

Universität Potsdam
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Professur Immuntechnologie

Dissertation

**Entwicklung eines Verfahrens zur Generierung von
spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen
Mikroorganismen basierend auf *in silico* Epitopenanalysen**

vorgelegt von

Markus Göthel

geb. am 30.08.1988 in Dresden

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin

Biochemie – Immuntechnologie

Soweit nicht anders gekennzeichnet, ist dieses Werk unter einem Creative-Commons-Lizenzvertrag Namensnennung 4.0 lizenziert.

Dies gilt nicht für Zitate und Werke, die aufgrund einer anderen Erlaubnis genutzt werden. Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Erstgutachter: Prof. Dr. Katja Hanack
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Hennig von Horsten
Drittgutachter: Prof. Dr. Kai Schulze-Forster

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<https://doi.org/10.25932/publishup-58801>

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-588017>

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universität Potsdam am Institut für Biochemie und Biologie in der Stiftungsprofessur Immuntechnologie unter der Leitung von Prof. Dr. Katja Hanack durchgeführt.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Hanack für die Bereitstellung eines solchen spannenden Themas und die wissenschaftliche Betreuung bedanken. Zudem für die schier endlosen Korrekturen meiner Komma- und Rechtschreibfehler, die Geduld und den mir stetig entgegengebrachten Optimismus.

Ebenso möchte ich einen herzlichen Dank aussprechen an Prof. Burkhard Michel, Dr. Katrin Messerschmidt und Dr. Ulrike Weichert für die hilfreichen Korrekturen und die stetige Unterstützung meiner Arbeit. Frau Gerlinde Gottwald möchte ich für die Rechtschreibkorrektur meiner Arbeit danken.

Ein „Riesen-Dankeschön“ geht an alle Mitglieder der Stiftungsprofessur. Egal ob Frust, Leid, Freude oder Kuchen. Wir haben alles geteilt und ihr habt mich durch diese Arbeit getragen. Habt vielen Dank.

Ergänzend möchte ich den vier Menschen danken, die mich in meinem bisherigen Leben am stärksten geprägt haben: Verena Blumberg, Marten Kreienbrock, Paul Demin und Janina Rahlff. Danke euch. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie für die stetige Unterstützung und die nie endende Geduld danken.

Inhalt

Eidesstattliche Erklärung	VIII
Zusammenfassung	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XVI
1. Einführung	1
1.1. Problemstellung.....	1
1.2. Die Immunantwort bei einer Immunisierung mit Proteinantigenen.....	2
1.3. Antikörper	5
1.3.1. Aufbau und Funktion eines Antikörpers	5
1.3.2. Antikörpervielfalt und Antikörperreifung.....	7
1.3.3. Generierung eines monoklonalen Antikörpers	9
1.4. VP1 Immunisierungsstrategie.....	12
1.5. Grundlagen der <i>Reverse Vaccinology</i>	13
1.6. Indikator-Organismen für Trinkwasserverunreinigungen.....	15
1.6.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	15
1.6.2. <i>Legionella pneumophila</i>	16
1.6.3. Zelloberflächenstrukturen von gramnegativen Bakterien für den antikörperbasierten Nachweis	16
1.7. Ziel der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Übersicht	19
2.2. Material	19
2.2.1. Laborgeräte.....	19
2.2.2. Chemikalien	19
2.2.3. Oligonukleotide.....	20
2.2.4. Puffer, Medien und Lösungen	21
2.2.5. Bakterienstämme.....	23
2.2.6. Plasmide	24
2.2.7. Kommerzielle Kits.....	25
2.2.8. Antikörper und Proteinkonjugate	25

2.2.9.	Versuchstiere	26
2.2.10.	Zelllinien	26
2.2.11.	Software.....	27
2.3.	Bioinformatische Methoden	28
2.3.1.	Komparative Genomanalyse.....	28
2.3.2.	Vorhersage der Proteinlokalisierung	29
2.3.3.	Vorhersage der B-Zell-Epitope	29
2.3.4.	Vorhersage von Proteinstrukturen.....	30
2.4.	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.4.1.	Präparation von genomischer Desoxyribonukleinsäure aus Bakterienzellen	31
2.4.2.	PCR zur Amplifikation von ds – Desoxyribonukleinsäure	31
2.4.3.	Agarose – Gelelektrophorese.....	32
2.4.4.	Reinigung von aufgetrennten dsDNA-Fragmenten	32
2.4.5.	Vektor-Linearisierung und Dephosphorylierung.....	32
2.4.6.	Hybridisierung von ssDNA-Oligonukleotiden	33
2.4.7.	Ligation von ds – Desoxyribonukleinsäure	34
2.4.8.	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	34
2.4.9.	Bakterienkolonie – PCR	34
2.4.10.	Plasmidpräparation.....	35
2.4.11.	Sequenzierung	35
2.5.	Mikrobiologische Methoden.....	36
2.5.1.	Anzucht von Bakterienkulturen.....	36
2.5.2.	Kryokonservierung von Bakterienzellen	36
2.6.	Proteinbiochemische Methoden	36
2.6.1.	Expression rekombinanter Proteinantigene	36
2.6.2.	Metallchelat-Affinitätschromatographie.....	37
2.6.3.	Affinitätschromatographie mittels Strep-Tactin®	38
2.6.4.	Affinitätschromatographische Reinigung von murinen Antikörpern mittels Protein A	38
2.6.5.	SDS-PAGE.....	39
2.6.6.	Western Blot.....	40
2.7.	Immunologische Methoden.....	41
2.7.1.	ELISA.....	41

2.7.2.	Zellfärbung von Mikroorganismen für Messung im Durchflusszytometer	42
2.7.3.	Zellfärbung von Hybridomzellen zur Zellsortierung	43
2.8.	Zellbiologische Methoden.....	44
2.8.1.	Gewinnung von Feederzellen	44
2.8.2.	Elektrochemische Fusion zur Generierung von Hybridomzelllinien	44
2.8.3.	Kultivierung von Säugerzelllinien.....	45
2.8.4.	Hybridomsequenzierung.....	46
2.9.	Tierexperimentelle Methoden	46
2.9.1.	Haltung von Balb/c Mäusen.....	46
2.9.2.	Immunisierung von Balb/c Mäusen.....	46
2.10.	Statistische Auswertung.....	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	<i>In silico</i> Vorhersage potenzieller Epitope für spezifische Antikörper	48
3.1.1.	Identifikation von spezifischen Epitopen für <i>E. coli</i> O157:H7	48
3.1.2.	Identifikation von spezifischen Epitopen für <i>Legionella pneumophila</i>	52
3.2.	Herstellung von rekombinanten Proteinen und Virusproteinen für die Immunisierung... 57	
3.2.1.	Herstellung von Virusproteinen mit spezifischen Epitopsequenzen aus <i>E. coli</i> O157:H7 und <i>L. pneumophila</i>	57
3.2.2.	Herstellung von rekombinanten Proteinen von <i>L. pneumophila</i>	59
3.3.	Immunisierungen mit chimären VPs.....	63
3.3.1.	Induzierte Immunantwort in BALB/c Mäusen gegen <i>E. coli</i> O157:H7	63
3.3.2.	Induzierte Immunantwort von BALB/c Mäusen gegen <i>Legionella pneumophila</i>	65
3.4.	Erstellen einer Zellfärbung zum Sortieren antigenspezifische Hybridome	69
3.4.1.	Konfiguration des Sortieraufbaus mit dem Antigen <i>E. coli</i> O157:H7.....	71
3.4.2.	Konfiguration des Sortieraufbaus mit dem Antigen <i>Legionella pneumophila</i>	76
3.5.	Fusion und Sortierung von Hybridomzellen.....	81
3.5.1.	Ergebnisse der Fusionen & Sortierungen gegen das Antigen <i>E. coli</i> O157:H7	81
3.5.2.	Ergebnisse der Fusionen & Sortierungen gegen das Antigen <i>Legionella pneumophila</i>	83
3.6.	Herstellung & Charakterisierung monoklonaler Antikörper	84
3.6.1.	Antikörper-Reinigung & Bestimmung der Subklasse.....	84
3.6.2.	Sequenzierung der Antikörper	86
3.6.3.	Charakterisierung der Kreuzreaktivität der monoklonalen Antikörper.....	86

3.6.4.	Validierung der spezifischen Epitopbindung	88
4.	Diskussion	90
4.1.	Bedeutung von mAK für den Nachweis von pathogenen Mikroorganismen	90
4.2.	Herausforderungen in der Generierung spezifischer mAK gegen Mikroorganismen und deren Adressierung im neuen <i>Workflow</i>	90
4.3.	Identifizierung spezifischer Epitope für <i>E. coli</i> O157:H7 und <i>L. pneumophila</i> mittels bioinformatischer Analysen.....	92
4.4.	Induzierte Immunantwort gegen <i>E. coli</i> O157:H7 & <i>L. pneumophila</i>	95
4.5.	Sortierung von Antigen-spezifischen Hybridomzellen.....	97
4.6.	Spezifische Bindung mAK.....	98
4.7.	Limitierungen des interdisziplinären <i>Workflows</i> und Alternativen	100
4.8.	Schlussfolgerung und Ausblick	101
	Literaturverzeichnis.....	102
	Anhang	112

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht worden. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung noch nicht vorgelegt worden.

Ort, Datum, Unterschrift

Zusammenfassung

Deutsch

Monoklonale Antikörper (mAK) sind eines der wichtigsten Biomoleküle für die Umweltanalytik und die medizinische Diagnostik. Für die Detektion von Mikroorganismen bilden sie die Grundlage für ein schnelles und präzises Testverfahren. Bis heute gibt es, aufgrund des hohen zeitlichen und materiellen Aufwandes und der unspezifischen Immunisierungsstrategien, nur wenige mAK, die spezifisch Mikroorganismen erkennen.

Zu diesem Zweck sollte ein anwendbares Verfahren für die Generierung von mAK gegen Mikroorganismen entwickelt werden, welches anhand von *Escherichia coli* O157:H7 und *Legionella pneumophila* validiert wurde. In dieser Dissertation konnten neue Oberflächenstrukturen auf den Mikroorganismen mittels vergleichender Genomanalysen und *in silico* Epitopenalysen identifiziert werden. Diese wurden in das Virushüllprotein VP1 integriert und für eine gezielte Immunisierungsstrategie verwendet. Für die Bestimmung antigenspezifischer antikörperproduzierender Hybridome wurde ein Immunfärbeprotokoll entwickelt und etabliert, um die Hybridome im Durchflusszytometer zu sortieren.

In der vorliegenden Studie konnten für *E. coli* O157:H7 insgesamt 53 potenzielle Proteinkandidaten und für *L. pneumophila* 38 Proteine mithilfe der bioinformatischen Analyse identifiziert werden. Fünf verschiedene potenzielle Epitope wurden für *E. coli* O157:H7 und drei verschiedenen für *L. pneumophila* ausgewählt und für die Immunisierung mit chimären VP1 verwendet. Alle Immunseren zeigten eine antigenspezifische Immunantwort. Aus den nachfolgend generierten Hybridomzellen konnten mehrere Antikörperkandidaten gewonnen werden, welche in Charakterisierungsstudien eine starke Bindung zu *E. coli* O157:H7 bzw. *L. pneumophila* vorwiesen. Kreuzreaktivitäten zu anderen relevanten Mikroorganismen konnten keine bzw. nur in geringem Maße festgestellt werden.

Folglich konnte der hier beschriebene interdisziplinäre Ansatz zur Generierung spezifischer mAK gegen Mikroorganismen nachweislich spezifische mAK hervorbringen und ist als hocheffizienter Arbeitsablauf für die Herstellung von Antikörpern gegen Mikroorganismen einsetzbar.

Zusammenfassung

Englisch

Monoclonal antibodies (mAbs) are one of the most important biomolecules for environmental analysis and medical diagnostics. For the detection of microorganisms, they form the basis for a rapid and precise test procedure. Until today, due to the substantial time and material effort and the non-specific immunization strategies, there are only a few mAbs that specifically detect microorganisms.

Therefore, an easy-to-use methodology for the generation of mAbs against microorganisms was developed and validated using *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli* O157:H7. In this dissertation, several new surface structures on the microorganisms were identified using comparative genomic analyses and *in silico* epitope modeling. These were integrated into the VP1 viral envelope protein and used for a specific immunization strategy. For the identification of antigen-specific antibody-producing hybridomas, an immunostaining protocol was developed and established to sort the hybridomas.

In the present study, 53 potential protein candidates were identified for *E. coli* O157:H7 and 38 proteins for *L. pneumophila* using bioinformatic analysis methods. Five different peptide epitopes were selected for *E. coli* O157:H7 and three different peptide epitopes for *L. pneumophila* for immunization using chimeric VP1. All immune sera showed an antigen-specific immune response. Several antibody candidates were obtained from the generated hybridoma cells, which showed strong binding to *E. coli* O157:H7 and *L. pneumophila*. Cross-reactivity to other relevant microorganisms could not be detected or could only be observed to a minor extent.

Consequently, the interdisciplinary approach to generate specific mAbs against microorganisms has been shown to generate specific mAbs and is applicable as a highly efficient workflow for the generation of antibodies against microorganisms.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCR	B-Zellrezeptor
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSS	<i>Balanced salt solution</i>
CDR	komplementärbestimmende Region
Da	Dalton
DCs	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
EC	<i>Escherichia coli</i> Epitop
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	konstantes Fragment
FKS	Fetales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GOI	<i>Gene of Interest</i>
H	Stunde
λ	lambda
LE	<i>Legionella pneumophila</i> Epitop

Abkürzungsverzeichnis

<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LPS	Lipopolysaccharid
HAT	Hypoxanthin, Azaserin und Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
κ	kappa
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung
mAK	monoklonale Antikörper
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NGS	<i>Next-generation-sequencing</i>
NKS	neonatales Kälberserum
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
POC	<i>Point of Care</i>
POD	Peroxidase

Abkürzungsverzeichnis

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RV	<i>Reverse Vaccinology</i>
SAV	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	single stranded
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
V _H	variable Teil der schweren Ketten eines Antikörpers
V _L	variable Teil der leichten Kette eines Antikörpers
VLP	Virus-ähnlicher-Partikel
VP	Virusprotein
VP1	Virushüllprotein der murinen Hamster-Polyomavirushülle

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: B-Zell Aktivierung.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls	6
Abbildung 3: Genrekombination während der B-Lymphozyten Reifung.....	8
Abbildung 4: Selektionsprinzip nach Listek. et. al.	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung von chimären VP1.....	12
Abbildung 6: Schematische Struktur von Oberflächenproteinen für die Detektion mittels Antikörpern.....	17
Abbildung 7 Verfahren zur zielgerichteten Generierung von mAK gegen einen Mikroorganismus	18
Abbildung 8: Zellfärbung von inaktivierten Mikroorganismen für die Durchflusszytometrie	43
Abbildung 9: Vergleichende Genomanalyse von <i>E. coli</i> O157:H7	49
Abbildung 10: Epitopvorhersage von FimH und OmpG	50
Abbildung 11: Proteinkristallstruktur von FimH und OmpG mit den zugehörigen Epitopvorhersagen.....	52
Abbildung 12: Vergleichende Genomanalyse <i>L. pneumophila</i>	53
Abbildung 13: Epitopvorhersage für PilE, Mip und MOMP.....	55
Abbildung 14: Epitop-Lokalisierung innerhalb der Proteinstrukturen von PilE, Mip & MOMP..	56
Abbildung 15: Nachweis der integrierten Nukleotidsequenzen der zugehörigen Epitope in pET22b	57
Abbildung 16: Affinitätschromatographische Reinigung von chimären VPs.....	59
Abbildung 17: Amplifikation der Gene <i>pilE</i> , <i>mip</i> und <i>mompS</i> aus genomischer DNA	60
Abbildung 18: Proteinexpression und Reinigung rekombinanten Proteine von <i>L. pneumophila</i>	61
Abbildung 19: Induzierte Immunantwort gegen chimäre VPs mit <i>E. coli</i> O157:H7 Epitopen.....	64
Abbildung 20: Induzierte Immunantwort gegen das Antigen <i>E. coli</i> O157:H7.....	65
Abbildung 21: Induzierte Immunantwort gegen chimäre VPs mit <i>L. pneumophila</i> Epitopen	66
Abbildung 22: Induzierte Immunantwort gegen rekombinante Proteine von <i>L. pneumophila</i>	67
Abbildung 23: Induzierte Immunantwort gegen das Antigen <i>L. pneumophila</i>	68
Abbildung 24: Verifizierung der vorhandenen Eigenschaften der Myelomzellen	70
Abbildung 25: Aufbau der Immunfärbung für die Zellsortierung von Hybridomzellen mit dem Antigen <i>E. coli</i> O157:H7	71
Abbildung 26: Test verschiedener anti- <i>E. coli</i> Antikörper	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 27: Bindung des Mausserums an den Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplex.....	73
Abbildung 28: Bestimmung der Antigenmenge für den Sortieraufbau	74
Abbildung 29: Bestimmung der Hintergrundsignale der Immunfärbung mit inaktivierten <i>E. coli</i> O157:H7 Zellen.....	75
Abbildung 30: Aufbau der Immunfärbung für die Zellsortierung von Hybridomzellen mit dem Antigen <i>L. pneumophila</i>	77
Abbildung 31: Validierung der Positivkontrolle anti - <i>L. pneumophila</i> Antikörper H61F2F8.....	78
Abbildung 32: Bestimmung der Antigenmenge von inaktivierten <i>L. pneumophila</i> Zellen für den Sortieraufbau.....	79
Abbildung 33: Bestimmung der Hintergrundsignale für die Zellfärbung mit inakt. <i>L. pneumophila</i> Zellen.....	80
Abbildung 34: Ergebnisse der Sortierungen der Hybridomzellen gegen <i>E. coli</i> O157:H7.....	82
Abbildung 35: Ergebnisse der Sortierungen der Hybridomzellen gegen <i>L. pneumophila</i>	83
Abbildung 36: mAK nach Protein A Reinigung	85
Abbildung 37: Subklassenbestimmung der gereinigten mAK.....	85
Abbildung 38: Nachweis spezifischer Antikörperbindung zu <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. pneumophila</i> und <i>E. coli</i> K12.....	87
Abbildung 39: Spezifische Epitop-Bindung der mAK an die chimären VPs	88
Abbildung 40: Schematische Darstellung des neu entwickelten <i>Workflows</i> im Zusammenhang mit den generierten Ergebnissen	92

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Laborgeräte.....	19
Tabelle 2 Chemikalien.....	19
Tabelle 3 Oligonukleotide.....	20
Tabelle 4 Allgemeine Medien und Puffer.....	21
Tabelle 5 Medien für Säugerzelllinien-Kultivierung und elektrochemische Zellfusion.....	22
Tabelle 6 Puffer für die Verwendung in der SDS-PAGE.....	22
Tabelle 7 Puffer & Lösungen für den Western Blot.....	22
Tabelle 8 Puffer für die affinitätschromatographische Reinigung mittels Protein A.....	23
Tabelle 9 Puffer & Lösungen für die Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	23
Tabelle 10 Puffer & Lösungen für Affinitätschromatographie von Protein-StrepTag II Komplex	23
Tabelle 11 Bakterienstämme	23
Tabelle 12 Basisplasmide	24
Tabelle 13 Generierte Plasmide	24
Tabelle 14 Kommerzielle Kits	25
Tabelle 15 Antikörper und Proteinkonjugate	25
Tabelle 16 neu generierte Zelllinien	26
Tabelle 17 Software	27
Tabelle 18 Verwendete Bakterienstämme für die vergleichende Genomanalyse.....	29
Tabelle 19 Thermozyklerprogramm zur Gen-Amplifikation.....	32
Tabelle 20 Thermozyklerprogramm für Hybridisierung von ssDNA-Oligonukleotide.....	33
Tabelle 21 Thermozyklerprogramm für die Kolonie-PCR.....	35
Tabelle 22 Übersicht Ausbeute von exprimierten und gereinigten rekombinanten Proteinen.....	62
Tabelle 23 Ausgewählte Klone für weitere Charakterisierungen.....	82
Tabelle 24 Sequenzen der ermittelten CDRs aus Hybridomsequenzierung von H4-3-E10.....	86

1. Einführung

1.1. Problemstellung

Pathogene Mikroorganismen stellen sowohl für Entwicklungsländer als auch Industrienationen eine Bedrohung dar. Sie sind Auslöser für verschiedene Krankheitsausbrüche, deren Auswirkungen bis zu epidemischen Ausmaßen reichen. Ein zentrales Problem ist die Verfügbarkeit von sauberem Trinkwasser (Saxena, 2015). In durch Fäkalien verunreinigtem Trinkwasser verbreiten sich Krankheitserreger in kurzer Zeit in der örtlichen Bevölkerung. So sind mehrere Fälle von fäkalen Verunreinigungen bekannt, die in den USA 1970 und 2011 in Deutschland zu Epidemien führten, welche durch das pathogene Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 ausgelöst wurden (Lim et al., 2010; von Rheinbaben and Schwarzkopf, 2012).

