

„Generierung, Charakterisierung und funktionaler Assay
von Antikörpern und Antikörperfragmenten gegen die
HCV Strukturproteine core, E1 und E2.“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologen

Tobias Franken

aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. Fischer
Universitätsprofessor Dr. med. K. Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

von einem für zwei

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
I. Einleitung	1
I.1 Hepatitis	1
I.2 Hepatitis C	2
I.2.1 Verteilung und Auftreten	2
I.2.2 Hepatitis C Virus (HCV)	4
I.2.3 Diagnose	6
I.3 Generierung von Antikörpern	8
I.3.1 Antikörper	8
I.3.2 Hybridomatechnologie	10
I.3.3 Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente	11
I.3.4 „Phage Display“	12
I.4 Expression rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i>	13
I.5 Zielsetzung der Arbeit	15
II. Material und Methoden	17
II.1 Material	17
II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
II.1.2 Enzyme und Reaktionskits	17
II.1.3 Antikörper und enzymkonjugierte anti-Antikörper	18
II.1.4 Versuchstiere	18
II.1.5 Bakterienstämme	18
II.1.6 Bakterien- und Phagmidvektoren	19
II.1.7 Synthetische Oligonukleotide	22
II.1.8 Verwendete Puffer und Lösungen	24
II.1.9 Nährmedien	24
II.1.10 Geräte, Apparaturen und Zubehör	24
II.1.11 Gentechnische Arbeiten	25

II.2 Methoden	25
II.2.1 Molekularbiologische Techniken	25
II.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
II.2.1.2 Polymerase Kettenreaktion	26
II.2.1.3 Analytische Agarosegelelektrophorese von DNA	27
II.2.1.4 Präparative Agarosegelelektrophorese	28
II.2.1.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren	28
II.2.1.6 Restriktion von DNA	28
II.2.1.7 Ligation restringierter DNA	28
II.2.1.8 DNA Reinigung/Umpufferung	29
II.2.1.9 Dephosphorylierung restringierter Vektor DNA	29
II.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	29
II.2.1.11 Anzucht von <i>E. coli</i> und Herstellung von Stammkulturen	30
II.2.1.12 Sequenzierung von DNA	31
II.2.2 Proteinbiochemische Methoden	31
II.2.2.1 SDS-PAA-Gelelektrophorese	31
II.2.2.2 Western-Blot und Immunodetektion	31
II.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
II.2.2.4 Massenspektroskopie	33
II.2.2.5 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	33
II.2.3 Proteinproduktion	34
II.2.3.1 HCV Strukturproteine	34
II.2.3.2 Periplasmatische Expression unter Stress	35
II.2.3.3 Zytoplasmatische Expression	36
II.2.3.4 Reinigung periplasmatisch exprimierter Proteine via NiNTA Matrix	36
II.2.3.5 Reinigung zytoplasmatisch exprimierter Proteine via TALON™ Matrix	37
II.2.3.6 Synthetische HCV Peptide	38
II.2.4 Immunisierung	41
II.2.4.1 Immunisierung von Mäusen	41
II.2.4.2 Isolierung von Milzzellen	42
II.2.5 Techniken zur Herstellung monoklonaler Antikörper	42
II.2.5.1 ELISA zur Bestimmung von Serumtitern sowie der Aktivität und Konzentration von monoklonalen Antikörpern	42
II.2.5.2 Kultur, Reinigung und Isotypisierung monoklonaler Antikörper	43

II.2.5.3	Bindungsanalysen mit Volllängenantikörpern und eukaryotisch produzierten HCV Proteinen (ICC)	44
II.2.6	Generierung von scFv Antikörpern aus Hybridomazellen	44
II.2.6.1	mRNA Isolierung aus Hybridomazellen	44
II.2.6.2	Konstruktion rekombinanter scFv Antikörper	45
II.2.6.3	Periplasmatische Expression rekombinanter scFv Antikörper	45
II.2.6.4	Reinigung rekombinanter scFv Antikörper nach periplasmatischer Expression	46
II.2.6.5	ELISA zur Bestimmung der Bindungseigenschaften von scFv Antikörpern	46
II.2.6.6	Dreidimensionale Strukturanalysen	46
II.2.7	„Phage Display“	47
II.2.7.1	Humane HCV Phagen Bibliothek	47
II.2.7.2	„Biopanning“ der humanen scFv Bibliothek	48
II.2.7.3	Anzucht monoklonaler Phagen in Mikrotiterplatten	49
II.2.7.4	Monoklonaler Phagen ELISA	50
II.2.7.5	Produktion von humanen scFv Antikörpern in Mikrotiterplatten	50
III.	Ergebnisse	51
III.1	Prokaryotische Expression der HCV Strukturproteine	51
III.1.1	Bilanzierung der Proteinausbeute	54
III.2	Hybridomaklone	55
III.2.1	ELISA Analysen	56
III.2.2	Bindungsanalysen mit eukaryotisch exprimiertem HCV Protein - „Immuno Cyto Chemistry“ (ICC)	57
III.2.3	Instabile Hybridomazelllinien	60
III.2.3.1	Klonierung der mAk als scFv Antikörperfragmente	60
III.2.3.2	Expression der scFv 1 und scFv 2	60
III.2.3.3	Immunoblot Analysen mit rekombinanten scFv Antikörpern	63
III.2.4	Sequenzanalysen des scFv 1	64
III.2.5	Dreidimensionale Strukturanalyse des scFv 1	65
III.3	Generierung HCV spezifischer monoklonaler Antikörper	66
III.3.1	Immunisierung	66
III.3.2	Generierung monoklonaler Antikörper	67

III.3.3	Charakterisierung der mAk mittels Immunoblot und Isotypenbestimmung	67
III.4	Humane scFv Antikörper	68
III.4.1	„Biopanning“ der humanen scFv Bibliothek	68
III.4.2	Prokaryotisch produziertes Antigen	70
III.4.2.1	Produktion im Mikrotiterplattenmaßstab	70
III.4.3	Synthetisches Antigen	71
III.4.3.1	Monoklonaler Phagen ELISA	71
III.4.3.2	Immunoblot Analyse der positiv getesteten humanen scFv Antikörper	72
III.4.3.3	ELISA Analysen mit humanen scFv Antikörper	73
III.4.3.4	Sequenzierung und Charakterisierung der positiv getesteten scFv Antikörper nach Kabat	74
III.5	Ergebnistabelle der generierten Antikörper	79
IV.	Diskussion	80
IV.1	Bereitstellung von HCV Antigen	80
IV.2	Hybridomatechnologie	83
IV.3	Humane scFv Antikörper	86
IV.4	Ausblick	88
V.	Zusammenfassung	90
VI.	Literatur	91
VI.1	Eigene Veröffentlichungen	104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Stammbaum von verfügbaren, kompletten Sequenzen der HCV Genotypen.	3
Abb. 2:	Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.	4
Abb. 3:	Genomische Struktur und translatierte Proteine des Hepatitis C Virus (HCV).	6
Abb. 4:	Klinischer und virologischer Verlauf von akuter (A) und chronischer (B) Hepatitis C.	8
Abb. 5:	Schematische Darstellung eines Immunglobulins (IgG) und davon abgeleiteten Ak-Fragmenten.	9
Abb. 6:	Schematischer Ablauf einer Hybridomaselektion.	11
Abb. 7:	Schematische Darstellung des „Phage Displays“.	13
Abb. 8:	Übersicht des Arbeitsplans der vorliegenden Arbeit.	16
Abb. 9:	Karte des Plasmids pMT.	19
Abb. 10:	Karte des Plasmids pET 26 b(+).	20
Abb. 11:	Karte des Phagmids pHENHi-scFv.	21
Abb. 12:	Karte des Phagmids pAK 100.	21
Abb. 13:	Karte des Plasmids pRSET B.	22
Abb. 14:	Ablauf einer PCR.	26
Abb. 15:	Schematische Darstellung des HCV Genoms und die Einteilung der zur Verfügung stehenden Konstrukte	34
Abb. 16:	Auswahl der HCV Sequenzen für die synthetischen Peptide.	39
Abb. 17:	Schema der Immunisierungen.	41
Abb. 18:	Ablauf der Hybridomafusion.	43
Abb. 19:	Flussschema einer Phagenbibliotheksherstellung mittels humanen Spendermaterials.	47
Abb. 20:	NuPAGE® (II.2.2.1) und Immunoblot (II.2.2.2) Analyse des unter Stress prokaryotisch produzierten und anschließend gereinigten HCV Oberflächenproteins ΔE2.	51
Abb. 21:	Vergleich von periplasmatischer (II.2.3.2) und zytoplasmatischer (II.2.3.3) Expression des HCV ΔE2 im NuPAGE® (A) und Immunoblot (B).	52
Abb. 22:	NuPAGE® Gel (A) und Immunoblot (B) der im Zytoplasma akkumulierten HCV Strukturproteine nach Reinigung über eine TALON™ Matrix.	54
Abb. 23:	Ergebnis der MS/MS Analysen für die HCV Strukturproteine.	55
Abb. 24:	ELISA Analysen der in Kulturüberständen befindlichen Antikörper.	56
Abb. 25:	Chromatogramme der Protein A Reinigung (A) und Gelfiltrationen (B & C) der Antikörperfermentation des Hybridomaklons 2.	58
Abb. 26:	NuPAGE® und Immunoblot der fermentierten, gereinigten Antikörper des Hybridomaklons 2.	58
Abb. 27:	Nachweis der Bindung von gereinigten Antikörpern des Hybridomaklons 2 an eukaryotisch exprimiertem HCV Antigen.	59
Abb. 28:	Amplifikation der schweren und leichten Ak-V-Domänen aus der cDNA der Hybridomaklone 1 und 2, Klonierung in den Phagmidvektor pHENHi und Expression der rekombinanten scFv Antikörper.	61

Abb. 29:	Indirekter ELISA zur Charakterisierung der Bindeeigenschaften der scFv Antikörper an denaturiertem HCV ΔE2.	62
Abb. 30:	Immunoblot Analysen zum Nachweis der Bindung der rekombinanten scFv Antikörper an HCV ΔE2.	63
Abb. 31:	Aminosäuresequenz des scFv Fragments 1 und Vergleich mit den Schlüsselamino-säuren nach Kabat (KA) und den zugehörigen Keimbahngenen (KB), (Tabelle IX).	64
Abb. 32:	Dreidimensionale Darstellung des scFv 1.	65
Abb. 33:	Titerbestimmung nach Immunisierung mit prokaryotisch produziertem ΔE2 Protein.	66
Abb. 34:	Immunoblot zur Bindungsanalyse der monoklonalen Hybridomaantikörper an denaturiertem HCV ΔE2.	68
Abb. 35:	Kolonien-PCR (II.2.1.2) von 24 Klonen pro Antigen, aufgetragen auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel (II.2.1.3).	70
Abb. 36:	Immunoblot Analyse (II.2.2.2) der im Überstand akkumulierten humanen scFv Antikörper.	72
Abb. 37:	ELISA Analysen der an die synthetischen Peptide HCV-core (A) bzw. HCV-E1 (B) bindenden prokaryotisch produzierten humanen scFv Antikörper.	74
Abb. 38:	Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit synthetischem core Protein selektiert wurden.	75
Abb. 39:	Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit prokaryotisch produziertem, nativem HCV core Protein selektiert wurden.	75
Abb. 40:	Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit synthetischem E1 Protein selektiert wurden.	75
Abb. 41:	Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit synthetischem E2 Protein selektiert wurden.	76
Abb. 42:	Charakterisierung der Aminosäuresequenz des humanen scFv Antikörpers, welcher mit prokaryotisch produziertem, denaturiertem E2 Protein selektiert wurde.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle I:	Zuordnung der HCV Subtypen zu ihren Genotypen nach alter und neuer Nomenklatur.	3
Tabelle II:	HCV Nachweismethoden.	7
Tabelle III:	Übersicht über die verwendeten Antikörper.	18
Tabelle IV:	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.	23
Tabelle V:	Buchstabencode für variable Basenpaare.	23
Tabelle VI:	PCR Ansatz.	26
Tabelle VII:	Parameter der in dieser Arbeit durchgeführten Immunoblots nach Transfer elektrophoretisch separierter Proteine auf eine Nitrocellulosemembran.	32
Tabelle VIII:	Proteinausbeute der prokaryotisch produzierten HCV Proteine.	55
Tabelle IX:	Einteilung des scFv Antikörpers 1 in Klasse und Subgruppe und Zuordnung der entsprechenden Keimbahngene.	64
Tabelle X:	Zuweisung der CDR Regionen des scFv 1 Antikörpers in die kanonischen Klassen nach Chothia.	65
Tabelle XI:	Darstellung der Isotypenbestimmung mittels Hybridomatechnologie generierter monoklonaler Antikörper.	68
Tabelle XII:	Anreicherung der selektierten scFv Phagen nach den Selektionsrunden 1 und 3.	69
Tabelle XIII:	Prozentuale Auswertung der mittels „Phage Display“ auf den unterschiedlichen Antigenen selektierten Phagen.	71
Tabelle XIV:	Einteilung der V_L und V_H der humanen scFv in Klassen, Subgruppen und Zuordnung der ursprünglichen Keimbahngene der einzelnen Segmente.	78
Tabelle XV:	Einteilung der Sequenzen der humanen scFv in kanonische Klassen nach Tomlinson (Tomlinson <i>et al.</i> , 1996).	78
Tabelle XVI:	Ergebnistabelle.	79

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azino-di-3-Ethylbenzthiazolinsulfonat
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CDR	„Complementarity Determining Region“
C _H 1	konstante C _H 1-Domäne der schweren Kette („Heavy Chain“)
C _L 1	konstante C _L 1-Domäne der leichten Kette („Light Chain“)
c-Myc	humanes Peptid zur Proteinmarkierung („Tag“)
C-Region	konstante Region („Constant Region“)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	„Envelope“, HCV Strukturprotein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC/NHS	N-Ethyl-N-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid, N-Hydroxy-Succinimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
<i>et al.</i>	und weitere
ETEC	Enterotoxin produzierende <i>E. coli</i>
Fab	„Fragment Antigen Binding“
Fc	konstante Region („Fragment Crystallin“)
FCS	Fötales Kälber Serum
FITC	Fluorecein-Iso-Thio-Cyanat
FR	„Framework Region“
Fv	„Fragment Variable“
g	Gramm

x g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
ggf.	gegebenenfalls
GAM	Ziege anti-Maus Antikörper („Goat Anti Mouse Antibody“)
h	Stunden
HCV	Hepatitis C Virus
His	Oligohistidinrest („Tag“)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
H-Kette	schwere Kette eines Antikörpers („Heavy Chain“)
HPSF	„High Purity Salt Free“
HRPO	Meerrettich Peroxidase („Horseradish Peroxidase“)
HVR I	hypervariable Region I („Hyper Variable Region I“)
ICC	„Immuno Cyto Chemistry“
Ig	Immunoglobulin
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IU	Internationale Einheiten („International Units“)
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LB	Luria Bertani
L-Kette	leichte Kette eines Antikörpers („Light Chain“)
M	Mol
m	Milli
mM	Millimolar
MALDI-TOF-MS	„Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation-Time-Of-Flight Mass Spectrometry“
mAk	monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
min.	Minuten

MOPS	3 N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure („Messenger Ribonucleic acid“)
n	Nano
n.b.	nicht bestimmbar
NBT	Nitroblautetrazolium
nm	Nanometer
NTA	N-Nitrilo-Tri-Essigsäure
OD	optische Dichte
ompA	„Outer Membrane Protein A“, Signalpeptid
ori	„Origin Of Replication“
p.a.	„Pro Analysis“
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBS-T	PBS + 0,05% (v/v) Tween-20
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenverlängerungs-Reaktion
pelB	Pectat-Lyase, Signalpeptid
PEG	Polyethylenglykol
pfu	„Plaque Forming Unit(s)“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
PO	Peroxidase
ppb	„Parts per Billion“
rAk	rekombinanter Antikörper
RAM	„Rat Anti Mouse“ Antikörper
RIBA	„Recombinant Immuno Blot Assay“
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„Rotations per Minute“
RPMI	Kulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, USA
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription

s.	siehe
S.	Seite
SAP	alkalische Phosphatase aus Schrimps („Shrimps Alkaline Phosphatase“)
scFv	Einzelketten Antikörper aus V _H und V _L („Single Chain Fragment of the Variable Region“)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	„Tris Buffered Saline“
tRNA	„transfer“ Ribonukleinsäure („Transfer Ribonucleinacid“)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	„Unit“, Einheit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
Vol.	Volumen
V-Region	variable Region
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

I. Einleitung

I.1 Hepatitis

Als Hepatitis wird eine entzündliche Erkrankung der Leber bezeichnet, die sowohl einen akuten als auch chronischen Verlauf annehmen kann (Heller & Rehmann, 2005; Rehmann & Nascimbeni, 2005). Auslösende Faktoren einer Erkrankung können Kontakt mit Kohlenwasserstoff-Tetrachloriden, giftige Pilze wie der Pilz *Amanita phalloides*, Arsen, Drogen wie Sulfonamide, Stoffwechselerkrankungen wie z. B. Morbus Wilson oder Hämochromatose, Bakterien wie *Leptospira* und Viren sein. Eine abgeschwächte Form der Hepatitis kann durch die beiden Herpesviren Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus ausgelöst werden (Sparks, 2001). Zusätzlich sind eine Reihe weiterer Viren als Ursache der infektiösen Hepatitis von Bedeutung. Hierzu zählen die bekannten hepatotropen Viren A bis E, sowie das weitestgehend unbekannte Virus G (Schreier *et al.*, 2003). Die Übertragungswege einer Virushepatitis sind entsprechend der unterschiedlichen Viren ebenfalls verschieden. Die Hepatitis A wird über eine Schmierinfektion von Mensch zu Mensch fäkal-oral übertragen; hierbei spielt u.a. Nahrung eine nicht zu unterschätzende Rolle (Robertson & Bell, 2001). Als effektiver Schutz gegen Hepatitis A kann jedoch eine Impfung durchgeführt werden. Die sehr ansteckende Hepatitis B wird sexuell oder durch Blut (parenteral) übertragen, auch gegen sie gibt es geeignete Impfstoffe (Smith, 2001; Jilbert & Mason, 2002). Hepatitis C wird in erster Linie durch Blut (parenteral), sexuell oder vertikal übertragen. Da die Infektionsquellen und -wege zu anderen Viruserkrankungen wie beispielsweise das menschliche Immun-Schwäche-Virus (HIV) gleich sind, kann es zu Co-Infektionen kommen (Rockstroh, 2005; Tien & Wright, 2005). Mit Hepatitis D können sich nur Virusträger des Hepatitis B Virus infizieren, demnach gelten hier die gleichen Verbreitungswege und vorbeugenden Maßnahmen wie bei der Hepatitis B Infektion. Die Hepatitis E wird wie eine Hepatitis A fäkal-oral übertragen. Diese Erkrankung ist gut zu beherrschen, kommt ausschließlich in den Tropen oder Subtropen vor und führt in der Regel nicht zu einem chronischen Verlauf. Das Hepatitis G Virus wurde bereits 1967 isoliert und zunächst als Hepatitis GB Virus bezeichnet. 1995 wurde es aufgrund seiner Genanordnung in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet. Durch das Vorhandensein einer „Internal Ribosomal Entry Site“ (IRES) und zweier Glycoproteine liegt wahrscheinlich eine Verwandtschaft mit dem Hepatitis C Virus vor. Es ist davon

auszugehen, dass eine Übertragung wie bei einer Hepatitis C Infektion erfolgt, doch liegen hier genauere Erkenntnisse bislang noch nicht vor (Modrow *et al.*, 2003).

I.2 Hepatitis C

I.2.1 Verteilung und Auftreten

In den 70er Jahren wurden die Hepatitisviren A und B entdeckt und beschrieben (Smith, 2001). Nach kontrollierten Bluttransfusionen aufgetretene Hepatitisfälle blieben allerdings weiterhin ungeklärt. Durch die Beschreibung des Hepatitis C Virus (HCV) konnte 1989 der wichtigste Vertreter der Non-A, Non-B-Hepatiden identifiziert werden (Choo *et al.*, 1989). Kontakt mit dem Hepatitis C Virus haben nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation etwa 170 Millionen Menschen weltweit (3 % der Weltbevölkerung). Ungefähr 130 Millionen Menschen hiervon gelten als chronisch infiziert. Somit stellt HCV ein global verbreitetes, medizinisches, epidemiologisches und gesundheitspolitisches Problem dar (Schreier *et al.*, 2003). Weltweit sind deutlich regionale Unterschiede in den Infektions- und Durchseuchungsraten zu beobachten (Wasley & Alter, 2000).

Für Europa gehen Schätzungen von 3 - 5 Millionen Virusträgern aus, in Deutschland liegt die Prävalenz von HCV Antikörpern bei 0,4 - 0,7 %. Bei einem chronischen Verlauf der Krankheit (70 - 80 % der Fälle), leben in Deutschland schätzungsweise derzeit 400.000 – 500.000 Virusträger (Schreier *et al.*, 2003). Die chronische Verlaufsform einer HCV Infektion führt bei 20 – 30 % der Fälle zu einer Leberzirrhose und/oder einem hepatozellulären Karzinom (Kurihara *et al.*, 2004).

Aufgrund der hohen Variabilität und Heterogenität der Gensequenz des Virus (Lyra *et al.*, 2004) welche u.a. aus der nichtvorhandenen „Proofreading“ Funktion der viruseigenen Polymerase und den hypervariablen Regionen des E2 Strukturproteins resultiert (Puntoriero *et al.*, 1998), wird das Virus nach alter Nomenklatur in elf, nach neuer Nomenklatur in sechs verschiedene Genotypen mit unterschiedlichen Subtypen unterteilt (Farci *et al.*, 2000; Nguyen & Keffe, 2004; Simmonds *et al.*, 2005) (Tabelle I, Abb. 1). Diese Unterteilung der global vorkommenden Hepatitis C Viren führt aufgrund der Varianzen innerhalb der Genotypen und Subtypen, wie auch phylogenetischer Kladen zu Komplikationen bei der Einteilung neu identifizierter Virustypen. Eine Genotypenstandardeinteilung in eine HCV Klassifizierung ist jedoch für weitere Studien der Epidemiologie, der Evolution oder der Pathogenese des Virus essentiell.

HCV Genotypen und zugeordnete Subtypen	
1	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m
2	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l, m
3	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k
4	a, c, d, e, f, g, h, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t
5	a
6	a, b, d, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q
alte Nomenklatur	neue Nomenklatur
I	1a
II	1b
III	2a
IV	2b
V	3a
VI	3b
4 alpha	4n
4 beta	4o
7a	6e
7b	6d
7c/NGII/II	6f
7d	6c
NGI	6n
8a	6l
8b	6k
9a	6b
9b	6i
9c	6j
10a/TD3	3k
11a	6g

Tabelle I: Zuordnung der HCV Subtypen zu ihren Genotypen nach alter und neuer Nomenklatur. Entnommen und übersetzt aus <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/classification/genotable.html>.

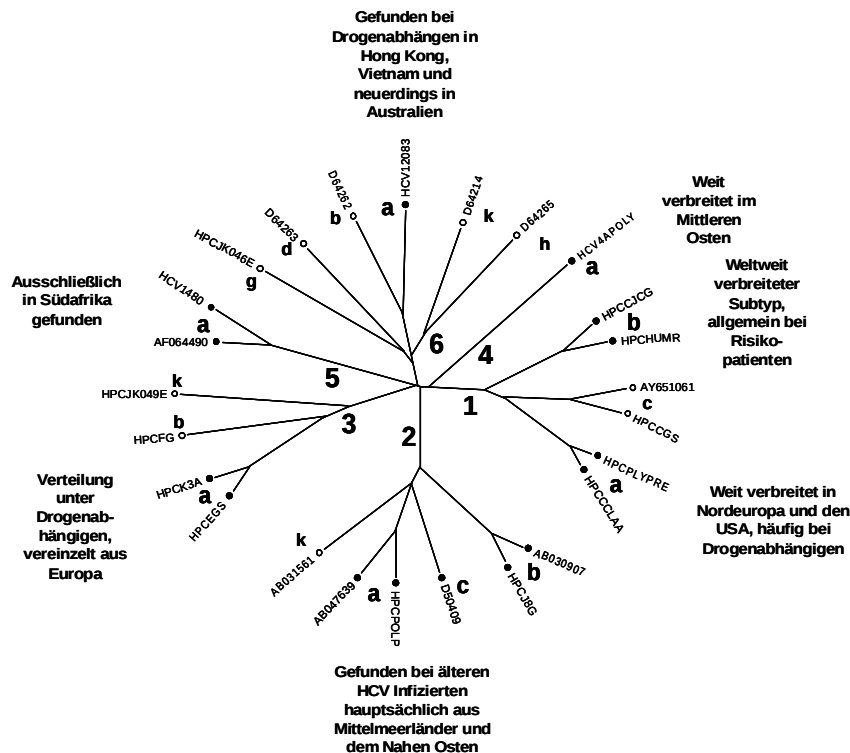


Abb. 1: Stammbaum von verfügbaren, kompletten Sequenzen der HCV Genotypen. Die hervorgehobenen Buchstaben und gefüllten Punkte geben die vorherrschenden Genotypen an. Die zugrundeliegenden Sequenzen sind mit den zugehörigen „Accession Numbers“ angegeben. Zusätzlich sind die weltweite Verteilung und die Risikogruppen dargestellt (modifiziert nach Simmonds *et al.*, 2005).

I.2.2 Hepatitis C Virus (HCV)

Nach dem „International Committee on the Nomenclature and Taxonomy of Viruses“ handelt es sich bei dem Virus um ein 50 nm großes Flavivirus der Familie der *Flaviviridae* innerhalb des Genus der *Hepaciviren*. Das Einzelstrang-RNA Virus positiver Polarität tritt während der Infektion nicht in den Nukleus der Zelle ein, sondern die Virus RNA fungiert als mRNA im Zytoplasma der Hepatozyten-Wirtszelle, wo die Translation an einer internen ribosomalen Bindungsstelle der 5' - UTR initiiert wird (Okoshi *et al.*, 2001). Das translatierte Polyprotein wird mit Hilfe von zellulären und viralen Proteasen in Strukturproteine (core, Hüllproteine E1, E2, p7) und den Nichtstrukturproteinen (NS2, -3, -4A, -4B, -5A und -5B) co- und posttranslational prozessiert (Bartenschlager *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1999; Rehmann & Nascimbeni, 2005). Nach der Synthese und Reifung bilden die Nichtstrukturproteine zusammen mit der viralen RNA membranassoziierte Replikationskomplexe. In diesen Komplexen wird die Transkription von RNA Zwischenprodukten mit negativer Polarität katalysiert, aus denen RNA Moleküle positiver Polarität generiert werden. Das Capsidprotein core und die genomische RNA bilden zusammen das Nukleocapsid, welches umhüllt von intrazellulären Membranen zytoplasmatische Vesikel bildet, die durch Exocytose aus den Hepatozyten ausgeschleust werden (Abb. 2).

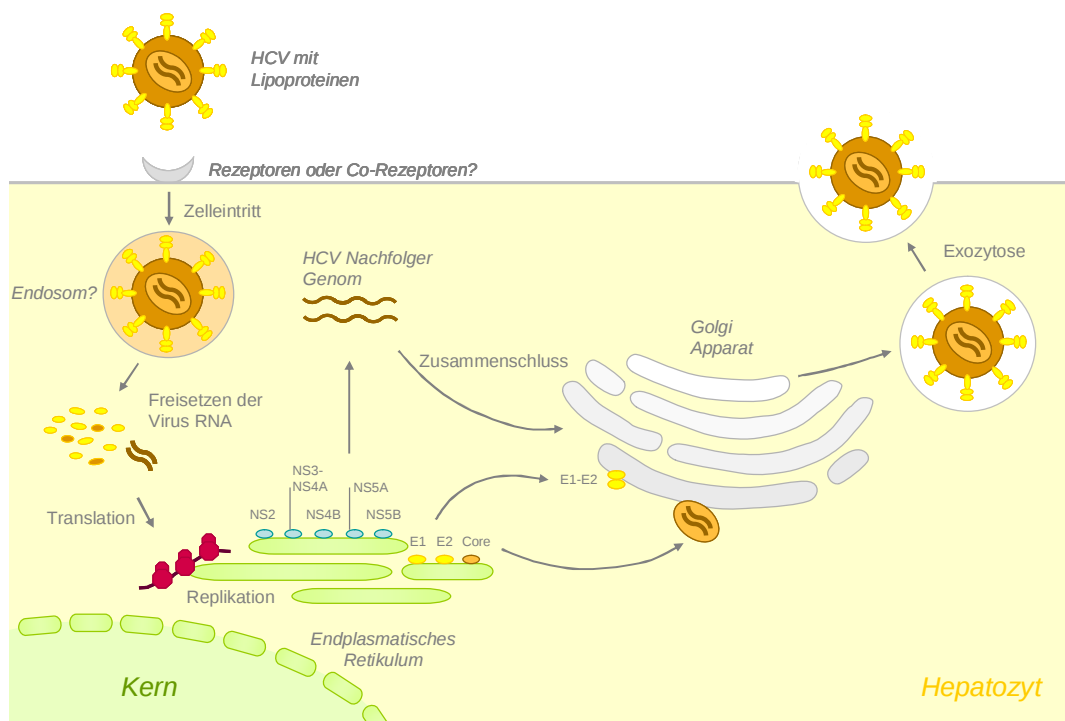


Abb. 2: Lebenszyklus des Hepatitis C Virus. Modifiziert nach Rehmann & Nascimbeni (2005).

Das HCV Genom besteht aus 10000 Nukleotiden einer Einzelstrang RNA Sequenz mit positiver Polarität (Abb. 3). Diese RNA codiert ein Leseraster („Open Reading Frame“) das an beiden Enden von einer untranslatierten Region (UTR) begrenzt wird, welche Signale für virale Proteine und die RNA Synthese beinhalten (Penin, 2003; Penin *et al.*, 2004). Das Nukleocapsid spielt wegen seinen immunmodulierenden und onkogenen Eigenschaften bei der hepatozellulären Karzinogenese eine entscheidende Rolle (Moriya *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999; McLauchlan, 2000). Die beiden weiteren Strukturproteine E1 und E2 sind Hüllproteine, welche Heterodimere bilden und dem Virus aufsitzen. Sie sind als Glykoproteine für die Bildung der Viruspartikel, deren Bindung und das Eindringen in die Zielzelle verantwortlich (Matsuura *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1999).

Neben Leberzellen fungieren auch Monozyten, Makrophagen und B-Zellen als Wirts- oder Zielzellen (Lerat *et al.*, 1998; Smith, 2001; Sung *et al.*, 2003). Als Rezeptor für das E2 Protein konnten bis dato vier Rezeptoren bestimmt werden: CD 81 (Petracca *et al.*, 2000; Kien *et al.*, 2003), „Low Density Lipoprotein“ (Agnello *et al.*, 1999; Wunschmann *et al.*, 2000), „Scavenger Receptor Type B Class I“ (Scarselli *et al.*, 2002) und das „Dendritic Cell Specific Intercellular Adhesion Molecule Grabbing Non Integrin“ (Lozach *et al.*, 2003; Pohlmann *et al.*, 2003). Weitere Rezeptoren für das Virus sollen Glykosaminoglykane sein (Kien *et al.*, 2003). In 3' - Richtung folgt ein RNA Abschnitt, der für das HCV Hüllprotein p7 codiert, dessen Funktion noch nicht geklärt ist.

Bei den nicht strukturellen Proteinen bildet das NS2 zusammen mit dem NS3 einen zinkabhängigen Metallproteasekomplex, welcher das Polyprotein zwischen NS2 und NS3 spaltet (Weiner *et al.*, 1991). Zusätzlich fungiert NS3 als RNA-Helikase, als Nukleosidtriphosphatase und im Komplex mit NS4A als Serinprotease, die das Polyprotein spaltet (Bartenschlager *et al.*, 1993; Eckart *et al.*, 1993; Sakamuro *et al.*, 1995; Rehmann & Nascimbeni, 2005). Während die Aufgabe des NS4B noch nicht geklärt ist, spielt NS5 eine wichtige Rolle bei karzinogenen, immunmodulierenden Vorgängen in den Leberzellen, z. B. wird die interferonabhängige Proteinkinase R durch NS5 gehemmt (Gale *et al.*, 1998). Eine weitere Aufgabe ist die Funktion als Transkriptionsfaktor zellulärer Gene (Matsuura *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1997). Das NS5B Protein dient der Replikation des Hepatitis C Virus (Lohmann *et al.*, 1998; Rehmann & Nascimbeni, 2005).

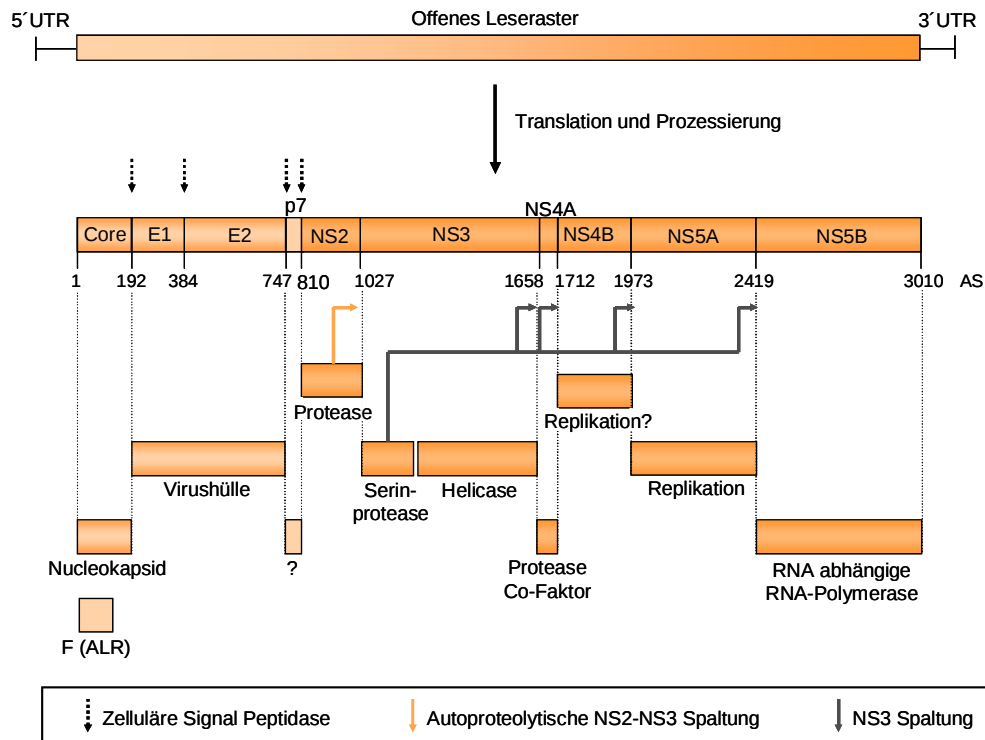


Abb. 3: Genomische Struktur und translatierte Proteine des Hepatitis C Virus (HCV). Die Nukleotidsequenz codiert für 3010 Aminosäuren. Die Nummern unter den Proteinen beschreiben deren Länge und deren Schnittstellen für zelluläre und virale Proteasen. F steht für ein kurzes „Frame Shift“ Protein in einem alternativen Leseraster (ALR). E- „Envelope Protein“, NS- „Non Structural Protein“, UTR- „Untranslated Region“, modifiziert nach Rehmann & Nascimbeni (2005).

I.2.3 Diagnose

Der Nachweis von HCV erfolgt serologisch und molekularbiologisch (Heller & Rehmann, 2005) (Tabelle II). Bei den serologischen Verfahren werden zwei Techniken angewandt, das HCV-Antikörper-Screening und der HCV-Immunoblot. Als Antikörper-Suchtest dienen die kostengünstigen „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) und „Recombinant Immunoblot Assay“ (RIBA) Verfahren. Hiermit lässt sich eine Infektion 7-8 Wochen nach Beginn nachweisen. Ein Schwachpunkt dieser Methoden ist, dass in einzelnen Fällen negative Ergebnisse nicht zwangsläufig negativ sein müssen, da die Serokonversion durchaus mehrere Monate nach dem Infektionszeitpunkt einsetzen kann. Weitere Probleme können bezüglich Sensitivität und Spezifität auftreten. Bei dem Immunoblot Verfahren werden Antikörper gegen mehrere einzelne virale Proteine nachgewiesen. Sind mehrere Subpopulationen der Antikörper gegen die spezifischen Epitope nachweisbar, so kann deren Identität als HCV spezifisch bezeichnet werden. Der Immunoblot wird deswegen als Bestätigung eines positiven Screening-Tests eingesetzt. Alle serologischen Untersuchungsmethoden

haben im Gegensatz zu den molekularbiologischen Methoden den Nachteil, dass sie keine Aussagen über die Infektionsphase machen können, da die Antikörper auch nach einer Spontanheilung noch über Jahre nachweisbar sind.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen werden drei verschiedene Methoden angewandt. Der qualitative Nachweis der HCV RNA (I.2.2) erfolgt mittels „Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR). Hierbei wird der direkte Nachweis von nativen Viren im Patientenplasma ermöglicht und gilt als positiv, wenn mehr als 50 internationale Einheiten (IU) pro ml Blut nachgewiesen werden (Strader *et al.*, 2004). Demzufolge kann so bereits zwei bis drei Wochen nach dem Infektionszeitpunkt eine bestehende Infektion festgestellt werden (Albert *et al.*, 2002). Ist die Virus RNA mit erhöhten Transaminasewerten über einen längeren Zeitraum nachweisbar (Abb. 4), wird von einer chronischen Verlaufsform ausgegangen. Der direkte Nachweis der Virus RNA wird standardmäßig zur Überwachung einer HCV Therapie mit Interferon und Ribavirin genutzt.

	Methode	Nachweis von	Probenmaterial	Nachweiszeitpunkt	Vorteil	Nachteil
Serologische Methoden	ELISA & RIBA	HCV spez. Antikörpern	1 ml Serum	7-8 Wochen nach Infektion	kostengünstig	• Nachweis in der frühen Infektionsphase nicht möglich • Sensitivität eingeschränkt • Bestätigungstest bei positivem Ergebniss nötig
	HCV-Immunoblot	HCV spez. Antikörpern	1 ml Serum	7-8 Wochen nach Infektion	kostengünstig, dient als Bestätigung von ELISA & RIBA	• Keine Aussage über Infektionsphase möglich
Molekularbiologische Methoden	RT-PCR	HCV Genom	5 ml EDTA-Blut	2-3 Wochen nach Infektion	Monitoring der Infektion/Therapie möglich	• kostenintensiv
	branched DNA-Verfahren	HCV Genom	5 ml EDTA-Blut	2-3 Wochen nach Infektion	Einschätzung der Infektiosität und Virusaktivität möglich	• kostenintensiv

Tabelle II: HCV Nachweismethoden.

Der quantitative Nachweis der Virus RNA erfolgt z.B. mittels „Branched“-DNA Verfahren, wobei im Gegensatz zur Amplifikation der HCV cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (Zielsequenzamplifikation) die HCV RNA durch Hybridisierungs-

reaktionen nachgewiesen (Signalamplifikation) wird, und damit eine Einschätzung der Infektiosität und der Virusaktivität erlaubt. Der Virustiter gilt als unabhängiger Faktor des Therapieerfolges und wird zu dessen Überwachung in verschiedenen Abschnitten bestimmt. Die molekularbiologische HCV Genotypisierung hat aufgrund der verschiedenen Genotypen und den daraus resultierenden unterschiedlichen Therapieansätzen eine wichtige Bedeutung. Zudem dient die Typisierung aus epidemiologischer Sicht der Aufdeckung von Infektionsketten. Alle herkömmlichen HCV Nachweismethoden zeigen allerdings Limitierungen in Bezug auf ihre Zuverlässigkeit, wobei die schnelle Reorganisation und Rekombination des Virus den Hauptgrund darstellt.

