> L1 <sub>N</sub>	+++	+++	1,0
NH2240-31 H2 <sub>P</sub>	+++	++	0,5
S45-18 WT	+++	---	---
S45-18 H3 <sub>I</sub>	+++	---	---
S45-18 H3 <sub>A</sub>	+++	+	n.d.
S69-4 WT	+++	++	0,5
S69-4 H3 <sub>ante</sub>	+++	+++	0,9
S69-4 H3 <sub>post</sub>	+++	+++	0,7
SAG506-01 WT	+++	++	0,5

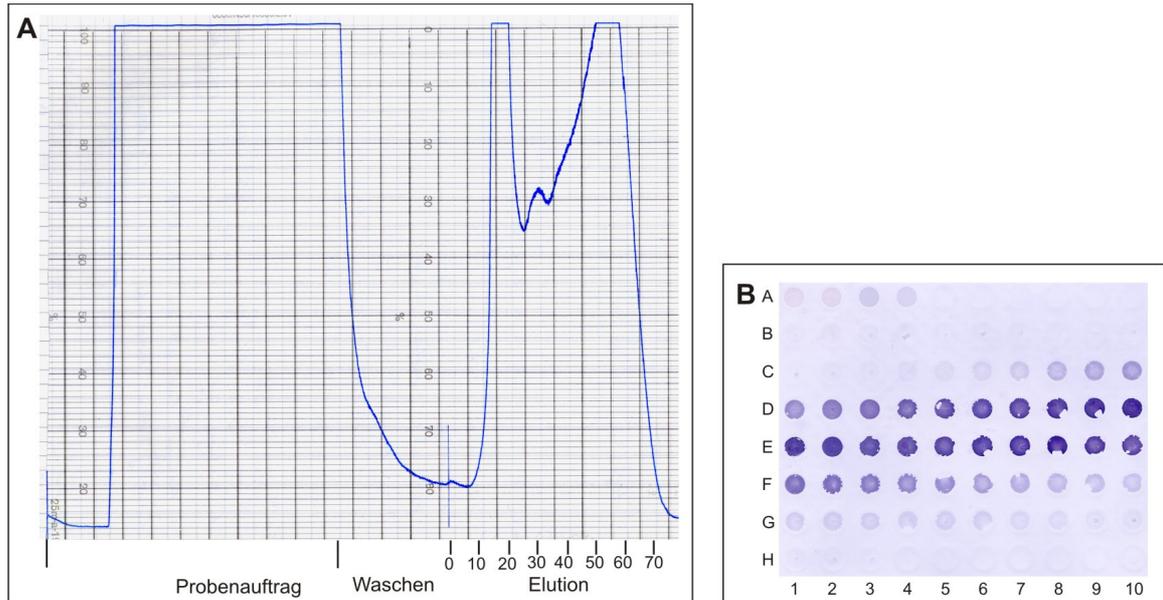
**Tab. 11:** Expressionsverhalten der untersuchten scFv und Menge an löslichem Protein. Angabe der Expression: gering (+), mittel (++) und hoch (+++), --- keine lösliche Expression. n.d. = nicht definiert.

### III.3. Aufreinigung der scFv

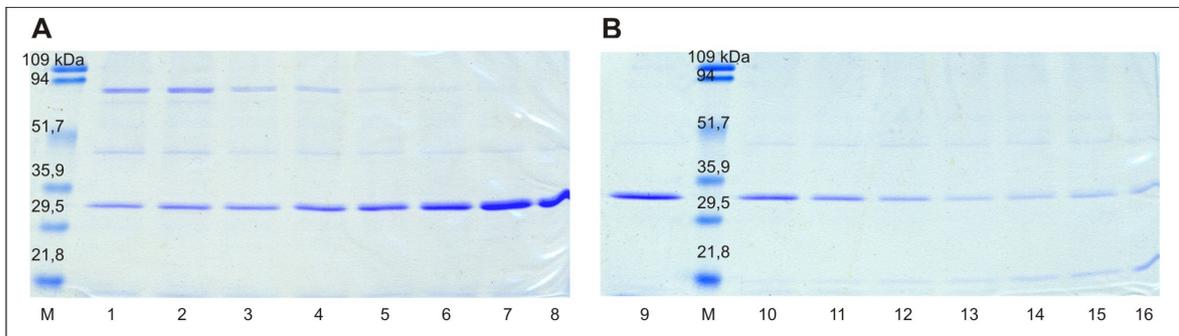
Die gewonnenen scFv-Antikörperfragmente aus den Extrakten nach Inkubation mit Polymyxin B und aus der Fällung des Kulturüberstandes konnten über den His-Tag mittels Nickel-Affinitätschromatographie von anderen Proteinen erfolgreich getrennt werden. Abb. 15A zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer IMAC-Aufreinigung des scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub>.

In der Elution der Affinitätschromatographie wurden zwei Fraktionen erhalten (Abb. 15A). Die Basisliniendrift ergab sich aus Absorption des zugegebenen Imidazols bei der Detektionswellenlänge von 280 nm. Um den scFv-Gehalt in den Elutionsfraktionen zu bestimmen, wurde ein Dot Blot durchgeführt (Abb. 15B) und mit Antikörper gegen den c-Myc-tag gefärbt. Das scFv wurde in den Elutionsfraktionen 15 – 60 (C5 – G10) nachgewiesen wobei sich die Hauptmenge des Proteins in den Fraktionen 19 – 46 befand (C9 – F6). Dies entsprach einer Elutionszeit von ca. 30 min und einer Imidazolkonzentration von ca. 350 mM. Weder im Durchlauf noch in der Waschfraktion wurde scFv nachgewiesen. Somit konnte das scFv quantitativ an die Säule gebunden werden.

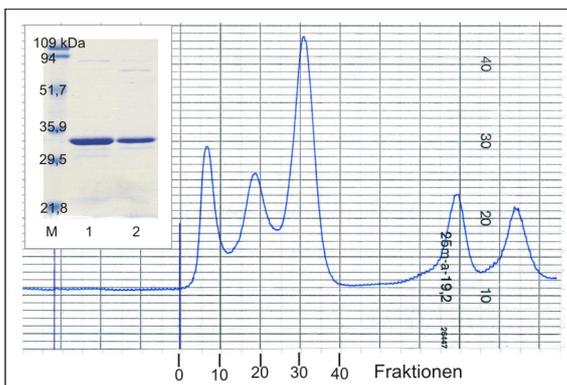
## ERGEBNISSE



**Abb. 15:** Chromatogramm einer IMAC-Aufreinigung von 78 ml eines Polymyxin B Extraktes des scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub> (A) und Dot-Blot (B) der Elutionsfraktionen. UV-Detektion bei 280 nm, Detektorempfindlichkeit 1,0 und Schreibergeschwindigkeit 1mm/min. Es wurden jeweils 0,5 ml je Fraktion durch einen Fraktionssammler aufgefangen. Angegeben sind Probenauftrag (Durchlauf), Waschen und Elution (Elutionsfraktionen 0-70). Probenauftrag und Waschen erfolgte bei einer Flussrate von 1,0 ml/min und Elution bei 0,5 ml/min. (B) PVDF-Membran inkubiert mit Proben des scFv NH2240-31 H3F nach Affinitätschromatographie, scFv-Nachweis mittels anti-c-Myc-Antikörper und Ziege-anti-Maus IgG H+L-AP. A1-A2: 50 und 100 µl Durchlauf, A3-A4: 50 und 100 µl Durchlauf Waschfraktion, B1-H10: 10 µl Elutionsfraktionen



**Abb. 16:** SDS-PAGE nach Affinitätschromatographie des scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub>-Extraktes aus *E. coli* TG-1 nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. Spur 1-16: je 10 µl jeder zweiten Elutionsfraktion 18-48, M: Größenstandard.

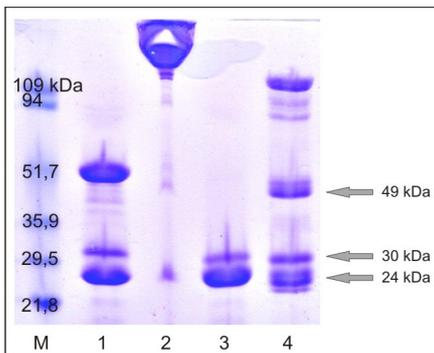


**Abb. 17:** Chromatogramm eines Gelfiltrationslaufs einer scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub>-Probe nach IMAC. Aufzeichnung des UV-Detektors (280 nm) bei einer Empfindlichkeit von 0,5 und einer Schreibergeschwindigkeit von 1 mm/min. Flussrate 1 ml/min. Der Abstand zweier senkrechter Linien entspricht 10 mm. Die erste senkrechte Schreiberlinie stellt den Zeitpunkt der Probeninjektion, die zweite den Beginn der Fraktionierung in 1 ml-Volumina dar. Elution des scFv-Dimers nach 50 min, scFv-Monomer nach 62 min (Vergleichsantikörper mAk S45-18). Links im Bild: SDS-PAGE mit 10 µl scFv-Dimers (1) und scFv-Monomer (2). 3,5 µl des Größenstandards (M).

Um einen Eindruck über die Reinheit des isolierten scFv zu bekommen, wurde jede zweite Elutionsfraktion in einer SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt (Abb. 16). Alle aufgetragenen Proben enthielten das erwartete Protein des scFv mit einer Größe von 30 kDa. In allen Fraktionen sind außerdem geringe Mengen von Proteinverunreinigungen erkennbar. Insgesamt konnte jedoch eine hohe Reinheit des scFv erzielt werden. Die Fraktionen des IMAC-Laufes (Abb. 15) mit der größten scFv-Konzentration (24 – 36) wurden vereinigt. Um für die Bindungsstudien monovalente scFv zu erhalten, wurde diese Proteinlösung über Gelfiltration in scFv Monomer, Dimer und höhere Oligomere erfolgreich getrennt (Abb. 17). Alle scFv-Antikörperdomänen, die löslich exprimiert wurden, konnten auf diese Weise sowohl aus dem Kulturüberstand als auch aus den Polymyxin B-Extrakten in aufgereinigter Form gewonnen werden. Die Proteinausbeute an gereinigten scFv aus einem Liter Kultur lag zwischen 0,5 und 1,2 mg. Für das scFv S45-18 H3<sub>A</sub> wurde ebenfalls diese Reinigungsmethode angewendet, jedoch war die Menge des löslichen Proteins zu gering, sodass von diesem scFv nicht genügend Protein für weitere Experimente erhalten werden konnte.

### III.4. Darstellung von Fab-Fragmenten des mAk S45-18

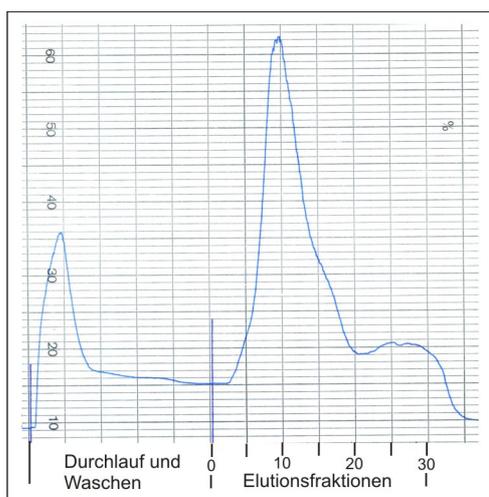
Da der S45-18 nicht als scFv löslich in *E. coli*-TG1 exprimiert werden konnte, wurde, um vergleichbare monovalente Fab-Fragmente zu erhalten, ein Verdau mit Papain durchgeführt. Das Ergebnis der Papain-Spaltung wurde auf einem Polyacrylamidgel (Abb. 18) kontrolliert. Die Analyse der Präparation des mAk S45-18 (IgG, 150 kDa) vor dem Papain-Verdau und unter reduzierenden Bedingungen ergab, dass sie keine Verunreinigungen enthielt. Nach Reduktion entstanden die erwarteten Banden der schweren (50 kDa) und leichten Ketten (25 kDa) des Antikörpers.



**Abb. 18:** SDS-PAGE des S45-18 mAk und Fab nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. Es wurden jeweils 6 µl Probe aufgetragen. Spur 1-2: unverdauter mAk S45-18 reduzierend und nicht reduzierend, Spur 3-4: Papain-verdauter mAk S45-18 reduzierend und nicht reduzierend, M: Größenstandard.

Nach Papain-Verdau und Reduktion ist aufgrund der fehlenden 50 kDa-Bande deutlich zu sehen, dass sich kein ganzer Antikörper mehr in dem Ansatz befand (Abb. 18, Spur 3) und der Verdau somit vollständig war. Es sind ausschließlich die Banden der Papain-verdauten Teilstücke der schweren und leichten Kette von je 24 kDa sowie die des Fc von etwa 30 kDa vorhanden. Die Auftrennung des Papainverdaus ohne Reduktion (Spur 4) ergab Proteinbanden von 49 kDa der nicht-reduzierten Fab-Fragmente und des Fc-Proteins. Die Banden bei 30 und 24 kDa, die reduziertes Fab und Fc darstellen, sind darauf zurückzuführen, dass bereits der Verdau unter leicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde. Die höheren Banden um die 90 bis 110 kDa sind wahrscheinlich Aggregaten zuzuordnen.

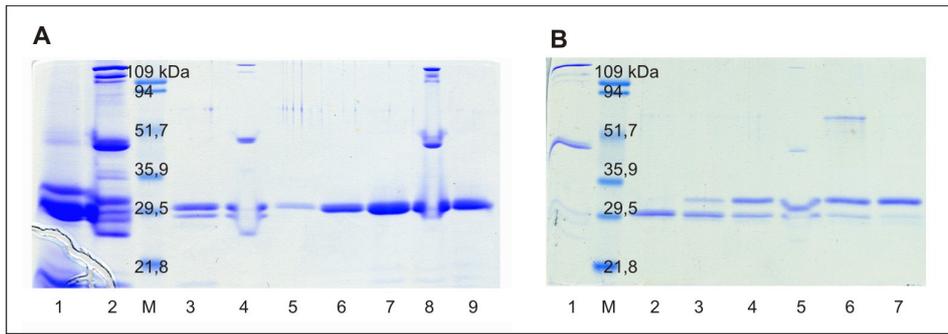
Um das Fc aus der Lösung zu entfernen, wurde der Restriktionsansatz in einer Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt (II.4.12). Die beiden während der Elution aufgezeichneten Peaks (Abb. 19) ergaben auf einer SDS-PAGE (Abb. 20) für den ersten Peak vorwiegend reines Fab. In den Fraktionen des zweiten Peaks war eine zusätzliche Bande erkennbar, was auf ein Gemisch aus Fab und Fc hindeutete. Die Durchlauffraktion enthielt ebenfalls Fab-Fragmente. Um die Anwesenheit von aktivem Fab in den Elutionsfraktionen nachzuweisen, wurde ein ELISA-Test gegen immobilisierte Elementarkörper von *C. psittaci* durchgeführt. Tab. 21 zeigt die Absorptionwerte des ELISA bei eingesetzten Proteinkonzentrationen von 120 bis 1,9 ng/ml von Proben aus den Elutionsfraktionen 7 – 13, die reines Fab-Fragment beinhalten sollten sowie den Elutionsfraktionen 19 – 28, die zusätzlich Fc enthielten.



**Abb. 19:** Chromatogramm der Fab S45-18-Reinigung über DEAE-Sepharose. Aufzeichnung der UV-Detektorsignale bei 280 nm, einer Empfindlichkeit von 0,5 und einer Schreiberlaufgeschwindigkeit von 1 mm/min. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Der Abstand zweier senkrechter Linien entsprechen 10 mm.

Durchlauf und Waschen: Probenauftrag 3 ml in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 und Waschen mit 22 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,0. Elutionsfraktionen: eine Fraktion entspricht 2 min, NaCl-Gradient innerhalb von 60 min von 0 auf 100 mM NaCl in 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

## ERGEBNISSE

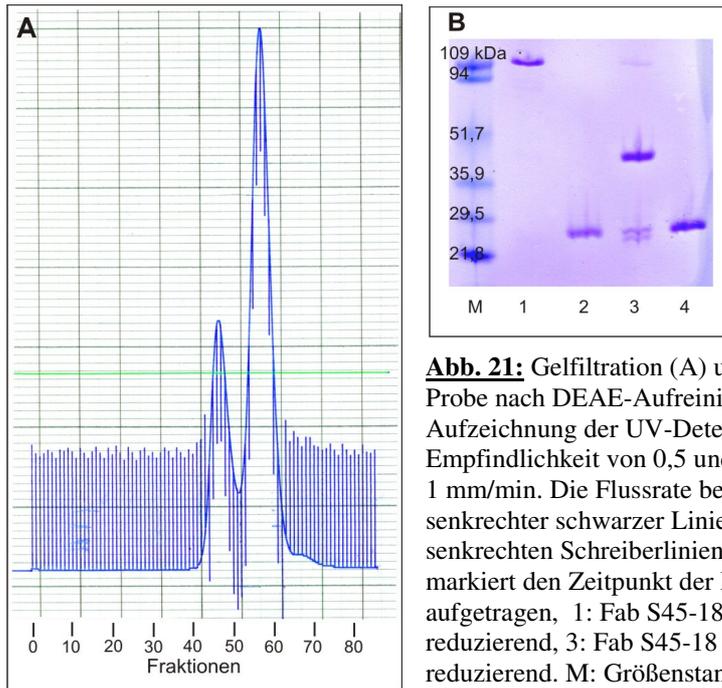


**Abb. 20:** SDS-PAGE einiger Elutionsfraktionen der DEAE-Aufreinigung nach Papainverdau des mAk S45-18 nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. 1-2: Papain-verdauter mAk S45-18 reduzierend und nicht reduzierend, 3-4: Durchlaufaktion reduzierend und nicht reduzierend, 5-6: Elutionsfraktionen 4 und 7 nicht reduzierend, 7-8: Elutionsfraktion 10 reduzierend und nicht reduzierend, 9: Elutionsfraktion 13 reduzierend. B: M: 3,5 µl des Größenstandards (II.4.2), 1-2: Elutionsfraktion 16 nicht reduzierend und reduzierend, 3-4: Elutionsfraktionen 19 und 22 nicht reduzierend, 5-6: Elutionsfraktion 25 reduzierend und nicht reduzierend, 7: Elutionsfraktion 28 reduzierend. M: Größenstandard.

0,581	0,639	0,763	1,032	2,495	3,297	3,149	OD Fab
0,000	0,000	0,202	0,237	0,559	0,403	0,607	OD Fab/Fc
1,9	3,8	7,5	15	30	60	120	Konzentration in ng/ml

**Tab. 12:** OD-Werte eines ELISA mit Fab-Präparationen gegen Elementarkörperchen von *C. psittaci* 6BC. Proteinkonzentration (c) von 1,9 bis 120 ng/ml. Absorption gemessen bei 405 nm nach ABTS-Färbung mit HRP-konjugiertem Goat anti-mouse IgG H+L.

Im ELISA konnte in beiden Proben aktives Fab nachgewiesen werden. Dabei beinhaltet die Probe aus dem ersten Peak den Hauptteil an aktivem Fab. Aus 10 mg mAk S45-18 wurden auf diese Weise 3 mg gereinigtes Fab erhalten. Für die geplanten Bindungsstudien wurde die Fab-Probe über eine Gelfiltrationssäule in Di- und Monomer getrennt (Abb. 21A) und auf einem SDS-Gel kontrolliert (Abb. 21B). In dem Chromatogramm (Abb. 21A) konnte ein kleinerer Peak nach 47 min und ein größerer nach 58 min detektiert werden. Eine Kontrolle der Proben beider Peaks auf einem Polyacrylamidgel zeigte, dass es sich bei dem ersten um Aggregate des Fab S45-18 handelte, wie die Bande bei 110 kDa in Spur 1 der Abb. 21B unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigt. Reduzierend fand sich die Bande dann bei 24 kDa, was dem Fab entspricht. Dem zweiten Peak war Fab-Monomer zuzuordnen, da sich die Hauptbande unter nichtreduzierenden Bedingungen bei 50 kDa befand. Mit Hilfe der Gelfiltration konnte das Fab S45-18-Monomer erfolgreich von höheren Oligomeren getrennt werden. Überraschenderweise wurden die Aggregate während des fünfminütigen Kochschrittes nicht aufgetrennt. Die starke Oligomerisierung war bei Bindungsstudien zu beachten.



**Abb. 21:** Gelfiltration (A) und SDS-PAGE (B) einer Fab S45-18-Probe nach DEAE-Aufreinigung und Dialyse gegen PBS pH 7,2. Aufzeichnung der UV-Detektorsignale bei 280 nm, einer Empfindlichkeit von 0,5 und einer Schreibergeschwindigkeit von 1 mm/min. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Der Abstand zweier senkrechter schwarzer Linien entsprechen 10 mm. Die blauen senkrechten Schreiberlinien zeigen die Fraktionen an, die erste Linie markiert den Zeitpunkt der Probeninjektion. (B) jeweils 6  $\mu$ l aufgetragen, 1: Fab S45-18 Oligomere, 2: Fab S45-18 Oligomere reduzierend, 3: Fab S45-18 Monomer, 4: Fab S45-18 Monomer reduzierend. M: Größenstandards

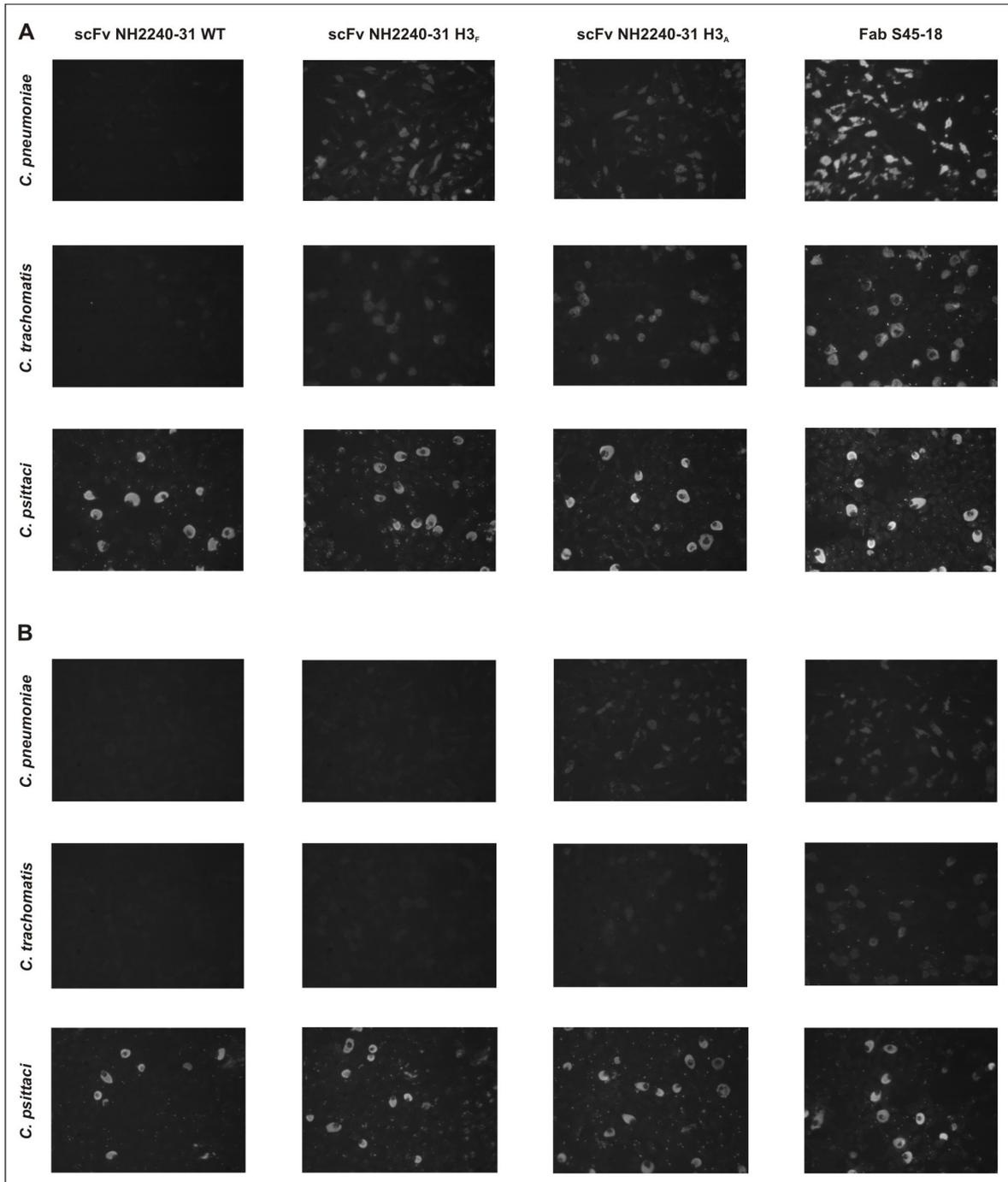
### III.5. Biochemische Untersuchungen mit Chlamydien

In diesem Abschnitt werden Bindungsstudien beschrieben, die vorwiegend klären sollten, inwieweit Mutationen an der Position 97<sub>H</sub> der CDR H3 die Spezifität und Affinität des scFv NH2240-31 verändern. Diese Position ist bei verschiedenen, mit dem mAk S45-18 verwandten Ak mit einer hydrophoben Aminosäure besetzt, die aus den Erkenntnissen der Röntgenstrukturanalyse einen starken Einfluss auf die Affinität und Spezifität dieser Ak ausüben könnte (I.2.5, Nguyen *et al.*, 2003).

#### III.5.1 Immunfluoreszenz

Zunächst wurde mit Hilfe von Chlamydien-infizierten Humanzellen (II.5.1) untersucht, wie sich der scFv NH2240-31 und seine Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> gegenüber Chlamydien hinsichtlich ihrer Spezifität verhalten. *C. psittaci*, *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*-infizierte Zellmonolayer wurden mit diesen drei scFv inkubiert. Als Vergleich wurde der Fab S45-18 herangezogen. Abb. 22 zeigt die mit 20 und 5  $\mu$ g/ml Antikörperfragment inkubierten und mit einem FITC-konjugierten Antikörper angefärbten Zellen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 22:** Fluoreszenznachweis von Chlamydien-Einschlüssen in Humanzellen. *C. pneumoniae*-infizierte HL-Zellen, L929-Zellen infiziert mit *C. trachomatis*-Eks, *C. psittaci*-infizierte L929-Zellen. Inkubation mit dem scFv NH2240-31 97H<sub>I</sub>, scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub>, scFv NH2240-31 H3<sub>A</sub>, Fab S45-18, A: 20 µg/ml und B: 5 µg/ml Antikörperfragment, detektiert wurden alle Antikörperfragmente über einen FITC-markierten sekundären Antikörper.

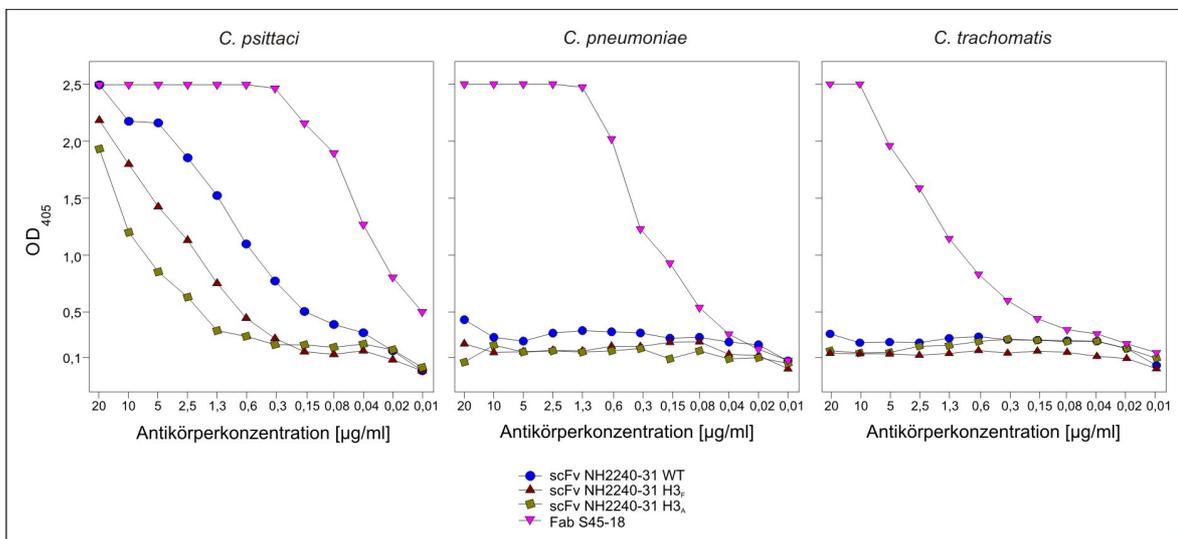
Abb. 22 zeigt, dass alle getesteten Antikörperfragmente mit *C. psittaci*-infizierten Humanzellen reagieren. Der scFv NH2240-31 bindet bei diesen Konzentrationen nicht an *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*-infizierte Zellmonolayer und differenziert somit zwischen den Chlamydien. Für die NH2240-31-Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> war eine

## ERGEBNISSE

Kreuzreaktivität gegenüber *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* festzustellen, die bei geringeren Antikörper-Konzentrationen von 5 µg/ml für den H3<sub>F</sub> nicht mehr und für den H3<sub>A</sub> kaum noch sichtbar war. Der Fab S45-18 dagegen reagierte bei einer Konzentration von 5 µg/ml noch mit allen drei getesteten Chlamydien, wobei *C. psittaci* der Leuchtintensität nach am besten erkannt wurde.

### III.5.2 ELISA gegen isolierte Chlamydien

Nachdem im Fluoreszenztest im Gegensatz zum scFv NH2240-31 für die Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> Kreuzreaktivität gegenüber *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* detektiert wurde, sollte untersucht werden, ob das auch bei isolierten Chlamydien der Fall ist. Die Reaktivität des scFv NH2240-31 und dessen Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> sowie des Fab S45-18, wurden auf immobilisierten Chlamydien *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* getestet (II.5.2). Die Ergebnisse der photometrischen Aktivitätsbestimmung in Bezug auf die Antikörperkonzentration von 0,02 bis 20 µg/ml sind in Abb. 23 in Form von Bindungskurven gezeigt.