Für die stetige Überwachung von Trinkwasser und anderen potenziellen Keimorten ist daher eine zuverlässige und schnelle Diagnostik unabdingbar. Jedoch ist dies mit den derzeitigen Verfahren nicht gegeben. Bisherige Analyseverfahren von kontaminiertem Trinkwasser plattieren Trinkwasserproben auf Selektivnährmedium, kultivieren diese bis zu 7 Tagen und zählen anschließend die Zellkolonien (Kennedy and Wilkinson, 2017). Der aktuelle industrielle Goldstandard ist der zuverlässige und schnelle Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Kennedy and Wilkinson, 2017). Jedoch müssen Proben hierfür entnommen, zu einem Labordienstleister verschickt und im Labor verarbeitet und ausgewertet werden. Diese Verfahren sind sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Eine Alternative stellen *Point of Care* (POC) Systeme, die vor-Ort Analysen ermöglichen und dem Anwender direkt ein Ergebnis liefern ohne Bedarf an aufwendiger Laborausstattung. Neben anderen Nachweismethoden ist der Antikörper-basierte Nachweis ein wichtiges Instrument für die vor-Ort Analytik. Für zuverlässige Ergebnisse sind spezifische monoklonale Antikörper (mAK) unerlässlich. Allerdings weisen kommerziell erhältliche mAK eine Vielzahl an Kreuzreaktivitäten zu anderen Mikroorganismen auf (Baker, 2015; Bradbury and Plückthun, 2015). Der Ursprung des Problems ist vielschichtig und liegt zum einen in der evolutionären Verwandtschaft vieler Organismen und in der bisherigen angewandten Immunisierungsstrategie. Für die Generierung von mAK gegen ein bestimmtes Bakterium wurde dieses als Totimpfstoff in den Donororganismus injiziert, dessen B-Zellen mit Myelomzellen mittels Hybridomtechnik fusioniert und gegen das gewünschte Bakterium gescreent. Das Screeningverfahren wird durch evolutionär konservierte

und ubiquitär vorhandene Oberflächenmoleküle verzerrt, indem gescreente Antikörper gegen diese Strukturen hohe Signale geben, diese Strukturen jedoch auf vielen weiteren Mikroorganismen vorhanden sind (Moor et al., 2016). Kommen diese mAK zum Einsatz ergeben sich unspezifische Ergebnisse, die weiter validiert werden müssen.

Es bedarf daher einer neuen Herangehensweise, um diesem Problem zu begegnen. Mittels einer zielgerichteten Immunisierungsstrategie basierend auf *in silico* Vorhersagen und dem Einsatz von Virusproteinen (VPs) als Träger von Epitopstrukturen, sollen spezifische mAK entwickelt werden. Hierfür werden im Folgenden die theoretischen Grundlagen erörtert.

1.2. Die Immunantwort bei einer Immunisierung mit Proteinantigenen

Für die Generierung von mAK gegen Proteinantigene wird im Folgenden das adaptive Immunsystem genauer betrachtet und in Bezug auf das gesamte Immunsystem eingeordnet.

Das Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich vereinfacht in zwei Teile gliedern. Das angeborene und das adaptive Immunsystem. Beide Systeme sind eng miteinander verknüpft und schützen den Organismus vor Pathogenen. Zu dem angeborenen Immunsystem zählen z.B. die Epithelzellen, Phagozyten und das Komplementsystem. Es dient vorrangig der Abwehr von fremden Keimen in den Körper. Hierfür besitzt es eine sehr schnelle Reaktionszeit und aktiviert verschiedene Reaktionskaskaden, spezifische Zellen und Proteine des gesamten Immunsystems, sobald Keime über die Haut und Schleimhäute in den Körper eindringen.

Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem umfasst ähnlich dem angeborenen Immunsystem sowohl Komponenten der humoralen als auch der zellulären Immunität und bekämpft eindringende Krankheitserreger. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, welches auf weit verbreitete Keime reagiert, ist das adaptive Immunsystem sehr spezifisch für jeden einzelnen Erreger. Die adaptive Immunantwort kann in zwei Varianten unterteilt werden: die zelluläre Immunantwort, die durch T-Zellen vermittelt wird, und die humorale Antwort, die durch von B-Zellen

sezernierte Antikörper vermittelt wird (Murphy and Weaver, 2018).

Antigenpräsentation

Die adaptive Immunantwort wird durch dendritische Zellen (DCs) induziert. Unreife DCs sind in den lymphoiden Organen und in der epithelialen Barriere lokalisiert. Sie nehmen kontinuierlich potenzielles pathogenes Material aus der extrazellulären Umgebung auf. Proteinantigene werden durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen.

Die DCs migriert durch die Lymphgefäße zu den Lymphknoten. Während der Zellwanderung werden in endosomalen/lysosomalen Vesikeln die endozytierten Proteine durch proteolytischen Abbau zu Peptiden gespalten und an MHC-Moleküle der Klasse II gebunden. Das MHC-Klasse-II-Molekül mit dem Antigenpeptid wird zur Zellmembran transportiert und zur Erkennung durch CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert. Ebenso werden kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimiert und auf der Oberfläche gezeigt. Während der Antigenaufnahme und deren Prozessierung sind die DCs zu hoch effizienten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) differenziert.

In den Lymphknoten wandern die naiven CD4⁺ T-Lymphozyten an der Zelloberfläche der APCs entlang. Bindet der T-Zell-Rezeptor (TCR) an einen passenden MHC-II/Peptid-Komplex differenziert die naive Zelle zu einer Effektorzelle. Neben der TCR-Bindung benötigt die naive T-Zelle ein kostimulatorisches Signal, welches durch die Bindung von CD80/86 auf der APC und CD28 auf der T-Zelle ausgelöst wird. Zu den Effektorzellen zählen unter anderem die T-Helferzellen, die antigenspezifische B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen. Weitere Effektorzellen sind Killerzellen, die eine Antwortmöglichkeit des adaptiven Immunsystems sein können, jedoch für die vorliegende Arbeit nicht weiter relevant sind. Die aktivierten T-Helferzellen proliferieren, sezernieren Zytokine und exprimieren den CD40 – Ligand auf der Zelloberfläche, welcher für die B-Zellaktivierung von Bedeutung ist (Murphy and Weaver, 2018).

B-Zell Aktivierung

Die B-Zellen lassen sich auf zwei verschiedene Arten aktivieren. Zum einen mit Hilfe von T-Zellen und zum anderen T-Zell-unabhängig. In den meisten Fällen benötigen B-Zellen Unterstützung von T-Helferzellen zur Produktion von Antikörpern (Abbildung 1).

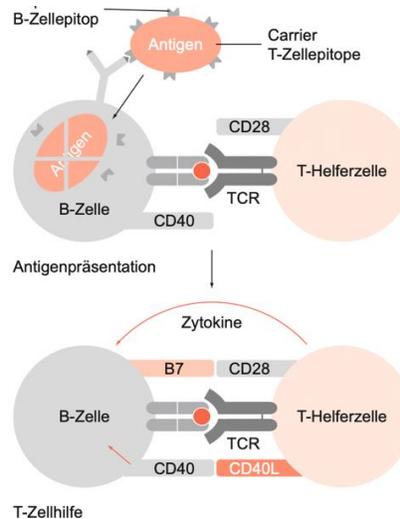


Abbildung 1: B-Zell Aktivierung

Schematische Darstellung der B-Zell-T-Zell-Aktivierung nach Interaktion mit APCs. Die durch den TCR vermittelte Erkennung des auf MHC II dargestellten Peptidantigens führt zur Expression des CD40-Liganden (CD40L) und zur Sekretion von Zytokinen durch die T-Helferzelle. Die Bindung von CD40 an CD40L stimuliert das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von B-Zellen. CD40L-vermittelte Signale in Kombination mit verschiedenen von T-Helferzellen sezernierten Zytokinen (IL-21, IL-10, IL-4) verstärken die B-Zell-Proliferation. CD28-B7 Interaktionen sind für die optimale Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Helferzellen notwendig. Quelle: Modifiziert nach Murphy & Weaver, 2018.

Naive B-Lymphozyten zirkulieren durch das Blut und die lymphatischen Organe. Sobald der B-Zell-Rezeptor (BCR) sein korrespondierendes Antigen bindet, internalisiert die B-Zelle das Antigen und prozessiert dieses, sodass es gebunden an MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Die differenzierten T-Helferzellen binden mit ihrem spezifischen TCR an das TCR-Epitop, welches auf den B-Zellen gezeigt wird. Obwohl die T-Helferzellen und B-Zellen stets unterschiedliche Epitope auf komplexen Antigenen erkennen, kooperieren sie antigenspezifisch. Für die Aktivierung der B-Zelle sind neben der Bindung des TCR an den MHC-II/Peptid-Komplex der B-Zelle auch kostimulatorische Signale essenziell. Dazu gehören die Interaktion des CD40-Liganden der T-Helferzelle an das CD40 der B-Zelle, sowie die Sekretion mehrerer Zytokine durch die T-Helferzelle. Die T-Helferzellen sezernieren die Zytokine und aktivieren die Proliferation der B-Zelle, sowie deren Differenzierung zu Antikörper-produzierenden B-Zellen (Plasmazellen). Während der Proliferation kommt es zum Klassenwechsel der Antikörper und zur somatischen Hypermutation, die im Abschnitt 1.3.2 genauer betrachtet wird. Die T-Zell-unabhängige Antikörperproduktion tritt vor allem bei vielen repetitiven Epitopen auf, die eine Quervernetzung der BCRs auf der B-Zell-Oberfläche

ermöglichen. Dies erzeugt ein starkes Aktivierungssignal, welches zur Differenzierung und Proliferation zu Plasmazellen führt.

Während einer Immunisierung sind zunächst B-Zellen vorhanden, die Antikörper vom Typ IgM produzieren. Durch mehrmalige Zugabe von Antigen kommt es zur Produktion von somatisch mutierten und hochaffinen Antikörpern der IgG-Klasse (MacLennan, I.C. et al., 2000).

1.3. Antikörper

1.3.1. Aufbau und Funktion eines Antikörpers

Die Produktion von Antikörpern, auch Immunglobuline genannt, ist ein zentraler Bestandteil der individuellen Immunantwort gegen eindringende Pathogene. Sie dienen der Bekämpfung von Krankheitserregern und Toxinen, die durch die angeborene Immunantwort nicht eliminiert werden können. Die Struktur von Antikörpern ist hierfür bifunktional aufgebaut. Sie binden zum einen ihr Antigen spezifisch und markieren dieses für weitere Komponenten des Immunsystems.

Antikörper Struktur

Insgesamt gibt es bei Menschen und Mäusen fünf verschiedene Antikörperklassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Sowohl IgA als auch IgG lassen sich in weitere Subklassen unterteilen: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgG4, sowie IgA1 und IgA2. IgM Antikörper sorgen für die primäre adaptive Immunantwort und liegen als Pentamere im Plasma vor.

Der größte Anteil an Antikörpern im Serum bilden die IgG Antikörper. Sie bestehen aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten. Ein IgG Antikörper hat ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa, das sich aus je 50 kDa der beiden schweren Ketten und je 25 kDa der beiden leichten Ketten zusammensetzt. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken in der sogenannten Gelenkregion verbunden. Die schweren Ketten bestehen aus drei konstanten Regionen (C_H), wobei C_{H2} und C_{H3} als F_C -Teil bezeichnet wird und für die Makrophagenbindung und Komplementaktivierung verantwortlich ist. Die variablen Bereiche mit den hypervariablen CDRs (engl. *complementarity determining regions*; deu. komplementaritätsbestimmende Regionen) befinden sich auf den variablen Teilen der schweren Kette (V_H) und der leichten Kette (V_L). Jeder variable Bereich trägt drei CDR Regionen, die mit

den umliegenden Bereichen die Antigenbindungsstelle bilden. Diese Antigenbindungsstelle wird als Paratop bezeichnet, welches an das Epitop des Antigens bindet. Die beiden variablen Teile der schweren und leichten Kette werden zusammen als Fv-Fragment bezeichnet. Der konstante Teil der leichten Kette (C_L) ist über eine Disulfidbrücke mit dem C_{H1} -Bereich der schweren Kette kovalent verbunden. Der gesamte Bereich, der nicht zum Fc-Teil gehört wird als Fab-Fragment angegeben (Abbildung 2).

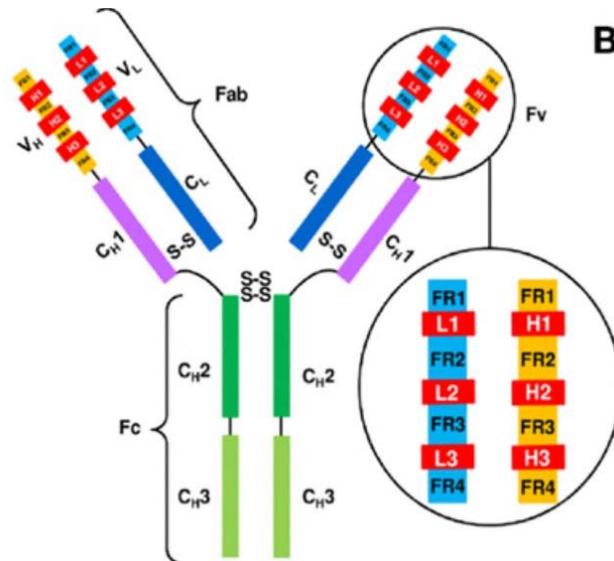


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls

Das IgG-Molekül setzt sich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten zusammen. Jede Kette besteht aus einem variablen Bereich (V_L und V_H) und einem bzw. mehreren konstanten Bereichen (C_L und C_{H1-3}). Über Disulfidbrücken sind die beiden Ketten miteinander verknüpft. Die Antigenbindestelle befindet sich in der variablen Domäne (V_L und V_H). Jeder variable Bereich trägt drei CDRs. Unterteilt wird das Molekül in ein Fc-Fragment (C_{H2} und C_{H3}), sowie in zwei Fab-Fragmente (V_L, C_L, V_H und C_{H1}). Quelle: Darstellung nach Murphy & Weaver, 2018.

Antikörperfunktion

Antikörper übernehmen verschiedene Funktionen im Körper zum Schutz des Organismus. Bekannt sind sie für ihre spezifische Bindung an ein Antigen. Diese Bindung von Antikörpern zu Antigenen durch nicht-kovalente Bindungen ist reversibel. Beeinflusst wird sie durch die Elektrolytkonzentration, den pH-Wert, die Temperatur und die Unversehrtheit der Antikörperstruktur (Carter, 2006; Tiller and Tessier, 2015).

Die zweite Funktion besteht in der Aktivierung des Komplementsystems. Wenn die Antikörpermoleküle IgG1, IgG2, IgG3 und IgM spezifisch an das entsprechende Antigen binden, ändert sich ihre Konformation. Das Komplementmolekül C1q bindet an den Antigen-

Antikörperkomplex, aktiviert diesen und leitet den traditionellen Komplementweg ein (Murphy and Weaver, 2018). Bei IgG sind mindestens zwei eng benachbarte IgG-Moleküle erforderlich, um das Komplementsystem zu aktivieren, wenn sie an das entsprechende Antigen gebunden sind. Nach der Bindung des entsprechenden Antigens über die V-Region können Ig über das Fc-Segment an eine Vielzahl von Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und verschiedene Effektor-Funktionen stimulieren. Zum Beispiel markieren Antikörper Mikroorganismen durch die Bindung an deren Zelloberfläche. Dieser Vorgang wird auch als Opsonierung bezeichnet. Die Bakterien werden folglich als körperfremd erkannt und von Neutrophilen oder Phagozyten aufgenommen und eliminiert. Ein weiterer Effekt ist die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). IgG bindet an entsprechende Zielzellen, wie virusinfizierte Zellen und Tumorzellen und löst einen ADCC-Effekt aus. Die NK-Zellen bindet an die Fc-Domäne des gebundenen Immunglobulines mittels Fc γ -Rezeptoren (CD16 oder CD32). Anschließend schüttet die Effektorzelle Interferon- γ und weitere zytotoxische Proteine aus, die die Antikörper-markierte Zielzelle lysiert.

1.3.2. Antikörpervielfalt und Antikörperreifung

Antikörperdiversität

Antikörper werden aus drei Pools von Gensegmenten und Exons hergestellt. Ein Pool kodiert kappa (κ)-Leichtketten, lambda (λ)-Leichtketten oder schwere Ketten. In jedem Pool werden separate Gensegmente, die für verschiedene Teile der variablen Region der leichten oder schweren Ketten kodieren, durch „*site-specific*“ Rekombination während der B-Zell-Entwicklung zusammengeführt (Abbildung 3).

Die Pools der leichten Ketten enthalten ein oder mehrere Exons der konstanten (C-) Region und Teile der variablen (V) und verbindenden (J) Gensegmente. Der Pool der schweren Kette enthält Exons der C-Region und Segmente der V-, Diversitäts- (D) und J-Gene. Um ein Antikörpermolekül herzustellen, rekombiniert ein VL-Gensegment mit einem JL-Gensegment, um eine DNA-Sequenz zu erzeugen, die für die V-Region einer leichten Kette kodiert, und ein VH-Gensegment rekombiniert mit einem D und einem JH-Gensegment, um eine DNA-Sequenz zu erzeugen, die für die V-Region einer schweren Kette kodiert. Jede der zusammengesetzten kodierenden Sequenzen der V-Region wird mit der entsprechenden Sequenz der C-Region co-transkribiert, um ein RNA-Molekül zu erzeugen, das die vollständige Polypeptidkette kodiert. Zellen, die funktionelle schwere und leichte Ketten bilden, schalten den

V(D)J-Verbindungsprozess aus, um sicherzustellen, dass jede B-Zelle nur eine Art von Antigenbindungsstelle erzeugt.

