

## „Magic bullets - Kamelide Antikörperfragmente als Allzweckwaffe für die menschliche Immunabwehr“

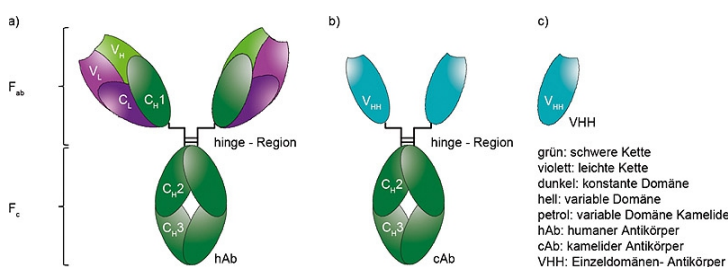
Fena Ochs und Daniel Degreif

Zur Zeit der spanischen Eroberung Südamerikas hielten sich allein die Inkas über 10 Millionen von ihnen; heute erleben alle diejenigen, die nicht gerade in den unzugänglichen Regionen der Anden leben oder an ihrem Fleisch oder ihrer Wolle interessiert sind, Lamas nur noch im Zoo - wo sie jeden Störenfried mit erstaunlicher Treffsicherheit anspucken.

Interessanterweise ist das Lama nun in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt. Lamas besitzen nämlich eine spezielle Form von Antikörpern, deren zentrale Untereinheit bald zur Allzweckwaffe in der Unterstützung des menschlichen Immunsystems zur Krankheitsbekämpfung werden könnte. Internationale Forscherteams entwickeln aus diesen Antikörpern bereits heute Medikamente zur Bekämpfung von Lebensmittelvergiftungen, HIV oder Tropenkrankheiten wie Malaria oder die Afrikanische Schlafkrankheit, mit denen sich jährlich über 600 Millionen Menschen infizieren.

Generell fungieren Antikörper als wichtige Werkzeuge in der experimentellen Forschung und medizinischen Anwendung. Auch der Mensch produziert Millionen verschiedener Antikörper-Moleküle, die hoch spezifische Bindepartner für quasi jede existierende biologische und chemische Komponente darstellen. Sie erkennen Zielstrukturen (Antigene) auf der Oberfläche infektiöser Partikel wie Viren und Bakterien, binden und markieren sie und alarmieren so die Fresszellen des menschlichen Körpers, die für den Abbau der Eindringlinge sorgen.

Konventionelle Antikörper, zu denen auch die menschlichen Antikörper zählen, bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Peptidketten, die durch Schwefelbrücken verbunden sind. Jeweils eine leichte und eine schwere Kette bilden zusammen eine Antigen-Bindestelle, das Paratop, welches flach oder konkav ist. Für die Antigenbindung verantwortlich sind dabei die sogenannten variablen Domänen  $V_L$  und  $V_H$  (siehe Abb.1a).

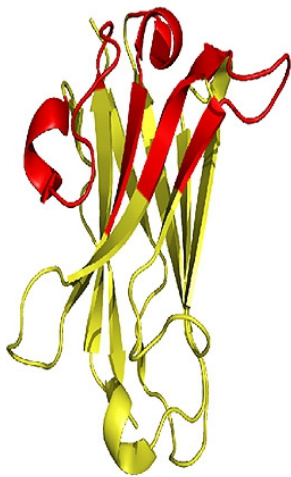


**Abbildung 1:** Aufbau von humanen und kameliden Antikörpern.  
**a)** Humane Antikörper zeigen einen klassischen Aufbau, der in allen Wirbeltieren zu finden ist: Sie besitzen zwei schwere und zwei leichte Ketten. Jede der beiden Antigenbindestellen (hier ausgebuchtet dargestellt) wird von der variablen Domäne einer schweren ( $V_H$ ) und der variablen Domäne einer leichten Kette ( $V_L$ ) geformt.  
**b)** Kameliden Antikörpern fehlen die leichten Ketten. Auch die  $C_H1$ -Domänen sind nicht vorhanden. Dafür ist die  $V_H$ -Domäne zur VHH Domäne vergrößert.  
**c)** In Mikroorganismen lassen sich VHHs, sogenannte Einzeldomänen-Antikörper-Fragmente, herstellen.

Die von ihnen mithilfe von drei Oberflächenschleifen (sogenannte *complementary determining regions* oder CDRs) gebildete Tasche erkennt das Antigen und bindet dieses.