**Abb. 23:** ELISA von scFv- und Fab-Antikörperfragmenten gegen isolierte Chlamydien. ScFv NH2240-31, scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub>, ScFv NH2240-31 H3<sub>A</sub>, Fab S45-18 auf 5 µl/ml immobilisierten Elementarkörpern von *C. psittaci*, *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* (Tab.2), gezeigt sind die Bindungskurven der Mittelwerte aus 4 parallelen Messreihen, die Absorption bei 405 nm ist gegen die Antikörperkonzentration aufgetragen beginnend mit 20 µg/ml.

Die scFv NH2240-31, NH2240-31 H3<sub>F</sub>, NH2240-31 H3<sub>A</sub> sowie Fab S45-18 reagierten alle mit *C. psittaci*-Elementarkörpern. Der Fab S45-18 erkannte *C. psittaci* 20fach besser als der scFv NH2240-31. Durch die H3<sub>F</sub>-Mutation im NH2240-31 verringerte sich die Reaktivität auf *C. psittaci* um das 4fache und bei der H3<sub>A</sub>-Mutante war eine 12fache Reduktion der Aktivität festzustellen. Eine Bindung des NH2240-31 und der Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> war auf *C. pneumoniae* bei der getesteten Konzentration von 20 µg/ml nicht detektierbar. Das gleiche galt für Elementarkörper von *C. trachomatis*. Der scFv NH2240 31 sowie beide Mutanten waren somit in der Lage *C. psittaci* deutlich von den anderen getesteten Chlamydien zu differenzieren. Der Fab S45-18 war dagegen in der Lage neben *C. psittaci* auch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zu binden. Hier war eine 8fach verringerte Aktivität auf *C. pneumoniae* gegenüber *C. psittaci* festzustellen und *C. trachomatis* wurde vom Fab S45-18 40mal schlechter als *C. psittaci* erkannt.

### **III.6. Biochemische Untersuchungen mit isolierten Oligosacchariden und Neoglykokonjugaten im ELISA**

In folgenden Experimenten sollte untersucht werden, welche Struktur von Chlamydien-LPS der NH2240-31 spezifisch erkennt und inwieweit sich die Mutationen an der Position 97<sub>H</sub> auf die Spezifität und Affinität dieses Antikörpers auswirken. In diese Versuche wurden die im Abschnitt III. 1 beschriebenen Antikörper einbezogen. In weitergehenden Studien wurde dann der Einfluss der dieser Position benachbarten Aminosäuren innerhalb der CDR H3 untersucht. Dazu diente das scFv des schwach affinen mAk S69-4 (Müller-Loennies *et al.*, 2006) in Bindungsstudien als Vergleich mit dem Fab des stark affinen mAk S45-18 sowie die durch Mutagenese hergestellten Hybridmoleküle dieser beiden Antikörper. Sowohl der S45-18 als auch der S69-4 sind gegen Kdo-Oligosaccharide der LPS von Chlamydien gerichtet (I.2.5, Brade *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2003; Müller-Loennies *et al.*, 2006). Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurden in den Bindungstests ausschließlich monovalente scFv- und Fab-Antikörperfragmente verwendet, die unmittelbar vor den Experimenten über Gelfiltration gereinigt wurden.

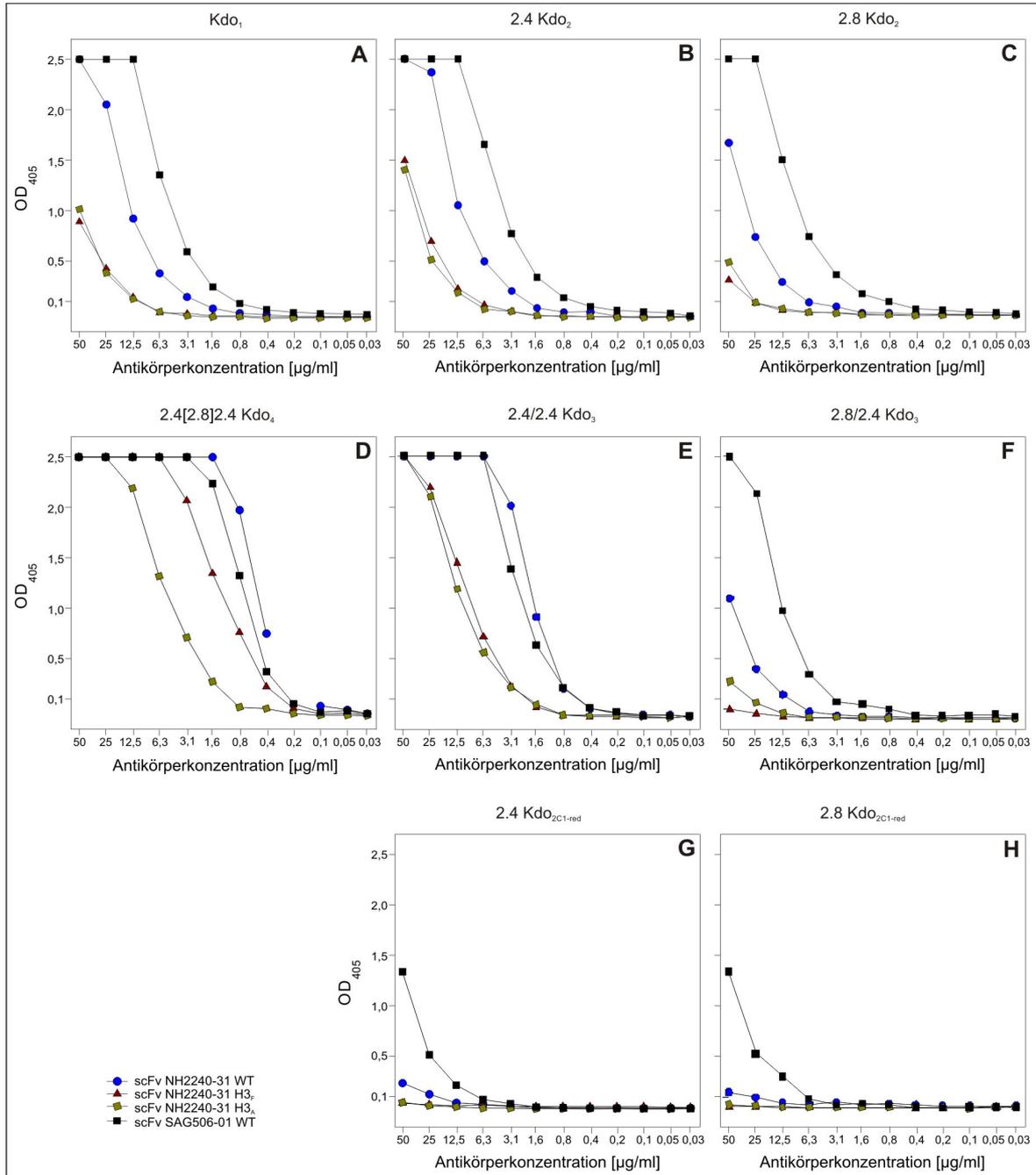
### III.6.1 Untersuchungen zum Einfluss der hydrophoben Wechselwirkung auf die Bindung verschiedener Kdo-Oligosaccharide

#### III.6.1.1 ELISA mit Kdo-haltigen Neoglycokonjugaten ohne Lipoid A-Grundgerüst

Zunächst wurden Bindungsassays mit synthetisch hergestellten Kdo-Oligosacchariden durchgeführt, die Partialstrukturen des LPS von Chlamydien (II.1.3) entsprachen und als Neoglycokonjugate mit Rinderserumalbumin (BSA) vorlagen. Diesen Oligosacchariden fehlte das Lipoid A-Grundgerüst. In Abb. 24 sind die ELISA-Bindungskurven für Antikörperkonzentrationen von 50 bis 0,03 µg/ml bei 20 pmol immobilisiertem Antigen dargestellt.

Für alle scFv ließ sich eine Bindung an die eingesetzten Neoglycokonjugate mit intaktem Kdo nachweisen. Eine sehr schwache Bindung an die carboxylreduzierten Kdo-Disaccharide (C1 reduziert am Kdo 1) wurde nur für das scFv SAG506-01 beobachtet. Dieses scFv zeigte gegenüber allen Liganden die stärkste Bindung. Nur gegen 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> und 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> wurde eine vergleichbare Affinität für das scFv NH2240-31 gezeigt. Die Mutanten H3<sub>A</sub> und H3<sub>F</sub> des NH2240-31 besaßen eine grundsätzlich geringere Affinität als das WT scFv NH2240-31. Die Bindung an Kdo-Monosaccharid (Abb. 24A) ergab eine OD<sub>405</sub> von 1,0 bei ca. 15 µg/ml für das scFv NH2240-31 und bei 3 µg/ml für das SAG506-01. Ähnliche Werte wurden für das 2.4 Kdo<sub>2</sub> (Abb. 24B) erhalten. Das 2.8 Kdo<sub>2</sub> (Abb. 24C) wurde hingegen um eine (25 µg/ml und 6 µg/ml für OD<sub>405</sub> = 1,0) und das 2.8/2.4 Kdo<sub>3</sub> (Abb. 24F) um zwei (50 µg/ml und 12 µg/ml für OD<sub>405</sub> = 1,0) Titerstufen schlechter gebunden. Für das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> (Abb. 24E) war eine deutlich stärkere Bindung sowohl für das scFv NH2240-31 (8x), als auch für die Mutanten H3<sub>A</sub> und H3<sub>F</sub> (4x) gegenüber dem 2.4 Kdo<sub>2</sub> festzustellen. Das Tetrasaccharid 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> (Abb. 24D) war das am besten gebundene Oligosaccharid für alle vier Antikörper. Die Bindung des NH2240-31 war um das 3fache und die der Mutante H3<sub>F</sub> um das 5fache im Vergleich zum 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> erhöht. Somit differenzierten diese am stärksten zwischen 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> und 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub>.

## ERGEBNISSE



**Abb. 24:** ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokonjugate ohne Lipoid A-Grundgerüst. ScFv NH2240-31 WT, H3<sub>F</sub>, H3<sub>A</sub> und SAG506-01 WT auf 20 pmol immobilisierten Neoglycokonjugaten, gezeigt sind die Bindungskurven gegenüber A: Kdo<sub>1</sub>, B: 2.4 Kdo<sub>2</sub>, C: 2.8 Kdo<sub>2</sub>, D: 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub>, E: 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub>, F: 2.8/2.4 Kdo<sub>3</sub>, G: 2.4 Kdo<sub>2C1-red</sub>, H: 2.8 Kdo<sub>2C1-red</sub>.

Im Gegensatz hierzu war für die H3<sub>A</sub>-Mutante keine Differenzierung zwischen diesen beiden Oligosacchariden festzustellen. Die größten Unterschiede zwischen den Antikörpern ergaben sich in der Bindung an das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub>. Hier waren die Affinitäten der scFv NH2240-31 und SAG506-01 um den Faktor 5 im Vergleich zu den Mutanten H3<sub>A</sub> und H3<sub>F</sub> erhöht. Für alle vier Antikörper wurde eine reduzierte Bindung auf dem

2.4 Kdo<sub>2C1-red</sub> (Abb. 24G) und dem 2.8 Kdo<sub>2C1-red</sub> (Abb. 24H) gegenüber den nichtreduzierten Disacchariden nachgewiesen.

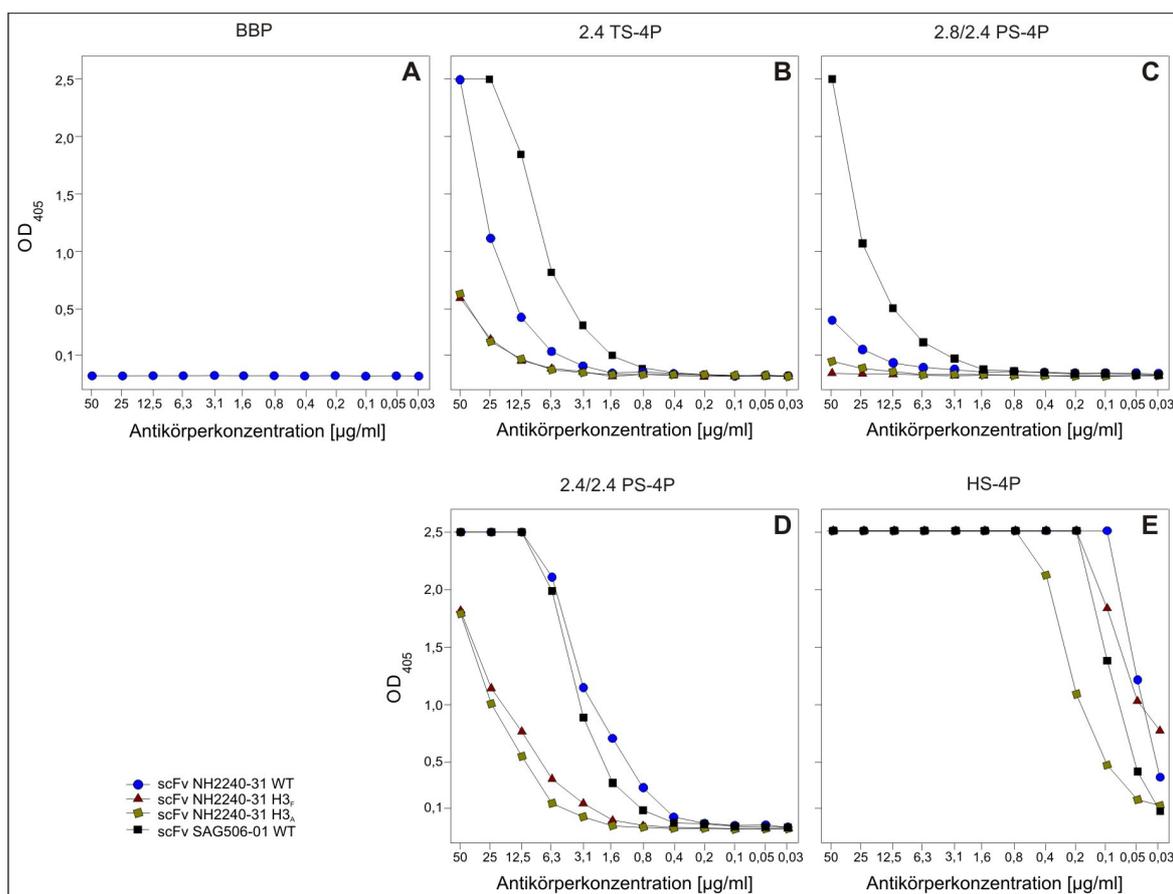
### III.6.1.2 ELISA mit Kdo-haltigen Neoglycokonjugaten mit Lipoid A-Grundgerüst

In Abb. 25 sind die Bindungskurven der Antikörper in einer Konzentration von 50 bis 0,03 µg/ml auf 20 pmol Neoglycokonjugaten dargestellt, die das Lipoid A-Grundgerüst beinhalteten (II.1.3). Da diese Oligosaccharide aus dem LPS von Bakterien isoliert und nach Dephosphorylierung an Position 1 über das C1 des GlcN am reduzierenden Ende konjugiert wurden, fehlte in diesen Oligosacchariden das glycosidisch gebundene Phosphat an Position 1. Das Lipoid A-Grundgerüst (BBP) hingegen wurde über die freien Aminogruppen mit Glutarialdehyd an BSA konjugiert und war somit in seiner Struktur intakt. Es konnte gezeigt werden, dass das scFv NH2240-31 nicht mit diesem Konjugat reagierte (Abb. 25A). Im Vergleich zu den entsprechenden Lipoid A-freien Liganden (III.6.1.1) wurde 2.4 TS-4P mit einer 2 und das HS-4P mit einer 10fach höheren Affinität gebunden während der Einfluss auf die Bindung von 2.4/2.4 PS-4P und 2.8/2.4 PS-4P deutlich geringer war. Für alle vier Antikörper ergab sich eine Affinitätssteigerung vom 2.4 TS-4P (Abb. 25B) über das 2.4/2.4 PS-4P (Abb. 25D) bis zum HS-4P (Abb. 25E). Das 2.8/2.4 PS-4P (Abb. 25C) wurde von allen scFv am schlechtesten gebunden. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den Antikörperfragmenten waren bei dem 2.4/2.4 PS-4P Konjugat zu sehen. Die Affinitäten der scFv SAG506-01 und NH2240-31 waren gegenüber den Mutanten H3<sub>A</sub> und H3<sub>F</sub> um das 8fache erhöht während sie mit HS-4P (Abb. 25E) bis auf die Mutante H3<sub>A</sub> (ca. 3,5x niedriger) unverändert waren. Im Vergleich zu den entsprechenden Lipoid A-freien Konjugaten zeigten alle scFv eine deutlich stärkere Differenzierung zwischen dem 2.4/2.4 verknüpften Kdo-Trisaccharid im 2.4/2.4 PS-4P und dem verzweigten Kdo-Tetrasaccharid im HS-4P. So wurde das HS-4P vom scFv NH2240-31 und SAG506-01 47mal, von der H3<sub>A</sub>-Mutante 125mal und von der Mutante NH2240-31 H3<sub>F</sub> 300mal besser gebunden als das 2.4/2.4 PS-4P.

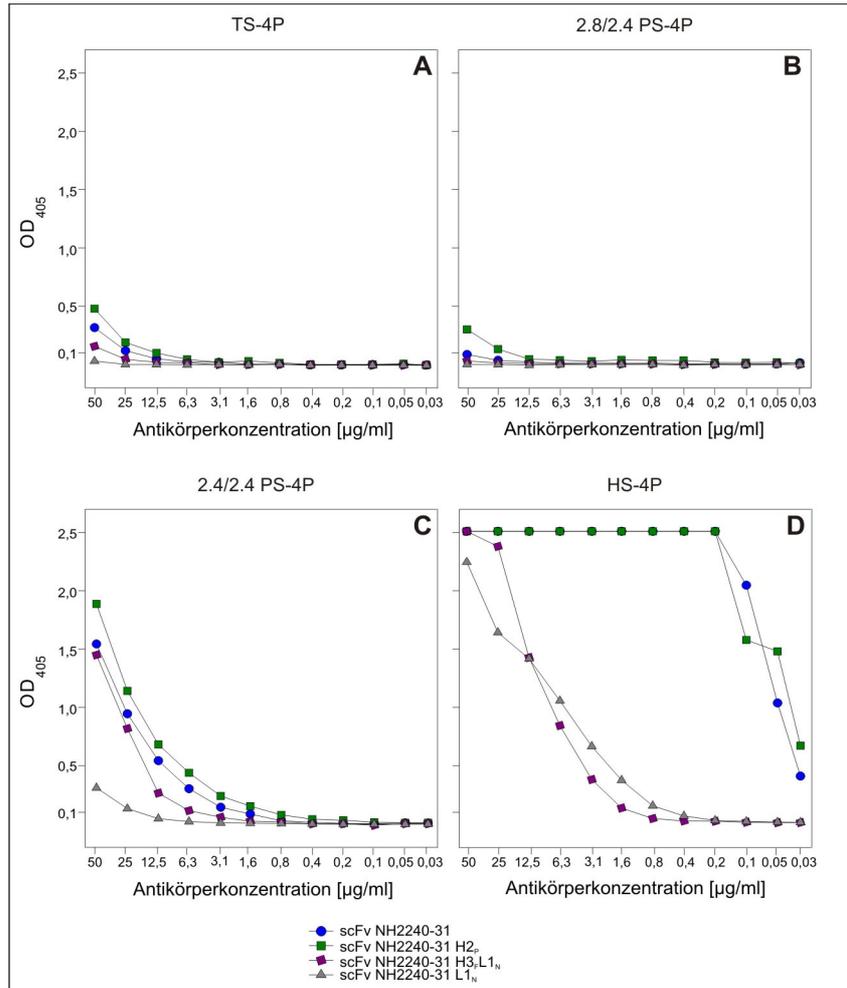
In einem weiteren Experiment wurden die Mutanten L1<sub>N</sub>, H3<sub>F</sub>L1<sub>N</sub>, H2<sub>P</sub> des scFv NH2240-31 (III.1) im Vergleich zum unveränderten scFv NH2240-31 getestet (Abb. 26). Für alle vier scFv konnte keine Bindung auf 2.4 TS-4P (Abb. 26A) und 2.8/2.4 PS-4P (Abb. 26B) festgestellt werden. Auf dem 2.4/2.4 PS-4P (Abb. 26C) kam es zu einer schwachen Bindung. Die Aktivitäten auf dem 2.4/2.4 PS-4P waren nicht auswertbar, da in

## ERGEBNISSE

diesem Experiment die verwendete Kontrolle des NH2240-31 eine weitaus geringere Aktivität zeigte im Vergleich zum Bindungstest auf Abb.26D. Auf dem HS-4P (Abb. 26D) zeigte sich dagegen eine deutliche Reduktion der Affinität der Mutanten NH2240-31 L1<sub>N</sub> und H3<sub>F</sub>L1<sub>N</sub> (126x) im Vergleich zum scFv NH2240-31 und der Mutante H2<sub>P</sub>.



**Abb. 25:** ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokongulate mit Lipoid A-Grundgerüst. ScFv NH2240-31 WT, H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> und SAG506-01 WT auf 20 pmol immobilisierten Neoglycokongulaten, gezeigt sind die Bindungskurven der Absorption bei 405 nm gegen die Antikörperkonzentration. A: BBP, B: 2.4 TS-4P, C: 2.8/2.4 PS-4P, D: 2.4/2.4 PS-4P, E: HS-4P.



**Abb. 26:** ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokongjugate mit Lipoid A-Grundgerüst. ScFv NH2240-31, H2<sub>p</sub>, L1<sub>N</sub> und H3<sub>F</sub>L1<sub>N</sub> auf 20 pmol immobilisierten Neoglycokongjugaten, gezeigt sind die Bindungskurven der Absorption bei 405 nm gegen die Antikörperkonzentration. A: 2.4 TS-4P, B: 2.8/2.4 PS-4P, C: 2.4/2.4 PS-4P, D: HS-4P.

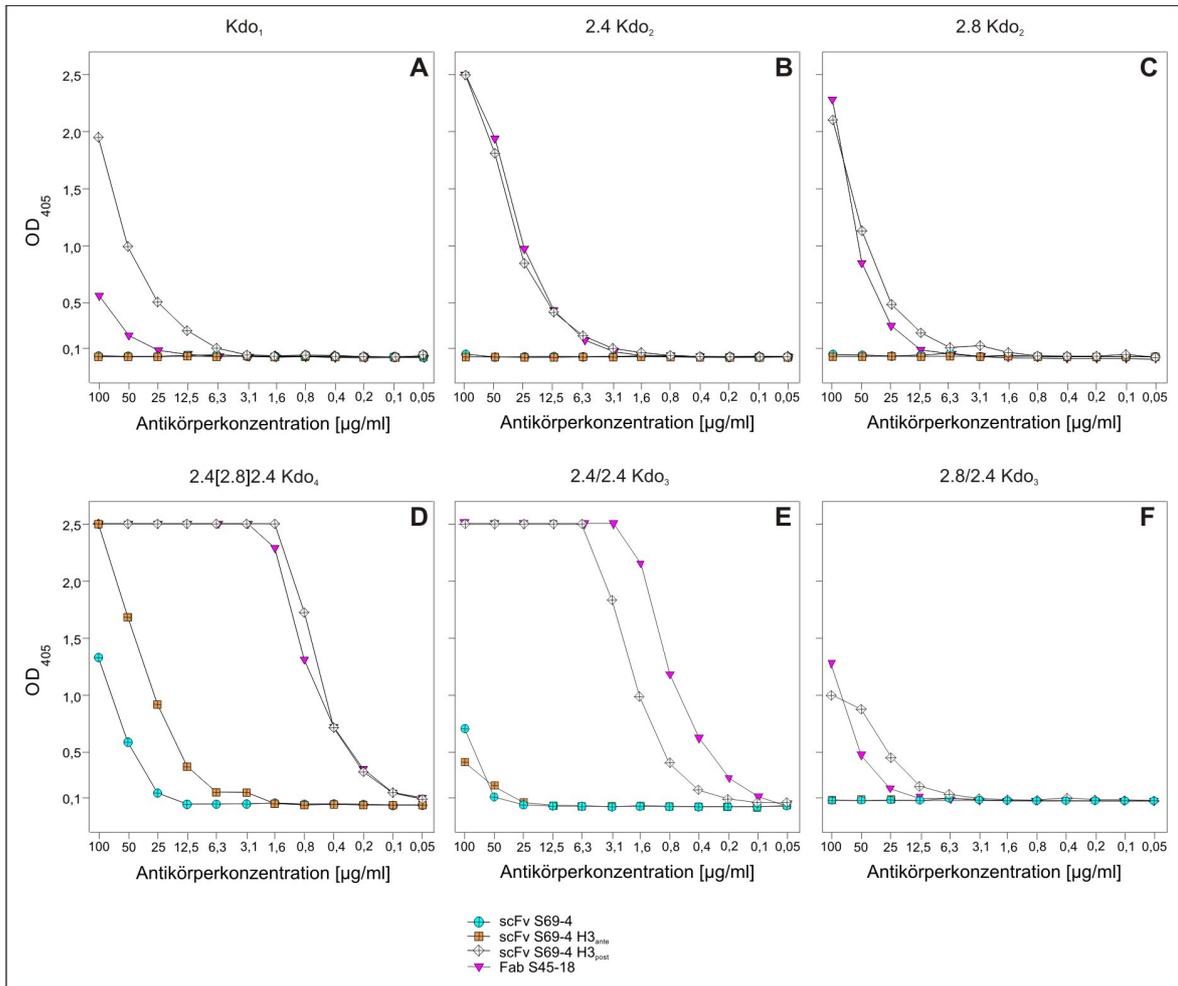
### III.6.2 Untersuchungen zum Einfluss der CDR H3-Struktur auf die Bindung verschiedener Kdo-Oligosaccharide

#### III.6.2.1 ELISA mit Kdo-haltigen Neoglycokongjugaten ohne Lipoid A-Grundgerüst

Um den Einfluss der CDR H3 Primärstruktur der mAk S69-4 und S45-18 zu verstehen, wurden weitere ELISA-Bindungsstudien mit dem scFv S69-4 und den Mutanten scFv S69-4 H3<sub>ante</sub> (93,96-96bALIY/VIYS) und scFv S69-4 H3<sub>post</sub> (98-100bDYDDA/GSRDG) in einer Antikörperkonzentration von 100 µg/ml bis 50 ng/ml durchgeführt. Als Vergleich diente das Fab S45-18 das aufgrund seiner hohen Affinität in einer Verdünnung von 1:100

## ERGEBNISSE

eingesetzt wurde. Die Ergebnisse auf Konjugaten ohne Lipoid A-Grundgerüst sind in Abb. 27 dargestellt.



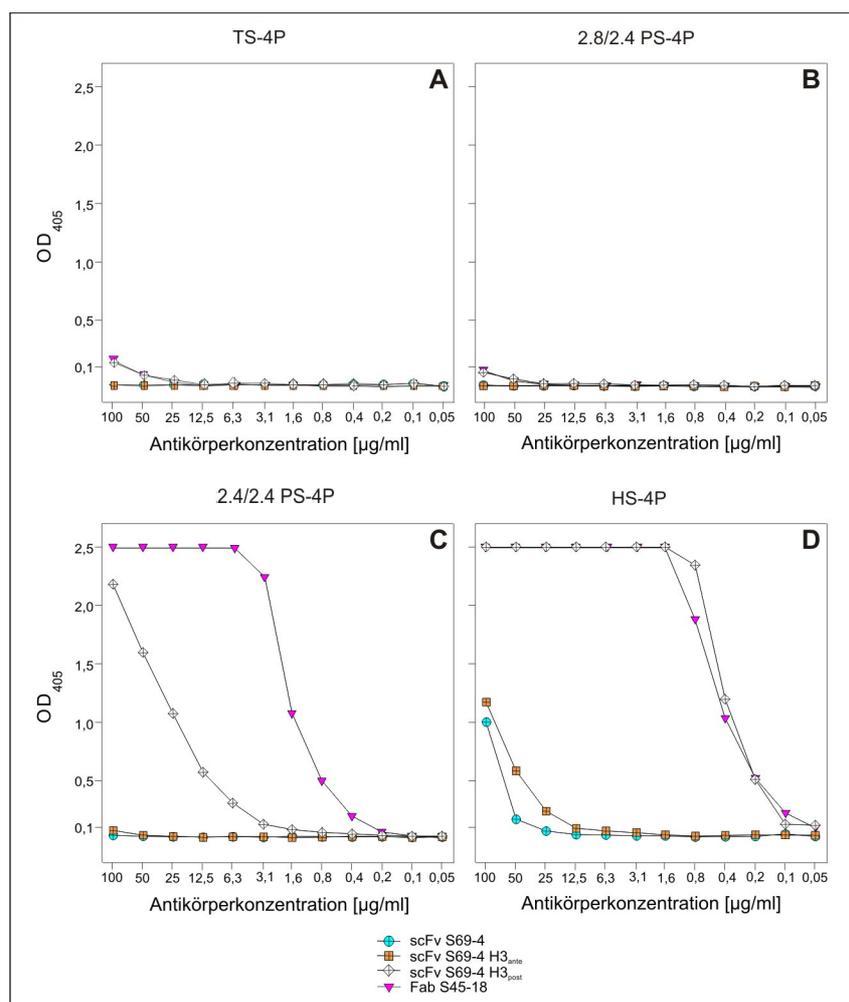
**Abb. 27:** ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokonjugate ohne Lipoid A-Grundgerüst. ScFv S69-4, S69-4 H3<sub>ante</sub>, S69-4 H3<sub>post</sub> und 1:100 verdünnter Fab S45-18 auf 20 pmol immobilisierten Neoglycokonjugaten. Gezeigt sind die Bindungskurven der Absorption bei 405 nm gegen die Antikörperkonzentration. A: Kdo<sub>1</sub>, B: 2.4 Kdo<sub>2</sub>, C: 2.8 Kdo<sub>2</sub>, D: 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub>, E: 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub>, F: 2.8/2.4 Kdo<sub>3</sub>.

