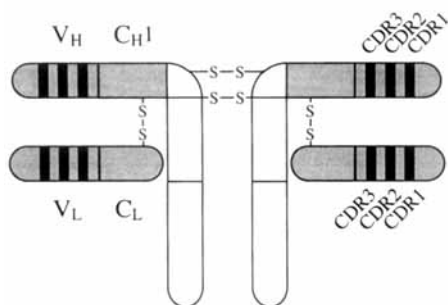


Spezifische Bindung von Antikörpern an DNA mit kombinatorischen Antikörper-Bibliotheken

Michael Famulok* und Dirk Faulhammer

Das Immunsystem eines höherentwickelten Organismus ist wohl das wirkungsvollste natürliche System zur hochspezifischen Erkennung der unterschiedlichsten Moleküle. Das Antikörperrepertoire des Menschen oder der Maus liegt in der Größenordnung von 10^7 bis 10^9 . Die enorme Zahl von Antikörper-Spezifitäten wird durch die Verknüpfung vergleichsweise weniger unvollständiger Gene erreicht (vgl. z.B. Immunglobulin G1, Schema 1). Für die variable Region V_H der schweren



Schema 1. Immunglobulin G1. Die in grau gezeigten Regionen stellen die Fab-Fragmente dar. Sie setzen sich zusammen aus der variablen Region (V_H) und der konstanten Region (C_H1) der schweren Kette sowie der variablen (V_L) und konstanten Region (C_L) der leichten Kette. Das Antigen wird überwiegend an die komplementaritätsbestimmenden Regionen (complementarity-determining regions, CDRs) innerhalb der V_H - und V_L -Bereiche gebunden.

Kette können etwa 100 V_H -Gene mit 30 Diversity-Genen (D-Genen) und 6 Joining-Genen (J-Genen) zu etwa 18000 unterschiedlichen kompletten V_H -Ketten verknüpft werden. Durch Ungenauigkeiten bei der Genverknüpfung und enzymatische Nachbehandlung erhöht sich diese Zahl um drei Zehnerpotenzen. Die variable Region V_L der leichten Kette kommt durch die Verknüpfung von 100 V_L -Genen mit 5 J-Genen zustande. Eine Antigen-Bindungsstelle setzt sich aus einer V_L - und einer V_H -Kette zusammen, deren zufällige Zusammenlagerung die Zahl der möglichen Kombinationen auf ca. 10^{11} erhöht. Somatische Mutationen in diesen Genbereichen können die Zahl der Antikörper-Spezifitäten noch einmal um mehrere Größenordnungen steigern. Diese Vielfalt wird vom Organismus aber bei weitem nicht ausgeschöpft. Das tatsächlich vor-

handene Repertoire reicht aus, um gegen eine immense Zahl möglicher Antigene spezifische Antikörper bilden zu können und dadurch einen Organismus wirkungsvoll gegen für ihn schädliche Substanzen oder Krankheitserreger zu schützen.

Dieser natürliche Prozeß hat allerdings Grenzen; sie zu überwinden wäre in vielerlei Hinsicht von großer Bedeutung für eine noch umfassendere technische, therapeutische oder diagnostische Anwendung der Antikörpertechnik. So ist die Herstellung von Antikörpern gegen Nucleinsäuren, wie Doppelstrang-DNA (dsDNA) oder RNA, durch klassische Immunisierung von Tieren meistens erfolglos, da Nucleinsäuren in der Regel nur eine schwache Immunantwort hervorrufen. Auch die Bildung katalytischer Antikörper durch Immunisierung mit Übergangszustandsanaloga (transition state analogues, TSAs) hat nicht immer zu Ergebnissen geführt, die man sich für einen wirkungsvollen Katalysator gewünscht hätte. Hinzu kommt, daß nur einige der Antikörper, die man aus TSA-immunisierten Tieren isolieren kann, das Antigen auch tatsächlich binden. Von den erhaltenen Bindern sind wiederum nur wenige katalytisch aktiv. Daher wird seit einiger Zeit versucht, Antikörper zu synthetisieren und dabei den natürlichen Prozeß nicht nur zu kopieren, sondern sogar zu verbessern^[1]. Das Ziel dabei ist, eine Antikörper-Bibliothek mit einer enormen Zahl an Bindungsspezifitäten einzusetzen, ohne dabei auf die Immunisierung von Tieren oder den Einsatz eukaryotischer Zellen angewiesen zu sein. Daß diese Bemühungen sehr vielversprechend sind, zeigt eine aktuelle Publikation von Barbas et al., in der über die spezifische Erkennung von Doppelstrang-DNA durch halbsynthetische Antikörper berichtet wird^[2].