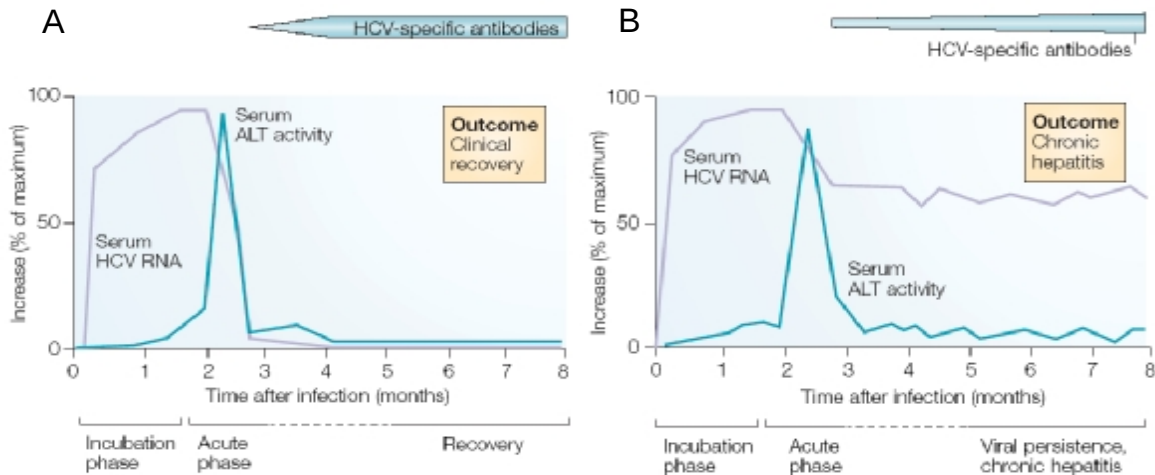


Abb. 4: Klinischer und virologischer Verlauf von akuter (A) und chronischer (B) Hepatitis C. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf des HCV RNA Titors im Serum, die zeitliche Alaninaminotransferase (ALT) Aktivität im Serum, als Indikator für eine durch T-Zellen vermittelte Leberentzündung und der zeitliche Anstieg von HCV spezifischen Antikörpern bei beiden Hepatitis Verlaufsformen. Nach der Inkubationsphase schließt die akute Phase an, die je nach RNA Titer und Alaninaminotransferase Aktivität in eine Ausheilung (A) oder einen chronischen Verlauf (B) übergeht. Die y-Achse gibt den prozentualen Zuwachs, die x-Achse die Zeit an. Nach Rehermann & Nascimbeni 2005.

I.3 Generierung von Antikörpern

I.3.1 Antikörper

Antikörper (Ak) spielen eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunantwort innerhalb der Vertebraten. Durch sie werden Fremdkörper und Pathogene spezifisch gebunden und durch weitere Bestandteile des Immunsystems neutralisiert. Antikörper sind aus vier Polypeptidketten aufgebaut, zwei identischen leichten (L-Ketten) und zwei identischen schweren Ketten (H-Ketten), welche kovalent durch Disulfidbrücken

miteinander verbunden sind (Abb. 5) und ein 150 kDa großes Tetramer bilden (Burton, 1987). Am aminoterminalen Ende des Proteins sitzt jeweils eine variable Region (V-Region), welche die spezifischen hypervariablen Regionen enthält, die die Bindungsspezifitäten eines Antikörpers festlegen. Am carboxyterminalen Ende befindet sich die konstante Region (C-Region), die im Fall der schweren Kette den Isotyp und die Effektorfunktion des Moleküls bestimmt. Die C-Region der schweren Kette besitzt je nach Isotyp eine unterschiedliche Anzahl an Domänen, die C-Region der leichten Kette besteht bei allen Isotypen aus einer Domäne. Die V-Region der schweren und leichten Ketten wird in jeweils drei hypervariable Regionen („Complementary Determining Regions“, CDR) und vier konservierte Bereiche, sogenannte „Frameworks“ (FR), eingeteilt (Kabat *et al.*, 1990). Durch die Assoziation der leichten und schweren Kette werden Paare gebildet, wodurch zwei antigenbindende Bereiche entstehen, welche für die Antikörper-Antigen Wechselwirkung zuständig sind.

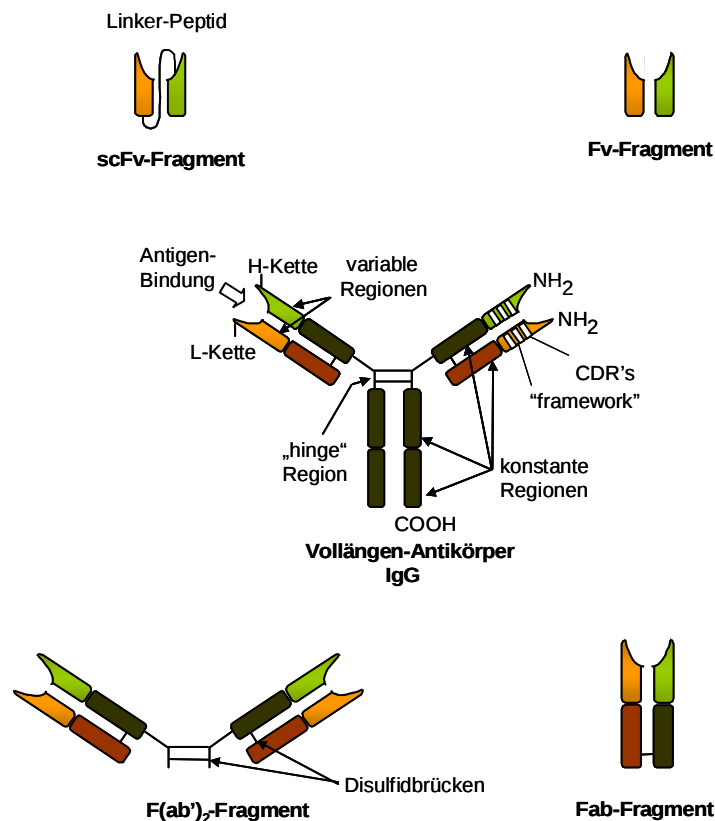


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Immunglobulins (IgG) und davon abgeleiteten Ak-Fragmenten. IgG = Immunglobulin G; Fab = „Fragment of Antigen Binding“; F(ab')₂ = Fab-Dimer; Fv = „Fragment of Variable Region“; scFv = „Single Chain Fragment of the Variable Region“; CDR = hypervariable Bereiche („Complementary Determining Region“); L-Kette = leichte Antikörperkette; H-Kette = schwere Antikörperkette. Modifiziert nach Brüll (2004).

Die Antigenspezifität eines Antikörpers wird durch die Aminosäure-Sequenz der CDR festgelegt (Jones *et al.*, 1986). Das Antigen stellt das Epitop, welches mit dem Paratop des Antikörpers über elektrostatische Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte eine Bindung eingeht. Die Domänen der C-Regionen sind nicht an der Bindung zwischen Antikörper und Antigen beteiligt. Das Fc-Fragment besteht aus den zwei carboxyterminalen Domänen der beiden schweren Ketten. Die bewegliche „Hinge“-Region verbindet die zwei Fab-Bereiche eines Antikörpers mit dem Fc-Teil. Köhler und Millstein entwickelten 1975 die erste Methode zur Gewinnung von Antikörpern (Köhler & Milstein, 1975). Die sogenannte Hybridomatechnologie ermöglicht die Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAk), welche an ein definiertes Epitop, des bei der Immunisierung eingesetzten Antigens binden. Monoklonale Antikörper werden zur Detektion und bei prophylaktischen, therapeutischen Verfahren eingesetzt.

I.3.2 Hybridomatechnologie

Köhler und Milstein waren wie bereits erwähnt 1975 die ersten Wissenschaftler, die eine Methode zur Herstellung von monoklonalen Antikörper entwickelten. Durch die somatische Zellhybridisierung lassen sich Antikörper durch die Fusion von aktivierten B-Lymphozyten aus der Milz von immunisierten Mäusen mit Mäusemyelomazellen generieren. Aufgrund der vorangegangenen Immunisierung wird das Immunsystem stimuliert, in dessen Verlauf B-Zellen einen spezifischen Antikörper produzieren. Aus der Fusion resultieren Hybridomazellen, welche die Eigenschaften beider Fusionspartner aufweisen. Diese Eigenschaften bestehen in permanentem Zellwachstum unter Kultivierungsbedingungen, sowie in der Produktion antigenspezifischer Antikörper für jeweils nur eine antigene Determinante. Die Selektion der Antikörper produzierenden Zelllinien erfolgt durch mehrfache Vereinzellung der Hybridomazellen mittels der „Limiting Dilution“ Klonierung. Die Fusionsraten werden mit 1×10^{-4} bis $2,5 \times 10^{-3}$ spezifischen Klonen pro Myelomazelle beschrieben (Monecke, 1999).

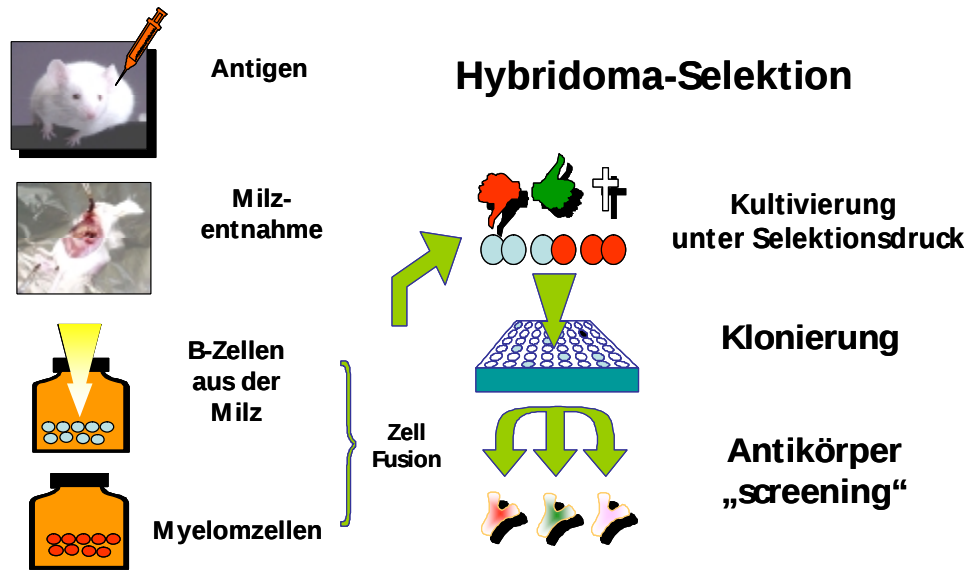


Abb. 6: Schematischer Ablauf einer Hybridomaselektion.

I.3.3 Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente

Da der epitopbindende Teil der Antikörper seine Antigenspezifität definiert, ist dieser bei der Herstellung von rekombinanten Antikörpern oder Antikörperfragmenten von zentraler Bedeutung. Die konstanten Regionen werden oft zwecks höherer Ausbeuten im Expressionssystem oder wegen einer Bindung an Fusionspartner vernachlässigt. Bei der Entwicklung von rekombinanten Antikörperfragmenten (rAk) wurden ursprünglich Fab-Fragmente (Porter, 1959), Fv-Fragmente und $F(ab')_2$ -Fragmente (Parham, 1986) durch Proteasebehandlungen hergestellt (Abb. 5). Die kleinste Einheit von Antikörper-Fragmenten sind die monovalenten heterodimeren Fv-Fragmente (Inbar *et al.*, 1972), die aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette bestehen. Allerdings sind diese Fragmente nicht kovalent miteinander verbunden und dissoziieren leicht. Alle Antikörperfragmente lassen sich auch molekularbiologisch herstellen (Winter & Milstein, 1991), wobei durch verschiedene Techniken eine Stabilisierung der Kettenverbindungen gewährleistet wird. Eine gängige Methode ist das Einsetzen einer kurzen verbindenden Peptidsequenz, dem sogenannten „Linker“ zwischen den variablen Bereichen der schweren und leichten Antikörperkette, woraus ein „Single Chain Fv“ (scFv) resultiert (Bird *et al.*, 1988). Die im „Linker“ verwendeten Aminosäuren sollten möglichst eine freie Faltung der variablen Bereiche gewährleisten, um deren Bindungseigenschaften nicht zu beeinträchtigen. Eine weitere Form der Stabilisierung von rAk ist das „Anhängen“ von Cysteinen an die carboxyterminalen Bereiche der variablen Domänen. Hierdurch können Disulfidbrücken ausgebildet werden, die eine Verstärkung

der Kettenassoziation bewirken. Diese disulfidstabilisierten scFv Antikörper weisen gegenüber herkömmlichen scFv eine höhere Stabilität, ein vermindertes Aggregationsverhalten und eine verbesserte Bindungsaffinität auf (Brinkmann *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 1994). Ausschlaggebend für die Funktionalität eines scFv Antikörpers, die Bindung zwischen scFv und Antigen und das Aggregationsverhalten kann neben der Aminosäuresequenz auch die Länge des „Linkers“ sein (Colcher *et al.*, 1990; Raag & Whitlow, 1995; Plückthun *et al.*, 1996). Zwei Methoden zur Generierung von scFv wurden in dieser Arbeit angewendet. Zum einen wurden die variablen Regionen der schweren und leichten Antikörperketten aus Hybridomazell-mRNA mittels PCR amplifiziert und assembliert, zum anderen konnten scFv mit der „Phage Display“ Technologie isoliert werden.

I.3.4 „Phage Display“

Zu Beginn der 90er Jahre wurde die „Phage Display“ Technologie zur Generierung von Antikörpern als Alternative zur Hybridomatechnologie entwickelt. Bei dieser Methode werden die pIII oder pVIII Hüllproteine filamentöser Bakteriophagen (f1, fd, M13) mit den auf Spezifität zu analysierenden Proteinen fusioniert und die Selektion des gesuchten Peptids durch die Bildung einer Protein-Protein-Bindung im nachfolgenden „Biopanning“ durchgeführt.

Die stäbchenförmigen 900 nm langen, 6 nm dicken filamentöse Bakteriophagen gehören zu den DNA Viren. Sie bestehen aus einer aus 2700 Kopien des pVIII Hüllproteins zusammengesetzten Proteinhelix, den distalen pVII und pIX (jeweils 5 Kopien) und den proximalen pIII (3-5 Kopien) und pVI (5 Kopien) „Minor Coat Proteins“, welche das Filament an den Enden begrenzt. Die Bakteriophagen infizieren Bakterien des Stammes *Escherichia coli* (*E. coli*) über den F-Pilus, replizieren in diese eine doppelsträngige replikative Form und werden an der Zellmembran als Bakteriophagen ohne Lyse der Wirtszelle wieder freigesetzt. Für die Infektion ist vor allem das pIII-Protein notwendig (Winter *et al.*, 1994).

Nach der Entdeckung der Präsentation von Peptiden an den pIII und pVII Phagenpeptiden und der daraus resultierenden Weiterentwicklung der Expression von Peptidbibliotheken (Smith, 1985) wurden zur Selektion von Peptid-Nukleinsäure oder Peptid-Peptid Bindungen, z.B. scFv-Antigen Bindungen, das „Biopanning“ entwickelt (McCafferty *et al.*, 1990) (Abb. 7). Hierbei können die antigenspezifischen Phagen über den auf der Oberfläche präsentierten Antikörper durch Wechselwirkung mit fixierten

Liganden (Antigenen) aus dem milliardenfachen Hintergrund der irrelevanten Phagen (Bibliothek) herausgefischt werden.

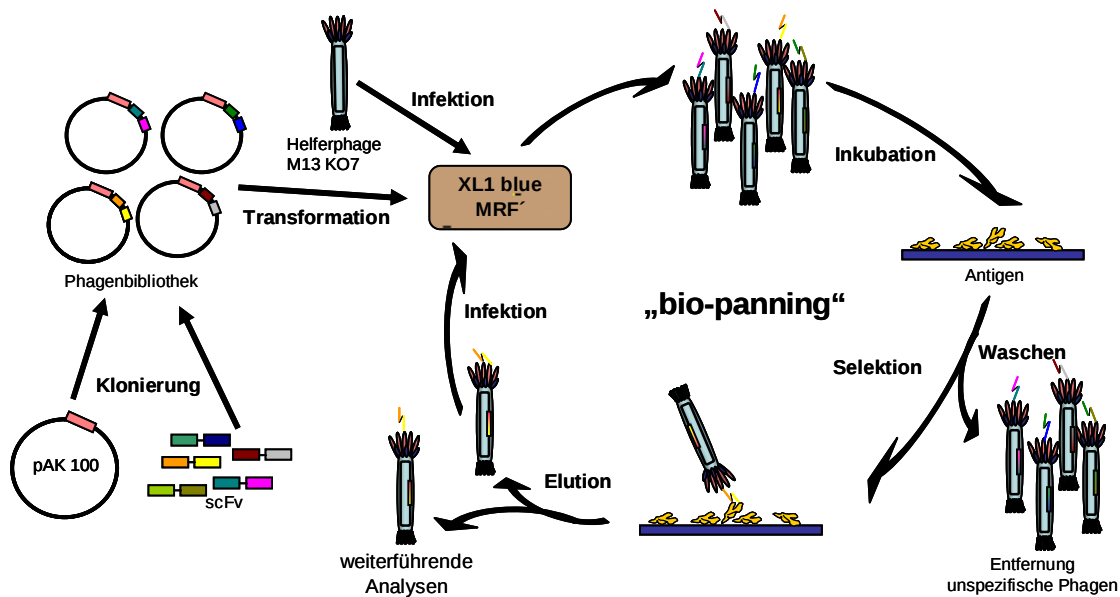


Abb. 7: Schematische Darstellung des „Phage Displays“. pAK 100 = Phagmidvektor, scFv = „Single Chain Fragment of the Variable Region“. Modifiziert nach Stolle (2005).

Die Phagen-Peptid Fusionen werden während der Selektion mit Peptiden inkubiert, welche an einem Festphasen-Trägermaterial, z.B. die Plastikoberfläche von ELISA-Platten, unspezifisch gebunden sind. Durch anschließende chaotrope Waschschrte werden schwach oder nicht bindende Phagen entfernt. Die verbliebenen spezifisch bindenden Phagen werden anschließend eluiert und können zur Infektion von *E. coli* zwecks Amplifikation und weiterer Selektion eingesetzt werden. Wird beim „Phage Display“ ein Phagmidvektor verwendet, in den die genetische Sequenz der zu analysierenden Proteine ligiert ist, wird für die Sekretion der Phagen ein Helferphage benötigt (Abb. 7), welcher alle auf dem Phagmid fehlenden Genprodukte beisteuert. Die in den Kulturüberständen vorliegenden Phagen können anschließend in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt werden oder nach erneuter Infektion von *E. coli* als lösliche Ak-Fragmente durch Induktion produziert werden.

1.4 Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Das *Escherichia coli* Expressionssystem ist das am häufigsten angewandte System um rekombinate Proteine biotechnologisch herzustellen. Verschiedene Gründe sind hierfür ausschlaggebend. So ist zum Beispiel die Produktion rekombinanter Proteine in

Bakterien sehr kostengünstig, es werden durch Fermentationsverfahren hohe Ausbeuten an Zielprotein erreicht, und die Systeme sind leicht zu handhaben und genetisch zu manipulieren. Das Fehlen von posttranslatorischen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen und Aminosäureacetylierung, ist ein Nachteil der prokaryotischen Expression im Vergleich zu eukaryotischen Expressionssystemen. Bei der *E. coli* Expression kann je nach verwendetem Vektorsystem das Zielprotein in den periplasmatischen Raum geleitet oder im Zytoplasma akkumuliert werden (Plückthun *et al.*, 1996).

Bei der zytoplasmatischen Produktion werden hohe Proteinausbeuten generiert (Sorensen & Mortensen, 2005), doch kann es schnell zu unlöslichen Proteinaggregationen („Inclusion Bodies“) kommen. Diese können gereinigt werden, allerdings liegen sie dann denaturiert vor und müssen erst durch eine aufwendige Rückfaltung renaturiert werden (Mitraki *et al.*, 1991; Middelberg, 2002). Zusätzlich stört das reduzierende Umfeld des Zytoplasmas die Ausbildung von Disulfidbrücken (Glockshuber *et al.*, 1992). Ein Vorteil der Aggregate ist, dass das Zielprotein so hoch konzentriert vorliegt, dass es vor dem Abbau durch zytoplasmatische Proteasen geschützt ist (Swamy & Goldberg, 1982).

Im Falle der periplasmatischen Expression wird das Zielprotein mittels Signalpeptid (z.B. Pectat-Lyase (*pelB*) oder „Outer Membrane Protein A“ (*ompA*) vom Synthesort dem Zytoplasma in den periplasmatischen Raum geleitet. Die Präsenz der Proteine im Periplasma hat den Vorteil, dass dort Disulfidbrücken durch das oxidierende Milieu und das Vorhandensein einer Disulfid-Oxidoreduktase ausgebildet werden. Zusätzlich werden die Proteine durch Chaperone stabilisiert. Die Reinigung von Proteinen aus dem Periplasma wird durch eine geringere Anzahl von endogenen *E. coli* Proteinen erleichtert (Talmadge & Gilbert, 1982). Weiterhin kann es bei der periplasmatischen Expression in Gram negativen Bakterien zur Poration der äußeren Bakterienmembran kommen, wodurch das Zielprotein im Kulturüberstand akkumuliert (Plückthun *et al.*, 1996; Kipriyanov *et al.*, 1997). Hierdurch können vor allem immunologische Untersuchungen wie z.B. ELISA Analysen mit bakteriellem Kulturüberstand durchgeführt werden. Eine Aggregation des Zielproteins kann allerdings auch im periplasmatischen Raum erfolgen, welche dann, ähnlich der „Inclusion Bodies“ im zytoplasmatischen Raum, denaturierend gereinigt, rückgefaltet und so aktiviert werden müssen.

Die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* kann durch verschiedene Faktoren während der Kultivierung optimiert werden. Hierzu zählt das Variieren der Temperatur (Schein, 1989), der Induktionsbedingungen und des Anzuchtmediums oder eine Coexpression mit stabilisierenden Molekülen, wie die bereits erwähnten Chaperone. Die Anwendung der verschiedenen Anzuchtparameter muss für jedes rekombinante Protein empirisch ermittelt werden. So können beispielsweise Chaperone bei einigen Proteinen auch das Aggregationsverhalten während der Produktion begünstigen (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Mogk *et al.*, 2002) und somit kontraproduktiv wirken.

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, mit verschiedenen Techniken Volllängenantikörper und rekombinante Antikörper gegen kontinuierliche Epitope der HCV Strukturproteine core, E1 und E2 zu generieren. Hierbei sollen die entwickelten Antikörper möglichst subtypenspezifisch an Epitope der Strukturproteine des HCV Subtyps 1b binden. Um dieses zu erreichen, muss für Immunisierungen von Mäusen und Bindungsassays ausreichend Antigen zur Verfügung gestellt werden. Als biotechnologische Produktionsplattform werden Expressionstämme des Bakteriums *E. coli* gewählt. Die anschließende Reinigung soll unter denaturierenden oder nativen Bedingungen erfolgen. Neben prokaryotisch produziertem Antigen sollen auch synthetische Peptide während der Reaktivitätsanalysen zum Einsatz kommen.

Durch Immunisierungen von Mäusen und unter Anwendung der Hybridomatechnologie generierte monoklonale Antikörper sollen mit denaturiertem Antigen in Bindungsanalysen verifiziert werden. Auch soll mittels einer „Two Step Cloning“ Strategie rekombinante scFv Antikörperformate der monoklonalen Antikörper generiert und anschließend analysiert werden. Zusätzlich soll mit einer humanen HCV spezifischen scFv Phagenbibliothek ein „Biopanning“ durchgeführt werden. Die identifizierten Antikörper sollen soweit wie möglich in proteinbiochemischen und molekularbiologischen Analysen charakterisiert werden.

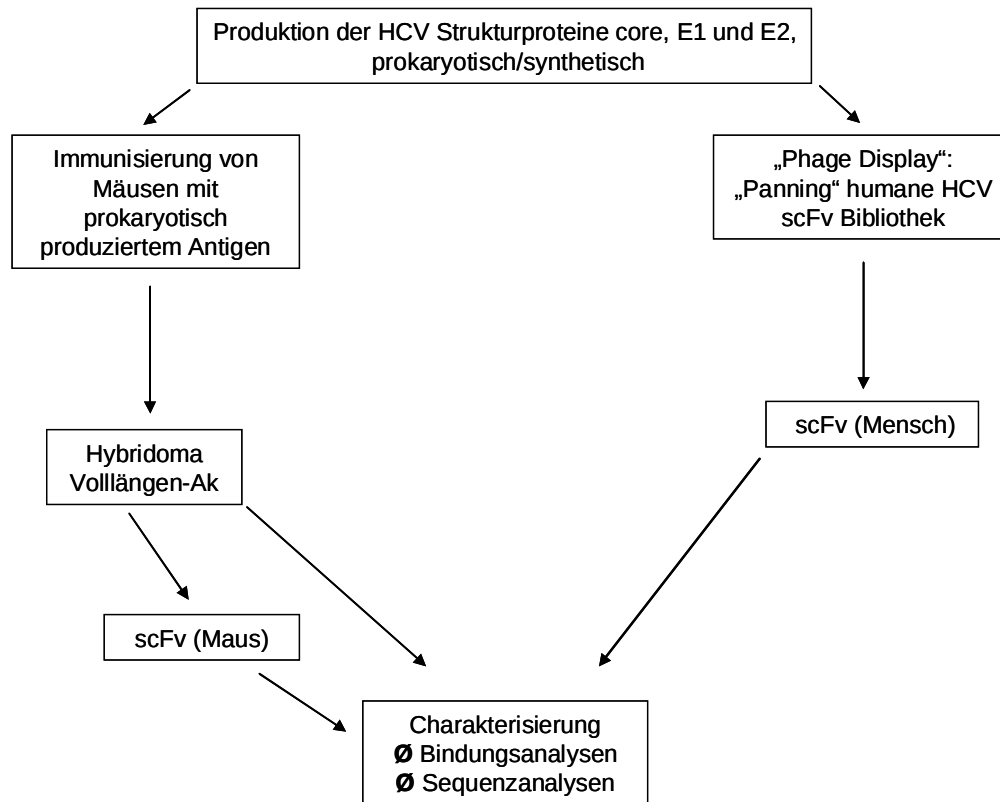


Abb. 8: Übersicht des Arbeitsplans der vorliegenden Arbeit.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Fertiglösungen wiesen wenigstens den Reinheitsgrad *pro analysis* auf und wurden von den Firmen Becton Dickinson Bioscience Clontech (Heidelberg), Biochrom (Berlin), BioRad (München), Cytogen (Obermörlen), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggstein), ICN (Eschwege), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Mannheim), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und VWR (Darmstadt) bezogen.

Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Becton Dickinson Biosciences Clontech (Heidelberg), Biozym (Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Hewlett-Packard (München), Invitrogen (Karlsruhe), Kodak (Stuttgart), Millipore (Eschborn), Nunc (Biebrich), Pall (Dreieich), Roth (Karlsruhe), Schott-Glaswerke (Mainz), Starlab (Ahrensburg) und Whatman (Maidstone, England).

II.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Boline (Luckenwalde), New England Biolabs (Schwalbach), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), MWG Biotech (Ebersberg) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und sofern nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben eingesetzt. Folgende Reaktionskits der Firma Qiagen (Hilden), Pierce (Rockford, USA) und Becton Dickinson Biosciences Clontech (Heidelberg) wurden verwendet:

- QIAquick Gelextraction Kit
- QIAGEN Mini Elute Gel Extraction Kit
- QIAprep Spin Miniprep Kit
- QIAquick PCR-Purification Kit
- Pierce BCATM Protein Assay Kit
- BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit

II.1.3 Antikörper und enzymkonjugierte anti-Antikörper

Zum Nachweis der rekombinant hergestellten HCV Strukturproteine und scFv Ak-Fragmente kamen folgende z.T. enzymkonjugierte Antikörper in Immunoblot Analysen (II.2.2.2) und ELISA (II.2.2.5) zum Einsatz (Tabelle III).

Antikörper	Zielepitop	Eigenschaft
Maus anti-Polyhistidin Ak (Qiagen)	C- oder N-terminaler Polyhistidin Tag	monoklonal
Maus anti-c-Myc Ak (Dr. Monneke, RWTH Aachen)	C-terminaler Myc Tag	monoklonal
Maus anti-Polyhistidin Ak (Klon His-1) (Sigma)	C- oder N-terminaler Polyhistidin Tag	monoklonal, Peroxidase konjugiert
Maus anti-c-Myc Ak (Klon 9E10) (Sigma)	C-terminaler Myc Tag	monoklonal, alkalische Phosphatase konjugiert
Maus anti-M13 Ak (Amersham Pharmacia)	Bakteriophagen M13 Haupthüllprotein pVIII	monoklonal, Peroxidase konjugiert
Ziege anti-Maus Ak (Sigma) GAM ^{HRPO}	IgG Fc spezifisch	Peroxidase konjugiert
Ziege anti-Maus Ak (Sigma) GAM ^{AP}	IgG Fc spezifisch	alkalische Phosphatase konjugiert

Tabelle III: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

II.1.4 Versuchstiere

Für die Herstellung der monoklonalen Antikörper und zur Gewinnung von mRNA aus Mausmilzzellen wurden ausschließlich weibliche BALB/c Mäuse im Alter von 16 Wochen verwendet. Die verwendeten Tiere wurden unter der internen Projekt-Nr. TV1144G1 des Institutes für Tierversuchskunde, RWTH Aachen geführt. Alle Tierversuche waren vom Regierungspräsidium des Landes NRW unter dem Aktenzeichen 50.203.2 AC 30, 4/02 genehmigt.

II.1.5 Bakterienstämme

Als Bakterienstämme zur Vermehrung und Isolierung von Plasmiden sowie zur Proteinexpression wurden folgende *E. coli* Bakterienstämme verwendet:

DH5 α :	<i>supE44 lacU169</i> (Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Hanahan, 1983)
XL1blue MRF $^+$:	<i>RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacIq</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene, La Jolla, USA)
BL21(DE3):	<i>F$^-$ ompT hsdS_R (r_B$^-$ m_B$^-$) dcm$^-$ gal lon$^-$</i> (Merk, Darmstadt)
BL21*(DE3)pLysS:	<i>F$^-$ ompT hsdS_R (r_B$^-$ m_B$^-$) gal dcm$^-$</i> (DE3) pLysS (Cam ^R) (Invitrogen, Karlsruhe)
TG1:	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM) 5(r_K$^-$ m_K$^-$)</i> [<i>F'</i> <i>traD36 proAB lacI^q ΔM15</i>] (Stratagene, La Jolla, USA)

II.1.6 Bakterien- und Phagmidvektoren

Alle verwendeten Plasmide und Phagmide besitzen ein Lactose Operon, welches über den künstlichen Induktor Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert wurde. IPTG wird im Gegensatz zu Lactose im natürlichen Metabolismus der Bakterien nicht umgesetzt, wodurch seine Konzentration im Versuch konstant und das entsprechende zu exprimierende Gen aktiv bleibt.

- pMT

Als Ausgangsmaterial der vorliegenden Arbeit diente die von G. Munz in den Expressionsvektor pMT ligierte codierende DNA der HCV Strukturproteine. Dieser Vektor basiert auf dem Plasmid pET 27 (Merck Bioscience), bei dem von Dr. M. K. Tur die C-terminale His6- durch eine N-terminale His10-Sequenz ausgetauscht wurde (Abb. 9).

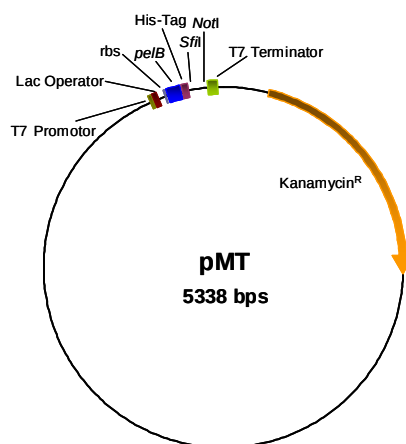


Abb. 9: Karte des Plasmids pMT. T7 Promotor = IPTG induzierbarer Promotor; Lac Operator = Lactose Operator; rbs = Bindungsstelle des Ribosoms; *pelB* = Signalsequenz zur periplasmatischen Lokalisation; His-Tag = Polyhistidinsequenz zur Reinigung und Detektion des Zielgens; *SfiI* und *NotI* = Restriktionsschnittstellen zur Klonierung; T7 Terminator = stop codon Sequenz der Translation, Kanamycin^R = Kanamycinresistenzgen.

- pET 26 b(+) (Merck Biosciences)

Dieses Plasmid wurde zur Produktion der HCV Strukturproteine $\Delta E1$ und $\Delta E2$ mit anschließender Akkumulation im Periplasma verwendet (periplasmatische Expression). Die periplasmatische Lokalisation des Zielproteins wird über eine N-terminale *pelB* Signal Sequenz vermittelt. Die Reinigung und Detektion des Zielproteins erfolgt über eine C-terminalen Histidinsequenz. Die Expression wird mittels T7 Promotorsystem reguliert (Abb. 10).

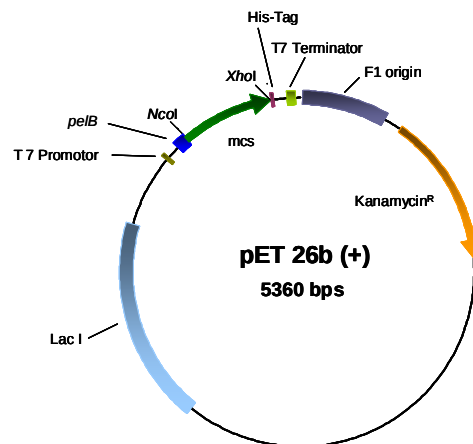


Abb. 10: Karte des Plasmids pET 26 b(+). Kanamycin^R = Kanamycinresistenzgen; His-Tag = Sequenz zur Detektion und Reinigung des Zielgens; Lac I = Lac Repressor; f1 ori = „Origin of Replication“ des Phagen F1; T 7 Promotor = IPTG induzierbarer Promoter, *pelB* = Signal Sequenz zur periplasmatischen Lokalisation, mcs = „Multiple Cloning Site“, *NcoI* und *XhoI* = Restriktionsschnittstellen über die die Zielgene kloniert werden, T7 Terminator = Terminatorsequenz.

- Phagemid pHENHi

Das Phagemid pHENHi basiert auf dem pHEN1-Phagemid (Hoogenboom *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2001) und wurde von Dr. D. Peschen modifiziert. Durch Einfügen einer zusätzlichen Histidinsequenz kann das Zielprotein mittels His-Tag gereinigt und die Detektion in Immunoblot und ELISA mit Hilfe des bereits im Ausgangsphagemid vorhandenen Myc-Tags durchgeführt werden (Abb. 11).

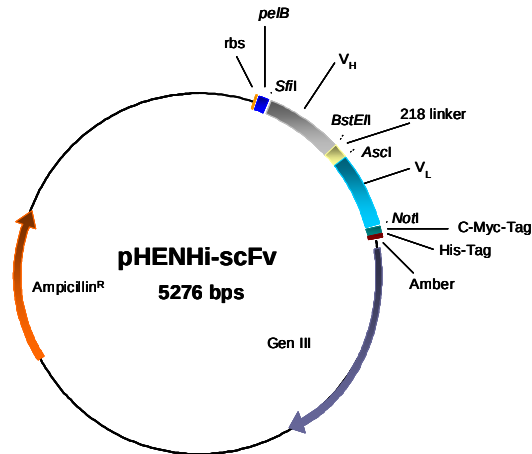


Abb. 11: Karte des Phagmids pPHENHi-scFv. rbs = „Ribosom Binding Site“, *pelB* = Signalsequenz zur periplasmatischen Lokalisation des Zielproteins, V_H/V_L = variable Domänen des „Single Chains“, 218 Linker = Linkerbereich, C-Myc-Tag/His-Tag = Sequenzen der Detektion und Reinigung des Zielproteins, Amber = Stopcodon, Gen III = Hüllproteingen III des Phagen M13, Ampicillin^R = Ampicillinresistenzgen, *SfiI/BstEII/AscI/NotI* = Restriktionschnittstellen über die die Zielgene in den Vektor kloniert wurden.

- Phagmid pAK 100

Die V_L und V_H Gensequenzen der durch das „Phage Display“ selektierten humanen scFv Antikörper, lagen im Phagmidvektor pAK 100 vor (Plückthun *et al.*, 1996; Krebber *et al.*, 1997); (Abb. 12).

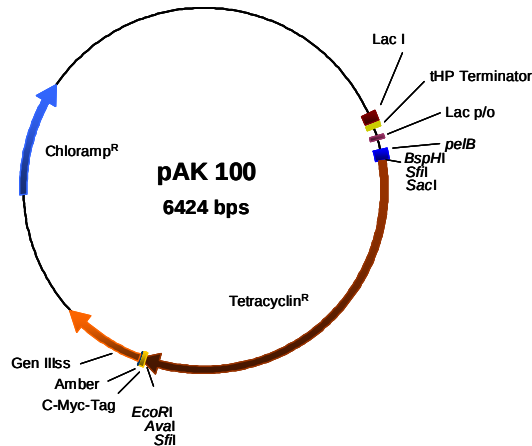


Abb. 12: Karte des Phagmids pAK 100. Lac I = Lac I Repressor-Gen, tHP Terminator = verstärkt in Kombination mit der Glukose Repression des Lac Promotors den Abbau der Basalexpression, Lac p/o = Lac Promotor und Lac Operator Region, *pelB* = Signalsequenz zur periplasmatischen Lokalisation des Zielgens, Tetracyclin^R = Tetracyclinresistenzgen, welches durch die Klonierung eines scFv ausgeschnitten wird, C-Myc-Tag = Sequenz zur Detektion des Zielproteins, Amber = Stopkodon, Gen IIIss = Hüllproteingen pIII des Phagen M13, Chloramphenicol^R = Chloramphenicolresistenzgen, *BspHI/SfiI/SacI/EcoRI/Aval* = Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der Zielgene.

- **pRSET B (Invitrogen, Karlsruhe)**

Für die Produktion der HCV Strukturproteine core, Δ E1 und Δ E2 mit anschließender Akkumulation im Zytoplasma (zytoplasmatische Expression) wurde das Plasmid pRSET B verwendet (Abb. 13).

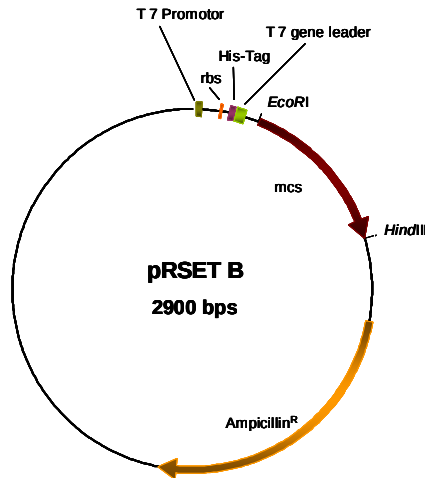


Abb. 13: Karte des Plasmids pRSET B. T7 Promoter = Bindungsstelle für die T7 RNA Polymerase, rbs = „Ribosome Binding Site“, His-Tag = Sequenz zur Detektion und Reinigung, hier N-terminal gelegen, T7 Gene Leader = verantwortlich für Proteinestabilität, mcs = „Multiple Cloning Site“, *EcoRI/HindIII* = Restriktionsschnittstellen für die Klonierung, Ampicillin^R = Ampicillinresistenzgen.