Auf den Konjugaten Kdo<sub>1</sub>, 2.4 Kdo<sub>2</sub>, 2.8 Kdo<sub>2</sub> und 2.8-2.4 Kdo<sub>3</sub> (Abb. 27A, B, C, F) waren für das scFv S69-4 und die Mutante scFv S69-4 H3<sub>ante</sub>, in der die vier Aminosäuren vor dem H<sub>97</sub>F in der CDR H3 gegen die des mAk S45-18 ausgetauscht wurden, keine Bindung nachzuweisen. Auf den Konjugaten 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> (Abb. 27E) und dem 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> (Abb. 27D) zeigten diese scFv eine schwache Bindung. Der Austausch der vier Aminosäuren hinter dem H<sub>97</sub>F in der CDR H3 im scFv S69-4 H3<sub>post</sub> dagegen bewirkte eine deutliche Steigerung der Affinität. Sowohl das Kdo-Monosaccharid als auch die Kdo-Disaccharide zeigten jetzt eine schwache Bindung, wobei keine signifikante Differenzierung zwischen diesen Antigenen festzustellen war. Das 2.8/2.4 Kdo<sub>3</sub> wurde

kaum erkannt. Die Liganden 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> und 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> wurden von diesem scFv mit einer hohen Affinität gebunden, wobei die OD<sub>405</sub> = 1,0 bei einer Konzentration von 0,5 bis 1 µg/ml erreicht wurde. Somit wurde das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> um mehr als das 65fache stärker gebunden als vom WT scFv S69-4, jedoch war eine Differenzierung zwischen 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> und 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> nicht gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutante scFv S69-4 H3<sub>post</sub> ähnliche Bindungseigenschaften wie das Fab des S45-18 besaß, jedoch jeweils mit einer geringeren Affinität in Anbetracht der eingesetzten 1:100-Verdünnung des Fab S45-18.

### III.6.2.2 ELISA mit Kdo-haltigen Neoglykokonjugaten mit Lipoid A-Grundgerüst

Auf den getesteten Liganden mit Lipoid A-Grundgerüst war bei der verwendeten Antikörperkonzentration für das scFv S69-4, seine beiden Mutanten H3<sub>ante</sub> und H3<sub>post</sub> und das Fab S45-18 im Gegensatz zu den Lipoid A-freien Konjugaten keine Reaktivität auf 2.4 TS-4P (Abb. 28A) und 2.8/2.4 PS-4P (Abb. 28B) nachzuweisen. Auf dem 2.4/2.4 PS-4P (Abb. 28C) ergab die Mutante scFv S69-4 H3<sub>post</sub> eine um das 15fache geringere Bindung als auf dem entsprechenden 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub>. Dieser Unterschied war beim Fab S45-18 nicht zu sehen. Das HS-4P (Abb. 28D) wurde von der Mutante scFv S69-4 H3<sub>post</sub> um das 40fache besser gebunden als das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> und zeigte eine deutliche Differenzierung zwischen diesen beiden Oligosacchariden, was bei der Verwendung der Konjugate ohne Lipoid A-Grundgerüst nicht beobachtet wurde. Diese starke Differenzierung zwischen HS-4P und 2.4/2.4 PS-4P konnte für den Fab S45-18 nicht gezeigt werden, hier wurde um den Faktor 4 zwischen diesen beiden Liganden unterschieden. Auf verschiedenen Oligosacchariden konnte eine signifikante Steigerung der Bindung des scFv S69-4 H3<sub>post</sub> gegenüber dem scFv S69-4 erreicht werden. Die Affinität für das am besten erkannte Antigen HS-4P war jedoch um den Faktor 2 geringer im Vergleich zur Reaktivität der H3<sub>A</sub>-Mutante des NH2240-31.

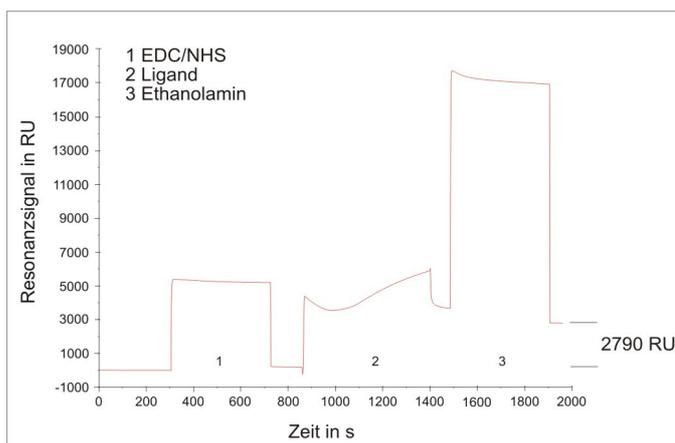


**Abb. 28:** ELISA gegen Kdo-haltige Neoglycokongulate mit Lipoid A-Grundgerüst. ScFv S69-4 WT, S69-4 H3<sub>ante</sub>, S69-4 H3<sub>post</sub> und 1:100 verdünnter Fab S45-18 auf 20 pmol immobilisierten Neoglycokongulaten. Gezeigt sind die Bindungskurven der Absorption bei 405 nm gegen die Antikörperkonzentration. A: 2.4 TS-4P, B: 2.8/2.4 PS-4P, C: 2.4/2.4 PS-4P, D: HS-4P.

### III.7. Bestimmung von Bindungskonstanten durch Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen (BIAcore)

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) sollten die Bindungseigenschaften der generierten Antikörperfragmente weiter untersucht werden. Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Endpunkt-Analysen, ist mit dieser Technologie eine Beobachtung der Bindungsreaktion in Echtzeit und eine Bestimmung von Bindungskonstanten möglich. Für die Etablierung des Systems sollte zunächst die Bindungsreaktion zwischen dem scFv NH2240-31 und dem Oligosaccharid 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> (HS-4P<sup>1</sup> II.1.3) untersucht werden.

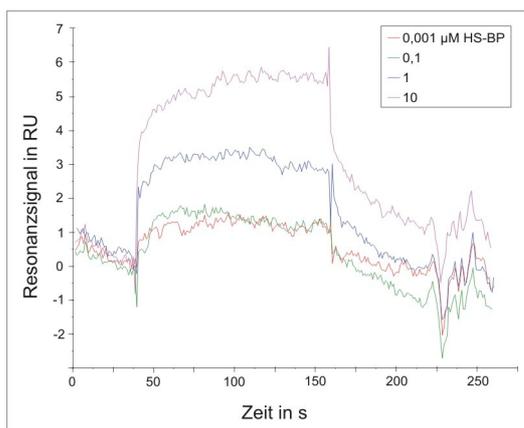
Als Referenzantikörper diente der mAk WN1 222-5 (II.1.4), der nicht an Kdo-Oligosaccharide von Chlamydien bindet. In einem Vortest (II.5.4) wurde für beide Antikörper auf Basis der elektrostatischen Wechselwirkung mit der Sensorchip-Oberfläche ein geeigneter pH-Wert für die Immobilisierung bestimmt. Die Messzelle des Sensorchips wurde mit dem scFv NH2240-31 bei einem pH-Wert von 3,72 belegt. Die Resonanzantwort erreichte nach einer Injektion von 45  $\mu$ l bei einer Proteinkonzentration von 50  $\mu$ g/ml ein Signal von 2790 RU (Abb. 29), was einer Massenlagerung von 2,8  $\text{ng}/\text{mm}^2$  entspricht. Um gleiche Messbedingungen zu schaffen, wurde der mAk WN1 222-5 in ähnlicher Belegungsrate immobilisiert. Für diesen Antikörper waren 10  $\mu$ l bei gleicher Proteinkonzentration und einem pH-Wert von 5,5 nötig, um 2650 RU zu immobilisieren. Abb. 29 zeigt beispielhaft das Sensorgramm der Immobilisierung des scFv NH2240-31.



**Abb. 29:** Sensorgramm einer Immobilisierung des scFv NH2240-31 auf einem CM5-Sensorchip, aufgetragen ist das Resonanzsignal gegen die Zeit.  
1: Injektionen von 35  $\mu$ l EDC/NHS, 2: 45  $\mu$ l 50  $\mu$ g/ml ScFv NH2240-31, 3: 35  $\mu$ l Ethanolamin-HCl pH 8,5.

Nach der Injektion von EDC/NHS (Abb. 29-1) blieb das Resonanzsignal um etwa 90 RU gegenüber der Basislinie erhöht, was die Generierung von NHS-Estern an der carboxymethylierten Dextranmatrix anzeigt. Wie in Abb. 28-2 sichtbar ist, kam es während der Injektion des scFv NH2240-31 zu einem Anstieg des Signals um etwa 4000 RU. Nach der Behandlung mit Ethanolamin (Abb. 29-3) blieben von dem immobilisierten scFv NH2240-31 auf der Oberfläche 2790 RU erhalten.

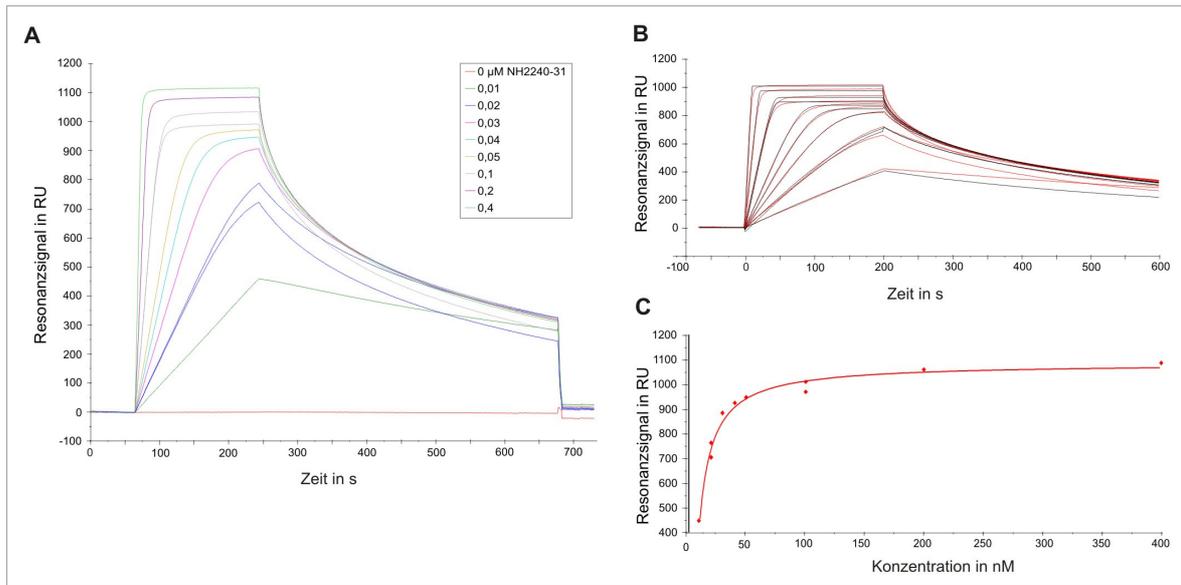
Für die Bindungsreaktion zwischen immobilisiertem NH2240-31 und dem Oligosaccharid 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> wurden bei einer Flussrate von 20  $\mu$ l/min vier Konzentrationen von 0,001 bis 10  $\mu$ M HS-BP (II.1.3) in einem Volumen von 40  $\mu$ l über beide Zellen gegeben und im Anschluss an jede Injektion die Oberfläche mit 20  $\mu$ l Laufpuffer gewaschen.



**Abb. 30:** SPR-Bindungskurven der Interaktion von 0,001 bis 10  $\mu\text{M}$  HS-BP mit 2790 RU immobilisiertem NH2240-31. Assoziation 40  $\mu\text{l}$ , Dissoziation 20  $\mu\text{l}$  bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Die Sensorgramme der Messung (Abb. 30) nach Subtraktion des Referenzsensorgramms zeigten eine Bindung zwischen dem scFv NH2240-31 und dem HS-BP. Bei dieser Messung betrug das Resonanzsignal nur 5,5 RU bei 10  $\mu\text{M}$  HS-BP und deutete darauf hin, dass der Antikörper während der Immobilisierung inaktiviert wurde.

Deshalb wurden stattdessen die Oligosaccharide als BSA-Neoglycokonjugate auf der Sensorchip-Oberfläche immobilisiert. Aufgrund der Ergebnisse aus einem Vortest (II.5.4) wurde die Immobilisierung des HS-4P (HS-4P<sup>1</sup> II.1.3) bei einem pH-Wert von 4,0 durchgeführt. Das Neoglycokonjugat aus BBP und BSA (II.1.3) konnte nicht als Referenz eingesetzt werden, da es schlecht in die Carboxymethyl-dextran-Schicht der Sensorchip-Oberfläche eindrang und somit nicht gut immobilisiert werden konnte. Daher wurde für die Referenzzelle BSA ohne ein konjugiertes Oligosaccharid ausgewählt. In der Messzelle konnten 1070 RU bei einer Injektion von 15  $\mu\text{l}$  des HS-4P Konjugats (Konz. 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  immobilisiert werden, was einer Massenveränderung von 1,07  $\text{ng}/\text{mm}^2$  auf der Oberfläche entsprach. Nach einer Injektion von 7,5  $\mu\text{l}$  BSA wurden bei gleicher Konzentration etwa 2728 RU (2,73  $\text{ng}/\text{mm}^2$ ) an die Dextran-Schicht gebunden. Die Bindungskurven des scFv NH2240-31 mit immobilisiertem HS-4P<sup>1</sup> (II.1.3) (Abb. 31A) wurden bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  aufgenommen und die Probeninjektion erfolgte für Analyt-Konzentrationen von 0,01 bis 0,4  $\mu\text{M}$ . Von den Sensorgrammen wurden sowohl Blindwert- (Injektion von Puffer) als auch das Sensorgramm der Referenzzelle subtrahiert. Im Anschluss an einen Bindungszyklus erfolgte eine Regenerierung der Oberfläche mit einer Injektion von 2  $\mu\text{l}$  10 mM NaOH, da auf diese Weise eine stabile Basislinie erhalten wurde.



**Abb. 31:** SPR-Bindungsdaten der Interaktion scFv NH2240-31 gegen immobilisiertes HS-4P<sup>1</sup> nach Referenzabzug. A: Sensorgramm-Overlay des Resonanzsignals gegen die Zeit 0 - 0,4 μM scFv gegen 1070 RU HS-4P<sup>1</sup> (II.1.3). Assoziation 60 μl, Dissoziation 120 μl bei einer Flussrate von 20 μl/min, Regenerierung mit 10 mM NaOH 2 μl bei 20 μl/min. B: nichtlineare Kurvenanpassung, C: Bindung im Gleichgewicht  $R_{max}$  gegen die scFv-Konzentration.

Bei den eingesetzten Analytkonzentrationen lag das höchste Resonanzsignal bei etwa 1100 RU (Abb. 31A). Bei höheren scFv-Konzentrationen war ein sehr steiler Anstieg in der Assoziationsphase zu beobachten, die nach wenigen Sekunden in eine Sättigung überging. Da am Ende der Dissoziation die Basislinie nicht auf den Ursprungswert zurückkehrte, wurde eine kurze Regenerierung mit NaOH durchgeführt. Die Analyse der sich im Gleichgewicht befindenden Bindungsreaktion bei unterschiedlichen Konzentrationen des Analyten ergab, dass eine Sättigung der Bindung erreicht wurde (Abb. 31C). Über die Formel  $R_{theo} = MW_{Analyt}/MW_{Ligand} * RU_{Ligand} * \text{Bindungsstöchiometrie}$  (Karlsson und Larsson *et al.*, 2004) wurde eine theoretische maximale Bindungskapazität  $R_{theo}$  von 2618 RU bestimmt. Somit waren für die Bindung nur ca. 50 % der immobilisierten Moleküle verfügbar. Für alle durchgeführten Analysen wurden nur monomere scFv eingesetzt und es konnte für alle Auswertungen der Bindungsreaktionen ein 1:1-Bindungsmodell zugrunde gelegt werden.

Nach den gemessenen Bindungskurven sollte der  $K_D$ -Wert bei  $R_{max}/2$ , also zwischen 10 und 20 nM liegen. Die Auswertung der Bindungskurven mit Hilfe der BIAevaluation Software (BIAcore, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) erfolgte anhand einer globalen Kurvenanpassung (Fitting, Abb. 31B) auf der Basis des Langmuir-Modells sowie im Gleichgewicht über die Resonanzeinheiten (Abb. 31C). Letztere ergab einen

## ERGEBNISSE

$K_D$ -Wert von  $1,3 \cdot 10^{-9}$  M bei einer Standardabweichung von  $1,2 \cdot 10^{-9}$  M. Unter diesen Bedingungen lag der Wert  $R_{\max}/2$  bei ca. 500 RU und damit nicht im gemessenen Konzentrationsbereich (Abb. 31C). In Abb. 31B sind die gemessenen Bindungskurven (schwarz) und die berechneten Kurven (rot) dargestellt. Im Anfangsbereich der Assoziation zum Zeitpunkt der Injektion, beim Übergang in die Sättigung und in der gesamten Dissoziationsphase waren größere Abweichungen von bis zu 80 RU festzustellen. Über die Software wurde ein  $K_D$ -Wert von  $4,5 \cdot 10^{-9}$  M berechnet bei einer Assoziationsrate ( $k_a$ ) von  $2,86 \cdot 10^7$  1/Ms und einer Dissoziationsrate ( $k_d$ ) von  $13 \cdot 10^{-2}$  1/s. Alle Werte sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Analyt	immobilisierter Ligand in RU	$R_{\text{theo}}$ in RU $R_{\text{max}}$ in RU	$k_a \cdot 10^7$ in 1/Ms	$k_d \cdot 10^{-2}$ in 1/s	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Fitting	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Gleichgewicht
scFv NH2240-31	HS-4P (V5228) 1070	$R_1$ 2618 $R_2$ 1100	2,86 +/- 0,24	13 +/- 0,11	4,5	1,3 +/- 1,2

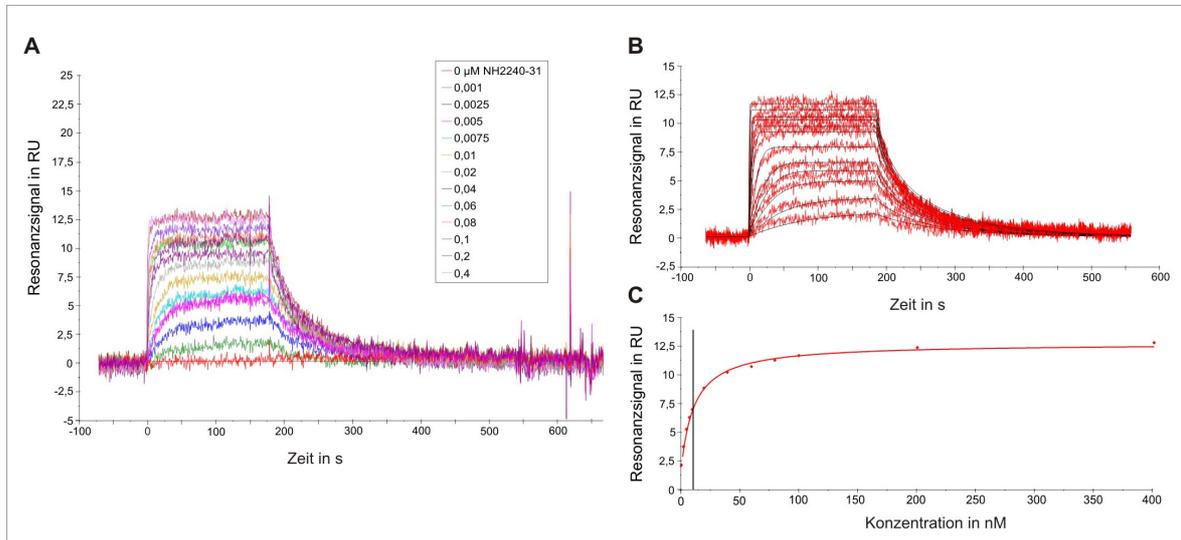
**Tab. 13:** Bindungsraten der Interaktion scFv NH2240-31 und HS-4P<sup>1</sup> über SPR bestimmt.

Die Überprüfung des Kurvenfittings mit der Evaluationssoftware ergab jedoch einen Hinweis auf eine Limitierung des Massentransports und somit auf falsche  $K_D$ -Werte. Deshalb wurden die weiteren Experimente bei einer geringeren Belegung durchgeführt. Mit der Verringerung der Liganddichte (1000 bis 100 RU Ligand) wurde eine deutliche Verbesserung der Kurvenanpassung festgestellt. Für die Bindungskurven der niedrigen scFv-Konzentrationen waren auch unter Berücksichtigung der geringeren Resonanzantwort weniger starke Residuen festzustellen und die  $K_D$ -Wert-Bestimmung war bei diesen am zuverlässigsten. Daher erfolgten die endgültigen Bindungsexperimente auf einem Sensorchip auf dem so wenig wie möglich Ligand immobilisiert war. Die Liganddichte auf der Chipoberfläche wurde zusätzlich durch Verwendung eines Konjugats mit niedrigem Belegungsgrad (HS-4P<sup>2</sup> II.1.3, 4,3 Ligandmoleküle pro BSA-Molekül) verringert. Unter diesen Bedingungen war die Immobilisierungsrate des BSA-BBP Konjugates ausreichend und konnte als Referenz eingesetzt werden.

Für die Messung wurden Konjugate des HS-4P mit 44 RU (ca. 44 pg/mm<sup>2</sup>) und des BBP mit 32 RU immobilisiert. Die Bindungsexperimente wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Assoziation 180 s, Dissoziation 360 s bei einer Flussrate von 30 µl/min, Regenerierung nach jeder Bindungsreaktion mit 2 µl 10 mM NaOH bei 20 µl/min. Die Sensorgramme des scFv NH2240-31 in Konzentrationen von 0 bis 0,4 µM auf HS-4P nach

## ERGEBNISSE

Blindwert- und Referenzsubtraktion (Abb. 32A) ergaben konzentrationsabhängig maximale Intensitäten im Gleichgewicht von 1,5 bis 13 RU und zeigten eine Sättigung der Bindung (Abb. 32C).



**Abb. 32:** SPR-Bindungsdaten der Interaktion scFv NH2240-31 gegen immobilisiertes HS-4P<sup>2</sup> nach Referenzabzug. A: Sensorgramm-Overlay des Resonanzsignals gegen die Zeit der Interaktion von 0 - 0,4  $\mu\text{M}$  scFv gegen 44 RU immobilisiertes HS-4P<sup>2</sup> (II.1.3). Assoziation 90  $\mu\text{l}$ , Dissoziation 180  $\mu\text{l}$  bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ , Regenerierung mit 10 mM NaOH 2  $\mu\text{l}$  bei 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ . B: nichtlineare Kurvenanpassung, C: Bindung im Gleichgewicht  $R_{\text{max}}$  gegen die ScFv-Konzentration.

Auch auf dieser Oberfläche war bei den höheren scFv-Konzentrationen eine sehr schnelle Assoziation zu erkennen. Die theoretische maximale Bindungskapazität lag für diese Oberfläche bei 78 RU. Der berechnete  $K_D$ -Wert aus den Signalintensitäten im Gleichgewicht betrug  $1 \cdot 10^{-8}$  M (Abb. 32C). Durch Fitting wurde eine Assoziationsrate ( $k_a$ ) von  $1,44 \cdot 10^7$  1/Ms und eine Dissoziationsrate ( $k_d$ ) von  $6,1 \cdot 10^{-2}$  1/s bestimmt. Hieraus ergab sich ein resultierender  $K_D$ -Wert von  $5 \cdot 10^{-9}$  M (Tab. 14).

Analyt	immobilisierter Ligand in RU	${}_1 R_{\text{theo}}$ in RU	${}_2 R_{\text{max}}$ in RU	$k_a \cdot 10^7$ in 1/Ms	$k_d \cdot 10^{-2}$ in 1/s	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Fitting	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Gleichgewicht
scFv NH2240-31	HS-4P (V5329) 44	${}_1$ 78	${}_2$ 13	1,44	6,1	5,0	10 +/-0,92

**Tab. 14:** Bindungsraten der Interaktionen scFv NH2240-31 und HS-4P<sup>2</sup> (II.1.3) über SPR bestimmt.

Eine Überprüfung der durch Kurvenfitting berechneten Kinetik wurde mittels linearer Regression (I.5.4) durchgeführt. Die Linearisierung der Dissoziationskurven der ersten 100 s ergab eine durchschnittliche Steigung von 0,01774 (Standardabweichung 0,0032),

## ERGEBNISSE

die dem  $k_d$ -Wert in 1/s entsprach. Die Linearisierung der Assoziation erfolgte über den  $k_s$ -Wert. Der Anstieg der Gerade aus dem Graphen  $k_s$  gegen die scFv-Konzentration ergab einen  $k_a$ -Wert von  $3,7 \cdot 10^6$  1/Ms. Für die Assoziation wurden die ersten 1 bis 4 s nicht berücksichtigt. Der  $K_D$ -Wert aus Dissoziations- und der Assoziationsrate betrug  $5 \cdot 10^{-9}$  M und war somit trotz nicht identischer Reaktionsraten der Dissoziationskonstante  $K_D$  aus dem globalen Fitting identisch. Ein Scatchard-Graph der Gleichgewichtsantwort  $R_{eq}$  geteilt durch die Analytkonzentration C gegen C führte zu einer Geraden mit einem Anstieg k von  $-0,1429$  wodurch aus  $-1/k$  ein  $K_D$ -Wert von  $7 \cdot 10^{-9}$  M berechnet wurde. Trotz des stärkeren Rauschens aufgrund des geringen Resonanzsignals war auf dieser mit minimal immobilisiertem HS-4P belegten Oberfläche ein gutes Kurvenfitting und eine Bestimmung signifikanter kinetischer Bindungsdaten möglich. Auf dieser Oberfläche wurden nun auch die anderen scFv auf ihre Bindungsstärke untersucht. Getestet wurden das scFv SAG506-01, NH2240-31 und dessen Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> sowie das scFv S69-4 und dessen Mutanten H3<sub>ante</sub> und H3<sub>post</sub> sowie das Fab S45-18. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst dargestellt.

Analyt	$R_{max}$ in RU	$k_a \cdot 10^7$ in 1/Ms	$k_d \cdot 10^{-2}$ in 1/s	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Fitting	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Gleichgewicht
NH2240-31 WT	13,0	1,44 +/-0,0087	6,1 +/-0,0087	5,0	10,0 +/-0,92
NH2240-31 H3 <sub>F</sub>	12,0	0,39 +/-0,0031	3,4 +/-0,0076	8,5	14,0 +/-0,15
NH2240-31 H3 <sub>A</sub>	9,0	0,42 +/-0,0057	5,9 +/-0,0500	14,0	29,8 +/-0,34
S69-4 WT	6,5	0,07 +/-0,0005	9,1 +/-0,0096	133,0	1170,0 +/-0,02
S69-4 H3 <sub>ante</sub>	.. 5,5	0,24 +/-0,0011	51,0 +/-0,8100	216,0	1954,0 +/-0,53
S69-4 H3 <sub>post</sub>	13,0	0,50 +/-0,0030	4,8 +/-0,0150	9,2	13,0 +/-0,98
SAG506-01 WT	11	0,43 +/-0,0012	1,9 +/-0,0050	4,4	8,0 +/-0,69
Fab S45-18	22	2,66 +/-0,0430	9,1 +/-0,1500	3,4	9,0 +/-0,51

**Tab. 15:** Bindungsraten der Interaktionen diverser scFv und Fab mit HS-4P<sup>2</sup> (II.1.3) über SPR bestimmt.

Die über das Fitting bestimmten  $K_D$ -Werte auf dem HS-4P waren für die scFv NH2240-31, dessen H3<sub>F</sub>-Mutante, für den SAG506-01, den Fab S45-18 und auch für die Mutante scFv S69-4 H3<sub>post</sub> vergleichbar und bewegten sich zwischen  $4$  und  $9 \cdot 10^{-9}$  M. Hier zeigte

## ERGEBNISSE

---

sich eine geringe Bindungskonstante vor allem aufgrund einer hohen Assoziationsrate. Im Vergleich wurde für die H3<sub>A</sub>-Mutante des NH2240-31 ein etwas höherer K<sub>D</sub>-Wert von 14\*10<sup>-9</sup> M bestimmt, obwohl die Reaktionsraten k<sub>a</sub> und k<sub>d</sub> keinen signifikanten Unterschied ergaben. Die errechneten K<sub>D</sub>-Werte im Gleichgewicht der Bindung waren für alle Interaktionen um den Faktor 2 bis 3 höher als die Werte aus dem Fitting, spiegelten aber die gleiche Tendenz wieder. Größere Unterschiede in der Bindungsstärke waren für das scFv S69-4 und die Mutante scFv S69-4 H3<sub>ante</sub> festzustellen. Die Affinität des scFv S69-4 war für das HS-4P deutlich geringer (um das 15fache) gegenüber der Mutante scFv S69-4 H3<sub>post</sub>. Die Messung des scFv S69-4 H3<sub>ante</sub> ergab eine 24fach schwächere Bindungsstärke gegenüber HS-4P im Vergleich zum scFv S69-4 H3<sub>post</sub>. Für die Bindung des scFv S69-4 wurde eine geringere Assoziationsrate bestimmt, während das scFv S69-4 H3<sub>ante</sub> eine höhere Dissoziationsrate aufwies. Die K<sub>D</sub>-Werte aus dem Gleichgewicht wichen für diese beiden Antikörper sehr stark von denen aus dem Fitting ab, da bei den getesteten scFv-Konzentrationen keine Sättigung der Oberfläche erreicht wurde. Für das scFv S69-4 und dessen Mutante H3<sub>ante</sub> wurden im Vergleich zu den anderen getesteten Antikörpern geringere Resonanzsignale detektiert.

Auf gleiche Weise, wie für das HS-4P beschrieben, wurde je ein Sensorchip mit den Neoglycokonjugaten 2.4/2.4 PS-4P und 2.8/2.4 PS-4P belegt. In Tab. 16 sind die Belegungsraten im Vergleich zum HS-4P aufgeführt. Die erhaltenen Sensorgramme auf immobilisiertem 2.4/2.4 PS-4P und 2.8/2.4 PS-4P sind in Abb. 33 am Beispiel des NH2240-31 gezeigt.