Wie läßt sich dieser von der Natur vorgegebene kombinatorische Prozeß der Antikörperbildung im Labor kopieren und erfolgreich zur Selektion von Antikörpern mit neuen Funktionalitäten einsetzen? Wie werden vor allem die selektierten funktionellen Moleküle genetisch zurückverfolgt und amplifiziert?

Entscheidend für eine hohe Antikörperdiversität *in vitro* ist zum einen die Möglichkeit, Antigen-bindende Fragmente im Bakterium *Escherichia coli* zu exprimieren^[3]. Antigen-bindende Fragmente (Fab) sind Heterodimere, die sich aus einer leichten Kette und einem Fragment einer schweren Kette zusammensetzen. Zum anderen ist die Amplifikation von V_H - und V_L -Genen durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)^[4] wichtig. Dadurch konnten Bibliotheken aus der genomischen cDNA Antikörper-produzierender Zellen (Knochenmark, Milz, Blutzellen)

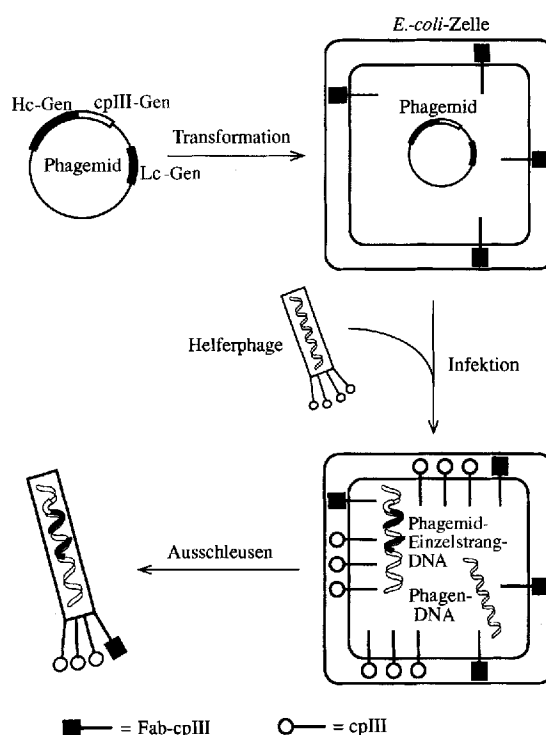
[*] Dr. M. Famulok, Dipl.-Chem. D. Faulhammer
Institut für Biochemie der Universität München
Am Klopferspitz 18 a, D-82152 Martinsried
Telefax: Int. + 89/8578-2470