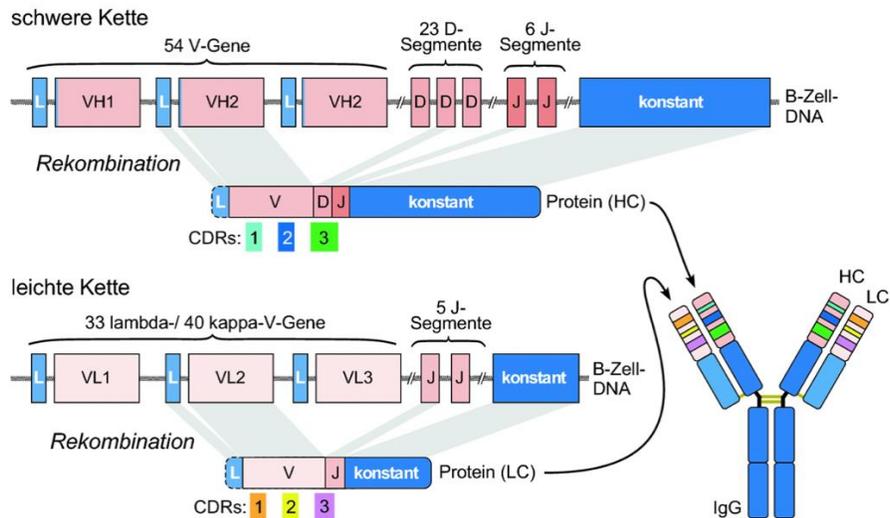


Abbildung 3: Genrekombination während der B-Lymphozyten Reifung

Schwere Ketten entstehen aus der Kombination von vier Genabschnitten: Eine von 54 variablen Regionen wird mit einer von 23 Diversity-Regionen und mit einer von 6 Joining-Regionen verknüpft. Je nach Antikörpertyp wird der so entstandene variable Teil an eine der verschiedenen konstanten Regionen gekoppelt. Leichte Ketten kommen in zwei Versionen vor: κ und λ . Beide entstehen aus der Kombination von drei Genabschnitten: Bei der κ -Kette wird eine von rund 40 variablen Regionen mit einer von 5 Joining-Regionen und der konstanten Region verknüpft. Bei der λ -Kette existieren 33 variable Regionen. Quelle: Darstellung nach Murphy & Weaver, 2018.

Durch die zufällige Kombination von vererbten Gensegmenten, die V_L - und V_H -Regionen kodieren, kann der Mensch Hunderte von verschiedenen leichten Ketten und Tausende von verschiedenen schweren Ketten herstellen. Da die Antigenbindestelle zwischen den hypervariablen Schleifen der V_L und V_H liegt, entsteht aus deren Paarung eine Antikörperdiversität von Millionen verschiedener Antigenbindestelle. Diese Zahl wird erhöht durch den Verlust und den Zugewinn von Nukleotiden an der Stelle, sowie durch somatische Mutationen, innerhalb der kodierenden Sequenzen der V-Region.

Antikörperreifung

Wie bereits erwähnt, nimmt die Affinität der Antikörper, die gegen das immunisierende Antigen gebildet werden, im Laufe der Zeit nach der Immunisierung zu. Dieses Phänomen der Affinitätsreifung ist auf die Anhäufung von Punktmutationen zurückzuführen, die sowohl in den kodierenden Sequenzen der schweren Kette als auch der leichten Kette der V-Region

auftreten. Die Mutationen treten einige Zeit nach dem Zusammenbau der kodierenden Regionen auf, wenn B-Zellen durch das Antigen stimuliert werden. Dieses Ereignis tritt mit einer Rate von etwa einer Mutation pro V-Region pro Zellgeneration auf. Da diese Rate etwa um das 10^6 -fache höher ist als die spontane Mutationsrate in anderen Genen, wird der Prozess als somatische Hypermutation bezeichnet. Dabei katalysiert die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) die Hydrolyse von Cytidin zu Uridin und mutiert die spezifischen DNA-Regionen.

Nur eine kleine Minderheit der veränderten Antikörper hat eine erhöhte Affinität für das Antigen. Die wenigen B-Zellen, die diese Antikörper bzw. den BCR exprimieren, werden durch das Antigen begünstigt zu überleben und zu proliferieren. Die anderen B-Zellen sterben durch Apoptose. Als Ergebnis werden Antikörper mit zunehmend höherer Affinität während einer Immunreaktion häufiger.

1.3.3. Generierung eines monoklonalen Antikörpers

Hybridomtechnologie

Mit der Entwicklung der Hybridomtechnologie 1975 von G. Köhler und C. Milstein wurde die Grundlage für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gelegt. 1973 veröffentlichten RG. Cotton und C. Milstein ihre Ergebnisse zur Fusion von zwei Antikörper-produzierenden Zellen (Cotton and Milstein, 1973). 1975 erschien die wissenschaftliche Abhandlung von G. Köhler und C. Milstein über die Fusionierung einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle mit einer immortalen Myelomzelle zu einer immortalen Antikörper-produzierenden Hybridomzelle (Köhler and Milstein, 1975). Für diese Entdeckung wurden die beiden Forscher zusammen mit N. Jerne im Jahr 1984 mit dem Nobelpreis für Physiologie ausgezeichnet.

Die Technologie besteht aus einer Abfolge von vier Schritten.

1. Immunisierung des Versuchstiers
2. Fusionierung der B-Lymphozyten mit immortalen Myelomzellen zu Hybridomzellen
3. Hybridom-Selektion
4. Screening der Hybridome nach dem spezifischen Antikörper

Der erste Schritt umfasst die Immunisierung eines Versuchstiers mit dem gewünschten Antigen. Um das Immunsystem des Versuchstieres zur Produktion von Antikörpern anzuregen, wird in Abhängigkeit des eingesetzten Immunogens ein Adjuvans hinzugefügt. Ist ein ausreichend

Einführung

hoher Antikörpertiter im Serum vorhanden, werden die isolierten B-Zellen anschließend fusioniert. Der zweite Schritt umfasst die Fusion der B-Lymphozyten mit den Myelomzellen. Hierfür werden die Zellmembranen der B-Zellen und Myelomzellen mittels eines elektrischen Pulses aufgebrochen. Die Zellmembranen der Zellen, die sich in räumlicher Nähe befinden, verschmelzen bei Reparation miteinander. Unterstützt wird der Vorgang durch die chemische Substanz Polyethylenglykol (PEG), welche das umliegende Wasser bindet und eine räumliche Annäherung zwischen den einzelnen Zellen bewirkt. Die entstandene Hybridomzellen besitzen zwei oder mehrere Zellkerne, die spontan fusionieren müssen, um eine intakte Zelle zu generieren. Bei diesem Vorgang werden jedoch häufig Chromosomen verloren, weshalb nur ein geringer Prozentsatz der Hybridome stabil überlebt. Der dritte Schritt umfasst die HAT-Selektion der fusionierten Zellen. Nach der Zellfusion liegt ein heterogenes Zellgemisch aus fusionierten Hybridomzellen und un-fusionierten B-Zellen oder Myelomzellen vor. Während B-Lymphozyten bereits nach 7 Tagen *in vitro* Kultivierung sterben, bedarf es zur Eliminierung der nicht fusionierten Myelomzellen eines Selektionsdrucks. Dieser ergibt sich aus der angezüchteten Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Defizienz (HGPRT-Defizienz) der Myelomzellen. Das Enzym HGPRT synthetisiert aus Nukleinsäurevorstufen, wie Guanin und Hypoxanthin, die Nukleinsäure Purin. Bei einer Defizienz dieses Enzyms, können Purine ausschließlich über den *de novo*-Nukleinsäuresyntheseweg in der Zelle hergestellt werden. Sobald im Selektionsmedium Azaserin oder Aminopterin enthalten ist, wird der *de novo*-Nukleotidsyntheseweg blockiert. Folglich überleben ausschließlich immortale Hybridome, die ein intaktes HGPRT-Gen nach der Fusion besitzen.

Der vierte Schritt umfasst das Screeningverfahren auf Antikörper-produzierenden Hybridomzellen und deren sezernierte Antikörper. Ziel ist es eine Einzelklonkolonie zu identifiziert, deren Antikörper die bevorzugten Eigenschaften aufweisen. Als Standardmethode kommt hierfür die limitierende Verdünnungsklonierung zum Einsatz, die jedoch zeitintensiv und materialaufwendig ist. Bis zur Identifizierung eines geeigneten Hybridomklons, wird die Kultur fortlaufend expandiert, kultiviert, vereinzelt und getestet. Dabei besteht das Risiko, dass Hochproduzenten durch andere Nicht-Produzenten verloren gehen, indem diese die Antikörperproduzenten überwachsen.

Selektionsverfahren nach Listek et. al.

2020 wurde ein neues Verfahren zur Selektion von spezifischen Hybridomzellen von Listek et al. publiziert (Abbildung 4). Verwendet wird eine neuentwickelte transgene Zelllinie, die einen artifiziellen Oberflächenrezeptor trägt. Dieser Rezeptor liegt biotinyliert vor und bildet zusammen mit einem Komplex aus Avidin und einem Ziege anti-Maus IgG Antikörper eine Matrix um die Zelle, die als Antikörperfänger-Matrix bezeichnet wird. Sezernierte Antikörper der Hybridomzelle werden von der Matrix gebunden und bilden eine direkte Verlinkung zwischen der Ursprungshybridomzelle und ihrem zugehörigen Antikörper.

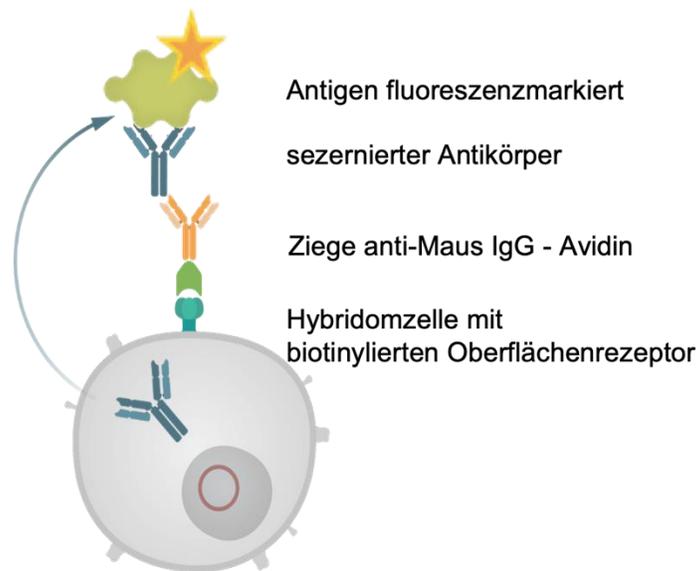


Abbildung 4: Selektionsprinzip nach Listek. et. al.

Die Hybridomzellen exprimieren einen artifiziellen Oberflächenrezeptor, der biotinyliert ist. An das gebundene Biotin bindet ein Komplex aus Avidin und Ziege anti-Maus IgG Antikörper, die zusammen mit dem artifiziellen Oberflächenrezeptor eine Matrix zum Binden des sezernierten Antikörpers bilden. An den gebundenen Antikörper kann ein fluoreszenzmarkiertes Antigen binden und die Hybridomzelle mit dem gebundenen Antikörper im FACS sortiert werden. Quelle: Modifiziert nach Listek et al., 2020.

Das Verfahren ermöglicht eine direkte Sortierung von Antigen-spezifischen Antikörperproduzierenden Hybridomzellen, indem das Antigen fluoreszenzmarkiert wird. Daraus resultiert eine zeiteffektive und materialsparende Alternative zur limitierenden Verdünnungsklonierung. Des Weiteren ermöglicht die Technologie eine bedeutend größere Anzahl an Hybridomen zu testen und erhöht die Wahrscheinlichkeit hochaffiner Antikörper zu identifizieren.

1.4. VP1 Immunisierungsstrategie

Um den Erfolg der Immunisierungsstrategie zu verstärken, wurde das Virushüllprotein VP1 in dieser Arbeit verwendet. VP1 ist eines der Hauptbestandteile der murinen Hamster-Polyomavirushülle. Es ist ein 350 Aminosäuren (AS) umfassendes Monomer, welches sich zu einem Virus-ähnlichen-Partikel (VLP) zusammenfügen kann (Abbildung 5). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass VP1 eine starke humorale und zellvermittelte Immunantwort ohne den Zusatz von Adjuvanten auslöst (Jandrig et al., 2021). Dies führte zur Entwicklung von VP1 als Impfstoff für verschiedene Anwendungen. Unter anderem basiert der weltweit vermarktete Impfstoff zur Vorbeugung von Hepatitis-B-Virusinfektionen, Engerix-B, auf VLPs mit Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Pleckaityte et al., 2015).

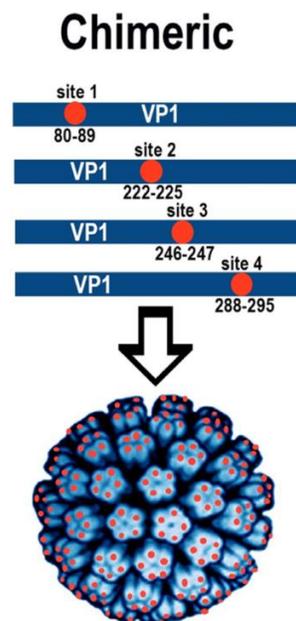


Abbildung 5: Schematische Darstellung von chimären VP1

Das Virushüllprotein VP1 besitzt vier verschiedenen Regionen (*site* 1-4) in denen Fremd-Sequenzen inseriert werden können, ohne die Struktur des Proteins zu beeinflussen. Die veränderten Peptidsequenzen werden auf der Proteinoberfläche präsentiert und können eine peptidspezifische Immunantwort erzeugen. Quelle: Modifiziert nach Jandrig et al., 2021.

Die Sequenzvergleiche und Strukturvorhersagen des murinen VP1 führten zur Identifizierung von vier flexiblen, variablen und oberflächenexponierten Regionen innerhalb von VP1, die zusätzlich zur C-terminalen Region potenzielle Integrationsstellen für fremde Epitope darstellen (Gedvilaite et al., 2000) ohne dabei die Struktur des VP1 zu verändern. Diese Positionen befinden sich (1) zwischen der 80-89 aa, (2) der 222-225 aa, (3) der 246-247 aa und (4) inmitten

der 288-295 aa (Abbildung 5). VP1 Proteine, deren Oberflächenstruktur durch Integration fremder Peptidsequenzen Epitop-modifiziert wurden, werden im Folgenden als chimäre VP1 bzw. chimäre VPs bezeichnet. In Immunisierungsstudien konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine ausgeprägte peptidspezifische Antikörperreaktionen in Mäusen mit chimären VPs induzierbar ist (Jandrig et al., 2021; Lütkecosmann et al., 2017; Scherneck et al., 2001; Zvirbliene et al., 2006).

1.5. Grundlagen der Reverse Vaccinology

Die Entwicklung der *Next-generation-sequencing* (NGS) hatte einen revolutionären Einfluss auf das Verständnis und die Analysen der heutigen Biologie. NGS liefert die Grundlage für einen neuen Ansatz in der Entwicklung von Vakzinen, die als „Reverse Vaccinology“ bezeichnet wird. Definiert wurde der Begriff „Reverse Vaccinology“ (RV) zuerst von Rappuoli (Rappuoli, 2000). Im Vergleich zum konventionellen Ansatz, der einen zeitaufwendigen und laborintensiven Auswahlprozess einzelner Impfstoffkandidaten erfordert, bietet die RV die Möglichkeit computergestützte Vorhersagen mittels Algorithmen (*in silico* Analysen) für einen zielgerichteten Auswahlprozess von Impfstoffkandidaten durchzuführen. Die Datengrundlage bilden die genomischen Daten.

Dieser *Top-Down* Ansatz kann die erforderliche Zeit für die Identifizierung von Impfstoffkandidaten erheblich verkürzen und ermöglicht die systematische Identifizierung aller potenziellen Antigene von Krankheitserregern.

Die RV wurde erstmals bei der Entwicklung eines Impfstoffs gegen *Neisseria meningitidis* der Serogruppe B (MenB) angewandt, der Hauptursache für Sepsis und Meningitis bei Kindern und jungen Erwachsenen (Rappuoli, 2000). Das gesamte MenB-Genom wurde mit Hilfe von bioinformatischen Algorithmen auf ORFs (engl. *open reading frame*; Offener Leserahmen) untersucht, die mutmaßlich oberflächenexponierte oder sezernierte Proteine kodieren und folglich für die Erkennung durch Antikörper geeignet sind. Von den etwa 600 neuen Impfstoffkandidaten wurden 350 in *E. coli* exprimiert und bei 28 eine schützende Immunität festgestellt.

Das Konzept der RV wurde nachfolgend bei vielen anderen Krankheitserregern erfolgreich angewandt. Die ersten Vertreter waren *Bacillus anthracis* (Ingram et al., 2010), *Streptococcus pneumoniae* (Maione et al., 2005) und *M. tuberculosis* (McMurry et al., 2005). Mit steigender

Rechenleistung der Server sind inzwischen eine Vielzahl an Krankheitserreger *in silico* für potenzielle Vakzine analysiert worden (Bidmos et al., 2018; Michalik et al., 2016; Rappuoli et al., 2016).

Die Identifizierung neuer Impfstoffkandidaten beinhaltet stets eine ähnliche Herangehensweise und wird im Folgenden genauer erörtert.

1. Vergleichende Genomanalyse zur Identifizierung spezifischer Gene in konservierten Sequenzbereichen

Genome von Mikroorganismen codieren eine Vielzahl an potenziellen Antigenen für die Vakzine-Herstellung bzw. Antikörpergenerierung. Mittels der vergleichenden Genomanalyse können je nach Anwendung mehrere Ziele erreicht werden.

Zum einen können konservierte Sequenzbereiche identifiziert werden, die sich innerhalb einer Bakterienspezies befinden und in allen Genomen vorkommen. Zum anderen können alle redundanten Gene verworfen werden, die nur in einzelnen Stämmen vorkommen.

Währenddessen bietet der Vergleich von verschiedenen Bakterienspezies bzw. Bakterienstämmen die Möglichkeit spezifische Gene zu identifizieren, die sich von den anderen Mikroorganismen unterscheiden und folglich ein potenzielles Ziel für die Vakzine-Herstellung aufzeigen.

2. Bestimmung der subzellulären Proteinlokalisierung

Für die Entwicklung eines Vakzins gegen Mikroorganismen sind insbesondere Proteine auf der Zelloberfläche oder sezernierte Proteine ein geeignetes Ziel. Ein Antikörper gegen ein bakterielles Zelloberflächenprotein hat das Potenzial, die Ausbreitung eines pathogenen Bakteriums zu blockieren. Bei den sezernierten Proteinen besteht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um Toxine oder andere Virulenzfaktoren handelt. Ermittelt werden kann die subzelluläre Lokalisation eines Proteins durch die Analyse von Signalsequenzen, die sich zumeist am N-terminus befinden. Datenbanken wie Psortb analysieren ganze Proteome und sind in der Lage die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle vorherzusagen.