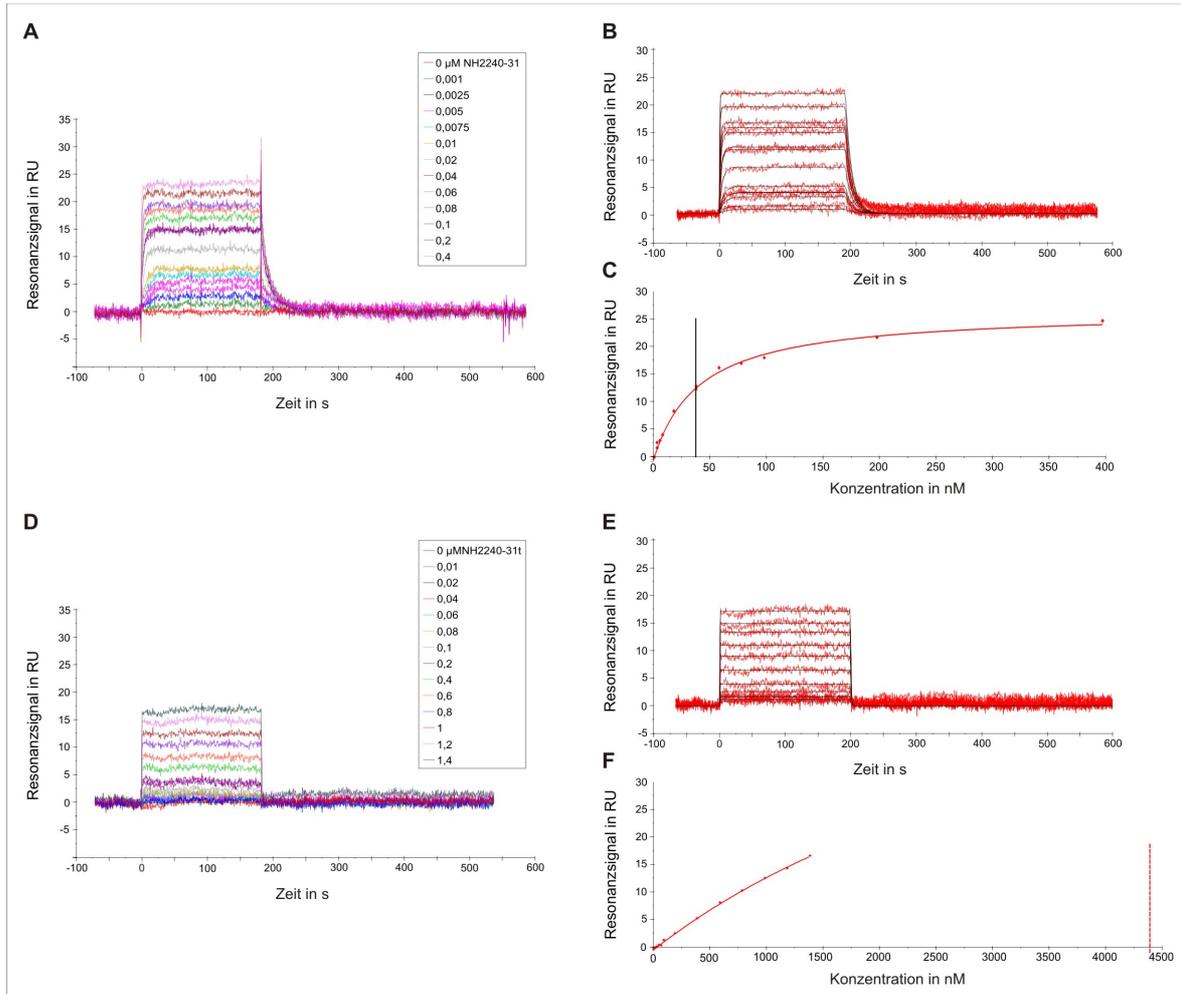
---

Zellenpaar	Ligand auf der Referenzzelle	Ligand auf der Messzelle
1	32 RU BBP	44 RU HS-4P
2	11 RU BBP	32 RU 2.4/2.4 PS-4P
3	40 RU BBP	70 RU 2.8/2.4 PS-4P

---

**Tab. 16:** Belegungsdaten aller immobilisierten Liganden. Die Anzahl der Ligandmoleküle/BSA sind in II.1.3 aufgeführt.

## ERGEBNISSE



**Abb. 33:** SPR-Bindungsdaten der Interaktion scFv NH2240-31 gegen 2.4/2.4 PS-4P und 2.8/2.4 PS-4P nach Referenzabzug. A: Sensorgramm-Overlay des Resonanzsignals gegen die Zeit der Interaktion von 0 - 0,4  $\mu\text{M}$  scFv gegen 32 RU 2.4/2.4 PS-4P, B: nichtlineare Kurvenanpassung und C: Grafik  $R_{\text{max}}$  im Gleichgewicht gegen die scFv-Konzentration für diese Interaktion. D: Sensorgramm-Overlay des Resonanzsignals gegen die Zeit der Interaktion von 0 bis 1,4  $\mu\text{M}$  scFv gegen 70 RU 2.8/2.4 PS-4P, E: nichtlineare Kurvenanpassung und F: Grafik  $R_{\text{max}}$  im Gleichgewicht gegen die scFv-Konzentration für diese Interaktion. Für alle Experimente galt: Assoziation 90  $\mu\text{l}$ , Dissoziation 180  $\mu\text{l}$  bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ , Regenerierung mit 10 mM NaOH 2  $\mu\text{l}$  bei 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Für das scFv NH2240-31 wurden auf immobilisiertem 2.4/2.4 PS-4P (Abb. 33A) ähnliche Bindungskurven erhalten wie für das immobilisierte HS-4P (Abb. 32A) Trotz gleicher scFv-Konzentration und geringerer Liganddichte war jedoch eine etwas höhere Resonanzantwort bis etwa 22 RU gemessen worden. Die Assoziationszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts war auf diesem Konjugat ebenso kurz wie auf dem HS-4P. Dagegen fiel die Dissoziationskurve im Vergleich zu der auf HS-4P schneller ab. In Tabelle 17 sind die Bindungsdaten für verschiedene scFv und das 2.4/2.4 PS-4P Konjugat zusammengefasst.

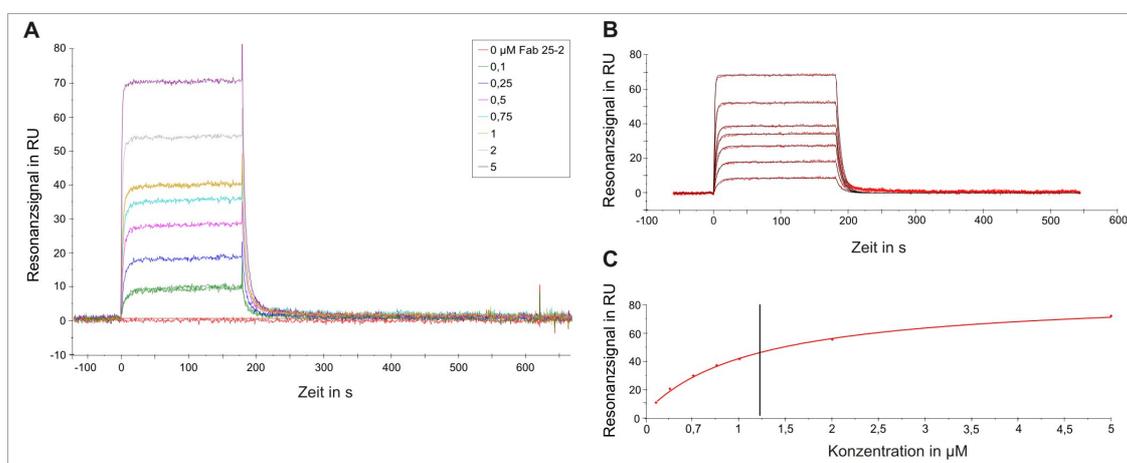
## ERGEBNISSE

Analyt	$R_{\max}$ in RU	$k_a \cdot 10^7$ in 1/Ms	$k_d \cdot 10^{-2}$ in 1/s	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Fitting	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Gleichgewicht
NH2240-31 WT	22,0	1,72 +/-0,0025	18,25 +/-0,000025	10,6	29,2 +/-2,4
NH2240-31 H3 <sub>F</sub>	20,0	0,61 +/-0,0095	10,97 +/-0,1100	18,1	39,0 +/-3,0
NH2240-31 H3 <sub>A</sub>	18,0	0,60 +/-0,015	11,12 +/-0,086	18,5	59,6 +/-5,1
S69-4 WT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S69-4 H3 <sub>ante</sub>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S69-4 H3 <sub>post</sub>	19,0	1,49 +/-0,014	11,01 +/-0,0088	7,4	18,0 +/-1,4
SAG506-01 WT	22,0	0,65 +/-0,011	6,91 +/-0,0007	10,6	31,8 +/-3,4
Fab S45-18	33,0	2,8 +/-0,010	9,4 +/-0,0022	3,0	11,0 +/-1,0

**Tab. 17:** Bindungsraten der Interaktionen diverser scFv und Fab mit 2.4/2.4 PS-4P über SPR bestimmt.

Auf dem 2.4/2.4 PS-4P waren die über ein Fitting berechneten  $K_D$ -Werte des scFv SAG506-01, NH2240-31 und für die Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> sehr ähnlich und lagen im zweistelligen Bereich von 10,6 bis 18,5\*10<sup>-9</sup> M. Die Mutanten zeigten dabei eine langsamere Assoziation bei einer ebenfalls langsameren Dissoziation im Vergleich zum NH2240-31. Für das scFv SAG 506-01 war ein ähnlicher  $k_a$ -Wert wie für die Mutanten gemessen worden, jedoch zeigte dieser Antikörper im Vergleich zum scFv NH2240-31 und den Mutanten einen geringeren  $k_d$ -Wert. Das Fab S45-18 sowie die Mutante scFv S69-4 H3<sub>post</sub> besaßen eine höhere Affinität zum 2.4/2.4 PS-4P. Diese basierte dabei auf einer sehr schnellen Assoziation. Für beide Antikörper und auch für die H3<sub>A</sub>-Mutante des NH2240-31 waren die Affinitäten auf 2.4/2.4 PS-4P mit denen auf HS-4P fast identisch. Für die anderen untersuchten scFv waren aufgrund einer schnelleren Dissoziation um den Faktor 3 die  $K_D$ -Werte etwa doppelt so hoch auf dem 2.4/2.4 PS-4P im Vergleich zum HS-4P. Diese Antikörper differenzierten somit schwach zwischen diesen beiden Liganden. Für das scFv S69-4 und dessen Mutante H3<sub>ante</sub> waren aufgrund der geringen Reaktivität auf dem 2.4/2.4 PS-4P keine zuverlässigen Bindungsdaten ermittelbar. Dies galt für alle untersuchten Antikörper gleichermaßen für das 2.8/2.4 PS-4P. In Abb. 33D sind die Bindungskurven der Interaktion des NH2240-31 mit dem 2.8/2.4 PS-4P beispielhaft gezeigt. Trotz einer höher gewählten Konzentration bis 1,4 µM waren lediglich

Resonanzantworten bis 16 RU im Gleichgewicht gemessen worden. Eine Sättigung der Oberfläche konnte hierbei nicht erreicht werden, wie in Abb. 33F zu sehen ist. Eine Berechnung des  $K_D$ -Wertes über das Gleichgewicht war somit nicht möglich. Die geringe Affinität wurde durch die Form der Kurvenverläufe bestätigt und erlaubte aufgrund der schnellen Kinetiken kein Kurvenfitting. Als Kontrolle für die Funktionalität dieser Oberfläche wurde der Fab S25-2 gemessen, der spezifisch mit dem 2.8/2.4 Trisaccharid reagiert. Abb. 34 zeigt die Bindungskurven von Konzentrationen zwischen 0 – 5  $\mu\text{M}$  Fab S25-2 unter gleichen Bedingungen wie die vorangegangenen Bindungsexperimente.



**Abb. 34:** SPR-Bindungsdaten der Interaktion Fab S25-2 gegen immobilisiertes 2.8/2.4 PS-4P.

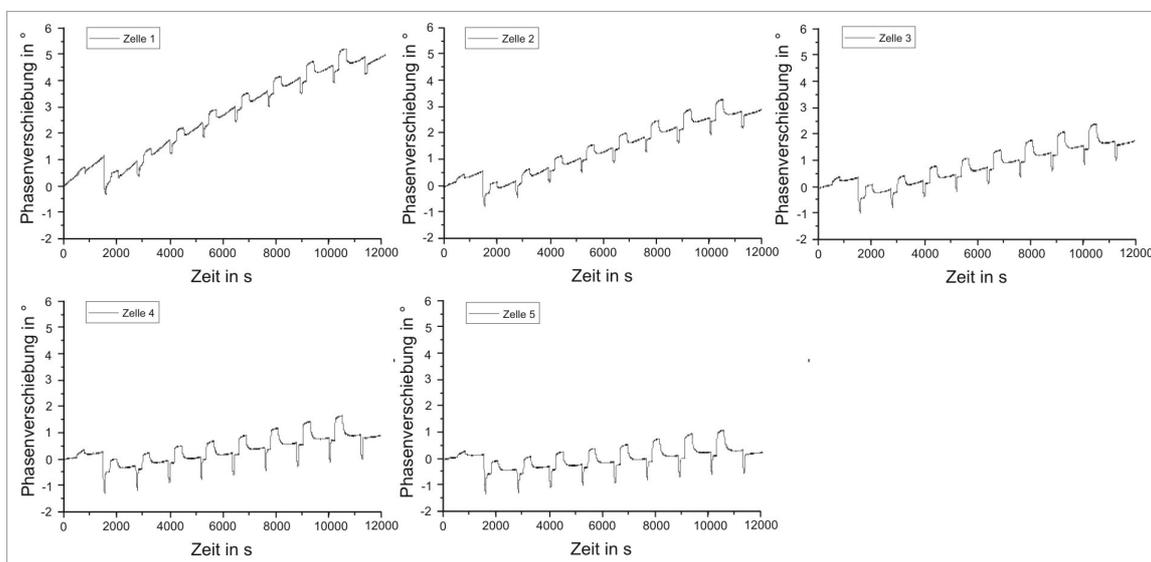
A: Sensorgramm-Overlay des Resonanzsignals gegen die Zeit der Interaktion von 0 - 5  $\mu\text{M}$  Fab gegen 70 RU immobilisiertes 2.8/2.4 PS-4P. Assoziation 90  $\mu\text{l}$ , Dissoziation 180  $\mu\text{l}$  bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ , Regenerierung mit 10 mM NaOH 2  $\mu\text{l}$  bei 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ . B: nichtlineare Anpassung der Bindungskurven, C: Bindung im Gleichgewicht  $R_{\text{max}}$  gegen die Fab-Konzentration.

Die Bindungskurven des Fab S25-2 erreichten auf dem 2.8/2.4 PS-4P eine Signalstärke von 10 - 70 RU bei Konzentrationen bis 5  $\mu\text{M}$ . Trotz der schnell ansteigenden Assoziations- und rasch abfallenden Dissoziationslinie war ein gutes Fitting möglich (Abb. 34B). Daraus wurde eine Assoziationsrate von  $1,584 \cdot 10^5 \pm 0,014 \cdot 10^5$  1/MS, eine Dissoziationsrate von  $0,1252 \pm 0,0011$  1/s und ein  $K_D$ -Wert von  $7,9 \cdot 10^{-7}$  M berechnet.

### III.8. Bestimmung von Bindungskonstanten über Oberflächenakustische Wellen (SAW)

In den ELISA-Bindungsstudien gegen Neoglycokonjugate wurde eine deutliche Differenzierung zwischen HS-4P und 2.4/2.4 PS-4P für die scFv NH2240-31 und die Mutante H3<sub>F</sub> gezeigt. Zudem war ein Unterschied in der Affinität des scFv NH2240-31

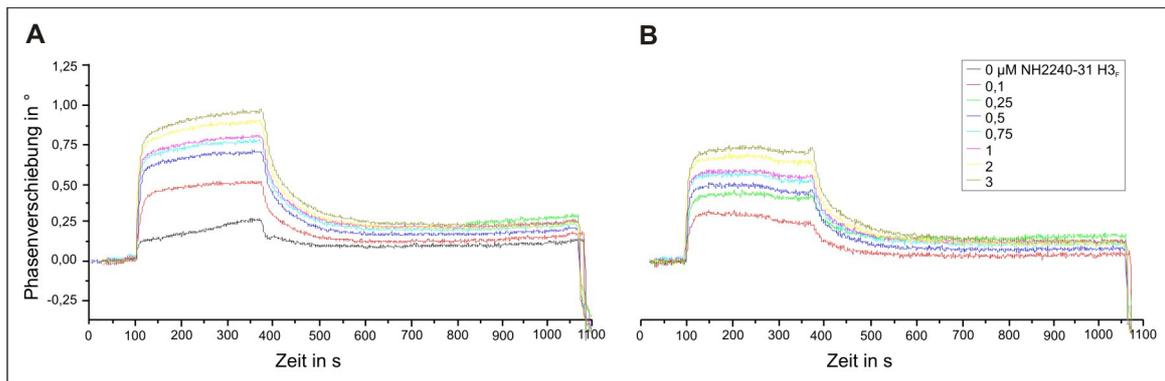
gegenüber den Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> festzustellen. Da dies in den SPR-Studien nicht nachweisbar war, sollten die Bindungseigenschaften der Antikörper mit Hilfe eines weiteren Systems, dem SAW (surface acoustic wave)-Biosensor (S-sens<sup>®</sup> K5 Biosensor, Nanofilm Technologie GmbH, Göttingen) für die Bestimmung von Kinetiken untersucht werden. Fünf aufeinanderfolgende Zellen eines Sensorchips wurden mit HS-4P<sup>2</sup> (II.1.3) immobilisiert. Die Injektion der EDC/NHS-Lösung (II.5.5) führte zu einer Veränderung der Phase in den Zellen um 3,4 bis 3,8°. Nach dem Waschen der Oberfläche mit Puffer war die Basislinie in den Zellen 1 bis 5 um 0,05, 1,75, 1,22, 2,1 bzw. 3,3° erhöht. Die anschließende Injektion von HS-4P erfolgte bei pH 4,0 und resultierte in einer Phasenverschiebung nach dem Waschen von 1 bis 5 um 1,5, 0,7, 0,6, 2,2 bzw. -1,4°. Nach einer Injektion von Ethanolamin-HCl und einer NaOH-Behandlung der Oberfläche waren in Zelle eins 1° Ligand immobilisiert worden, was einer Menge von etwa 10 pg/mm<sup>2</sup> entsprach. Auf den anderen vier Zellen lagen die Werte im Minusbereich. Um die Aktivität und Sensitivität der Oberfläche zu testen, wurde für den Bindungstest zunächst die H3<sub>F</sub>-Mutante des NH2240-31 eingesetzt, da für diesen scFv laut vorangegangener Bindungsstudien auch hier eine geringere Reaktivität vermutet wurde. Abb. 35 zeigt die Aufzeichnung der Phasenveränderung während der scFv-Injektionen.



**Abb. 35:** SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P auf allen fünf Messzellen. Sensorgramme der Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  gegen die Zeit der Interaktion von 0-4  $\mu$ M scFv gegen immobilisiertes HS-4P. Jeder Zyklus beinhaltet eine Assoziation von 200  $\mu$ l und eine Dissoziation von 360  $\mu$ l bei einer Flussrate von 40  $\mu$ l/min sowie ein Regenerierungsschritt mit 50  $\mu$ l 10 mM NaOH.

## ERGEBNISSE

Trotz negativer Immobilisierungswerte für Zelle 2-5 sind auf allen Zellen konzentrationsabhängige Bindungskurven in aufeinander folgenden Zyklen aufgezeichnet worden. Ein Unterschied in der Signalhöhe der Kurven zwischen den einzelnen Zellen konnte nicht festgestellt werden, obwohl die Werte für die Immobilisierung sehr unterschiedlich waren. Das Abfallen der Basislinie nach jedem Bindungszyklus zeigt den Regenerierungsschritt an. Auf allen Zellen war trotz Entgasen des Puffers die Basislinie innerhalb der Messung nicht stabil.



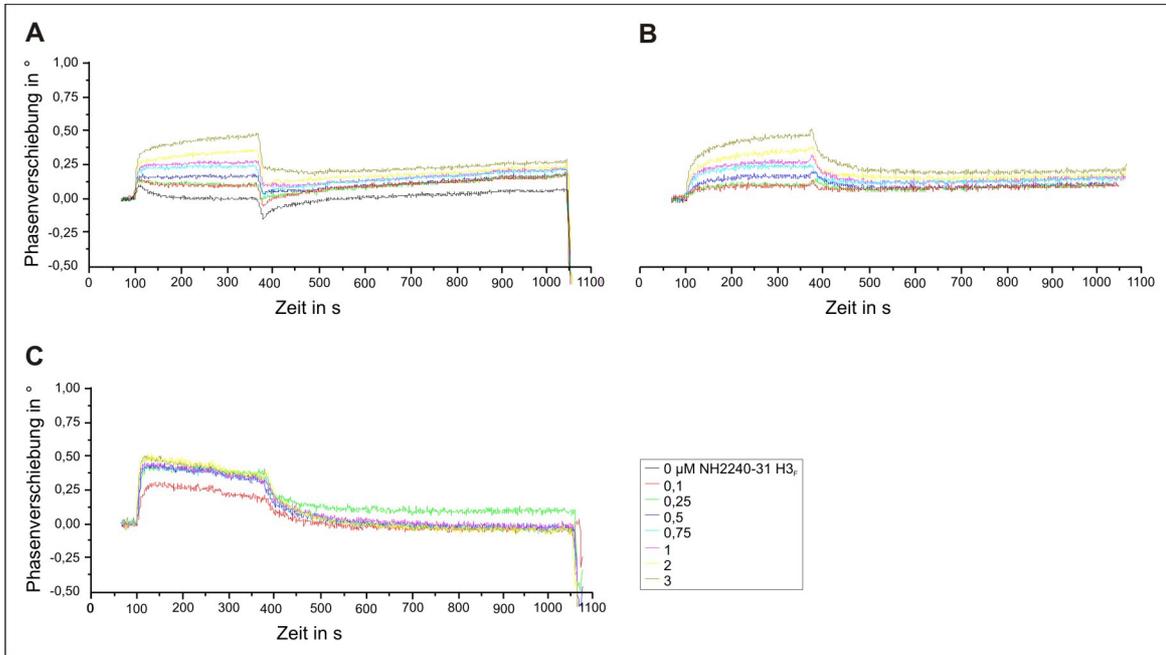
**Abb. 36** A: SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H<sub>3F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P<sup>2</sup> (II.1.3). Sensorgramm-Overlay der Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  gegen die Zeit der Interaktion von 0 - 3  $\mu$ M scFv gegen immobilisiertes HS-4P<sup>2</sup>. Assoziation 200  $\mu$ l, Dissoziation 360  $\mu$ l bei einer Flussrate von 40  $\mu$ l/min, Regenerierung mit 10 mM NaOH 50  $\mu$ l. B: Kurven nach Blindwertsabstraktion.

Die Stärke dieses Abdriftens war auf allen Zellen unterschiedlich. Für die Auswertung der Kurven wurden jene auf Zelle 5 ausgewählt. Die aufgezeichneten Messpunkte wurden in die Auswertungssoftware Microcal Origin™ 6.0G exportiert und die einzelnen Kurven übereinander gelegt (Abb. 36A), ohne Einbeziehen eines Referenzliganden.

Die in Abb. 36A dargestellten Bindungskurven zeigen eine konzentrationsabhängige Phasenverschiebung bis zu 1,0°. Die Pufferinjektion hatte ebenfalls eine Kurvenform, wobei die Basislinie im Plateau im Gegensatz zu den scFv-Injektionen anstieg. Dadurch kam es zu einer Veränderung der Kurvenform nach Blindwertsabstraktion (Abb. 36B) und zu einem leichten Abfall der Basislinie im Plateau. Bevor ein Kurvenfitting und eine zuverlässige  $K_D$ -Wert-Bestimmung durchgeführt werden konnte, war es notwendig einen Sensorchip mit einem Referenzliganden zu immobilisieren. Die kovalente Bindung des BPP als Referenz auf einem Sensorchip erfolgte wie für das HS-4P beschrieben. Obwohl die Phasenveränderung nach EDC/NHS-Aktivierung im Minusbereich lag, konnte nach einer Injektion des Liganden bei pH 3,72 1 – 1,8° Konjugat gebunden werden. Nach der Absättigung mit Ethanolamin-HCl betrug die endgültige Phasenveränderung auf den

## ERGEBNISSE

Zellen 1,0, 1,8, 1,6, 1,4 und 0,6°. Auch hier konnte während des Bindungsexperiments trotz verschiedener Immobilisierungswerte kein Unterschied der Signalhöhe zwischen den Zellen festgestellt werden. Abb. 37A zeigt einen Overlay der Bindungskurven von 0 - 3  $\mu\text{M}$  NH2240-31 H3<sub>F</sub> auf BBP aus Zelle 5.

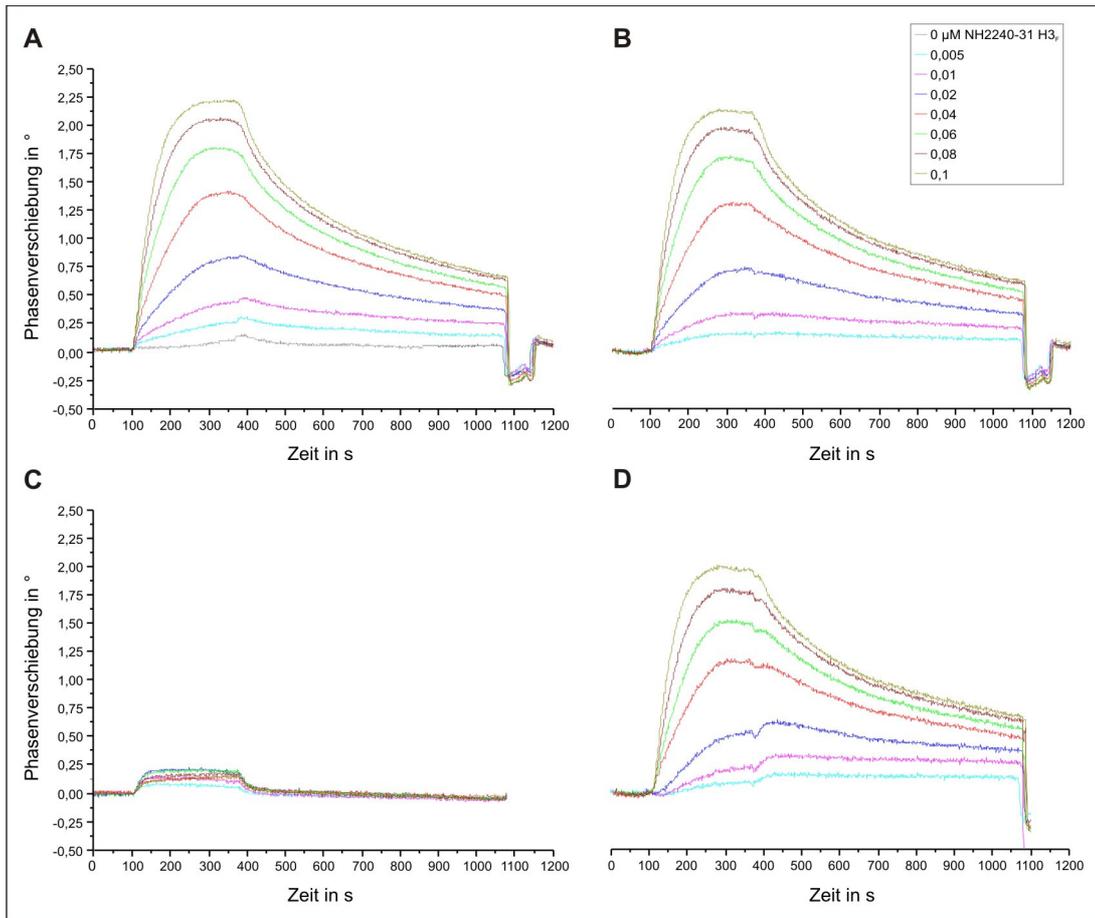


**Abb. 37:** SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P<sup>2</sup> nach Referenzsubtraktion. Sensorgramm-Overlay der Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  gegen die Zeit der Interaktion von 0 - 3  $\mu\text{M}$  scFv gegen ein Referenzligand BBP (A) ohne Blindwertsubtraktion, BBP nach Blindwertsubtraktion (B), HS-4P<sup>2</sup> (II.1.3) nach Blindwert- und Referenzsubtraktion (C). Assoziation 200  $\mu\text{l}$ , Dissoziation 360  $\mu\text{l}$  bei einer Flussrate von 40  $\mu\text{l}/\text{min}$ , Regenerierung mit 10 mM NaOH 50  $\mu\text{l}$ .

Wie in Abb. 37A zu sehen ist, war auf BBP Bindung bis 0,5° detektiert worden. Die Subtraktion des Blindwertes führte zu deutlichen Bindungskurven in einer Signalhöhe von bis zu 0,3° (Abb. 37B). Die Datenpunkte der Kurven auf der Referenz wurden von den entsprechenden Bindungskurven aus der HS-4P-Messung subtrahiert (Abb. 37C). Aufgrund der unterschiedlichen Kurvenform auf BBP und HS-4P waren die resultierenden Bindungskurven nicht gut auswertbar. Auch der geringe Unterschied in der Signalhöhe zwischen beiden Oberflächen führte zu Schwierigkeiten. Um ein höheres Signal für den Messliganden zu erhalten, wurde für eine Immobilisierung eines Sensorchips das Konjugat HS-4P<sup>1</sup> ausgewählt, welches eine höhere BSA-Belegung aufwies (II.1.3). Für eine Optimierung der Oberflächenaktivierung wurde das EDC/NHS frisch aus den Feststoffen angesetzt, gemischt und sofort 350  $\mu\text{l}$  bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  über die Oberfläche gegeben. Die Phasenveränderung erreichte 2,6 – 3,8. Nach dem Waschen war die Basislinie nur noch um 0,2 – 1° gegenüber dem Startpunkt erhöht. Das HS-4P wurde in

## ERGEBNISSE

einem Volumen von 350  $\mu\text{l}$  und einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  bei 20  $\mu\text{l/min}$  injiziert, was zu einer Phasenverschiebung in den Zellen von 6 - 8 $^\circ$  führte, wovon nach dem Waschen 2,2 - 3,9 $^\circ$  gebunden waren. Nach dem Ethanolaminschritt waren in den Zellen eins bis fünf 2,0, 2,1, 2,0, 0,3 und -2,7 $^\circ$  Ligand immobilisiert. Im Anschluss erfolgte eine Injektion von 50  $\mu\text{l}$  10 mM NaOH bei einer Flussrate von 40  $\mu\text{l/min}$ , wodurch die Basislinie um 0,4 $^\circ$  sank. Für die Auswertung wurden die Bindungskurven aus Kanal 4 herangezogen. Die Referenzsubtraktion erfolgte mit Bindungskurven auf Kanal 4 des BBP-Sensorchips.