II.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) oder Biomers (Ulm) synthetisiert. Zur Lagerung wurde eine 100 pmol wässrige Lösung bei -20°C aufbewahrt, aus der die jeweilige Arbeitskonzentration von 10 pmol hergestellt wurde. Die Primer kamen in PCR-Reaktionen bzw. zur DNA Sequenzierung zum Einsatz.

Oligonucleotide	Sequenz
pET 26 b(+)	
p-5'-E2DLNcone	5'-catgcatggacgggacccacgtgacagggg-3'
p-3'-E2DLXhol	5'-ccgctcgagttcccatttgattgcaaggagac-3'
p-5'-E1DLNcone	5'-catgcatggactaccaagtgcgcaacgcgtcc-3'
p-3'-E1DLXhol	5'-ccgctcgaggtggggcccctgccaccatatac-3'
pRSET B	
p-5'-EcoRI-Core	5'-ccgccggaattcatgagcacgaatcctaaacc-3'
p-3'-HindIII-Core	5'-atccccaagctttcattaagcggaagctgggatggtaaacc-3'

p-5'-EcoRI-E1"	5'-ccgccggaattctaccaagtgcgcaacgcgtcc-3'
p-3'-HindIII-E1"	5'-atccccaagctttcattagtggggcccctgccaccatatcc-3'
p-5'-EcoRI-E2"	5'-ccgccggaattcgggacccacgtgacagg-3'
p-3'-HindIII-E2"	5'-atccccaagctttcattattcccatttgattgcaag-3'
pHENHi	
p-5'-pHENx	5'-cacacaggaaacagctatgacc-3'
p-3'-pHENx	5'-gttccgctaattcaaccattgc-3'
scFv-Klon	
MVHI For	5'-tgaggagacggtgaccgdagtbccctksrcc-3'
MPDVHBII-1	5'-tgmrgagacggtgaccgtrgtc-3'
Mu PD 34	5'-tccagaaccgccaccgccgctaccgccccacctgmrgagacdgtgasmgtrgtc-3'
MVHII For	5'-tgaggagacggtgactgargtbccctksrcc-3'
MPDVHBII-4	5'-tgmrgagacggtgaccgaggtt-3'
Mu PD 37	5'-tccagaaccgccaccgccgctaccgccccacctgmrgagagdgtgastgargtb-3'
MVkl For	5'-tttgatctccagcttggtvccnsmdccg-3'
MPDVLB2	5'-ctagtgtgactccacgcggccgctcgacagcmcgtttkatytcarytt-3'
Mu PD 28	5'-actagtcgcgccgcgctcgacagcmcgtttkatytcarytt-3'
MVKIIa Back	5'-gacattgtgatgaccagactccaytcwcy-3'
MPDVLF1	5'-catgccatgactcgcgccgcgcctgacattgtgmtgwchcagtctcca-3'
Mu PD 20	5'-agcggcggtggcggttctggaggcggcggttctgatrtrktgatgaccara-3'
Mu PD 19	5'-agcggcggtggcggttctggaggcggcggttctgacattgtgmtgwacagc-3'
MVHI Back	5'-caggtgcagctkswgsagtcwgg-3'
MPD VHF 2	5'-catgccatgactcgcgccagccggccatggccaggtgmagctgawggartctgg-3'
Mu PD 5	5'-gcggccagccggccatggccsaggtcagctgcarcagtcwggd-3'

Tabelle IV: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Code	Nucleotide	Code	Nucleotide
r	a oder g	b	c, g oder t
y	c oder t	d	g, a oder t
m	c oder a	h	a, c oder t
k	g oder t	v	a, c oder g
w	a oder t	n	a, c, t oder g
s	c oder g		

Tabelle V: Buchstabencode für variable Basenpaare.

II.1.8 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle Standardlösungen, -puffer und -medien wurden nach Ausubel, Coligan und Sambrook hergestellt (Ausubel *et al.*, 1995; Coligan *et al.*, 1995; Sambrook *et al.*, 1996). Spezielle Lösungen oder Puffer sind gesondert aufgeführt und wurden, wie die Standardlösungen, in entionisiertem Wasser angesetzt. Um den pH-Wert einzustellen, wurden in der Regel HCl oder NaOH verwendet. Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen durch Autoklavieren (25 min/121°C/1 bar) sterilisiert. Thermolabile Komponenten wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und den Lösungen nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugesetzt.

II.1.9 Nährmedien

Die folgenden Medien wurden zur Kultivierung von Bakterien verwendet:

LB (pH 7,0)

NaCl	1,0 % (w/v)
Nutrient Broth	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)

TB (pH 7,4)

Bacto Trypton	1,2 % (w/v)
Hefeextrakt	2,4 % (w/v)
Glyzerin	0,4 % (w/v)

2 x TY (pH 7,4)

NaCl	0,5 % (w/v)
Nutrient Broth	1,6 (w/v)
Hefeextrakt	1,0 % (w/v)

GYT (pH7)

Trypton	0,25 % (w/v)
Hefeextrakt	0,125 % (w/v)
Glyzerin	10 % (w/v)

Medienzusätze, je nach Bedarf:

Ampicillin	100 µg/ml	Tetracyclin	10 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml	Chloramphenicol	25 µg/ml
Agar	1,6 % (w/v)		

II.1.10 Geräte, Apparaturen und Zubehör

- Glasbioreaktor (Applikon, Schiedam, Niederlande)
- PCR-Thermocycler Primus 96 Plus (MWG-Biotech), „Programmable Thermal Controller“ PTC-200™ (MJ Research Inc, Watertown, USA)
- Elektrotransformationsapparatur „Gene Pulser“ und „Pulse Controller Unit“ (BioRad)
- Gelelektrophorese-Apparaturen, -Kämme und „Power Supply“ (BioRad)

- UV-Transilluminator und Fotodokumentationssystem 299 (Herolab, Wiesloch)
- Automatische Sequenziermaschine: „ABI Prism 3700“ Kapillar-Sequenzierer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA)
- ESI QTof2 Massenspektrometer (Waters Micromass, Eschborn)
- Biophotometer (Eppendorf)
- XCell II Blot Module (Invitrogen)
- ELISA-Reader SpectraMax 340 (Molecular Devices, München)
- Schüttler und Inkubatoren Innova™ 4430 (New Brunswick Scientific, Nürtingen), 37° C Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau)
- Sterilbank Hera Safe HS12 (Kendro, Hanau)
- Probe Sonicator für Ultraschallaufschluß UW2070 (Bandelin Electronic, Berlin), Mikrospritze aus Titan MS72, Mikrospritze aus Titan MS73
- Zentrifugen: Avanti J-30, Allegra 6KR, MikrofugeR, Optima L-40 Ultrazentrifuge (Beckman, Fullerton, USA), Biofuge Pico (Heraeus Instruments), Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf), Picofuge (Stratagene), Rotilabo-Zentrifuge mit Butterfly-Rotor
- Zentrifugenbecher aus Polypropylen oder Polyacetat mit Schraubverschlüssen
- Rotoren #3324 (Heraeus Instruments), F241.5, 16.250, JA-30.50, GH 3.8 (Beckmann), A-4-62 (Eppendorf)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA)

II.1.11 Gentechnische Arbeiten

Alle durchgeführten gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe S1 wurden vom Landesumweltamt unter der Registrierungsnummer 64-K-1 19/02 genehmigt.

II.2 Methoden

II.2.1 Molekularbiologische Techniken

II.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA für weiterführende Arbeiten wie Restriktion oder Ligationen zu erhalten, wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Reinheit und Quantität der isolierten DNA wurde spektrophotometrisch (II.2.1.5) oder mittels einer analytischen Gelelektrophorese (II.2.1.3) ermittelt. Die Lagerung der DNA Präparate erfolgte bei – 20°C.

II.2.1.2 Polymerase Kettenreaktion

Zum Vermehren definierter DNA Abschnitte wurde die als „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) bezeichnete enzymatische *in vitro*-Amplifikation von DNA (Saiki *et al.*, 1988) genutzt.

Hierfür wurde entweder eine *Taq*-Polymerase (Bioline) oder der Expand-DNA-Polymerase-Mix (Roche) verwendet. Nach Ansetzen der Proben in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym), wurden diese gemischt, zentrifugiert und anschließend auf Eis gehalten. Nach Erreichen der Arbeitstemperatur, wurden die Proben in den PCR-Thermocycler (MWG Biotech, MJ Research) gestellt. Die PCR Ansätze wurden in einem 25 µl Volumen angesetzt (Tab. VI & Abb. 14).

Material	Konzentration final
Matrizen DNA	1-10 ng
10 x PCR Puffer	1x
2,5 M Betain	250 mM
10 mM dNTP Mix	0,4 mM
100 pmol/µl 3' Primer	10 pmol
100 pmol/µl 5' Primer	10 pmol
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	1,25 units
<i>Aqua dest.</i>	-

Tabelle VI: PCR Ansatz.

	95°C	5 min	initiale Denaturierung
30x	95°C	45 sec	Denaturierung
	T _p oder Gradient	45 sec	Primer Annealing
	72°C	1 min/1kb	Elongation
	72°C	7 min	finale Elongation

Abb. 14: Ablauf einer PCR.

Die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer wurde nach der empirischen Formel nach Wu und Ugozzoli (1991) errechnet oder experimentell per Temperatur Gradient ermittelt.

$$T_p = \{22 + 1.046[2x(G + C) + (A + T)]\}$$

Die PCR Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (II.2.1.3) auf erfolgreiche Amplifikation und Integrität hin analysiert.

Je nach Versuch wurde das o.g. Protokoll empirisch angepasst.

Colony PCR:

Bakterienklone welche mit Plasmid-DNA mit einem bestimmten Gen transfiziert wurden, konnten mittels einer „Colony PCR“ nach Jesnowski (1995) identifiziert werden. Hierbei wurden einzelne Klone von einer LB-Agar Platte entnommen und in ein PCR Reaktionsgefäß mit 10 µl sterilem H₂O getaucht. Danach wurde mit 15 µl eines PCR Ansatzes supplementiert, wodurch ein Volumen von 25 µl erreicht wurde. Die PCR Bedingungen wurden wie in Abb. 14 beschrieben gewählt, wobei aber die initiale Denaturierung zur Lyse der Bakterien auf 10 Minuten verlängert wurde. Die anschließende Analyse des PCR Ansatzes erfolgte in einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.2.1.3).

Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR):

Bei der RT-PCR wurde isolierte mRNA (II.2.6.1) mittels einer RNA abhängigen DNA-Polymerase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierbei wurde die Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Um Erststrang-cDNA zu erhalten wurde in einer ersten Reaktion mit Oligo (dT) Primern, danach mit genspezifischen Primern amplifiziert

II.2.1.3 Analytische Agarosegelelektrophorese von DNA

Analytische Agarosegelelektrophoresen wurden zur Isolierung von DNA Fragmenten nach Restriktionen (II.2.1.6) und PCR-Reaktionen (II.2.1.2) durchgeführt, wobei sowohl Fragment- und Vektorgrößen, als auch Konzentrationen von DNA Lösungen ermittelt wurden. Die Auftrennung der DNA erfolgte in 0,8 – 2 %igen (w/v) Agarosegelen, supplementiert mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, bei einer Feldstärke von ca. 5 V/cm². Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1996). Nach Beendigung der Auftrennung wurden die DNA Banden auf einem UV-Transilluminator (Herolab) bei einer Wellenlänge von 302 nm visualisiert. Die Dokumentation der Banden erfolgte mit einem Videodokumentationssystem der Firma Herolab unter Verwendung der Software „Easy Quant“. Als Größen- und Konzentrationsstandard diente der Hyperladder I DNA Standard (Bioline).

II.2.1.4 Präparative Agarosegelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA Fragmenten aus einem Fragmentgemisch, das nach Restriktionen (II.2.1.6) oder PCR Amplifikationen (II.2.1.2) vorlag, wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte dabei unter den in II.2.1.3 beschriebenen Bedingungen. Nach der Separation der DNA Fragmente wurden diese mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarosematrix erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel-extraktionskits (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die gereinigten DNA Fragmente einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.2.1.3) unterzogen oder photometrisch bestimmt (II.2.1.5).

II.2.1.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die DNA oder RNA Menge einer Probe konnte durch eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt werden. Liegt die OD_{260nm} bei 1, entspricht dies einem Wert von $\sim 50 \mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und $\sim 40 \mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA oder DNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde durch die *ratio* der gemessenen optischen Dichte bei 260 und 280 nm ermittelt. Richtwerte für den Reinheitsgrad sind 1,8 für reine DNA und 2,0 für reine RNA.

II.2.1.6 Restriktion von DNA

DNA Restriktionen wurden nach den Vorgaben des Enzymherstellers in den mitgelieferten Puffern unter Berücksichtigung der jeweils optimalen Temperatur und empirisch ermittelten Inkubationszeiten durchgeführt. Um $1 \mu\text{g}$ DNA zu schneiden, wurde in der Regel eine Enzymmenge von 2-4 Units (U) eingesetzt. Restriktionen, bei denen zwei verschiedene Enzyme kompatible Reaktionsbedingungen hatten, wurden in einem Ansatz durchgeführt. Im Falle unterschiedlicher Reaktionstemperaturen oder Puffersysteme der beiden Enzyme wurden die Reaktionen nacheinander bei der jeweiligen optimalen Bedingung durchgeführt. Um den Puffer zu wechseln, wurde die DNA präzipitiert (II.2.1.8).

II.2.1.7 Ligation restringierter DNA

Die Verknüpfung zweier restringierter DNA Fragmente (II.2.1.6) erfolgte unter Einsatz der T4-DNA Ligase (NEB) in den vom Hersteller angegebenen Konzentrationen und einem Gesamtvolumen von 10-25 μl . Das „Insert“ war in dreifach molarem Überschuss

zur Vektormenge vorhanden, und ein Ansatz wurde in der Regel 2-4 h bei 22°C oder ü.N. bei 16°C inkubiert (Sambrook *et al.*, 1996).

II.2.1.8 DNA Reinigung/Umpufferung

Zum Reinigen und Umpuffern von DNA wurden drei verschiedene Methoden angewandt. Bei Durchführung einer Ethanol-fällung wurde die Probe mit 2,5 Volumen 96 % Ethanol (v/v) sowie 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Die Isopropanol-fällung erfolgte dagegen mit 0,7 Volumen Isopropanol. Beide Ansätze wurden jeweils 30 min bei -20°C (Ethanol-fällung) bzw. bei Raumtemperatur (Rt) (Isopropanol-fällung) gelagert. Anschließend wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation pelletiert (13.000 x g/25 min/4°C), mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 x g/5 min/4°C). Die DNA wurde 10 min bei Rt getrocknet und dann in sterilem, entionisiertem Wasser aufgenommen. Bei der dritten angewandten Methode wurde die DNA mit dem QIAGEN „Mini Elute Gel Extraction“ Kit nach Herstellerangaben gereinigt und anschließend umpuffert.

II.2.1.9 Dephosphorylierung restringierter Vektor DNA

Zur Vermeidung von Autoligation der restringierten Vektor DNA (II.2.1.6) wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen mit der Shrimps alkalischen Phosphatase nach Herstellerangaben (Roche Molecular Biochemicals) entfernt.

II.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA:

Für die Hitzeschocktransformation wurden kompetente *E. coli* Zellen (Hanahan, 1983) auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA gemischt und 30 min auf Eis gelagert. Es wurden ca. 10 ng Plasmid-DNA (II.2.6.1) oder 10-20 µl eines Ligationsansatzes (II.2.2.4) eingesetzt. Danach erfolgte der Hitzeschock für 45-90 sec in einem 42°C warmen Wasserbad. Nach Lagerung der Zellen für weitere 2 min auf Eis wurden dem Reaktionsansatz 800 µl 2x TY-Flüssigmedium zugegeben. Zur Regeneration der Bakterienzellen und Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurden diese 1 h bei 37°C unter Schütteln (~225 „Rotations per Minute“ (rpm)) inkubiert. Anschließend wurden zur Selektion rekombinanter Klone verschiedene Volumina auf zuvor mit Antibiotika versetzten LB-Agarplatten aufgebracht und über Nacht (ü.N.) bei 37°C inkubiert. Die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone erfolgte durch Plasmid Minipräparation

(II.2.1.1), Kontrollrestriktion der isolierten DNA (II.2.1.6), Kolonien-PCR (II.2.1.2), sowie anschließender Agarosegelelektrophorese (II.2.1.3).

Elektrotransformation von Plasmid-DNA:

Bei der Elektrotransformation wurden kompetente *E. coli* (Dower *et al.*, 1988) verwendet. Vor der Transformation wurde die DNA mit Hilfe des Qiagen „Mini Elute Gel Extraction“ Kit nach Herstellervorschrift entsalzt. Ein 100 µl Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 100 ng salzfreier DNA gemischt und in eine gekühlte, sterile Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad) nach Herstellerangaben. Im Anschluß wurden die Zellen in 800 µl 2x TY-Medium aufgenommen und zur Regeneration 1 h bei 37°C und ~225 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 50-100 µl der Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte ebenfalls durch Plasmid Minipräparation (II.2.1.1), Kontrollrestriktion der Plasmid-DNA (II.2.1.6), Kolonien-PCR (II.2.1.2), sowie anschließender Agarosegelelektrophorese (II.2.1.3). Die weitere Lagerung der Agarplatten erfolgte bei 8°C.

Messung der Transformationseffizienz:

Die Transformationseffizienz von jeder neuen Charge kompetenter Zellen wurde durch eine Testtransformation mit einer bekannten DNA Konzentration des Vektors pUC18 gemessen. Folgende Transformationsraten konnten erreicht werden: $> 10^7/\mu\text{g}$ pUC18 bei hitzeschockkompetenten *E. coli*, $> 10^9/\mu\text{g}$ pUC18 bei elektrokompetenten *E. coli* Zellen.

II.2.1.11 Anzucht von *E. coli* und Herstellung von Stammkulturen

E. coli Kulturen wurden in LB-Flüssigmedium ü.N. bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (~225 rpm) angezogen. Die Selektion transformierter Bakterienklone erfolgte durch Supplementation der Medien und Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum. Für eine kurzzeitige Lagerung antibiotikaresistenter Bakterienklone wurden LB-Agarplatten verwendet und bei 8°C gelagert. Ebenso dienten LB-Agarplatten der Selektion antibiotikaresistenter Bakterien nach einer erfolgten Transformation (II.2.1.10), wobei die Platten ü.N. bei 37°C inkubiert wurden. *E. coli* Stammkulturen wurden hergestellt, indem 750 µl einer ü.N.-Suspensionskultur mit 750 µl sterilem 40 % (w/v) Glycerin versetzt wurden. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

II.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Nach der Klonierung von DNA Fragmenten wurden die amplifizierten und neu integrierten Bereiche durch Sequenzierung überprüft. Ebenso wurden finale Plasmide vor der Transformation in die Bakterienexpressionsstämme (II.1.5) verifiziert. Die Sequenzierung der DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) in der hauseigenen Sequenzierungs-Einheit unter der Leitung von Dr. J. Muth durchgeführt. Die zu sequenzierenden DNA Abschnitte wurden durch die 3' und 5' Primer definiert (Tabelle IV), die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit den Analyseprogrammen Chromas, Accelrys DS Gene 1.5 und Clustel X 1,8.

II.2.2 Proteinbiochemische Methoden

II.2.2.1 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAA-Gelelektrophorese) wurde das kommerziell erhältliche Gelsystem NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gele (Invitrogen) in MES Puffer (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde ein unspezifischer Nachweis der Proteine durchgeführt, wobei die Visualisierung mit „Simply Blue™ Safe Stain“ (Invitrogen) erfolgte. Weiterhin wurden die Proteine in einem Western-Blot (II.2.2.2) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und spezifisch in einer immunologischen Reaktion nachgewiesen. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einem Scanner (ArcusII, AGFA) eingelesen und anschließend in Cellophan gewickelt und getrocknet.

II.2.2.2 Western-Blot und Immunodetektion

Western-Blot Analysen erfolgten zum spezifischen Nachweis von Proteinen, die durch ein NuPAGE® (II.2.2.1) größenabhängig aufgetrennt wurden. Dazu wurden die Proteine aus den Gelen mittels XCell II-Blot-Moduls (Invitrogen) nach Herstellerangaben auf Nitrocellulosemembranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Die Visualisierung der immobilisierten Proteine erfolgte über Immunodetektion. Hier wurde entweder ein proteinspezifischer Antikörper und ein enzymkonjugierter sekundärer anti-primärer Antikörper verwendet oder ein enzymgekoppelten Protein spezifischer Antikörper (II.1.3). Wurde ein mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelter Antikörper eingesetzt, führte der anschließende Substratumsatz mit Nitroblautertrazolium (NBT)/BCIP (Life Technologies) zur Sichtbarmachung der Proteinbanden. Bei Einsatz eines Peroxidase

konjugierten Antikörpers wurde als Substrat SIGMA FAST™ (Sigma) verwendet. Die Entwicklung erfolgte bei Raumtemperatur (Rt) und Dunkelheit für 5 Minuten. Durch den Vergleich mit dem Größenstandard „SeeBluePlus2 Prestained Standard“ (Invitrogen) oder „Protein Prestained Marker“ (NEB) konnte eine Größenabschätzung der Proteine durchgeführt werden. Die einzelnen Schritte zur Detektion der Proteinbanden sind in Tabelle VII dargestellt. Die Antikörper wurden, falls nicht anders angegeben, in 1 x PBS, 0,5 % (w/v) BSA verdünnt. Die Membranen wurden zwischen den einzelnen Inkubationsschritten jeweils 3 x mit PBS-Tween 0,05 % (w/v) gewaschen. Bei Verwendung von alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern erfolgte vor der Substratreaktion ein zusätzlicher Aquilibrierungsschritt mit AP-Puffer. Die Farbreaktion wurde durch gründliches Waschen mit Wasser gestoppt. Die Dokumentation der Immunoblots erfolgte durch Digitalisieren über einen Scanner (ArcusII, AGFA).

Schritt	Nachweis von HCV Proteinen und scFvs
Blockieren	2% (w/v) BSA in 1x PBS, pH 7,4 1 h bei Rt oder ü.N. bei 4°C
Hybridisierung Ak I	Maus anti-penta-His Ak (1:5000), Maus anti-c-Myc Ak (1:5000), Maus anti-poly His ^{PO} Ak (1:400), 1 h bei Rt
Hybridisierung Ak II	GAM ^{AP} Ak (1:5000), GAM ^{HRPO} Ak (1:5000) 1 h bei Rt
Substratreaktion	(NBT)/BCIP (10-20 min bei Rt) ECL (5 min bei Rt) Sigma Fast™

Tabelle VII: Parameter der in dieser Arbeit durchgeführten Immunoblots nach Transfer elektrophoretisch separierter Proteine auf eine Nitrocellulosemembran.

Blotting-Puffer (pH 8,3):

Tris-HCl,	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)

AP-Puffer (pH 9,6):

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

II.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Elutionsfraktionen nach der Reinigung rekombinanter Proteine aus prokaryotischer Bakterienexpression wurde mit Hilfe des „Pierce BCA™

Protein Assay Kit“ (Pierce) nach Herstellerangaben photometrisch bestimmt. Die Ermittlung der Proteinmengen aus den gemessenen Extinktionswerten erfolgte dabei anhand einer BSA Standard Verdünnungsreihe, welche mit dem Computerprogramm MS-Excel (Microsoft) ausgewertet und graphisch dargestellt wurde.

II.2.2.4 Massenspektroskopie

Die in dieser Arbeit durchgeführten MS/MS Analysen bestanden aus einem „Peptide Mass Fingerprinting“, bei dem das Massenspektrum eines enzymatisch verdauten Proteins aufgenommen wurde und einem „Peptide Mass Mapping“ mittels „Mascot“ Datenbank, um das entsprechende Protein zu identifizieren.

Die massenspektroskopischen Messungen zur Ermittlung der Aminosäuresequenzen von prokaryotisch produzierten Proteinen wurden von Herrn M. Küpper in der hauseigenen Analyseeinheit mit einem ESI QToF2 (Quadrupole Time of Fly) Massenspektrometer (Waters Micromass) oder von Herrn A. Dubus, GIGA Proteomics, University of Liège, Belgien durchgeführt. Hierfür wurden die zu analysierenden Proteinbanden aus einem NuPAGE® Gel (II.2.2.1) mit einem Skalpell herausgeschnitten und zur Lagerung in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und so an die Analyseeinheiten übergeben.

II.2.2.5 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Der ELISA ist eine Festphasenmethode, die sich aufgrund ihrer Variabilität, der schnellen und einfachen Durchführbarkeit und der besonders hohen Sensitivität gut zum Nachweis von Antigen-Antikörper Interaktionen eignet (Clark & Adams, 1977; Engvall & Perlman, 1979). Dieses Analyseverfahren lässt sich leicht auf verschiedene Fragestellungen hin optimieren, folglich werden die hier angewandten Assays in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

II.2.3 Proteinproduktion

II.2.3.1 HCV Strukturproteine

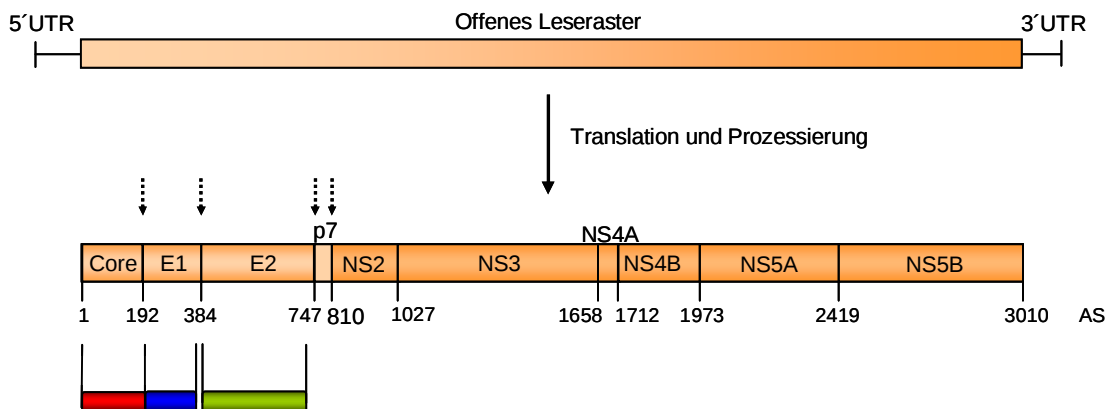


Abb. 15: Schematische Darstellung des HCV Genoms und die Einteilung der zur Verfügung stehenden Konstrukte. rot: core - 20,73 kDa/573 bp, blau: Δ E1 - 17,6 kDa/483 bp, grün: Δ E2 - 36,27 kDa/1002 bp., Core = Strukturprotein core, E1 = Strukturprotein E1, E2 = Strukturprotein E2, NS = nicht Strukturproteine.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antigene wurden einerseits prokaryotisch in *E. coli* produziert, andererseits synthetisch hergestellt. Die codierenden DNA Sequenzen der HCV Strukturproteine core, E1 und E2 des weltweit meist verbreiteten Subtyps 1b (Simmonds *et al.*, 2005) wurden von Prof. Dr. H. Zentgraf, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg zur Verfügung gestellt. Im Rahmen eines Praktikums wurden diese von G. Munz als Volllängenkonstrukte und im Falle der Hüllproteine E1 und E2 zusätzlich als Deletionsvarianten (Δ E1/ Δ E2) in den Expressionsvektor pMT (Abb. 9) kloniert. Bei den verkürzten Konstrukten wurden die carboxyterminalen hydrophoben Transmembrandomänen deletiert, da diese sich bei der Expression, Produktion, dem Transfer in den periplasmatischen Raum und einer eventuellen nativen Reinigung störend auswirken können (Yan *et al.*, 1994; Hüssy *et al.*, 1997; Yi *et al.*, 1997). Nach Transformation des Bakterienstamms BL 21 (De 3) (II.2.1.10) erfolgten erste prokaryotische, periplasmatische Expressionsversuche. Die Übergabe der Vektoren erfolgte durch Dr. K.M. Tur. Die Sequenzen wurden zur Bestätigung überprüft (II.2.1.12), die Position im Vektor und Größe der Konstrukte analysiert (Abb. 15) und nach einem Datenbankabgleich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) als DNA und Stammkultur gelagert (II.2.1.11). Im Falle der Deletionsvariante E1 wurde aus dem Volllängenkonstrukt ein neues Deletionskonstrukt abgeleitet, da ursprünglich nicht alle hydrophoben Aminosäuren der Transmembrandomäne entfernt wurden (Daten nicht gezeigt). Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Expressionen und den folgenden

Analysen ist zu berücksichtigen, dass die Zielproteine größer, als die in Abb. 15 gezeigten Werte sind. Dies liegt daran, dass allen prokaryotisch produzierten Antigenen der zur Reinigung und Detektion verwendete His-Tag und die dazugehörige Enterokinase Schnittstelle angehängt waren.

II.2.3.2 Periplasmatische Expression unter Stress

Für die periplasmatische Stressexpression der HCV Strukturproteine wurde das in Barth *et al.* (2000) beschriebene Protokoll modifiziert. Als Vektoren wurden die beiden Plasmide pMT und pET 26 b(+) verwendet (II.1.6), mit denen *E. coli* BL21(DE3) transformiert (II.1.5, II.2.1.10) wurden.

Für den Expressionsansatz wurde TB-Flüssigmedium im Verhältnis 10:1 mit Kalium-Phosphat-Puffer (170 mM KH_2PO_4 , 720 mM K_2HPO_4) vermischt, 2 % (w/w) Glucose hinzugefügt und mit 1 M ZnCl_2 -Lösung zu einer Endkonzentration von 0,5 mM sowie einem geeigneten Antibiotikum versetzt. 5 ml von diesem Medium wurden dann mit einem einzelnen *E. coli* Klon einer LB-Platte oder aus einer Stammkultur (II.2.1.11) beimpft. Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte ü.N. bei 26°C unter Schütteln (220 rpm). Die ü.N. Kultur wurde zur Inokulation einer Hauptkultur in 2 % (w/v) Glucose, 1 M ZnCl_2 , sowie der entsprechenden Menge Antibiotikum und einer geeigneten Menge TB-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (220 rpm) bei 26°C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 10-16$. Nach dem Erreichen der erwünschten OD_{600} wurde die Kultur zentrifugiert (5.000 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in TB-Medium resuspendiert, um eine OD_{600} von 5-10 zu erhalten. Hierauf erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h unter Schütteln bei 26°C.

Eine wichtige Grundlage dieser Methode ist die Einleitung von Stress durch die Stressfaktoren NaCl_2 und Sorbitol und die Zugabe von Stressprotektiva wie Glycinbetain oder Hydroxyectoin. Diese auch als Osmoprotektanten bezeichneten kompatiblen gelösten Substanzen schützen in der Natur halophile Mikroorganismen vor einer Dehydrierung und den daraus resultierenden Zellschäden, verursacht durch eine hohe Salzkonzentration im umgebenden Milieu (Brock, 2001). Durch den eingeleiteten Stress werden in den Bakterien Hitzeschockproteine und Chaperone freigesetzt, die eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung von *E. coli* Proteinen einnehmen und somit die Stabilität und Funktionalität von im Periplasma akkumulierter, rekombinanter Proteine begünstigen. Den niedermolekularen, organischen, kompatiblen gelösten Substanzen schreibt man, neben der Funktion als Stressschutzfaktoren, zusätzlich

einen positiven Einfluss auf die Funktionalität und Stabilität der zu exprimierenden Proteine zu. Deswegen wurde die Kultur mit 0,5 M Sorbitol, 4 % (w/v) NaCl₂ und 10 mM Betain versetzt und für weitere 30 min bei 26°C geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte die Expression für mindestens 6 h bei 26°C unter Schütteln (200 rpm). Durch Zentrifugation der Kultur bei 30000 x g und 4°C für 20 min konnten die Bakterien sedimentiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren oder bei -20°C gelagert werden.

II.2.3.3 Zytoplasmatische Expression

Für die zytoplasmatischen Bakterienexpression der HCV Strukturproteine wurde die HCV spezifische DNA in das Vektorsystem pRSET B kloniert (II.1.6, II.2.1.7) und Bakterien des Bakterienstamms BL21*(DE3)pLysS transformiert (II.1.5, II.2.1.10). Zunächst wurden 5 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum versetzt und mit einem entsprechenden Bakterienklon angeimpft. Die Kultivierung erfolgte ü.N. bei 37°C unter Schütteln (220 rpm). Für die Expressionskultur wurde LB-Medium mit Antibiotikum supplementiert und mit der ü.N. Kultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und 2,5 h bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) weiter angezogen, bis eine OD₆₀₀ von ~0,5 - 0,8 erreicht war. Hierauf erfolgte die Induktion der Expression mit 1 mM IPTG. Die Synthese der Zielproteine erfolgte bei 28°C unter schütteln (220 rpm) für 3 h. Nach Zentrifugation der Kultur bei 20000 x g für 30 min bei 4°C wurden die pelletierten Zellen weiterverarbeitet (II.2.3.5) oder bei -80°C gelagert.

II.2.3.4 Reinigung periplasmatisch exprimierter Proteine via NiNTA Matrix

Das aus der Expression (II.2.3.2) erhaltene Bakterienpellet wurde auf Eis im Verhältnis 1:1 im Aufschlusspuffer (NaCl₂ 300 mM, Ethylendiaminteracetat (EDTA) 10 mM, Glycerin 10 % (v/v), „Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets“ (Roche), pH 8,0) resuspendiert und komplett gelöst. Für den folgenden Ultraschallaufschluss wurden zwei Sonden verwendet. Bei Arbeiten mit der kleinen Sonde (M 71) wurden 700 µl – 1 ml Suspension in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt und auf Eis 4 x 30 sec bei 70 % Leistung beschallt; „Duty Cycle“: 9 sec. Bei Verwendung der großen Sonde (M 73) wurde das resuspendierte Pellet (1-100 ml) in ein Becherglas überführt und 3 x 1 min auf Eis bei 40 % Leistung beschallt; „Duty Cycle“: 9 sec. Hierauf erfolgte die Klärung des Periplasmaüberstandes durch Zentrifugation bei 30000 x g und 4°C für 25 min. Von

dem entstandenen Pellet wurde eine Probe entnommen, welche zur Kontrolle auf Ziel-Antigen in „Inclusion Bodies“ in NuPAGE® Laufpuffer (Invitrogen) für 10 min bei 70°C erhitzt und per Immunoblot auf detektierbares Protein analysiert wurde. Der verbliebene Periplasmaüberstand wurde über einen 0,45 µm Filter vorfiltriert und mittels einer zuvor mit 10 ml Entsalzungspuffer (EP) (1 x PBS, 1 M NaCl, pH 8) äquilibrierten PD 10 Entsalzungssäule (Amersham Biosciences) in 3 ml EP umgepuffert.

Für die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) wurde je nach zu erwartender Proteinausbeute eine „Poly-Prep Column“ oder „Econo-Pac Column“ (Biorad) mit NiNTA Agarose (Qiagen), Bindekapazität 5-10 mg Protein/1ml Matrix, befüllt und mit 10 Säulenvolumina EP-Puffer äquilibriert. Danach wurde die periplasmatische Fraktion auf die Säule aufgegeben und anschließend nacheinander mit jeweils 10 Säulenvolumen EP-Puffer und Waschpuffer I (1 M NaCl, 40 mM Imidazol, 1 x PBS, pH 8) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die NiNTA gebundenen Proteinmoleküle wurden durch Waschen der Säule mit 3 Säulenvolumina Elutionspuffer (1 M NaCl, 500 mM Imidazol, 1 x PBS, pH 8) eluiert und in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Zwecks Regenerierung wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina 50 mM EDTA/1 M NaCl gewaschen. Die gesammelten Fraktionen wurden nachfolgend mittels NuPAGE® (II.2.2.1), Immunoblot (II.2.2.2) und Massenspektroskopie (II.2.2.4) analysiert.

II.2.3.5 Reinigung zytoplasmatisch exprimierter Proteine via TALON™ Matrix

Für die Reinigung der im Zytoplasma akkumulierten HCV Proteine wurde eine BD TALON™ Metal Affinity Resin Matrix (BD Biosciences), Bindekapazität 5-10 mg Protein/1 ml Matrix verwendet. Hierbei wurden die beiden HCV Strukturproteine E1 und E2 unter denaturierenden Bedingungen und das core Protein unter nativen Bedingungen nach Herstellerangaben gereinigt. Die unterschiedlichen Reinigungsmodi wurden aufgrund der zuvor durchgeführten Löslichkeitsvorhersage mittels des Computerprogramms „Recombinant Protein Solubility Prediction“ (Wilkinson & Harrison, 1991), lokalisiert auf dem Internetserver www.biotech.ou.edu, ermittelt und experimentell durch Anwendung beider Reinigungsmethoden für jedes HCV Strukturprotein bestätigt.

Auch hier erfolgte wie in II.2.3.4 eine Kontrolle der gesammelten Reinigungsfractionen nach Reinigung mittels NuPAGE® (II.2.2.1), Immunoblot (II.2.2.2) und Massenspektroskopie (II.2.2.4).

Durch die Verwendung eines 5,4 m Guanidin HCl Denaturierungspuffers (Herstellerprotokoll), musste das Antigen für Immunisierungsversuche in ein mausverträgliches Puffersystem überführt werden. Dies erfolgte durch Dialyse mittels einer Servarpor® Dialysemembran gegen 5 l PBS bei 8°C ü.N. unter ständigem Rühren.