einfach zusammengestellt und halbsynthetisch hergestellte Antikörper-Gene verwendet werden, bei denen ein Teil einer Komplementaritätsbestimmenden Region (complementarity-determining region, CDR) durch ein randomisiertes Oligonucleotid ersetzt war. Schließlich mußte noch ein Gen-Vehikel – ein Vektor – gefunden werden, das geeignet war, eine möglichst große Zahl von Antikörper-Genen zu klonieren und die entsprechenden Proteine in den fremden Zellen zu vermehren. Dazu wurde ein Bakterienvirus (Phage) verwendet, der die Gene für Fragmente der schweren und leichten Kette enthält sowie spezifisch und mit hoher Effizienz Bakterien infizieren kann^[5]. Phagen haben darüber hinaus den Vorteil, daß auf ihrer Oberfläche beliebige Peptide exprimiert werden können, wie Smith bereits 1985 feststellte^[6]. Dazu wird die das Peptid codierende DNA so in den Phagenvektor kloniert, daß das resultierende Peptid mit der N- oder der C-terminalen Region des Gen-III-Proteins des Phagen fusioniert ist. Dieses Gen-III-Protein (cpIII) ist für die Bindung des Phagen an das Bakterium erforderlich und wird an seiner Oberfläche zu etwa vier Kopien pro Virion exprimiert. Das gleiche Fusionsprinzip ließ sich auf die Antikörper-Gene anwenden^[7]. Für die Konstruktion der Antikörper-Bibliothek wurde ein Klonierungsvektor (fdCAT1) verwendet, durch den die schwere Kette durch die cpIII-Fusion mit der inneren Membran des Bakteriums verankert und die leichte Kette in den Periplasmarraum, den Raum zwischen der inneren und äußeren Membran des Bakteriums, ausgeschleust wurde. Die beiden Ketten konnten sich dann auf der Membran zum kompletten Antikörper zusammensetzen. So konnte die genetische mit der Strukturinformation verbunden werden: Die Phagen enthielten im Inneren die Gene für die Antikörper und exprimierten diese auf ihrer Außenseite, so daß sie mit ihrem Antigen in Lösung wechselwirken konnten. Damit wurde es auch möglich, die Phagen durch Bindung an immobilisierte Antigene z.B. affinitätschromatographisch zu selektieren. Mit den selektierten Phagen konnten dann erneut Bakterien infiziert werden und der Selektionsprozeß so lange wiederholt werden, bis die funktionellen Fab-Fragmente maximal angereichert waren.

Diese Methode hatte allerdings zwei Nachteile: Für einen Eintritt in das Bakterium benötigt der Phage das Protein cpIII auf seiner Oberfläche. Nach der direkten Klonierung der Antikörper-Gene in den Phagen enthielten aber alle vier auf der „Spitze“ des Virions exprimierten cpIII-Moleküle jeweils ein Fab-Fragment, wodurch die Infektiosität des Phagen drastisch verringert wurde. Außerdem verstärkten die vier Fab-Fragmente auf dem Phagenende die Bindungskapazität; schwache Binder konnten so durch Chelatisierung niedrige Dissoziationskonstanten vortäuschen.

Dieses Problem wurde mit einem speziellen Klonierungsvektor für die Antikörper-Bibliothek, einem Phagemid mit der Bezeichnung pComb3, in Kombination mit einem Helferphagen umgangen (Schema 2). Ein Phagemid ist ein Hybrid aus einem Phagen und einem Plasmid, der sich aus Teilen der Einzelstrang-DNA von Phagen und Doppelstrang-DNA-Plasmid-Anteilen zusammensetzt. Phagemide werden in einer Wirtszelle wie Doppelstrang-Plasmide vermehrt. Wenn die Zellen gleichzeitig mit dem Helferphagen (M13) infiziert werden, bewirkt dieser die Exprimierung der für die Verpackung von Phagenpartikeln, also auch für die des Phagemids, benötigten Proteine; in diesem Fall können die Phagemide wie Einzelstrang-DNA-Phagen ver-