**Abb. 38:** SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H<sub>3F</sub> gegen HS-4P<sup>1</sup> (II.1.3). Sensorgramm-Overlay der Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  gegen die Zeit der Interaktion von 0 - 0,1  $\mu\text{M}$  scFv gegen immobilisiertes HS-4P<sup>1</sup> ohne Blindwertsubtraktion (A), HS-4P<sup>1</sup> nach Blindwertsubtraktion (B), BBP nach Blindwertsubtraktion (C), HS-4P<sup>1</sup> nach Blindwert- und Referenzsubtraktion.. Assoziation 200  $\mu\text{l}$ , Dissoziation 360  $\mu\text{l}$  bei einer Flussrate von 40  $\mu\text{l/min}$ , Regenerierung mit 50  $\mu\text{l}$  10 mM NaOH.

Im Gegensatz zu den niedrigen Signalen auf HS-4P<sup>2</sup> waren auf der HS-4P<sup>1</sup>-Oberfläche (Abb. 38A) konzentrationsabhängige Bindungskurven mit Phasenverschiebungen von bis zu 2,2 $^\circ$  für das scFv NH2240-31 nachzuweisen. Dazu war eine geringere scFv-Konzentration von 100 nM notwendig. Auf dem HS-4P<sup>2</sup> erreichte die Bindungskurve von

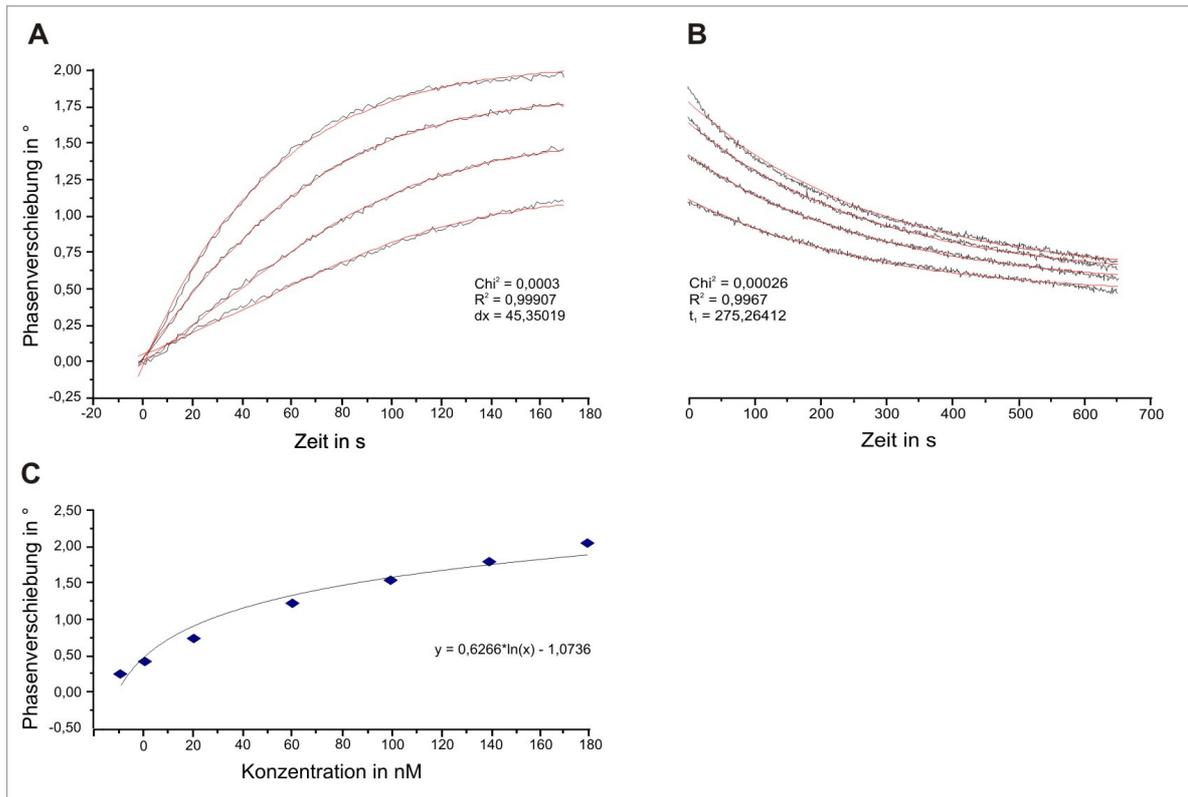
## ERGEBNISSE

100 nM lediglich eine maximale Phasenverschiebung von  $0,5^\circ$  (Abb. 37). Bei den Kurven der kleineren Konzentrationen waren sehr flache Dissoziationslinien festzustellen, was durch die Subtraktion des Puffer-Blindwertes (Abb. 38B) zusätzlich verstärkt wurde. Die Signale auf der BBP-Referenz erreichten bei gleicher scFv-Konzentration Werte von bis zu  $0,2^\circ$  (Abb. 38C). Dadurch, dass die Kurvenform auf BBP nicht dieselbe Form aufwies wie auf HS-4P, kam es nach Referenzsubtraktion zu einer stärkeren Veränderung der Kurvenform im Bereich des Injektionsstopps (Abb. 38D). Besonders deutlich wurde dies in den Kurven der niedrigen Konzentrationen. Für die Bindungskurven der Konzentrationen ab 40 nM wurde eine Auswertung der Kinetik mit Hilfe der Microcal Origin<sup>TM</sup>6.0G Software vorgenommen (II.5.5). Tab. 18 zeigt die errechneten kinetischen Daten dieser Interaktion zwischen dem ScFv NH2240-31 H3<sub>F</sub> und HS-4P<sup>1</sup>.

Analytkonzentration NH2240-31 H3 <sub>F</sub> in nM	$\Delta\phi_{\max}$ in $^\circ$	$k_a \cdot 10^5$ in 1/Ms	$k_d \cdot 10^{-2}$ in 1/s	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Fitting	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Gleichgewicht
40	1,0	2,1	0,196	9,6	n.d.
60	1,3	2,0	0,223	11,3	n.d.
80	1,6	1,7	0,245	14,8	n.d.
100	1,8	1,8	0,280	16,0	n.d.
global 100	n.d.	1,3	0,252	20,0	27,0

**Tab. 18:** Bindungsraten der Interaktion scFv NH2240-31 H3<sub>F</sub> mit HS-4P<sup>1</sup> (II.1.3) über SAW bestimmt, Assoziations-, Dissoziationsraten und  $K_D$ -Werte aus einem lokalen Fitting der Konzentrationen 40 - 100 nM und aus einem globalen Fitting basierend auf 100 nM, Bindungskonstante berechnet aus dem Gleichgewicht.

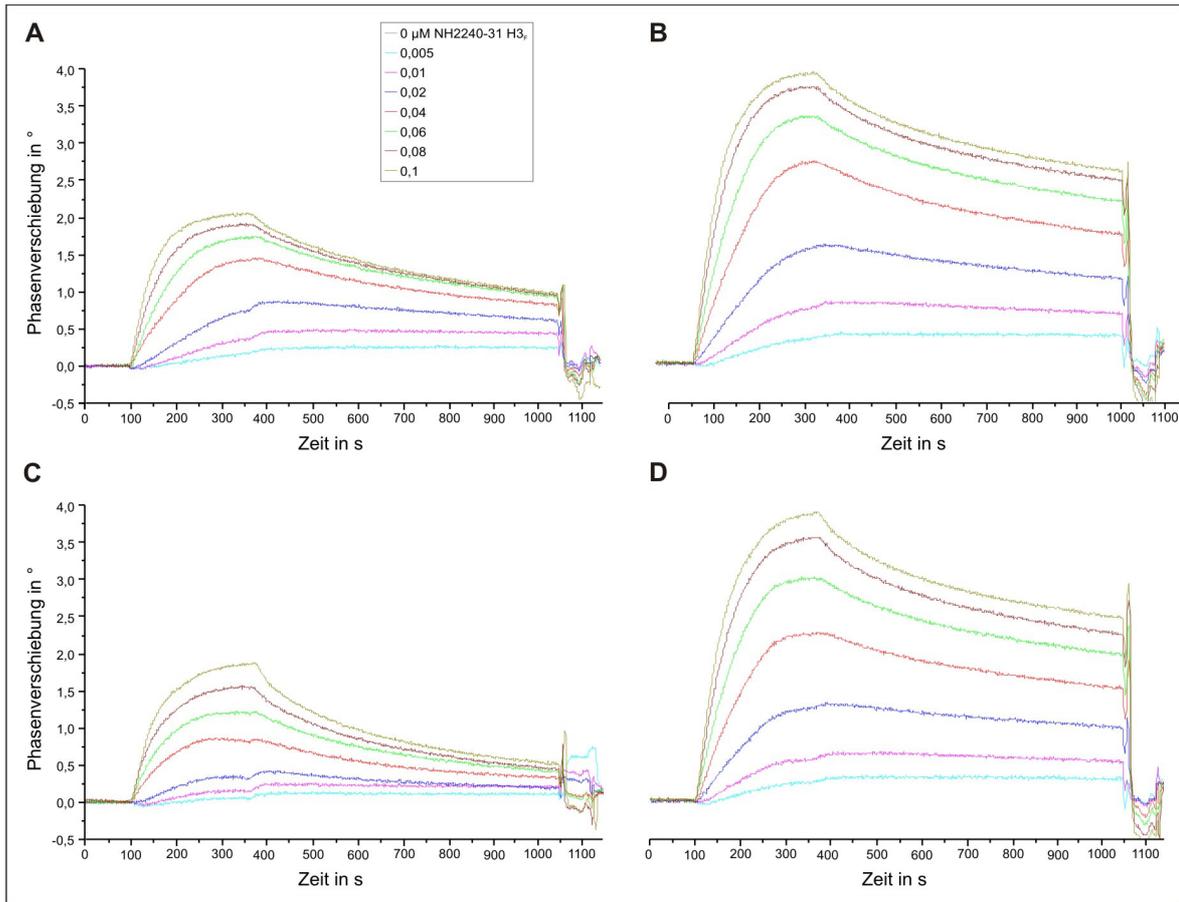
Die berechneten  $K_D$ -Werte für die einzelnen Bindungskurven lagen bei  $9,6 - 16 \cdot 10^{-9}$  M (Tab. 18). Es ist ein Ansteigen des  $K_D$ -Wertes mit der scFv-Konzentration festzustellen, was bei lokal gefitteten SPR-Kurven auch beobachtet wurde. Bei einem globalen Fitting über die Konzentrationen 40 - 100 nM (Abb. 39A, B) wurde eine Assoziationsrate von  $1,3 \cdot 10^5$  1/Ms, eine Dissoziationsrate von  $0,00252$  1/s und ein  $K_D$ -Wert von  $20 \cdot 10^{-9}$  M bestimmt. Dieser war etwa doppelt so hoch wie der aus den SPR-Experimenten. Der Wert für  $k_a$  war dabei um den Faktor 30 und der  $k_d$ -Wert 13mal geringer gegenüber SPR. Demnach wurde für diese Interaktion im SAW eine langsamere Assoziation, aber auch eine langsamere Dissoziation beobachtet.



**Abb. 39:** Kinetische Auswertung der Interaktion scFv NH2240-31 H<sub>3F</sub> gegen immobilisiertes HS-4P<sup>1</sup> (II.1.3). A: globaler Fit der 40, 60, 80 und 100 nM-Bindungskurven der Assoziation, B: globaler Fit der 40, 60, 80 und 100 nM-Kurven der Dissoziation. C: Bindung im Gleichgewicht  $\phi_{max}$  gegen die scFv-Konzentration.

In diesem Bindungsexperiment konnte keine Sättigung der Oberfläche erreicht werden (Abb. 39C). Das war auch bei Verwendung von bis zu einer scFv-Konzentration von 1  $\mu$ M der Fall. Trotzdem wurde über die Hälfte der maximalen Gesamtantwort eine Bindungskonstante von  $27 \cdot 10^{-9}$  M bestimmt.

Auf diese Weise wurden auch die Interaktionen der scFv NH2240-31, SAG506-01 und Fab S45-18 untersucht. Zusätzlich erfolgten Messungen für alle fünf scFv auf einer 2.4/2.4 PS-4P Oberfläche. Die Immobilisierung des 2.4/2.4 PS-4P erfolgte unter gleichen Bedingungen wie für das HS-4P<sup>1</sup>. Die Phasenverschiebung während der Aktivierung mit EDC/NHS betrug etwa 5°, nach dem Waschen lag sie zwischen 0,2 und 0,4°. Das maximale Signal während der Ligandimmobilisierung erreichte Werte von 10 - 11°. Tatsächlich gebunden waren nach dem Ethanolaminschritt in den Kanälen 1 bis 5 5,8, 5,4, 4,9, 4,7 und 4,3°, was doppelt so hoch war wie für das HS-4P. In Abb. 40 sind beispielhaft die Bindungskurven des NH2240-31 und des Fab S45-18 auf HS-4P<sup>1</sup> nach Referenzsubtraktion gezeigt sowie im Vergleich die Bindung der beiden Antikörperfragmente auf 2.4/2.4 PS-4P.



**Abb. 40:** SAW-Bindungskurven der Interaktion scFv NH2240-31 H<sub>3F</sub> und Fab S45-18 gegen HS-4P<sup>1</sup> (II.1.3) und 2.4/2.4 PS-4P. Sensorgram-Overlay der Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  gegen die Zeit der Interaktion von 0 - 100 nM scFv NH224-31 gegen immobilisiertes HS-4P<sup>1</sup> (A) und 2.4/2.4 PS-4P (C), Fab S45-18 auf HS-4P<sup>1</sup> (B) und 2.4/2.4 PS-4P (D) nach BBP-Referenzsubtraktion. Assoziation 200  $\mu$ l, Dissoziation 360  $\mu$ l bei einer Flussrate von 40  $\mu$ l/min, Regenerierung mit 10 mM NaOH 50  $\mu$ l.

Die Bindungskurven des Fab S45-18 (Abb. 40B) auf HS-4P<sup>1</sup> zeigten nach BBP-Referenzsubtraktion höhere Signale im Vergleich zu denen des scFv NH2240-31 (Abb. 40A). Trotzdem war ein ähnlich flacher Kurvenverlauf der Dissoziation für beide Antikörper sichtbar. Die Dissoziationslinien erreichten nicht die ursprüngliche Basislinie, dadurch war eine Regenerierung der Oberfläche nach jedem Zyklus notwendig. Die maximale Phasenverschiebung der Bindungskurven beider Antikörper war auf 2.4/2.4 PS-4P gegenüber HS-4P trotz einer höheren Belegung vergleichbar. Die Ergebnisse der Kinetik sowie die aus dem Gleichgewicht berechneten  $K_D$ -Werte sind in Tab. 19 und 20 aufgelistet.

## ERGEBNISSE

Analytkonzentration global 100 nM	$k_a \cdot 10^5$ in 1/Ms	$k_d \cdot 10^{-2}$ in 1/s	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Fitting	$K_D \cdot 10^{-9}$ in Gleichgewicht
scFv NH2240-31 WT	2,1	0,150	16,0	21,0
scFv NH2240-31 H3 <sub>F</sub>	1,3	0,252	20,0	27,0
scFv NH2240-31 H3 <sub>A</sub>	1,1	0,255	22,0	28,0
scFv SAG506-01 WT	0,9	0,209	25,0	27,0
Fab S45-18	1,0	0,196	19,0	21,5

**Tab. 19:** Bindungsraten der Interaktion diverser scFv und Fab mit HS-4P<sup>1</sup> (II.1.3). Assoziations-, Dissoziationsraten und KD-Werte.

Analytkonzentration global 100 nM	$k_a \cdot 10^5$ in 1/Ms	$k_d \cdot 10^{-2}$ in 1/s	$K_D \cdot 10^{-9}$ in M Fitting	$K_D \cdot 10^{-9}$ in Gleichgewicht
scFv NH2240-31 WT	1,0	0,251	26,0	29,0
scFv NH2240-31 H3 <sub>F</sub>	1,1	0,320	30,0	35,0
scFv NH2240-31 H3 <sub>A</sub>	1,0	0,353	36,0	43,0
scFv SAG506-01 WT	0,9	0,273	30,0	32,0
Fab S45-18	1,0	0,210	22,0	25,0

**Tab. 20:** Bindungsraten der Interaktion diverser scFv und Fab mit 2.4/2.4 PS-4P. Assoziations-, Dissoziationsraten und KD-Werte.

Im SAW wurden auf dem HS-4P<sup>1</sup> (Tab. 19) über ein globales Fitting  $K_D$ -Werte von 16 – 25 \* 10<sup>-9</sup> M bestimmt, die somit höher waren als die SPR-Daten. Dabei fielen die Werte aus dem Gleichgewicht, ähnlich wie im Biacore, jeweils höher aus als die aus der Kinetik. Im SAW-System konnte keine signifikante Differenzierung unter den gemessenen scFv-Antikörperfragmenten und auch nicht im Vergleich zum Fab S45-18 festgestellt werden. Das zeigten auch die jeweiligen Assoziations- und Dissoziationsraten. Auf der 2.4/2.4 PS-4P-Oberfläche waren ähnliche Werte wie auf dem HS-4P gemessen worden (Tab. 20). Somit war auch kein signifikanter Unterschied in der Affinität aller getesteten Antikörperfragmente zwischen HS-4P und 2.4/2.4 PS-4P nachweisbar. Es fiel jedoch auf, dass die SAW-Daten im Vergleich zu den Biacore-Werten, sowohl für den  $k_a$  als auch für den  $k_d$ -Wert um jeweils eine Nullstelle geringer waren. Da dieser Unterschied sowohl auf die Assoziations- als auch auf die Dissoziationsrate zutraf, wurde nach der Division ein ähnlicher  $K_D$ -Wert wie im Biacore erhalten.

## IV. DISKUSSION

### IV.1. Herstellung rekombinanter Antikörper

Nach Immunisierungen von Mäusen mit Neoglycokonjugaten können hochaffine Antikörper erhalten werden, die das LPS von Chlamydien binden (Fu *et al.*, 1992). Ein wichtiger hoch affiner Antikörper ist der monoklonale Antikörper (mAk) S25-23, der das familienspezifische Epitop von Chlamydien, das  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-Trisaccharid, bindet (Fu *et al.*, 1992). Da diese Struktur in allen Chlamydien vorkommt ist er kreuzreaktiv zwischen diesen. Eine Struktur die bislang nur im LPS von *C. psittaci* nachgewiesen wurde ist ein  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-Tetrasaccharid (2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub>). Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Hinblick auf eine Verbesserung der Chlamydien-Diagnostik einen Antikörper zu generieren, der spezifisch und mit einer hohen Affinität diese Struktur bindet. Neben den  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-Trisaccharid spezifischen Antikörpern wird nach Immunisierung auch die Bildung von Antikörpern stimuliert, die  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-Trisaccharid erkennen. Ein hochaffiner Antikörper gegen dieses Epitop ist der mAk S45-18, dessen dreidimensionale Struktur im Komplex mit dem Antigen aufgeklärt wurde (Nguyen *et al.*, 2003). Dieser Antikörper ist gleichermaßen kreuzreaktiv zwischen Chlamydien und bindet auch an das verzweigte Kdo-Tetrasaccharid. Bei Betrachtung des Komplexes wird ersichtlich, dass Antikörper dieses Typs voraussichtlich nicht mit dem im verzweigten Tetrasaccharid vorhandenen zusätzlichen (2 $\rightarrow$ 8)-verknüpften Kdo interagieren. Dennoch konnte mit dem mAk S69-4 ein Ak generiert werden, der spezifisch mit verschiedenen Isolaten von *C. psittaci* reagierte (Müller-Loennies *et al.*, 2006). Seine Sequenzierung ergab eine sehr hohe Homologie zum mAk S45-18 mit Unterschieden nur in der CDR 3 der schweren Kette (CDR H3). Somit sind Antikörper dieser Keimbahnlinie durchaus in der Lage zwischen diesen Antigenen zu differenzieren. Dennoch war der mAk S69-4 von deutlich geringerer Affinität (Müller-Loennies *et al.*, 2006). Ein zweites wichtiges Ziel dieser Arbeit war es deshalb, einen Beitrag zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen der beobachteten Spezifität und Kreuzreaktivität verschiedener Antikörper derselben Keimbahnsequenz auf struktureller Ebene zu leisten.

Nach Immunisierung mit einem synthetisch hergestelltem Neoglycokonjugat aus einem  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -Kdo-Trisaccharid konnte mit Hilfe der Phage-Display-Technik ein scFv isoliert werden, das ebenfalls spezifisch *C. psittaci* erkennt. Die Primärstruktur dieses scFv NH2240-31 wies eine hohe Homologie zu den mAk S45-18 und S69-4 auf. In ersten Bindungsexperimenten wurden für das scFv NH2240-31 im Vergleich zum S69-4 höhere Affinitäten gemessen (Dr. C. R. MacKenzie, persönliche Mitteilung). Ausgehend vom S45-18, von dem bekannt ist, dass er eine hohe Spezifität gegenüber dem  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo aufweist (Nguyen *et al.*, 2003), sollten anhand der Kristallstruktur geeignete Positionen für die Mutagenese des scFv NH2240-31 und des scFv S69-4 ausgewählt werden. Damit sollte untersucht werden, welche Auswirkungen einzelne Aminosäuren auf die Bindungseigenschaften der Antikörper haben und welche Austausche notwendig sind, um die Affinität der Antikörper zu erhöhen und somit die Ursache von Spezifität und Affinität besser zu verstehen. Aus der Veröffentlichung von Nguyen *et al.* (2003) war bekannt, dass das hydrophobe Phenylalanin an der Position 97 der CDR H3 durch Van-der-Waals-Interaktionen mit allen drei Hexoseringen des  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo die Bindung so stabilisiert, dass diese Struktur spezifisch und mit einer hohen Affinität erkannt wird. Sequenzanalysen sowie ein berechnetes Computermodell deuteten an, dass trotz einer kürzeren Bindungsschleife, das 97<sub>H</sub>I im NH2240-31 dieselbe strukturelle Funktion wie das 97<sub>H</sub>F im S45-18 ausübt. Durch die Mutationen H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> an der Position 97 der CDR H3 im NH2240-31 und die entsprechenden Austausche H3<sub>I</sub> und H3<sub>A</sub> im S45-18 sollte die Bedeutung der Aminosäure an der Position 97<sub>H</sub> untersucht werden. Um weitere Aminosäuren zu identifizieren, die bedeutend für die Antigenbindung sind, wurden die Mutanten NH2240-31 H2<sub>P</sub> (52<sub>C</sub>H<sub>A</sub>/P), L1<sub>N</sub> (30<sub>a</sub>L<sub>K</sub>/N) und H3<sub>F</sub>L1<sub>N</sub> (97<sub>H</sub>I/F und 30<sub>a</sub>L<sub>K</sub>/N) hergestellt. Im Falle des S69-4 sollte die Affinität durch den Austausch der vom S45-18 abweichenden Aminosäuren in der CDR H3 gesteigert werden. Hierfür wurden die Mutanten scFv S69-4 H3<sub>ante</sub> (93,96-96bALIY/VIYS) und H3<sub>post</sub> (98-100bDYDDA/GSRDG) generiert. Um das scFv NH2240-31 mit den mAk S69-4 und S45-18 in Bindungsstudien zu vergleichen und auf einfache Art und Weise die Auswirkung von Aminosäureaustauschen in den CDR aufzeigen zu können, wurde der S45-18 sowie der S69-4 als scFv kloniert und periplasmatisch exprimiert. Ein Vorteil der periplasmatischen Expression war der saubere Aufschluss der Zellen mittels Polymyxin B, was eine geringere

Verunreinigung der gewünschten Proteine durch Wirtspoteine und Nukleinsäuren bedeutete und die Reinigung der scFv vereinfachte.

Die Kulturbedingungen und der *E. coli*-Stamm spielen oft eine große Rolle im Hinblick auf eine lösliche Proteinexpression (Anand *et al.*, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde die gesamte Bakterienanzucht bei 24 °C durchgeführt und Minimalmedium verwendet, da diese Bedingungen vorteilhaft für die lösliche Expression der scFv im Periplasma sind (Schein, 1989; Plückthun, 1991). Es konnte auf diesem Wege für das scFv NH2240-31 und seiner Mutanten H3<sub>F</sub>, H3<sub>A</sub>, H2<sub>P</sub>, L1<sub>N</sub> und H3<sub>F</sub>L1<sub>N</sub> sowie für das scFv SAG506-01 und das scFv S69-4 und seiner Mutanten H3<sub>ante</sub> und H3<sub>post</sub> eine Sekretion ins Periplasma und auch in den Kulturüberstand in löslicher Form erreicht werden. Nach der Aufreinigung der scFv über Metallaffinitäts- und Größenausschlusschromatographie wurden Ausbeuten zwischen 0,5 und 1,2 mg an funktionellem Protein aus einem Liter Kultur erreicht. Diese Proteinmenge reichte aus, um zuverlässige Bindungsstudien durchführen zu können. Zdanov *et al.* (1994) beschrieben für das scFv Se155-4 gegen  $\alpha$ -D-Gal-(1→2)-[ $\alpha$ -D-Abe(1→3)]- $\alpha$ -D-Manp1→OMe Ausbeuten von 5-20 mg aus einem Liter. Die Expression des NH2240-31 war im Vergleich zu den anderen scFv in dieser Arbeit etwas geringer. Das könnte damit begründet werden, dass das Codon für Isoleucin zu den seltenen tRNA in *E. coli* gehört, was zu einer geringeren Effizienz in der Translation führen könnte. Der scFv S45-18 und dessen Mutante H3<sub>I</sub> konnte trotz Optimierung der Kulturbedingungen auch in anderen bakteriellen Systemen, wie dem T7-pET-System (Studier und Moffat, 1986), nicht in löslicher Form gewonnen werden. Lediglich der Austausch H3<sub>A</sub> führte zu einer geringen Expression an löslichem Protein. Dies deutete darauf hin, dass die CDR H3 wahrscheinlich einen großen Einfluss auf die richtige Faltung der schweren Kette in diesem Antikörper hat. Da sie gleichermaßen bedeutend für die Antigenbindung ist, wurde von Versuchen abgesehen, die Expression durch Mutagenese zu verbessern. Die Löslichkeit von Proteinen ist grundsätzlich von ihrer Primärstruktur abhängig (Anand *et al.*, 1991). Studien zeigten, dass durch den Austausch einer Aminosäure die Löslichkeit eines scFv um das Vierfache gesteigert werden konnte (Zdanov *et al.*, 1994) und die Kombination zweier scFv-Antikörperketten zu einer weitaus geringeren löslichen Expression führen kann, obwohl beide Antikörper zuvor mit hoher Ausbeute löslich gewonnen wurden (Müller-Loennies *et al.*, 2000). Die Unlöslichkeit mancher Proteine hängt auch mit der Unfähigkeit vieler *E. coli*-Stämme zusammen als Prokaryot bestimmte posttranslationale Modifikationen, wie die Ausbildung von Disulfidbrücken, die für die

Faltung und Aktivität der scFv-Antikörperdomänen von Bedeutung sind, vorzunehmen (Glockshuber *et al.*, 1992; Baneyx und Myjacic, 2004). Eine Möglichkeit die Löslichkeit von schwer exprimierbaren Proteinen zu verbessern ist die Fusion mit einem seinerseits löslichen Polypeptid, wie zum Beispiel dem NusA (Harrison, 2000) oder Thioredoxin, welches zusätzlich die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysiert (Stewart *et al.*, 1998). Entsprechende Vektoren, die solche Fusionsproteine enthalten, sind kommerziell erhältlich. Eine weitere Möglichkeit stellt die Koexpression von effizienten Chaperonen dar, die mit der Proteinvorstufe interagieren und dieses während der Faltung vor einer Aggregation schützen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Weitere Möglichkeiten wären die Expression in höheren Organismen oder die zellfreie Proteinbiosynthese. Die Rückfaltung aus Inklusionen ist zwar ebenfalls prinzipiell möglich, bedarf allerdings einer Optimierung der Bedingungen für jedes individuelle Zielprotein (Sørensen und Mortensen, 2005). Aufgrund der geringen Expressionsrate im bakteriellen System wurden für die folgenden Bindungsstudien als Alternative monovalente Fab-Fragmente des mAk S45-18 durch eine enzymatische Spaltung mit Papain (Parham *et al.*, 1982) hergestellt. Diese Antikörperfragmente können häufig in Bindungsstudien mit scFv verglichen werden, da in mehreren Beispielen gezeigt wurde, dass sie vergleichbare Bindungskonstanten besitzen (Amit *et al.*, 1986; Bhat *et al.*, 1990; Müller-Loennies *et al.*, 2000). Für diese Experimente war das Entfernen des Fc-Teils aus dem Reaktionsansatz von erheblicher Bedeutung, um die richtige Konzentration für die Bindungsstudien zu bestimmen. Gleichmaßen mussten selbst geringe Konzentrationen von intaktem und damit bivalentem Ak entfernt werden, um die sich anschließenden Bindungsstudien vergleichbar durchführen zu können. Das Fab des S45-18 konnte weder über Protein A noch über Protein G zufriedenstellend gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Für Antikörper, die in Ratten produziert wurden ist dieses Problem bekannt und lässt sich hier auf eine geringe Affinität von Protein A und G (Coleman und Mahler, 2003) erklären. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung mit Hilfe einer DEAE-Ionenaustauschermatrix durchgeführt, die eine Trennung aufgrund des unterschiedlichen isoelektrischen Punkts zwischen Fc-Teil und Fab ermöglicht (Rossomando, 1990; Choudhary und Horvath, 1996).