Konventionelle Antikörper werden bereits therapeutisch eingesetzt, beispielsweise zur Bekämpfung von Brustkrebs, multipler Sklerose oder rheumatoider Arthritis. Die spezifischen Antikörper werden dabei klassischerweise über die sogenannte Hybridom-Technik hergestellt. Dabei wird zuerst eine Maus mit dem Ziel-Antigen immunisiert. Aufgrund der Immunantwort kommt es zur Bildung von Antikörpern durch Leukozyten (B-Zellen). Diese Zellen werden nun entnommen und mit Tumorzellen fusioniert, so dass man Klone erhält, die

spezifisch einen Antikörper bilden, ihn in das Kulturmedium abgeben und unbegrenzt wachsen. Aus dem Überstand einer solchen Zellkultur lassen sich dann die Antikörper durch mehrstufige Proteinreinigungsverfahren gewinnen. Nachteile der therapeutischen Nutzung dieser monoklonalen Antikörper sind die hohen Produktionskosten sowie die Temperatur- und pH-Empfindlichkeit der Moleküle. Aufgrund dieser Nachteile begann die Suche nach kleineren Antikörper-ähnlichen Molekülen.



**Abbildung 2:** Struktur einer kameliden VHH Antikörperdomäne. Rot hervorgehoben sind die *complementary determining regions*. Die übrige Proteinstruktur ist gelb dargestellt. Die Abbildung wurde selbst erstellt mit PyMOL aus Strukturdaten der PDB (1I3U.pdb).

1989 entdeckte der belgische Professor Raymond Hamers, dass bei manchen Tierarten wesentlich einfacher aufgebaute Antikörper vorkommen. Neuwelt-Kamelide, zu denen auch das Lama zählt, produzieren in Ergänzung zu den konventionellen Antikörpern eine zusätzliche Sorte von speziellen Antikörpern, die anstelle von vier nur aus zwei Ketten bestehen (Abb.1). Im Vergleich zu herkömmlichen Antikörpern, die aus ca. 1500 Aminosäurebausteinen bestehen, sind diese Antikörper wesentlich kleiner ( $< 1000$  Aminosäuren), kompakter und stabiler. Wie in Abbildung 1 gezeigt, ist für die Bindung des Antikörpers an das Zielmolekül normalerweise die Kopfreion zuständig, die aus der  $V_L$ - und der  $V_H$ - Domäne besteht. Bei Lamas reicht dafür eine einzige, zur  $V_H$ -Domäne strukturähnliche, Domäne aus, die sogenannte VHH Domäne (variable domain of the heavy-chains of heavy-chains-only antibodies). Sie ist direkt über die hinge-Region mit der Fc-Domäne verbunden (siehe Abb.1b). Bei humanen Antikörpern wird die Bindung an das Zielmolekül durch sechs Schleifenregion ermöglicht. Dabei werden drei Schleifen von der  $V_H$ -Domäne und drei von der  $V_L$ -Domäne bereitgestellt. Die kamelide VHH Domäne verfügt nur über drei Schleifen, da ihnen ja die  $V_L$ -Domäne fehlt, bindet aber genauso gut an das Zielmolekül (Target) wie das komplexe humane dimere Konstrukt. Dies wird dadurch ermöglicht, dass bei VHH Domänen die bindenden Schleifenregionen länger sind und sich dadurch eine fast ähnlich große Interaktionsfläche mit dem Zielmolekül ergibt wie bei Zweiketten-Antikörpern (siehe Abb.2).

Für die Bindung an ein Zielmolekül ist die VHH Domäne ausreichend (Abb.1c). Diese kann zum Beispiel von Mikroorganismen hergestellt werden, wenn man das zugehörige Gen zusammen mit den für die Proteinproduktion in Bakterien notwendigen Kontrollregion in Form von DNA in die Mikroorganismen eingeschleust hat.