II.2.3.6 Synthetische HCV Peptide

Neben der prokaryotischen Produktion von HCV Oberflächenproteinen wurden zusätzlich synthetische Peptide von den Firmen Invitrogen und JPT angefertigt. Diese Peptide repräsentieren die jeweils subtypenspezifischen Aminosäureabfolgen der verschiedenen Strukturproteine des HCV. Hierfür wurden alle im Internet verfügbaren und in Datenbanken (<http://hcv.lanl.gov>) gespeicherten HCV Sequenzen des Subtyps 1b mit Hilfe des Programms Clustel X 1.8 verglichen und konservierte Bereiche des HCV Proteoms identifiziert (Abb. 16). Unter Berücksichtigung der hohen Heterogenität der E1 und E2 Proteinsequenzen und um ausreichend lange Konstrukte zu erhalten, wurden die konservierten Bereiche am C-Terminus vernachlässigt. Pro Strukturprotein wurden mehr als 10 Aminosäuren ausgewählt, um ein Epitop zu präsentieren. Durch Analysen mit dem Programm NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>) und Literaturrecherchen (Meunier et al., 1999; Dubuisson et al., 2000; Patel et al., 2000; Goffard & Dubuisson, 2003; Goffard et al., 2005) konnten N-Glykosilierungen in den ausgewählten Sequenzen ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden die identifizierten Peptide in einem Datenbankabgleich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit allen bekannten Proteinsequenzen verglichen um Homologien zu anderen Organismen auszuschließen. Die bestellten Peptide wurden mit dem höchsten Reinheitsgrad geliefert, um eventuelle falsch positive Bindungsreaktionen zu vermeiden. Die ausgewählten Peptidsequenzen stellten sich wie folgt zusammen (Abb. 16):

HCV-core: PRLGVRATRK(98 %T/2 %A)SERSQPRGRRQP

HCV-E1: T(88 %T/12 %A)TIRRHVDLLVG(63 %A/37 %T)A(92 %A/8 %T)FCS(92 %A/8 %V)MYVGDLGG

HCV-E2: HY(88 %A/12 %P)P(88 %R/23 %Q)(77 %P/23 %Q)CGIVPA(98 %S/8 %L)(77 %Q/23 %E)VCGPVYCFTPSPVV



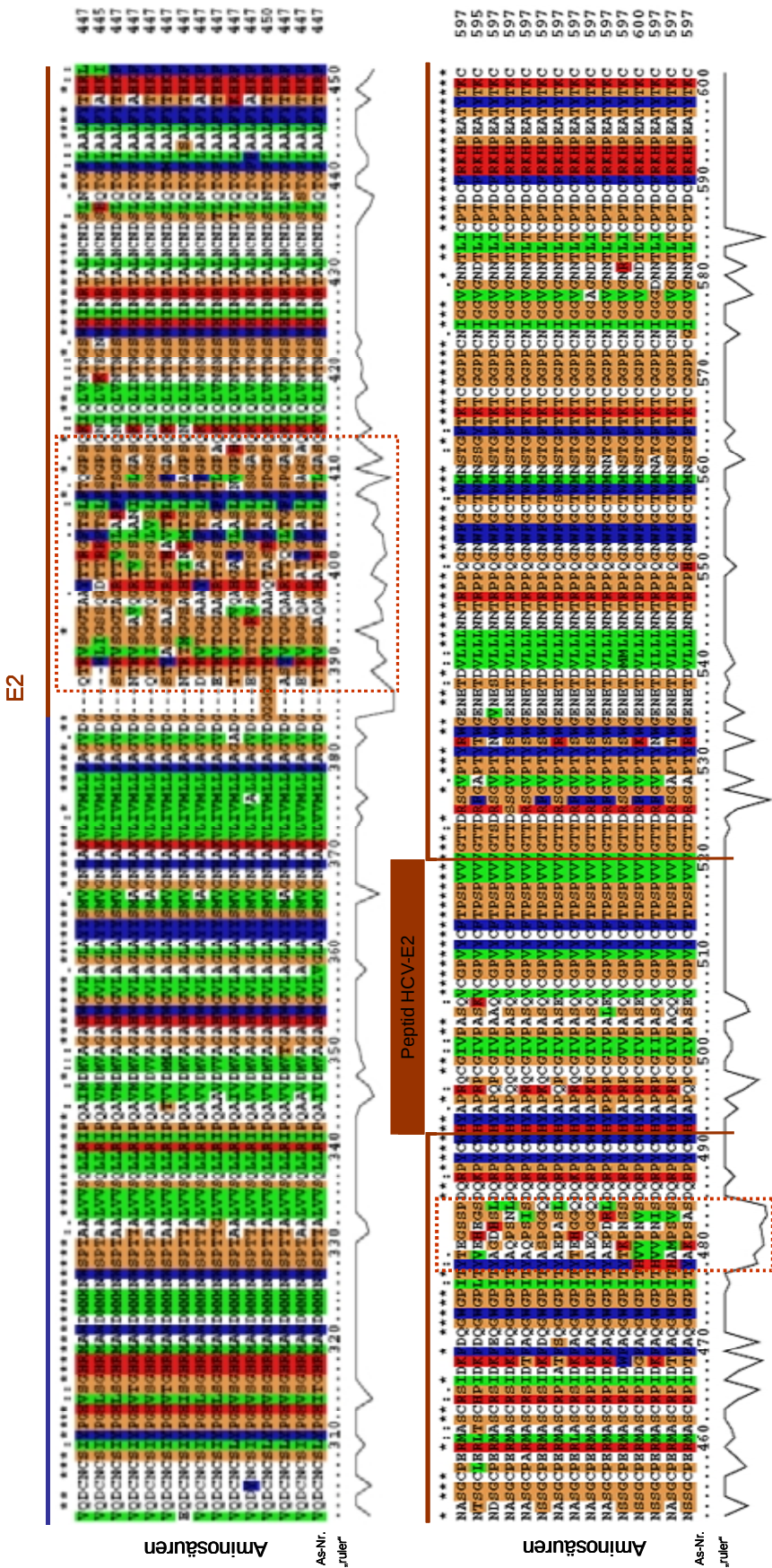


Abb. 16: Auswahl der HCV Sequenzen für die synthetischen Peptide. Die Peptide wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: Konservierte Region innerhalb des Subtyps 1b, nicht konservierte Region als Startsequenz, länger als 10 Aminosäuren, höchster Reinheitsgrad, keine Übereinstimmung mit der Peptidsequenz anderer Organismen. [Die Sequenzen der HCV Strukturproteine werden von aufliegenden Balken gekennzeichnet, die ausgewählten Sequenzen der Strukturproteine sind durch unterbrechende Querbalken hervorgehoben, core: rote Balken; E1: blauer Balken, E2: braune Balken. Das Lineal („ruler“) gibt durch „Peaks“ den Grad der Übereinstimmung der einzelnen Aminosäuren innerhalb der verglichenen Sequenzen an. Die zwei hypervariablen Regionen in der E2 Sequenz sind durch gestrichelte Kästchen gekennzeichnet. In der Abbildung wurden die Sequenzen innerhalb der E2 Strukturproteinsequenz nach den Aminosäuren 595-600 abgebrochen. As-Nr.= Aminosäurennummer].

Die Prozentzahlen geben dabei Auskunft über die prozentuale Verteilung der entsprechenden Aminosäuren innerhalb der analysierten Sequenzen. Alle Peptide wurden lyophilisiert geliefert und in sterilem, deionisiertem H₂O in einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgenommen

II.2.4 Immunisierung

II.2.4.1 Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierung von Mäusen erfolgte mit dem Antigen $\Delta E2$ *subcutan* beidseitig des Schwanzansatzes nach dem untenstehenden Schema:

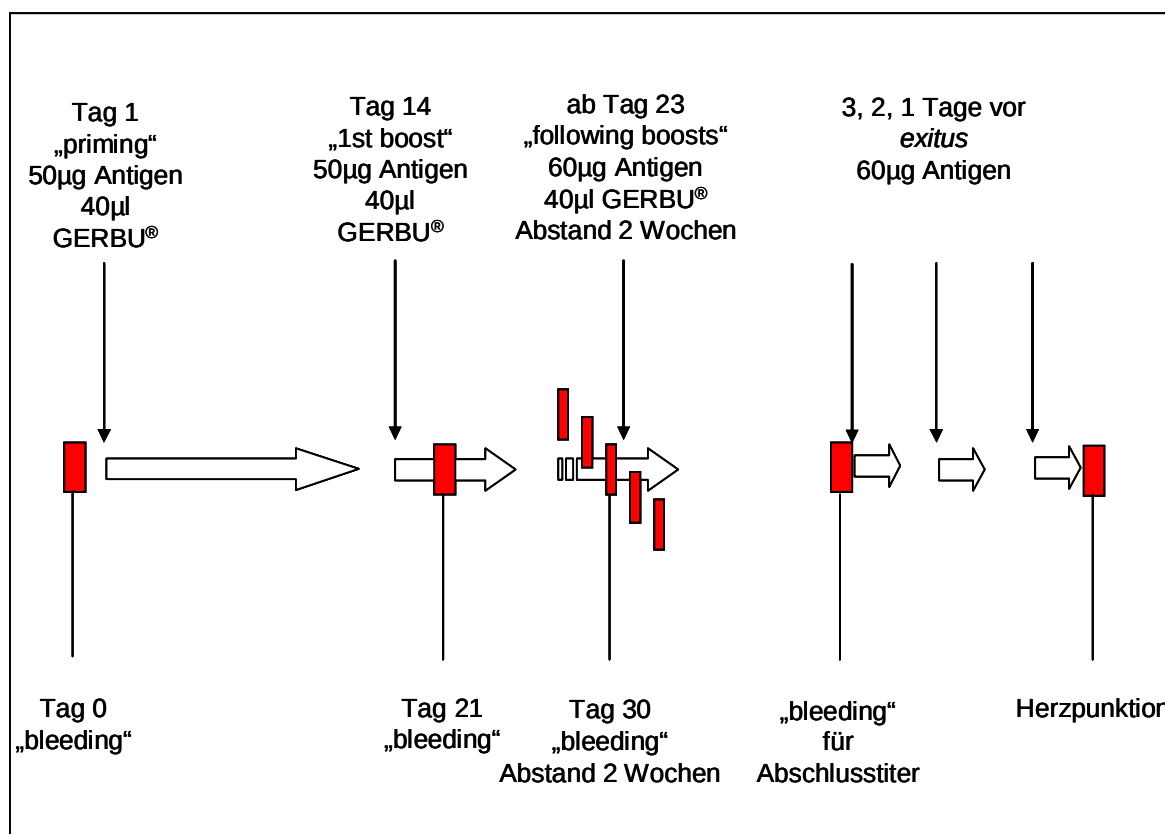


Abb. 17: Schema der Immunisierungen.

Zur Feststellung des Titers gegen das Antigen $\Delta E2$ wurde den Tieren an der Schwanzvene ~ 10 - 20 µl Blut entnommen und mit einer gleichen Menge PBS verdünnt. Nach Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C für 20 min enthielt die obere Serumphase die polyklonalen Antikörperfraktion, mit der nach Serumverdünnung in einem indirekten ELISA eine Antikörperantwort (Titer) bestimmt wurde (II.2.5.1).

II.2.4.2 Isolierung von Milzzellen

Die immunisierten Mäuse (BALB/c) (II.1.4) wurden mit Ether geopfert und in 70 % (w/v) Ethanol für 2 min oberflächlich sterilisiert. In einer Sterilbank wurde die Milz mit sterilem Sezierbesteck entnommen, in mehrere Stücke zerteilt und unter Zuhilfenahme des Stempels einer 10 ml Spritze durch ein Stahlnetz mit einer Maschenweite von 200 µm gepresst. Das Zellhomogenisat wurde in einer Petrischale in 25 ml eiskaltem RPMI 1640 Medium (Cytogen) aufgenommen und in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt. Alle nachfolgenden Schritte der Zellisolation wurden, wenn möglich, auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Zum Sedimentieren grober Zell- und Gewebetrümmer inkubierte das Homogenisat für 2 min. Die im Überstand befindlichen Zellen wurden in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und anschließend pelletiert (5 min, 200 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 25 ml frisches RPMI 1640 Medium überführt und resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde 2 x wiederholt.

II.2.5 Techniken zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden in Zusammenarbeit mit Dr. S. Zimmermann, Dr. T. Klockenbrink und N. Redding (RWTH Aachen, Institut für Biologie VII) mit Hilfe der Hybridomatechnik hergestellt. Wie in II.2.4.2 beschrieben wurden die Milzzellen isoliert und anschließend mit Myelomzellen fusioniert (Abb.18). Herstellung, Isolierung und Charakterisierung erfolgte nach Monnecke (1999) und Peters & Baumgarten (1990). Die aus der Fusion resultierenden polyklonalen Hybridomaklone wurden durch eine „Limiting Dilution“ Klonierung vereinzelt. Die Identifizierung der antikörperproduzierenden Klone erfolgte mittels indirektem ELISA (II.2.5.1).

II.2.5.1 ELISA zur Bestimmung von Serumtitern sowie der Aktivität und Konzentration von monoklonalen Antikörpern

Serumtiter der mit Antigen HCV ΔE2 immunisierten Mäuse sowie Reaktivitäten von monoklonalen Antikörpern (mAk) aus Kulturüberständen von Hybridomazellen wurden durch einen indirekten ELISA ermittelt. Dazu wurden die erhaltenen Sera seriell im Verhältnis 1:1000 bis 1:1024000 in PBS verdünnt. Monoklonale Antikörper-Kulturüberstände wurden entweder unverdünnt oder im Verhältnis 1:5 in Probenpuffer verdünnt eingesetzt. Für den ELISA wurden die Platten mit rekombinantem Antigen (100 ng/„Well“) beschichtet, zur Blockierung der noch freien Bindungsstellen mit 2 % BSA (w/v) beschichtet und die entsprechend Antikörper-Verdünnungen oder

Überstände zugegeben. Gebundene Maus Ak wurden mit einem Peroxidase konjugiertem Ziege-anti-Maus (GAM^{HRPO}) Antikörper über 2,2-Azino-di-3-Ethylbenzthiazolinsulfonat-Substratumsatz (ABTS) (Roche Diagnostics) detektiert. Die Inkubationszeiten waren 1 h bei Rt, 0,5 h bei 37°C oder über Nacht bei 8°C. Die Stärke des Substratumsatzes wurde photometrisch nach 1 h erfasst und die Extinktionswerte bei 405 nm dokumentiert. Der Titer ergab sich aus dem Schnittpunkt der Verdünnungskurve nach Abzug des Hintergrunds mit einem Ausschluss von 0,1. Der Hintergrund kam durch unspezifische Reaktionen der beteiligten Reagenzien zustande und wurde als Negativkontrolle unter Ausschluss der Sera gemessen. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Ansätze mit PBS+Tween 0,5% (v/w) gewaschen.

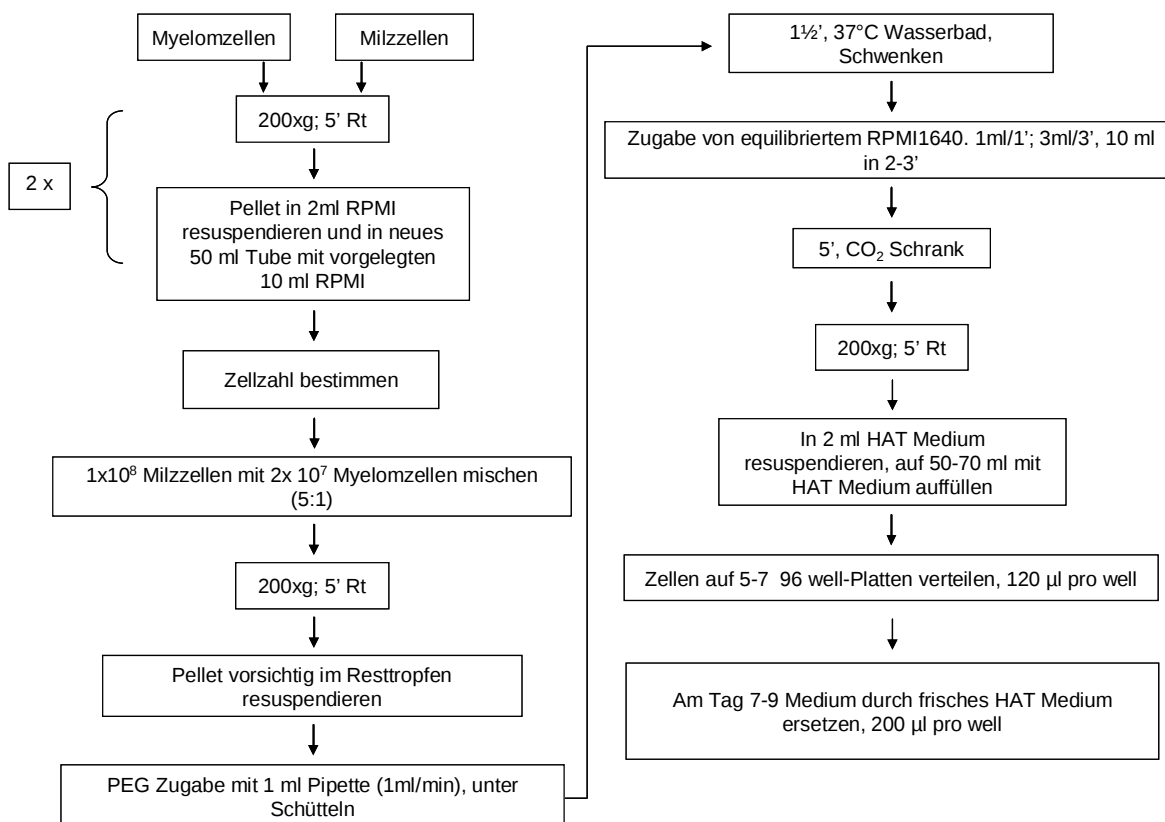


Abb. 18: Ablauf der Hybridomafusion. Das Schema beschreibt die Arbeitsschritte einer Hybridomafusion, wie sie in dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. T. Klockenbrink und N. Redding durchgeführt wurde.

II.2.5.2 Kultur, Reinigung und Isotypisierung monoklonaler Antikörper

Um eine ausreichende Menge an monoklonalen Antikörpern zu erhalten, wurden 10^7 Hybridomazellen in einem Glasbioreaktor (Applikon) in einem Arbeitsvolumen von 1 l über 140 h angezogen. Der erhaltene Überstand wurde anschließend mittels einem „Äkta Explorer 10“ Chromatographiesystem (Amersham) über eine „Protein A Ceramic

Hyper D[®]F“ Matrix (Life Technologies, Gibco BRL) in einer XK 60/20 Säule (Amersham) gereinigt. Folgend wurde nach der tonusmäßigen Kalibrierung mittels Gelfiltrationsstandard (Biorad) ein weiterer Gelfiltrationsreinigungsschritt mittels einer „Superdex 200 HR“ Säule (Amersham) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Überwachung und Auswertung der Säulenchromatographien erfolgte über das Unicorn Analysis Computerprogramm (Amersham); die Kontrolle der eluierten Fraktionen wurde mittels NuPAGE[®] (II.2.2.1) und Immunoblot Analysen (II.2.2.2) durchgeführt. Eine Isotypenbestimmung wurde mit einem „Mouse Immunoglobuline Isotyping Kit“ der Firma BD Bioscience nach Herstellerangaben durchgeführt, mit dem folgende Isotypen bestimmt werden können: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und IgA (II.1.2).

Anzuchtmedium:	RPMI	1 l
	Fötales Kälber Serum (FCS)	10 % (v/v)
	L-Glutamin	2 mM
	β-Mercapto-Ethanol	50 µM
	Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml
	Glucose	0,2 % (w/w)
Ladepuffer (Protein A Matrix):	0,5 Na Citrat pH 8,4	
Elutionspuffer (Protein A Matrix):	100 mM Na Citrat pH 4	
Lade-/Elutionspuffer (Gelfiltration):	PBS pH 7,4	

II.2.5.3 Bindungsanalysen mit Volllängenantikörpern und eukaryotisch produzierten HCV Proteinen (ICC)

Weitere Spezifitätsanalysen von Volllängenantikörpern zu eukaryotisch produziertem HCV Protein wurden in einer Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen von Dr. C. T. Bock durchgeführt. Hierfür wurde die Hepatozytenzelllinie HepG2 mit den eukaryotischen Expresssionsvektoren pRVcore-NS3 und pHCV-E2 transient transfiziert. Die mikroskopische Auswertung der Bindungen erfolgte über einen Fluoreceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten GAM Antikörper.

II.2.6 Generierung von scFv Antikörpern aus Hybridomazellen

II.2.6.1 mRNA Isolierung aus Hybridomazellen

Die Isolation von mRNA aus Hybridomazellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, II.1.2) nach Herstellerangaben. Pro Milz konnten bis zu 30 µg RNA isoliert und anschließend für die Erststrang-cDNA-Synthese (II.2.6.2) verwendet werden.

II.2.6.2 Konstruktion rekombinanter scFv Antikörper

Gereinigte mRNA (II.2.6.1) aus Maushybridomaklonen wurde mit Hilfe der „Superscript II Revers Transkriptase“ (Invitrogen) durch RT-PCR (II.2.1.2) nach Herstellerangaben in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Zur Konstruktion der rekombinanten scFv wurde ein „Two Step Cloning“ in den Phagmidvektor pHENHi (Abb. 11) nach Dorf Müller (2002) durchgeführt. Dieser Vektor verfügt über einen synthetischen „Linker“, an den über singuläre Schnittstellen die variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperkette ligiert wurden. Die für die Amplifikation der Gensegmente benötigten Primer (II.1.7) wurden nach Bestimmung des Antikörperisotyps (II.2.5.2) im Falle der schweren Antikörperkette IgG 2a spezifisch und im Falle der leichten Antikörperkette κ spezifisch aus der bestehenden Primerbibliothek (II.1.7) ausgewählt. Zunächst wurden die schweren und leichten Antikörperketten aus der cDNA mittels PCR amplifiziert (II.2.1.2) und mit einer präparativen Gelelektrophorese analysiert und gereinigt (II.2.1.4). Hierauf erfolgte die Restriktion (II.2.1.6) der Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *SfiI/BstEII* für die schwere Antikörperkette und *AscI/NotI* für die leichte Antikörperkette mit anschließender Reinigung mittels präparativer Gelelektrophorese (II.2.1.4). Parallel hierzu wurde der Vektor mit den Enzymen *SfiI/BstEII* linearisiert und nach Dephosphorylierung (II.2.1.9) ebenfalls mittels einer präparativen Gelelektrophorese analysiert und gereinigt (II.2.1.4). Anschließend erfolgte die Ligation (II.2.1.7) der schweren Antikörperkette in den linearisierten Vektor und Transformation (II.2.1.10) von *E. coli* DH5 α (II.1.5). Nach erneutem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *AscI/NotI* (II.2.1.6), Dephosphorylierung (II.2.1.9), Analyse und Reinigung durch eine präparative Elektrophorese (II.2.1.4) erfolgte die Ligation (II.2.1.7) der leichten Antikörperkette mit anschließender Transformation (II.2.1.10) von *E. coli* XL 1blue MRF' (II.1.5). Die generierten Konstrukte wurden sequenziert (II.2.1.12) und auf ihre strukturelle Integrität analysiert.

II.2.6.3 Periplasmatische Expression rekombinanter scFv Antikörper

Für die periplasmatische Expression wurde zunächst 5 ml 2 x TY-Medium mit entsprechendem Antibiotikum und 1 % (w/w) Glucose supplementiert und mit einem Bakterienklon beimpft. Die Kultivierung erfolgte ü.N. bei 37°C. Am darauf folgenden Tag wurden 500 ml 2 x TY-Medium mit Antibiotikum und 0,1 % (w/w) Glucose versetzt und mit der ü.N. Kultur innokuliert. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7- 0,8

bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte ebenfalls unter Schütteln (220 rpm) mit 1 mM IPTG für 3 h bei 30°C. Danach wurden die Bakterien bei 5000 x g und 4°C für 30 min sedimentiert und weiterverarbeitet (II.2.6.4) oder bei -80°C gelagert.

II.2.6.4 Reinigung rekombinanter scFv Antikörper nach periplasmatischer Expression

Die mittels dem Phagmidvektor pHENHi (Abb. 11) in BL21* (DE3) pLysS (II.1.5) rekombinant produzierten scFv wurden über eine „BD TALON™ Metal Affinity Resin Matrix“ (Becton Dickinson Biosciences Clontech) nach Herstellerangaben gereinigt. Das aus der Expression resultierende Bakteriensediment wurde in Natriumphosphatpuffer (50 mM Na₂H₂PO₄H₂O, 300 mM NaCl, pH 8, 2ml pro 25ml Kulturvolumen) aufgenommen und unter Verwendung von Ultraschall (Sonde M73, 3x1 min, 40% Leistung, „Duty Cycle“: 9 sec) und Aktivierung der BL21* (DE3) pLysS eigenen lysozymalen Funktion (II.1.5), durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen nach Herstellerangaben, aufgeschlossen.

II.2.6.5 ELISA zur Bestimmung der Bindungseigenschaften von scFv Antikörpern

Zur Feststellung von Bindungen der rekombinanten scFv an das HCV Antigen wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Die Platten wurden mit 100 ng/Vertiefung („Well“) Antigen beschichtet und mit 2 % (w/v) BSA abgesättigt. Der prokaryotisch produzierte scFv Antikörper wurde zum einen als Kulturüberstand und zum anderen gereinigt, in einer Konzentration von 100 ng/„Well“, verwendet. Der Nachweis erfolgte indirekt über einen anti-Myc und einem GAM^{HRPO} Antikörper (Tabelle III). Zur Darstellung der erfolgreichen Bindung wurde als geeignetes Substrat ABTS zugegeben. Die Inkubationszeiten zwischen den Arbeitsschritten dauerten, wenn nicht anders in den Versuchsbeschreibungen erwähnt, 1 Stunde bei Raumtemperatur, 0,5 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 8°C. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde 3 x mit PBS+Tween 0,5% (w/v) gewaschen. Die Stärke des ABTS Substratumsatzes wurde photometrisch bei 405 nm dokumentiert.

II.2.6.6 Dreidimensionale Strukturanalysen

Die dreidimensionale Struktur von scFv Antikörpern wurde nach Whitelegg & Rees (2000) errechnet und dargestellt.

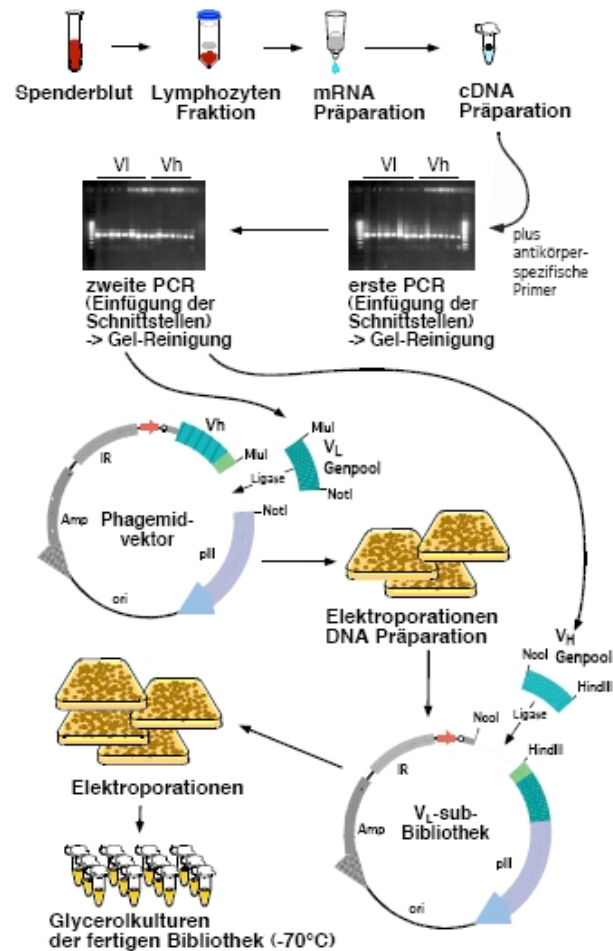


Abb. 19: Flussschema einer Phagenbibliotheksherstellung mittels humanen Spendermaterials. Nach Schmiedl & Dübel (2004).

II.2.7 „Phage Display“

II.2.7.1 Humane HCV Phagen Bibliothek

Durch die freundliche Unterstützung von Dr. T Heintges und Dr. K. Tessmann konnten in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit humanen HCV Phagen Bibliotheken, unter Verwendung der synthetischen und prokaryotisch exprimierten Antigene, mehrere „Panning“ Runden (Smith, 1985) durchgeführt werden (Abb. 19).

Die „Phage Display“ Technik erlaubt eine Affinitäts-Selektion von Proteinbibliotheken mit einer sehr großen Anzahl verschiedenster Proteine (Tessmann *et al.*, 2002). Bei der hier verwendeten Phagenbibliothek wurde die DNA der schweren und leichten Kette der humanen Antikörper mit einer genspezifischen PCR von Plasmazellen infizierter Patienten, nach RNA Isolierung, amplifiziert (Abb. 19). Die Fragmente wurden

anschließend in das Phagmid pAK 100 ligiert und nach Transfektion des Bakterienstamm XL1blue MRF' als Glycerinstammkultur bei -80°C gelagert. Auf diese Stammkulturen wurde nun während eines „Phage Displays“ für drei „Biopanning“ Runden zurückgegriffen.

II.2.7.2 „Biopanning“ der humanen scFv Bibliothek

Das „Biopanning“ der Patienten Bibliotheken (II.2.7.1) erfolgte nach dem Protokoll von Dr. K. Tessmann (2002), welches in die meist parallel ablaufenden Arbeitsschritte Produktion der Phagen, „Biopanning“ und Titration eingeteilt werden kann.

Produktion der Phagen: 10^8 Bakterienzellen XL1blue MRF' von 4 Glycerolstocks aus 4 Patientenbibliotheken wurden in 50 ml 2 x TY-Medium, 1 % (w/v) Glucose, 10 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Chloramphenicol aufgenommen und bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Danach wurde die Kulutur mit 2 x TY-Medium, 1 % (w/v) Glucose, 10 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Chloramphenicol auf 100 ml (bzw. 50 ml nach der ersten „Panning“ Runde) aufgefüllt und 4-5 Stunden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe des Helferphagen M13 (Invitrogen) in einer Konzentration von 10^{11} - 10^{12} und 0,5 mM IPTG. Für eine ausreichende Infektion wurde der Ansatz 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann für 3-4 Stunden bei 26°C geschüttelt, mit 30 µg/ml Kanamycin supplementiert und anschließend über Nacht bei 26°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes bei 4500 rpm für 15 min. Der Überstand wurde mit 1/5 Volumen gekühltem 20 % Polyethylenglykol (PEG) und 15 % (w/v) NaCl supplementiert und auf Eis für 3 h inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min wurde der Überstand verworfen, das Phagenpellet in 1 ml PBS aufgenommen und anschließend für das „Biopanning“ verwendet.

„Biopanning“: Mikrotiterplatten (96 „Well“ EIA/RIA Platte, Nunc, BRL Gibco) wurden mit prokaryotisch produzierten oder synthetischen HCV Strukturproteinen mit einer Konzentration von 0,5 µg/50 µl beschichtet und über Nacht bei 8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 5 x mit PBS gewaschen und mit 200 µl, 3 % (w/v) BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Hierauf folgten 5 Waschschrte mit PBS. Anschließend wurde mit 50 µl (10^{11} - 10^{12}) Phagenkultur/PBS pro Vertiefung beschichtet und für 1 h bei Rt inkubiert. Es folgten 15 gründliche Waschschrte mit PBS + 0,1 % (w/v) Tween. Die Elution der bindenden Phagen erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer (0,1 M Glycerin H₂O/HCl pH 2,2) nach einer 10 minütigen Inkubation bei

Rt. Das Eluat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl 1 M Tris (pH7) neutralisiert. Hierauf erfolgte eine Supplementation von 50 µl des Eluats mit 2 ml *E. coli* XL1blue MRF⁺ Kultur. Der Ansatz wurde zunächst für 30 min stehend, danach unter Schütteln bei 80 rpm ebenfalls für 30 min inkubiert. Hiernach erfolgte eine Zugabe von 8 ml 2 x TY, 1 % (w/w) Glucose, 10 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Chloramphenicol. Jeweils 1 µl und 10 µl des Ansatzes wurden für die Titration abgenommen. Durch eine erneute Supplementation mit 50 ml 2 x TY-Medium, versetzt mit 10 µg/ml Tetracyclin und 25 µg/ml Chloramphenicol, konnte mit einer weiteren Phagenproduktion fortgefahren werden.

Titration: 10 µl [Verdünnung 1:1000] und 1 µl [Verdünnung 1:10000] Bakterienkultur wurden auf 2 x TY Platten mit 10 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert, bei 37°C über Nacht inkubiert und die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt, um die Anzahl der selektierten Phagenklone festzustellen.

Die selektierten, eluierten Phagen wurden nach drei „Panning“ Runden bei 8°C gelagert. Mit ihnen wurden zur weiteren Analyse *E. coli* Bakterien des Stammes XL1blue MRF⁺ infiziert und als Stammkultur bei -80°C gelagert. Für die folgenden Einzelklonanalysen wurden 2 x TY Agaroseplatten mit 10 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Chloramphenicol supplementiert und mit den Stammkulturen ausgestrichen, bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend bei 8°C gelagert.

II.2.7.3 Anzucht monoklonaler Phagen in Mikrotiterplatten

Zur Identifikation monoklonaler scFv Phagenklone aus den „Biopanning“ Runden der humanen scFv Phagenbibliothek (II.2.7.2) wurde das Protokoll von Nissim *et al.* (1994) modifiziert. 100 µl 2 x TY-Medium/„Well“ versetzt mit 1 % (w/w) Glucose und Antibiotikum wurden in 60 Vertiefungen einer „V-Bottom 96 Well“ Platte (Greiner) vorgelegt und mit jeweils einem Klon/„Well“ einer 2 x TY Platte (II.2.7.2) mit den entsprechenden Phagmidklonen inokuliert. Nach Abdeckung mit Parafilm® (Neenah, USA) erfolgte eine Inkubation bei 30°C ü.N. unter Schütteln (150 rpm). Am nächsten Tag wurden 200 µl/„Well“ 2 x Ty-Medium, 1 % (w/w) Glucose, Antibiotikum und $0,5 \times 10^{10}$ pfu M13-KO7 Helferphagen (NEB) in eine neue „V-Bottom 96 Well“ Platte überführt, mit 20 µl der ü.N. Kultur inokuliert und für 2 h bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1800 rpm für 10 min. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Bakterien mit 200 µl 2 x TY-Medium inklusive Antibiotikum überschichtet und ü.N. bei 37°C unter Schütteln

(150 rpm) resuspendiert. Am darauffolgenden Tag wurde erneut wie beschrieben zentrifugiert und der Überstand im monoklonalen Phagen ELISA getestet (II.2.7.4).

II.2.7.4 Monoklonaler Phagen ELISA

Zur Identifikation von monoklonalen Phagen, die einen spezifischen humanen scFv Antikörper präsentieren, wurde ein monoklonaler Phagen ELISA durchgeführt. 60 Vertiefungen einer „Maxisorp“ Mikrotiterplatte (Nunc) wurden mit entsprechendem Antigen ü.N. bei 8°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die freien Bindungsstellen mit 2 % (w/v) BSA für 2 h bei 37°C abgesättigt. Nach Zugabe von 100 µl eines mit scFv präsentierenden Phagen und mit 2 % (w/v) BSA 1:1 durchgemischten Bakterienüberstandes (II.2.7.3), wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Hierauf erfolgte die Zugabe und Inkubation eines α -M13^{HRPO} konjugierten Antikörpers (Tabelle III) für 1 h bei 37°C und anschließender Visualisierung durch Umsatz von ABTS. Zwischen jedem Arbeitsschritt wurde mit PBS+Tween 0,5 % (w/v) gewaschen. Die Dokumentation erfolgte photometrisch.

II.2.7.5 Produktion von humanen scFv Antikörpern in Mikrotiterplatten

Humane scFv Antikörper, welche im „Phage Display“ mit prokaryotisch produziertem Protein selektiert wurden (II.2.7.2), wurden in einem Expressionsansatz im Mikrotiterplattenformat eingesetzt. Hierfür wurde 2 x TY-Medium mit entsprechendem Antibiotikum und 1 % (w/w) Glucose supplementiert. 150 µl des Mediums wurde jeweils in eine Vertiefung einer „V-Bottom 96 Well Plate“ (Greiner) vorgelegt und anschließend mit einem Klon/„Well“ angeimpft. Die mit Parafilm® (Neenah, USA) abgedeckte Mikrotiterplatte wurde ü.N. bei 37°C unter Schütteln (170 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das resultierende Pellet wurde in 250 µl mit entsprechendem Antibiotikum und 0,5 mM IPTG versetztem 2 x TY-Medium aufgenommen und ü.N. bei 30°C unter Schütteln (170 rpm) inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen wurden am nächsten Tag 150 µl (2 x 75 µl) Kulturüberstand mit den darin vorliegenden scFv Antikörpern auf erfolgte Produktion und Bindung an das entsprechende Antigen in einem ELISA Ansatz (II.2.6.5) eingesetzt.

III. Ergebnisse

III.1 Prokaryotische Expression der HCV Strukturproteine

Verschiedene Versuchsansätze der Expression aller drei HCV Strukturproteine waren im Vorfeld dieser Arbeit unternommen worden und sollten zunächst hinsichtlich der Proteinproduktion modifiziert werden. Der primäre Ansatz war die modifizierte Stressexpression nach Barth *et al.* (2000) (II.2.3.2) im Vektorsystem pMT (Abb. 9) unter Verwendung des Bakterienstamms BL21 (DE3) (II.1.5). Die Reinigung erfolgte unter nativen Bedingungen. Allerdings konnte nur bei dem Protein $\Delta E2$ eine erfolgreiche Produktion und Reinigung durch NuPAGE® (II.2.2.1), Immunoblot (II.2.2.2) und MS/MS Analysen (II.2.2.4) nachgewiesen werden (Abb. 20).



Abb. 20: NuPAGE® (II.2.2.1) und Immunoblot (II.2.2.2) Analyse des unter Stress prokaryotisch produzierten und anschließend gereinigten HCV Oberflächenproteins $\Delta E2$. Aus dem Pellet einer 1,2 l Schüttelkolben-Stressexpression (II.2.3.2) wurde das $\Delta E2$ nach Ultraschallaufschluss und Entsalzung über PD 10 Säulen mittels NiNTA gereinigt (II.2.3.4). 29 μ l jeder Elutionsfraktion wurden in einem 12 % NuPAGE® aufgetrennt (A) und in einem Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis des N-terminalen His-Tags erfolgte im Immunoblot mit einem Maus- α -Penta-His Antikörper und einem mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiertem Ziege anti-Maus Antikörper (GAM^{AP}) (B). Die Visualisierung der Banden erfolgte mit (NBTB)/CIP (Life Technologies). [10: Waschfraktion 10 mM Imidazol; 40: Waschfraktion 40 mM Imidazol; M: „See Blue Plus Proteinstandard“ (Invitrogen); 1 - 4: Elutionsfraktionen 500 mM Imidazol].

Bei den zusätzlichen Banden größer und kleiner der 38 kDa handelt es sich nach MS/MS Analyse teils um unspezifisch gebundenes bakterielles Protein und um HCV spezifische Proteine. Diese kommen wahrscheinlich aufgrund von Oligomerisation und proteolytischen Abbau zustande.