Insgesamt wurden mit Hilfe der scFv-Expression und Papain Digestion bei anschließender Abtrennung von Oligomeren über Gelfiltration monovalente Antikörperfragmente gewonnen, die in Bindungsstudien charakterisiert werden konnten. In allen durchgeführten Bindungsexperimenten war die Monovalenz der untersuchten Antikörperfragmente von

zentraler Bedeutung und vereinfachte die qualitative und quantitative Auswertung der Bindungsdaten. Bivalente Antikörper erreichen eine 10-100fach erhöhte Affinität aufgrund des Aviditätseffekts (Varki *et al.*, 1999). Besonders in kinetischen Analysen ist dies von Bedeutung, da Berechnungsmodelle, die vom 1:1-Bindungsmodell abweichen, komplexere Gleichungen und Parameter benötigen. MacKenzie *et al.* (1996) beobachteten eine fünffache Steigerung in der Assoziationsrate im Vergleich von mono- und bivalentem scFv Se155-4.

## IV.2. Serologische Charakterisierung rekombinanter Antikörper

In Bindungsstudien mit Chlamydien-infizierten Humanzellen differenzierte das scFv NH2240-31 zwischen *C. psittaci* und den anderen getesteten Chlamydien *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* und erkennt somit Strukturen, die ausschließlich in *C. psittaci* zu finden sind. Das einzig bekannte Oligosaccharid, das bislang nur in diesen Chlamydien nachgewiesen wurde, ist das  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)]- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo (Holst *et al.*, 1995). Mit dieser Spezifität ist der NH2240-31 für die Anwendung in der klinischen Diagnose von *C. psittaci*-Infektionen interessant. Für die Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> wurde neben der Bindung von *C. psittaci*-infizierten Zellen Kreuzreaktivität gegenüber *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* nachgewiesen. Somit spielt das Isoleucin an der Position 97<sub>H</sub> eine entscheidende Rolle für die Spezifität dieses Antikörpers. Der Fab S45-18 zeigte auch bei geringeren Konzentrationen Kreuzreaktivität, die bereits von Brade *et al.* (2000) nachgewiesen wurde. Für diesen Antikörper wurde anhand von Kristallstrukturen eine spezifische hoch affine Bindung des  $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Kdo beschrieben (Nguyen *et al.*, 2003). Die Kreuzreaktivität der H3<sub>A</sub>-Mutante könnte mit einer höheren Flexibilität durch das kleinere Alanin zusammenhängen oder aufgrund fehlender hydrophober Wechselwirkungen mit dem Antigen. Die H3<sub>F</sub>-Mutante ähnelt mit ihrer Kreuzreaktivität eher dem S45-18. Hier kommt es offenbar zu einer strukturellen Veränderung der Bindungstasche im Vergleich zum ursprünglichen NH2240-31. In ELISA-Studien gegen isolierte Bakterien wurde für alle drei NH2240-31-Antikörper eine spezifische Bindung von Elementarkörpern von *C. psittaci* und keine Kreuzreaktivität gegenüber *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* nachgewiesen. Das Fab S45-18 dagegen zeigte Kreuzreaktivität gegenüber den anderen Chlamydien. In diesen Bindungsstudien wurde auch eine höhere Affinität des Fab S45-18 gegenüber dem scFv NH2240-31

deutlich. Da der NH2240-31 eine höhere Affinität zeigte als die beiden Mutanten, ist davon auszugehen, dass die Kreuzreaktivität im Test gegen infizierte Zellmonolayer nicht auf einer höheren Affinität basiert. Möglicherweise liegen die verschiedenen Ergebnisse in der Empfindlichkeit der Teste begründet. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Empfindlichkeit solcher Experimente mit infizierten Zellkulturen vom Stadium der Chlamydien beeinflusst sein könnte (Peterson *et al.*, 1998).

Um zu untersuchen, welche Struktur von Chlamydien-LPS der NH2240-31 spezifisch erkennt und inwieweit sich die Mutationen an der Position 97<sub>H</sub> auf die Spezifität und Affinität dieses Antikörpers auswirken, wurden Bindungsstudien auf zahlreichen isolierten Oligosacchariden durchgeführt. Das scFv NH2240-31 und dessen Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> waren in der Lage ein einzelnes Kdo zu erkennen. Mit steigender Kettenlänge von  $\alpha$ -(2→4)-verknüpften Kdo bis hin zum  $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo (2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub>) stieg dabei die Affinität der Antikörper. Diese Ergebnisse gehen mit Beobachtungen einher, in denen für die beiden Chlamydien-spezifischen Keimbahnantikörper S25-2 und S45-18 eine konservierte Bindungstasche für das terminale Kdo beschrieben wurden, wobei zusätzliche Kdo flexibel über weitere Seitenketten der CDR gebunden werden können, was eine Steigerung der Bindungsstärke bewirkt (Nguyen *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2008). Ähnliches wurde auch für humane Antikörper beschrieben, die tierische Erythrocyten agglutinieren (Padler-Karavani *et al.*, 2008). Diese binden die Sialinsäure Neu5GC, welche als Paratop nicht die gesamte Bindungstasche ausfüllen kann. Durch die Verknüpfung des Monosaccharids mit weiteren Glycanstrukturen kommt es zu einer Vielfalt von Antikörperspezifitäten. Die höchste Affinität wurde für die NH2240-31-Antikörper durch die zusätzliche  $\alpha$ -(2→8)-Verzweigung im  $\alpha$ -Kdo-(2→4)-[ $\alpha$ -Kdo-(2→8)]- $\alpha$ -Kdo-(2→4)- $\alpha$ -Kdo (2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub>) erreicht. Der terminale verzweigte Teil dieser Struktur 2.4[2.8] Kdo<sub>3</sub> war für die Immunisierung des NH2240-31 eingesetzt worden. Im Gegensatz dazu wurde das  $\alpha$ -(2→8)-verknüpfte Di- und Trisaccharid kaum erkannt. Somit verhält sich der NH2240-31 ähnlich wie der S45-18. Dieser bindet spezifisch und mit einer hohen Affinität das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> (Nguyen *et al.*, 2003) und erkennt diese Struktur auch im verzweigten 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub>. Diese Eigenschaften des S45-18 gehen auf eine längere CDR H3-Bindungsschleife und einem endständigen 97<sub>H</sub>F zurück, welches in Kombination mit dem 100<sub>aH</sub>D die Bindung bzw. die Konformation des 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> fixiert, wodurch die Erkennung von  $\alpha$ -(2→8)-Strukturen erschwert wird

## DISKUSSION

---

(Nguyen *et al.*, 2003). Das hydrophobe 97<sub>H</sub>I im NH2240-31 übernimmt offenbar trotz kürzerer CDR H3-Bindungsschleife dieselbe Funktion wie das 97<sub>H</sub>F im S45-18. Laut Modellversuchen sitzt das 97<sub>H</sub>I an derselben Position wie das 97<sub>H</sub>F im S45-18. Die Wichtigkeit einer hydrophoben Aminosäure an dieser Stelle wurde durch die geringere Affinität der H3<sub>A</sub>-Mutante auf allen getesteten Liganden gezeigt. Eine weitere essentielle Aminosäure im NH2240-31 ist das 30<sub>a</sub>L<sub>K</sub>. Die Mutation dieses Lysins gegen das Asparagin des S45-18, welches in Kontakt mit dem Antigen tritt (Nguyen *et al.*, 2003), führte zu einer erheblichen Reduktion der Affinität gegenüber dem 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub>. Das Lysin an der Position 30<sub>a</sub>L ist folglich, wie das Asparagin im S45-18, für einen wesentlichen Kontakt mit dem Antigen verantwortlich. Im Vergleich zum S45-18 besitzt der NH2240-31 eine geringere Affinität. Da durch die Mutation H3<sub>F</sub> die Bindungsstärke nicht zusätzlich gesteigert werden konnte, sondern sogar auf allen untersuchten Liganden reduziert war, wurde zunächst von einer sterischen Behinderung durch das in der Bindungstasche gegenüber liegende 30<sub>a</sub>L<sub>K</sub> ausgegangen. Die Doppelmutante H3<sub>F</sub>L1<sub>N</sub> zeigte jedoch gegenüber dem 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> eine weitaus geringere Affinität als das Ursursprungprotein. Welche Auswirkung eine 30<sub>a</sub>L<sub>N/K</sub>- oder eine 97<sub>H</sub>F/I-Mutation im S45-18 hat, konnte aufgrund der geringen Expressionseffizienz des scFv S45-18 nicht untersucht werden. Wahrscheinlich ist das 97<sub>H</sub>F in der Bindungstasche des NH2240-31 einfach zu voluminös oder es hat eine Konformationsänderung der CDR H3-Bindungsschleife zur Folge. Ein weiterer wesentlicher Unterschied der Primärstruktur zwischen NH2240-31 und S45-18 innerhalb der CDR's ist das 52<sub>c</sub>H<sub>A</sub> im NH2240-31, wohingegen der S45-18 an dieser Stelle ein Prolin trägt, welches bekanntlich einen Einfluss auf die dreidimensionale Proteinstruktur hat. Der Austausch des 52<sub>c</sub>H<sub>A</sub>/P im NH2240-31 H2<sub>P</sub> führte jedoch zu keiner Veränderung der Bindungseigenschaften gegenüber den untersuchten Neoglycokonjugaten. Die hochaffine Bindung des 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> durch den S45-18 wird neben dem 97<sub>H</sub>F einem Aspartat an der Position 100<sub>a</sub>H zugeschrieben, welches über ein vermittelndes Wassermolekül in Kontakt mit dem Antigen tritt (Nguyen *et al.*, 2003). Die geringere Affinität des NH2240-31 im Vergleich zum S45-18 könnte mit der kürzeren CDR H3-Bindungsschleife zusammenhängen. Im NH2240-13 befindet sich dadurch ein Aspartat direkt an der Position 98<sub>H</sub>, was Einfluss auf die dreidimensionale Struktur der Bindungsschleife haben könnte. Inwiefern die in Kontakt mit dem Antigen tretenden Aminosäuren die gleichen sind wie im S45-18 und ob die Bindungstasche doch eine abweichende Struktur besitzt, kann nur durch weitere

Mutationsexperimente bzw. über die Kristallstruktur des NH2240-31 in Kombination mit dem 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> geklärt werden. Kristallisationsexperimente werden derzeit durchgeführt. Für den scFv NH2240-31 H<sub>97A</sub> und den zweiten Antikörper aus der Phagenbibliothek SAG506-01 konnten kürzlich erste Kristalle gewonnen werden (Brooks *et al.*, 2008b). Der SAG506-01 zeigte in den Bindungsexperimenten der vorliegenden Arbeit eine ähnliche Affinität für das 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> und das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> wie der NH2240-31. Somit wurde die Bedeutung einer hydrophoben Aminosäure an der Position 97<sub>H</sub> bestätigt. Wenn Isoleucin und Valin dieselbe Funktion während der Antigenbindung einnehmen und davon ausgegangen wird, dass beide Aminosäurereste sowie das 97<sub>H</sub>F im S45-18 über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Antigen interagieren, ist wahrscheinlich das Phenylalanin im NH2240-31 lediglich durch seine Größe an dieser Position ungeeignet. Eine andere Möglichkeit wäre auch eine abweichende Positionierung des Phenylalanins durch die angrenzenden Aminosäuren der CDR H3-Schleife. Insgesamt zeigte der SAG506-01 eine Spezifität, die einem Antikörper ähnelt, der für ein Kdo Monosaccharid spezifisch ist. Für Kdo-Monosaccharid, beide Disaccharide und für das 2.8/2.4 Kdo<sub>3</sub> wurde im Vergleich zum NH2240-31 eine höhere Affinität bestimmt. Abgesehen vom 97<sub>H</sub>V, trägt dieser scFv ein 55<sub>H</sub>V anstelle eines Tyrosins im NH2240-31. Dieses Valin liegt in der Nähe des 52<sub>d</sub>HK und könnte einen Einfluss auf dessen Position oder die Struktur der Bindungsschleife haben (Nguyen *et al.*, 2003). Eine Kristallstruktur könnte auch hier Aufschluss über die Unterschiede der Bindungstasche beider Antikörper geben.

Um zu untersuchen, weshalb der S69-4 trotz hoher Homologie zum S45-18 im Vergleich eine weitaus geringere Affinität besitzt, wurden Mutationen in den scFv S69-4 eingefügt. Im Gegensatz zum ursprünglichen scFv S69-4, der unter den gewählten Bedingungen lediglich eine schwache Bindung auf dem 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> zeigte, bewirkte die Mutation 98-100bDYDDA/GSRDG (scFv S69-4 H<sub>3</sub><sub>post</sub>) eine deutliche Erhöhung der Reaktivität auf allen getesteten Oligosacchariden, wohingegen der Austausch 93,96-96bALIY/VIYS (scFv S69-4 H<sub>3</sub><sub>ante</sub>) zu keiner signifikanten Veränderung führte. Möglicherweise behindern einige angrenzende Aminosäuren in der Nähe des 97<sub>H</sub>F die beschriebene Fixierung der Bindung durch das hydrophobe Phenylalanin, was durch die Mutation H<sub>3</sub><sub>post</sub> teilweise aufgehoben wird. Hier käme der Austausch 98<sub>H</sub>D/A in Frage, da das Aspartat einen größeren Raum einnimmt als das Alanin. Auch die Substitution 99<sub>H</sub>Y/S könnte eine Bedeutung haben, denn auch das Tyrosin beansprucht einen größeren Raum als das Serin.

Das Arginin an der Position 100<sub>H</sub> anstelle des Aspartats könnte durch die positive Ladung ionische Wechselwirkungen mit den Carboxylgruppen des Antigens eingehen, was wiederum die Bindung stabilisieren würde. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der CDR H3 für die affine Antigenbindung. Zudem wurde für die H3<sub>post</sub>-Mutante des scFv S69-4 eine höhere Stabilität während der Lagerung gegenüber dem ursprünglichen Protein beobachtet. Interessanterweise betrafen die ausgetauschten Aminosäuren keine, die laut Kristallstruktur des S45-18 an der Bindung des 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> beteiligt sind. Daher sorgen offenbar die angrenzenden Aminosäurereste für die Struktur und richtige Position des 97<sub>H</sub>F innerhalb der Bindungstasche. Die Bindungseigenschaften der H3<sub>post</sub>-Mutante des scFv S69-4 näherten sich denen des S45-18 an, dagegen war die immer noch geringe Affinität im Vergleich zum Fab S45-18 bislang nicht zu erklären, denn in der Primärstruktur finden sich all jene Aminosäuren wieder, die für den S45-18 als die an der Bindung beteiligten Aminosäuren beschrieben wurden (Nguyen *et al.*, 2003). Daher müssen angrenzende Aminosäurereste für eine abweichende Struktur verantwortlich sein.

Für den scFv NH2240-31 wurde im Bindungstest gegen Chlamydien-infizierte Zellmonolayer und gegenüber isolierten Bakterien eine Spezifität für *C. psittaci* gezeigt. Im ELISA gegen Neoglycokonjugate konnte die Vermutung, dass diese Spezifität auf dem Vorhandensein des 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> als Bindungsepitop basiert, nicht bestätigt werden. Lediglich wiesen die Ergebnisse auf eine Präferenz dieses Antigens hin, welche wahrscheinlich auf der hohen Affinität z. B. durch zusätzliche Kontakte basiert. Ähnliches wurde für Heparin beschrieben, welches eine höhere Affinität gegenüber seinem Pentasaccharid besaß, wenn es innerhalb eines Octasaccharids präsentiert wurde (Guerrini *et al.*, 2008).

Ein Vergleich der Bindungsstudien mit Bakterien bzw. infizierten Humanzellen ist schwierig, da im Gegensatz zu isolierten Oligosacchariden keine konkrete Aussage darüber getroffen werden kann, welche Menge an Antigen bzw. in welcher Dichte das Antigen vorliegt. Möglicherweise spielt auch der freie Zugang zum Epitop bei zellassozierten LPS-Strukturen eine Rolle. Die Bindung wird wahrscheinlich stark von der Art der Antigenpräsentation beeinflusst (Brooks *et al.*, 2008) und die Bindungsstelle verhält sich möglicherweise durch die Verankerung in der Membran weniger flexibel (Fu *et al.*, 1992). Interessanterweise wurde aber gezeigt, dass die untersuchten Oligosaccharide besser erkannt wurden, wenn sie mit dem Lipoid A-Grundgerüst präsentiert wurden, obwohl das BBP von diesen Antikörpern und auch vom scFv NH2240-31 (diese Arbeit) selbst nicht

gebunden wurde (Fu *et al.*, 1992; Brade *et al.*, 1997). Diese Beobachtung wird durch die strukturelle Analyse des Komplexes zwischen dem S45-18 und PSBP gestützt (Nguyen *et al.*, 2003). Eine indirekte Rolle für das Lipoid A-Grundgerüst ergab hierbei die Kokristallisation des Fab S25-2 mit verschiedenen Liganden (Brooks *et al.*, 2008), wodurch gezeigt werden konnte, dass bei Anwesenheit des Lipoid A-Grundgerüsts Kdo-Disaccharide nicht tief genug in die Bindungstasche eintauchen können. Für das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> und das 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> hingegen kommt es möglicherweise zu einer veränderten Konformation des Liganden durch die Anwesenheit des Lipoid A-Grundgerüsts oder zu einer Stabilisierung des Komplexes. Im ELISA gegen Neoglycokonjugate konnte auch kein Hinweis auf eine stärkere Kreuzreaktivität der 97<sub>H</sub>-Mutanten im Vergleich zum ursprünglichen NH2240-31, wie sie im Bindungstest gegen infizierte Humanzellen detektiert wurde, gefunden werden. Um diese Fragen zu klären und die unterschiedlichen Ergebnisse der Teste bewerten zu können, wurden die Interaktionen zwischen den scFv und diversen Oligosacchariden in kinetischen Experimenten mit Biosensoren untersucht.

### **Etablierung von Bindungsmessungen mit BIAcore- und SAW-Sensor**

Die Etablierung der Bindungsassays mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) bildete einen wesentlichen Bestandteil der vorliegenden Arbeit. In den ersten Experimenten am Biacore T100 zeigte sich, dass die kovalente Immobilisierung monovalenter Antikörper an eine carboxymethylierte Dextranmatrix in einer zum größten Teil inaktiven Oberfläche resultierte. Trotz guter Immobilisierungsrate des scFv NH2240-31 von 6 ng/mm<sup>2</sup> und einer Ligandkonzentration von bis zu 10 µM HS-BP konnte nach Referenzsubtraktion keine reale Bindung detektiert werden. Dies hing wahrscheinlich mit einer geringen Stabilität der Antikörperfragmente auf der Oberfläche zusammen. Eine weitere Erklärung ist die ungünstige Orientierung der gebundenen Fragmente, aufgrund der kovalenten Bindung über die N-Termini oder über positiv geladene Aminosäurereste des Proteins. Dadurch könnte die Antigenbindungsstelle verdeckt werden und wäre dem Analyten nicht mehr zugänglich. Jedoch konnte auch durch eine Konjugation in Anwesenheit des Liganden keine Besserung erzielt werden. Die Verwendung von monovalenten Antikörperfragmenten scheint für eine Immobilisierung ungünstig, zumal diese auch aufgrund der Proportionalität zwischen Massenveränderung

und Signal ein schwächeres Resonanzsignal erzeugen im Vergleich zu größeren Molekülen (Karlsson und Larsson, 2004). Durch eine Immobilisierung von BSA-konjugierten Oligosacchariden, sogenannte Neoglycokonjugate, war es möglich, auf einer Oberfläche mit  $1,1 \text{ ng/mm}^2$  ( $0,115 \text{ ng/mm}^2$  Kohlenhydratanteil) gebundenem HS-4P, welches das  $2.4[2.8]2.4 \text{ Kdo}_4$  enthält, sogar bei einer Injektion von  $1 \text{ nM}$  scFv NH2240-31 Bindung nachzuweisen. Die leichte Detektierbarkeit der Bindung lässt auf eine hohe Affinität des Antikörpers gegenüber seinem Antigen schließen. Diese lag für den scFv NH2240-31 gegenüber HS-4P bei  $5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ . Aufgrund der geringen Konzentration des  $K_D$ -Wertes war für eine zuverlässige Auswertung der Bindungskurven sogar eine Reduzierung der Liganddichte auf bis zu  $44 \text{ pg/mm}^2$  ( $3,44 \text{ pg/mm}^2$  Kohlenhydratanteil) von Vorteil. Dies stand in Übereinstimmung mit den Ausführungen von Karlsson und Larsson (2004), die empfehlen, Analytkonzentrationen um den  $K_D$ -Wert zu messen. Zudem sollten Liganddichte und Analytkonzentrationen so gewählt werden, dass die höchste Konzentration die maximale Bindungskapazität der Oberfläche erreicht (Karlsson und Larsson, 2004). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, war dies für eine zuverlässige Bestimmung des  $K_D$ -Wertes basierend auf dem Gleichgewicht der Bindungsreaktion von Bedeutung. Die gemessenen maximalen Resonanzsignale der einzelnen Bindungskurven, die zwar eine Sättigung der Oberfläche ergaben, erreichten jedoch nicht die theoretische Bindungskapazität (III.7.1). Dies führte zu geringen Unterschieden zwischen dem  $K_D$ -Wert aus dem Gleichgewicht gegenüber dem, der über die Reaktionsraten berechnet wurde. Ein Erreichen der maximalen Bindungskapazität kann durch Transporteffekte beeinflusst werden. Wenn die Konzentration in der Nähe der Sensorchip-Oberfläche wesentlich geringer als die Konzentration des injizierten Analyten ist, was durch eine zu langsame Diffusion der Moleküle senkrecht zur laminaren Strömung entstehen kann, handelt es sich um eine Transportlimitierung (I.5.4). Das spielt eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der Reaktionsraten (Glaser, 1993; Kortt *et al.*, 1997). Eine Transportlimitierung, wie sie in der vorliegenden Arbeit auf Sensorchip-Oberflächen mit einer hohen Liganddichte detektiert wurde, konnte mittels einer Verringerung der Belegung weitgehend behoben werden, wahrscheinlich aufgrund einer verlangsamten Bindungsreaktion im Vergleich zur Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten auf die Oberfläche.

Mit Hilfe der BIAevaluation Software wurden über ein Fitting anhand der Reaktionsraten für verschiedene Interaktionen die Affinität bestimmt. Dabei ließen sich die

Bindungskurven auf HS-4P und 2.4/2.4 PS-4P anhand eines 1:1 Bindungsmodells richtig beschreiben. Geringe Abweichungen der gemessenen gegenüber den theoretischen Kurven sind damit zu erklären, dass die Auswertung der Bindung auf dem Kurvenverlauf der aufgezeichneten Bindungskurve basiert. Das macht das System für gewisse Störungen anfällig, wie z. B. Pufferabweichungen oder Unterschiede der Bindung auf der Referenzzelle. In der vorliegenden Arbeit wurde die Qualität der Bindungskurven wie folgt optimiert. Aufgrund der hohen Stabilität der Bindungskomplexe, wurden während der Dissoziationszeit innerhalb eines Messzyklus nicht alle gebundenen Analyten von der Oberfläche gewaschen, was durch eine Regenerierung mit NaOH nach jedem Injektionszyklus gelöst werden konnte. Besonders beim Fab S45-18 war das von Bedeutung, da aufgrund des höheren Molekulargewichts noch gebundene Analyten ein starkes Restresonanzsignal verursachten, welches den Verlauf anschließender Bindungszyklen verfälscht hätte. Abweichungen zwischen gemessenen und theoretischen Bindungskurven im Fitting waren vorwiegend zu Beginn und am Ende der Injektion in Form von Spikes sichtbar, die aufgrund der Referenzsubtraktion zustande kamen. Obwohl sich der Referenzligand BBP vom Messliganden nur im Fehlen der Kdo unterscheidet, verhielt sich der Injektionsspike auf der Referenzzelle anders als auf der Messzelle. Diese Abweichungen am Assoziationsstart konnten nicht eliminiert werden. Über SPR werden auch Änderungen im Brechungsindex detektiert, die durch Unterschiede zwischen Probenlösung und Laufpuffer zustande kommen (Karlsson und Larsson, 2004). Solch ein Unterschied wurde durch eine Gelfiltration zur Überführung der Analyten in Laufpuffer verhindert. Unklar ist, inwieweit die zusätzliche Pufferentgasung im Gerät selbst Abweichungen herbeiführt. Die aufwendige Gelfiltration vor jedem Bindungslauf war auch notwendig, um eventuelle Dimere zu eliminieren, welche die Kinetik beeinflussen würden (MacKenzie *et al.*, 1996; Myszka *et al.*, 1997). Unspezifische Bindung oder eine Anlagerung der Antikörperfragmente aufgrund von Aggregation könnte auch eine Rolle spielen. Nach Angaben von Löfås und Johnsson (1990) weist die carboxymethylierte Dextranmatrix jedoch eine sehr geringe unspezifische Bindung auf. Die Verwendung von 150 mM NaCl im Laufpuffer sollte elektrostatische Interaktionen zwischen freien Carboxylgruppen und positiv geladenen Gruppen des Analyten zusätzlich vermeiden (Löfås und Johnsson, 1990; Karlsson und Larsson, 2004). Auch das supplementierte Surfactant P20 (0,005 % Tween 20) sorgte für eine Verringerung einer Adsorption des Analyten an Röhrchen und Schlauchsystemen (Karlsson und Larsson, 2004). Die

Verwendung von 3 mM EDTA im Laufpuffer sollte einem proteolytischen Abbau der Antikörperfragmente vorbeugen.

Im SAW-System traten die beschriebenen Schwierigkeiten noch deutlicher hervor, besonders im Hinblick auf den Referenzliganden. Da der SAW-Sensorchip aus fünf direkt hintereinander geschalteten Flusszellen besteht, war es notwendig, alle fünf Zellen mit demselben Liganden zu belegen, was zu einem größeren Materialverbrauch führte. Es wäre auch eine Immobilisierung separat für jede Zelle außerhalb des Gerätes möglich, was jedoch eine Abschätzung der Belegung erschwert. Im BIAcore-System dagegen kann eine zeitgleiche Messung des Analyten auf der Referenz- und Messzelle erfolgen. Auf der inaktiven Zelle wurden ebenfalls kurvenartige Verläufe aufgezeichnet, die nach Subtraktion von der Bindungskurve auf dem Messliganden zu starken Abweichungen führte. Das erschwerte ein Fitting der Assoziations- und Dissoziationskurven an die mathematischen Modelle und könnte in ungenauen  $K_D$ -Werten resultieren. Diese Abweichungen konnten minimiert werden, indem das höher belegte HS-4P immobilisiert wurde, was zu stärkeren Signalen auf der Messzelle führte. Erst mit diesem Liganden wurde eine messbare Immobilisierung von  $2^\circ$  bzw.  $20 \text{ pg/mm}^2$  (Kohlenhydratanteil  $2,15 \text{ pg/mm}^2$ ) erzielt. Das entsprach etwas mehr als der Hälfte der geringsten Belegung von  $44 \text{ pg/mm}^2$  HS-4P (Kohlenhydratanteil  $3,44 \text{ pg/mm}^2$ ) auf den SPR-Sensorchips. Ein Grund für die geringe Immobilisierung der BSA-Konjugate auf den SAW-Sensorchips könnte mit der Dextranmatrix zusammen hängen. Die Dextranschicht der SAW-Sensorchips besaß eine geringere Dicke (Dr. J. Andrä, persönliche Mitteilung), wodurch natürlich weniger Bindungsstellen für eine kovalente Immobilisierung zur Verfügung standen. Im Gegensatz zu den BIAcore-Experimenten, in denen noch bei einer Analytkonzentration von 1 nM die Bindungskurven ausgewertet werden konnten, war dies im SAW-Sensor erst ab einer Konzentration von 40 nM möglich. Diese geringere Sensitivität verwundert, da für BIAcore ein Detektionslimit von  $10 \text{ pg/mm}^2$  und für SAW eines von  $0,75 \text{ pg/mm}^2$  beschrieben wurde (Fägerstam *et al.*, 1991; Schlensog *et al.*, 2004). Laut Löfås und Johnsson (1990) und Stenberg *et al.* (1991) liegt die minimale Detektion im SAW-Sensor bei  $50 \text{ pg/mm}^2$ . Liss *et al.* (2002) beschrieben ein Detektionslimit für einen QCM-Biosensor von  $33 \text{ pg/mm}^2$  für immobilisierte IgE-Aptamere und wiesen darauf hin, dass dieser Sensor nicht für alle Anwendungen geeignet ist. Schlensog *et al.* (2004) haben die Ergebnisse aus einem Love-wave Sensor mit denen aus einem BIAcore3000 Biosensor für eine Elastase verglichen. Dabei konnte bei einer Injektion von  $5 \text{ } \mu\text{M}$  gegen

ein immobilisiertes Thrombin-Aptamer eine Phasenverschiebung von  $-0,2^\circ$  nachgewiesen werden, was einer Massenanlagerung von  $50 \text{ pg/mm}^2$  entspricht. Im BIAcore3000 dagegen wurden 145 RU bzw.  $1450 \text{ pg/mm}^2$  gebunden. Somit zeigten sie eine generell höhere Massenanlagerung im BIAcore3000. Die Autoren begründen dies mit dem im BIAcore geringeren Totvolumen von  $0,6 \mu\text{l}$  in der Flusszelle, welches im SAW-Sensor  $14,5 \mu\text{l}$  beträgt. Ein Vorteil der SAW-Sensoren besteht in den geringeren Kosten und der Verlässlichkeit und geringer Fehlerempfindlichkeit (Schlensog *et al.*, 2004). Da die SAW-Sensoren erst seit kurzem auf dem Markt Einzug erhalten haben, können sie mit einer Weiterentwicklung und Verbesserung ihres Flusssystems sicher als Alternative zu den BIAcore-Varianten angesehen werden.