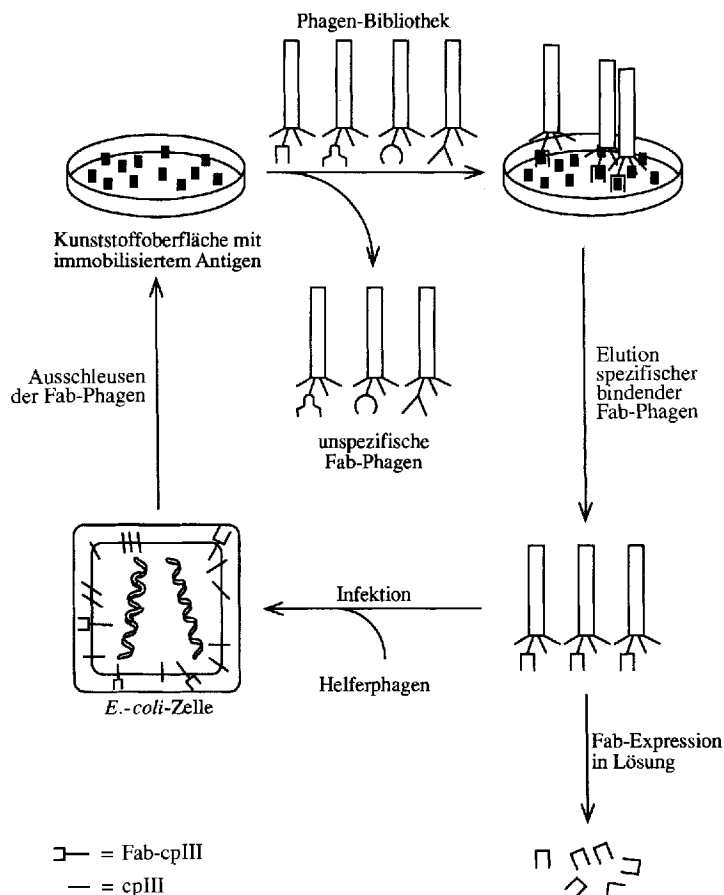
mehrt werden. Neben den Hüllproteinen entstehen cpIIIs und Fab-cpIII-Fusionsproteine, deren Gene in der DNA des Helferphagen bzw. im Phagemid enthalten sind. Wurde die DNA des Helferphagen gezielt mutiert, kommt es zur bevorzugten Verpackung der Phagemid-DNA. Wenn der zusammengesetzte Phage aus der Zelle ausgeschleust wird, wird seine Oberfläche mit drei cpIIIs und einem Fab-cpIII-Fusionsprotein versehen. Der ausschleusende Phage enthält somit die genetische Information für die Antikörper-Gene in Form der Einzelstrangkopie der Phagemid-DNA sowie ein Fab- und die zur Infektion nötigen cpIII-Moleküle an seiner Oberfläche. Von jedem Phagen – und damit auch von jedem Satz von Antikörper-Genen mit den entsprechenden Fab-Fragmenten – entstehen so etwa 10^5 Kopien.



Schema 2. Phagemid-rescue (Phagemid-Regenerierung) der Phagemid-DNA durch Helferphagen. Das Phagemid enthält die Gene für die leichte Kette (Lc) und für das Fusionsprotein aus cpIII und der schweren Kette (Hc) des Fab-Fragments. Nach Transformation in die *E.-coli*-Zelle wird das Fab-cpIII-Fusionsprotein (Fab-cpIII) im Periplasmarraum exprimiert (vgl. Text). Der Helferphage exprimiert alle Proteine, die für den Aufbau von Viruspartikeln benötigt werden, einschließlich cpIII. Da das Phagemid Phagen-Verpackungssignale trägt, wird auch diese DNA als Einzelstrang in Phagen-Partikel verpackt.

Der Selektionsschritt, auch „Panning“ genannt, ist in Schema 3 skizziert. Der gesamte Pool an etwa 10^{12} (10^5 Kopien $\times 10^7$ unterschiedliche Phagen der Bibliothek) Fab enthaltenden Phagen wird mit dem an einer Kunststoffoberfläche immobilisierten Antigen inkubiert. Die nicht bindenden Phagen werden gewaschen und die so etwa 100fach angereicherten spezifisch bindenden Phagen eluiert, z.B. durch Affinitätselution mit dem Antigen oder durch Erniedrigung des pH-Wertes. Mit den aus dem Eluat isolierten Phagen werden dann erneut Bakterienzellen infiziert, so daß die Phagemid-DNA während des Zellwachstums amplifiziert werden kann. Diese wird dann durch Infektion mit den Helferphagen verpackt und das Fab, wie

beschrieben, an der Oberfläche des neuen ausgeschleusten Phagen exprimiert. Diese Schritte werden wiederholt, bis der größte Teil der Phagen des so angereicherten Fab-Phagen-Pools an das Antigen bindet. Die DNA dieser spezifisch bindenden Fab-Phagen wird anschließend isoliert, das *cpIII*-Gen durch Restriktionsenzyme entfernt und das Phagemid durch Ligation wiederhergestellt. Mit diesem Phagemid werden wieder Bakterienzellen infiziert, die aber nun, da das *cpIII*-Gen fehlt, das unfusionierte Fab-Fragment in löslicher Form in den Zellen exprimieren. Der Bakterien-Zellextrakt enthält also die freien Fab-Fragmente, deren jeweilige Bindung an das Antigen nun geprüft werden kann.