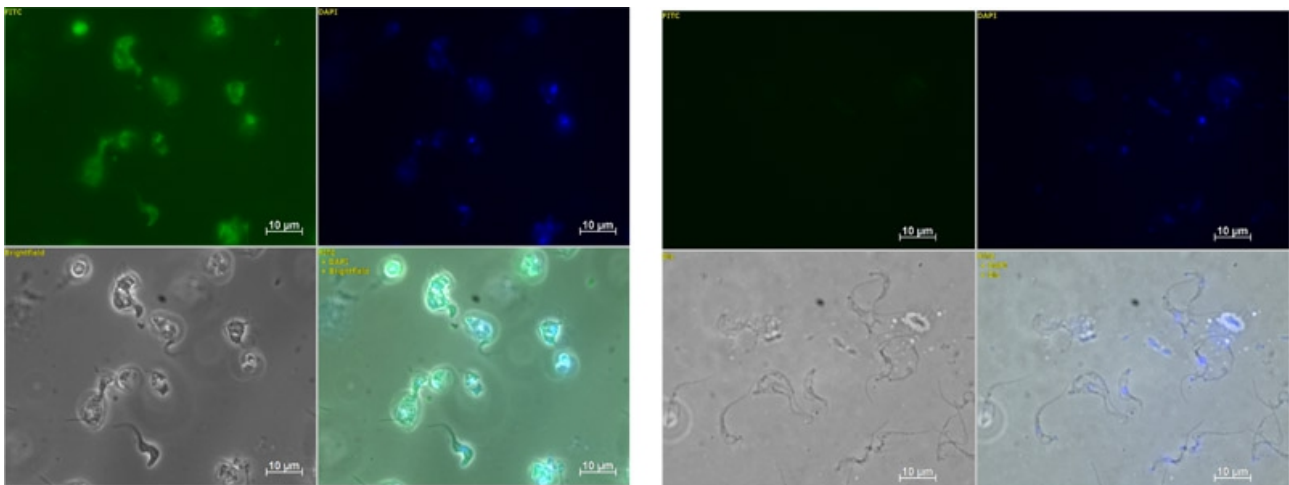
Wie identifiziert und isoliert man nun kamelide Antikörperfragmente, die an ein interessantes Zielmolekül binden? Dafür kann die nach dem belgischen biopharmazeutischen Unternehmen Ablynx benannte Ablynx-Technologie genutzt werden. Dabei werden Lamas mit dem Zielprotein geimpft. Dadurch wird deren Antikörperproduktion angeregt. Nach ca. vier bis sechs Monaten wird den Tieren Blut abgenommen, das in großer Anzahl Antikörper-produzierende Leukozyten enthält. Isoliert man diese Zellen, kann aus ihnen die genetische Information der Antikörper gewonnen werden. Aus dieser kann dann die VHH kodierende DNA-Sequenz vervielfältigt werden, welche von Bakterien zur Produktion der Antikörper-Fragmente genutzt werden kann. In diesem Verfahren wird eine Bakteriensammlung angelegt, bei der jedes Bakterium einen eigenen Antikörper herstellt. Damit wird mit molekularbiologischen Methoden die Herstellung von Antikörpern aus Leukozyten direkt auf Bakterien übertragen. Diese lassen sich leichter und billiger vermehren und auch einfacher nach solchen Zellen durchsuchen, die einen Antikörper produzieren, der das zur Impfung eingesetzte Zielprotein bindet.

Diese Durchmusterung einzelner Bakterienklone liefert dann VHH Antikörperfragmente mit den gewünschten Bindungseigenschaften.

Im Vergleich zu konventionellen Antikörpern zeigen die so gewonnenen kameliden Domänen viele Vorteile: Erstens sind sie mit einem Zehntel der Größe konventioneller Antikörper deutlich kleiner und können somit Gewebe deutlich besser penetrieren. Zweitens sind sie gut in wässrigem Milieu löslich, und sie sind pH- und temperaturstabil. Des Weiteren sind sie in Mikroorganismen kostengünstig produzierbar, und sie zeigen dabei außerdem sehr gute Bindeeigenschaften.

Ein Beispiel für den therapeutischen Einsatz der VHHs ist die Bekämpfung des Erregers der Afrikanischen Schlafkrankheit, mit dem sich jährlich 18 Millionen Menschen infizieren. Es handelt sich dabei um eine ohne Behandlung tödlich verlaufende Infektion, die durch den extrazellulären Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense* verursacht und durch die TseTse-Fliege übertragen wird. Die Symptome sind Fieber, Ödeme, Koordinationsstörungen sowie Krampfanfälle und im Endstadium ein Dämmerzustand, der der Krankheit ihren Namen gegeben hat. Bis heute sind nur zwei Medikamente dagegen bekannt: Suramin und Melarsoprol. Beide können zu Rückfällen der Patienten führen, erfordern lange Behandlungszeiten und sind gegen neu auftretende Medikamenten-resistente Erreger weitgehend unwirksam.

Da die Erreger auf ihrer Oberfläche sogenannte variable Oberflächenglycoproteine (VSGs) besitzen, bei denen sie die Zusammensetzung der Aminosäurebausteine kontinuierlich variieren, entkommen sie dem Immunsystem und lassen gewöhnliche Impfstrategien zur Unterstützung der körpereigenen Immunabwehr ins Leere laufen.



**Abbildung 3:** Fluorophor-gekoppelter VHH Antikörper gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

**a)** Speziell gegen die VSGs von *Trypanosoma brucei rhodesiense* gerichtete Fluorophor-gekoppelte VHH Antikörper binden spezifisch an den Parasiten. Bei Fluoreszenzanregung kann die Lokalisierung des VHH Antikörpers detektiert werden (oben links). Spezifische DNA-Anfärbung (oben rechts) und eine entsprechende Hellfeldaufnahme (unten links) zeigen die genaue Position der Trypanosomen im gewählten Bildausschnitt. Eine Überlagerung aller Aufnahmen (unten rechts) zeigt die spezifische Bindung des VHH Antikörpers an die Trypanosomen.