Zur Optimierung der Proteinausbeute wurden weitere Versuche zur periplasmatischen und zytoplasmatischen Expression der rekombinanten Proteine unternommen. Hierfür wurde die DNA Sequenz der HCV Strukturproteine in entsprechende Plasmide ligiert. Um einen direkten Vergleich zu dem pMT System ziehen zu können, konzentrierten sich die nachfolgenden Versuche zunächst auf die Deletionsvariante (Δ) des

Strukturproteins E2. Als zusätzlicher Expressionsvektor für die periplasmatische Expression wurde der pET 26 b(+) Vektor (Merk Biosciences) (Abb. 10) verwendet. Um eine zytoplasmatische Expression des $\Delta E2$ durchzuführen (Lorenzo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001), wurde der pRSET B Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Abb. 13) eingesetzt. Nach erfolgter Ligation der $\Delta E2$ cDNA in das Plasmid pET 26 b(+) und Transformation des Expressionsstamms BL21 (DE3) wurde erneut nach Barth *et al.* (2000) mehrere Expressions- und Reinigungsansätze durchgeführt (II.2.3). Die erfolgte Expression konnte nach anschließender Entsalzung über PD 10 Säulen und Reinigung mittels NiNTA Säulen (II.2.3.4) durch Immunoblot (II.2.2.2) und MS/MS Analysen (II.2.2.4) nachgewiesen werden. Der optische Vergleich der NuPAGE® zeigte bezüglich des Verhältnisses von Kulturvolumen zur Proteinausbeute keinen Unterschied zum pMT System. Das gesamte Zielprotein lag nach der Reinigung in löslicher Form vor, da in Immunoblot Analysen von denaturierten Sediment- und Periplasmafraktionen kein Protein via His-Tag nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

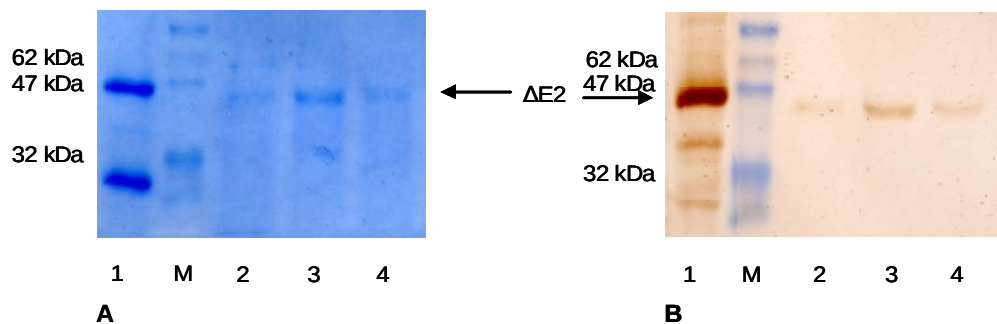


Abb. 21: Vergleich von periplasmatischer (II.2.3.2) und zytoplasmatischer (II.2.3.3) Expression des HCV $\Delta E2$ im NuPAGE® (A) und Immunoblot (B). Nach erfolgter Expression wurde das Protein aus den Bakterienpellets gereinigt. Dies erfolgte im Fall des im Periplasma akkumulierten Proteins nach Entsalzung über PD 10 Säulen über eine NiNTA Matrix (II.2.3.4), wobei das Protein anschließend in löslicher Form vorlag. Im Fall des im Zytoplasma akkumulierten Proteins wurde dieses direkt in einem denaturierenden Ansatz über eine TALON™ Matrix gereinigt (II.2.3.5). Zu sehen sind die unterschiedlichen Ausbeuten an Protein und die Präsenz in unterschiedlichen Fraktionen. Bei der zytoplasmatischen Expression wurde das Protein aus 200 ml Kulturvolumen gereinigt und in 2 ml eluiert, bei der periplasmatischen Expression wurde aus 330 ml Kulturvolumen gereinigt und mit 1,5 ml eluiert. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion des Zielproteins im Immunoblot über einen anti-His Ak und einen GAM^{HRPO}. Als Substrat wurde „SIGMA FAST“ (Sigma) verwendet. [Aufbau: 1: Elutionsfraktion zytoplasmatischer Expression; M: Proteinstandard „Prestained Protein Proteinstandard“ (NEB); 2: Durchfluss Fraktion periplasmatischer Expression; 3 und 4: Elutionsfraktionen periplasmatischer Expression. Die in dieser Abbildung gezeigten periplasmatischen Fraktionen wurden von Frau Christiane Frechen zur Verfügung gestellt].

Auch nach mehreren Optimierungsversuchen der periplasmatischen Ansätze bezüglich Expression (IPTG Konzentration), Produktion (Temperatur, Zeit) und Reinigung

(Packvolumen der Säulen), wurde das Zielprotein nicht nur in den Elutionsfraktionen, sondern auch zusätzlich in den Waschfraktionen gefunden (Abb. 21).

Nach Klonierung der cDNA des HCV $\Delta E2$ in den zytoplasmatischen Expressionsvektor pRSET B (Abb. 13) wurde für die Expression der *E. coli* Stamm BL21* (De3) pLysS (Invitrogen, II.1.5) transformiert. Mittels des Programms „Recombinant Protein Solubility Prediction“ (Wilkinson & Harrison, 1991), welches den Wahrscheinlichkeitsgrad einer unlöslichen prokaryotische Produktion von Proteinen anhand der Aminosäuresequenz errechnet, wurden die Proteinsequenzen der HCV Strukturproteine analysiert. Diese Analyse ergab für das core Protein eine 76,4 %ige, für das $\Delta E1$ Protein eine 77,1 %ige und für das $\Delta E2$ eine 90,4 % ige Wahrscheinlichkeit, dass das Zielprotein unlöslich vorlag. Aufgrund dieser Daten wurde das HCV $\Delta E2$ nach Expression (II.2.3.3) und unterstützendem Aufschluss durch das bakterieneigene T7 Lysozym unter denaturierenden Bedingungen über eine BD TALON™ Metal Affinity Resin Säule (BD Biosciences Clontech II.2.3.5) nach Herstellerangaben gereinigt. In anschließenden Analysen in Form von NuPAGE® (II.2.2.1), Immunoblot (II.2.2.2) und MS/MS Analysen (Abb. 23; II.2.2.4) konnte das Zielprotein nachgewiesen werden. Ein optischer Vergleich der NuPAGE® Gele von im Periplasma und Zytoplasma akkumuliertem $\Delta E2$ Protein zeigte, dass die Proteinausbeute bei der zytoplasmatische Expression viel höher war, als bei der periplasmatischen Expression (Abb. 21). Weiter wurde das Zielprotein im Falle der zytoplasmatischen Expression nur in den Elutionsfraktionen gefunden und nicht, wie bei der periplasmatischen Expression, zusätzlich in den Waschfraktionen (Abb. 21).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die cDNA des core und $\Delta E1$ Strukturproteins in den Expressionsvektor pRSET B kloniert, *E. coli* BL 21* (De3) pLysS mit diesen transfiziert und die Expression durchgeführt. Anschließend wurden beide Proteine aufgrund ihrer postulierten höheren wahrscheinlichen Löslichkeit sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen mittels des „BD TALON™ Metal Affinity Resins“ nach Herstellerangaben gereinigt. Die erfolgreiche Produktion und Reinigung wurde im Fall des $\Delta E1$ in der denaturierten Elutionsfraktion und im Fall des core Proteins in der nativen wie auch in der denaturierten Elutionsfraktion durch NuPAGE® (II.2.2.1), Immunoblot (II.2.2.2, Abb. 22) und MS/MS Analysen (II.2.2.4) nachgewiesen (Abb. 23).

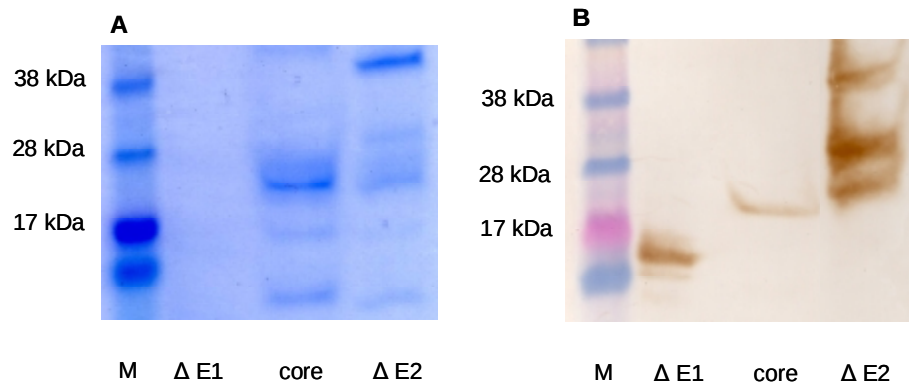


Abb. 22: NuPAGE® Gel (A) und Immunoblot (B) der im Zytoplasma akkumulierten HCV Strukturproteine nach Reinigung über eine TALON™ Matrix. Nach Standardexpression (II.2.3.3) wurden die drei Strukturproteine über eine TALON™ Matrix unter nativen und denaturierenden Bedingungen gereinigt (II.2.3.5). Hiernach erfolgte die Analyse im NuPAGE® (II.2.2.1) und im Immunoblot (II.2.2.2). Die HCV Proteine sollten im pRSET B Vektorsystem folgende Größen haben: ΔE1 19 kDa, core 22 kDa und ΔE2 38 kDa. Um die Identität der Banden sicherzustellen, wurden von ihnen MS/MS Analyse durchgeführt. Der Nachweis in B erfolgte über einen anti-His Ak und einem GAM^{HRPO}. Die Visualisierung der Bindung erfolgte über eine Substratreaktion mit „SIGMA FAST“ (Sigma). [M: „See Blue Plus Proteinstandard“ (Invitrogen); core, ΔE1 und ΔE2: HCV Strukturproteine].

In Abb. 22 wurden neben den erwarteten HCV Proteinen im NuPAGE® weitere größere und kleinere Proteine nachgewiesen. Durch eine MS/MS Analyse der zusätzlichen Proteinbanden konnte gezeigt werden, dass diese degradierte und aggregierte HCV Strukturproteine darstellten.

III.1.1 Bilanzierung der Proteinausbeute

Die Proteinbestimmung mit dem Pierce BCA™ Protein Assay Kit (II.1.2) ergab je nach Expressionsansatz in Tabelle VIII dargestellte durchschnittliche Proteinkonzentrationen pro Liter initialer Expressionskultur. Zum Vergleich sind in der Literatur angegebene Proteinausbeuten und Expressionssysteme mit entsprechenden Verweisen angegeben. Die Proteinmengen liegen im Bereich der in der Literatur beschriebenen Mengen. Aufgrund des geringen Reinheitsgrades des aus dem Periplasma gereinigten HCV Proteins konnte dieses nicht in eine Bilanzierung einfließen.

A Mascot Search Results

```
User       : M.
Email      : michael.kuepper@wzth-aachen.de
Search title : 
MS data file : D:\TEST_FMO\Data\5050214SV_304.pkl
Database    : NCBI nr 20090211 (232195) sequences: 78760532 residues
Timestamp   : 14 Feb 2005 at 14:24:45 GMT
Significant hits:
  gi1393382  The Structure Of OmpF Porin In A Tetragonal
  gi1560198  polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi14488813 Chain A, OmpF Porin Mutant Y166F
  gi126372608 R2 protein [Hepatitis C virus]
  gi133324921 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi17636244 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi15814087 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi122272646 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi1807171  R2, NS1(gp10, E1, polypeptide, core protein)
  gi17636238 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi132688231 polypeptide [Hepatitis C virus type 1b]
  gi13318345 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi1464178  polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi180333322 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi1323171  Outer membrane protein A [Outer membrane pro
  gi14972380 unnamed protein product [Hepatitis C virus]
  gi13436025 R2/NS1 protein [Hepatitis C virus]
  gi184977  glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [g
```

B Mascot Search Results

```
User       : Kuepper
Email      : kuepper@molbiotech.wzth-aachen.de
Search title : I
MS data file : D:\TEST_FMO\Data\5050214SV_304.pkl
Database    : NCBI nr 20090211 (232195) sequences: 78760532 residues
Timestamp   : 14 Feb 2005 at 14:24:45 GMT
Significant hits:
  gi1560198  polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi13344691 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi133324921 polypeptide [Hepatitis C virus type 1b]
  gi14972380 unnamed protein product [Hepatitis C virus]
  gi138566668 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi167558  trypsin (EC 3.4.21.4) precursor - pig (testa
```

C Mascot Search Results

```
User       : Michael Kuepper
Email      : kuepper@molbiotech.wzth-aachen.de
Search title : Tobiasal
MS data file : D:\TEST_FMO\Data\5048917SV_301.pkl
Database    : NCBI nr 20040908 (209429) sequences: 674368817 residues
Timestamp   : 16 Sep 2004 at 15:07:06 GMT
Significant hits:
  gi1393382  The Structure Of OmpF Porin In A Tetragonal
  gi1560198  polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi14488813 Chain A, OmpF Porin Mutant Y166F
  gi126372608 R2 protein [Hepatitis C virus]
  gi133324921 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi17636244 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi15814087 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi122272646 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi1807171  R2, NS1(gp10, E1, polypeptide, core protein)
  gi17636238 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi132688231 polypeptide [Hepatitis C virus type 1b]
  gi13318345 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi1464178  polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi180333322 polypeptide [Hepatitis C virus]
  gi1323171  Outer membrane protein A [Outer membrane pro
  gi14972380 unnamed protein product [Hepatitis C virus]
  gi13436025 R2/NS1 protein [Hepatitis C virus]
  gi184977  glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [g
```

Abb.23 Ergebnis der MS/MS Analysen für die HCV Strukturproteine. Die Proteine wurden nach der prokaryotischen Produktion und Reinigung via TALON™ Matrix mittels NuPAGE® getrennt und mit einem Skalpell als Banden aus dem Gel geschnitten. Hiernach erfolgte die MS/MS Analyse (II.2.2.4). Die Präsentation der Analyseergebnisse erfolgte wie in A, B, C dargestellt. A: core Banden, B: E1 Banden, C: E2 Banden.

Protein	Expressionssystem	Ausbeute	Autor
E2-116; E2-181	<i>E. coli</i> TG1	>1 mg/l	Liu et al. (2001)
E1.1; E2.3	<i>E. coli</i> SG & M15	0,5-1 mg/l	Hüssy et al. (1997)
E1.8; E2.10	Sf9 Insektenzellen	2 mg/l	Hüssy et al. (1997)
HCV core; HCV ΔE1; HCV ΔE2	<i>E. coli</i> BL21*pLysS	0,9-2,7 mg/l	vorliegende Arbeit

Tabelle VIII: Proteinausbeute der prokaryotisch produzierten HCV Proteine. Neben den in dieser Arbeit produzierten HCV Proteinen werden für einen bilanziellen Vergleich Literaturwerte gezeigt.

III.2 Hybridomaklone

Im Vorfeld dieser Doktorarbeit wurden erfolgreich Mäuse mit nativem E2 Strukturprotein, produziert in BL 21 (DE3) unter Verwendung des pMT Plasmids, immunisiert (II.1.6, II.1.5, III.1). Aus dieser Immunisierung resultierten nach einer Hybridomafusion

(II.2.4.1) 14 Hybridomaklone. Diese wurden von Dr. M.K. Tur übergeben und in dieser Arbeit bezüglich ihrer Spezifität zu HCV Δ E2 Protein (III.1) analysiert.

III.2.1 ELISA Analysen

Von den 14 Hybridomaklonen wurden jeweils 100 μ l Kulturüberstand in einem indirekten ELISA nach Beschichtung mit 100 ng/„Well“ Antigen Δ E2 und Absättigung mit 2 % (w/v) BSA eingesetzt. Nach Abzug des Hintergrundes konnte bei einigen Klonen eine Extinktion von bis zu 0,8 gemessen werden, was eine Produktion von Antikörpern in den Kulturüberstand und eine Bindung dieser an das Antigen nachweist (Abb. 24).

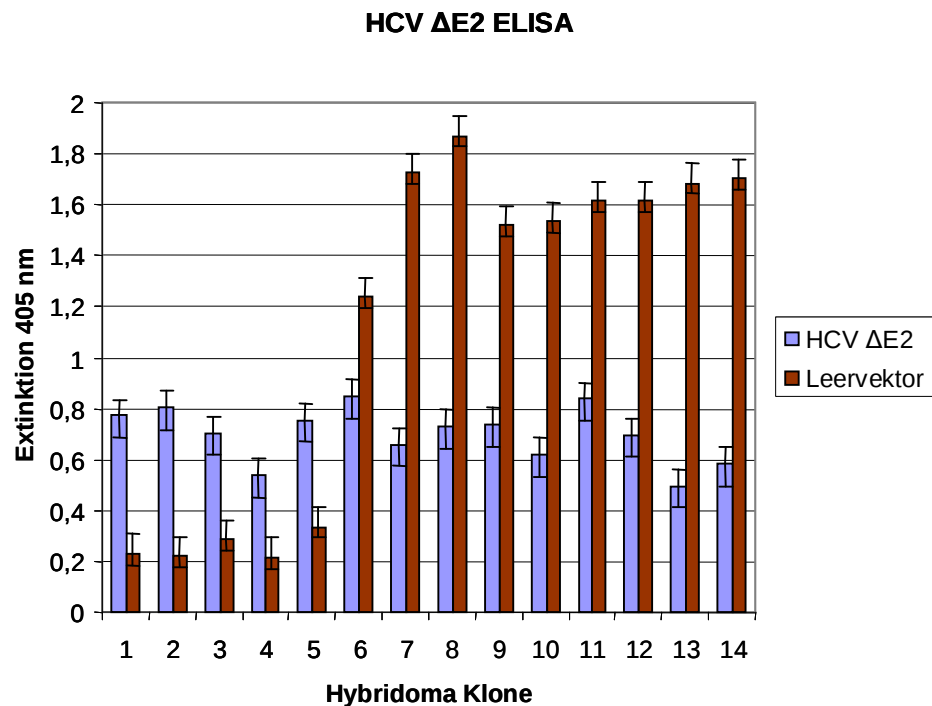


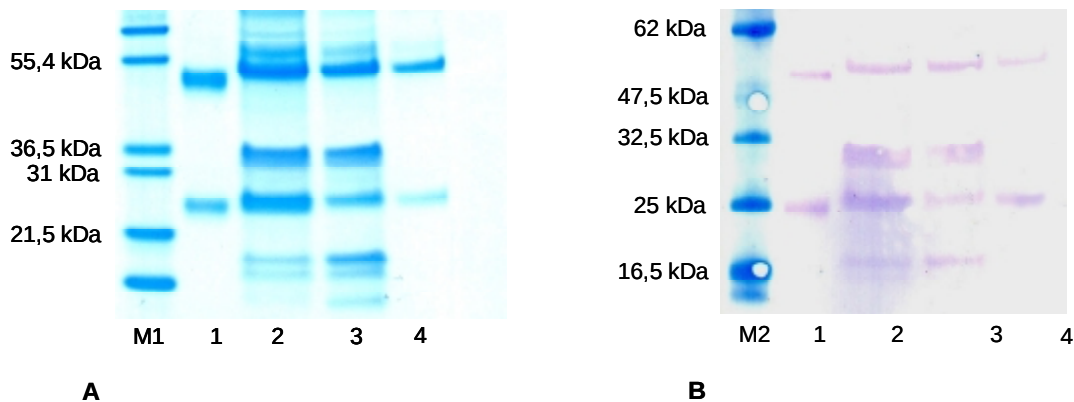
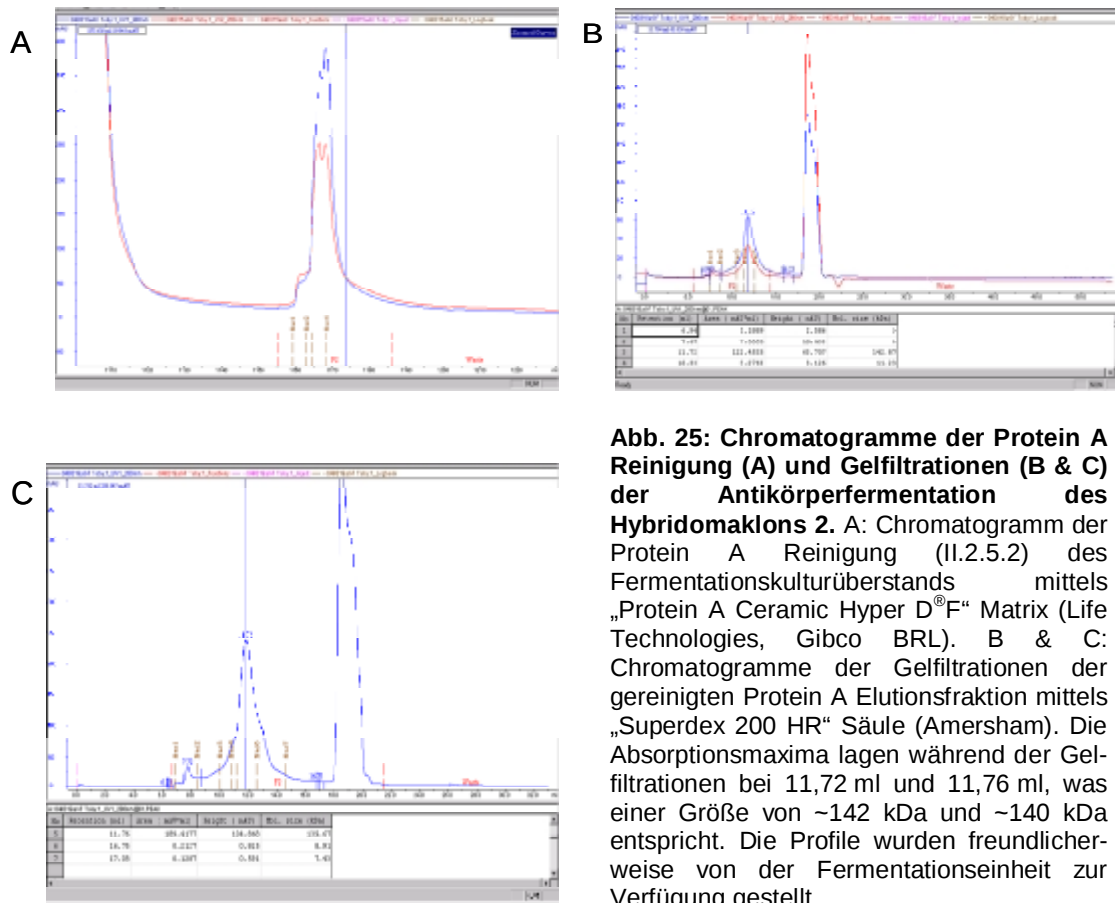
Abb. 24: ELISA Analysen der in Kulturüberständen befindlichen Antikörper. Beschichtet wurden in einem ELISA (II.2.5.1) mit 100 ng/„Well“ über eine TALON Matrix gereinigtem HCV Δ E2 Antigen (blaue Säulen) und in der Negativkontrolle mit Proteinen aus einer über NiNTA Matrix gereinigten Leervektorexpression (braune Säulen). Nach Blockieren mit 2 % (w/v) BSA wurde mit 100 μ l Hybridomakulturüberstand inkubiert. Die Bindung der Antikörper aus den Überständen wurde über einen sekundären GAM^{HRPO} und Substratumsatz von ABTS visualisiert. Die Inkubationszeiten betrugen 1 h bei 37°C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungen.

Als Negativkontrolle wurde ein zweiter indirekter ELISA durchgeführt, bei dem mit einer Elutionsfraktion beschichtet wurde, welche aus einer pMT Leervektor Expression unter Stress (II.2.3.2) und Aufreinigung über NiNTA (II.2.3.4) eluiert wurde (Abb. 24). Es zeigte sich, dass die Antikörper aus den Überständen der Klone 6-14 an ein

mitgereinigtes *E. coli*- oder Vektor-Protein binden. Diese Klone wurden bei den weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt. Die verbleibenden Hybridomaklone 1-5 wurden für weitere Analysen in flüssigem Stickstoff gelagert.

III.2.2 Bindungsanalysen mit eukaryotisch exprimiertem HCV Protein - „Immuno Cyto Chemistry“ (ICC)

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen wurden von Dr. T. Bock Bindungsanalysen mit dem im Überstand akkumulierten Antikörper des Hybridomaklons 2 durchgeführt (II.2.5.3). Hierfür wurde zunächst zur Gewinnung von genügend Antikörpern in Zusammenarbeit mit der hauseigenen Fermentationseinheit eine Kultivierung in einem 1 l Volumen durchgeführt. Die anschließende Reinigung der in den Fermentationsüberstand abgegebenen Antikörper erfolgte mittels eines „Äkta Explorer 10“ Chromatographiesystems über eine Protein A Matrix (II.2.5.2, Abb. 25). Über den Verlauf der 280 nm Absorptionskurve wurde nachgewiesen, dass der gereinigte Antikörper in den 21 ml der Elutionsfraktionen 3 und 4 vorlag (Abb. 25 A). Die anschließende Analyse per NuPAGE® und Immunoblot (Abb. 26) zeigte neben der schweren und leichten Antikörperkette noch weitere Proteine. Die Protein A Elutionsfraktionen wurden daher zusätzlich nach Konzentration mittels Nanosep® (Pall GmbH) durch eine 2 malige Gelfiltration gereinigt (Abb. 25 B & C). Durch die Analyse der Reinigung mittels Unicorn Analysis Computerprogramm (Amersham) wurde die Größe der in den verschiedenen Elutionsfraktionen befindlichen Proteine analysiert. Hierauf wurde bei der ersten Filtration die Fraktionen 3 und 4 und bei der erneuten Filtration die Fraktion 5 ausgewählt, da hier Proteine mit den Größen von ~139 und ~143 kDa eluiert wurden. Die Werte lagen einer beschriebenen Antikörpergröße von ~150 kDa als Richtwert am nächsten. Das Elutionsvolumen der am Ende durchgeführten Gelfiltration lag bei 1,45 ml. Die darin befindlichen Proteine wurden anschließend durch NuPAGE® und Immunoblot als Antikörper verifiziert (Abb. 26). Um eine Aussage über den vorliegenden Antikörperisotypen machen zu können, erfolgte eine Isotypisierung mittels „Mouse Immunoglobuline Isotyping Kit“ (BD Bioscience) und ergab für den Antikörper des Hybridoms den Isotypen IgG 2a. Die Proteinbestimmung des gereinigten Antikörpers mittels „BCA™ Assay Kit“ (Pierce) ergab eine niedrige Konzentration von 220 µg/l Fermentation.



Nach erfolgreicher Fermentation und Reinigung wurden Bindungsanalysen am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen mit HCV transfizierten HepG2 Zellen durchgeführt (Abb. 27). Hierfür wurden die Expressionskonstrukte pRV core-NS3 und pHCV-E2 in HepG2 Zellen transient transfiziert und die Zellen für die anschließende Analyse auf einem Objektträger fixiert. Die Konstrukte beinhalten die Sequenz von unterschiedlichen rekombinanten HCV Proteinen. Der Nachweis der Expression in den eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem gereinigten Antikörper des Hybridomaklons 2 (Abb. 26 A+B, Bahn 4) und wurde fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Abb. 27).

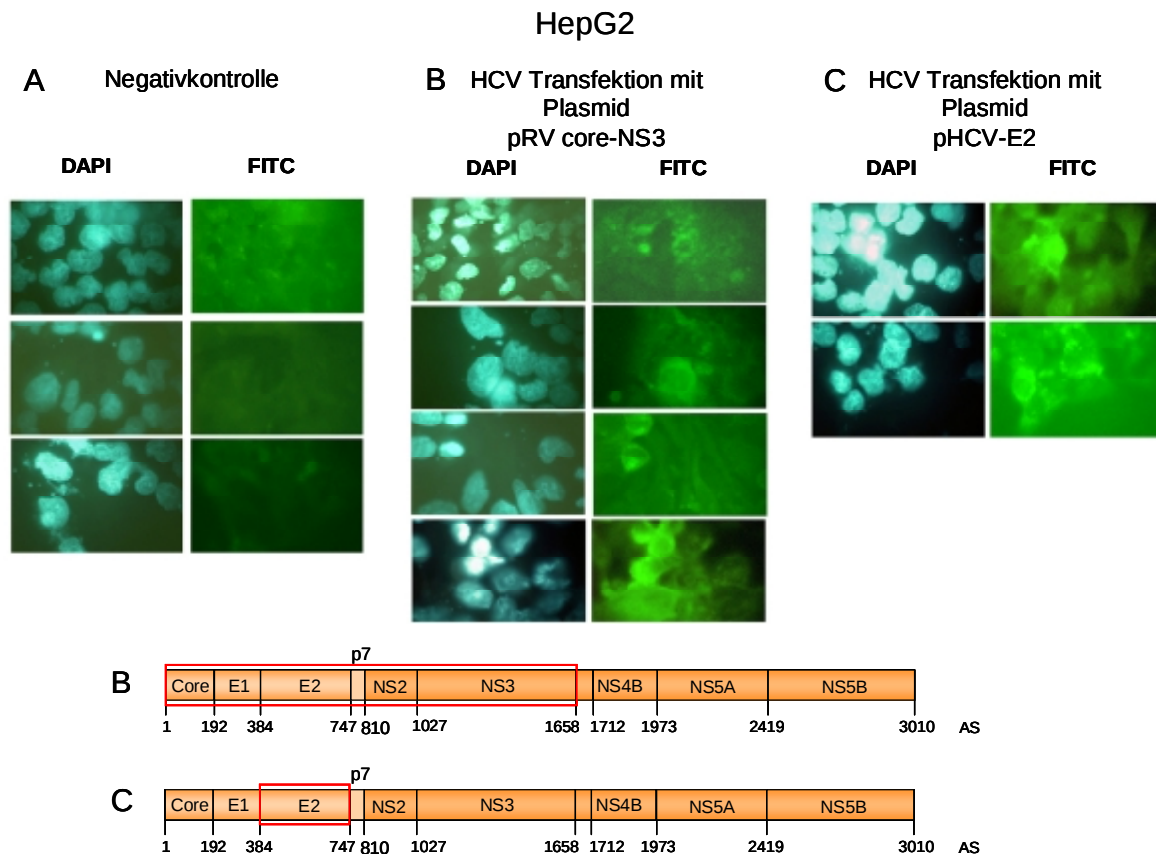


Abb. 27: Nachweis der Bindung von gereinigten Antikörpern des Hybridomaklons 2 an eukaryotisch exprimiertem HCV Antigen. Hep G2 Zellen wurden mit den eukaryotischen Expressionsvektoren pRV core-NS3 und pHCV-E2 transient transfiziert. Nach deren Expression und Synthese der entsprechenden HCV Proteine wurden diese mit dem gereinigten Antikörper (II.2.5.2) des Hybridomaklons 2 nachgewiesen. A: Negativkontrolle des Versuchs, der primäre Antikörper des Hybridoms 2 wurde durch PBS ersetzt. Die Lage der Zellen wurde mit einer 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Färbung sichtbar gemacht. B und C: Mit den Plasmiden pRV core-NS3 und pHCV-E2 transient transfizierte HepG2 Zellen. Nach Expression wurde die Bindung des Hybridomaklons 2 Antikörpers über einen Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat (FITC) gekoppelten GAM Antikörper detektiert und im Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Die roten Querbalken in den Darstellungen unter den Photos flankieren die mit den Vektoren transfizierten DNA Bereiche des HCV Genoms. Die Bilder wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Uniklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die spezifische Bindung des monoklonalen anti-E2 Hybridomaantikörpers in den transfizierten Zellen wird durch die Bindung eines FITC gekoppelten anti-Maus Antikörpers visualisiert. Die zusätzliche 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Färbung der Präparate ermöglichte die Lokalisation der Zellen. So konnte eine Bindung des Hybridomaantikörpers Klon 2 an eukaryotisch exprimiertem Antigen nachgewiesen werden.

III.2.3 Instabile Hybridomazelllinien

In ELISA Analysen (II.2.5.1) wurde bei den Hybridomaklonen 1 - 5 mit zunehmender Kultivierungszeit eine abnehmende Antikörperproduktion festgestellt. Um die Bindungseigenschaften der mit HCV Δ E2 Antigen selektierten (Abb. 24), monoklonalen Antikörper zu konservieren, wurde die spezifische DNA der variablen Antikörperdomänen aus den Hybridomaklonen isoliert und als rekombinanter scFv Antikörper gesichert (Krebber *et al.*, 1997; Dorfmueller, 2002).

III.2.3.1 Klonierung der mAk als scFv Antikörperfragmente

Für die Generierung des rekombinanten scFv Antikörpers wurde zunächst die mRNA aus den Hybridomaklonen 1-5 isoliert (II.2.4.2) und durch eine RT-PCR in cDNA umgeschrieben (II.2.6.2). Mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide (II.1.7) sollten die spezifischen DNA Fragmente für die variablen Domänen der monoklonalen Antikörper in einer PCR Reaktion amplifiziert werden. Dies gelang nur mit der cDNA der Hybridomaklone 1 und 2. Über eine „Two Step Cloning“ Strategie (Breitling *et al.*, 2001) wurden die leichte und schwere Antikörperkette der Klone 1 und 2 erfolgreich in den Phagmidvektor pHENHi inseriert (II.2.6.2, Abb. 28). Dieser Phagmidvektor wurde gewählt, da er neben einem His-Tag über einen Myc-Tag verfügt, welcher es ermöglichte, die Bindung der scFv Antikörpers an prokaryotisch produziertem HCV Δ E2 über einen anti-Myc Antikörper (I.3.1) nachzuweisen. Hierbei wurden erfolgreich die zwei rekombinanten Antikörper scFv 1, bestehend aus der V_H und V_L des Hybridoms 1 und scFv 2, bestehend aus der V_H und V_L des Hybridoms 2, generiert.

III.2.3.2 Expression der scFv 1 und scFv 2

Die Expression der scFv 1 und 2 erfolgte in einem 200 ml Ansatz bei 30°C für 3 h (II.2.6.3) nach Transformation (II.2.1.10) von Bakterien des Stammes BL21 (De3) mit der entsprechenden Phagmid-DNA. Unter diesen Bedingungen wurde die maximale Proteinausbeute nach Proteinkonzentrationsbestimmung (II.1.2) von 70 µg/100 ml

Kulturansatz erreicht. Da der pHENHi Phagmidvektor (Abb. 11) eine *pelB* Signalsequenz besitzt, akkumulierte das Protein im periplasmatischen Raum und wurde aus diesem erfolgreich isoliert. Die Reinigung erfolgte über eine TALON™ Matrix (II.2.3.5). Die löslichen scFv Antikörper wurden zur weiteren Analyse per NuPAGE® pherografiert, mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und über den N-terminalen Myc-Tag im Immunoblot detektiert (Abb. 28).

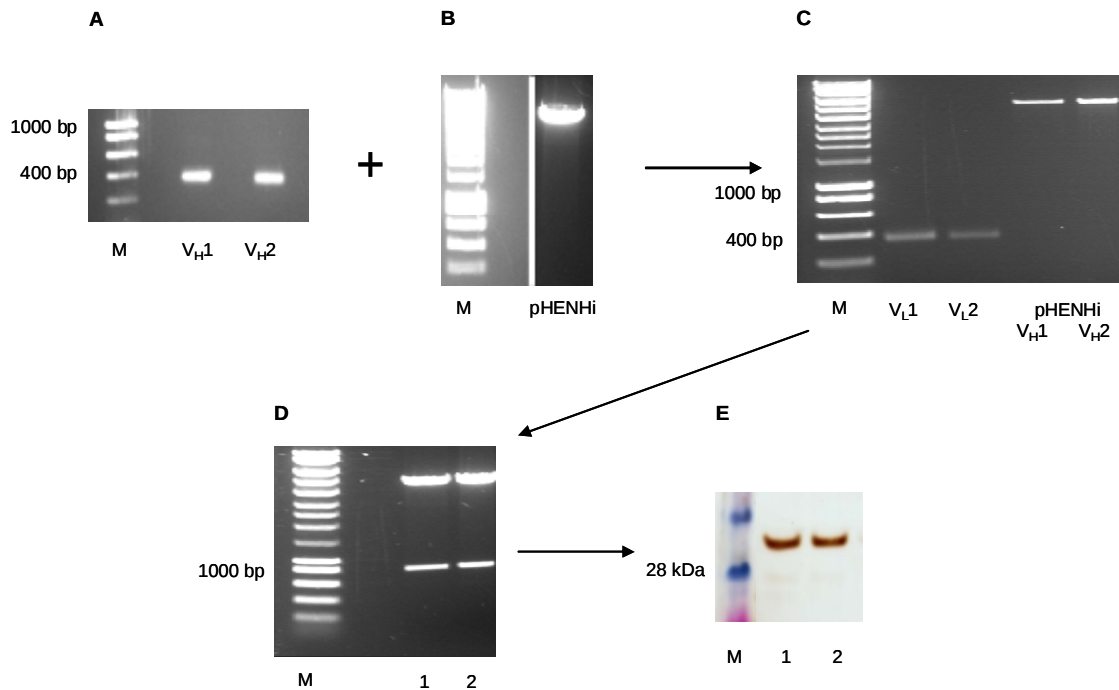


Abb. 28: Amplifikation der schweren und leichten Ak-V-Domänen aus der cDNA der Hybridomaklone 1 und 2, Klonierung in den Phagmidvektor pHENHi und Expression der rekombinanten scFv Antikörper. A: Restriktion (II.2.1.6) der PCR-Produkte der variablen Bereiche der schweren Antikörperkette V_H1 und V_H2 mit den Enzymen *NcoI* und *BstEII*. B: Der mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstEII* linearisierte Vektor pHENHi. C: Restriktion der Amplifikationen von den variablen Regionen der leichten Antikörperketten V_L1 und V_L2 mit den Enzymen *AscI* und *Sall*, sowie durch Restriktion mit *AscI* und *Sall* linearisierten Phagmidvektoren pHENHi V_H1 und V_H2 . D: Kontrollverdau (II.2.1.6) von DNA der scFv Phagmidklone 1 und 2 mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI*. Verwendet wurden 1 % (w/v) Agarosegele, als DNA Standard wurde die „Hyperladder I“ (Bioline) eingesetzt. E: Expression (II.2.6.3) der scFv Klone nach Transformation von BL21 (De3) und Detektion im Immunoblot nach Reinigung mit einer TALON™ Matrix. Die Proteine wurden nach Übertragung auf die Nitrocellulosemembran und Blockieren mit 2 % (w/v) BSA über einen anti-Myc Ak und einen GAM^{HRPO} Antikörper detektiert. Die Visualisierung erfolgte über Substratumsatz mit „SIGMA FAST“ (Sigma). Aufbau: M: „See Blue Plus“ Proteinstandard (Invitrogen).

Die gereinigten scFv Antikörper wurden erwartungsgemäß als 30 kDa Protein (1/5 eines Volllängenantikörpers) im NuPAGE® identifiziert.

Zur ersten Charakterisierung der Bindungseigenschaften der scFv Antikörper 1 und 2 wurde ein ELISA (II.2.6.5) durchgeführt. Hierbei wurde als Beschichtungsreagenz

100 ng/„Well“ des prokaryotisch produzierten, denaturierten HCV Δ E2 Protein eingesetzt. Die Auswertung der Extinktionswerte zeigte, dass der scFv 1 eine höhere Reaktivität zu dem prokaryotisch exprimierten denaturierten HCV Δ E2 aufweist als der scFv 2 (Abb. 29). Mit der Negativkontrolle wurden eventuelle Kreuzreaktionen der verwendeten Proteine ausgeschlossen.

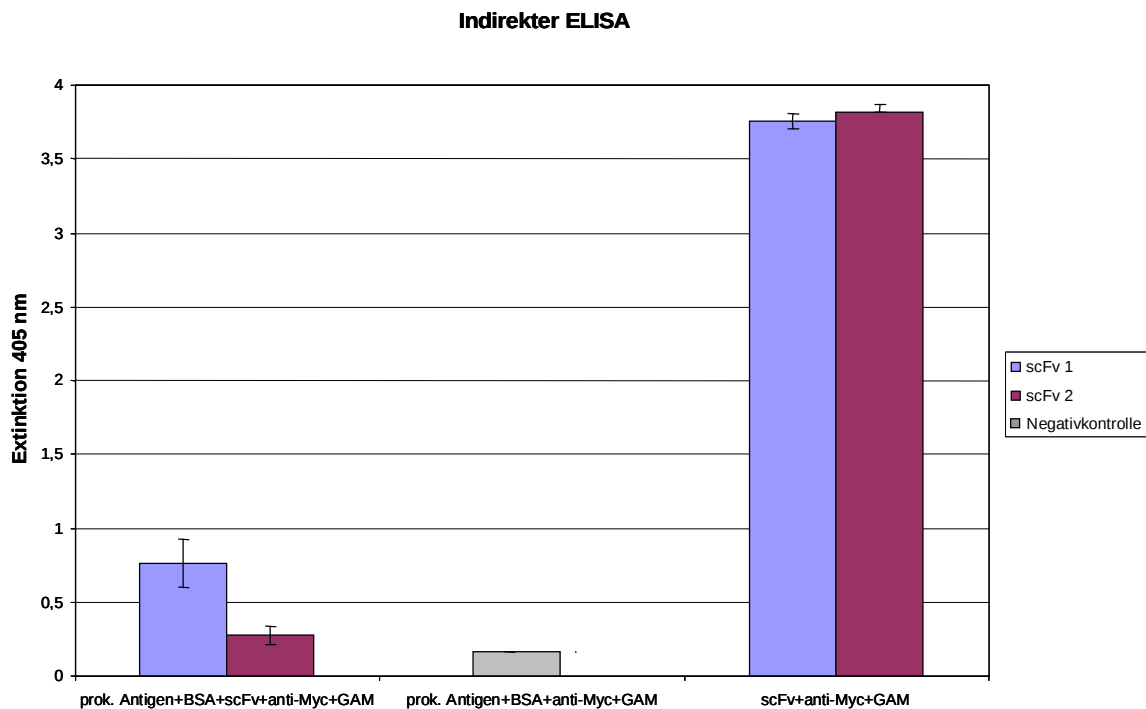


Abb. 29: Indirekter ELISA zur Charakterisierung der Bindeeigenschaften der scFv Antikörper an denaturiertem HCV Δ E2. Bei diesem ELISA wurde mit 100 ng/„Well“ HCV Δ E2 Antigen beschichtet, die Absättigung der Platte erfolgte mit 2 % (w/v) BSA. Die scFv Antikörper wurden unverdünnt eingesetzt. Von links nach rechts wird zunächst der Spezifitätsnachweis dargestellt, dann die Negativkontrolle, gefolgt vom Nachweis der scFv Antikörper. Die Inkubationen wurden alle bei 37°C für 1 h durchgeführt. Die Extinktion gibt den Substratumsatz von ABTS nach 1 h/37°C an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungen.