Schema 3. Panning-Prozess zur Selektion Antigen-spezifischer Fab-Fragmente (Erläuterungen siehe Text).

Barbas et al. gingen bei der Isolierung spezifisch DNA-bindender Antikörper von drei Antikörper-Bibliotheken aus, die durch Randomisierung bestimmter Bereiche der V_H -Kette hergestellt worden waren und jeweils aus etwa 10^8 individuellen Molekülen bestanden^[2]. Dabei wurden bei der ersten Bibliothek 10, bei den anderen beiden 16 Aminosäuren der CDR3 der schweren Kette randomisiert. Diese Region des Antikörper-Moleküls trägt generell am stärksten zur Antigen-Erkennung bei, da sie die variabelste der drei CDRs ist. Für die ersten beiden Bibliotheken wurde die V_L -Region konstant gehalten, für die dritte auch hier ein kurzer Teil randomisiert. Zum Panning wurde dsDNA aus humaner Plazenta auf einer Kunststoffoberfläche immobilisiert. Nach vier Panning-Cyclen wurden individuelle Fab-Fragmente mit dem Enzym-gekoppelten Immunoas-

say (ELISA) auf ihr Bindungsverhalten an DNA geprüft. Zwei Fab-Fragmente (SD1 und SD2) gaben ein deutlich positives Signal. Beide an immobilisierte DNA gebundene Fab-Fragmente konnten mit einer nur 10^{-9} M Lösung von dsDNA eluiert werden, was auf eine hohe Affinität mit einer Dissoziationskonstante zwischen 10 und 100 nM deutet. Der Antikörper SD1 bevorzugte zur Bindung eindeutig G-C-reiche Regionen: Bei steigenden Konzentrationen inhibierten poly(dG) · poly(dC) und poly(dG-dC) · poly(dG-dC) seine Bindung an die DNA, nicht aber poly(dA) · poly(dT) oder poly(dA-dT) · poly(dA-dT).

Die von Barbas et al. selektierten Antikörper erfüllen noch nicht die Ansprüche für eine technische oder medizinische Anwendung. Dazu müßten sie mit deutlich höherer Sequenzspezifität binden. Die Fab-Fragmente sind aber mit ihrer Präferenz für G-C-reiche Regionen die Basis für eine neue Klasse sequenzspezifisch DNA-bindender Moleküle. Dies wird deutlich, wenn man die 16mer V_H -Region von SD1 mit der 10mer V_H -Region von SD2 vergleicht. Die Aminosäuresequenzen der beiden ursprünglich randomisierten Regionen ähneln sich beträchtlich.

SD1: Gly-Arg-Ala-Tyr-Gly-Gly-Asn-Gly-Leu-Lys-Met-Met-Ser-Leu-Asp-Asn

SD2: Gly-Arg-Gly-Trp-Ser-Gly—————Ser-Leu-Asp-Ile

SD1 enthält allerdings sechs weitere Aminosäuren. Da dies der wesentlichste Unterschied zwischen den beiden Fab-Fragmenten ist, nimmt man an, daß dieser Aminosäure-Einschub für die G-C-Präferenz von SD1 ausschlaggebend ist. Es wird untersucht, ob Veränderungen in dieser Region einen Einfluß auf die Sequenzspezifität der Antikörper haben.