3. Analyse von Epitopen

Eine AS-Sequenz eines Impfstoffkandidaten enthält in der Regel viele kurze Peptide, die als Epitope fungieren können. Ein Epitop ist eine definierte Bindestelle auf dem Antigen, welches mit einem B-Zell-Rezeptor oder T-Zell-Rezeptor interagiert. Es gibt zahlreiche Softwareprogramme, wie die *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) - Tools und Vaxitop, mit denen sich Immunepitope vorhersagen lassen (Potocnakova et al., 2016). Neben der Vorhersage als B-Zell oder T-Zell Epitope, lassen sich weitere kritische Faktoren wie die immunogene Bereiche der AS Sequenz oder die Zugänglichkeit der Epitopbindestelle für den Antikörper auf der Proteinoberfläche prognostizieren (Soria-Guerra et al., 2015).

1.6. Indikator-Organismen für Trinkwasserverunreinigungen

Für die Bestimmung von Verunreinigungen im Trinkwasser sind eine Reihe von verschiedenen Mikroorganismen beschrieben, die als Indikator-Organismen bezeichnet werden. Bekannte Vertreter sind unter anderem *Salmonella enterica* sp., *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) und weitere (Cabral, 2010). Im Folgenden werden die beiden Vertreter *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila* genauer betrachtet.

1.6.1. *Escherichia coli* O157:H7

E. coli Bakterien gehören zur Familie der Enterobacteriaceae und sind zumeist im Verdauungstrakt angesiedelt. Die meisten *E. coli* Stämme sind apathogen und Teil der natürlich vorhandenen Darmflora eines Säugetiers. Jedoch gibt es pathogene Vertreter, die in verschiedene Gruppen zusammengefasst sind. Es existieren die enteropathogenen *E. coli* Stämme (EPEC), die enteroinvasiven *E. coli* (EIEC), die uropathogenen *E. coli* (UPEC), sowie die enterohämorrhagischen *E. coli* Stämme (EHEC). Der Serotyp *E. coli* O157:H7 gehört zur Gruppe der EHEC und kann bei einer Infektion zu einem Hämolytisch - Urämischem Syndroms (HUS) führen, welches in schweren Fällen aufgrund von Nierenversagen tödlich verlaufen kann. Das Genom von *E. coli* O157:H7 besteht aus 5.528.445 Basen, die eine Vielzahl an Toxinen und Virulenzfaktoren codieren (Lim et al., 2010). Ein bedeutender Virulenzfaktor ist die Bildung und Sekretion des Shiga Toxin (Perna et al., 2001). In Deutschland gab es im Jahr 2000 insgesamt 16 Ausbrüche die 1.370 Fälle einer EHEC Erkrankung zur Folge hatten (Robert Koch-Institut,

2021). Der größte Ausbruch wurde 2011 in Deutschland mit 2.966 EHEC-Infektionen während der HUS-Epidemie dokumentiert (Robert Koch-Institut, 2012). Speziell Kinder unter 5 Jahren und ältere Patienten weisen eine überdurchschnittliche Inzidenz auf.

Die Hauptursache für EHEC-Verunreinigungen bildet landwirtschaftliches Nutzvieh. Die Fäkalien der Tiere gelangen in die Umwelt und kontaminieren Fleisch und Milchprodukte (Armstrong et al., 1996) sowie das Trinkwasser (Olsen, 2002).

1.6.2. *Legionella pneumophila*

L. pneumophila gehört ebenso wie *E. coli* zu den gram-negativen Stäbchenbakterien. Die Art *Legionella pneumophila* umfasst insgesamt 79 Serogruppen und ist eine von 57 Arten aus der Gruppe der *Legionellaceae*. Die Serogruppen 1, 4 und 6 sind die am häufigsten vorkommenden humanpathogenen Erreger, wovon die Serogruppe 1 einen Anteil von 60% erreicht. Das Genom von *L. pneumophila* umfasst 3.635.495 Basen (Amaro et al., 2012). *L. pneumophila* kommen vorrangig im Grund- und Oberflächenwasser vor, aber auch in Süß- und Salzwassersystemen (Mercante and Winchell, 2015). Im Freien besteht aufgrund der geringen Konzentration keine Gefahr, jedoch kann es in künstlichen Rohrsystemen zur Anreicherung und Biofilm-Bildung kommen. *L. pneumophila* wächst in Temperaturbereichen von 25 °C bis 45 °C ideal (Baron, 1996).

Die Infektion auf den Menschen erfolgt über kontaminierte Aerosole. Eine Legionellen-Pneumonie wird diagnostiziert, wenn eine schwere Lungenentzündung vorliegt. Die Bakterien gelangen in das Lungen- und Bronchiengewebe und werden von Makrophagen aufgenommen. Innerhalb der Zellen vermehren sich die Legionellen und zerstören diese, sodass es zu einer starken Entzündungsreaktion kommt (Birtles et al., 1990). In Deutschland kam es im Jahr 2020 zu 1.281 Fällen (Robert Koch-Institut, 2021). Die Letalität liegt bei gesunden Menschen bei 15 %, steigt jedoch bei immungeschwächten Personen auf bis zu 70 % (Freudenmann et al., 2011).

1.6.3. Zelloberflächenstrukturen von gramnegativen Bakterien für den antikörperbasierten Nachweis

Die Organismen *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila* gehören zu der Gruppe der gramnegativen Bakterien. Die Bakterienhülle mit ihren enthaltenen Proteinen und Polysacchariden stellt die Bindungsfläche für die antikörperbasierte Detektion dar. Aufgebaut ist die Bakterienhülle aus der inneren Zellmembran, der Peptidoglykan-Zellwand und einer äußeren Membran (engl. *outer membrane*).

Die äußere Membran besteht aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS), die der äußeren Umgebung zugewandt sind. In der äußeren Membran sind zwei Klassen von Proteinen dominierend zu finden: Lipoproteine und β -Barrel-Proteine (Rappuoli, 2000). Während die Lipoproteine noch weitgehend unbekannt sind, ist die integrale Transmembranstruktur der β -Barrel-Proteine besser studiert. Die β -Faltblatt-Struktur der Proteine ermöglicht die Anordnung zu einem Zylinder, der den passiven Transport von kleineren Molekülen wie Zucker, Ionen oder Aminosäuren ermöglicht. Diese Proteine werden als äußere Membranproteine (engl. *outer membrane proteins*, OMPs) bezeichnet. Bekannte Vertreter sind OmpF, OmpC oder OmpA. OMPs sind zumeist sehr abundant auf der Zelloberfläche zu finden und können bis zu 250.000 Kopien pro Zelle enthalten (Cowan et al., 1992).

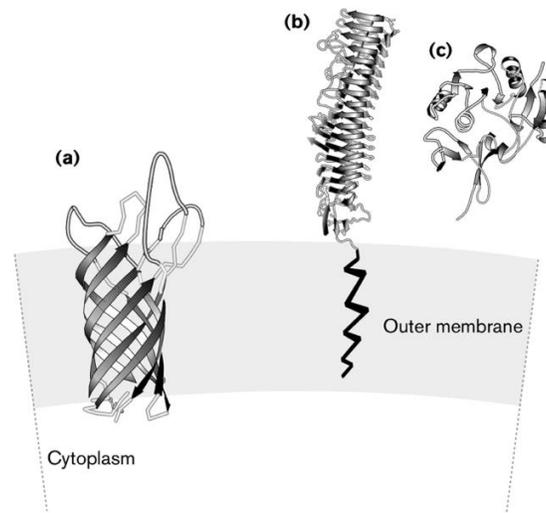


Abbildung 6: Schematische Struktur von Oberflächenproteinen für die Detektion mittels Antikörpern

Beispiele für Proteinantigene in bzw. auf der Oberfläche von Mikroorganismen (a) Schematische Struktur eines Außenmembranproteins, das größtenteils in die Membran eingebettet ist. (b,c) Schematische Strukturen von membranverankerten Lipoproteinen oder sezernierten Antigenen. Quelle: Darstellung nach Rappuoli, 2000.

Eine weitere Kategorie sind Oberflächenproteine, die für die Kolonisierung, Fortbewegung und die Adhäsion an eine Wirtszelle verantwortlich sind. Die Oberflächenproteine sind in der Peptidoglykanschicht verankert oder durchspannen die gesamte Bakterienhülle. Vertreter sind Proteine für die Ausbildung von Pili und Flagellen. Diese bestehen aus komplexen Proteinstrukturen. Für die Generierung eines Vakzins oder für die Bindung eines Antikörpers stellt die Polysaccharidschicht eine Herausforderung dar, da konservierte und charakteristische Strukturen durch die Fülle an verschiedenen Polysacchariden verborgen werden.

1.7. Ziel der Arbeit

Die meisten Antikörper, die heutzutage ein gewünschtes Bakterium detektieren, beruhen auf traditionellen Vakzinierungsstrategien mit toten bzw. inaktivierten Mikroorganismen. Diese Vorgehensweise hat viele Antikörper hervorgebracht, jedoch besitzt sie einige Limitierungen. Unter anderem weisen diese Antikörper in vielen Fällen eine hohe Kreuzreaktionen zu anderen verwandten Mikroorganismen auf. Bis heute gibt es aufgrund des hohen zeitlichen und materiellen Aufwandes und der unspezifischen Immunisierungsstrategien nur wenige mAK, die spezifisch Mikroorganismen erkennen können (Saper, 2009).

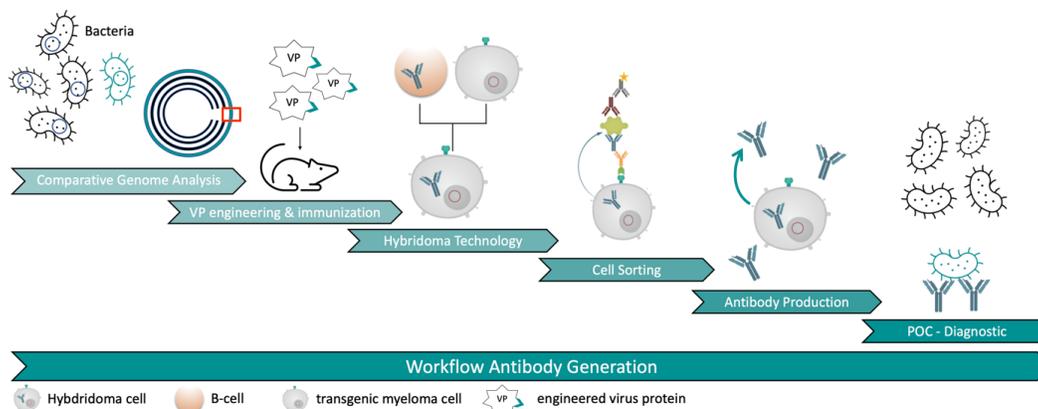


Abbildung 7 Verfahren zur zielgerichteten Generierung von mAK gegen einen Mikroorganismus

Der in dieser Arbeit beschriebene neue *Workflow* setzt sich aus mehreren Einzelschritten zusammen, die in Kombination ein neues Verfahren zur Generierung spezifischer mAK gegen Mikroorganismen bilden. Die Basis bilden *in silico* Vorhersagen, deren Ergebnisse in chimäre VPs überführt werden und zur zielgerichteten Immunisierung verwendet werden. Die resultierenden Hybridomzellen können kurz nach der Zellfusion mit einem erstellten Färbeprotokoll (basierend auf dem Verfahren von Listek et. al.) direkt nach Hybridomen sortiert werden, die einen bakterienspezifischen mAK produzieren. Quelle: Darstellung nach Göthel et al. 2021

Validiert werden soll das Verfahren anhand der Bakterienart *L. pneumophila* und dem *E. coli* Serotyp *E. coli* O157:H7, die in einem Szenario der Trinkwasseranalyse spezifisch detektiert werden sollen. Die vorliegende Arbeit strebt einen neuen kombinatorisch-interdisziplinären Ansatz zur Entwicklung und Generierung von mAK gegen Mikroorganismen an. Zu diesem Zweck sollen neue Oberflächenpeptidstrukturen auf den Mikroorganismen mittels vergleichender Genomanalysen und *in silico* Epitopenalysen identifiziert werden. Diese werden mit einer Immunisierungsstrategie, basierend auf chimären Virushüllproteinen und einem Hybridom-Selektionssystem kombiniert, um spezifische mAK gegen Mikroorganismen zu gewinnen. Die Abbildung 7 stellt diesen neuen Ansatz grafisch dar.

2. Material und Methoden

2.1. Übersicht

2.2. Material

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von Sigma, TPP und Merck bezogen.

2.2.1. Laborgeräte

Tabelle 1 Laborgeräte

Funktion	Gerät	Hersteller
Blotter	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)
Durchflusszytometer	Attune™	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, USA)
Durchflusszytometer	BD FACSMelody™	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
Durchflusszytometer	BD FACS Calibure Cell Sorter	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
Mikroskop	Celigo Imaging Cytometer	Nexcelom Bioscience, (Lawrence, USA)
Nanophotometer	NanoPhotometer™ P300	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, USA)
SDS-Gelelektrophorese- vorrichtung	PowerPac™ 300	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, USA)
Zellfusion	Elektroporator EPI 2500	Fischer, (Heidelberg, Deutschland)
UV-Bildgerät	ChemiDoc™ MP-Imaging System	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, USA)

2.2.2. Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Azaserin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Carbenicillin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Material und Methoden

Clarity™Western Blot ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules,USA)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)-Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA-Ladepuffer (5x)	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
EZ™-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HyperLadder 1kb	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Neonatales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG (Berli, Deutschland)
PAGERuler™ Plus Prestained Protein	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Protino®Ni-NTA-Agarose	Macherey Nagel GmbH (Düren, Deutschland)
Q5™ High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
Q5™Reaction Buffer	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
Roti®-Load 1, 4x reduz.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Roti®-Load 1, 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
T4-DNA-Ligasepuffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Molekula (München, Deutschland)
ThermoPol Reaction Buffer (10x)	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
Trans-Blot® Turbo™5X Transferpuffer	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules,USA)

2.2.3. Oligonukleotide

Tabelle 3 Oligonukleotide

Gen	Primer	Primersequenz [5' -> 3']
Sequenzier-primer	M13 FW	CGGATAACAATTTTCACACAGG
	T7 Prom	TAATACGACTCACTATAGGG

Material und Methoden

Epitop EC_1	EC_1 FW EC_1 RV	CTCATGTCAGAATGAGGACTCGACAGGCCAAAACC CCGGGGTTTTGGCCTGTCGAGTCCTCATTTCTGACATGAGAGCT
Epitop EC_2	EC_2 FW EC_2 RV	CTTTTCCACAAAAGGGGCAGGAGGCAGGGGAGAGAAAATC CCGGGATTTCTCTCCCTGCTCCTGCCCCCTTTGTGGAAAAGAGCT
Epitop EC_3	EC_3 FW EC_3 RV	CGCTCTGACCGGTCAGGCAAAGTCTGACGCCCGGTGCTGTCCAGC CCGGGGACAGCACCGGGCGTCAGACTTGCCTGACCGGTCAGGAGCT
Epitop EC_4	EC_5 FW EC_5 RV	CCACTACGTTGATGAACCGGGTAAAAGACACGC CCGGGCGTGTCTTTACCCGGTTCATCAACGTAGTGGAGCT
Epitop EC_5	EC_6 FW EC_6 RV	CTTCAATATGGATGATAGCCGCAATAACGGTGAGTTTC CCGGGAAACTCACCGTTATTGCGGCTATCATCCATATTGAAGAGCT
Epitop LE_31 (Pile)	LE_31 FW LE_31 RV	CTATCCTTCTTATTTACAATATATTCAAAAATCTCGTC CCGGGACGAGATTTTTGAATATATTGTAAATAAGAAGGATAGAGCT
Epitop LE_32 (MIP)	LE_32 FW LE_32 RV	CGTTGTTTTACCTTCTGGTTTACAATATAAAAGTTATTC CCGGGAATAACTTTATATTGTAAACCAGAAGGTAAAAACAACGAGCT
Epitop LE_33 (MOMP)	LE_33 FW LE_33 RV	CGTGAACCTGGTATCATTGATAATGACAGTGATCACC CCGGGGTGATCACTGTCATTATCAAAAATGATACCAGTTCACGAGCT
<i>pile</i>	pile FW pile RV	CTGGATCCCATGCTCAGTCATGTACATTTTATGA CTCTCGAGACCGGGATTCCAGCATTCT
<i>mip</i>	mip FW mip RV	CTGGATCCCATGAAGATGAAATTTGGTGACTGCAG CTCTCGAGAGATGATTTTTTCACTGAAATTAAGTG
<i>mompS</i>	momp FW momp RV	CTGGATCCCATGTTAAATTTGAAAAAAAAACAGCGGT CTCTCGAGCACATTACCAACATACTTCAAGCC

2.2.4. Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 4 Allgemeine Medien und Puffer

Name	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB)-Nähragar	LB-Nährlösung + 15 g/L Agar; autoklaviert
LB-Nährlösung	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl; autoklaviert
MACS Puffer	1x PBS + 0,5 % BSA
SOC-Medium	2 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, pH 7,5; autoklaviert
20x PBS (pH 7,4)	2,74 M NaCl, 54 mM KCl, 86 mM Na ₂ HPO ₄ , 28 mM KH ₂ PO ₄ ; autoklaviert
10x TBS (pH 7,6)	0,5 M Tris, 1,5 M NaCl; autoklaviert
50x TAE Puffer (pH 8,0)	2 M Tris, 1M Essigsäure, 50 mM EDTA; autoklaviert

Material und Methoden

TMB – Substratlösung	0,1 M H ₂ PO ₄ , 0,1 % (w/v) Harnstoff/H ₂ O ₂ , 1,2 mg/mL TMB in Ethanol im Verhältnis 5:4:1
----------------------	---

Tabelle 5 Medien für Säugerzelllinien-Kultivierung und elektrochemische Zellfusion

Name	Zusammensetzung
Vollmedium	RPMI 1640, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol
HAT-Selektionsmedium	RPMI 1640, 20 % FKS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin, 1 µg/mL Azaserin, 1 mM Hypoxanthin, 12 mM 2-Deoxythymidin, 0,1 mg/mL Gentamycin
BSS-Puffer	125 mM NaCl, 5 mM KCl 4 mM CaCl ₂ , 2,5 mM MgCl ₂ , 5 mM Tris-HCl, pH 7,4

Tabelle 6 Puffer für die Verwendung in der SDS-PAGE

Name	Zusammensetzung
1x Laufpuffer	25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl-Puffer, 0,4% (w/v) SDS, 0,4% (v/v) TEMED, pH 6,8
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl-Puffer, 0,4% (w/v) SDS, 0,4% (v/v) TEMED, pH 8,8
APS-Lösung	10% APS in H ₂ O _{VE}
Reduzierender Probenpuffer	Roti®-Load 1, 4x konzentriert
Färbelösung	10 mL Roti®-Blue 5x konzentriert, 60 mL H ₂ O _{VE} , 20 mL MeOH

Tabelle 7 Puffer & Lösungen für den Western Blot

Name	Zusammensetzung
Blockpuffer	3% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS
Transferpuffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% SDS, 20% MeOH, pH 8,3
Ponceau S	0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure
Entwicklerlösung	<i>Clarity™ Western ECL Substrat</i>

Tabelle 8 Puffer für die affinitätschromatographische Reinigung mittels Protein A

Name	Zusammensetzung
Beladungspuffer	4 M NaCl, 2 M Glycin in H ₂ O _{VE}
Waschpuffer	Beladungspuffer 1:3 mit H ₂ O _{VE}
Elutionspuffer I	0,1 M Citrat, HCl in H ₂ O _{VE} , pH 5,0
Elutionspuffer II	0,1 M Citrat, HCl in H ₂ O _{VE} , pH 3,5
Neutralisationspuffer	3,5 M Tris/HCl, pH 9,0
Reinigungspuffer	0,1 M Citrat, HCl in H ₂ O _{VE} , pH 2,0
Aufbewahrungspuffer	0,1 M CH ₃ COOH, 1% (v/v) Benzylalkohol, 0,01 NaN ₃ in H ₂ O _{VE} pH 5,2

Tabelle 9 Puffer & Lösungen für die Metallchelate-Affinitätschromatographie

Name	Zusammensetzung
Denaturierender Puffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 8 M Urea, pH 7,5
Waschpuffer I	denaturierenden Puffer + 10 mM Imidazol
Waschpuffer II	denaturierenden Puffer + 20 mM Imidazol
Elutionspuffer	denaturierenden Puffer + 250 mM Imidazol
Rückfaltungspuffer	1,25 mM GSH 0,5 mM GSSG, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

Tabelle 10 Puffer & Lösungen für Affinitätschromatographie von Protein-StrepTag II Komplex

Name	Zusammensetzung
Puffer W	10 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8.0
Puffer E	10 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8.0

2.2.5. Bakterienstämme

Tabelle 11 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Resistenz	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	keine	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Material und Methoden

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	keine	DSMZ, Ref.-Nr.: 25993 (El-Sharkawy et. al., 2016)
<i>E. coli</i> Rosetta-gami™ 2 (DE3)	Ampicillin	Professur Immuntechnologie, Universität Potsdam, Deutschland
<i>E. coli</i> O157:H7 (Hitze inaktiviert)	keine	antibodies-online GmbH, Aachen, Deutschland
<i>L. pneumophila</i> (Hitze inaktiviert)	keine	Sifin diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland

2.2.6. Plasmide

Basisplasmide

In der Tabelle 12 sind die Plasmide aufgeführt, die als Ausgangsbasis für weitere Klonierungen verwendet wurden.

