

Wolfgang Willenbacher
Dr.med.

HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN HERPES SIMPLEX VIRUS TYP-1 STRUKTURPROTEINE

Geboren am 29.06.1962 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 18.05.1982 in Karlsruhe

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1985/86 bis WS 1992/93

Physikum am 25.08.1987 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium an der Universität Heidelberg

Praktisches Jahr an der Universitätsfrauenklinik, der chirurgischen Universitätsklinik und der Med. Poliklinik Abt. Innere V der Universitätsklinik Heidelberg

Staatsexamen am 25.03.1993 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. med. habil. R.W. Braun

Im Rahmen der vorgestellten Dissertationsarbeit : *Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Herpes Simplex Virus Typ 1* wurden 29 monoklonale Antikörper mit Spezifität für HSV-1 Strukturproteine etabliert. Die isolierten m' Ak wurden einer breit gefächerten Charakterisierung in virologischen, immunologischen, proteinbiochemischen, molekularbiologischen und funktionellen Testsystemen unterworfen. So wurden: Immunglobulinsubtyp und Leichtkettenstatus, die Kreuzreaktivität mit anderen Herpesviridae, die Virustypspezifität, die Virusstammspezifität, die Reaktivität mit nicht N-glykosylierten Tunicamycin behandelten Virionen, die Reaktivität mit zellulären Proteinen, die Zuordnung zu den HSV-Proteinen (Antigencharakterisierung), die Virus-neutralisierende Aktivität (NT), und die Tauglichkeit der Antikörper in Western-Blot-Analyse (WBA), RIPA-PAGE, Immunfluoreszenztest (IFT) und Affinitätschromatographie (AC) systematisch untersucht.

Bei den m' Ak dominierten IgG-1 (19/29) kappa (25/29) Isolate. Bei den erkannten Antigenen dominierten die viralen Glykoproteine gC (13), gD (6) und gB (2). Des weiteren wurde ein m' Ak gegen ein Capsidprotein (VP 5), ein m' Ak gegen p40 und 6 m' Ak ungeklärter Spezifität isoliert. Es fanden sich keine Kreuzreaktivitäten der m' Ak mit Proteinen anderer Herpesviridae oder Zellproteinen. 20 m' Ak erwiesen sich als HSV-1 typspezifisch, 9 zeigten subtypübergreifende Reaktivität mit HSV-2. Für die m' Ak IV.3 und IV.4 konnte die Abhängigkeit der gD-Reaktivität von der Tunicamycin abhängigen N-Glykosylierung gezeigt werden. 20/29 m' Ak waren reaktiv im ELISA, 22/29 im WBA, 10/29 im RIPA, 5/29 im NT, 15/29 im IFT und 4/5 der untersuchten in der AC. Reaktivität in RIPA und WBA einerseits, sowie virus-neutralisierende Aktivität und Immunfluoreszenzreaktivität waren regelhaft vergesellschaftet, was auf die jeweils ähnlichen Proteinkonformationen in diesen Tests (lineare Peptid-backbone Epitope vs. Konformationsepitope) zurückzuführen ist.

Mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten konnten 2 Konkurrenzgruppen von m' Ak gegen gD (Klone: IV.3;4 vs. IV.12) und 4 von m' Ak gegen gC (Klone: IV.1;6;7 vs. IV.2 vs. IV.8 vs. IV.13;19) definiert werden. Ein feineres Epitopmapping gelang mit Hilfe der Analyse der Reaktivität mit HSV-1-Glykoprotein- β -Gal-Fusionsproteinen für 5 m' Ak. So konnte das Epitop von m' Ak IV.9 auf die Aminosäuren 1-81 von gC eingegrenzt werden, die beiden Epitope der m' Ak IV.7-11-13 auf die Aminosäuren 453-523 von gC und das Epitop von m' Ak IV.27 auf die Aminosäurepositionen 49-505 von gB.

Die Steuerung der Isolierung von m' Ak gewünschter Spezifitäten und Eigenschaften gelang über einen Screening-gesteuerten Ansatz mit höherer Effizienz, als über einen Immunisierungs-gesteuerten. Die Isolierung von m' Ak gegen die Glykoproteine gC und gD gelang bereits mit unspezifischem Screening (ELISA, Dot-Blot), während die Etablierung von Klonen mit anderen Spezifitäten (gB) ein gezieltes Suchprogramm (Mini-WBA) erforderte. Zumindest für hochimmunogene Antigene (wie virale Glykoproteine) ist somit nach unseren Erfahrungen die Isolierung von m' Ak screeninggesteuert mit geringerem Aufwand und höherer Ausbeute möglich, als immunisierungsgesteuert. Die Manipulation gewünschter Eigenschaften von m' Ak erwies sich ebenfalls, als einer Screening Steuerung gut zugänglich. Monoklonale Antikörper mit zugeordneten linearen Epitopen ließen sich über Testsysteme mit denaturiertem Antigen (Western-Blot; ELISA), solche mit putativen Konformationsepitopen über Neutralisationsteste und Immunfluoreszenzteste erfassen. Die Reagibilität von m' Ak mit beta-Gal-HSV-Fusionsproteinen war hochgradig (4/5 reagiblen m' Ak) mit der Zuordnung zu Konformationsepitopen korreliert.

Mit Hilfe der solchermaßen charakterisierten m' Ak konnten HSV-1 und HSV-2 typspezifische bzw. nicht-typspezifische Kontrollproben für WBA und IFT zusammengestellt werden sowie virale Glykoproteine in Reinform dargestellt werden (AC). Hierdurch war eine Bestimmung der viralen Glykoproteine (gC, gB, gD) möglich, die an frühen Anheftungsprozessen des HSV an die Zellmembran in non-kooperativer Weise beteiligt sind (Kühn, et al. 1995; J. Virol . 64: 2491-2497 1990).