### **Bestimmung von Bindungsaffinitäten aus SPR- und SAW-Experimenten**

Sowohl im SAW-System als auch über SPR konnten für die Interaktionen des scFv NH2240-31, dessen Mutanten H3<sub>F</sub> und H3<sub>A</sub> sowie für den SAG506-01 und den scFv S69-4 H3<sub>post</sub> K<sub>D</sub>-Werte zwischen  $4 \cdot 10^{-9}$  und  $1,4 \cdot 10^{-8}$  M aus der Kinetik und etwas höhere Werte aus dem Gleichgewicht auf HS-4P bestimmt werden. Im SAW-System waren die Bindungsstärken etwas höher und lagen zwischen  $1,6 \cdot 10^{-8}$  und  $3,6 \cdot 10^{-8}$  M. Hier konnte trotz hoher Injektionskonzentration keine Sättigung der Oberfläche erreicht werden. Das erklärt sich aus der Limitierung der Injektionszeit aufgrund des Flusssystems (Schlensog *et al.*, 2004). Trotzdem kann eine Affinitäts-ähnliche Konstante über einen Graphen der Phasenverschiebung aufgetragen gegen die Analytkonzentration bestimmt werden (Schlensog *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit berechneten K<sub>D</sub>-Werte lagen zwischen  $2,1 \cdot 10^{-8}$  und  $4,3 \cdot 10^{-8}$  M und waren somit vergleichbar mit denen aus den SPR-Experimenten. Auch Gronewold *et al.* (2005) zeigten für die Interaktion eines immobilisierten RNA-Aptamers gegen humanes Thrombin ähnliche Affinitäten von  $1,13 \cdot 10^{-7}$  M im BIAcore3000 und  $1,81 \cdot 10^{-7}$  M im Love-wave SAW-Sensor. In beiden Systemen unterschieden sich die K<sub>D</sub>-Werte auf HS-4P und 2.4/2.4 PS-4P nicht wesentlich voneinander. Auch im Vergleich zum Fab S45-18 wurden keine signifikanten Unterschiede in der Bindungsstärke festgestellt. Somit konnte für die affinen Antikörper keine Differenzierung gezeigt werden. Lediglich für die scFv S69-4 und dessen Mutante H3<sub>ante</sub> waren geringere Bindungsstärken von  $1,33 \cdot 10^{-7}$  M und  $2,16 \cdot 10^{-7}$  M gemessen worden. Auf dem 2.8/2.4 PS-4P wurde für alle untersuchten Antikörper keine Bindung

nachgewiesen. Demnach konnte über SPR und SAW nur zwischen gut und schwach bindenden Antikörpern unterschieden werden. Dass das verwendete System generell für die Bestimmung von zuverlässigen  $K_D$ -Werten geeignet war, zeigten die Bindungsexperimente mit dem scFv S25-2, da hier Affinitäten gemessen worden sind, die mit Literaturangaben (Müller-Loennies *et al.*, 2000) übereinstimmen. Die Reaktionsraten der Interaktion des NH2240-31 mit dem HS-4P wurden zusätzlich mit Hilfe der linearen Regression erfolgreich verifiziert. Auch die Affinitäten des Fab S45-18 korrelierten mit Angaben von Dr. C. R. MacKenzie (persönliche Mitteilung), der eine Bindungsstärke von  $2 \cdot 10^{-8}$  M gegenüber 2.4/2.4 PS-BP bestimmt hatte. Offenbar sind hohe Affinitäten im BIAcore schwierig zu differenzieren, obwohl laut Karlsson und Larsson (2004) über SPR sogar pikomolare Affinitäten gemessen werden können. Die Autoren führten Assoziationsraten zwischen  $10^3$  und  $10^8$  1/Ms und Dissoziationsraten von  $10^{-5}$  bis 1 1/s an. In diesem Rahmen bewegten sich auch die gemessenen Daten in der vorliegenden Arbeit. Solch hohe Affinitäten, wie sie hier gemessen worden sind, sind außergewöhnlich für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen. Normalerweise sind solche Interaktionen aufgrund der geringen Größe von Kohlenhydrat-Epitopen mit einer geringen Affinität verbunden, da sich nur wenige funktionelle Gruppen auf dem Antigen befinden (MacKenzie *et al.*, 1996; Varki *et al.*, 1999). Deng *et al.* (1994) zeigten für das scFv Se155-4 beispielsweise eine Bindungskonstante von  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M. Für andere Chlamydien-spezifische Antikörper, wie z. B. für die scFv S25-2 und S25-23, wurden auch höhere Affinitäten von  $5,9 \cdot 10^{-7}$  M und  $6,0 \cdot 10^{-7}$  nM beschrieben.  $K_D$ -Werte von unter  $10^{-8}$  M waren nur für die entsprechenden monoklonalen Antikörper festgestellt (Müller-Loennies *et al.*, 2000). Eine höhere Stabilität des Komplexes aufgrund von Dimerisierung des Analyten kann aufgrund der vorangegangenen Gelfiltration weitgehend ausgeschlossen werden. Zudem wäre für bivalente Fragmente eine deutlich langsamere Dissoziationsrate zu erwarten, wie sie für den mAk S25-2 von  $9 \cdot 10^{-4}$  1/Ms bestimmt wurde (Müller-Loennies *et al.*, 2000). Die gemessenen Dissoziationsraten in der vorliegenden Arbeit lagen zwischen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  1/Ms. In der Dissoziationsrate vor allem zeigt sich die unterschiedliche und normalerweise geringe Affinität von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen (MacKenzie *et al.*, 1996). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte hohe Affinität kommt durch eine sehr schnelle Assoziation zwischen  $10^6$  und  $10^7$  1/Ms zustande, dessen Werte um das 10 bis 100fache höher lagen als in der Literatur beschrieben (Müller-Loennies *et al.*, 2000). Für das bivalente 5A3 scFv-Fc gegen Man3-BSA wurden

keine Assoziationsraten größer als  $10^4$  1/Ms beschrieben (Zhang *et al.*, 2007). Interessanterweise wurden in der Literatur ähnliche Assoziationsraten für monovalente scFv und bivalente IgG nachgewiesen (Müller-Loennies *et al.*, 2000). Wie die in der vorliegenden Arbeit schnellen Assoziationsraten zustande kommen, kann zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden. In der Assoziation sind Abweichungen als besonders kritisch zu betrachten weil  $k_a$  konzentrationsabhängig ist. Kleinste Ungenauigkeiten in der Verdünnung des Analyten hätten bereits große Auswirkungen auf die Berechnung der Assoziationsrate (Karlsson und Larsson, 2004). Insbesondere biphasische Bindungsprofile sind schwierig zu analysieren (MacKenzie *et al.*, 1996). Diese kommen durch geringe Dimer-Kontaminationen zustande. Auch Van der Merwe *et al.* (1994) erklärte multimere Interaktionen als Hauptursache für fehlerhafte SPR-Daten. Ob die vorliegenden Ergebnisse aus den SPR-Experimenten tatsächlich die Realität widerspiegeln, könnte zusätzlich über BIAcore-Experimente mit bivalentem scFv oder mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht werden. Bei dieser Methode wird direkt die Wärmeentwicklung während der Komplexbildung bei einer konstanten Temperatur gemessen (Perozzo *et al.*, 2004). Dies wäre auch deswegen interessant, da hier die Antikörper-Antigen-Reaktion vollständig in Lösung untersucht wird, obwohl die Bindungsdaten über ELISA und Biosensortechnologie mit der Realität vieler physiologischer Immunreaktionen einhergehen, da Bindungsreaktionen zwischen Antikörpern an Antigenen häufig an Oberflächen an denen einer der Reaktionspartner als zweidimensionale Fläche auftritt, stattfinden (Glaser, 1993). Generell werden die in der Literatur beschriebenen hohen Affinitäten von Chlamydien-spezifischen Antikörpern mit der Anwesenheit von zahlreichen negativen Ladungen, insbesondere die der Carboxylgruppen der Kdo diskutiert, welche durch ionische Wechselwirkungen die Bindung stabilisieren (Brade *et al.*, 1997; Müller-Loennies *et al.*, 2000). Nach Brade *et al.* (1997) geht die Reduktion der Carboxylgruppe des 2.8/2.4 Trisaccharids mit einer Konformationsänderung des Liganden einher, was offenbar die Bindung der Antikörper S25-2 und S25-23 erschwert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in den ELISA-Studien gegen Neoglycokonjugate gezeigt werden, dass die Carboxylgruppe des 1. Kdo an der Bindung der Disaccharide beteiligt ist. Eine Überführung in eine Hydroxylgruppe resultierte in einer Verringerung der Aktivität für alle drei NH2240-31-Antikörper sowie für den SAG506-01. Die Wegnahme von negativen Ladungen fällt bei weniger

spezifischen Antikörpern, wie dem S25-2, jedoch nicht so sehr ins Gewicht aufgrund einer höheren Flexibilität der Bindungstasche (Fu *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 2003).

Nach den Ergebnissen der SPR- und SAW-Studien haben die eingeführten Einzelmutationen im NH2240-31 keinen Einfluss auf dessen Bindungseigenschaften. Jedoch im Falle des scFv S69-4 H3<sub>ante</sub> wurde eine deutliche Verbesserung der Affinität erreicht, die auf dem Niveau des NH2240-31 lag. Im Gegensatz dazu, war es in diversen ELISA-Experimenten möglich, eine detaillierte Aussage über die Spezifität und Affinität der untersuchten Antikörper zu treffen. Beim ELISA handelt es sich um eine Endpunktbestimmung, in der keine Kinetiken, sondern die Menge an entstandenen Antikörper-Antigen-Komplexen im Reaktionsgleichgewicht bestimmt wird. Im Falle der Biosensoren, die molekulare Bindung in Echtzeit messen (Karlsson and Larsson, 2004) bleibt die kritische Frage, ob die Bindungsreaktion hundertprozentig einem 1:1-Modell entspricht und inwiefern Flussdynamik, Multivalenz, Rückbindung, Konformationsänderungen und Massentransport diese beeinflussen. Generell sind die Ergebnisse solcher Bindungsexperimente neben der eingesetzten Antikörperkonzentration von der Menge des immobilisierten Liganden abhängig. Das wurde sowohl in den ELISA- als auch in den Experimenten mit Biosensoren deutlich. Z. B. wurde in ELISA-Studien der vorliegenden Arbeit unter den gewählten Bedingungen eine Kreuzreaktivität des Fab S45-18 mit dem 2.8 Kdo<sub>2</sub> und 2.4 Kdo<sub>2</sub> gezeigt, obwohl Nguyen *et al.* (2003) anhand der Kristallstruktur eine Erkennung des S45-18 von Kdo-Disacchariden verneinte. Aus Bindungsstudien von Brade (2000) ging hervor, dass mit einer Erhöhung der Liganddichte von 2 über 20 bis hin zu 200 pmol die Affinität des S45-18 proportional anstieg und das Niveau des 2.4 Kdo<sub>3</sub> erreichte. Ein weiterer Grund für Unterschiede könnte die Liganddichte pro BSA-Molekül sein. Eine hohe Dichte an Ligand könnte die Zugänglichkeit der Bindungsstellen durch die räumliche Nähe der Ligandmoleküle beeinträchtigen. Z. B. konnte eine deutliche Reduktion der Bindung des NH2240-31 auf HS-4P gezeigt werden bei Verwendung eines Konjugats mit 250 nmol/mg BSA im Vergleich zu 90 nmol/mg BSA. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf geachtet, dass in ELISA- und Biosensorexperimenten äquimolare Mengen an Ligand eingesetzt werden. Die Belegungsdichte der Konjugate spielt bei der Verwendung von vollständigen Antikörpern wahrscheinlich nicht so eine große Rolle, weil durch die affinere Bindung durch Avidität diese feinen Unterschiede nicht detektiert werden können. Trotz einer komplizierteren Handhabung monovalenter Antikörper besitzen diese jedoch diverse Vorteile gegenüber

multivalenten Antikörpern im Hinblick auf die Untersuchung von Spezifitäten und Affinitäten (I.2.3). Mit Hilfe monovalenter Fragmente kann eine genauere Aussage über deren Spezifität getroffen werden, da aufgrund der raschen Dissoziation diese während der Waschschriffe schneller abgelöst und als Nichtbinder identifiziert werden (MacKenzie und To, 1998). Das konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Mit Hilfe der weniger affinen NH2240-31-Mutante H<sub>3F</sub> konnte im ELISA gegen definierte Oligosaccharide eine deutliche Differenzierung zwischen 2.4/2.4 PS-4P und HS-4P erreicht werden. Im Falle des 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> war die Affinität für alle Antikörper so hoch, dass keine Differenzierung zwischen den Antikörpern mehr detektiert werden konnte. Das steht im Gegensatz zu der allgemeinen Vorstellung, dass eine Reifung der Antikörperantwort zu einer höheren Spezifität mit gleichzeitiger Steigerung der Affinität führt (MacLennon *et al.*, 1992; Furukawa *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass spezifischere Antikörper erhalten werden können, wenn sie eine geringere Affinität besitzen. Nichtsdestotrotz wurde im ELISA gegen isolierte Chlamydien für alle NH2240-31 eine Spezifität für *C. psittaci* nachgewiesen und im Bindungstest gegen Chlamydien-infizierte Humanzellen war diese Spezifität gegenüber *C. psittaci* zumindest für den ursprünglichen NH2240-31 eindeutig. Die generelle Problematik kreuzreaktiver Kohlenhydrat-bindender Antikörper, wie sie unter anderem von Manimala *et al.* (2007) gezeigt worden ist, ist schwierig zu überwinden. Da in vorherigen Arbeiten nachgewiesen wurde, dass bei einer Immunisierung mit dem 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> Antikörper erhalten werden können, die das 2.4/2.4 Kdo<sub>3</sub> binden und somit kreuzreaktiv sind, wurde für die Generierung des NH2240-31 ein Oligosaccharid mit der Struktur 2.4[2.8] Kdo<sub>3</sub> verwendet. Die Gewinnung eines Antikörpers der das gesamte 2.4[2.8]2.4 Kdo<sub>4</sub> spezifisch erkennt ist schwierig. Fu *et al.* (1992) zeigte, dass bei einer Immunisierung mit dem 2.8/2.4 Kdo<sub>3</sub> Antikörper gewonnen werden konnten, die maximal ein Disaccharid erkannten. Erst bei der Verwendung eines Konjugats mit Lipoid A-Grundgerüst wurden Antikörper generiert, die das gesamte 2.8/2.4 Kdo<sub>3</sub> binden. Normalerweise würde man für einen Chlamydien-spezifischen Antikörper erwarten, dass dieser  $\alpha$ -(2→8)-verknüpfte Kdo-Strukturen erkennt, da solch eine glykosidische Bindung spezifisch für diese Familie ist (Nurminen *et al.*, 1983). Für die bereits beschriebenen Antikörper S25-2 und S25-23 ist dies auch der Fall. Diese können zwar in der Diagnostik für den Nachweis von Chlamydien auf dem Familienlevel allgemein eingesetzt werden, sind jedoch für die Detektion einer Chlamydienart ungeeignet. Mit dem NH2240-31 ist es gelungen einen spezifischen

## DISKUSSION

---

Antikörper für *C. psittaci* zu generieren, der Potential für den Einsatz in der Diagnostik mitbringt. Im Gegensatz zum S69-4 ist dieser stabiler und besitzt eine höhere Spezifität.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Bakterien der Familie *Chlamydiaceae* sind obligatorisch intrazelluläre Pathogene, die beim Menschen und im Tier infektiöse Erkrankungen auslösen können (Gerbase, 1998; Burton, 2007). Chlamydien besitzen Lipopolysaccharide mit unterschiedlichen Oligosaccharidstrukturen aus 2-Keto-3-desoxy- $\alpha$ -octonsäure (Kdo). Im Hinblick auf eine Verbesserung der Chlamydien-Diagnostik, ist ein Antikörper von Vorteil, der spezifisch mit dem verzweigten  $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)[ $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)]- $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ Kdo-Tetrasaccharid reagiert, welches bislang ausschließlich in *Chlamydophila psittaci* nachgewiesen wurde. Bisher ist der monoklonale Antikörper S69-4 bekannt, der zwar spezifisch Elementarkörper von *C. psittaci* bindet, jedoch eine geringe Affinität und Stabilität sowie bei hohen Konzentrationen Kreuzreaktivität gegenüber anderen Chlamydien aufweist.

Nach einer Immunisierung mit dem Neoglycokonjugat  $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)[ $\alpha$ Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ Kdo ist es gelungen, über das Phage-Display-Verfahren das scFv NH2240-31 zu isolieren, das spezifisch und mit einer hohen Affinität Elementarkörper von *C. psittaci* erkennt und somit großes Potential für den Einsatz in der Chlamydien-Diagnostik mitbringt.

Um die Bindungseigenschaften dieses Antikörpers biochemisch zu untersuchen, wurden über positionsgerichtete Mutagenese Aminosäureaustausche, vorwiegend in der CDR H3, in den NH2240-31 eingefügt, die scFv in *Escherichia coli* exprimiert und nach einer Aufreinigung in diversen Bindungsstudien gegen Elementarkörper von *C. psittaci*, *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* und gegen Chlamydien-infizierte Zellmonolayer getestet. Zusätzlich wurden Bindungsexperimente mit verschiedenen natürlichen und synthetisch hergestellten Oligosacchariden (Neoglycokonjugaten) nicht nur im ELISA durchgeführt, sondern auch Surface Plasmon Resonance (SPR)- und Surface Acoustic Wave (SAW)-Experimente in Biosensoren aufwendig etabliert. Alle Bindungsexperimente zeigten für die untersuchten scFv sehr hohe Affinitäten gegenüber Chlamydien-LPS.

Mit Hilfe der Mutanten konnte zwar nicht eindeutig geklärt werden, worauf die Spezifität des NH2240-31 strukturell beruht, jedoch wurden generelle Erkenntnisse über den Bindungsmechanismus von Kohlenhydrat-bindenden Antikörpern gewonnen. Hierbei wurde die Bedeutung des hydrophoben Isoleucin an der Position 97<sub>H</sub> in der CDR H3 im Zentrum der Antigenbindungstasche des NH2240-31 nicht nur für eine affine Interaktion mit Kdo-Strukturen, sondern auch für eine spezifische Bindung von *C. psittaci* herausgestellt. Die Bedeutung der CDR H3 für die Affinität wurde zusätzlich durch die

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Mutation H3<sub>post</sub> des scFv S69-4 verdeutlicht. Der Austausch von nur vier Aminosäuren in der CDR H3 bewirkte eine drastische Affinitätssteigerung dieses Antikörpers gegenüber HS-4P. Die Affinität des NH2240-31 konnte durch die Mutation H3<sub>F</sub> nicht erhöht werden, allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit anhand dieser Mutante gezeigt, dass offenbar weniger affine Antikörper eine höhere Spezifität gegenüber HS-4P verleihen.

---

**VI. LITERATUR**

- Abdelrahman YM, Belland RJ: The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* 29, 949-959 (2005)
- Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C: Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273, 927-948 (1997)
- Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ: Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* 233, 747-753 (1986)
- Anand NN, Mandal S, MacKenzie CR, Sadowska J, Sigurskjold B, Young NM, Bundle DR, Narang SA: Bacterial expression and secretion of various single-chain Fv genes encoding proteins specific for a *Salmonella* serotype B O-antigen. *J Biol Chem* 266, 21874-21879 (1991)
- Andrade JD, Hlady V: Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested Hypotheses. *Adv Polym Sci* 79, 1-63 (1986)
- Andrew SM, Titus JA: Fragmentation of immunoglobulin G. *Curr Protoc Immunol Chapter 2, Unit 2.8* (2001)
- Attrill H, Imamura A, Sharma RS, Kiso M, Crocker PR, van Aalten DM: Siglec-7 undergoes a major conformational change when complexed with the  $\alpha(2,8)$ -disialylganglioside GT1b. *J Biol Chem* 281, 32774-32783 (2006)
- Baker DA, Sugii S, Kabat EA, Ratcliffe RM, Hermentin P, Lemieux RU: Immunochemical studies on the combining sites of Forssman hapten reactive hemagglutinins from *Dolichos biflorus*, *Helix pomatia*, and *Wistaria floribunda*. *Biochemistry* 22, 2741-2750 (1983)
- Baneyx F, Mujacic M: Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22, 1399-1408 (2004)
- Barbas III, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ: *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)
- Barbas CF, 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ: Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7978-7982 (1991)
- Belunis CJ, Mdluli KE, Raetz CR, Nano FE: A novel 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Chlamydia trachomatis* required for expression of the genus-specific epitope. *J Biol Chem* 267, 18702-18707 (1992)
- Berk Y, Klaassen CH, Mouton JW, Meis JF: [An outbreak of psittacosis at a bird-fanciers fair in the Netherlands]. *Ned Tijdschr Geneesk* 152, 1889-1892 (2008)
- Bhat TN, Bentley GA, Fischmann TO, Boulot G., Poljak RJ: Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments of antibody D1.3 on antigen. *Nature* 347, 483-485 (1990)
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M: Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426 (1988)
- Bokken GC, Corbee RJ, van Knapen F, Bergwerff AA: Immunochemical detection of *Salmonella* group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor. *FEMS Microbiol Lett* 222, 75-82 (2003)
- Boman J, Gaydos CA, Quinn TC: Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*

## LITERATUR

---

- 37, 3791-3799 (1999)
- Bondeson K, Frostell-Karlsson A, Fagerstam L, Magnusson G: Lactose repressor-operator DNA interactions: kinetic analysis by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Biochem* 214, 245-251 (1993)
- Bornscheuer UT, Pohl M: Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* 5, 137-143 (2001)
- Brade H, Brade L, Nano FE: Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2508-2512 (1987a)
- Brade L, Holst O, Kosma P, Zhang YX, Paulsen H, Krause R, Brade H: Characterization of murine monoclonal and murine, rabbit, and human polyclonal antibodies against chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 58, 205-213 (1990)
- Brade L, Nano FE, Schlecht S, Schramek S, Brade H: Antigenic and immunogenic properties of recombinants from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella minnesota* rough mutants expressing in their lipopolysaccharide a genus-specific chlamydial epitope. *Infect Immun* 55, 482-486 (1987b)
- Brade L, Nurminen M, Makela PH, Brade H: Antigenic properties of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 48, 569-572 (1985)
- Brade L, Rozalski A, Kosma P, Brade H: A monoclonal antibody recognizing the 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) trisaccharide  $\alpha$ Kdo(2-->4) $\alpha$ Kdo(2-->4) $\alpha$ Kdo of *Chlamydia psittaci* 6BC lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res* 6, 361-368 (2000)
- Brade L, Schramek S, Schade U, Brade H: Chemical, biological, and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 54, 568-574 (1986)
- Bradshaw CS, Tabrizi SN, Read TR, Garland SM, Hopkins CA, Moss LM, Fairley CK: Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. *J Infect Dis* 193, 336-345 (2006)
- Braun B, Paschke M: Der Phagen-Display-Zyklus aus: Phagen-Display auf neuen Wegen. *BIOspektrum* 04.06 12. Jahrg., 381-383 (2006)
- Brooks CL, Müller-Loennies S, Brade L, Kosma P, Hiram T, MacKenzie CR, Brade H, Evans SV: Exploration of specificity in germline monoclonal antibody recognition of a range of natural and synthetic epitopes. *J Mol Biol* 377, 450-468 (2008)
- Brooks CL, Blackler RJ, Gerstenbruch S, Kosma P, Müller-Loennies S, Brade H, Evans SV: Pseudo-symmetry and twinning in crystals of homologous antibody Fv fragments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64, 1250-1258 (2008b)
- Burton MJ: Trachoma: an overview. *Br Med Bull* 84, 99-116 (2007)
- Caldwell HD, Hitchcock PJ: Monoclonal antibody against a genus-specific antigen of *Chlamydia* species: location of the epitope on chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 44, 306-314 (1984)
- Catimel B, Nerrie M, Lee FT, Scott AM, Ritter G, Welt S, Old LJ, Burgess AW, Nice EC: Kinetic analysis of the interaction between the monoclonal antibody A33 and its colonic epithelial antigen by the use of an optical biosensor. A comparison of immobilisation strategies. *J Chromatogr A* 776, 15-30 (1997)
- Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Hammerschlag MR, Schachter J: Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn. *J Infect Dis* 163, 757-761 (1991)

## LITERATUR

---

- Chothia C, Lesk AM: Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196, 901-917 (1987)
- Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G: Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol* 227, 799-817 (1992)
- Choudhary G, Horvath C: Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol* 270, 47-82
- Ciftçi B, Guler ZM, Aydogdu M, Konur O, Erdogan Y: Familial outbreak of psittacosis as the first *Chlamydia psittaci* infection reported from Turkey. *Tuberk Toraks* 56, 215-220 (2008)
- Coleman L, Mahler SM: Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis. *Protein Expr Purif* 32, 246-251 (2003)
- Condra JH, Sardana VV, Tomassini JE, Schlabach AJ, Davies ME, Lineberger DW, Graham DJ, Gotlib L, Colonno RJ: Bacterial expression of antibody fragments that block human rhinovirus infection of cultured cells. *J Biol Chem* 265, 2292-2295 (1990)
- Corsaro D, Greub G: Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19, 283-297 (2006)
- Creighton TE: Protein structure – A practical approach. 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford: IRL Press at Oxford Univ. Press (1997)
- Crocker PR: Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol* 12, 609-615 (2002)
- Crowley JM: Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys J* 13, 711-724 (1973)
- Cyglar M, Rose DR, Bundle DR: Recognition of a cell-surface oligosaccharide of pathogenic Salmonella by an antibody Fab fragment. *Science* 253, 442-445 (1991)
- Darby NJ, Creighton TE: Protein structure. Oxford: IRL Press at Oxford Univ. Press (1993)
- Davies DR, Padlan EA, Sheriff S: Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem* 59, 439-473 (1990)
- Dean D, Kandel RP, Adhikari HK, Hessel T: Multiple Chlamydiaceae species in trachoma: implications for disease pathogenesis and control. *PLoS Med* 5, e14 (2008)
- Deng SJ, MacKenzie CR, Sadowska J, Michniewicz J, Young NM, Bundle DR, Narang SA: Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J Biol Chem* 269, 9533-9538 (1994)
- DiPadova FE, Brade H, Barclay GR, Poxton IR, Liehl E, Schuetze E., Kocher HP, Ramsay G, Schreier MH, McClelland, DB, et al.: A broadly cross-protective monoclonal antibody binding to *Escherichia coli* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 61 (1993)
- Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, et al: Standardizing *Chlamydia pneumoniae* Assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clinical Infectious Diseases* 33, 492-503 (2001)
- Doughri AM, Yong S, Storz J: Pathologic changes in intestinal chlamydial infection of newborn calves. *Am J Vet Res* 35, 939-944 (1974)
- Englard S, Seifter S: Precipitation techniques. *Methods Enzymol* 182, 285-300 (1990)
- Engvall E, Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of

## LITERATUR

---

- immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874 (1971)
- Everett KD: Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 75, 109-126 (2000)
- Fägerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, Persson B, Ronnberg I: Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr* 597, 397-410 (1992)
- Fisher RJ, Fivash M: Surface plasmon resonance based methods for measuring the kinetics and binding affinities of biomolecular interactions. *Curr Opin Biotechnol* 5, 389-395 (1994)
- Freundenberg J, von Schickfus M, Hunklinger S: A SAW immunosensor for operation in liquid using a SiO<sub>2</sub> protective layer. *Sens. Actuators B* 76, 147-151 (2001)
- Friedman MG, Dvoskin B, Kahane S: Infections with the chlamydia-like microorganism *Simkania negevensis*, a possible emerging pathogen. *Microbes Infect* 5, 1013-1021 (2003)
- Fu Y, Baumann M, Kosma P, Brade L, Brade H: A synthetic glycoconjugate representing the genus-specific epitope of chlamydial lipopolysaccharide exhibits the same specificity as its natural counterpart. *Infect Immun* 60, 1314-1321 (1992)
- Furukawa K, Shirai H., Azuma T, Nakamura H: A role of the third complementarity-determining region in the affinity maturation of an antibody. *J Biol Chem* 276 (2001)
- Gallati H: Horseradish peroxidase: a study of the kinetics and the determination of optimal reaction conditions, using hydrogen peroxide and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as substrates (author's transl). Artikel auf deutsch. *J Clin Chem Clin Biochem* 17, 1-7 (1979)
- Garrard LJ, Yang M, O'Connell MP, Kelley RF, Henner DJ: Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology (N Y)* 9, 1373-1377 (1991)
- Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE: Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 351 Suppl 3, 2-4 (1998)
- Gianazza E, Righetti PG: Size and charge distribution of macromolecules in living systems. *J Chromatography* 193, 1-8 (1980)
- Gibson TJ: PhD thesis, Cambridge University, Cambridge, UK (1984)
- Glaser RW: Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Anal Biochem* 213, 152-161 (1993)
- Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Plückthun A: A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29, 1362-1367 (1990)
- Glockshuber R, Schmidt T, Plückthun A: The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 1270-1279 (1992)
- Goding JW: *Monoclonal Antibodies*. 2nd Edition London Academic press (1968)
- Grayston JT, in Sillis M: Species differentiation in the diagnosis of chlamydial respiratory infections, in *Immunofluorescence – antigen detection techniques in diagnostic microbiology*, 1992 Public Health Laboratory Service (1988)
- Grayston JT: Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis* 181 Suppl 3, S402-410 (2000)