**b)** Kontrollaufnahmen ohne einen VHH Antikörper. Ohne vorhandenen Fluorophor-gekoppelten VHH Antikörper zeigt sich bei Fluoreszenzanregung kein Signal (oben links). Die Existenz von *Trypanosoma brucei rhodesiense* kann durch spezifische DNA-Anfärbung (oben rechts) bzw. durch eine entsprechende Hellfeld-Aufnahme (unten links) und eine Überlagerung aller Aufnahmen (unten rechts) verifiziert werden.

[Bildquelle: Verwendung des Bildmaterials mit freundlicher Genehmigung durch Christina Uth und Michael Brecht, TU Darmstadt].

2006 konnten Baral *et al.* jedoch einen VHH identifizieren, der an die konservierte Region der Oberflächenproteine bindet. Dieses, als NbAn33 bezeichnete Protein erkennt dort spezifisch Zuckerketten in Form von Mannose-Oligomeren. Während der Erreger seine

Oberflächenproteine dauernd als Strategie der Immunabwehr variiert, bleiben die Zuckerketten auf der Zelloberfläche konstant. VHH Antikörperdomänen, die diese Zucker erkennen, reichern sich daher auf der Oberfläche der Trypanosomen an (Abb. 3).

Um diese spezifisch abzutöten, wurde der Antikörper noch mit einem Killerprotein verknüpft, das als trypanolytischer Faktor wirkt. Als trypanolytischer Faktor kommt dabei eine besonders aktive Form des Tr-apoL-I Proteins zum Einsatz, ein Protein das im menschlichen Blut vorkommt. Dieses Protein wird nun durch die VHH Domäne gezielt auf die Erregeroberfläche gebracht, reichert sich dort an und kann dann seine zelltötende Wirkung ausüben. Im Vergleich zum konventionellen Antikörper können VHHs die Schutzhülle aus Oberflächenproteinen besser durchdringen und kommen leichter an die unveränderlichen Erkennungsregionen heran.

Dass VHHs außerdem eine erhebliche Verbesserung der Brustkrebstherapie in Aussicht stellen, zeigt eine Arbeit von Vaneycken und ihren Kollegen aus dem Jahr 2011. Dem Forscherteam gelang es, einen VHH zu entwickeln, der eine bestimmte Form von Brustkrebszellen gezielt erkennt und bindet. Die Zielstruktur des Antikörpers ist dabei ein Protein, das die Krebszellen im Gegensatz zu normalen Körperzellen in stark erhöhter Zahl auf ihrer Zelloberfläche besitzen. Dieses Oberflächenprotein ist zugleich die Zielstruktur für die heute bei dieser Krebsart gängigen Therapeutika. Allerdings nur in ungefähr 20-30 % aller Brustkrebsfälle ist dieses Protein stark vermehrt und die Medikamente somit überhaupt wirksam. Durch Kopplung des VHHs an im Körper gut durch computertomographische Methoden nachweisbare Stoffe ist eine schnelle und effektive Detektion dieser Art von Brustkrebszellen im Körper möglich. Auf diese Weise können Patienten identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich auf die gängige Therapie ansprechen. Die Gabe unwirksamer Medikamente mit zugleich starken Nebenwirkungen bis hin zu schädigender Wirkung auf lebenswichtige Organe kann somit umgangen werden. Da VHHs leicht zu produzieren sind und das zu relativ geringen Kosten, eröffnet diese Entdeckung eine genau auf den Patienten abgestimmte Therapie als vielversprechende Alternative zur konventionellen Krebsbehandlung. In Zukunft könnte diese Therapie auch dazu dienen, andere medikamentös erreichbare Angriffspunkte von Krebszellen ausfindig zu machen.

Dieses Beispiel zeigt die große Bedeutung der kameliden Antikörperfragmente für die Biotechnologie und medizinische Anwendung. Möglicherweise betrachten Sie die Lamas beim nächsten Zoobesuch nun mit ganz anderen Augen!

## Kontakt:



Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. [Woche 2](#)). Die Autoren, Fena Ochs und Daniel Degreif, sind Studierende des Faches Biomolecular Engineering (Master) an der TU Darmstadt

(E-Mail: [fena.ochs@gmx.de](mailto:fena.ochs@gmx.de),  
[dd89@gmx.net](mailto:dd89@gmx.net)).



Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Harald Kolmar

(E-Mail: [kolmar@biochemie-tud.de](mailto:kolmar@biochemie-tud.de)).

## Schlauer Fuchs

Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:

Woraus bestehen konventionelle Antikörper?

## Literatur:

[1] Baral TN, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, Muyldermans S, De Baetselier P. (2006). Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med.* **12**(5):580-5844.

[2] Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, Muyldermans S, Lahoutte T, Cavelliers V. 2011. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J.* **25**(7):2433-2446-