



# Antikörper-Expression auf Bakterien

## Autodisplay-Technologie zur effektiven Antikörperentwicklung

Wilhelmine Weckenbrock, Münster

Antikörper bilden die größte Gruppe in der Arzneistoffklasse der Biologicals. Heute sind in Europa über 30 Antikörper zur Therapie und Diagnostik diverser Krankheiten wie Krebs und Rheuma oder zur passiven Impfung zugelassen. Die Autodisplay-Technologie hat das Potenzial, das Screening nach neuen, hochspezifischen Antikörper-Varianten mit Hilfe von Bakterien zu ermöglichen. In der hier vorgestellten Arbeit konnte die Entwicklung einer derartigen Methode einen entscheidenden Schritt voran gebracht werden.

### Autodisplay-Technologie

Bei der Autodisplay-Technologie wird ein Plasmid in das Wirt-Bakterium, beispielsweise *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert. Auf diesem Plasmid befindet sich ein künstliches Gen, das für ein Fusionsprotein codiert. Dieses Fusionsprotein besteht aus einem Signalpeptid, das den Transport über die innere Membran des Bakteriums vermittelt, dem jeweiligen Protein von Interesse und einer Translokationsdomäne, dem sogenannten Autotransporter. Die Autotransporterdomäne ermöglicht den Transport des Proteins über die äußere Bakterienmembran und die Verankerung des Proteins auf der Zelloberfläche.

### Oberflächenexpression vollständiger Antikörper

Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Sie besitzen sowohl konstante Domänen als auch hochvariable Regionen, die das Antigen binden (Abb. 1). Während die Oberflächenexpression ganzer Antikörper auf Säugetier- oder Hefezellen bereits realisiert wurde, ist für Bakterien zuvor lediglich die Oberflächenexpression von Antikörperfragmenten beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals ein kompletter, rekombinanter Antikörper in einem Bakterium produziert, aus dem Bakterium ausgeschleust und anschließend fest auf dessen Oberfläche verankert. Gegenstand der Untersuchung war der chimäre Antikörper T84.66, der gegen das Carcinoembryonale Antigen (CEA) gerichtet ist.

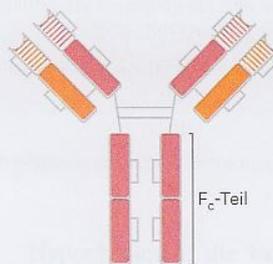


Abb. 1. Struktur eines IgG-Antikörpers, rot: schwere Kette; orange: leichte Kette; ausgefüllt: konstante Domäne; schraffiert: variable Region [Grafik: Weckenbrock]

CEA ist ein Tumormarker, der 1965 erstmals isoliert und beschrieben wurde und heute in der Diagnostik von Darmkrebs eine Rolle spielt.

Zunächst wurden die schwere und die leichte Kette des Antikörpers getrennt voneinander auf der Oberfläche derselben *E. coli*-Zellen exprimiert. Der Nachweis der Oberflächenständigkeit der Antikörperketten wurde mit zwei voneinander unabhängigen Methoden erbracht (Protease-Sensitivitäts-Test und Durchflusszytometrie). Die Mobilität der Verankerungsdomäne in der äußeren Bakterienmembran erlaubte die Zusammenlagerung der Antikörperketten

**Dr. Wilhelmine Weckenbrock**

Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der WWU  
Münster, Corrensstr. 48, 48149 Münster  
E-Mail: wilhelmine.weckenbrock@googlemail.com

## Glossar

**Protease-Sensitivitätstest:** Nachweis oberflächenständiger Proteine auf Zellen durch Behandlung der Zellen mit einer nicht Zellmembran-gängigen Protease

**Durchflusszytometrie:** Messverfahren zur Analytik der Fluoreszenz einzelner Zellen

**Phagen-Display:** Methode zur Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von Bakteriophagen

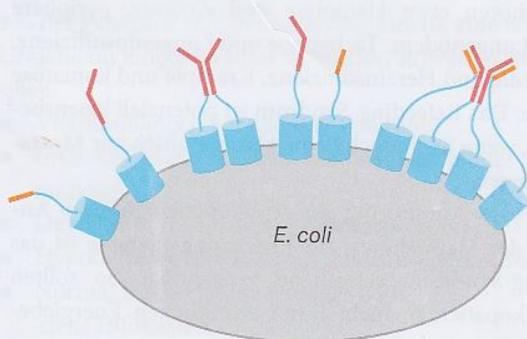
zu einem vollständigen Antikörper (Abb. 2). Schließlich konnte die Funktionalität des Antikörpers durchflusszytometrisch belegt werden, also seine Fähigkeit zur Bindung des CEA. Somit ist in dieser Arbeit zum ersten Mal die Oberflächenexpression eines funktionalen, vollständigen Antikörpers auf *E. coli* gelungen.