Für die Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen maßgeschneiderte Antikörper könnten vielfältig genutzt werden: So könnten sie für Genom-Kartierungen eingesetzt werden, indem sie bestimmte Sequenzbereiche blockieren und dadurch die entsprechende Stelle auf der DNA für andere Enzyme unzugänglich machen. Synthetische DNA-bindende Fab-Fragmente könnten in die Kontrolle der Expression bestimmter Gene eingreifen, was in vielerlei Hinsicht therapeutische Anwendung finden sollte. In der Gendiagnostik könnten sequenzspezifische Antikörper bestimmte DNA-Sequenzen identifizieren. Dies sind einige der möglichen Anwendungen. Wichtig ist die im Prinzip unlimitierte Anwendungsbreite der hier beschriebenen Methode, sei es für die Herstellung synthetischer Biokatalysatoren oder für die Neutralisierung von Viren oder Toxinen. Eine der wichtigsten Zukunftsperspektiven dürfte die Selektion und die Verbesserung katalytischer Antikörper sein. Erste Erfolge gibt es bereits^[8, 9]. So konnten Chen et al. kürzlich eine Antikörper-Bibliothek aus TSA-Hapten-immunisierten Mäusen in Phagen übertragen^[8]. Aus dieser Phagen-Bibliothek wurden Klone isoliert, die an das Hapten banden und zum Teil katalytisch aktiv waren. Dies war der Beweis für die prinzipielle Anwendbarkeit kombinatorischer Fab-Bibliotheken für die Bildung katalytischer Antikörper.

Es ist zu erwarten, daß bald ein Arsenal von Antikörperketten mit unterschiedlichen Bindungsmotiven zur Verfügung stehen wird. Die entsprechenden Gene könnten nach dem Baukastenprinzip zum gezielten Aufbau von Designer-Antikörpern ge-

nutzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Selektion von Antikörpern, die selbst unter exotisch anmutenden Bedingungen, z.B. in Gegenwart organischer Lösungsmittel oder toxischer Substanzen, funktionieren könnten.

- [1] R. A. Lerner, A. S. Kang, J. D. Bain, D. R. Burton, C. F. Barbas III, *Science* **1992**, 258, 1313–1314; A. S. Kang, T. M. Jones, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 11120–11123; C. F. Barbas III, E. Björling, F. Chiodi, N. Dunlop, D. Chababa, T. M. Jones, S. L. Zebede, M. A. Persson, P. L. Nara, E. Norrby, D. R. Burton, *ibid.* **1992**, 89, 9339–9343; D. R. Burton, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 405–411.
 [2] S. M. Barbas, P. Ghazal, C. F. Barbas III, D. R. Burton, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2161–2162.
 [3] A. Skerra, A. Plückthun, *Science* **1988**, 240, 1038–1041; M. Better, C. P. Chang, R. R. Robinson, A. H. Horvitz, *ibid.* **1988**, 240, 1041–1043.

- [4] J. W. Larrick, Y. L. Chiang, R. Cheng-Dong, G. Senyk, P. Casali, *Prog. Biotechnol.* **1988**, 5, 231; R. Orlandi, D. H. Güssow, P. T. Jones, G. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 3833–3837.
 [5] W. D. Huse, L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science* **1989**, 246, 1275–1281.
 [6] G. P. Smith, *Science* **1985**, 228, 1315–1316; J. K. Scott, G. P. Smith, *ibid.* **1990**, 249, 386–390.
 [7] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell, *Nature* **1990**, 348, 552–554; A. S. Kang, C. F. Barbas III, K. D. Janda, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 4363–4366; C. F. Barbas III, A. S. Kang, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *ibid.* **1991**, 88, 7978–7982; T. Clackson, H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, G. Winter, *Nature* **1991**, 352, 624–628.
 [8] Y.-C. J. Chen, T. Danon, L. Sastry, M. Mubarak, K. D. Janda, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 357–358.
 [9] B. Posner, J. Smiley, I. Lec, S. Benkovic, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 145–150; J. D. Stewart, S. J. Benkovic, *Int. Rev. Immunol.* **1993**, 10, 229–240.