## LITERATUR

---

- Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA: Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8, 191-202 (1989)
- Greub G, Raoult D: Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. *Emerg Infect Dis* 8, 625-630 (2002)
- Gronewold TM: Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: recent trends and challenges. *Anal Chim Acta* 603, 119-128 (2007)
- Gronewold TM, Baumgartner A, Quandt E, Famulok M: Discrimination of single mutations in cancer-related gene fragments with a surface acoustic wave sensor. *Anal Chem* 78, 4865-4871 (2006)
- Gronewold TM, Glass S, Quandt E, Famulok M: Monitoring complex formation in the blood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors. *Biosens Bioelectron* 20, 2044-2052 (2005)
- Gültekin H, Heermann KH: The use of polyvinylidenedifluoride membranes as general blotting matrix. *Anal Biochem* 172, 320-329 (1988)
- Hackstadt T, Todd WJ, Caldwell HD: Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J Bacteriol* 161, 25-31 (1985)
- Hanuszkiewicz A, Hubner G, Vinogradov E, Lindner B, Brade L, Brade H, Debarry J, Heine H, Holst O: Structural and immunochemical analysis of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter lwoffii* F78 located outside *Chlamydiaceae* with a *Chlamydia*-specific lipopolysaccharide epitope. *Chemistry* 14, 10251-10258 (2008)
- Hardman KD, Ainsworth CF: Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* 11, 4910-4919 (1972)
- Harrick, NJ: Internal reflection spectroscopy. Interscience. New York (1967)
- Harrison R. *innovations* 11, 4-7 (2000)
- Hartl FU, Hayer-Hartl M: Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858 (2002)
- Heine H, Müller-Loennies S, Brade L, Lindner B, Brade H: Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydomphila psittaci* 6BC. *Eur J Biochem* 270, 440-450 (2003)
- Hobson D: Nongonococcal urethritis and related oculogenital infections. *Proc R Soc Med* 70, 49-52 (1977)
- Holst O, Bock K, Brade L, Brade H: The structures of oligosaccharide bisphosphates isolated from the lipopolysaccharide of a recombinant *Escherichia coli* strain expressing the gene *gseA* [3-deoxy-D-manno-octulopyranosonic acid (Kdo) transferase] of *Chlamydia psittaci* 6BC. *Eur J Biochem* 229, 194-200 (1995)
- Holst O, Broer W, Thomas-Oates JE, Mamat U, Brade H: Structural analysis of two oligosaccharide bisphosphates isolated from the lipopolysaccharide of a recombinant strain of *Escherichia coli* F515 (Re chemotype) expressing the genus-specific epitope of *Chlamydia* lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 214, 703-710 (1993)
- Houen G, Jensen OM: Conjugation to preactivated proteins using divinylsulfone and iodoacetic acid. *J Immunol Methods* 181, 187-200 (1995)
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al.: Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-

## LITERATUR

---

- digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5879-5883 (1988)
- Janeway CA jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie*. 5. dt Aufl., Spektrum Akad. Verl. Heidelberg (2002)
- Johne B, Gadnell M, Hansen K: Epitope mapping and binding kinetics of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance. *J Immunol Methods* 160, 191-198 (1993)
- Johnsson B, Löfås S, Lindquist G: Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* 198, 268-277 (1991)
- Jones DS, Silverman AP, Cochran JR: Developing therapeutic proteins by engineering ligand-receptor interactions. *Trends Biotechnol* 26, 498-505 (2008)
- Jönsson U, Fägerstam L, Ivarsson B, Johnsson B, Karlsson R, Lundh K, Löfås S, Persson B, Roos H, Rönnberg I, et al.: Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* 11, 620-627 (1991)
- Kabat EA, Liao J, Burzynska MH, Wong TC, Thøgersen H, Lemieux RU: Immunochemical studies on blood groups--LXIX. The conformation of the trisaccharide determinant in the combining site of anti-I Ma. *Mol Immunol* 18, 873-881 (1981)
- Kabat EA, Liao J, Lemieux RU: Immunochemical studies on blood groups--LXVIII. The combining site of anti-I Ma (group 1). *Immunochemistry* 15, 727-731 (1978)
- Kaltenboeck B, Heard D, DeGraves FJ, Schmeer N: Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J Clin Microbiol* 35, 2293-2298 (1997)
- Karlsson R: SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J Mol Recognit* 17, 151-161 (2004)
- Karlsson R, Larsson A: Affinity measurement using surface plasmon resonance. *Methods Mol Biol* 248, 389-415 (2004)
- Katz E, Willner I: Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis* 15, 913-947 (2003)
- Kazlauskas RJ: Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* 4, 81-88 (2000)
- Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975)
- Komath SS, Kavitha M, Swamy MJ: Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org Biomol Chem* 4, 973-988 (2006)
- Kortt AA, Gruen LC, Oddie GW: Influence of mass transfer and surface ligand heterogeneity on quantitative BIAcore binding data. Analysis of the interaction of NC10 Fab with an anti idiotypic Fab'. *J Mol Recognit* 10, 148-158 (1997)
- Kosma P: Chlamydial lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta* 1455, 387-402 (1999)

## LITERATUR

---

- Kosma P, Bahnmüller R, Schulz G, Brade H: Synthesis of a tetrasaccharide of the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Carbohydr Res* 208, 37-50 (1990)
- Kosma P, Reiter A, Hofinger A, Brade L, Brade H: Synthesis of neoglycoproteins containing Kdo epitopes specific for *Chlamydomphila psittaci* lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res* 6, 57-69 (2000)
- Kosma P, Schulz G, Brade H: Synthesis of a trisaccharide of 3-deoxy-D-manno-2-octulopyranosylonic acid (KDO) residues related to the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Carbohydr Res* 183, 183-199 (1988)
- Kosma P, Strobl M, Allmaier G, Schmid E, Brade H: Synthesis of pentasaccharide core structures corresponding to the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Carbohydr Res* 254, 105-132 (1994)
- Kretschmann E, Raether H: Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturf. A* 23, 2135-2136 (1968)
- Kuo CC, Grayston JT: In vitro drug susceptibility of *Chlamydia sp.* strain TWAR. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 257-258 (1988)
- Lämmli UK: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- Lemieux RU, Wong TC, Liao J, Kabat EA: The combining site of anti-I Ma (group 1). *Mol Immunol* 21, 751-759 (1984)
- Liedberg B, Nylander C, Lundström I: Biosensing with surface plasmon resonance--how it all started. *Biosens Bioelectron* 10, i-ix (1995)
- Lindhorst TK: *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* Wiley-VCH; Auflage: 3., vollst. überarb. und erw. A. (2007)
- Liss M, Petersen B, Wolf H, Prohaska E: An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem* 74, 4488-4495 (2002)
- Liu CG, Zhu MC, Chen ZN: Preparation and purification of F(ab')<sub>2</sub> fragment from anti hepatoma mouse IgG(1) mAb. *World J Gastroenterol* 5, 522-524 (1999)
- Löbau S, Mamat U, Brabetz W, Brade H: Molecular cloning, sequence analysis, and functional characterization of the lipopolysaccharide biosynthetic gene *kdtA* encoding 3-deoxy- $\alpha$ -D-manno-octulosonic acid transferase of *Chlamydia pneumoniae* strain TW-183. *Mol Microbiol* 18, 391-399 (1995)
- Löfås S, Johnsson B: A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1526 – 1528 (1990)
- Lottspeich F, Zorbas H: *Bicinchoninsäure-Assay*. *Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag*, Mai 1998, 1. Aufl. 40 (1998)
- MacKenzie CR, Hiram T, Deng SJ, Bundle DR, Narang SA, Young NM: Analysis by surface plasmon resonance of the influence of valence on the ligand binding affinity and kinetics of an anti-carbohydrate antibody. *J Biol Chem* 271, 1527-1533 (1996)
- MacKenzie CR, Jennings HJ: Characterization of polysaccharide conformational epitopes by surface plasmon resonance. *Methods Enzymol* 363, 340-354 (2003)
- Malik A, Jain S, Rizvi M, Shukla I, Hakim S: *Chlamydia trachomatis* infection in women with secondary

## LITERATUR

---

- infertility. Fertil Steril (2008)
- Malmberg AC, Borrebaeck CA: BIAcore as a tool in antibody engineering. J Immunol Methods 183, 7-13 (1995)
- Mamat U, Baumann M, Schmidt G, Brade H: The genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia* is assembled in *C. psittaci* and *C. trachomatis* by glycosyltransferases of low homology. Mol Microbiol 10, 935-941 (1993)
- Manimala JC, Roach TA, Li Z, Gildersleeve JC: High-throughput carbohydrate microarray profiling of 27 Antibodies demonstrated widespread specificity problems. Glycobiology 17, 17C-23C (2007)
- Martin AC: Accessing the Kabat antibody sequence database by computer. Proteins 25, 130-133 (1996)
- May AP, Robinson RC, Vinson M, Crocker PR, Jones EY: Crystal structure of the N-terminal domain of sialoadhesin in complex with 3' sialyllactose at 1.85 Å resolution. Mol Cell 1, 719-728 (1998)
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ: Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature 348, 552-554 (1990)
- McNutt SH, Waller EF: Sporadic bovine encephalomyelitis. Cornell Vet. 30, 437-448 (1940)
- Merritt EA, Sarfaty S, Jobling MG, Chang T, Holmes RK, Hirst TR, Hol WG: Structural studies of receptor binding by cholera toxin mutants. Protein Sci 6, 1516-1528 (1997)
- Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ: A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature 382, 607-609 (1996)
- Morton TA, Myszka DG, Chaiken IM: Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. Anal Biochem 227, 176-185 (1995)
- Moulder JW: Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. Microbiol Rev 55, 143-190 (1991)
- Moulder JW, Levy NJ, Schulman LP: Persistent infection of mouse fibroblasts (L cells) with *Chlamydia psittaci*: evidence for a cryptic chlamydial form. Infect Immun 30, 874-883 (1980)
- Müller-Loennies S, Grimmecke D, Brade L, Lindner B, Kosma P, Brade H: A novel strategy for the synthesis of neoglycoconjugates from deacylated deep rough lipopolysaccharides. J Endotoxin Res 8, 295-305 (2002)
- Müller-Loennies S, Gronow S, Brade L, MacKenzie R, Kosma P, Brade H: A monoclonal antibody against a carbohydrate epitope in lipopolysaccharide differentiates *Chlamydophila psittaci* from *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Chlamydia trachomatis*. Glycobiology 16, 184-196 (2006)
- Müller-Loennies S, MacKenzie CR, Patenaude SI, Evans SV, Kosma P, Brade H, Brade L, Narang S: Characterization of high affinity monoclonal antibodies specific for chlamydial lipopolysaccharide. Glycobiology 10, 121-130 (2000)
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. Biotechnology 24, 17-27 (1992)
- Myszka DG, Morton TA, Doyle ML, Chaiken LM: Kinetic analysis of protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. Biophys Chem 64, 127-137 (1997)
- Nano FE, Caldwell HD: Expression of the chlamydial genus-specific lipopolysaccharide epitope in *Escherichia coli*. Science 228, 742-744 (1985)

## LITERATUR

---

- Narang SA, Yao FL, Michniewicz JJ, Dubuc G, Phipps J, Somorjai RL: Hierarchical strategy for protein folding and design: synthesis and expression of T4 lysozyme gene and two putative folding mutants. *Protein Eng* 1, 481-485 (1987)
- Neumann E, Rosenheck K: Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* 10, 279-290 (1972)
- Nguyen HP, Seto NO, MacKenzie CR, Brade L, Kosma P, Brade H, Evans SV: Germline antibody recognition of distinct carbohydrate epitopes. *Nat Struct Biol* 10, 1019-1025 (2003)
- Nurminen M, Leinonen M, Saikku P, Mäkelä PH: The genus-specific antigen of *Chlamydia*: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. *Science* 220, 1279-1281 (1983)
- O'Shannessy DJ, Brigham-Burke M, Soneson KK, Hensley P, Brooks I: Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Anal Biochem* 212, 457-468 (1993)
- Paavonen J, Eggert-Kruse W: *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 5, 433-447 (1999)
- Padlan EA: On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins* 7, 112-124 (1990)
- Padlan EA: Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217 (1994)
- Padler-Karavani V, Yu H, Cao H, Chokhawala H, Karp F, Varki N, Chen X, Varki A: Diversity in Specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease. *Glycobiology* 18, 818-830 (2008)
- Palmer JD, Rifkind D: Neutralization of the hemodynamic effects of endotoxin by polymyxin B. *Surg Gynecol Obstet* 138, 755-759 (1974)
- Panayotou G, Gish G, End P, Truong O, Gout I, Dhand R, Fry MJ, Hiles I, Pawson T, Waterfield MD: Interactions between SH2 domains and tyrosine-phosphorylated platelet-derived growth factor beta-receptor sequences: analysis of kinetic parameters by a novel biosensor-based approach. *Mol Cell Biol* 13, 3567-3576 (1993)
- Parham P, Androlewicz MJ, Brodsky FM, Holmes NJ, Ways JP: Monoclonal antibodies: purification, fragmentation, application to structural and functional studies of class I MHC antigens. *J Immunol Methods* 53, 133-173 (1982)
- Perozzo R, Folkers G, Scapozza L: Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res* 24, 1-52 (2004)
- Persson H: Envenoming by European vipers antivenom treatment--influence on morbidity. *Przegl Lek* 58, 223-225 (2001)
- Petersen EM, de la Maza LM, Brade L, Brade H: Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 66, 3848-3855 (1998)
- Petrovay F, Balla E: Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. *J Med Microbiol* 57, 1296-1298 (2008)
- Phillips DC: Symposium on Three-Dimensional Structure of Macromolecules of Biological Origin. by Invitation of the Committee on Arrangements for the Autumn Meeting. Presented before the Academy on October 19, 1966. Chairman, Kauzmann W: The hen egg-white lysozyme molecule

## LITERATUR

---

- Proc Natl Acad Sci U S A. 57, 483–495 (1967)
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G: Metal Chelate affinity chromatography, a new approach to protein Fractionation. *Nature* 258, 598-599 (1975)
- Qureshi N, Kaltashov I, Walker K, Doroshenko V, Cotter RJ, Takayama K, Sievert TR, Rice PA, Lin JS, Golenbock DT: Structure of the monophosphoryl lipid A moiety obtained from the lipopolysaccharide of *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* 272, 10594-10600 (1997)
- Rehm H: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 4 Aufl. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (2002)
- RKI Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern Ausgabe 2007
- Roden LD, Myszka DG: Global analysis of a macromolecular interaction measured on BIAcore. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 1073-1077 (1996)
- Rossomando EF. Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol* 182, 309-317 (1990)
- Rund S, Lindner B, Brade H, Holst O: Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Chlamydia trachomatis* serotype L2. *J Biol Chem* 274, 16819-16824 (1999)
- Rund S, Lindner B, Brade H, Holst O: Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Chlamydophila psittaci* strain 6BC. *Eur J Biochem* 267, 5717-5726 (2000)
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354 (1985)
- Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T.: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. (1989)
- Schachter J: Chlamydial infections (second of three parts). *N Engl J Med* 298, 490-495 (1978)
- Schachter J, Caldwell HD: Chlamydiae. *Annu Rev Microbiol* 34, 285-309 (1980)
- Schein C: Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnol* 7, 1141-1149 (1989)
- Schlecht U, Malave A, Gronewold TM, Tewes M, Lohndorf M: Detection of Rev peptides with impedance-sensors--comparison of device-geometries. *Biosens Bioelectron* 22, 2337-2340 (2007)
- Schlenso MD, Gronewold TMA, Tewes M, Famulok M, Quandt E: A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands. *Sensors and Actuators B* 101, 308-315 (2004)
- Schuck P: Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport. *Biophys J* 70, 1230-1249 (1996)
- Severs AH, Schasfoort RBM, Salden MHL: An immunosensor for syphilis screening based on surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron* 8, 185-189 (1993)
- Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, Hemingsen G, Wong C, Gerhart JC, Marks JD: Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6157-6162 (1998)
- Sheriff S, Chang CY, Jeffrey PD, Bajorath J: X-ray structure of the uncomplexed anti-tumor antibody BR96 and comparison with its antigen-bound form. *J Mol Biol* 259, 938-946 (1996)
- Shiba J., Gronewold TMA, Schlenso MD, Olbrich C, Quandt E, Famulok M, Schirner M: Specific targeting

## LITERATUR

---

- of ultrasound contrast agent (USCA) for diagnostic application: an in vitro feasibility study based on SAW biosensor. *Biosens Bioelectron* 20, 1829-1835 (2005)
- Skerra A, Pfitzinger I, Plückthun A: The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)* 9, 273-278 (1991)
- Skerra A, Plückthun A: Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041 (1988)
- Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317 (1985a)
- Smith KA, Bradley KK, Stobierski MG, Tengelsen LA: Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. *J Am Vet Med Assoc* 226, 532-539 (2005)
- Smith M: In vitro mutagenesis. *Annu Rev Genet* 19, 423-462 (1985b)
- Stenberg E, Persson B, Roos C, Urbaniczky C: Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci* 143, 513-526 (1990)
- Sørensen HP, Mortensen KK: Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4, 1 (2005)
- Stephens RS, Tam MR, Kuo CC, Nowinski RC: Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol* 128, 1083-1089 (1982)
- Storz J: Intestinal chlamydial infections of ruminants. In *Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A., 146-154(1971)
- Storz J, Smart RA, Marriott ME, Davis RV: Polyarthritits of calves: isolation of psittacosis agents from affected joints. *Am J Vet Res* 27, 633-641 (1966)
- Studier FW, Moffatt BA: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression Of cloned genes. *J Mol Biol* 1, 113-130 (1986)
- Terpe K: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial Systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523-533 (2003).
- Tsong TY: Electroporation of cell membranes. *Biophys J* 60, 297-306 (1991)
- Van der Merwe PA, Barclay AN, Mason DW, Davies EA, Morgan BP, Tone M, Krishnam AK, Ianelli C, Davis SJ: Human cell-adhesion molecule CD2 binds CD58 (LFA-3) with a very low affinity and an Extremely fast dissociation rate but does not bind CD48 or CD59. *Biochemistry* 33, 10149-10460 (1994)
- Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F: *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* 45, 93-119 (1995)
- Van Weemen BK, Schuurs AH: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15, 232-236 (1971)
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J: *Essentials of glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1999)

## LITERATUR

---

- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS: Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 14, 309-314 (1996)
- Weaver JC: Electroporation of cells and tissues. *Plasma Science, IEEE Transactions* 28, 24 – 33 (2000)
- Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC: Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289, 366-373 (1981)
- Wilson MR, Thomson RG: *Chlamydia pneumoniae* of calves. *Res Vet Sci* 9, 467-473 (1968)
- Yelton DE, Rosok MJ, Cruz G, Cosand WL, Bajorath J, Hellström I, Hellström KE, Huse WD, Glaser SM: Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. *J Immunol* 155, 1994-2004 (1995)
- Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J: Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52, 3402-3408 (1992)
- Zdanov A, Li Y, Bundle DR, Deng SJ, MacKenzie CR, Narang SA, Young NM, Cygler M: Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv) fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6423-6427 (1994)
- Zhang W, Matsumoto-Takasaki A, Kusada Y, Sakaue H, Sakai K, Nakata M, Fujita-Yamaguchi Y: Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing nonreducing terminal mannose residues. 2. Expression, purification, and characterization of recombinant single chain antibodies. *Biochemistry* 46, 263-270 (2007)
- Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F: Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J* 14, 881-899 (1974)

## VII. ANHANG

### VII.1.Oligonukleotidsequenzen

Bezeichnung	Verwendung	T <sub>a</sub> in °C
NH1543-01 A	Amplifikation der scFv-Gene in pSJF8 5'CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC3'	46 °C
NH1543-02 S	Amplifikation der scFv-Gene in pSJF8 5'GCGGATAACAATTTACACAGGAA3'	46 °C
NH2160-04 S	Amplifikation der scFv-Gene in pComb3XSS und Einfügen einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle 5'GGGGGGAATTCATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGC3'	60 °C
NH1971-03 A	Amplifikation der scFv-Gene in pComb3XSS und Einfügen einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle 5'GGGGGATCCCTTCAAATCTTCTCACTGATTAGCTTCTGTTCAGATCTTGAGGAGACGGTGACTGAGGT3'	60 °C
SAG61-01 A	Mutation VH scFv NH2240-31 H97 I/F 5'CCCCAGTAGTCCATAGCATCGAAAGTAGTAACCATCTCTTGCAC3'	75 °C
SAG61-11 S	Mutation VH scFv NH2240-31 H97 I/F 5'GTGCAAGAGATGGTTACTACTTTCGATGCTATGGACTACTGGGG3'	75 °C
SAG132-01 A	Mutation VH scFv NH2240-31 H97 I/A 5'GTGCAAGAGATGGTTACTACGCAGATGCTATGGAC3'	55 °C
SAG132-11 S	Mutation VH scFv NH2240-31 H97 I/A 5'GTCCATAGCATCTGCGTAGTAACCATCTCTTGCAC3'	55 °C
SAG61-02 A	Mutation VH scFv 45-18 H97 F/I 5'ACCCAGTAATCCATACCATCCCTACTCCCAGATAGAATAGATATC3'	70 °C
SAG61-12 S	Mutation VH scFv 45-18 H97 F/I 5'GATATCTATTCTATCGGGAGTAGGGATGGTATGGATTACTGGGGT3'	70 °C
SAG132-02 S	Mutation VH scFv 45-18 H97 F/A 5'GATATCTATTCCGCGGGGAGTAGGGATGGTATGGACTACTG3'	50 °C
SAG132-12 A	Mutation VH scFv 45-18 H97 F/A 5'SAGCAGTAGTCCATACCATCCCTACTCCCCGCGGAATAGATATC3'	50 °C
SAG61-03 A	Mutation VH scFv 69-4 H91,94-96 ALIY/VIYS 5'GGATAGCGCCACTTATTACTGTGTGAGAGATATCTATTCCTTTGATTACGACGA3'	50 °C
SAG61-13 S	Mutation VH scFv 69-4 H91,94-96 ALIY/VIYS 5'TCGTCGTAATCAAAGGAATAGATATCTCTCACACAGTAATAAGTGGCGCTATCC3'	50 °C
SAG175-01 S	Mutation VH scFv 69-4 H98-100,102 DYDA/GSRG 5'GTGCAAGAGATCTGATCTACTTTGATTACGACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC3'	65 °C
SAG175-02 A	Mutation VH scFv 69-4 H98-100,102 DYDA/GSRG 5'GGTTCCTTGTCCCCAGTAGTCCATCCCATCCCTGCTTCCAAAGTAGATCAGATCTCTTGCAC3'	65 °C
SAG1451-01 S	Mutation VL scFv NH2240-31 L30a K/N 5'ATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGTTTAAATAGTAG3'	50 °C
SAG1451-02 A	Mutation VL scFv NH2240-31 L30a K/N 5'CTACTATTAAACAGACTCTGACTGGATTTCAGCTCAT3'	50 °C
SAG1451-03 S	Mutation VH scFv NH2240-31 H52c A/P 5'TGAGTGGTTGGGGTTCATTAGAAACAAGCCGAAAGGTTATACA3'	50 °C
SAG1451-04 S	Mutation VH scFv NH2240-31 H52c A/P 5'TGTATAACCTTTCGGCTTGTCTTAATGAAACCCCAACCACTCA3'	50 °C

**Tab. 21:** Verwendete Oligonukleotide für die PCR. T<sub>a</sub>: Annealing-Temperatur. S = Sense Primer, A = Antisense Primer, grau unterlegt = Nucleobasen, die im Zuge der Mutagenese in der Zielsequenz verändert wurden, unterstrichene Nucleobasen = Endonuklease-Schnittstelle. NH = Oligonukleotide, entworfen von N. Harmel (FZ Borstel), SAG = selbst entworfene Oligonukleotide mittels PrimerSelect™ DNASTAR Inc., Wisconsin, USA, synthetisiert von Eurofins MWG GmbH, Martinsried, Qualität: HPSF high purity salt free.

VII.2. Gen- und Proteinsequenzen

<u>M K K T A I A I A V A L A G F A T</u> <u>ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACC</u>	NH2240-31 WT
<u>V A Q A A E L</u> D I V M T Q S P S S <u>GTGGCCAGGCGGCCGAGCTCGACATTGTAATGACCCAATCTCCATCCTCC</u>	NH2240-31 WT
L A V S A G E K V T M S C K S S Q CTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAG	NH2240-31 WT
S L F K S R N Q K N Y L A W Y Q Q AGTCTGTTTAAGAGTAGAAAATCAAAAAGAACTACTGGCTTGGTACCAGCAG	NH2240-31 WT
K P G Q S P K L L I Y W A S T R E AAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAA	NH2240-31 WT
S G V P D R F T G S G S G T D F T TCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT	NH2240-31 WT
L T I N G V Q A E D L A V Y Y C K CTCACCATCAACGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAG	NH2240-31 WT
Q S Y N L R T F G G G T K L E L K CAATCTTATAATCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	NH2240-31 WT
S S G G G G S G G G G G S S R S <u>TCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGTGGTTCTCTAGATCT</u>	NH2240-31 WT
S L E V Q L V E S G G G L V Q P G <u>TCCCTCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTGGTACAGCCTGGG</u>	NH2240-31 WT
G S L R L S C A T S G F T F T D Y GGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTTCACTGATTAC	NH2240-31 WT
Y M S W V R Q P P G K A L E W L G TACATGAGCTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCACTTGAGTGGTTGGGT	NH2240-31 WT
F I R N K A K G Y T T E Y S A S V TTCATTAGAAAACAAAGCTAAAGGTTATACAACAGAGTACAGTGCATCTGTG	NH2240-31 WT
K G R F S I S R D N S Q S I L Y L AAGGGTTCGGTTCAGCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTATCTT	NH2240-31 WT
Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R CAAATGAACACCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCTTATTACTGTGCAAGA	NH2240-31 WT
D G Y Y I D A M D Y W G Q G T S V GATGGTTACTACATAGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC	NH2240-31 WT
T V S S R S E Q K L I S E E D L K ACCGTCTCC <u>TCAAGATCTGAACAGAAGCTAATCAGTGAGGAAGATTTGAAG</u>	NH2240-31 WT
G S H H H H H <u>GGATCCATCACCATCACCAT</u>	NH2240-31 WT

**Abb. 41:** Gen- und Proteinsequenz des scFv NH2240-31, bestehend aus den variablen Domänen der leichten (VL) und schweren Kette (VH), verbunden durch eine Linkersequenz (Barbas III et al., 2001) (unterstrichen) verbunden. Leaderpeptid (gelb unterlegt), drei Aminosäuren kommen durch die Schnittstellen für die Klonierung des scFv zustande (grau unterlegt), c-Myc-Tag (blau), His(5)-Tag (orange). Länge des reifen scFv = 816 bp bzw. 272 Aminosäuren, Molekulargewicht 30 kDa.

### VII.3. Molekulargewichte in Bindungsstudien verwendeter Proteine

Antikörperfragment	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht in kDa
scFv	272-275	30 <sup>1</sup>
Fab S45-18 und S25-2	441-445	50

**Tab. 22:** Molekulargewichte der Antikörperfragmente. <sup>1</sup> Die Molekulargewichte der reifen scFv beinhalten den c-Myc- und His<sub>(5)</sub>-Tag.

Neoglycokonjugat	Molekulargewicht in kDa	Anzahl der Ligandmoleküle pro BSA-Molekül
HS-4P (V5228)	71,6	6,1
HS-4P (V5329)	71,6	4,3
2.4-2.4 PS-4P (V6745)	72,9	6,4
2.8-2.4 PS-4P (V5327)	75,1	8,4
BBP (P3330)	69,7	7,5

**Tab. 23:** Molekulargewichte der für Biacore- und SAW-Experimente verwendeten Neoglycokonjugate.

### DANKSAGUNG

Ich bedanke mich vor allem bei Prof. Dr. Helmut Brade für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe -Medizinische und Biochemische Mikrobiologie- am Forschungszentrum Borstel anfertigen zu dürfen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt PD Dr. Sven Müller-Loennies für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit, insbesondere für die sehr gute wissenschaftliche Ausbildung.

Bei Dr. Lore Brade, Veronika Susott, Ute Agge und Irina von Cube sowie allen anderen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft im Labor und für das nette Miteinander. Insbesondere ist hier Nadine Harmel zu nennen, die mich stets unterstützt und mir nicht nur beruflich eine große Hilfe war sowie auch Lena Heinbockel und Dr. Sandra Albrecht ebenfalls für ihre Freundschaft.

Großer Dank gilt auch Dr. C. Roger MacKenzie vom National Research Council, Ottawa, Kanada und dessen Mitarbeitern für die ersten BIAcore-Studien.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Jörg Andrä und PD Dr. Thomas Gutschmann bedanken, die mir am SAW mit Rat und Tat zur Seite standen sowie auch Dr. Uwe Mamat.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie für die nicht nur finanzielle Unterstützung sowie meinen Freunden und Hendrik von ganzem Herzen für ihr Verständnis, die Anteilnahme, die Motivation und die wundervollen Stunden außerhalb des Labors.

Zuletzt danke ich meiner ehemaligen Biologielehrerin Frau Petzka. Sie hat den Grundstein gelegt für meinen Wunsch Biologie zu studieren, den ich bisher nie bereut habe.

## LEBENS LAUF

---

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum:	03.01.1978
Geburtsort:	Schwerin
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

---

05/2008 bis heute	Universität Greifswald, Inst. für Biochemie, Abt. Biotechnologie und Enzymkatalyse
03/2005 bis 03/2008	Forschungszentrum Borstel, Abt. Medizinische und Biochemische Mikrobiologie Doktorarbeit: Protein – Kohlenhydrat-Interaktionen und Antikörper Engineering
04/1999 bis 09/2004	Universität Hamburg, Studium der Biologie, Schwerpunkte: Molekularbiologie, Mikrobiologie, Zoologie
09/2003 bis 05/2004	Universität Hamburg, Abt. Molekularbiologie Diplomarbeit: Heterologe Expression, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung einer Lipase
09/2001	Vordiplom in Zoologie, Botanik, Chemie, Physik

### BERUFLICHE UND SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

08/1996 bis 01/1999	Architekturbüro Dipl.-Ing. K. Melzig, Schwerin Ausbildung zur Bauzeichnerin
06/1996	Gymnasium in Schwerin Allgemeine Hochschulreife

## **PUBLIKATIONEN**

Brooks CL, Blackler RJ, **Gerstenbruch S**, Kosma P, Müller-Loennies S, Brade H, Evans SV: Pseudo-symmetry and twinning in crystals of homologous antibody Fv fragments. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 64, 1250-1258 (2008)

## **POSTERPRÄSENTATIONEN**

**Gerstenbruch S**, Brade L, Kosma P, MacKenzie CR, Evans, SV, Brade H, Müller-Loennies S: Carbohydrate-Protein Interaction and Antibody Engineering: Mutations in the primary structure of single chain Fv and their effect on binding properties.

Orte:           59. DGHM Kongress, Göttingen, 30.9. – 4.10.2007  
              14. European Carbohydrate Symposium 2007, Lübeck, 2. – 7.9.2007