Die rekombinanten Antikörper der beiden ursprünglichen Hybridomklone 1 und 2, von denen sich die scFv 1 und 2 ableiten, wiesen in der ELISA Analyse eine unterschiedliche Reaktivität zum denaturierten HCV Δ E2 auf (Abb. 29). Unter Beteiligung des rekombinanten scFv Antikörpers 2, welches die Bindeeigenschaften des monoklonalen Antikörpers des Hybridoms 2 konservieren sollte, wurde wiederholt ein geringerer Substratumsatz gemessen als unter Verwendung des rekombinanten scFv 1, welcher sich von dem Hybridom 1 ableitete.

III.2.3.3 Immunoblot Analysen mit rekombinanten scFv Antikörpern

Zur weiteren Charakterisierung der Bindung der scFv an denaturiertes HCV Δ E2 Strukturprotein wurden diese als primäre Detektionsantikörper in einem Immunoblot eingesetzt (II.2.2.2). Die Detektion, des in *E. coli* produzierten Δ E2 erfolgte in vorangegangenen Analysen mittels eines anti-His Antikörpers (I.3.1, Abb. 22). Die ebenfalls in *E. coli* produzierten scFv Antikörper weisen, wie bereits in II.2.3.1 beschrieben, neben einem N-terminalen His-Tag einen zusätzlichen Myc-Tag auf.

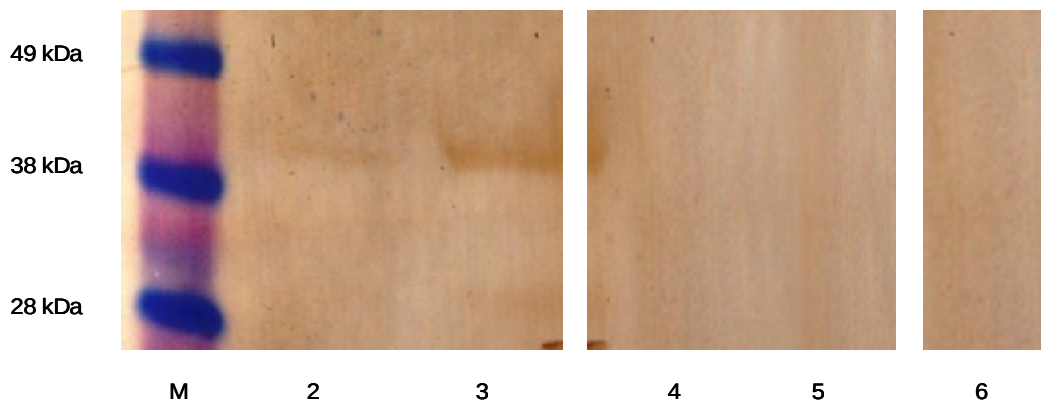


Abb. 30: Immunoblot Analysen zum Nachweis der Bindung der rekombinanten scFv Antikörper an HCV Δ E2. Nachweis des HCV Δ E2 Proteins mittels scFv 1, anti-Myc und GAM^{HRPO} Antikörper nach Transfer und Blockieren mit 2 % (w/v) BSA. Die Visualisierung erfolgte über Substratumsatz von „SIGMA FAST“. In Bahn 2 wurde versucht, das Antigen mit 1/10 verdünnten scFv 1 zu detektieren, in Bahn 3 ist der scFv 1 unverdünnt eingesetzt. Bahn 4 und 5 stellen den Versuch der Detektion des HCV Δ E2 Proteins mittels scFv 2 da, Bahn 6 ist die Negativkontrolle. Das Zielprotein ist beim Vergleich mit dem Größenstandard bei ~38 kDa in den Bahnen 2 und 3 zu erkennen. Aufbau M: Proteinstandard „See Blue Plus“ (Invitrogen); 2-5: Transfer des Proteins HCV Δ E2; 6: Negativkontrolle, Ansatz ohne einen scFv als Detektionsantikörper.

Durch den Einsatz des scFv 1 als primären Detektionsantikörper konnte das HCV Δ E2 Protein mit einer Größe von 38 kDa, über den Myc-Tag des scFv 1 Antikörpers, in der Immunoblot Analyse detektiert werden. Der Einsatz des rekombinanten scFv 2 Antikörpers bestätigte das Ergebnis der zuvor durchgeführten ELISA Analyse (Abb. 29). Auch hier kam es zu einem geringen bis gar nicht nachzuweisenden Substratumsatz. Aufgrund der schwachen Reaktivität des scFv 2 wurde dieser bei nachfolgenden Analysen nicht weiter verwendet. Eine etwaige Spezifität des scFv 1 für den His-Tag des HCV Δ E2 Proteins konnte durch eine weitere Immunoblot Analyse ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die verwendete Protein-His-Tag Fusion wurde freundlicherweise von A. Pätz zur Verfügung gestellt.

III.2.4 Sequenzanalysen des scFv 1

Die Nukleotidsequenz des scFv Antikörpers 1 wurde durch Sequenzierung analysiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Sequenzen nach Kabat, Chothia, Martin und Deret (Chothia *et al.*, 1989; Kabat *et al.*, 1990; Kabat & Wu, 1991; Chothia *et al.*, 1992; Deret *et al.*, 1995; Martin & Thornton, 1996).

	V _H FR 1	V _H CDR 1	V _H FR 2	V _H CDR 2	V _H FR 3	V _H CDR 3
1	AELVKPGASVKLSCKASGYTFT	SHWMH	HWVKQAGQGLEWIG	EFNPSNGRTNYNEIKS	KATLTVDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAS	RDYDYDGRYFDY
KA	xxxxxxxxxxxxCxxxxxxxx	-----	xWVxxxxxxxxLEWIG	-----	LATxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxCAR	-----
KB		.Y....	P.....	.I.....	F..	

	V _L FR 4	218-Linker	V _L FR 1	V _L CDR 1	V _L FR 2	V _L CDR 2	V _L FR 3
1	WGQGTITVTVSS	GSTSGSGKPGPGEGSTKG	DIVMTQSPASLSASVGETVTITC	RASENIYNLA	WYQQKQKSPQLLVY	NAKTLAE	GVPSRFSGSGGTQF
KA	WGxGxxxxxx		xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxC	-----	WYQxxxxxxxxxIY	-----	xxxxxxxxxxxxxx
KB			...Q.		S		

	V _L FR 3	V _L CDR 3	V _L FR 4	c-Myc Tag
1	PLKINSLQPEDFGSYIC	QHRYGTPFT	FGGGTKLEIK	KAVDAA AEQKLISEEDLN
KA	xxxxxxxxxxxxxxxxxC	-----	FGxGxxxxxx	
KB	S.....	..H.....		

Abb. 31: Aminosäuresequenz des scFv Fragments 1 und Vergleich mit den Schlüsselaminosäuren nach Kabat (KA) und den zugehörigen Keimbahngen (KB), (Tabelle IX).

Der Vergleich mit den Schlüsselaminosäuren nach Kabat zeigt, dass der scFv 1 die typischen Eigenschaften muriner V_H und V_L Sequenzen aufweist, alle Aminosäuren befinden sich an den erwarteten Positionen. Die Sequenz wurde daher wahrscheinlich ohne Mutationen aus den Hybridomaklonen amplifiziert und kloniert.

Im Vergleich mit den zugeordneten Keimbahngen (Tabelle IX) weist die translatierte Sequenz des scFv 1 vier Mutationen in der V_H und vier in der V_L Sequenz auf (Abb. 31).

Schwere Kette (V _H)				
Klon	Subgruppe	V-Segment	D-Segment	J-Segment
scFv 1	Ib	J 558.33	D 5-12	JH 4d
Leichte Kette (V _L)				
Klon	Klasse	Subgruppe	V-Segment	J-Segment
scFv 1	K	I	IgVK 12-44	JK 4

Tabelle IX: Einteilung des scFv Antikörpers 1 in Klasse und Subgruppe und Zuordnung der entsprechenden Keimbahngene.

Die Zugehörigkeit der variablen Regionen zu einzelnen Subgruppen und den Keimbahngen der unterschiedlichen Segmente ist Tabelle IX zu entnehmen. In der Klassifizierung der CDR Regionen zeigten die Sequenzen höchste Übereinstimmung zu

den in Tabelle X dargestellten kanonischen Klassen. Die kanonische Klassifizierung nach Chothia und Lesk (1987) beruht auf einer Zuordnung der 3D-Konformation von L- und H-Antikörperketten aufgrund charakteristischer Aminosäurereste.

Klon	L 1	L 2	L 3	H 1	H 2
scFv 1	2	1	5	1	2

Tabelle X: Zuweisung der CDR Regionen des scFv 1 Antikörpers in die kanonischen Klassen nach Chothia. Die kanonische Klasse der CDR H3 konnte nicht bestimmt werden.

III.2.5 Dreidimensionale Strukturanalyse des scFv 1

Um die dreidimensionale Struktur des generierten scFv Antikörpers zu ermitteln, wurde die Aminosäuresequenz (III.2.4) des scFv 1 nach Whitelegg & Rees (2000) analysiert und berechnet (II.2.6.6, Abb. 32). Der 218-Linker ist in der Abb. 32 nicht dargestellt, die CDR L1 und CDR L3 flankieren die CDR 3 auf der einen Seite, während die CDR H2 von den CDR H1 und H3 auf der anderen Seite flankiert werden. Bei dieser Darstellung handelt es sich um eine theoretische Auswertung, die als eine erste strukturelle Analyse zu bewerten ist.

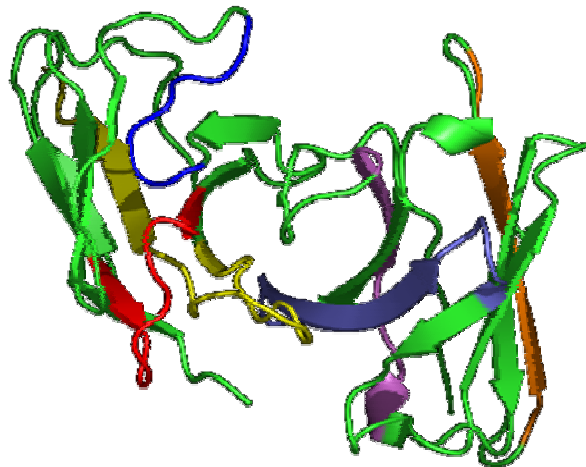


Abb. 32: Dreidimensionale Darstellung des scFv 1. Die Struktur wurde nach Whitelegg & Rees (2000) berechnet und mit dem Programm PyMol™ Version 0.97 visualisiert. Die CDR Abschnitte sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet: rot (L1), blau (L2), gelb (L3), orange (H1), hellblau (H2), violett (H3). Der verbindende 218-Linker fehlt in der Darstellung.

III.3 Generierung HCV spezifischer monoklonaler Antikörper

III.3.1 Immunisierung

Ausgangsmaterial für Immunisierungen war denaturiertes HCV Strukturprotein $\Delta E2$, welches in 5,4 M Guanidin HCl vorlag (III.1). Da die hohe Salzkonzentration in diesem denaturierenden Elutionspuffer keine Immunisierung von Mäusen zuließ, wurde das $\Delta E2$ Protein durch eine Dialyse in PBS umgepuffert (II.2.3.5). Das schrittweise Herabsetzen der Salzkonzentration führte zur Aggregation des Proteins. Um dieser entgegen zu wirken, wurde der Suspension 2 M Ectoin zugesetzt, wodurch das Antigen löslich blieb. Bei den durchgeführten Immunisierungen wurden 2 BALB/c Mäuse im Alter von 16 Wochen (II.1.4) mit dem umgepufferten HCV $\Delta E2$ Strukturprotein immunisiert (II.2.4.1). Die Bestimmung der generierten Antikörperantwort (Titer) erfolgte mittels ELISA (II.2.5.1; Abb. 33), bei dem 100 ng Antigen immobilisiert wurden.

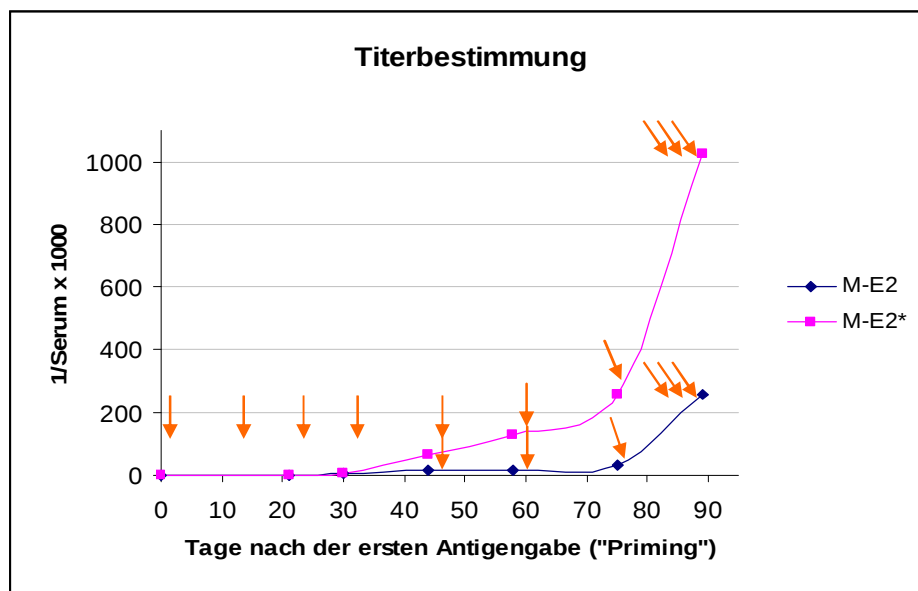


Abb. 33: Titerbestimmung nach Immunisierung mit prokaryotisch produziertem $\Delta E2$ Protein. Vor den Antigengaben (II.2.4.1, orange Pfeile) wurde zur Kontrolle der Antikörperantwort Blut aus der Schwanzvene der Mäuse M-E2* und M-E2 entnommen und dieses in einem indirekten ELISA analysiert (II.2.5.1). War der Titer entsprechend hoch, (für M-E2* 1/1024000, für M-E2 1/256000) wurden die Tiere getötet und die in der Milz vorkommenden B-Zellen für die Hybridomafusion verwendet (II.2.5).

Nach Ermitteln eines entsprechend hohen Titers polyklonaler Antikörper im Mäuseblut von 1/1024000 (Maus M-E2*, 7. Antigengabe) und 1/254000 (Maus M-E2, 9. Antigengabe), bei einem Ausschluss von 0,1 nach Abzug des Hintergrunds und Substratumsatz nach 1 h/37°C, wurden die Mäuse nach drei weiteren Immunisierungen

geopfert, deren B-Zellen aus der Milz präpariert und für die Hybridomafusion verwendet (II.2.5).

III.3.2 Generierung monoklonaler Antikörper

Mit Hilfe der Hybridomatechnologie wurden unter der Mitarbeit von Dr. T. Klockenbrink und N. Redding vier monoklonale Antikörper (mAk) aus zwei Hybridomafusionen durch die „Limiting Dilution“ Klonierung identifiziert und separiert. Aus der Fusion von M-E2 B-Zellen konnten drei monoklonale Antikörper (MK D6, MK E5, MK G8) und aus der Fusion von M-E2* B-Zellen ein monoklonaler Antikörper (MK 4A71) generiert werden. Die Verifizierung der Antikörper, welche von den Hybridomaklonen produziert wurden, erfolgte mittels einer Immunoblot Analyse (III.3.3).

III.3.3 Charakterisierung der mAk mittels Immunoblot und Isotypenbestimmung

Zur weiteren Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen das prokaryotisch produzierte HCV Δ E2 wurde eine Immunoblot Analyse (II.2.2.2, Abb. 34) durchgeführt. Hierfür wurde das denaturierte Antigen mittels NuPAGE[®] getrennt (II.2.2.1) und im Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (II.2.2.2). Der anschließende Immunoblot erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern aus den Kulturüberständen. Das denaturierte HCV Δ E2 wurde gewöhnlich mittels eines anti-His Antikörpers (II.1.3) nachgewiesen (E, schwarzer Pfeil). Diese Banden wurden ebenfalls bei der Detektion mit dem Überstand des Hybridomaklons MK 4A71 aus der Fusion von M-E2* B-Zellen (A, schwarzer Pfeil, Abb. 34) detektiert. Die Blots, bei denen die Überstände der Hybridomaklone MK E5, MK G8, MK D6 aus der Fusion von M-E2 B-Zellen (III.3.2) verwendet wurden, zeigen neben den erwarteten Proteinbanden um 38 kDa (schwarze Pfeile) noch weitere Banden unterhalb von 14 kDa (roter Pfeil). Eine Reaktivität der Hybridoma-Antikörper gegen den His-Tag des HCV Δ E2 wurde durch eine zusätzliche Immunoblot Analyse ausgeschlossen (III.2.3.3). Zu diesem Zeitpunkt kann den bisherigen Ergebnissen nach nur der Klon MK 4A71 als ausschließlich HCV Δ E2 spezifisch angesehen werden. Die Isotypenbestimmung mittels „BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit“ ergab die in Tabelle XI dargestellten Isotypen.

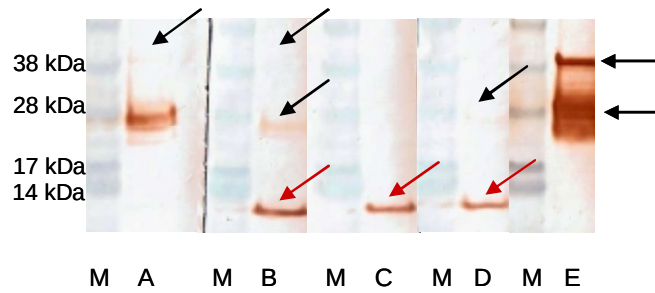


Abb. 34: Immunoblot zur Bindungsanalyse der monoklonalen Hybridomaantikörper an denaturiertem HCV ΔE2. In dem Immunoblot wurde das über TALON™ gereinigte HCV ΔE2 (II.2.3.5) nach Auftrennung in einer NuPAGE® auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Blockierung der Membran erfolgte mit 2 % (w/v) BSA für 2 h bei 37°C. Nach Inkubation mit den Hybridomaüberständen für 1 h/Rt erfolgte die Detektion der Bindung mittels GAM^{HRPO} für 1 h/Rt und die Visualisierung mittels „SIGMA FAST“ (Sigma). Folgende Überstände wurden getestet: A: MK 4A71, B: MK E5, C: MK G8, D: MK D6. E: positiv Kontrolle, anti-His 1/1000 verdünnt, M = Marker „See Blue Plus“ (Invitrogen).

Hybridomaklon	Isotyp	Klasse der leichten Kette
MK 4A71	IgG 2a	K
MK D6	IgG 1	K
MK E5	IgG 1	K
MK G8	IgG 1	K

Tabelle XI: Darstellung der Isotypenbestimmung mittels Hybridomatechnologie generierter monoklonaler Antikörper.

III.4 Humane scFv Antikörper

III.4.1 „Biopanning“ der humanen scFv Bibliothek

Mit den prokaryotisch produzierten (III.1) und den synthetisierten HCV Strukturproteinen (II.2.3.6) wurde im Rahmen einer Kollaboration mit der Universitätsklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einer aus 5 Patienten gewonnenen humanen scFv „Phage Display“ Bibliothek ein „Biopanning“ (II.2.7.2) durchgeführt. Ziel war eine Anreicherung der an die HCV Strukturproteine bindenden, von Phagen präsentierten scFv Antikörper. Die Vergrößerung des Antikörperpools erfolgte durch Klonierung der

einzelnen scFv Fragmente in das Vektorsystem pAK 100 (Abb. 12). Auf diese Weise kam es u.a. zu Neukombinationen der schweren und leichten Antikörperketten, die so im menschlichen Organismus nicht vorliegen. Die hierfür verwendeten Patienten Bibliotheken hatten eine Größe von 1×10^9 .

In drei „Panning“ Runden wurden Helferphagen mit einer Endkonzentration von 1×10^{10} /ml „Plaque Forming Units“ (pfu) eingesetzt und bindende Phagen selektiert, angereichert und durch Titration ausgezählt (Tabelle XII, II.2.7). Ziel dieses Versuches war es, möglichst viele diverse rAks zu identifizieren. Mit den selektierten Phagen wurden nach der dritten Selektionsrunde erfolgreich *E. coli* XL1blue MRF⁻ Bakterien infiziert, als Stammkulturen gelagert und auf einer LB- Platte ausgestrichen (II.2.7.2). Pro Antigen wurden von diesen Platten stichprobenartig 24 Klone gepickt und in einer Kolonien-PCR (II.2.1.2) auf Vollständigkeit und Qualität überprüft (Abb. 35).

erstes „Panning“		drittes „Panning“	
Antigen	Klone	Antigen	Klone
synthetisches core	$1,2 \times 10^3$	synthetisches core	$1,8 \times 10^7$
prokaryotisches core	2×10^3	prokaryotisches core	8×10^6
synthetisches Δ E1	4×10^4	synthetisches Δ E1	$1,5 \times 10^7$
prokaryotisches HCV-E1	$1,2 \times 10^4$	prokaryotisches HCV-E1	$1,7 \times 10^7$
synthetisches Δ E2	8×10^3	synthetisches Δ E2	3×10^6
prokaryotisches HCV-E2	8×10^3	prokaryotisches HCV-E2	3×10^6

Tabelle XII: Anreicherung der selektierten scFv Phagen nach den Selektionsrunden 1 und 3.

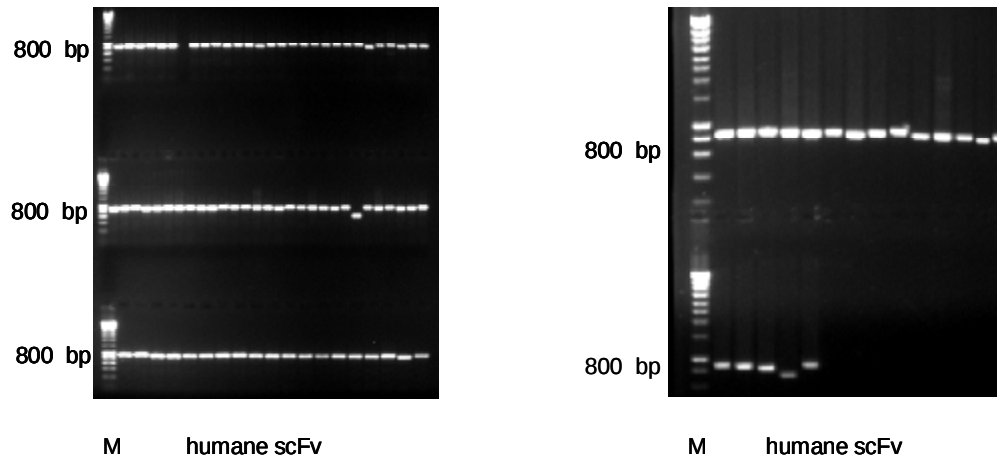


Abb. 35: Kolonien-PCR (II.2.1.2) von 24 Klonen pro Antigen, aufgetragen auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel (II.2.1.3). Mit der Kolonien-PCR Technik wurde überprüft, ob die selektierten scFv nach den drei „Panning“ Runden des „Phage Displays“ die richtige Größe um 800 bp (~400 bp jeweils für V_H und V_L) hatten. Insgesamt drei der analysierten Klone waren kleiner und wurden nicht weiter verwendet. Die geringen Größenunterschiede innerhalb der dargestellten DNA Fragmente können durch die Längenpolymorphismen der entsprechenden CDR 3 Regionen zustande kommen. Aufbau: M-DNA Standard „Hyperladder I“ (Bioline), humane scFv Antikörper.

III.4.2 Prokaryotisch produziertes Antigen

Zur besseren Übersicht sind alle rekombinanten scFv, die mittels prokaryotisch exprimiertem Antigen selektiert wurden mit einer Nummer versehen. Diese Nummern stehen hinter den Zahlen 2- für das core Antigen, 4- für das $\Delta E1$ Antigen und 6- für das $\Delta E2$ Antigen.

III.4.2.1 Produktion im Mikrotiterplattenmaßstab

Mit den auf unterschiedlichen Antigenen selektierten Phagen scFv (III.4.1) wurden verschiedene weiterführende Analysen durchgeführt. 60 Bakterienklone pro Antigen wurden willkürlich von der LB-Agar Platte (III.4.1) entnommen und, wie in II.2.7.5 beschrieben, in 96 „Well“ Platten kultiviert. Die Anzahl der Klone wurde mit 60 bestimmt, da die Praxis im Vorfeld gezeigt hatte, dass in den „Wells“ am Rand einer 96er Mikrotiterplatten vermehrt falsch positive Signale generiert wurden. Der anschließende ELISA (II.2.6.5) gab Auskunft über die Bindung, der nach Expression und Produktion im Überstand akkumulierten scFv Antikörper an 100 ng beschichtetem prokaryotischem Antigen (Tabelle XIII A). Als Expressionskontrolle wurde mit dem Kulturüberstand in einem zweiten ELISA beschichtet, die Detektion der scFv erfolgte nach Absättigung mit 2 % (w/v) BSA durch einen anti-Myc und GAM^{HRPO} Antikörper. Durch die wiederholte Bindungsanalyse wurden die in Tabelle XIII prozentual dargestellten bindenden humanen scFv identifiziert. Hierbei konnten keine rekombinanten scFv Antikörper

nachgewiesen werden, die an prokaryotisch produziertem $\Delta E1$ Protein binden. Die an die Antigene core und $\Delta E2$ bindenden Antikörper wurden sequenziert und anschließend auf ihre strukturelle Integrität (Vergleich mit der „Sequences of Immunological Interest“ nach Kabat) überprüft (III.4.3.4).

A			B			
Analyse	eingesetztes Antigen 100 ng/well	bindende scFv in %	Analyse	eingesetztes Antigen 100 ng/well	bindende Phagen in %	bindende scFv in %
Platten- expression	prok. prod. core (2-)	6,6	monoklonaler Phagen- ELISA	synth. prod. core (1-)	6,6	6,6
	prok. prod. $\Delta E1$ (4-)	-		synth. prod. E1 (3-)	8,3	8,3
	prok. prod. $\Delta E2$ (6-)	1,6		synth. prod. E2 (5-)	16	-

Tabelle XIII: Prozentuale Auswertung der mittels „Phage Display“ auf den unterschiedlichen Antigenen selektierten Phagen. Es wurden nur die Phagen-scFv Fusionen bzw. prokaryotisch produzierte scFv als reaktiv bezeichnet, die den Mittelwert der Extinktion aller getesteten Klone um das 1,5 fache überschritten. Im Falle der „Plattenexpression“ wurden im Plattenformat Bakterienklone kultiviert und die nach Expression im Überstand akkumulierten humanen scFv Antikörper auf Bindung an das jeweilige Antigen getestet. Bei dem monoklonalen Phagen-ELISA wurde zunächst in einem Plattenformat die Bindung der Phagen-scFv Fusionen an das jeweilige Antigen überprüft. Anschließend wurden die positiv getesteten Klone wie bei der Plattenexpression kultiviert und deren im Überstand akkumulierten scFv Antikörper bezüglich ihrer Bindung an das synthetische Antigen getestet. Abkürzungen: prok. = prokaryotisch, prod. = produziert, synth. = synthetisch.

III.4.3 Synthetisches Antigen

Auch hier sind der Übersicht wegen die mittels synthetischem Antigen selektierten, rekombinanten Antikörper durchnummeriert. Die Zahlen vor den Nummerierungen stehen für die synthetischen Antigene core (1-), E1 (3-) und E2 (5-).

III.4.3.1 Monoklonaler Phagen ELISA

Die Bakterienklone, die aus dem „Biopanning“ mit synthetisch produzierten HCV-Peptiden resultierten (III.4.1), wurden über einen monoklonalen Phagen ELISA (II.2.7.4) verifiziert. Diese Analyse erlaubte es zunächst, die bindenden, mit Phagen verbundenen rekombinanten Antikörper zu identifizieren. Kam es bei der löslichen Expression zu Problemen bezüglich Produktion und anschließender Akkumulation der scFv Antikörper, konnte in diesem zweiten Versuchsabschnitt eine Versuchsoptimierung durchgeführt werden. Mit Hilfe des monoklonalen Phagen ELISAs wurden

die, in Tabelle XIII B prozentual dargestellten reaktiven Phagen identifiziert. Als Negativkontrolle wurde PBS anstelle von Phagen in drei Ansätzen pro synthetischem Antigen eingesetzt. Die positiv getesteten Klone wurden weiterführenden Analysen im Immunoblot (III.4.3.2), löslicher Expression (III.4.3.3) und einem Vergleich mit den „Sequences of Immunological Interest“ nach Kabat unterzogen (III.4.3.4).

III.4.3.2 Immunoblot Analyse der positiv getesteten humanen scFv Antikörper

Die positiv getesteten humanen scFv wurden löslich in *E. coli* XL1blue MRF' in einem 50 ml Kulturansatz entsprechend dem Plattenexpressionsprotokoll produziert (II.2.7.5). Bei den anschließenden Immunoblot Analysen wurde der jeweilige Kulturüberstand mittels NuPAGE® aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die scFv über ihren Myc-Tag detektiert. Der Immunoblot erbrachte bei den mittels synthetischem HCV-E2 selektierten scFv kein Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren blieb auch jeweils ein Nachweis eines mittels synthetischem HCV-core (Klon 1-22) und HCV-E1 (Klon 3-58) selektierten scFv aus (Abb. 36).

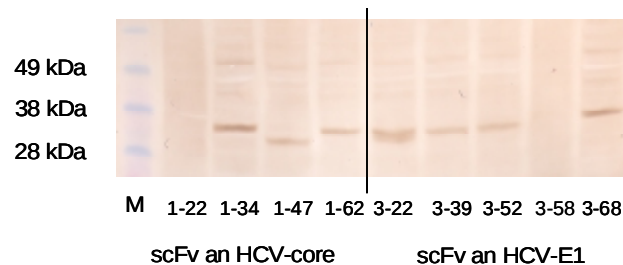


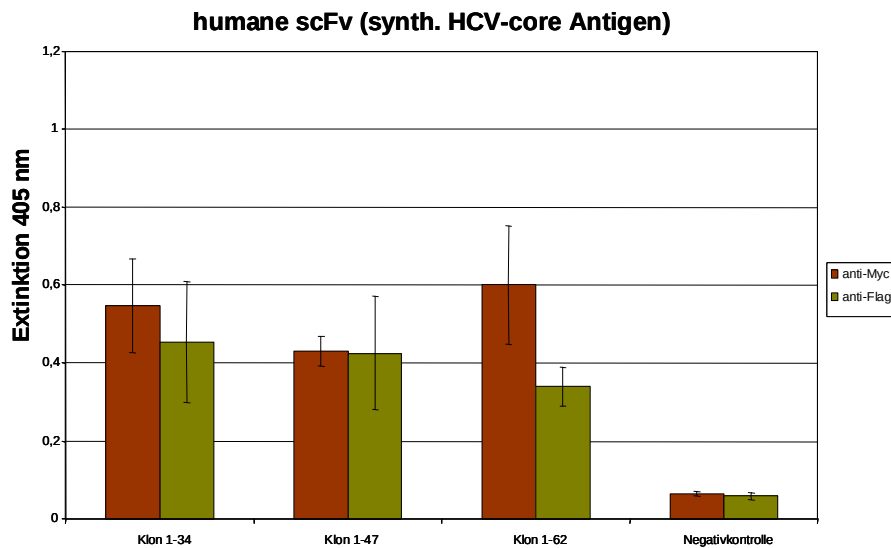
Abb. 36: Immunoblot Analyse (II.2.2.2) der im Überstand akkumulierten humanen scFv Antikörper. Bei der prokaryotischen Produktion (II.2.7.5) der humanen scFv Antikörper, die im monoklonalen Phagen ELISA an das HCV-core Peptid bzw. das HCV-E1 Peptid banden, konnte die Expression jeweils eines scFv Antikörpers nicht nachgewiesen werden (1-22, 3-58). Die aufgetrennten scFv Proteine aus dem Kulturüberstand wurden über einen anti-Myc Ak und einen GAM^{HRPO} mit anschließendem Substratsatz von „SIGMA FAST“ (Sigma) nachgewiesen. M: „See Blue Plus Proteinstandard“ (Invitrogen); scFv an HCV-core, scFv an HCV-E1: die jeweils im monoklonalen ELISA bindenden scFv Antikörper der Phagenklone.

Die Immunoblot Analyse zeigt die für einen scFv zu erwartenden Banden bei 30 kDa. Zusätzlich sind allerdings noch weitere Banden oberhalb der 49 kDa Markerbande zu identifizieren. Diese sind wahrscheinlich auf ein scFv Dimer zurückzuführen, während die 30 kDa Bande das scFv Monomer repräsentiert.

III.4.3.3 ELISA Analysen mit humanen scFv Antikörper

Nach dem erfolgten Nachweis der Expression und Produktion von humanen scFv in *E. coli* wurden die Überstände der Bakterienkulturen (III.4.3.2) in einem indirekten ELISA Ansatz auf Bindung an das synthetische HCV-core bzw. HCV-E1 Antigen eingesetzt (II.2.6.5, Abb. 37). Während der Analyse wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, da die produzierten scFv Antikörper im pAK 100 Phagmidvektor (Abb. 12) einen Myc-Tag und einen, mit den scFv Fragmenten ligierten Flag-Tag besitzen. Mit beiden Nachweisantikörpern konnte erfolgreich die Bindung der humanen scFv Antikörper an synthetischem HCV-core und HCV-E1 nachgewiesen werden.

A



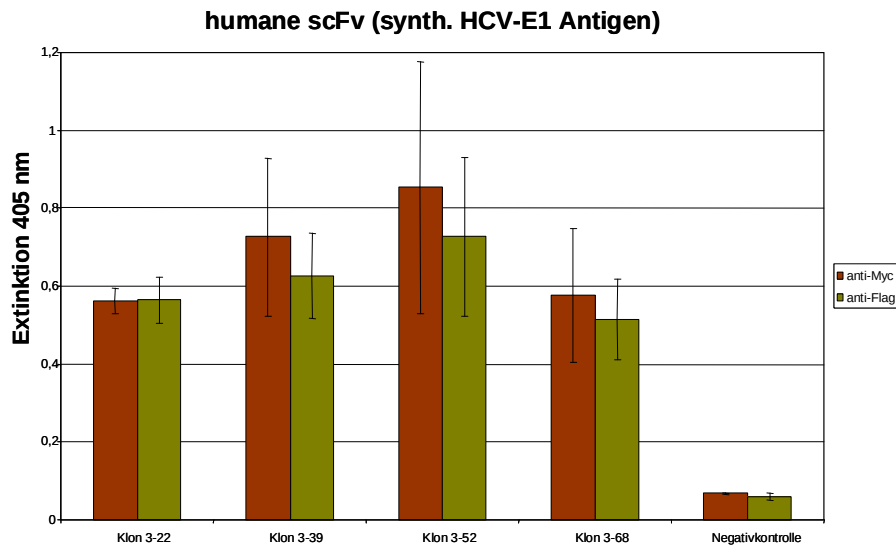
B

Abb. 37: ELISA Analysen der an die synthetischen Peptide HCV-core (A) bzw. HCV-E1 (B) bindenden prokaryotisch produzierten humanen scFv Antikörper. Nach Expression und Akkumulation der scFv in den Kulturüberstand wurde diese in einem indirekten ELISA (II.2.6.5) eingesetzt. Der Nachweis der bindenden scFv Antikörper erfolgte nach Beschichtung mit dem entsprechenden Antigen ü.N. bei 8°C, Blockieren mit 2 % (w/v) BSA für 2 h bei 37°C und Inkubation mit den Kulturüberständen für 2 h bei 37°C. Im nachfolgenden Schritt wurde mit zwei primären Antikörpern, einem anti-Myc und einen anti-Flag Antikörper 1 h bei 37°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein GAM^{HRPO} für 2 h bei 37°C eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte über den Substratumsatz von ABTS. Die Negativkontrolle setzte sich aus dem gleichen ELISA Aufbau ohne die eingesetzten scFv zusammen. Die Inkubationszeit für den Substratumsatz war 1 h bei 37°C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungen.

III.4.3.4 Sequenzierung und Charakterisierung der positiv getesteten scFv Antikörper nach Kabat

Nach Sequenzierung der humanen scFv (II.2.1.12) und Übersetzung in die Aminosäuresequenz wurden diese mit denen bekannter humaner schweren und leichten Ketten verglichen und analysiert (Chothia *et al.*, 1989; Kabat *et al.*, 1990; Kabat & Wu, 1991; Chothia *et al.*, 1992; Tomlinson *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1996) (www.bioinf.org.uk und <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/>). Die typisch humanen V_H und V_L Merkmale konnten in allen erhaltenen scFv Sequenzen identifiziert werden. Im Falle der zehn Klone deren scFv eine Spezifität zu dem synthetischem HCV-E2 zeigten und die nicht zur Expression gebracht werden konnten (III.4.3.2), zeigte die Sequenzierung, dass die zehn Klone sich nur auf zwei verschiedene Sequenzen aufteilten, (Abb. 41), hier also nur zwei Klone unterschiedlicher Identität vorlagen.