Zusätzlich wurde auch ein gegen den EGF(epidermal growth factor)-Rezeptor gerichtetes Antikörperfragment mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli* exprimiert und das Bindungsvermögen dieser Bakterien an Tumorzellen untersucht.

## Ausblick

Die Oberflächenexpression von Antikörpern auf Bakterien soll zukünftig zur effizienten Entwicklung neuer Antikörper gegen beliebige Targets genutzt werden (Screening). Hierzu ist die Erstellung von bakteriellen Bibliotheken, bei der jedes Bakterien-Individuum einen Antikörper mit einer anderen Sequenz exprimiert, notwendig. Ein Vorteil der Durchmusterung einer solchen bakteriellen Bibliothek wäre die Möglichkeit, eine Hochdurchsatzanalytik, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie, zu betreiben.

Bei der Durchmusterung von Phagen-Bibliotheken („Bio-Panning“) werden bindende Varianten an einer mit dem Antigen gekoppelten Matrix gebunden und später eluiert. Dieses Aufreinigungsverfahren hat den Nachteil, dass be-



**Abb. 2.** Prinzip der Oberflächenexpression eines vollständigen Antikörpers auf *E. coli*. Orange: leichte Kette; rot: schwere Kette. Nach getrennter Expression von schweren und leichten Ketten erlaubt die Mobilität der Verankerungsdomäne deren spontane Zusammenlagerung [Grafik: Weckenbrock]

sonders stark bindende Varianten diskriminiert werden können, wenn sie durch den Eluenten nicht mehr von der Matrix gelöst werden können. Bei der durchflusszytometrischen Durchmusterung zellulärer Bibliotheken besteht diese Problematik nicht, da das Selektionsprinzip keine Bindung der Zellen erfordert, sondern lediglich eine (Fluoreszenz-) Markierung des Antigens. Die Arbeit mit vollständigen Antikörpern bietet zudem Vorteile gegenüber der Expression von Antikörperfragmenten, da der Fc-Teil (Abb. 1) vorhanden ist. Dieser ist nicht an der Bindung des Antigens beteiligt und kann beispielsweise zur Kopplung an andere Strukturen (z.B. Fluoreszenzfarbstoffe) verwendet werden.

Ein weiteres Forschungsfeld, in dem Antikörper präsentierende *E. coli* zukünftig von Nutzen sein könnten, ist das „bakterielle Tumortargeting“, also die gezielte Adressierung malignen Gewebes durch Bakterien. Zwar eignen sich Bakterien aufgrund der pyrogen wirkenden Lipopolysaccharide (LPS) in ihrer Außenmembran nicht zur systemischen Applikation, jedoch ist der Magen-Darm-Trakt ohnehin stark von Bakterien besiedelt (Mikrobiom). Daher ist die orale oder rektale Applikation von Bakterien möglich. Bekannt ist die Applikation lyophilisierter Bakterienkulturen über magensaftresistente Arzneiformen, beispielsweise zur Sanierung der Darmflora nach Antibiotikagabe. Auf ähnliche Weise könnten Bakterien mit spezifischer Affinität zu Darmkrebs-assoziierten Strukturen zur Behandlung kolorektaler Krebserkrankungen angewendet werden. Zwar können Bakterien im Gegensatz zu freien Proteinen das Gewebe kaum penetrieren, allerdings entwickelt sich Darmkrebs in der Mehrzahl der Fälle aus Polypen, die in das Darmlumen hineinragen. Somit muss dieser Umstand nicht zwingend einen Nachteil darstellen.



**Dr. Wilhelmine Weckenbrock** studierte Pharmazie an der WWU Münster und fertigte am dortigen Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Jose ihre Disser-

tation an. Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Oberflächenexpression rekombinanter Proteine auf gramnegativen Bakterien mittels der Autodisplay-Technologie. Ziel des Projekts von Frau Weckenbrock war die Expression eines funktionalen, vollständigen Antikörpers mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli*. Ihre herausragende Dissertation wurde im April 2016 von der Verspohl-Stiftung ausgezeichnet.