Tabelle 12 Basisplasmide

Plasmid	Resistenz	Herkunft
pET21b	Carbenicillin	Addgene (Watertown, USA)
pET22b	Carbenicillin	Addgene (Watertown, USA)

Generierte Plasmide

In der Tabelle 13 sind alle Plasmide aufgeführt, die im Laufe der Dissertation aus den Basisplasmiden generiert wurden.

Tabelle 13 Generierte Plasmide

Plasmidname	Resistenz	Basisvektor	Insert
pET21b:EC_1	Carbenicillin	pET21b	Epitop EC_1 AS: NVYVNLAPVVNV
pET21b:EC_2	Carbenicillin	pET21b	Epitop EC_2 AS: YLTPVSSAGG
pET21b:EC_3	Carbenicillin	pET21b	Epitop EC_3 AS: PGSVPIPLTVYC
pET21b:EC_4	Carbenicillin	pET21b	Epitop EC_4 AS: HYVDEPGKDT
pET21b:EC_5	Carbenicillin	pET21b	Epitop EC_5 AS: FNMDDSRNNGEF
pET21b:LE_31	Carbenicillin	pET21b	Epitop LE_31 AS: YPSYLQYIQKSR
pET21b:LE_32	Carbenicillin	pET21b	Epitop LE_32 AS: VVLPSGLQYKVI

Material und Methoden

pET21b:LE_33	Carbenicillin	pET21b	Epitop LE_33 AS: VNWYHFDNDS DH
pET22b: <i>pilE</i> : Strep-Tag II	Carbenicillin	pET22b	<i>pilE</i> , Strep-Tag II
pET22b: <i>mip</i> : Strep-Tag II	Carbenicillin	pET22b	<i>mip</i> , Strep-Tag II
pET22b: <i>mompS</i> : Strep-Tag II	Carbenicillin	pET22b	<i>mompS</i> , Strep-Tag II

2.2.7. Kommerzielle Kits

Tabelle 14 Kommerzielle Kits

Name	Hersteller
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey Nagel GmbH (Düren, Deutschland)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel GmbH (Düren, Deutschland)
BACTERIAL & YEAST GENOMIC DNA KIT	Roboklon GmbH (Berlin, Deutschland)

2.2.8. Antikörper und Proteinkonjugate

Tabelle 15 Antikörper und Proteinkonjugate

Antikörper/Protein	Konjugat	Spezifität	Hersteller
Streptavidin (SAV)	PE	-	eBioscience (Hatfield, England)
SAV	POD	-	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Esel anti-Ziege IgG	PE	polyklonal	Biologend (San Diego, USA)
Ziege anti-Maus IgG	-	polyklonal	Jackson ImmunoResearch (UK)
Ziege anti-Maus IgG	PE	polyklonal	Abcam (Cambridge, USA)
Ziege anti-Maus IgG	POD	polyklonal	Dianova, (Hamburg, Deutschland)
Ziege anti-Maus IgG1	Biotin	polyklonal	Dianova, (Hamburg, Deutschland)
Ziege anti-Maus IgG2a	Biotin	polyklonal	Dianova, (Hamburg, Deutschland)
Ziege anti-Maus IgG2b	Biotin	polyklonal	Dianova, (Hamburg, Deutschland)
Ziege anti-Maus IgG3	Biotin	polyklonal	Dianova, (Hamburg, Deutschland)

Material und Methoden

Ziege anti-Maus IgM	Biotin	polyklonal	Dianova, (Hamburg, Deutschland)
Ziege anti-Kaninchen Ig	PE	polyklonal	Jackson ImmunoResearch (UK)
Maus anti-6XHis-Tag®	POD	monoklonal	Abcam (Cambridge, USA)
Maus anti-LPS	-	monoklonal	Abcam (Cambridge, USA)
Maus anti - <i>L. pneumophila</i> (H61F2F8)	-	monoklonal	Professur Immuntechnologie, Universität Potsdam
Kaninchen anti - <i>L. pneumophila</i>	PE	polyklonal	Invitrogen (Waltham, USA)
Kaninchen anti- <i>E. coli</i>	-	polyklonal	Abcam (Cambridge, USA)
Schwein anti-Kaninchen IgG	POD	polyklonal	Dako (Agilent Santa Cruz, USA)

2.2.9. Versuchstiere

Zur Immunisierung wurden in dieser Arbeit die Mäuse des Inzuchtstammes Balb/c verwendet. Für die Generierung von Feederzellen wurde der NMRI Mausstamm genutzt. Alle Arbeiten mit den Mäusen wurden nach den gesetzlichen Richtlinien des Landesamts für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit des Landes Brandenburg von fachlich geschultem Personal durchgeführt.

2.2.10. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Myelomzelllinie Sp2/0-Ag14 (Herkunft: Professur Immuntechnologie, Universität Potsdam), sowie die transgene SP2/0 Myelomzelllinie (Herkunft: Professur , (Listek et al., 2020)) verwendet.

Tabelle 16 neu generierte Zelllinien

Name	Genetischer Hintergrund	Hersteller/Herkunft
H3-2-B8	Trans Sp2/0-Ag14	AG Immuntechnologie, Universität Potsdam
H3-3-G1	Trans Sp2/0-Ag14	AG Immuntechnologie, Universität Potsdam
H5-2-F4	Trans Sp2/0-Ag14	AG Immuntechnologie, Universität Potsdam

Material und Methoden

H5-3-D10	Trans Sp2/0- Ag14	AG Immuntechnologie, Universität Potsdam
H5-3-E10	Trans Sp2/0- Ag14	AG Immuntechnologie, Universität Potsdam

2.2.11. Software

Tabelle 17 Software

Name	Hersteller
GraphPad Prism 5.0	Graphpad Holdings, LLC (Kalifornien, USA)
FlowJo 10.6.1	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
BD Melody	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)

2.3. Bioinformatische Methoden

2.3.1. Komparative Genomanalyse

Für die vergleichende Genomanalyse wurden die Genome von mehreren Bakterien, die sich im selben Habitat wie der Zielorganismus befinden, miteinander verglichen. Das Ziel der Analyse ist es, Gene zu identifizieren, die einzigartig für den Zielorganismus sind. Diese stellen ein potenziell geeignetes Ziel für die Antikörpergenerierung dar. Als Zielorganismen sind in dieser Arbeit *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila* definiert.

Bei der komparativen Analyse geht es um die Bestimmung der Homologie von Genen bzw. Proteinen. In diesem Zusammenhang ist der Begriff der Orthologen zu benennen, die zu den Homologen gehören. Unter dem Begriff orthologe Gene bzw. Proteine werden Moleküle bezeichnet, die eine ähnliche biologische Funktion und damit einhergehend eine homologe Sequenz in unterschiedlichen Organismengruppen aufweisen. Daraus abgeleitet ergibt sich das *core genome*, welches alle Gene, die in jedem Stamm einer Spezies wiederzufinden sind, zusammenfasst.

Für die vergleichende Genomanalyse wurden der Algorithmen BLAST (Altschul et al., 1994) verwendet. Dazu wurden die Tools der Ressourcen von IMG/M (Chen et al., 2019) und BioCyc (Peter D Karp et al., 2019) genutzt, um die Mikroorganismengenome miteinander zu vergleichen. Als Referenzgenom wurde entweder *E. coli* O157:H7 oder *L. pneumophila* festgesetzt und mit den in Tabelle 18 aufgeführten Bakterienstämme verglichen. Als Parameter wurde der *E-value* und die Homologie der Sequenzen verwendet. Sobald ein Vergleich zur Referenzgenomsequenz ein *E-value* größer 0,5 bzw. eine Sequenzübereinstimmung (Homologie) von 70% oder höher ergab, wurden die Gene aus dem Referenzgenom gefiltert. Am Ende sind ausschließlich Gene aus dem Referenzgenom vorhanden, die einen *E-value* kleiner 0,5 und eine Sequenzübereinstimmung von 70% oder niedriger zu den anderen Genomsequenzen aufweisen.

Tabelle 18 Verwendete Bakterienstämme für die vergleichende Genomanalyse

Bakterienstämme	Herkunft
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	NZ_CP015855.1
<i>Legionella pneumophila</i>	NZ_CP015941.1
<i>Salmonella enterica</i> C629	NZ_CP015724.1
<i>Campylobacter jejuni</i> 4031	NC_022529.1
<i>Proteus mirabilis</i> HI4320	NC_010554.1
<i>Klebsiella aerogenes</i> KCTC 2190	NC_015663.1
<i>Serratia marcescens</i> subsp. marcescens Db11	NZ_HG326223.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NC_002516.2
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus NCTC 8325	NC_007795.1
<i>Escherichia coli</i> CORE-genome	BioCyc version 25.0

2.3.2. Vorhersage der Proteinlokalisierung

Die Lokalisation der Proteine aus der vorhergehenden vergleichenden Genomanalyse wurde mittels der Proteinlokalisationsdatenbank Psortb bestimmt (Yu et al., 2010). In Psortb sind alle charakteristischen Sortiersignale für Proteine hinterlegt. Der Algorithmus vergleicht die Aminosäuresequenz des Proteins mit denen der Datenbank und gibt eine Wahrscheinlichkeit für die Proteinlokalisierung aus. Zusätzlich betrachtet der Algorithmus die Länge der N-terminalen Region, der hydrophoben Region und die Nettoladungen für seine Vorhersagen.

Dabei unterscheidet der Algorithmus in folgende Lokalisations-Kategorien: Zytoplasma, Periplasma, innere Membran, äußere Membran und extrazellulär. In der vorliegenden Arbeit wurde die Psortb Version 3.0 verwendet.

Für die Analyse wurden die Standardparameter für gramnegative Bakterien verwendet. Für die weiteren Analyseschritte des *Workflows* wurden nur Proteine betrachtet, die sich in der äußeren Zellmembran befinden oder als extrazellulär bestimmt wurden.

2.3.3. Vorhersage der B-Zell-Epitope

Für die Epitopvorhersage wurden die Tools der Datenbank IEDB verwendet und auf die zuvor identifizierten Proteine der äußeren Bakterienzellmembran bzw. Proteine im extrazellulären Bereich angewandt (Vita et al., 2019).

Das Ziel der Vorhersage ist es, geeignete kurze Peptidsequenzen aus der Aminosäuresequenz der Proteine zu identifizieren, die für die Antikörpergenerierung von Vorteil sind. Bei Vorhandensein der folgenden Kriterien liegt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit vor, dass es sich

um eine geeignete Peptid- bzw. Epitopsequenz handelt (Galanis et al., 2021; Potocnakova et al., 2016):

1. Eine lineare Aminosäuresequenz existiert
2. Die Epitopsequenz ist auf der Proteinoberfläche zugänglich
3. Bestimmung von immunogenen Bereichen (Schwellenwert > 1) mittels eines Index

Lineare B-Zell-Epitope aus einer Proteinsequenz wurden mit Hilfe des BepiPred-2.0-Server vorhergesagt. Hierfür wurde ein sogenannter *Random-Forest*-Algorithmus verwendet, der auf Epitopen und Nicht-Epitop-Aminosäuren trainiert wurde, die aus Kristallstrukturen bestimmt wurden. Anschließend wurde eine sequenzielle Vorhersage durchgeführt. Die Aminosäuren mit Werten über dem Schwellenwert wurden als Teil eines Epitops vorhergesagt. Der hier verwendete Schwellenwert war der Standardwert von 0,5. Alle gefilterten linearen Epitope wurden anschließend auf ihre Zugänglichkeit auf der Proteinoberfläche untersucht und ihre immunogenen Bereiche bestimmt.

Nach Emini wurde die Oberflächenwahrscheinlichkeit bestimmt: Eine Hexapeptidsequenz mit einer Oberflächenwahrscheinlichkeit größer als 1,0 zeigt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an, auf der Proteinoberfläche lokalisiert zu sein (Emini et al., 1985) .

Zur Vorhersage von immunogenen Bereichen innerhalb der Proteine wurde die semi-empirische Methode von Kolaskar and Tongaonkar verwendet (Kolaskar and Tongaonkar, 1990), die physikochemische Eigenschaften von Aminosäureresten und deren Häufigkeit nutzt. Der Algorithmus sucht nach den hydrophoben Aminosäuren Cys, Leu und Val und erstellt einen Index für immunogene Bereiche innerhalb der AS-Sequenz. Dieser weist bei Überschreiten des Schwellenwertes von 1,0 auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für ein Epitop hin. Die Treffergenauigkeit des Algorithmus liegt bei 75%.

2.3.4. Vorhersage von Proteinstrukturen

Der letzte Schritt im bioinformatischen Teil des *Workflows* bildete die Verifizierung der identifizierten Epitopsequenzen innerhalb der zugehörigen Proteinstrukturen. Ziel war es, die Epitopsequenzen auf die Proteinstrukturen zu übertragen und die Lokalisation mit den Proteinstrukturmodellen zu überprüfen. Für diesen Zweck wurden die Proteinmodelle, falls nicht als Kristallstruktur vorhanden, mittels Strukturvorhersagertools ermittelt. In diesem

Zusammenhang wurden die Ressourcen von I-Tasser (Yang et al., 2015) genutzt. Die Strukturvorhersage wurde mit den Standardparametern durchgeführt. Für die Proteine FimH und OmpG waren die Kristallstrukturdaten öffentlich zugänglich. Für die Proteine Pile, MOMP und Mip wurden Proteinmodelle nach I-Tasser generiert.

Die ermittelten Modelle und die zugehörigen Epitope wurden in PyMol (Schrödinger, LLC, 2015) visualisiert.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Präparation von genomischer Desoxyribonukleinsäure aus Bakterienzellen

Um die genomische DNA aus Bakterienzellen zu erhalten, wurde das BACTERIAL & YEAST GENOMIC DNA KIT von Roboklon (Berlin, Deutschland) verwendet. Es wurden 100 µL einer Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Elution erfolgte in 100 µL H₂O_{VE}. Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.4.2. PCR zur Amplifikation von ds – Desoxyribonukleinsäure

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Amplifikation von doppelsträngiger (ds) DNA-Abschnitten aus genomischer DNA oder Plasmiden verwendet. Hierfür wird im ersten Schritt die dsDNA in einzelsträngige (ss) DNA aufgetrennt. Oligonukleotide, auch als Primer bezeichnet, hybridisieren an die komplementären Sequenzstränge und das *Gene of Interest* (GOI) kann mittels der DNA-Polymerase und unter Vorhandensein von dNTPs amplifiziert werden.

Ein PCR-Ansatz umfasst ein Volumen von 25 µL und besteht aus 1x Q5™ Reaktionspuffer mit 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, jeweils 0,5 µM sequenzspezifische Primer und 50 pg - 1 µg dsDNA sowie 1 Einheit der Q5 DNA-Polymerase.

Die PCR erfolgte im Thermozykler mit folgendem Programm:

Tabelle 19 Thermozyklerprogramm zur Gen-Amplifikation

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initialdenaturierung	98	30	
Denaturierung	98	10	} 32x
Anlagerung	58	20	
Elongation	72	[20-30]s/kb	
Finale Elongation	72	120	

2.4.3. Agarose – Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt, um die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Basenpaar-Länge aufzutrennen. Für diesen Zweck wurden 1-1,5%-ige Agarosegele verwendet, die vor der Polymerisation mit Ethidiumbromid versetzt wurden (0,2 mg/L). Das Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren und verändert das Absorptionsspektrum, sodass die DNA-Banden detektierbar sind. Zur besseren Präparation wurden die Proben mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard kamen 3 µL des Hyperladder 1kb von Bionline zum Einsatz. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte im 1X TAE-Ladepuffer bei einer Gleichspannung von 100 V über 45 Minuten. Detektiert und dokumentiert wurden die Messungen am ChemiDoc™ MP-Imaging System unter UV-Licht.

2.4.4. Reinigung von aufgetrennten dsDNA-Fragmenten

Nach erfolgreicher Trennung der DNA-Fragmente in der Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Banden aus dem Gel präpariert. Für die Reinigung der dsDNA wurde das NucleoSpin® Gel and PCR CleanUp Kit verwendet nach den Protokollangaben des Herstellers. Die Elution erfolgte in 30 µL H₂O_{VE}. Die Konzentration und Reinheit der dsDNA wurde anschließend am Nanophotometer bestimmt.

2.4.5. Vektor-Linearisierung und Dephosphorylierung

Für die Linearisierung von Vektoren wurden unterschiedliche Typ II-Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Zum Einsatz kamen die *FastDigest* Enzyme *KpnI*, *NdeI*, *SacI*, *XbaI* sowie *XhoI* der Firma ThermoFischer. Die Typ II-Restriktionsenzyme sind 6-Cutter. Das heißt, sie schneiden an einer spezifischen 6 bp umfassenden Stelle und erzeugen charakteristische DNA-Überhänge.

Diese werden genutzt, um das GOI in den Zielvektor mittels Ligation zu integrieren.

Zusätzlich wurden die linearisierten Vektoren an der 5'-terminalen Phosphatgruppe simultan dephosphoryliert. Dadurch wird eine Rezirkulation des Plasmids während der Ligation unterbunden. Für diesen Zweck wurde eine Einheit der thermosensitiven Alkalinen Phosphatase *FastAP* zu 1.000 ng Plasmid-DNA, einer Einheit des verwendeten Restriktionsenzym und 1x*FastDigest* Puffer gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 65°C für 15 min inaktiviert. Der linearisierte Vektor wird anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und für die Ligation eingesetzt.