	FLAG	V _L FR 1	V _L CDR 1	V _L FR 2	V _L CDR 2	V _L FR 3	V _L CDR 3	V _L FR 4
134	AQPAMADYKD	NFMLTQ-PHSVESPGKTVTISC	TASGGRIATNYVQ	WYQQRPGSAPATVIY	EDYQRPS	GVSSRFSGSVDSSSNSASLTISGLKNEDEADYYC	QSYDDNTNSWV	FGGGTKV
162	AQPAMADYKD	NFMLTQ-PHSVESPGKTVTISC	TRSSSGSIGSNYVQ	WYQQRPGSAPTTVIS	EDNQRP	GVPARFSGSIDISSNSASLTISGLKPEDEADYYC	QSYDRNTH-WV	FGGGTKL
147	AQPAMADYKD	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQG--ISSFLA	WYQKPGQAPRLITY	DASIRAT	GIPARFSGS--GSGTDFLTITISLEPEDFAVYYC	QQ-----RA	FGGGTKV
	(Gly ₄ Ser) ₄ -Linker							
		V _H FR 1	V _H CDR 1	V _H FR 2	V _H CDR 2	V _H FR 3		
134	TVLG	-----GGGGSGGGGS	EVQLVESGAETKPGESLKISCKTSGYSF--T	NYMIS	WVRQVPGKLEWMG	RIDPRS--SSTNYSPSFQG	HVAFSAVKSITTAFLQMSRLKVSDDTA	
162	TVLG	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVISSS	NYWYG	WIRQPPGRGLEWIG	TF-YHS--GNTYYPNLSKS	RVTISGDTSKNQFPLKRSVTAADTA	
147	DIKR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCVSGFAF--I	NAWMN	WVRQTPGKLEWVA	RIKSKNDGGAADYAAPVKG	RFTISRDDSRTTLYLHMNSLRADSA	
		V _H CDR 3	V _H FR 4					
134	IYYCAR	QANYDDGAGYPSDY	WGQGLTVTVSSASGA					
162	VYYCAR	R-DGDYLAGW-FDP	WGQGLTVTVSSASGA					
147	LYYCTS	DLPGIGPQTT-HDL	WGPGTLTVTVSSASGA					

Abb. 38: Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit synthetischem core Protein selektiert wurden.

	FLAG	V _L FR 1	V _L CDR 1	V _L FR 2	V _L CDR 2	V _L FR 3	V _L CDR 3	V _L FR 4
241	AMADYKD	VMTQSPDLSAVSLGERATINC	KSGQSLLYSPRNKNYLA	WYQKPGQPPNLIY	WASTREA	GVPDRFTGSGSGTNFTLISSLQAEDVAVYYC	QQYLGTG--LT	FGPGT
247	AMADYKD	QSALTQLASVSGSPQSITISC	TGTSNDVGG---NNFVS	WYQHPGKAPKLIY	DVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAKDEADYYC	NSYTSTTTRVA	FGGGT
245	-----	IVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQGI-----SSFLA	WYQKPGQAPRLITY	DASIRAT	GIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYC	QQ-----RA	FGGGT
	(Gly ₄ Ser) ₄ -Linker							
		V _H FR 1	V _H CDR 1	V _H FR 2	V _H CDR 2	V _H FR 3		
241	KVEIKR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQESGPRVLKPSSETLSLTCTVSGGSTS	GQ--YW-N	WLRQSPGKLEWIG	NIYYRGN---TIYNPSLKS	RVTLSVDTPRNQVFLKLTSTVTA	
247	KLTVL-	-----GGGGSGGGGS	QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS	SNSGAW-N	WVRQSPSRGLEWLG	RTYHRSK-WYTDYIKSVKS	RISITTDTSKNQFSLQLPSVTTD	
245	KVDIKR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCVSGFAFI	N---AWMN	WVRQTPGKLEWVA	RIKSKNDGGAADYAAPVKG	RFTISRDDSRTTLYLHMNSLRAE	
		V _H CDR 3	V _H FR 4					
241	DTAVYFCAR	SPPYSGSHREPDI	WGQGLTVTVSSASGA					
247	DTAVYFCAR	-----G-YGNGLDV	WGQGLTVTVSSASGA					
245	DSALYYCTS	DLPGIG-PQTTTDL	WGPGTLTVTVSSASG-					

Abb. 39: Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit prokaryotisch produziertem, nativem HCV core Protein selektiert wurden.

	FLAG	V _L FR 1	V _L CDR 1	V _L FR 2	V _L CDR 2	V _L FR 3	V _L CDR 3
322	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSSVSASVGDRTVITC	-RATQGI-SKWLIA	WYQKPGKAPKVLII	DTSTLQS	GVPSRFSGS--ESGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQANFFPRGPFT
352	AQPAMADYKD	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	-RASQTI-SNYLN	WYQKPGKAPKLLII	AASGLQS	GVPSRFSGS--GSGTDFLTITISLQPEDSATYYC	QQS---YSSIS
339	AQPAMADYKD	NFMLTQ-PHSVESPGKTVTISC	TRSSGSVASQYVQ	WFQQRPGSSPTTVIY	EDDQRP	GVPGRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEAHYYC	QSYG---RSGWV
368	AQPAMADYKD	E-----	-QGDSLRSYYAA	WYQKPGQAPVLVIF	GENNRPS	GIPDRFSGS--KSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDS--NGVRV
		V _H FR 4	(Gly ₄ Ser) ₄ -Linker	V _H FR 1	V _H CDR 1	V _H FR 2	V _H CDR 2
322	LEIKR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS	--SYWYS	WIRQPPGKLEWIG	-YIYYGGS--TNYNPSLKS	RVTILVDKSKNQFSLKLSVTAADT
352	VDIR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	EVQLVESGSELKPGASVKVCKASGYTLA	--RHAIN	WVRQAPGGLEWMG	GIIPVVGAA--ANYAQKFQ	RVTITADESTKTAYMQLSTRSEDT
339	VTVLG	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVNLREFGPVLVKPTETLTCTVSGFSL	NGRMGVS	WIRQPPGKALEWLA	-HIFSNDR--KSYSTSLKS	RLTISKDTSKSQVVLTLNMDPVD
368	LTVLG	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS	SNSGAWN	WVRQSPSRGLEWLG	-RTYHRSKWYTDYIKSVKS	RISITTDTKNQFSLQLPSVTSDDT
		V _H CDR 3	V _H FR 4				
322	AVYYCA-	SHSSGWFN--WFDP	WDHGHRL--ASGA				
352	AVYYCAR	GGRQIWQNPWGAFDI	WGQGMHVTVSSASGA				
339	ATYYCAR	ALNYDIFPGYTFDF	WGQGLTVTVSSASGA				
368	AVYYCAR	GYGN-----GLDV	WGQGLTVTVSSASGA				

Abb. 40: Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit synthetischem E1 Protein selektiert wurden.

	FLAG	V _L FR 1	V _L CDR 1	V _L FR 2	V _L CDR 2	V _L FR 3	V _L CDR 3	V _L FR 4	
52	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
529	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
534	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
555	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
556	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
557	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
566	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
578	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
565	AQPAMADYKD	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITC	RASQSISSWLA	WYQRTGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC	QQYDSYPIT	FGQGTKEIKR	GG
552	AQPAMADYKD	DIQMTQFPSSLSASVGDRTITC	RASQSISSYLN	WYQKLGKAPKVLII	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFLTIVSSRRPEDFATYYC	QQSYSTPYT	FGQGTKEIKR	GG
	(Gly ₄ Ser) ₄ -Linker	V _H FR 1	V _H CDR 1	V _H FR 2	V _H CDR 2	V _H FR 3			
52	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
529	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
534	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
555	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
556	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
557	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
566	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
578	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
565	GG-----SGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACGAS-GFTL	GYWMT	WVRHPPGKGLEWVA	NMAADGNDIHHADSVQG	RFIISRDNARNLSLYQLNSLRAEDTAVYYCAR	DTN		
552	GGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVSAGSIS	GHYW-S	WIRQPPGKGLEWIG	-YVFDSGSTNYNRHLRS	RVTISLDTPKNQFSKLKSPVTAADTAVYYCAR	QGW		
	V _H CDR 3	V _H FR 4							
52	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
529	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
534	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
555	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
556	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
557	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
566	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
578	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
565	YHDGTTYDVFDI	WGQGTLVTVFLGLGG							
552	Q--LPYY--FDY	WGQGTLVTVSSASGA							

Abb. 41: Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen scFv Antikörper, die mit synthetischem E2 Protein selektiert wurden.

	FLAG	V _L FR 1	V _L CDR 1	V _L FR 2	V _L CDR 2	V _L FR 3	V _L CDR 3	
644	AQPAMADYKD	DVMVTQSPSLPVTLGQPASISC	RSSQSLVYNDGNTYLN	WFQQRPGQSPRRIMY	KVSNRDS	GVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVVYC	QSYDDNTNSMW	
	V _L FR 4	(Gly ₄ Ser) ₄ -Linker	V _H FR 1	V _H CDR 1	V _H FR 2	V _H CDR 2	V _H FR 3	
644	FGQGTKEIK	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTF	GYFMH	WVRQAPGQGLEWMA	WINPNSGDTKYAQKFQG	RVTIMTRDTSITTAY	
	V _H FR 3	V _H CDR 3	V _H FR 4					
644	MELSGLRIDDTAVYYCAR	PHHSNIATAGNGGWYFDL	WGQGTLVTVSSASGA					

Abb. 42: Charakterisierung der Aminosäuresequenz des humanen scFv Antikörpers, welcher mit prokaryotisch produziertem, denaturiertem E2 Protein selektiert wurde.

Beim Vergleich der scFv, die mittels synthetischem und prokaryotischem core Antigen selektiert wurden, wurde jeweils ein rekombinanter Antikörper gleicher Identität identifiziert (Klon 1-47 & 2-45). Dies bedeutet, dass dieser Antikörper mittels zwei verschiedenen produzierten Antigenen selektiert wurde und an ein Epitop beider Antigene

bindet. Dieses muss demnach im Bereich der 23 Aminosäuren des HCV-core Peptids liegen (II.2.3.6).

Die Sequenzierungen der verbleibenden scFv zeigte, dass die spezifischen Antikörper alle eine unterschiedliche Identität besitzen, wodurch das Ziel, möglichst viele diverse Antikörper durch 3 „Biopanning“ Runden zu selektieren, erreicht wurde.

Einige der selektierten rekombinanten Antikörper zeigen Mutationen im „Linker“ Bereich bzw. im Flag-Tag. Diese Sequenzänderungen zeigten keine Auswirkungen auf das Bindeverhalten der scFv (III.4.3.3, Abb. 37). Weiter wurden, wie zu erwarten, Längenpolymorphismen in den CDR 3 Regionen und weiteren variablen Bereichen festgestellt. Gravierend erscheint der Wegfall einer ganzen V_LFR1 beim Klon 3-68, was allerdings ohne Auswirkung auf die durchgeführten Reaktivitätsanalysen blieb. Zur weiteren Überprüfung und Charakterisierung wurden die einzelnen Klassen und Subgruppen der V_L und die Subgruppe der V_H Regionen der selektierten scFv bestimmt. Zusätzlich wurden die V- und J-Segmente der V_L, sowie die V-, D- und J-Segmente der V_H Regionen soweit wie möglich den bereits beschriebenen Keimbahngenomen zugeordnet (Tabelle XIV).

Leichte Kette (V_L)					
Klon	Antigen	Klasse	Subgruppe	V-Segment	J-Segment
1-34	synth. core	λ	VI	V 1-22	JL 3b
1-47	synth. core	κ	III	L 20	n.b.
1-62	synth. core	λ	VI	V 1-22	JL 3b
2-41	HCV-core	κ	IV	B 3	JK 2
2-45	HCV-core	κ	III	L 12	JK 3
2-47	HCV-core	λ	II	V 1-4	JL 2/ JL 3a
3-22	synth. E1	κ	I	L 19	JK 3
3-39	synth. E1	λ	VI	V 1-22	JL 3b
3-52	synth. E1	κ	I	O 12	n.b.
3-68	synth. E1	λ	I	V 2-13	n.b.
5-2/5-70	synth. E2	κ	I	L 12	JK 4
5-52	synth. E2	κ	I	O 12	JK 2
6-44	HCV-ΔE2	κ	II	A 17	JK 2

Schwere Kette (V_H)					
Klon	Antigen	Subgruppe	V-Segment	D-Segment	J-Segment
1-34	synth. core	I	VH 5-51	D 1-7	JH 4b
1-47	synth. core	III	VH 3-15	D 4-11	JH 2.
1-62	synth. core	II	VH 4-39	D 4-17	JH 5b
2-41	HCV-core	II	VH 4-59	n.b.	n.b.
2-45	HCV-core	III	VH 3-15	n.b.	n.b.
2-47	HCV-core	II	VH 6-1	n.b.	n.b.
3-22	synth. E1	III	VH 4-59	n.b.	n.b.
3-39	synth. E1	II	VH 2-36	n.b.	n.b.
3-52	synth. E1	I	VH 1-69	D 5-5	JH 3b
3-68	synth. E1	II	VH 6-1	n.b.	n.b.
5-2/5-70	synth. E2	III	VH 3-7	n.b.	n.b.
5-52	synth. E2	II	VH 4-59	n.b.	n.b.
6-44	HCV-ΔE2	I	VH 1-2	D 6-13	JH 4b

Tabelle XIV: Einteilung der V_L und V_H der humanen scFv in Klassen, Subgruppen und Zuordnung der ursprünglichen Keimbahngene der einzelnen Segmente. Die Klassen und Subgruppenbestimmung erfolgte nach Deret (Deret *et al.*, 1995), die zugehörigen Keimbahngene wurden nach Tomlinson (Tomlinson *et al.*, 1996) ermittelt. n.b.= nicht bestimmbar.

Ebenfalls wurden die scFv Antikörper soweit wie möglich in kanonische Klassen nach Martin & Thornton (1996) eingeordnet (Tabelle XV).

Klon	L 1	L 2	L 3	H 1	H 2
1-34	n.b.	1	n.b.	n.b.	2
1-47	2	1	n.b.	n.b.	4
1-62	5	1	n.b.	2	1
2-41	3	1	1	n.b.	1
2-45	2	1	n.b.	n.b.	4
2-47	6	1	5	3	n.b.
3-22	2	1	n.b.	1	1
3-39	5	1	5	1	1
3-52	2	1	3	n.b.	2
3-68	2	1	n.b.	1	n.b.
5-2/5-70	2	1	1	1	2
5-52	2	1	1	1	1
6-44	4	1	1	1	3

Tabelle XV: Einteilung der Sequenzen der humanen scFv in kanonische Klassen nach Tomlinson (Tomlinson *et al.*, 1996). n.b.= nicht bestimmbar.

Wie Tabelle XV entnommen werden kann, weisen die variablen Bereiche der L2 aller Klone die gleiche räumliche Struktur auf. Alle weiteren variablen Regionen weisen unterschiedliche Konformationen auf.

III.5 Ergebnistabelle der generierten Antikörper

	core	E1	E2	Name	Isotyp	Sequenzanalyse
Antigen	prok. √ synth. √	prok. √ synth. √	prok. √ synth. √	-	-	-
Antikörper (Maus)	-	-	√	(Klon 2) MK 4A71	IgG 2a IgG 2a	-
scFv (Maus)	-	-	√	scFv 1	-	√
scFv (human)	√	√	√	1-34, 1-47, 1-62, 2-41, 2-45, 2-47, 3-22, 3-39, 3-52, 3-68, 5-52, 5-70, 6-44	-	√

Tabelle XVI: Ergebnistabelle. Die Tabelle stellt nochmals die erreichten Ergebnisse zusammenfassend da. Es wurden alle HCV Strukturproteine prokaryotisch produziert oder synthetisch bereitgestellt. Der Hybridomaklon 2 wird in Klammern erwähnt, da er im Laufe der Arbeit seine Antikörperproduktion einstellte, jedoch Analysen mit diesem hier beschrieben werden. Die humanen scFv können wie unter III.4.2 und III.4.3 beschrieben zugeordnet werden.

IV. Diskussion

Hepatitis C ist eine weltweit vorkommende Viruserkrankung mit einer hohen klinischen Bedeutung, da eine große Anzahl von Infizierten eine chronische Verlaufsform entwickeln, die in einer Leberzirrhose und/oder einem hepatozellulären Karzinom resultieren kann. Bezüglich der Vakzinentwicklung und serologischer Detektion stellt die Variabilität des HCV Genoms eines der Hauptprobleme da (Zhong *et al.*, 2002). Zudem ist sie gleichzeitig verantwortlich für die Einteilung des Virus in verschiedene Geno- und Subtypen. Um einen ersten Ansatz in Richtung neue antikörperbasierte HCV Therapien und Detektionssysteme zu unternehmen, sollte in dieser Doktorarbeit mittels verschiedener Methoden versucht werden, Antikörper gegen die HCV Strukturproteine core, E1 und E2 herzustellen. Hierbei wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollten mittels der Hybridomatechnologie nach erfolgter Immunisierung von Mäusen monoklonale Antikörper gewonnen und auf HCV Spezifität überprüft werden, zum anderen sollte eine „Phage Display“ Bibliothek mit humanen Antikörperfragmenten präsentierenden Phagen auf HCV Antigenen selektiert werden. Für beide Ansätze war es essentiell, dass ausreichend Antigen zur Verfügung stand. Dieses sollte prokaryotisch in *E. coli* Bakterien produziert und für die Immunsierungen und Selektionen verwendet werden. Des Weiteren sollten während „Phage Display“ Selektionsrunden auch synthetisch hergestellte Peptide als Antigen eingesetzt werden, da bei Auswahl der Aminosäuresequenz auch eine Subtypenspezifität berücksichtigt werden konnte.

IV.1 Bereitstellung von HCV Antigen

Bakterien werden oft als Produktionsplattform für rekombinant herzustellende Proteine verwendet. Den so produzierten Proteinen fehlen zwar die posttranskriptionalen Proteinmodifikationen, wie sie in eukaryotischen Systemen vorkommen, allerdings ist die Proteinproduktion in prokaryotischen Systemen meistens ertragreicher und billiger als bei der Verwendung von eukaryotischen Expressionssystemen wie z.B. Säuger- oder Insektenzellen.

Um eine effektive Produktionsmethode von HCV Antigen zu entwickeln und aufgrund der bereits beschriebenen Immunogenität von rekombinant hergestelltem HCV Antigen (Liu *et al.*, 2001; Lorenzo *et al.*, 2001), wurde die Expression der HCV Strukturproteine in zwei verschiedenen Expressionssystemen unternommen, von denen sich letztendlich

die zytoplasmatische Expression (Ciccaglione *et al.*, 2000; Lorenzo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001) gegenüber der periplasmatischen Expression durchsetzte (III.1).

Da bereits beschrieben wurde, dass die hydrophoben Bereiche der Transmembrandomänen für eine *E. coli* Toxizität verantwortlich sein können und möglicherweise Modifikationen der Bakterienmembranen verursachen (Ciccaglione *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2001; Ciccaglione *et al.*, 2004), wurden im Vorfeld der Arbeit von G. Munz Deletionskonstrukte ohne Transmembrandomänen für die Oberflächenproteine E1 und E2 generiert. Die Überprüfung dieser Deletionsvarianten Δ E1 und Δ E2 erfolgte zu Beginn der Arbeit durch Literaturvergleich mit Op De Beeck *et al.* (2000) und Cocquerel *et al.* (2002).

Im Zuge der erfolgreichen zytoplasmatischen Expression wurden die Genabschnitte für die Proteine core, Δ E1 und Δ E2 in den Vektor pRSET B ligiert und damit *E. coli* BL21*(DE3)plysS transformiert. Die Reinigung erfolgte aufgrund der hohen Proteinausbeute über eine TALONTM Matrix. Im Falle des core Proteins wurde dabei unter nativen Bedingungen bei den beiden Deletionsvarianten Δ E1 und Δ E2 unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass noch weitere Domänen von Δ E1 und Δ E2 Einfluss auf die prokaryotische Proteinproduktion nehmen konnten, wurden die Kulturbedingungen weiter modifiziert. Das Herabsetzen der Temperatur während der Expression erbrachte keine merkliche Steigerung der Proteinausbeute, obwohl dieses Verfahren häufig bei der Expression von *E. coli* toxischen Proteinen angewendet wird (Mujacic *et al.*, 1999). Zudem wird bei niedrigen Temperaturen der Plasmidverlust während der Expression verringert (Kerschbaumer *et al.*, 1997). Wahrscheinlich reichte die Verwendung des speziell für die Produktion von *E. coli* toxischen Proteinen entwickelten BL21*(DE3)plysS Bakterienstammes (II.1.5) zur Expression und die Deletion der hydrophoben Transmembrandomänen bei den beiden Strukturproteinen E1 und E2 aus, um deren postulierte Toxizität ausreichend zu minimieren. Der modifizierte BL 21 (DE3) Stamm produziert ein bifunktionales T7 Lysozym welches zum einen die Basalexpression von *E. coli* toxischen Zielproteinen durch Bindung der T7 RNA Polymerase hemmt. Zum anderen kann das T7 Lysozym durch mehrere abwechselnde Inkubationen bei -80°C und +42°C aktiviert werden und durch Spaltung von Peptidoglykanbrücken der *E. coli* Zellwand den Aufschluss der Zellen erleichtern.

Bei der Detektion der HCV Strukturproteine über einen anti-His Antikörper wurden in der NuPAGE[®] und Immunoblot Analyse, unabhängig davon ob im Periplasma (Abb. 20

und Abb. 21) oder im Zytoplasma akkumuliertes Protein gereinigt wurde (Abb. 21 und Abb. 22), zusätzliche Banden nachgewiesen. Dieses „Strickleitermuster“ ist bei der Expression von Glycoproteinen eukaryotische Zellen bekannt und kommt dort durch erfolgte oder teilweise erfolgte Glycosylierung zustande. Die HCV Oberflächenproteine E1 und E2 gehören zu den Typ I Transmembran Proteine und weisen 4 -5 bzw. 11 putative N-Glycosylierungsmotive auf. O-Glycosylierungsstellen sind nicht bekannt (Op de Beek *et al.*, 2004, Goffard *et al.*, 2005). Eine Sequenzanalyse der klonierten E1 und E2 spezifischen DNA mittels NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>) bestätigte diese Angaben auch für die verwendeten Gensequenzen. Glycosylierungen sind bei Prokaryoten im Falle von *Archaeobacteria* und bei *Eubacteria* bereits charakterisiert worden, vor allem bei Proteinen, welche an Adhäsionvorgängen beteiligt sind. Die Expression von einem N-glycosylierten Protein in *E. coli* konnte ebenfalls in dem enterotoxigenen Stamm (ETEC) H 10497 nachgewiesen werden (Lindenthal & Elsinghorts, 1999). Aufgrund der nicht bekannten posttranslationalen Modifikationen der hier verwendeten *E. coli* Stämme ist das in dieser Arbeit vorliegende Muster eher ein Resultat von durch Proteasen abgebauter Strukturproteine, Oligomerisationen und nicht vollständig entfernter *E. coli* Proteine, was durch MS/MS Analysen auch bestätigt wurde (III.1).

Da Antikörper u.a. durch Immunisierung generiert werden sollten, musste das gereinigte, denaturierte Antigen in ein Puffersystem überführt werden, welches für die Immunisierung von Mäusen verwendet werden konnte. Das vorliegende Puffersystem auf Guanidin HCl Basis konnte aufgrund seiner Toxizität für die Immunisierungen nicht verwendet werden. Durch Umpuffern des Antigens in PBS fiel dieses jedoch aus und konnte daher nicht eingesetzt werden. Monnecke (1999) hatte bereits gezeigt, dass unlösliche Antigene eine verminderte Immunantwort auslösen. Durch Supplementation mit Ectoin konnte das Antigen löslich in PBS gepuffert und so für die Immunisierungen verwendet werden. Ectoin wird in hohen Konzentrationen von halophilen Mikroorganismen wie *Halomonas* angereichert, die in salzhaltigen Medien leben und auf diese Weise extremen Schwankungen in der Osmolarität entgegen wirken. Dieses Osmoprotektant zeichnet sich dadurch aus, dass es nicht mit dem Makromolekül interagiert, aber dessen lösliche Eigenschaften verändert und eine sehr geringe molekulare Masse hat (Yu & Nagaoka, 2004).

Durch Titerkontrollen (Abb. 33) wurde die Immunantwort überwacht und der Zeitpunkt der Milzentnahmen bestimmt. Hier zeigte sich, dass das Ectoin keinen Einfluss auf die

Spezifität der gebildeten Antikörper hatte, da in dem indirekten ELISA zur Feststellung des Serumtiters denaturiertes HCV Protein ohne Ectoin eingesetzt wurde und eine Titerantwort bis 1/1024000 gemessen wurde.

Die synthetischen Peptide wurden, wie unter II.2.3.6 beschrieben, ausgewählt und für Selektionsanalysen eingesetzt. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass die getesteten Aminosäurenabfolgen HCV Proteine repräsentieren, und dass alle bis dato bekannten Aminosäurenkombinationen des Subtyps 1b in diesen kurzen Sequenzen prozentual vorhanden waren. Da Bereiche ohne Glykosylierungsmotive ausgewählt wurden, konnten mit diesen Peptiden erfolgreich humane, rekombinante Antikörper identifiziert werden, die an frei zugänglichen Epitopen binden.

IV.2 Hybridomatechnologie

Durch Immunisierungen und Hybridomafusionen konnten in dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen das HCV Δ E2 Protein generiert werden. Seit der Etablierung und Modifizierung dieser Methode können stabile mAk in größeren Mengen produziert werden. Die generierten anti- Δ E2 Antikörper des Hybridomaklons 2 konnten nach Reinigung über einen längeren Zeitpunkt bei 8°C gelagert und unter Kühlung transportiert werden, ohne dass sie ihre Antigenreaktivität verloren. Zudem konnten ELISA und Immunoblot Analysen mit gereinigten Antikörpern oder mit mAk aus dem Zellkulturüberstand durchgeführt werden (III.3.3). Limitierungen erfährt die Hybridomatechnologie allerdings durch den hohen technischen Aufwand und damit verbundenen hohen Produktionskosten (Fischer & Emans, 2000). Die Qualität des mAk und die Produktionsrate des Klons sind jedoch die entscheidenden Faktoren für eine Kosten-Nutzenrechnung. Wie in dieser Arbeit gezeigt, besteht jederzeit die Gefahr verminderter Produktion (III.2.2) oder letztendlich einer Einstellung dieser. Auf eine mindere Produktionsrate des Hybridomaklons 2 konnte nach der Fermentation geschlossen werden, da hier lediglich 200 ng Antikörper aus einem Liter Kulturansatz gereinigt wurden. Beschrieben werden Produktionsausbeuten gut produzierender Hybridomen von bis zu 200 µg/ml Kulturansatz (Yoo *et al.*, 2002). Aufgrund der abzusehenden Einstellung der Antikörperproduktion wurde durch die rechtzeitige Klonierung der Gensequenzen für die variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperkette in den Phagmidvektor pHENHi versucht, die Spezifität der mAKs zu erhalten (Krebber *et al.*, 1997; Azzazy & Highsmith, 2002; Hust *et al.*, 2005). Dies war nur bei zwei der ursprünglichen fünf Klone erfolgreich (III.2.3.1). Wahrscheinlich hatten

die restlichen Hybridomklone die Expression der betreffenden Gene bereits zum Zeitpunkt der RNA Isolation eingestellt, so dass keine spezifische mRNA vorhanden war und in cDNA transkribiert werden konnte.

Die Proteinausbeute der durch prokaryotischen Expression produzierten scFv 1 und 2 liegt mit einem Durchschnitt von 0,7 mg/l im Bereich der, in der Literatur beschriebenen Werte von 0,1-2 mg/l Expressionskultur (Gram & Ridder, 2001).

Von einer *E. coli* Toxizität der scFv (Ge *et al.*, 1995; Krebber *et al.*, 1996a) ist nicht auszugehen, da das Zellwachstum während der Kultivierung kontinuierlich verlief. Zudem erbrachte die Absenkung der Expressionstemperatur auf 18°C bis 24°C keine Erhöhung der Proteinausbeute. Wie bereits für scFv Antikörper beschrieben (Plückthun *et al.*, 1996; Robin *et al.*, 2003), wurde keine größere Menge an Zielprotein als unlösliche „Inclusion Bodies“ in den Pelletfraktionen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Ordnet man die V_H und V_L der scFv 1 und 2 den mAk zu, entsprechen diese im Fall des scFv 1 denen des Hybridomklons 1, die des scFv 2 denen des Hybridomklons 2. Mit den mAk des Hybridoms 2 wurden erfolgreich Bindungsanalysen mit nativem prokaryotisch und eukaryotisch produziertem Antigen durchgeführt. Der abgeleitete scFv 2 zeigt an prokaryotisch produziertem, denaturiertem Antigen eine geringere Reaktivität im indirekten ELISA und Immunoblot. Dies kann zum einen an der Monovalenz des scFv im Vergleich zu einem bivalenten mAk erklärt werden (Kim *et al.*, 2001). Zum anderen können cDNA Segmente von produktiven, wie auch von nicht produktiven Ketten amplifiziert worden sein. Diese nicht produktiven Ketten können von aberranten Rearrangements des zweiten Allels, der bei der Hybridomafusion verwendeten B-Lymphozyten abstammen (Breitling *et al.*, 2001). Die Folge hiervon ist, dass die Konzentration der erwünschten DNA abnimmt, und es so zu Klonierungen inaktiver DNA Bereiche, sogenannter Pseudogene, kommt. Zusätzlich kann ein Hybridom auch aus der Fusion mehrerer B-Zellen mit einer Myelomzelle resultieren. Hierdurch können während der PCR mit kettenspezifischen Primern ebenfalls mehrere unterschiedliche codierende DNA Bereiche amplifiziert werden, wodurch es zu Klonierungen von V_H und V_L Kombinationen kommt, welche nicht für das Antigen spezifisch sind (Krebber *et al.*, 1997). Letztlich können für eine verminderte Reaktivität des rekombinanten scFv auch Faltungsfehler während der prokaryotischen Produktion und durch die PCR Amplifikation entstandene Punktmutationen verantwortlich sein.

Der Hybridomaklon 1 wurde durch die Immunisierung mit nativem HCV E2 Antigen generiert (III.2). Der von diesem Hybridomaklon abgeleitete rekombinante scFv 1 bindet an denaturiertes Antigen. Das betreffende Epitop muss demnach in nativer und denaturierter Form frei zugänglich sein. Die Antigenerkennung von Antikörpern erfolgt nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip (Janeway & Travers, 2002). Die Konformation des Antigens und sämtliche Faktoren, die diese beeinflussen können, sind so für die Bindung an diskontinuierliche Epitope elementar, da diese von tertiären und quaternären Proteinstrukturen geformt werden. Lineare Epitope definieren sich über ihre primäre AS-Sequenz, weswegen diese, wie hier gezeigt wurde, im Immunoblot auch nachzuweisen sind (Abb. 30).

Mit Hilfe von Datenbankabgleichen und Analyseprogrammen wurde der scFv 1 Antikörper weiterführend charakterisiert und mit den Keimbahngenen verglichen (III.2.4). Hierbei wurden acht Mutationen festgestellt, welche wahrscheinlich auf die sekundäre Immunreifung zurückzuführen sind. Die Zuordnung zu einer kanonischen Klasse der H3 Region, basiert auf ihren charakteristischen Aminosäureresten und wird aufgrund von Längenpolymorphismen und Varianzen in der betreffenden Sequenz limitiert (Chothia & Lesk 1987). Dies gilt sowohl für den von einem Hybridomaklon abgeleiteten scFv 1 (Tabelle X) als auch für die humanen scFv aus dem „Phage-Display“ (Tabelle XV).

Die Analysen mit Antikörpern der Hybridomaklone MK 4A71, MK E5, MK G8 und MK D6, die durch eine Immunisierung mit Ectoin versetztem HCV Δ E2 Antigen generiert wurden, konnten nur unter Einsatz des Zellkulturüberstandes erfolgen. Grund hierfür war eine geringe Konzentration der Antikörper aufgrund des frühen Zeitpunktes nach Vereinzelung, welche nicht zusätzlich durch eine Reinigung vermindert werden sollte. Bei den zusätzlichen Banden in Abb. 34 unterhalb 28 kDa (schwarzer Pfeil) handelt es sich, wie in III.1 festgestellt, um Degradationsbanden des HCV Proteins, die auch hier durch die monoklonalen Antikörper detektiert werden (Abb. 22). Weitere Banden unterhalb der 14 kDa, die in ihrer Intensität stärker sind als die Detektion der HCV spezifischen Banden um 28-38 kDa, können das Resultat von Kreuzreaktionen zu einem nicht entfernten *E. coli* Protein sein. Eine weitere Erklärung für diese Banden wäre, dass hier trotz „Limiting Dilution“ Klonierung ein polyklonaler Klon vorliegt, der zwei unterschiedliche Antikörperpopulationen unterschiedlicher Spezifität produziert.

Zur weiteren Charakterisierung der Antikörper und Antikörperfragmente wurde eine Plasmon-Oberflächen-Resonanzmessung durchgeführt, die allerdings kein

verwertbares Ergebnis erbrachte. Problematisch war hier der Einsatz des denaturierten HCV Antigens, wobei auch eine durch Dialyse vorgenommene Umpufferung in einen Harnstoffpuffer keine Verbesserung der Analysebedingungen erbrachte.

IV.3 Humane scFv Antikörper

Ein großer Vorteil der „Phage Display“ Technologie ist, dass, wie hier gezeigt, eine bestehende Antikörperbibliothek auf mehreren unterschiedliche Antigenen unterschiedlich oft *in vitro* selektioniert werden kann. Eine Immunisierung wie bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist dabei nicht notwendig. Zudem können humane Patientenbibliotheken generiert und verwendet werden. Sowohl humane als auch humanisierte HCV spezifische scFv wurden bereits beschrieben (Sullivan *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2002). Rekombinante Antikörper aus der hier verwendeten Patientenbibliothek wurden bereits erfolgreich zur Detektion von HCV NS3 Protein verwendet (Tessmann *et al.*, 2002; Artsaenko *et al.*, 2003).

Da mehrere rekombinante Antikörper identifiziert werden sollten wurde in nur drei Runden selektioniert. Hierdurch wurden nicht nur hochspezifische scFv Antikörper selektiert, sondern auch solche minderer Spezifität zum Zweck einer erweiterten Diversität. In der Literatur werden 2 - 6 Runden beschrieben (Azzazy & Highsmith, 2002; Hust *et al.*, 2005), allerdings kann je nach Anforderung beliebig oft selektioniert werden. Die Ausbeute der verschiedenen rekombinanten Antikörper hängt mit der Bibliothek, mit den verwendeten Antigenen und den angewandeten Selektionsmethoden eng zusammen. Für das hier durchgeführte „Phage Display“ ist deswegen zu beachten, dass die verwendete Patientenbibliothek Bindungseigenschaften beinhaltet, welche aufgrund einer HCV Infektion im Patienten generiert wurden. Die Selektion erfolgte im Gegensatz dazu mittels HCV Strukturproteinen die prokaryotisch, denaturiert oder synthetisch hergestellt waren. Ein weiterer relevanter Faktor ist die beschriebene Hypervariabilität des Virus (I.2) und die daraus resultierenden Quasispezies innerhalb eines Patienten. Obwohl die Sequenzen der verwendeten Antigene von dem Subtyp 1b abgeleitet waren, die Patienten mit diesem Subtypen ebenfalls infiziert waren, können putative Epitope durch Punktmutationen voneinander abweichen.

Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern wiesen die in *E. coli* exprimierten scFv, wie bereits beschrieben (Kim *et al.*, 2001), eine geringere Stabilität auf. So können diese nicht wie Vollängenantikörper über Monate hinweg bei 8°C gelagert werden. Ein

weiteres Problem stellt die geringere Affinität der rekombinanten monovalenten Antikörper im Vergleich zu bivalenten monoklonalen Antikörpern da.

Die bindenden scFv Antikörper wurden nach den „Panning“ Runden mittels verschiedener ELISA Ansätze selektioniert. Bei erfolgter Einzelklonablage und Expression im Mikrotiterformat (III.4.2.1) können in *E. coli* exprimierte, an Antigen bindende, humane scFv Antikörper schnell identifiziert werden. Nach Produktion der scFv in *E. coli* treten diese durch gesteigerte Porosität der Membranen in den Kulturüberstand über, welcher in Folge für Bindungsanalysen verwendet werden kann. Hierbei hängt die Durchlässigkeit der äußeren Membran von bestimmten Kultivierungsbedingungen wie der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur ab. Die Sequenz des produzierten Proteins kann ebenfalls auf die Membranpassage Einfluss haben (Plückthun, 1991; Plückthun *et al.*, 1996; Kipriyanov *et al.*, 1997). Das Ergebnis zeigt, dass mittels dieser Methode verschiedene, an HCV Strukturproteine bindende, humane scFv identifiziert werden konnten. Bei der anschließenden Sequenzanalyse fanden sich nicht nur die, bei Kabat (Kabat *et al.*, 1990) beschriebenen Schlüsselaminosäuren, sondern wie zu erwarten war, auch Motive aus den von Artsaenko (Artsaenko *et al.*, 2003) und Tessmann (Tessmann *et al.*, 2002) beschriebenen scFv Antikörpern.

Aufgrund eines geringeren Reinheitsgrades der prokaryotisch produzierten HCV Strukturproteine konnte eine Identifikation von falsch positiven Signalen nicht ausgeschlossen werden. Deswegen wurde eine zeit- und kostenintensivere genauere Analyse, mit den nun auf synthetischen Peptiden selektierten scFv Antikörpern durchgeführt. Bei dieser Selektion erfolgt die Identifikation in mehreren Versuchsabschnitten. Zunächst wurden die, durch die „Panning“ Runden selektierten scFv Antikörper durch Einzelklonablage vereinzelt und nochmals durch einen monoklonalen Phagen ELISA verifiziert (III.4.3.1). Danach wurden die, nach der Expression in *E. coli* im Kulturüberstand akkumulierten scFv Antikörper durch einen Immunoblot nachgewiesen (III.4.3.2). Ein anschließender indirekter ELISA diente der Spezifitätsanalyse der produzierten scFv Antikörper (III.4.3.3). Die so identifizierten scFv Antikörper haben eine Größe von ~30 kDa und entsprechen somit der publizierten Größe rekombinanter scFv Antikörper (Azzazy & Highsmith, 2002). Die im Immunoblot (Abb 36) festgestellten Größenunterschiede können mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte hierfür der Längenpolymorphismus der CDR 3 Regionen verantwortlich sein. Zum anderen wurde die Expression im *E. coli* Stamm XL1blue MRF⁺ durchgeführt,

welcher aufgrund seiner Suppressoreigenschaft gewöhnlich nur für das „Phage Display“ verwendet wird. Hierdurch ist eine Proteinfusion von scFv und Gen III durch die Suppression des *Amber Stop Codons* möglich, wodurch es zu Größenunterschieden je nach Abbruch der Transkription/Translation kommen kann. Weiterhin können gerade die geringfügigen Größenunterschiede der sezernierten scFv Antikörper mit einer fehlerhaften „Suppressor“ Funktion erklärt werden. Auch kann eine proteolytische Spaltung der Proteine nach der Produktion und Akkumulation im Kulturüberstand durch dort vorhandene Proteasen nicht ausgeschlossen werden. Die Detektion von Proteinbanden oberhalb von 30 kDa, hervorgerufen durch Bildung von scFv Dimeren oder einer erhöhten Oligomerisation von Antikörperderivaten, ist ebenfalls bekannt (Essig *et al.*, 1993; Raag & Whitlow, 1995) und wurde bezüglich der verwendeten „Linker“ untersucht (Turner *et al.*, 1997).

Das Potenzial des „Phage Displays“ wurde am Beispiel der identischen Klone 1-47 und 2-45 deutlich. Nach den „Panning“ Runden konnte mittels Plattenexpression (III.4.2.1) und monoklonalem Phagen ELISA (III.4.3.1) ein rekombinanter Antikörper identifiziert werden, der an ein Epitop unterschiedlich prozessierter Antigene bindet. Besonders auffällig ist, dass sowohl Mutationen im Glycin-Serinlinker (z.B. Klon 5-29, 2-47), als auch in den FR-Bereichen der V_L Kette (z.B. Klon 3-68) keine Auswirkungen auf die Bindeeigenschaften der rAk haben. Dies spricht für eine vorrangige Beteiligung der V_H an der Antikörper-Antigen Wechselwirkung. Diese Beobachtung korreliert mit den Bemühungen, antigenbindende Regionen eines Immunoglobulins weiter zu verkleinern und so nur die V_H zu exprimieren. Die fehlende Interaktion zur V_L resultiert allerdings in einer geringeren Stabilität und Löslichkeit des Derivates (Rohrbach *et al.*, 2003). Als natürliches Vorbild dieser Strategie dienen die Antikörper von Kamelen und deren Verwandten, bei denen ein Teil der natürlich vorkommenden Immunoglobuline nur aus der schweren Kette besteht (Riechmann & Muyldermans, 1999).