Anorganische Synthesechemie von und mit Hochtemperaturspezies am Beispiel subvalenter Aluminiumhalogenide

Jörg J. Schneider*

Durch die Pionierarbeiten von P. L. Timms vor nunmehr 20 Jahren wurde zum ersten Mal das Synthesepotential subvalenter, d. h. unterhalb der maximalen Gruppenwertigkeit liegender Verbindungen EX_n , insbesondere der dritten und vierten Hauptgruppe und hier speziell mit $E = B$ und Si , erschlossen^[1] (Schema 1). Zur Erzeugung und weiteren Umsetzung dieser Teilchen mit geeigneten Reaktionspartnern wurde eine Reihe spezieller Arbeitstechniken entwickelt, insbesondere auch, um solche Hochtemperatur(HT)-Spezies im Labormaßstab in präparativen Mengen handhabbar zu machen^[1, 2]. Mittlerweile ist eine Vielzahl derartiger Moleküle experimentell zugänglich (Tabelle 1). Zur Synthese bedient man sich zumeist Dis- und Komproportionierungsreaktionen (Schema 2). In allen Fällen ist dabei als zweiter Schritt nach der eigentlichen Synthese bei meist hoher Temperatur das Abfangen bei tiefer Temperatur, z.B. bei

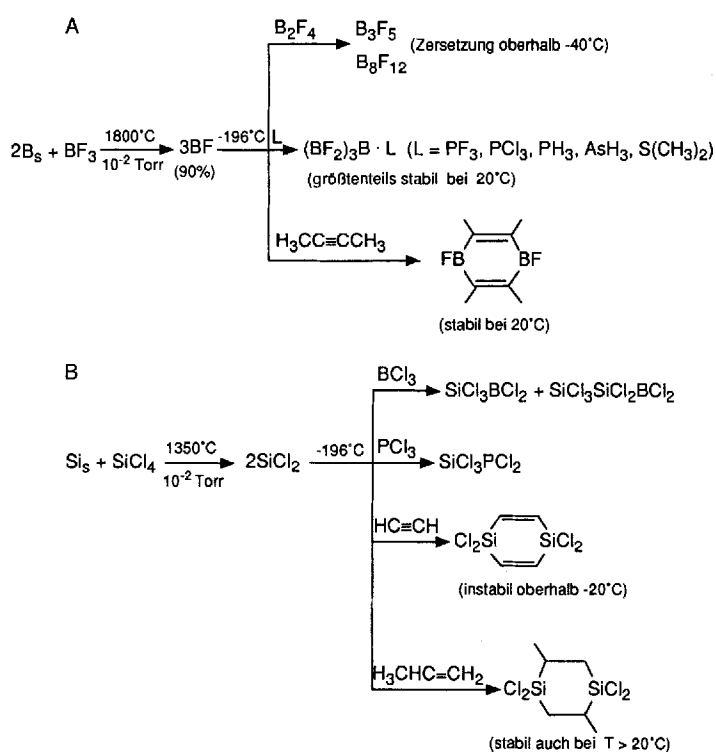


Tabelle 1. Einige ausgewählte Beispiele präparativ zugänglicher, subvalenter HT-Spezies von Hauptgruppenelementen [2 b].

BF	CS	
BCl	CF ₂	
BCl ₂	CBr ₂	
B ₂ O ₂		
AlCl	SiO	P ₂
AlF	SiS	PF
	SiC	PN
	SiF ₂	PF ₂
	SiCl ₂	

[*] Priv.-Doz. Dr. J. J. Schneider^[+]
 Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
 Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr

[+] Neue Adresse:
 Institut für Anorganische Chemie der Universität-Gesamthochschule
 Universitätsstraße 5–7, D-45117 Essen
 Telefax: Int. + 201/183-2402

Schema 1. Ausgewählte Cokondensationsreaktionen der subvalenten HT-Spezies BF (A) und $SiCl_2$ (B) mit organischen und anorganischen Verbindungen bei $-196^\circ C$.

$-196^\circ C$, notwendig, um die außerordentliche Reaktivität dieser Moleküle „zu bändigen“. So weisen die Zentralatome aller in Tabelle 1 vorgestellten HT-Moleküle Koordinationszahlen auf, die weit unterhalb ihrer maximalen Koordinationszahl liegen, was ihre hohe Reaktivität begründet. Die schonende Um-