2.4.6. Hybridisierung von ssDNA-Oligonukleotiden

Um die identifizierten Epitope mit einer Länge von 12 Aminosäuren in den Loop 4 des Virushüllproteins VP1 zu integrieren (siehe Abschnitt 1.4), wurden ssDNA-Oligonukleotide von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Während der Hybridisierung lagern sich die komplementären ssDNA-Stränge des *forward*- sowie des *reverse*-Stranges aneinander an. Der Hybridisierungsansatz enthält jeweils 100 nmol/mL der ssDNA-Oligonukleotide und den 1x *Annealing*-Puffer. Die Reaktion erfolgt im Thermozykler mit den nachfolgenden Reaktionsbedingungen.

Tabelle 20 Thermozyklerprogramm für Hybridisierung von ssDNA-Oligonukleotide

Dauer [h]	Temperatur [°C]
1 h	98
1 h	85
1 h	75
1 h	65
1 h	55
1 h	45
1 h	35
1 h	25
1 h	15
∞	8

2.4.7. Ligation von ds – Desoxyribonukleinsäure

Die Ligation erfolgt, nachdem die DNA-Fragmente und der Zielvektor mit den Restriktionsenzymen verdaut und anschließend gereinigt wurden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphatresten und 3'-OH-Resten und verbindet die spezifischen Überhänge zwischen Fremd-DNA und Zielvektor. In dem Ligationsansatz werden 100 ng des linearisierten Vektors mit dem zu inserierenden DNA-Fragment im molaren Verhältnis 1:3 zusammengeführt. Inkubiert wird der Ligationsmix 1 h bei Raumtemperatur und anschließend mittels Hitzeschock in die Zellen überführt (Abschnitt 2.4.8). Die neu generierten Plasmide mit dem Zielvektor und dem DNA-Fragment (Insert) sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Plasmide pET21b und pET22b sind Vektoren, die insbesondere der Expression von rekombinanten Proteinen dienen.

2.4.8. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation von Plasmiden wurden chemisch kompetente DH5 α - oder BL21 (DE3) - Zellen verwendet. Hierfür wurden 50 μ L chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 μ L Ligationsansatz oder 5 ng des Vektors versetzt. Der Transformationsansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 s. Die Suspension wurde nachfolgend für 2 min auf Eis inkubiert und im Folgenden mit 1 mL LB-Medium versetzt. Es folgte eine dynamische Inkubation für 1 h bei 37°C und 450 U/min. Im Anschluss wurden die Zellen pelletiert bei 3.500 U/min für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 μ L LB-Medium aufgenommen, wovon 150 μ L auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C invertiert inkubierten. Die Selektionsagarplatten wurden zuvor frisch angesetzt und enthielten das entsprechende Antibiotikum, welches in Tabelle 13 aufgeführt ist. Ausschließlich Klone, die eine entsprechende Resistenz gegen das enthaltene Antibiotikum durch die Transformation des Plasmides erhalten haben, konnten auf den Selektionsagarplatten wachsen.

2.4.9. Bakterienkolonie – PCR

Die Bakterienkolonie-PCR wird eingesetzt, um angewachsene Klone nach der Transformation auf das Vorhandensein des *GOI* zu überprüfen.

Die Klone werden von der LB-Agarplatte gepickt und in 10 μ L H₂O resuspendiert. Die Bakteriensuspension dient in der nachfolgenden PCR als DNA-Template. Weitere

Komponenten des PCR-Ansatzes sind 200 μM dNTPs, jeweils 0,5 μM der sequenzspezifischen Primer, 1x *ThermoPol* Reaktionspuffer und eine Einheit der *Taq*-Polymerase.

Die Bakterienkolonie-PCR erfolgte mit dem nachfolgenden Thermozykler-Programm. Die in den Proben enthaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend in der Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt.

Tabelle 21 Thermozyklerprogramm für die Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initialdenaturierung	98	180	
Denaturierung	98	10	} 30x
Anlagerung	58	20	
Elongation	72	[60]s/kb	
Finale Elongation	72	600	

2.4.10. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mithilfe des NucleoSpin® Plasmid EasyPure-Kits durchgeführt. Einzelklone wurden am Tag zuvor von den Selektionsagarplatten entnommen und in 5 ml LB-Selektionsmedium überführt. Hiervon wurden 4 mL der bei 37°C über Nacht gewachsenen Bakterienkultur durch Zentrifugation bei 8.000 x g für 3 min geerntet. Die Reinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Elution wurden 2x 15 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{VE}}$ verwendet. Sowohl die Konzentration als auch die Reinheit wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 und 260 nm bestimmt.

2.4.11. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von LGC-Genomics (Berlin, Deutschland) nach der Sanger Methode durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 100 ng/ μL DNA in einem Volumen von 15 μL zur Sequenzierung eingesendet. Die entsprechenden Sequenzierungsprimer wurden vor Ort in einer Konzentration von 5 μM hinzugefügt.

2.5. Mikrobiologische Methoden

2.5.1. Anzucht von Bakterienkulturen

Für die Anzucht von Bakterienzellen wurden 5 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Tabelle 12 & Tabelle 13) vorbereitet und mit dem Bakterienstamm infiziert. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37°C und 230 U/min dynamisch inkubiert.

2.5.2. Kryokonservierung von Bakterienzellen

Für die Kryokonservierung von Bakterienzellen wurden 0,5 mL einer Übernachtskultur mit einer 20% Glycerin-Lösung im Volumenverhältnis 1:1 zusammengeführt. Die Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte bei -80°C.

2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.6.1. Expression rekombinanter Proteinantigene

Alle Proteine wurden in *E. coli* Zellen unter der Kontrolle des lac-Promotors exprimiert. Das lac-Operon wird durch Laktose vorübergehend induziert, da Laktose von den Bakterien verstoffwechselt wird. Um eine konstante Aktivität des lac-Operons zu erreichen, wird das Struktur analogon Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) verwendet. IPTG bindet auf die gleiche Weise wie Laktose an den lacI-Repressor, inaktiviert ihn und verhindert auf diese Weise seine Bindung an den lac-Operator. Die Bakterien können IPTG jedoch nicht verstoffwechseln, was zu einer konstanten Induktion des lac-Promotors und damit zur Expression des Fusionsproteins führt.

Nach der erfolgreichen Transformation der Expressionsplasmide (siehe Tabelle 13) in *E. coli* BL21 oder *E. coli* Rosetta gami 2 konnten die rekombinanten Proteine exprimiert werden.

Hierfür wurden 20 mL Übernachtskultur in entsprechendem Selektionsmedium angesetzt und bei 37°C und 230 rpm kultiviert. Am Folgetag wurden 10 mL in 1 L Kulturmedium überführt und bei 230 rpm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. Sobald die OD erreicht war, wurde 1 mL einer 1 M IPTG-Lösung hinzugegeben. IPTG induziert die Proteinexpression der rekombinanten Proteine. Die Proteinexpression erfolgt über 12 Stunden bei 26°C und 100 rpm. Die Zellen wurden abschließend geerntet durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 min

bei 4°C und das Pellet in PBS bzw. denaturierenden Bindepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (15 min, 75% Amplitude, 2s Puls, 2s Pause, 4 °C). Die Reinigung der VPs erfolgte über die Metallchelate-Affinitätschromatographie, die der rekombinanten Proteine MIP, PilE und MOMP über die Streptactin-Affinitätschromatographie.

2.6.2. Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie beruht auf der Wechselwirkung zwischen Histidin- oder Cystein-Seitenketten zu Metallionen, welche an einer Matrix immobilisiert sind. Auf diese Weise können Proteine, die einen His₆-Tag tragen, aus einem Proteingemisch gebunden und gereinigt werden. Der His₆-Tag ist eine Oligohistidin-Sequenz, die eine hohe Affinität zu chelatisierten Metallionen aufweist (Porath, 1992; Schlapschy and Skerra, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde das Produkt Ni Sepharose 6 Fast Flow als Matrix verwendet. Für den Chelatkomplex wurden dabei an eine Sepharose-Matrix gebundene Iminodiessigsäure-Gruppen als Chelatbildner verwendet. Als Metallion kommt das Ni²⁺ zum Einsatz, an das die Proteine mit ihrem C-terminalen His₆-Tag binden. In Tabelle 9 sind die entsprechenden Puffer für die Proteinreinigung aufgeführt.

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde für die Reinigung von rekombinanten VPs verwendet. Für die Proteinreinigung wurden die *E. coli* Zellen zunächst mittels Ultraschall (15 min, 75% Amplitude, 2s Puls, 2s Pause) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 13.000 x g für 20 min und 4 °C pelletiert und der Überstand zu 3 mL Ni Sepharose 6 Fast Flow Säulenmaterial gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Durchfluss gesammelt und die Säule mit 50 mL Waschpuffer I gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die Säule wurde ein zweites Mal mit 50 mL Waschpuffer II gewaschen und anschließend eluiert. Die Elution erfolgte mit 1,8 mL, 3,2 mL, und 2 mL Elutionspuffer, der 250 mM Imidazol enthält. Das Imidazol verdrängt die His₆-Tag Proteine vom Metallion. Da es sich bei der hier beschriebenen Methode um eine denaturierende Reinigung von Proteinen handelt, wurden die Elutionsfraktionen im letzten Schritt tropfenweise in Rückfaltungspuffer überführt, um die Disulfidbrücken der Proteine erneut auszubilden und eine native Struktur zu erhalten. Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.

2.6.3. Affinitätschromatographie mittels Strep-Tactin®

Für die Isolierung der rekombinanten Proteine MIP, MOMP und PilE wurde die Strep-Tag®II – Strep-Tactin® Technologie von IBA (IBA GmbH, Deutschland) verwendet (Schlupschy and Skerra, 2001). Das Prinzip der Technologie beruht auf der Bindung von Biotin zu SAV, welche die stärkste bekannte nicht-kovalente Bindung darstellt. Der Strep-Tag®II imitiert das Biotin und bindet an die Biotin-Bindestelle von SAV und dessen modifizierte Variante Strep-Tactin®.

Nachdem die *E. coli* mit Hilfe des Ultraschallaufschlusses lysiert und die Zelltrümmer pelletiert wurden (13.000 x g, 15 min, 4 °C), bestand der erste Schritt in der Zugabe der Plasmafraktion zu 2 mL Säulenmaterial (Strep-Tactin®-Sephärose). Um eventuelle Bindestellen von Strep-Tactin® durch freies Biotin im Zentrifugationsüberstand zu eliminieren, wurde 1 U Avidin hinzugegeben. Avidin bindet nicht-kovalent Biotin, jedoch nicht den Strep-Tag®II der rekombinanten Proteine. In einem Rotorschüttler wurden die Komponenten für 1 h bei RT dynamisch inkubiert und der Durchlauf anschließend aufgefangen. Die Säule wurde mit 20 mL Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 x 2,5 mL Puffer E. Puffer E enthält D-Desthiobiotin, welches die gebundenen Proteine mit dem Strep-Tag®II verdrängt. Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Durch Dialyse gegen 2 L PBS wurde ein Pufferaustausch der eluierten rekombinanten Proteine vorgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch am Nanophotometer ermittelt.

2.6.4. Affinitätschromatographische Reinigung von murinen Antikörpern mittels Protein A

Monoklonale Antikörper können aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen durch Affinitätschromatographie mit einer Protein A-Säule gereinigt werden. Bei diesem Verfahren bindet der Fc-Teil des Antikörpers an das Protein A und wird zurückgehalten. Die Elution der Antikörper von der Protein A-Matrix erfolgte durch ein kontinuierliches Absenken des pH-Werts. Zur Reinigung der Antikörper wurde das Chromatographiesystem BioLogic LP verwendet, welches die optische Dichte bei 280 nm kontinuierlich misst.

Für die Reinigung der mAK aus 500 mL Kulturüberstand wurden zuerst Zellfragmente entfernt, indem dieser bei 13.000 x g für 10 min und 4 °C zentrifugiert und anschließend filtriert wurde. Der Kulturüberstand wurde im Verhältnis 1:3 mit Beladungspuffer vermischt. Die Beladung der

Protein A Säule mit den Antikörpern erfolgte über Nacht in einer kontinuierlichen Schleife. Am Folgetag wurde die beladene Protein A-Säule in das Chromatographiesystem installiert und eine Durchflussrate von 1 mL/min eingestellt. Um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen, wurde diese zu Beginn mit Waschpuffer gespült, bis eine Basislinie bei 280 nm zu erkennen war. Daraufhin folgte die Elution mit den Elutionspuffern I und II. Gesammelt wurden die Fraktionen in 15 mL-Reaktionsgefäßen, in denen 400 µL Neutralisationspuffer vorgelegt waren. Im Anschluss wurde die Säule mit dem Reinigungspuffer gespült, um alle restlichen Proteine zu entfernen. Die Lagerung der Protein A-Säulen erfolgte in Aufbewahrungspuffer bei 4°C.

Die eluierten Fraktionen wurden photometrisch am NanoPhotometer vermessen und ihre Reinheit mit Hilfe einer SDS-PAGE überprüft. Zum Schluss wurden die Antikörperfraktionen in PBS-Puffer dialysiert.

2.6.5. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde angewandt, um die relativen Molekülmassen von Proteinen zu bestimmen. Das analytische Verfahren wurde erstmals von Ulrich Lämmli (1970) (Laemmli, 1970) beschrieben.

Hierbei dient Natriumdodecylsulfat als anionisches Detergens, welches die Eigenladung der Proteine überlagert. In der nachfolgenden Gelelektrophorese trennen sich die Proteine folglich entsprechend ihrer Molekülmasse in der porösen Polyacrylamid-Gelmatrix auf.

Angewandt wurde die SDS-PAGE zum einen für die Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung der Antikörper und der chimären VPs sowie der *L. pneumophila*-Proteine MIP, MOMP und PilE. Des Weiteren wurde die Expression der Konstrukte in den Bakterienstämmen *E. coli* BL21(DE31) und *E. coli* Rosetta gami 2 überprüft.

Für die SDS-PAGE wurden Trenngele mit einem Anteil von 7,5 % bzw. 10 % Acrylamid eingesetzt. Das Probenvolumen umfasste 20 µL bei der Bestimmung der Reinheit der rekombinanten Proteine MIP, PilE und MOMP sowie bei den chimären VPs. Zur Bestimmung der Reinheit der mAK wurden 10 µg aufgetragen. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit 4x Roti®-Load 1 versetzt, welches die Disulfidbrücken-Bindungen mittels β-Mercaptoethanol reduziert. Weiterhin wurden die Proben 10 min bei 95°C gekocht, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Als Größenstandard wurde der *PAGERuler Plus Prestained Protein Ladder*

verwendet.

Die Gele wurden in die SDS-Gelelektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese lief konstant bei 100 V für 100 min. Im letzten Schritt wurden die Gele aus der Halterung genommen. Die Gele wurden im Western Blot weiter verwertet oder in 1x Roti®-Blue auf dem Orbitalschüttler über Nacht bei RT inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte am nächsten Tag mit H₂O_{VE}, welches mehrmals gewechselt wurde. Die Dokumentation wurde am ChemiDoc™ MP-Imaging System durchgeführt.

2.6.6. Western Blot

Um Proteine spezifisch innerhalb eines Proteingemisches immunchemisch nachzuweisen, wurde die Methode des *Western Blot* angewandt. Hierfür wurde das Proteingemisch zuerst mittels einer SDS-PAGE nach der Molekülmasse aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf ein hydrophobes Trägermaterial überführt und in einem immunchemischen Verfahren selektiv gefärbt. Das Verfahren der SDS-PAGE ist im Abschnitt 2.6.5 erklärt. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel aus der Apparatur präpariert. Das Gel sowie alle im Folgenden genannten Materialien wurden für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte auf eine Nitrocellulose-Membran. Hierfür wurde ein Whatmann-Filtepapier, die Nitrocellulose-Membran, das Trenngel und ein weiteres Whatmann-Filtepapier übereinandergestapelt und auf die Kathodenplatte der Elektroblopparatur gelegt. Unter *Semi-Dry*-Bedingungen wurden die Proteine bei 25 V; 1,3 A für 7 min mit Hilfe des Transferpuffers auf die Membran transferiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde daraufhin dreimal mit TBS-T für 5 min gewaschen.

Immunchemischer Nachweis des StrepTag II

Für den Nachweis von rekombinanten Proteinen mit einem StrepTag II wurde die Membran mit einer 1 µg/mL SAV – Peroxidase (POD) Lösung für 1 h inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit TBS-T entfernt und die ECL – Entwicklerlösung hinzugefügt. Die Entwicklerlösung besteht unter anderem aus Wasserstoffperoxid und Luminol. Die gekoppelte POD spaltet das enthaltene Wasserstoffperoxid in der Entwicklerlösung. Die frei gewordenen Protonen oxidieren das Luminol in der ECL – Lösung und führen zur Chemilumineszenz. Nach 2 min wurde die Chemilumineszenz – Reaktion im ChemiDoc™ MP-Imaging System aufgenommen.

Immunochemischer Nachweis der Antikörperbindung

Für die Prüfung der Bindung der gereinigten mAK an die Zellysate der Bakterien wurden 5 µg/mL mAK – Lösungen hergestellt und für 1 h auf den Membranen inkubiert. Die Membran wurde mit TBS-T dreimal jeweils 5 min gewaschen, anschließend der Sekundärantikörper Ziege anti-Maus – POD in einer Konzentration von 0,5 µg/mL hinzugefügt und für 1 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Entwicklerlösung wie oben beschrieben hinzugefügt und die Ergebnisse am ChemiDoc™ MP-Imaging System gemessen.

2.7. Immunologische Methoden

2.7.1. ELISA

Die Bindungsaktivität von Antikörpern gegenüber ihrem jeweiligen Antigen kann mittels eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) nachgewiesen werden. Hierfür wird das Antigen auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert und nach Zugabe des Antikörpers die Bindung mittels einer chromogenen Enzymreaktion gemessen. Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene ELISA-Formate zum spezifischen Nachweis mAK gegen Mikroorganismen entwickelt. In allen ELISA-Formaten wurden die Inkubationsschritte in einer Feuchtkammer bei RT durchgeführt und das Pipettiervolumen war stets 50 µL. Ebenso wurde, wenn nicht anders erwähnt, die 96 Kavitätenplatte pro Waschschritt 6x mit Aqua dest. gewaschen. Die Platten wurden anschließend trocken geklopft, um restliches Aqua dest. zu entfernen. Für den signalgebenden Farbumschlag wurden 50 µL TMB-Substratlösung pro Kavität pipettiert und die Reaktion mit 50 µL einer 1 M H₂SO₄ Lösung pro Kavität gestoppt. Die Messung der Signalstärken erfolgte photometrisch an der Paradigm Detection Platform bei 450 nm und bei 620 nm als Referenzwellenlänge.