IV.4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Antikörper können nach weiterführender Verifizierung auf den Gebieten der HCV Forschung, Detektion und Therapie Verwendung finden.

So könnte z.B. prokaryotisch oder eukaryotisch produziertes HCV Strukturprotein in der HCV Forschung durch verschiedene Assays, unter Verwendung der generierten Antikörper im Immunoblot oder ELISA nachgewiesen werden.

Für den Einsatz als HCV Detektionantikörper ist zunächst ein erfolgreicher Spezifitätsnachweis für native oder denaturierte Strukturproteine, gewonnen aus Seren oder Hepatozyten HCV infizierten Patienten, zu führen. Dieser Nachweis kann in Form von ELISA-, Immunoblot-, Dotblot- oder *in situ* Hybridisierungsansätzen erfolgen. Sowohl rekombinante als auch monoklonale Antikörper werden bereits auf Proteomchips eingesetzt (Schmiedl & Dübel, 2004). Auch die hier produzierten Antikörper können in einem solchen Ansatz eingesetzt werden. Sollte zudem durch Kreuzreaktionsanalysen eine Subtypenspezifität eines oder mehrerer Antikörper festgestellt werden, kann mit diesen eine erste subtypenspezifische Identifikation erfolgen. Eventuelle Vorteile lägen in der Kosten-, Aufwands- und Zeitreduktion gegenüber den herkömmlichen molekularbiologischen Nachweisverfahren.

Ebenfalls wäre ein therapeutischer Einsatz der Antikörper in Form einer passiven Immunisierung denkbar. Die Penetration der Zielzelle könnte durch die Antikörperbindung an die Oberflächenproteine E1 und E2 des nativen Virus be- oder verhindert werden. Ein weiteres Ziel der therapeutischen Verwendung könnte die Aktivierung des Komplementsystems und der antikörpervermittelten, zellulären Toxizität (ADCC) sein. Hierdurch würde eine erste Immunreaktion unterstützt und eine Ausbreitung der Infektion behindert werden. Allerdings müssten für einen solchen Ansatz die monoklonalen Hybridomaantikörper durch Humanisierung optimiert und die humanen scFv mit einem Fc-Effektorbereich versehen werden. Weiterhin sind bei therapeutischen Ansätzen Limitationen wie Immunogenität, geringere Halbwertszeiten und Instabilität rekombinanter Proteine im humanen Serum zu berücksichtigen.

V. Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus stellt ein global auftretendes Gesundheitsproblem dar und ist der wichtigste Vertreter der Non-A und Non-B Hepatitis Viren. Da es bei ungefähr 30 % der 130 Millionen chronisch erkrankten Virusträger zu der Entwicklung einer Leberzirrhose und/oder eines hepatozellulären Karzinoms kommt, gilt Hepatitis C als eine der weltweit häufigsten Erkrankungen mit Todesfolge.

In dieser Dissertation wurden Antikörper gegen die Strukturproteine core, E1 und E2 des Hepatitis C Virus (Subtyp 1b) hergestellt. Ausgangsmaterial waren die codierenden Sequenzen für Vollängen- und Deletionskonstrukte der o.g. Proteine. Zunächst gelang es ausreichend Protein als Antigen für Analysen und Immunisierungen prokaryotisch herzustellen, und entsprechend des Akkumulationsortes aus dem Peri- bzw. Zytoplasma zu reinigen. Die rekombinant produzierten Strukturproteine wurden mittels SDS Page, Immunoblot und MS/MS Analysen verifiziert. Als weitere Antigene wurden synthetische Peptide, welche Abschnitten der Aminosäureabfolge der Strukturproteine repräsentierten, nach bestimmten Parametern ausgewählt und zur Synthese in Auftrag gegeben. Zusätzlich wurden Antikörper von bereits vorhandenen Hybridomaklonen durch einen indirekten ELISA auf ihre Spezifität hin überprüft und ausgewählt. Mit monoklonalen Antikörpern eines Klons konnten erfolgreich in einem Kooperationsprojekt Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt werden. Durch eine „Two Step Cloning“ Strategie wurden zwei rekombinante scFv Antikörper aus den übernommenen monoklonalen Antikörpern generiert. Diese scFv Antikörper konnten ebenfalls auf ihre Spezifität hin im indirekten ELISA getestet werden. Ihre Sequenz wurde bezüglich Vollständigkeit und Integrität überprüft. Nach Überführung des prokaryotisch hergestellten Antigens in ein für Mäuse verträgliches Puffersystem wurden Tiere mit E2 Protein immunisiert. Aus dieser Immunisierung resultierte unter Anwendung der Hybridomatechnologie ein monoklonaler Antikörper. Im Rahmen einer weiteren Kooperation wurde mit den synthetischen und prokaryotischen Antigenen eine humane Phagenbibliothek durchmustert. Hieraus resultierten dreizehn rekombinante humane scFv Antikörper deren Sequenzen ebenfalls bezüglich ihrer Integrität analysiert und charakterisiert wurden. Die generierten Antikörper sollten weiteren Affinitätsanalysen und Spezifitätsanalysen an z.B. nativem oder denaturiertem Patientenmaterial unterzogen werden, um deren Verwendungsmöglichkeit als Detektions- oder Therapieantikörper zu verifizieren.

VI. Literatur

ABBAS, A. K., POBER, J. S. and LICHTMAN, A. H. (1994). Antibodies and antigens. *Cellular and Molecular Immunology* **2**, 33-64.

AGNELLO, V., ABEL, G., ELFAHAL, M., KNIGHT, G. B. and ZHANG, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 22, 12766-12771.

ALBERT, S., MAIBERGER, S. and GOHL, P. (2002). Labordiagnostik der Hepatitis C. *Labor aktuell* **5**.

ARTSAENKO, O., TESSMANN, K., SACK, M., HAUSSINGER, D. and HEINTGES, T. (2003). Abrogation of hepatitis C virus NS3 helicase enzymatic activity by recombinant human antibodies. *J Gen Virol* **84**, Pt 9, 2323-2332.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R. and KINGSTON, R. E. (1995). Current Protocols in Molecular Biology. *New York, Wiley Interscience*.

AZZAZY, H. M. and HIGHSMITH, W. E., JR. (2002). Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* **35**, 6, 425-445.

BARTENSCHLAGER, R., AHLBORN-LAAKE, L., MOUS, J. and JACOBSEN, H. (1993). Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* **67**, 7, 3835-3844.

BARTH, S., HUHN, M., MATTHEY, B., KLIMKA, A., GALINSKI, E. A. and ENGERT, A. (2000). Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4, 1572-1579.

BIRD, R. E., HARDMAN, K. D., JACOBSON, J. W., JOHNSON, S., KAUFMAN, B. M., LEE, S. M., LEE, T., POPE, S. H., RIORDAN, G. S. and WHITLOW, M. (1988). Single chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426.

BREITLING, F., MOOSMAYER, D., BROCK, B. and DÜBEL, S. (2001). Construction of scFv from hybridoma by two-step cloning. In: Antibody Engineering. R. Kontermans and S. Dübel (eds). Heidelberg. *Springer-Verlag*.

BRINKMANN, U., REITER, Y., JUNG, S. H., LEE, B. and PASTAN, I. (1993). A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 16, 7538-7542.

BROCK, T. D. (2001). Mikrobiologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin*.

BRÜLL, D. (2004). Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten Immunotoxinen zur Therapie von metastasierendem Pankreaskarzinom. *Dissertation, RWTH-Aachen*.

- BURTON, D. R. (1987). Structure and function of antibodies. *Mol Gen of Immunoglobulins* **4**, 1-50.
- CHOO, Q. L., KUO, G., WEINER, A. J., OVERBY, L. R., BRADLEY, D. W. and HOUGHTON, M. (1989). Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362.
- CHOTHIA, C. and LESK, A. M. (1987). Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **196**, 901-917.
- CHOTHIA, C., LESK, A. M., GHERARDI, E., TOMLINSON, I. M., WALTER, G., MARKS, J. D., LLEWELYN, M. B. and WINTER, G. (1992). Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol* **227**, 3, 799-817.
- CHOTHIA, C., LESK, A. M., TRAMONTANO, A., LEVITT, M., SMITH-GILL, S. J., AIR, G., SHERIFF, S., PADLAN, E. A., DAVIES, D. and TULIP, W. R. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* **342**, 6252, 877-883.
- CICCAGLIONE, A. R., MARCANTONIO, C., COSTANTINO, A., EQUESTRE, M., GERACI, A. and RAPICETTA, M. (1998). Hepatitis C virus E1 protein induces modification of membrane permeability in E. coli cells. *Virology* **250**, 1, 1-8.
- CICCAGLIONE, A. R., MARCANTONIO, C., COSTANTINO, A., EQUESTRE, M., GERACI, A. and RAPICETTA, M. (2000). Expression and membrane association of hepatitis C virus envelope 1 protein. *Virus Genes* **21**, 3, 223-226.
- CICCAGLIONE, A. R., MARCANTONIO, C., TRITARELLI, E., EQUESTRE, M., MAGURANO, F., COSTANTINO, A., NICOLETTI, L. and RAPICETTA, M. (2004). The transmembrane domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein induces cell death. *Virus Res* **104**, 1, 1-9.
- CLARK, M. F. and ADAMS, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475-483.
- COCQUEREL, L., OP DE BEECK, A., LAMBOT, M., ROUSSEL, J., DELGRANGE, D., PILLEZ, A., WYCHOWSKI, C., PENIN, F. and DUBUISSON, J. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Embo J* **21**, 12, 2893-2902.
- COLCHER, D., BIRD, R., ROSELLI, M., HARDMAN, K. D., JOHNSON, S., POPE, S., DODD, S. W., PANTOLIANO, M. W., MILENIC, D. E. and SCHLOM, J. (1990). In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J Natl Cancer Inst* **82**, 14, 1191-1197.
- COLIGAN, J. E., KRUISBEEK, A. M. and MARGULIES, D. H. (1995). Current Protocols in Immunology. New York, Wiley Interscience.

- CROMBERG, M. (2004). Hepatitis C und B: Fortschritte in der Therapie. *Ärztinformation. Kompetenznetz Hepatitis 2*. Neuauflage: Juni 2004 © Kompetenznetz Hepatitis.
- DERET, S., MAISSIAT, C., AUCOUTURIER, P. and CHOMILIER, J. (1995). SUBIM: a program for analysing the Kabat database and determining the variability subgroup of a new immunoglobulin sequence. *Comput Appl Biosci* **11**, 4, 435-439.
- DORFMÜLLER, S. (2002). Herstellung, Expression und Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern und Immuntoxinen gegen *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Verticillium dahliae*. *Dissertation, RWTH-Aachen*.
- DOWER, W. J., MILLER, J. F. and RAGSDALE, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.
- DUBUISSON, J., DUVET, S., MEUNIER, J. C., OP DE BEECK, A., CACAN, R., WYCHOWSKI, C. and COCQUEREL, L. (2000). Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein. *J Biol Chem* **275**, 39, 30605-30609.
- ECKART, M. R., SELBY, M., MASIARZ, F., LEE, C., BERGER, K., CRAWFORD, K., KUO, C., KUO, G., HOUGHTON, M. and CHOO, Q. L. (1993). The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 2, 399-406.
- ENGVALL, E. and PERLMAN, P. (1979). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-879.
- ENOMOTO, N., SAKUMA, I., ASAHINA, Y., KUROSAKI, M., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, C., IZUMI, N., MARUMO, F. and SATO, M. (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant *hepatitis c virus* 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *Journal of Clinical Investigation* **96**, 224-230.
- ESSIG, N. Z., WOOD, J. F., HOWARD, A. J., RAAG, R. and WHITLOW, M. (1993). Crystallization of single-chain Fv proteins. *J Mol Biol* **234**, 897-901.
- FARCI, P., SHIMODA, A., COIANA, A., DIAZ, G., PEDDIS, G., MELPOLDER, J. C., STRAZZERA, A., CHIEN, D. Y., MUNOZ, S. J., BALESTRIERI, A., PURCELL, R. H. and ALTER, H. J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**, 5464, 339-344.
- FISCHER, R. and EMANS, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* **9**, 279-299.
- GALE, M., BLAKELY, C. M., KWIECISKEWSKI, B. and TAN, S. L. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 5208-5218.

- GE, L., KNAPPIK, A., PACK, P., FREUND, C. and PLÜCKTHUN, A. (1995). in *Antibody Engineering: Expressing antibodies in Escherichia coli* (Borrebaeck, C. A. K., ed), **2nd edition Ed.**, pp. Oxford University Press, Inc., New York, 229-266.
- GLOCKSHUBER, R., SCHMIDT, T. and PLÜCKTHUN, A. (1992). The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**, 5, 1270-1279.
- GOFFARD, A., CALLENS, N., BARTOSCH, B., WYCHOWSKI, C., COSSET, F. L., MONTPELLIER, C. and DUBUISSON, J. (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **79**, 13, 8400-8409.
- GOFFARD, A. and DUBUISSON, J. (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* **85**, 3-4, 295-301.
- GRAM, H. and RIDDER, R. (2001). Expression of scFv antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. In: *Antibody Engineering*. R. Kontermans and S. Dübel (eds). Heidelberg. Springer-Verlag.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- HARTL, F. U. and HAYER-HARTL, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 5561, 1852-1858.
- HELLER, T. and REHERMANN, B. (2005). Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* **25**, 1, 7-17.
- HOOGENBOOM, H. R., GRIFFITHS, A. D., JOHNSON, K. S., CHISWELL, D. J., HUDSON, P. and WINTER, G. (1991). Multi subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* **19**, 4133-4137.
- HÜSSY, P., FAUST, H., WAGNER, J. C., SCHMID, G., MOUS, J. and JACOBSEN, H. (1997). Evaluation of hepatitis C virus envelope proteins expressed in *E. coli* and insect cells for use as tools for antibody screening. *J Hepatol* **26**, 6, 1179-1186.
- HUST, M., TOLEIKIS, L. and DÜBEL, S. (2005). Antibody Phage Display. *Mod. Asp. Immunobiol.* **15**, 47-49.
- INBAR, D., HOCHMAN, J. and GIVOL, D. (1972). Localization of the antibody combining site within the variable portions of heavy and light chains. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2659-2662.
- JAECKEL, E., CORNBERG, M., WEDEMEYER, H., SANTANTONIO, T., MAYER, J., ZANKEL, M., PASTORE, G., DIETRICH, M., C, T. and MANN, M. (2001). Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med.* **345**, 20, 1452-1457.
- JANEWAY, C. A. and TRAVERS, P. (2002). Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.

JESNOWSKI, R., NÄHRING, J. and WOLF, K. (1995). A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells. *Current Genetics* **27**, 318-319.

JILBERT, A. R. and MASON, W. S. (2002). Hepatitis B virus. *Encyclopedia of Life Sciences*.

JONES, B., TITE J.P. and C.A., J. (1986). Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen triggered cytotoxicity of L2T4-positive, IA restricted T cell clones. *J Immunol Methods* **136**, 1, 348-356.

KABAT, E. A. and WU, T. T. (1991). Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol* **147**, 5, 1709-1719.

KABAT, E. A., WU, T. T., REID-MILLER, M., H. M. PERRY, H. M. and GOTTESMAN, K. S. (1990). Sequences of proteins of immunological interest. *U.S. Department of Health, Fifth Edition*.

KATO, N., LAN, K. H., ONO-NITA, S. K., SHIRATORI, Y. and OMATA, M. (1997). Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* **71**, 11, 8856-8859.

KERSCHBAUMER, R. J., HIRSCHL, S., KAUFMANN, A., IBL, M., KOENIG, R. and HIMMLER, G. (1997). Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem* **249**, 2, 219-227.

KIEN, F., ABRAHAM, J. D., SCHUSTER, C. and KIENY, M. P. (2003). Analysis of the subcellular localization of hepatitis C virus E2 glycoprotein in live cells using EGFP fusion proteins. *J Gen Virol* **84**, Pt 3, 561-566.

KIM, S. H., CHUN, J. H. and PARK, S. Y. (2001). Characterization of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA) and expression in E. coli. *Hybridoma* **20**, 4, 265-272.

KIPRIYANOV, S. M., MOLDENHAUER, G. and LITTLE, M. (1997). High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures. *J Immunol Methods* **200**, 1-2, 69-77.

KÖHLER, G. and MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.

KREBBER, A., BORNHAUSER, S., BURMESTER, J., HONEGGER, A., WILLUDA, J., BOSSHARD, H. R. and PLÜCKTHUN, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods* **201**, 25-55.

- KREBBER, A., BURMESTER, J. and PLÜCKTHUN, A. (1996a). Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene* **178**, 71.
- KURIHARA, C., TSUZUKI, Y., HOKARI, R., NAKASHIMA, H., MATAKI, N., KUROKI, M., KAWAGUCHI, A., NAGAO, S., KONDO, T. and MIURA, S. (2004). A highly hydrophobic domain within hypervariable region 1 may be related to the entry of hepatitis C virus into cultured human hepatoma cells. *J Med Virol* **74**, 4, 546-555.
- LERAT, H., RUMIN, S., HABERSETZER, F., BERBY, F., TRABAUD, M. A., TREPO, C. and INCHAUPE, G. (1998). In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* **91**, 10, 3841-3849.
- LI, C. and ALLAIN, J. P. (2005). Chimeric monoclonal antibodies to hypervariable region 1 of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **86**, 1709-1716.
- LIN, S., ARCANGEL, P., MEDINA-SELBY, A., COIT, D., NG, P., NGUYEN, S., MCCOIN, C., GYENES, A., HU, C., TANDESKE, L., PHELPS, B. and CHIEN, D. (2005). Design of novel conformational and genotype-specific antigens for improving sensitivity of immunoassays for hepatitis C virus-specific antibodies. *J Clin Microbiol* **43**, 8, 3917-3924.
- LINDENTHAL, C. and ELSINGHORST, E. A. (1999). Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**, 8, 4084-4091.
- LIU, J., ZHU, L., ZHANG, X., LU, M., KONG, Y., WANG, Y. and LI, G. (2001). Expression, purification, immunological characterisation and applications of *Escherichia coli*-derived hepatitis C virus E2 proteins. *Biotechn. Appl. Biochem.* **34**, 109-119.
- LO, S. Y., SELBY, M. J. and OU, J. H. (1996). Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* **70**, 8, 5177-5182.
- LOHMANN, V., ROOS, A., KORNER, F., KOCH, J. O. and BARTENSCHLAGER, R. (1998). Biochemical and kinetic analyses of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Virology* **249**, 1, 108-118.
- LORENZO, L. J., DUENAS-CARRERA, S., FALCON, V., ACOSTA-RIVERO, N., GONZALEZ, E., DE LA ROSA, M. C., MENENDEZ, I. and MORALES, J. (2001). Assembly of truncated HCV core antigen into virus-like particles in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 4, 962-965.
- LORENZO, L. J., GARCIA, O., ACOSTA-RIVERO, N., DUENAS-CARRERA, S., MARTINEZ, G., ALVAREZ-OBREGON, J., PICHARDO, D., RAMOS, A., GUERRA, I. and MORALES, J. (2000). Expression and immunological evaluation of the *Escherichia coli*-derived hepatitis C virus envelope E1 protein. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **32** (Pt 2), 137-143.

- LOZACH, P. Y., LORTAT-JACOB, H., DE LACROIX DE LAVALETTE, A., STAROPOLI, I., FOUNG, S., AMARA, A., HOULES, C., FIESCHI, F., SCHWARTZ, O., VIRELIZIER, J. L., ARENZANA-SEISDEDOS, F. and ALTMAYER, R. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* **278**, 22, 20358-20366.
- LYRA, A. C., FAN, X. and DI BISCEGLIE, A. M. (2004). Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res* **37**, 5, 691-695.
- MANNS, M., MCHUTCHINSON, J. G., GORDON, S. C., RUSTGI, V. K., SHIFFMAN, M., REINDOLLAR, R., GOODMAN, Z. D., KOURY, K., LING, M. and ALBRECHT, J. K. (2001). Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**, 958-965.
- MARTIN, A. C. and THORNTON, J. M. (1996). Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. *J Mol Biol* **263**, 5, 800-815.
- MATSUURA, Y., SUZUKI, T., SUZUKI, R., SATO, M., AIZAKI, H., SAITO, I. and MIYAMURA, T. (1994). Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* **205**, 1, 141-150.
- MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A. D., WINTER, G. and CHISWELL, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 6301, 552-554.
- MCLAUCHLAN, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* **7**, 1, 2-14.
- MEUNIER, J. C., FOURNILLIER, A., CHOUKHI, A., CAHOUR, A., COCQUEREL, L., DUBUISSON, J. and WYCHOWSKI, C. (1999). Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J Gen Virol* **80** (Pt 4), 887-896.
- MIDDELBERG, A. P. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* **20**, 10, 437-443.
- MITRAKI, A., FANE, B., HAASE-PETTINGELL, C., STURTEVANT, J. and KING, J. (1991). Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science* **253**, 5015, 54-58.
- MODROW, S., FALKE, D., TRUYEN, U. (2003). Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin*. **2. Auflage**.
- MOGK, A., MAYER, M. P. and DEUERLING, E. (2002). Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *ChemBiochem* **3**, 9, 807-814.

MONDELLI, M. U., CERINO, A., MEOLA, A. and NICOSIA, A. (2003). Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *Journal of Biosciences* **28**, 3, 305-310.

MONECKE, M. (1999). Immunologische Untersuchungen zur Expression von Nicht-Strukturproteinen des Kartoffel Blattrollvirus (PLRV) mit spezifischen Antikörpern. *Dissertation, RWTH-Aachen*.

MORIYA, K., FUJIE, H., SHINTANI, Y., YOTSUYANAGI, H., TSUTSUMI, T., ISHIBASHI, K., MATSUURA, Y., KIMURA, S., MIYAMURA, T. and KOIKE, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* **4**, 9, 1065-1067.

MUJACIC, M., COOPER, K. W. and BANEYX, F. (1999). Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* **238**, (2), 325-332.

NGUYEN, M. H. and KEEFFE, E. B. (2004). Epidemiology and treatment outcomes of patients with chronic hepatitis C and genotypes 4 to 9. *Rev Gastroenterol Disord* **4 Suppl 1**, 14-21.

NISSIM, A., HOOGENBOOM, H. R., TOMLINSON, I. M., FLYNN, G., MIDGLEY, C., LANE, D. and WINTER, G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* **13**, 692-698.

OKOSHI, S., TAKEDA, Y., TAKIMOTO, M., SHIMOTOHNO, K., ASAKURA, H. and JAY, G. (2001). Molecular dissection of hepatitis C virus expression. *Intervirology* **44**, 1, 21-28.

OP DE BEECK, A., MONTSERRET, R., DUVET, S., COCQUEREL, L., CACAN, R., BARBEROT, B., LE MAIRE, M., PENIN, F. and DUBUISSON, J. (2000). The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J Biol Chem* **275**, 40, 31428-31437.

PARHAM, P. (1986). Handbook of Experimental Immunology Vol I: Immunochemistry. *Blackwell Scientific Publications* **Vol. I**, 1-23.

PATEL, A. H., WOOD, J., PENIN, F., DUBUISSON, J. and MCKEATING, J. A. (2000). Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J Gen Virol* **81**, Pt 12, 2873-2883.

PENIN, F. (2003). Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* **7**, 1, 1-21.

PENIN, F., DUBUISSON, J., REY, F. A., MORADPOUR, D. and PAWLOTSKY, J. M. (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology* **39**, 5-19.

PETERS, J. H. and BAUMGARTEN, H. (1990). Monoklonale Antikörper. *Springer-Verlag, Berlin*, **2. Auflage**.

PETRACCA, R., FALUGI, F., GALLI, G., NORAI, N., ROSA, D., CAMPAGNOLI, S., BURGIO, V., DI STASIO, E., GIARDINA, B., HOUGHTON, M., ABRIGNANI, S. and GRANDI, G. (2000). Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol* **74**, 10, 4824-4830.

PLÜCKTHUN, A. (1991). Antibody engineering: Advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Bio/Technology* **9**, 545-551.

PLÜCKTHUN, A., KREBBER, A., KREBBER, C., HORN, U., KNÜPFER, U., WENDEROTH, R., NIEBA, L., PROBA, K. and RIESENBERG, D. (1996). Producing antibodies in *Escherichia coli*. From PCR to fermentation. In: J. McCafferty and H.R. Hoogenboom (Eds), *Antibody engineering: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p 203.

POHLMANN, S., ZHANG, J., BARIBAUD, F., CHEN, Z., LESLIE, G. J., LIN, G., GRANELLI-PIPERNO, A., DOMS, R. W., RICE, C. M. and MCKEATING, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* **77**, 7, 4070-4080.

PORTER, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* **73**, 119-126.

PUNTORIERO, G., MEOLA, A., LAHM, A., ZUCHELLI, S., ERCOLE, B. B., TAFI, R., PEZZANERA, M., MONDELLI, M. U., CORTESE, R., TRAMONTANO, A., GALFRE, G. and NICOSIA, A. (1998). Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J* **17**, 13, 3521-3533.

RAAG, R. and WHITLOW, M. (1995). Single-chain Fvs. *Faseb J* **9**, 1, 73-80.

REHERMANN, B. and NASCIMBENI, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**, 3, 215-229.

REITER, Y., BRINKMANN, U., JUNG, S. H., LEE, B., KASPRZYK, P. G., KING, C. R. and PASTAN, I. (1994). Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Biol Chem* **269**, 28, 18327-18331.

RIECHMANN, L. and MUYLDERMANS, S. (1999). Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *Journal of Immunological Methods* **231**, 1-2, 25-38.

ROBERTSON, B. H. and BELL, B. P. (2001). Hepatitis A virus. *Encyclopedia of Life Sciences*.

ROBIN, S., PETROV, K., DINTINGER, T., KUJUMDZIEVA, A., TELLIER, C. and DION, M. (2003). Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv. *Mol Immunol* **39**, 12, 729-738.

ROCKSTROH, J. (2005). Therapie und Diagnostik der Hepatitis C bei HIV koinfizierten Patienten. *www.hepatitis-care.de*

ROHRBACH, P., BRODERS, O., TOLEIKIS, L. and DÜBEL, S. (2003). Therapeutic antibodies and antibody fusion proteins. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* **20**, 137-163.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H. and AL, E. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

SAKAMURO, D., FURUKAWA, T. and TAKEGAMI, T. (1995). Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* **69**, 6, 3893-3896.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and AL, E. (1996). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, New York*, **3rd edition**.

SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 12, 5463-5467.

SCARSELLI, E., ANSUINI, H., CERINO, R., ROCCASECCA, R. M., ACALI, S., FILOCAMO, G., TRABONI, C., NICOSIA, A., CORTESE, R. and VITELLI, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* **21**, 19, 5017-5025.

SCHEIN, C. H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio Technology* **7**, 1141-1148.

SCHMIEDL, A. and DÜBEL, S. (2004). Rekombinante Antikörper & Phagen Display. aus "Molekulare Biotechnologie", Wiley-VCH (2004) Hrsg.: M. Wink.

SCHREIER, E., RADUN, D., NEUHAUSER, H. and STARK, K. (2003). Hepatitis C. *Robert Koch Institut* **15**.

SIMMONDS, P., BUKH, J., COMBET, C., DELEAGE, G., ENOMOTO, N., FEINSTONE, S., HALFON, P., INCHAUSPE, G., KUIKEN, C., MAERTENS, G., MIZOKAMI, M., MURPHY, D. G., OKAMOTO, H., PAWLITSKY, J. M., PENIN, F., SABLON, E., SHIN, I. T., STUYVER, L. J., THIEL, H. J., VIAZOV, S., WEINER, A. J. and WIDELL, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 4, 962-973.

SMITH, D. B. (2001). Hepatitis C virus. *Encyclopedia of Life Sciences*.

SMITH, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.

SORENSEN, H. P. and MORTENSEN, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microb Cell Fact* **4**, 1, 1.

SPARKS, R. D. (2001). What is hepatitis C? *www.hepatitis-c.de*

- STOLLE, T. (2005). Development of bispecific filamentous bacteriophages for the generation of a novel automated screening system based on phage display technology. *Dissertation, RWTH-Aachen*.
- STRADER, D. B., WRIGHT, T. and THOMAS, D. L. (2004). Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatology* **39**, 4, 1147-1171.
- SULLIVAN, D. E., MONDELLI, M. U., CURIEL, D. T., KRASNYKH, V., MIKHEEVA, G., GAGLIO, P., MORRIS, C. B., DASH, S. and GERBER, M. A. (2002). Construction and characterization of an intracellular single-chain human antibody to hepatitis C virus non-structural 3 protein. *J Hepatol* **37**, 5, 660-668.
- SUNG, V. M., SHIMODAIRA, S., DOUGHTY, A. L., PICCHIO, G. R., CAN, H., YEN, T. S., LINDSAY, K. L., LEVINE, A. M. and LAI, M. M. (2003). Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* **77**, 3, 2134-2146.
- SUZUKI, R., SUZUKI, T., ISHII, K., MATSUURA, Y. and MIYAMURA, T. (1999). Processing and functions of Hepatitis C virus proteins. *Intervirology* **42**, 2-3, 145-152.
- SWAMY, K. H. and GOLDBERG, A. L. (1982). Subcellular distribution of various proteases in Escherichia coli. *J Bacteriol* **149**, 3, 1027-1033.
- TALMADGE, K. and GILBERT, W. (1982). Cellular location affects protein stability in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6, 1830-1833.
- TESSMANN, K., ERHARDT, A., HÄUSSINGER, D. and HEINTGES, T. (2002). Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol Methods* **103**, 1, 75-88.
- TIEN, P. C. and WRIGHT, T. (2005). Management and Treatment of Hepatitis C Virus Infection in HIV-Infected Adults: Recommendations from the Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center Program and National Hepatitis C Program Office. *Am J Gastroenterol* **100**, 1-17.
- TOMLINSON, I. M., COX, J. P., GHERARDI, E., LESK, A. M. and CHOTHIA, C. (1995). The structural repertoire of the human V kappa domain. *Embo J* **14**, 18, 4628-4638.
- TOMLINSON, I. M., WILLIAMS, S. C., CORBETT, S. J., COX, J. P. L. and WINTER, G. (1996). V base Sequence Directory. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html>)
- TOWBIN, H., STAEBLIN, T. and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.
- TURNER, D. J., RITTER, M. A. and GEORGE, A. J. (1997). Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. *J Immunol Methods* **205**, 43-54.

- WASLEY, A. and ALTER, M. J. (2000). Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* **20**, 1, 1-16.
- WEINER, A. J., BRAUER, M. J., ROSENBLATT, J., RICHMAN, K. H., TUNG, J., CRAWFORD, K., BONINO, F., SARACCO, G., CHOO, Q. L., HOUGHTON, M. and ET AL. (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **180**, 2, 842-848.
- WHITELEGG, N. R. and REES, A. R. (2000). WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Eng* **13**, 12, 819-824.
- WILKINSON, D. L. and HARRISON, R. G. (1991). Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. *Bio/Technology* **9**, 443-448.
- WILLIAMS, S. C., FRIPPIAT, J. P., TOMLINSON, I. M., IGNATOVICH, O., LEFRANC, M. P. and WINTER, G. (1996). Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J Mol Biol* **264**, 2, 220-232.
- WINTER, G., GRIFFITHS, A. D., HAWKINS, R. E. and HOOGENBOOM, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* **12**, 433-455.
- WINTER, G. and MILSTEIN, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293-299.
- WU D.Y. and UGOZZOLI, L. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biology* **10**, 233-238.
- WUNSCHMANN, S., MEDH, J. D., KLINZMANN, D., SCHMIDT, W. N. and STAPLETON, J. T. (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* **74**, 21, 10055-10062.
- YAN, B. S., LIAO, L. Y., LEOU, K., CHANG, Y. C. and SYU, W. J. (1994). Truncating the putative membrane association region circumvents the difficulty of expressing hepatitis C virus protein E1 in Escherichia coli. *J Virol Methods* **49**, 3, 343-351.
- YI, M., NAKAMOTO, Y., KANEKO, S., YAMASHITA, T. and MURAKAMI, S. (1997). Delineation of regions important for heteromeric association of hepatitis C virus E1 and E2. *Virology* **231**, 1, 119-129.
- YOO, E. M., CHINTALACHARUVU, K. R., PENICHET, M. L. and MORRISON, S.L. (2002). Myeloma expression systems. *J Immunol Methods* **261**, 1-20.
- YU, I. and NAGAOKA, M. (2004). Slowdown of water diffusion around protein in aqueous solution with ectoine. *Chemical Physics Letters* **388**, 316-321.
- ZHANG, M. Y., SCHILLBERG, S., ZIMMERMANN, S., LIAO, Y. C., BREUER, G. and FISCHER, R. (2001). GST fusion protein cause false positives during selection of viral movement protein specific single chain antibodies. *J. Virol. Methods* **91**, 139-147.

ZHONG, Y., CHENG, J., WANG, G., SHI, S., LI, L., ZHANG, L. and CHEN, J. (2002). Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* **8**, 5, 863-867.

VI.1 Eigene Veröffentlichungen

Teilergebnisse der Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Tur M.K. & Franken T., Huhn M., Zimmermann S., Zentgraf H., Fischer R. and Barth S. "Monoclonal antibodies for Hepatitis C virus envelope E2 protein from immunized mice", LifeTec Xchange Technologies for Life Sciences, 23.10.2003, Aachen, Germany

Franken T., Huhn M., Zimmermann S., Zentgraf H., Bock T., Fischer R., Finnern R. and Barth S. "Specific monoclonal antibodies for Hepatitis C virus envelope E2 protein from immunized mice", Bioforum, 07.12.2004, Liège, Belgium

Nähring J. & Franken T. and Barth S. "Recombinant HCV protein production for a novel diagnostic chip", 2nd BioRiver Congress - BioRiver meets Meuse-Rhine-Triangle, 15./16.03.2005, Aachen, Germany

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Fischer möchte ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation am Fraunhofer Institut IME und am Institut für Biologie VII der RWTH Aachen, sowie für die Betreuung und die Übernahme des Referats danken.

Herrn Prof. Dr. K. Ritter danke ich für die Übernahme des Co-Referats.

Die vorliegende Arbeit wurde innerhalb der PPD Gruppe des Fraunhofer Instituts IME angefertigt. Hier möchte ich gerne Herrn Prof. Dr. Dr. S. Barth für die wissenschaftliche Anleitung danken. Weiter möchte ich mich bei der Gruppe für ihr Interesse und ihre Zusammenarbeit bedanken.

Ebenfalls danke ich den Kooperationspartnern des DKFZ Heidelberg und der Universitätskliniken Tübingen und Düsseldorf für ihre Mitarbeit.

Weiter möchte ich den Mitarbeitern beider Aachener Institute für ihre Diskussionsbereitschaft und ihr Interesse danken.

Für ihre Unterstützung und ihr fortlaufendes Interesse, die direkte Betreuung und das geduldige Korrekturlesen, auch im Urlaub, danke ich Dr. R. Finnern und Dr. J. Nähring.

Herrn Prof. Dr. J. Bohrmann möchte ich einen herzlichen Dank dafür aussprechen, dass er sich als dritter Prüfer zur Verfügung gestellt hat und mir beratend zur Seite stand.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre Unterstützung, besonders meiner Mutter möchte ich für die Korrekturarbeiten während der Revision danken.

Die zurückliegenden fünf Jahre waren lang, an dieser Stelle möchte ich auch abseits der Wissenschaft allen danken, die mich unterstützt, an mich geglaubt und ein Kerzchen angezündet haben.

„Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.“ F. Kafka

Danke Lotte, Danke Claudi.

Summary

The Hepatitis C virus constitute a global health problem and is the most important member of non-A and non-B Hepatitis C viruses. Hepatitis C is deemed to be one of the most fatal diseases worldwide. Approx. 30 % of the 130 million Hepatitis C patients who carry a chronically Infection are developing cirrhosis of their liver or hepatocellular carcinoma.

In the dissertation on hand, antibodies against the Hepatitis C (subtype 1b) structure proteins core, E1 and E2 were synthesised. The coding sequences of full-length and deleted versions of the protein mentioned above served as starting material. In a first step sufficient amount of the respective protein was produced in *E. coli* for the later use as antigen in further analyses and immunisations and purified from the compartment of accumulation e.g. the cytoplasm or periplasm. SDS-PAGE, Immunoblot as well as MS/MS analysis were used to verify the recombinant produced structure proteins. Additionally synthetic peptides were designed as antigens, which represented specific internal amino acid sequences of the native proteins. The peptide synthesis was commercially ordered. In a second step already existing hybridoma clones were screened for their specificity by indirect ELISA. As part of a cooperation project monoclonal antibodies of one of the selected clones were utilised successfully in immunofluorescence analyses. By carrying out a "Two Step Cloning" two recombinant scFv antibodies were generated from the hybridoma originated monoclonal antibodies. These scFv antibodies also showed antigen specificity in ELISA. The corresponding amino acid sequences were analysed with regard to the totality and integrity. In a final step the *E. coli* produced and verified E2 antigens were mobilised for immunisation of mice resulting in the generation of an additional monoclonal antibody by application of the hybridoma technology. Moreover the recombinant antigens as well as the artificial peptide antigens were used in a second cooperation project for screening of a human Hepatitis phage-library. Arising from these analysis thirteen recombinant antibodies were identified and their amino acid sequences were further characterised.

The biotechnologically produced and verified anti Hepatitis C antibodies described above now open up the possibilities for detailed characterisation e.g. by analysis of affinity and specificity on native or denatured patients samples. A possible application as detection- or therapeutic antibody could be clarified.

CURRICULUM VITAE

DISSERTATION

03/04/2008

Promotionsprüfung

03/2003 - 03/2006

Promotion unter der Betreuung von

Prof. Dr. R. Fischer in der Arbeitsgruppe

„Pharmazeutische Produkt Entwicklung“ am

Fraunhofer Institut IME, Aachen

Thema der Promotion:

„Generierung, Charakterisierung und funktionaler

Assay von Antikörpern und Antikörperfragmente gegen
die HCV Strukturproteine core, E1 und E2“

UNIVERSITÄT

07/2002

Diplom am Institut für Zoologie, Abt. II

(Prof. Dr. J. Markl) an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

Thema der Diplomarbeit: „Herstellung der kompletten
rekombinanten cDNA des Hämocyanins HtH I“

Prüfungen in: Zoologie, Botanik, Anthropologie

03/1997 - 07/2002

Biologiestudium an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

10/1995 - 03/1997

Lehramtsstudium der Biologie und Geschichte SEK I
an der Universität Köln

STIPENDIUM

11/2001 - 04/2002

Forschungsstipendium für Diplomstudenten der
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

AUSBILDUNG

10/1993 - 07/1995

GaLa Bau Ethen, Aachen; Beruf: Gärtner

WEHRDIENST

10/1992 - 10/1993

Sanitätsstaffel beim DDO NATO E-3A Verband,
Geilenkirchen

SCHULAUSBILDUNG

1989 - 1992

Rhein-Maas-Gymnasium, Aachen

1986 - 1989

Realschule Brand, Aachen

1983 - 1986

Pius-Gymnasium, Aachen

1979 - 1983

Kath. Grundschule Marktstraße, Aachen

Aachen, 22.09.08