Serum/mAK ELISA

Für den Nachweis von spezifischen Antikörpern im Serum von Mäusen oder von mAK nach der Affinitätschromatographie-Reinigung wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Das Antigen wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL in PBS und in 50 µL pro Kavität über Nacht bei 4 °C an die feste Phase adsorbiert. Am Folgetag wurde die Platte gewaschen und 100 µL Blocklösung (5% NKS/PBS) zur Sättigung freier Bindestellen hinzugegeben. Nach 30 min wurde die Blocklösung entfernt, gewaschen und der jeweilige Antikörper (5 µg/mL) oder

das Serum (Verdünnung 1:100 – 1:3200) in 50 µL PBS in die Vertiefung gegeben. Die Inkubationszeit betrug 1 h. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch Waschen entfernt und der POD-gekoppelte Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgG in einer Verdünnung von 1:5000 in Blocklösung für 45 min inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und die chromogene Reaktion wie oben beschrieben gestartet und gemessen.

Subklassen ELISA

Für die Bestimmung der Subklasse wurden die mAK in einer Konzentration von 5 µg/mL aufgetragen und über Nacht bei 4 °C adsorbiert. Die Kavitäten wurden am Folgetag gewaschen und spezifische Biotin-gekoppelter Antikörper gegen die Subklassen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgM in einer Verdünnung von 1:10.000 hinzu pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 1 h. Die ungebundenen Antikörper wurden mittels Waschens entfernt. Die Detektion erfolgte mit dem Komplex aus SAV – POD (1:20.000 in Blocklösung).

2.7.2. Zellfärbung von Mikroorganismen für Messung im Durchflusszytometer

Zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der gereinigten mAK sowie des Hybridom-Kulturüberstandes wurden die Mikroorganismen immungefärbt und durchflusszytometrisch vermessen (Abbildung 8). Für die Zellfärbung wurden 2×10^6 Zellen mit 100 µL Hybridom-Kulturüberstand bzw. mit mAK in einer Konzentration von 20 µg/mL bis 0,02 µg/mL in MACS-Puffer für 30 min bei 4 °C inkubiert. Für den Waschschrift wurden 500 µL MACS-Puffer zu den Zellen gegeben und bei 8000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 100 µL eines 1:500 verdünnten PE-markierten Ziege anti-Maus Ig Antikörper aufgenommen und erneut für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500 µL MACS-Puffer wurden die Zellen für die weitere Analyse in 200 µL MACS-Puffer resuspendiert.

Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Probe mit dem PE-markierten Sekundärantikörper ohne Primärantikörper versetzt sowie ungefärbte Zellen aufgenommen. Für die Mikroorganismen *E. coli* und *L. pneumophila* wurden Positivkontrollen verwendet. Ein polyklonaler Kaninchen-anti-*E. coli*-Antikörper wurde mit 1 µg/mL als Kontrolle eingesetzt und mit einem polyklonalen Schwein anti-Kaninchen IgG Antikörper nachgewiesen in einer 1:500 Verdünnung. Als Positivkontrolle für *L. pneumophila* wurde der in der Arbeitsgruppe entwickelte mAK H61F2F8 mit einer Konzentration von 1 µg/mL für 2×10^6 Zellen verwendet.

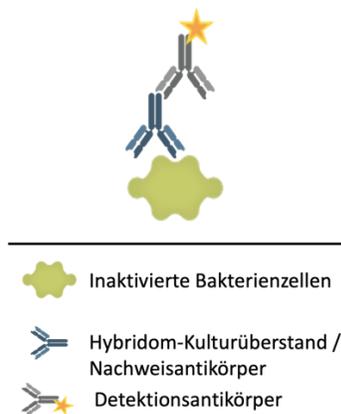


Abbildung 8: Zellfärbung von inaktivierten Mikroorganismen für die Durchflusszytometrie

Dargestellt ist die schematische Färbung von inaktivierten Bakterienzellen für die Messung am Durchflusszytometer. Inaktivierte Bakterienzellen werden mit 100 μ l Kulturüberstand bzw. dem Nachweisantikörper inkubiert und anschließend mit einem PE-markierten Detektionsantikörper gefärbt.

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit den Durchflusszytometern FACSMelody™ und Attune™ durchgeführt. Gemessen wurden stets 50.000 Events. Die Messungen wurden mit der FlowJo™ Software ausgewertet.

2.7.3. Zellfärbung von Hybridomzellen zur Zellsortierung

Nach 14 Tagen HAT-Selektion wurden die Hybridomzellen für die antigenspezifische Sortierung vorbereitet. Die Hybridomzellen sind aus transgenen Myelomzellen hervorgegangen und tragen einen artifiziellen Oberflächenrezeptor, der biotinyliert ist. Zur Überprüfung der Biotinylierung wurden 10^5 Zellen mit 3 μ l SAV-PE einer 1 mg/mL Lösung inkubiert und durchflusszytometrisch am FACSMelody™ gemessen.

Für die Färbung zur Zellsortierung wurde zuerst die Matrix zum Binden der sezernierten Antikörper auf den Zellen erzeugt. Zu diesem Zweck wurde ein SAV-konjugierter Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (1 mg/mL) zu den biotinylierten Hybridomzellen gegeben und für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 mL MACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 300 μ l MACS-Puffer resuspendiert und 2×10^6 inaktivierte *E. coli* O157:H7 Zellen wurden hinzugefügt. Die Probe wurde 20 min lang bei 4 °C inkubiert und dann dreimal mit 10 mL MACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde wiederum in 300 μ l MACS-Puffer resuspendiert und mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-*E. coli*-Antikörper (5 μ g/mL) inkubiert. Nach 20 min bei 4 °C wurden die Zellen erneut mit 10 mL MACS-Puffer gewaschen.

Im letzten Färbeschritt wurden die resuspendierten Zellen mit einem PE-konjugierten Ziege anti-Kaninchen-Fab-Fragment in einer 1:500 Verdünnung gefärbt. Nach 20 min Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 500 μ L MACS-Puffer resuspendiert. Schließlich wurden 3 μ L 7-AAD einer 1 mg/mL - Stammlösung hinzugefügt und die Zellsuspension 15 Minuten bei 4 °C gelagert.

Die Proben wurden durchflusszytometrisch gemessen und am BD FACSMelody™ sortiert. Hierfür wurden die Zellpopulationen im Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitenstreulicht (SSC) aufgenommen und ein Gate um diese Zellen gelegt. Anschließend wurden Dupletten diskriminiert und die Zellen im Fluoreszenzkanal für PE betrachtet. Einzelzellen, die eine Signalstärke von über 10^4 im PE-Kanal vorwies, wurden sortiert und anschließend kultiviert. Die Analyse wurde mit der FlowJo™ Software durchgeführt.

2.8. Zellbiologische Methoden

2.8.1. Gewinnung von Feederzellen

Feederzellen sind essenziell für die Kultivierung von Hybridomzellen nach der Zellfusion und während der Screeningphase. Sie unterstützen die heranwachsenden Hybridomzellen durch Zell-Zell-Interaktionen und der Sekretion von Zytokinen, die Wachstums- und Überlebenssignale für die co-kultivierten Hybridomzellen liefern. Bei Feederzellen handelt es sich um peritoneale Makrophagen, die aus dem Peritoneum der Maus gewonnen werden. Zum Einsatz kommen für diese Arbeit Mäuse des NMRI-Mausstammes. Zur Entnahme der Makrophagen wurde der Bauchraum einer getöteten NMRI-Maus unter sterilen Bedingungen geöffnet. 4 °C kaltes RPMI-Medium wurde in den Bauchraum überführt, um die Zellen von der Bauchwand zu lösen. Zu diesem Zweck wurde das Peritoneum stark massiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 96 Kavitäten-Platten und 24 Kavitäten-Platten verteilt. Kultiviert wurden die Zellen in Vollmedium zusammen mit 0,1 mg/mL Gentamycin. Etwa 48 Stunden nach dem Ausplattieren sind die Zellen für die Ko-Kultivierung nutzbar.

2.8.2. Elektrochemische Fusion zur Generierung von Hybridomzelllinien

Die Generierung von Hybridomzellen erfolgt aus der elektrochemischen Fusion einer B-Zelle

mit einer immortalen Myelomzelle. Das zugehörige Protokoll wurde von Köhler & Milstein entwickelt und in einer modifizierten Variante in dieser Arbeit umgesetzt (Holzlöhner and Hanack, 2017; Köhler and Milstein, 1975). Als Myelomzellen wurden die in der Arbeitsgruppe entwickelten transgenen SP2/0-Ag14 (Absatz 1.3.3) verwendet und mit den B-Lymphozyten der zuvor immunisierten Mäuse fusioniert.

In einem ersten Schritt wurde die Milz der getöteten Maus unter sterilen Bedingungen entnommen und die Splenozyten durch ein Zellsieb gedrückt, um sie zu vereinzeln. Die Zellen wurden mit 25 mL RPMI 1640 gewaschen und bei 300 x g für 10 min und 4°C pelletiert. Sowohl die Milzzellen als auch die Myelomzellen wurden getrennt voneinander drei Mal mit BSS-Puffer gewaschen (300 x g, 10 min, 4 °C). Im nächsten Schritt wurden die Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt und die Myelomzellen mit den Milzzellen im Verhältnis 1 : 3 vereint. Die Zellen wurden erneut gewaschen und pelletiert und in 1 mL BSS-Puffer aufgenommen. Vor der elektrochemischen Fusion wurde das Zellgemisch in 200 µL Aliquots aufgeteilt und mit jeweils 200 µL einer 25 %-igen PEG-8000 Lösung versetzt und vermischt. PEG-8000 fördert den Zell-Zell Kontakt während der Zellfusion und erhöht die Chance für die Generierung neuer Hybridome (Li and Hui, 1994). Die 400 µL Zellsuspension wird in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette blasenfrei pipettiert und mittels Gleichspannungspuls von 600 V und 25 ms in einem Elektroporator EPI 2500 fusioniert. Der Fusionsansatz inkubiert für 3 Minuten und wird tropfenweise in das HAT-Selektionsmedium überführt. Die Zellen inkubieren über Nacht und werden am nächsten Tag auf drei T75 Kulturflaschen mit Feederzellen aufgeteilt. Nach einer Inkubationsphase von 7 Tagen wird das HAT-Selektionsmedium gewechselt und die Zellen erneut für 7 Tage kultiviert.

2.8.3. Kultivierung von Säugerzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten und neu generierten Zelllinien wurden in Vollmedium oder HAT-Selektionsmedium bei 37 °C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Nach einer durchflusszytometrischen Zellsortierung von Hybridomzellen wurden diese mit 0,1 mg/mL Gentamycin versetzt und 100 µL Zellsuspension auf eine Kavität einer 96-Kavitäten-Platte mit Feederzellen verteilt und co-kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die Platten lichtmikroskopisch nach angewachsenen Hybridomkulturen gesichtet und deren Kulturüberstand getestet. Positiv getestete Kulturen wurden vereinzelt und kultiviert bis eine monoklonale Hybridomkultur vorhanden war, die ein positives Signal vorwies.

2.8.4. Hybridomsequenzierung

Die Sequenzierung des Hybridoms H5-3-E10 wurde von der Firma Absolut Antibody (Redcar, UK) durchgeführt. Dabei erfolgte die Sequenzierung durch die *Shotgun*-Sequenzierung des gesamten Transkriptoms des Hybridoms. Zuvor wurde die gesamte RNA aus 10^6 Zellen extrahiert und eine barcodierte cDNA-Bibliothek durch RT-PCR unter Verwendung von zufälligen Hexamer-Oligonucleotiden erzeugt. Darauf folgte das *Next Generation Sequencing*, welches mit einem Illumina HiSeq Sequenzer durchgeführt wurde. Die entstandenen kurzen Sequenzen, auch als *Contigs* bezeichnet, wurden assembliert und die Daten nach Antikörpersequenzen durchsucht. Alle identifizierten Antikörpersequenzen wurden nach variablen schweren und leichten Domänen getrennt und die relative Häufigkeit jedes identifizierten Gens als Transkript pro Million angegeben. Die Spezies und der Isotyp konnten durch die identifizierten Antikörpergene ebenfalls bestimmt werden.

Die entstandenen Sequenzen wurden mit bekannten aberranten (d. h. nicht funktionsfähigen) Antikörpergenen verglichen und gegebenenfalls aus der Analyse entfernt.

2.9. Tierexperimentelle Methoden

2.9.1. Haltung von Balb/c Mäusen

Die Versuchstiere stammen aus der eigenen Zucht. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gesäubert und mit neuem Pappeinstreu versehen. Alle Tiere erhielten Wasser und Haltungsfutter frei zugänglich. Es herrschte eine konstante Temperatur von 21 °C und für einen alternierenden Tag-Nacht-Wechsel wurde eine Zeitschaltuhr installiert. Zum Nestbau lagen Zellstofftücher und Rollen aus Pappe zusätzlich im Käfig.

2.9.2. Immunisierung von Balb/c Mäusen

Für die Immunisierung wurden Mäuse vom Stamm Balb/c verwendet. Für jedes chimäre VP wurden zwei 6 Monate alte Mäuse mit 50 µg des Antigens immunisiert. Die Injektion erfolgte intraperitoneal an den Tagen 0, 7, 14 und 21. Um die Immunantwort zu überprüfen, wurde den Tieren Blut vor der ersten Antigengabe und am Tag 29 abgenommen. Alle Immunisierungen wurden von geschultem Personal durchgeführt und nach den nationalen und internationalen ARRIVE Richtlinien zum Tierschutz durchgeführt. Die Studie wurde vom Ministerium für

ländliche Entwicklung, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt (Referenznummer: V3-2347-A16-4-2012).

2.10. Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der GraphPad Software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Zur Analyse der experimentellen Daten wurde zum einen der t-Test-Kalkulator, als auch der ANOVA-Test-Kalkulator der Software verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. *In silico* Vorhersage potenzieller Epitope für spezifische Antikörper

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung von potenziellen Peptiden, die als Antigene für die Generierung neuer spezifischer Antikörper dienen. Der hier verwendete Ansatz nutzt das Prinzip der RV. Die aufeinander aufbauenden Analyseschritte dieses Ansatzes umfassen eine vergleichende Genomanalyse, die Lokalisation der identifizierten Proteine innerhalb der Zelle und die Vorhersage möglicher Epitopsequenzen auf den identifizierten Proteinen. Abschließend werden die ausgewählten Epitope auf die Proteinkristallstrukturen bzw. vorhergesagten Proteinstrukturen gemappt. Am Ende dieses Prozesses steht eine *in silico* vorhergesagte Auswahl an Peptidsequenzen, die für die Immunisierung und zur Generierung neuer spezifischer Antikörper geeignet ist.

3.1.1. Identifikation von spezifischen Epitopen für *E. coli* O157:H7

Komparative Genomanalyse

Zur Identifikation von spezifischen Epitopen wurde im ersten Schritt das Genom von *E. coli* O157:H7 als Referenzgenom gegen 8 weitere Bakterienstämme, sowie das Core-Genome von *E. coli* (Tabelle 18) verglichen.

In der Abbildung 9 sind die Ergebnisse des komparativen Genomvergleichs grafisch dargestellt. Das Referenzgenom von *E. coli* O157:H7 umfasst 5.478.683 Basenpaare, die 5.545 offene Leserahmen (engl. *open reading frames*, ORF) codieren (Perna et al., 2001). Im Vergleich dazu umfasst der Genpool des *E. coli* Core-Genoms 35.601 ORFs und der Pool an Genen aller in Tabelle 18 aufgeführten Bakterienstämme 50.500 ORFs.

Nach der vergleichenden Genomanalyse gegen die anderen Bakterienstämme sind insgesamt 1203 ORF für die weitere Analyse verwertbar. Somit existieren 4342 Gene, die sich im Referenzgenom mit den anderen Bakterienstämmen aus Tabelle 18 überschneiden.

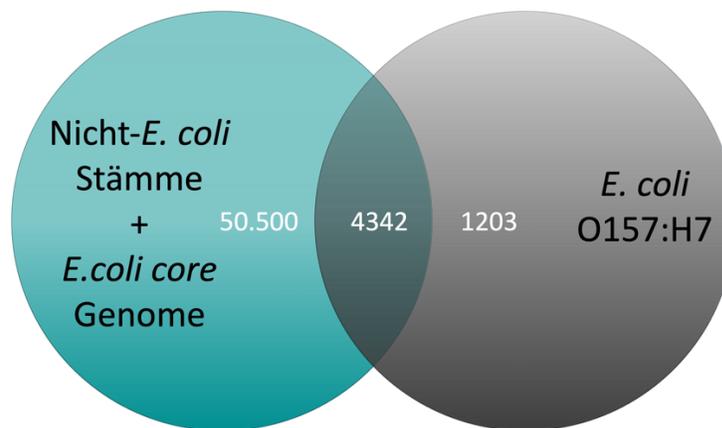


Abbildung 9: Vergleichende Genomanalyse von *E. coli* O157:H7

In der vergleichenden Genomanalyse wurde das Referenzgenom *E. coli* O157:H7 gegen acht weitere Bakterienstämme und dem *E. coli* Core-Genom verglichen. Die Analyse erfolgte mittels BLAST. Von den 5545 ORFs im Referenzgenom sind nach dem komparativen Vergleich 1203 ORFs ausschließlich *E. coli* O157:H7 zuzuordnen. Durchgeführt wurde die Analyse mit den Tools von BioCyc und IMG/M.

Ausgehend von den 1203 identifizierten ORFs wurden deren zugehörige AS-Sequenzen ermittelt. Die 1203 AS-Sequenzen wurden für die weiteren bioinformatischen Analyseschritte verwendet.

Proteinlokalisierung

Die 1203 identifizierten AS-Sequenzen für den Serotyp *E. coli* O157:H7 wurden aus der vergleichenden Genomanalyse in die Proteinlokalisierung überführt. Der Algorithmus der Proteinlokalisationsdatenbank Psortb 3.0 v unterteilt die Proteinlokalisierung in fünf verschiedene Klassen. Diese sind die Cytoplasmamembran, das Zytoplasma, die äußere Zellmembran, das Periplasma und die extrazelluläre Position außerhalb der Zelle.

Von den 1203 AS-Sequenzen wurden insgesamt 53 Sequenzen identifiziert, die der Algorithmus als extrazellulär oder in der äußeren Zellmembran vorhersagt. Die restlichen 1150 AS-Sequenzen verteilen sich auf die anderen drei Zellpositionen. Ausgehend von diesen 53 Proteinsequenzen sind 26 extrazellulär und 27 der äußeren Zellmembran zugeordnet. Eine Liste aller 53 Proteinsequenzen ist im Anhang Tabelle S1 aufgeführt.

Für die weiteren Analyseschritte wurde im Folgenden jeweils ein Vertreter aus der Liste der extrazellulären Proteine bzw. Proteine aus der äußeren Membran verwendet. Für diesen Zweck

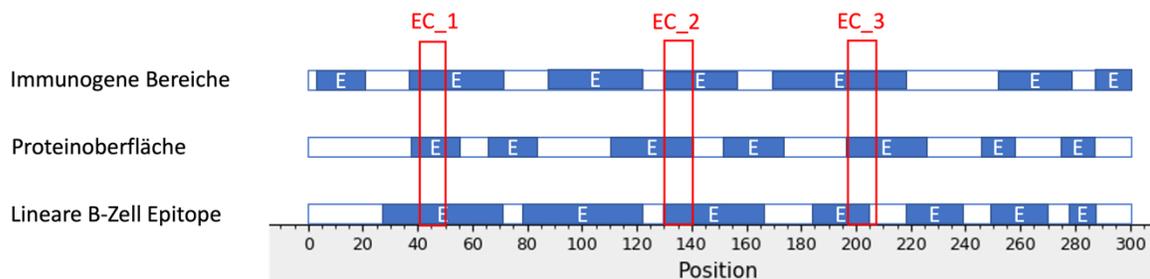
Ergebnisse

wurde OmpG als Vertreter der äußeren Zellmembran und FimH für die extrazellulären Proteine gewählt. Eine Analyse aller 53 Proteine mit anschließender Immunisierung war aus Kapazitätsgründen nicht möglich

Vorhersage B-Zell-Epitope

Aus der Proteinlokalisationsvorhersage wurden FimH und OmpG als Vertreter der extrazellulären Proteine bzw. der Proteine in der äußeren Zellmembran ausgewählt und mittels der Datenbank IEDB weiter analysiert. Zur Identifizierung geeigneter B-Zell Epitope wurden drei verschiedene Parameter genauer betrachtet. Der erste Parameter bestimmt die linearen B-Zell Epitope innerhalb der Proteine, der zweite Parameter weist die immunogenen Bereiche der AS auf und der dritte bestimmt die Zugänglichkeit der AS auf der Proteinoberfläche. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse dieser Vorhersagen dargestellt. Potenzielle Epitope wurden markiert (rot), sobald übereinstimmende Bereiche zwischen den drei Parametern vorlagen.

A) Protein FimH



B) Protein OmpG

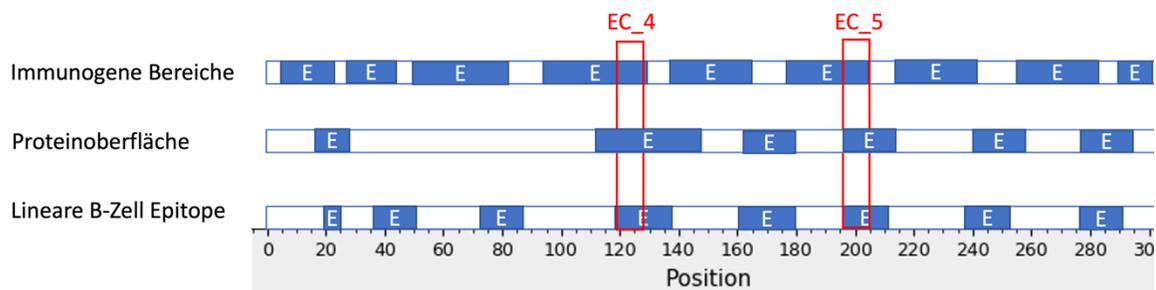


Abbildung 10: Epitopvorhersage von FimH und OmpG

Vorhersage von B-Zell-Epitopen innerhalb von FimH (A) und OmpG (B) durch drei verschiedene Kriterien der IEDB: Lineare Epitopvorhersage, Zugänglichkeit zur Proteinoberfläche und immunogene Bereiche. Regionen oberhalb des Schwellenwerts (blaue Bereiche mit einem E) werden als potenzielle B-Zell-Epitope dargestellt. Überlappende Bereiche, die als Epitope ausgewählt wurden, sind rot markiert.

Das Protein FimH setzt sich aus 300 AS zusammen. Für jede dieser AS-Positionen wurden Werte für die oben genannten Parameter berechnet und einer Epitopvorhersage zugeordnet

Ergebnisse

(blau). Für FimH ergeben sich insgesamt drei überlappende Bereiche, die als EC_1, EC_2 und EC_3 bezeichnet sind. Das Epitop EC_1 erstreckt sich von der AS-Position 40 bis zur 52 und hat die Sequenz NVYVNLAPVVNV, EC_2 reicht von der 130-140 AS und hat die AS-Abfolge YLTPVSSAGG. Das dritte Epitop EC_3 ist PGSVPIPLTVYC und befindet sich zwischen der AS-Position 197-209.

Das zweite Protein OmpG setzt sich aus 301 AS zusammen. In Abbildung 10B sind die Ergebnisse der Epitopanalyse veranschaulicht. Für dieses Protein konnten insgesamt zwei überlappende Bereiche identifiziert werden. Das Epitop EC_4 erstreckt sich von der AS-Position 118 bis 127 mit der AS-Sequenz HYVDEPGKDT. Das zweite Epitop EC_5 besitzt die AS-Sequenz FNMDDSRNNGEF und ist zwischen den AS 198 - 209 lokalisiert.

Mapping der identifizierten Epitope auf die Proteinkristallstrukturen

Im letzten Schritt der bioinformatischen Analyse wurden die fünf vorhergesagten Epitope auf die Proteinkristallstruktur von FimH (PDB:1QUN) und OmpG (PDB:2iwv) übertragen und in PyMol visualisiert. Die Kristallstrukturen mit den zugehörigen identifizierten Epitope sind in Abbildung 11 präsentiert.

Die Proteinoberfläche der Proteinkristallstruktur von FimH (grün) ist zusammen mit dem Protein FimC (orange) dargestellt, welches in dem Strukturmodell zu FimH mit enthalten war. Die jeweiligen Epitope sind in rot hervorgehoben. Ebenso ist die Proteinoberfläche von OmpG grün gefärbt und die beiden Epitope EC_4 und EC_5 rot hervorgehoben. Die Epitope sind deutlich erkennbar präsentiert auf der Proteinoberfläche und bilden jeweils ein zusammenhängendes lineares Epitop.

Nachfolgend werden die identifizierten AS-Sequenzen als potenzielle Epitopsequenzen bezeichnet.

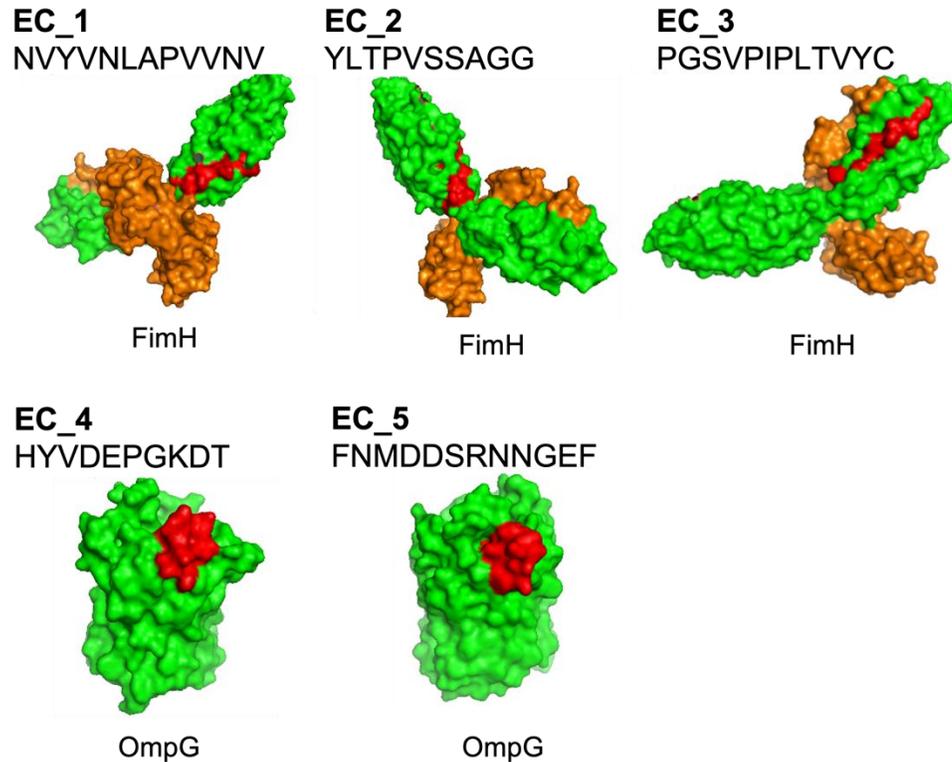


Abbildung 11: Proteinkristallstruktur von FimH und OmpG mit den zugehörigen Epitopvorhersagen

Fünf Epitope (EC_1, EC_2, EC_3, EC_4 und EC_5) mit ihren Aminosäuresequenzen und ihrer Position auf dem Zielprotein (rot) wurden mit PyMOL dargestellt. Die Kristallstruktur der Zielproteine stammt aus der PDB-Datenbank. Die Proteinoberfläche des OmpG (PDB: 2iww) sowie FimH (PDB: 1QUN) sind grün dargestellt. Das zugehörige FimC ist orange abgebildet. Quelle: Modifiziert nach Göthel et al. 2021

3.1.2. Identifikation von spezifischen Epitopen für *Legionella pneumophila*

Für die Identifizierung von spezifischen Epitopen gegen *L. pneumophila* wurde ebenso wie bei *E. coli* O157:H7 der Ansatz der RV verwendet. Hierfür wurden erneut die Genome der in Tabelle 18 aufgeführten Mikroorganismen miteinander verglichen. Das Referenzgenom von *L. pneumophila* wurde gegen die anderen Bakterienstämme mittels dem BLAST Algorithmus gegenübergestellt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der Abbildung 12 gezeigt.

Das Referenzgenom von *L. pneumophila* umfasst 3.397.754 bp, wovon 2.942 ORFs Proteine codieren und 52 weitere ORFs unterschiedliche RNAs (Chien et al., 2004) abbilden. Verglichen mit den Genomen aus der Tabelle 18 haben 1699 ORFs des Referenzgenoms eine

Sequenzübereinstimmung von über 70% bzw. einen *E-value* von über 0,5 zu anderen ORFs aus dem „Nicht *L. pneumophila*“-Genpool. Dementsprechend sind 1295 ORFs für die weitere Verwertung in der bioinformatischen Analyse geeignet. Deren zugehörige AS-Sequenzen wurden ermittelt und weiter analysiert.

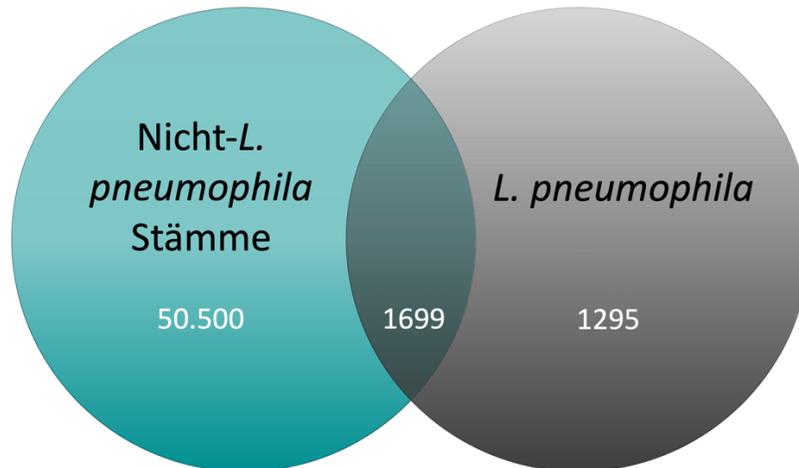


Abbildung 12: Vergleichende Genomanalyse *L. pneumophila*

In der vergleichenden Genomanalyse wurde das Referenzgenom *L. pneumophila* gegen acht weitere Bakterienstämme mittels dem BLAST Algorithmus verglichen. Von den 2994 ORFs im Referenzgenom sind nach dem komparativen Vergleich 1699 ORFs ausschließlich *L. pneumophila* zuzuordnen. Durchgeführt wurde die Analyse mit den Tools von BioCyc und IMG/M.

Proteinlokalisierung

Ausgehend von den 1295 AS-Sequenzen, die zuvor im komparativen Genomvergleich identifiziert wurden, erfolgte im nächsten Schritt die Bestimmung der Lokalisation. Wie bereits zuvor für die *E. coli* O157:H7 AS-Sequenzen wurde der Psortb v. 3.0 Algorithmus mit den voreingestellten Parametern für gramnegative Bakterien verwendet. Der Algorithmus betrachtet die AS-Sequenzen und ermittelt anhand von Signalsequenzen den Aufenthaltsort des Proteins innerhalb der Zelle. Von den 1295 Genen konnten 38 Proteine der äußeren Zellmembran oder dem extrazellulären Raum außerhalb der Zelle zugeordnet werden. Die 38 Proteine gliedern sich in 23 extrazelluläre Proteine und 15 Proteine der äußeren Zellmembran. Die übrigen 1699 Proteine verteilen sich auf die Kategorien Zytoplasma, innere Zellmembran und Periplasma. Als Vertreter für die weiteren Analysen wurden die Proteine PileE, MOMP und MIP gewählt.

Vorhersage B-Zell-Epitope

Ausgehend von ursprünglichen 2994 Genen des Referenzgenoms sind nach dem Genomvergleich und der Proteinlokalisierung 38 potenzielle Antigen-Kandidaten hervorgegangen. Von diesen werden repräsentativ Pile, MOMP und MIP genauer betrachtet und auf drei verschiedene Parameter untersucht: 1. potenzielle lineare Epitope, 2. immunogene Bereiche innerhalb der AS-Sequenz und 3. Bereiche, die auf der Proteinoberfläche exponiert sind. Für die Analyse wurden die Tools der IEDB Datenbank verwendet. Die Sequenzabschnitte, die bei allen drei Parametern über deren spezifischen Schwellenwert liegen, wurden als ein potenzielles Epitop für die Generierung von Antikörpern gekennzeichnet. Aufgrund der zeitlichen Limitierung der wissenschaftlichen Arbeit wurde pro Protein ein Epitop gewählt.

Das erste Protein Pile (UniProt: Q5ZU93) besteht aus 142 AS. Wie in Abbildung 13A zu erkennen, gibt es für dieses Protein keinen Bereich, der von allen Parametern als Epitop ausgewiesen wird. Jedoch befindet sich im Bereich der AS-Position 46 – 58 ein Abschnitt der vollständig auf der Proteinoberfläche exponiert ist und als lineares Epitop von der AS-Position 46 – 55 identifiziert wurde. Innerhalb dieses Abschnittes liegen zwei getrennte immunogene Bereiche, deren Wert über dem Schwellenwert liegt. Dementsprechend wurde der Bereich von der AS-Position 46 – 58 als Epitop LE_31 mit der folgenden AS-Sequenz YPSYLQYIQKSR gekennzeichnet.

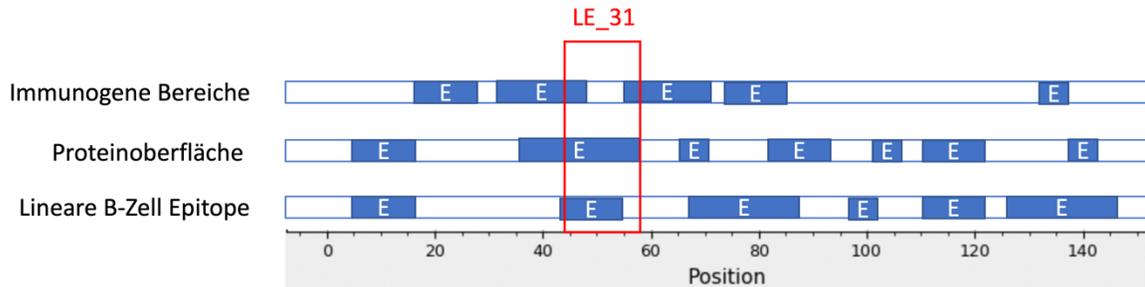
Das zweite Protein Mip (Abbildung 13B; UniProt: Q70YI1) setzt sich aus 233 AS zusammen. Für dieses Protein gibt es zwei sehr kurze Bereiche (vier-fünf AS), die von allen drei Parametern als Epitop ausgegeben werden. Zudem befindet sich von der AS-Position 120 bis 134 ein Abschnitt, der als lineares Epitop auf der Proteinoberfläche beschrieben ist und von der AS-Position 123 – 134 einen immunogenen Bereich über dem Schwellenwert vorweist. Dieser Bereich wurde daher als Epitop LE_32 identifiziert und hat die AS-Abfolge VVLPSGLQYKVI.

Das dritte Protein MOMP (Abbildung 13C; UniProt: Q9Z3C9) hat eine Sequenzlänge von 289 AS. Das Protein besitzt im Vergleich zu den vorher beschriebenen Proteinen nur kurze Sequenzabschnitte, die von den Parametern als potenzielles Epitop ausgegeben werden. Im Bereich von der AS-Position 100 – 112 befindet sich ein Abschnitt, der in den ersten sechs AS einen hohen immunogenen Wert aufweist und gleichzeitig auf der Proteinoberfläche lokalisiert

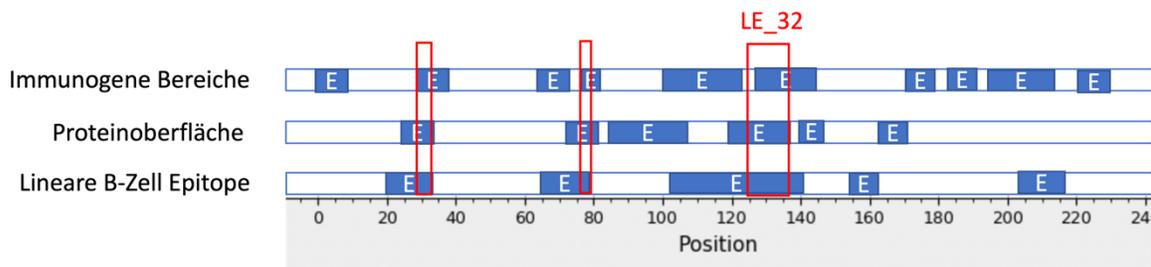
Ergebnisse

ist. Das lineare Epitop erstreckt sich von der Position 103 – 112. Dieser Bereich wurde als Epitop LE_33 identifiziert und hat die AS-Sequenz VNWYHFDNDS DH.

A) Protein Pile



B) Protein Mip



C) Protein MOMP

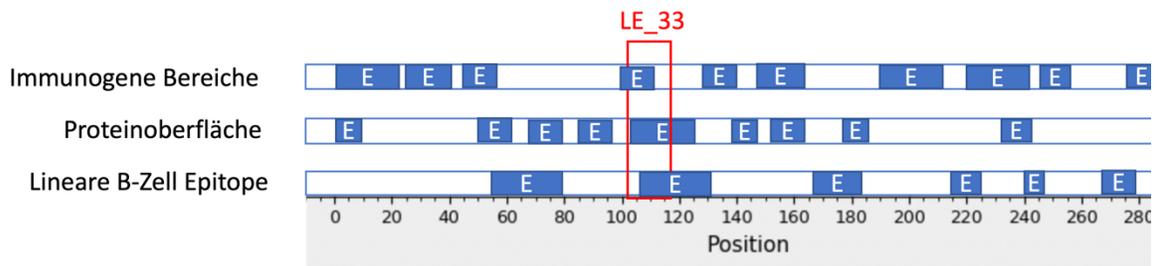


Abbildung 13: Epitopvorhersage für Pile, Mip und MOMP

Vorhersage von B-Zell-Epitopen innerhalb von Pile (A), Mip (B) und MOMP (C) mittels drei verschiedener Kriterien: Lineare Epitopvorhersage, Proteioberflächenzugänglichkeit und immunogene Bereiche. Regionen oberhalb des Schwellenwerts (blaue Bereiche) werden als potenzielle B-Zell-Epitope dargestellt. Überlappende Bereiche, die als Epitope ausgewählt wurden sind rot markiert.

Mapping der identifizierten Epitope auf die Proteinkristallstrukturen

Im letzten Schritt der bioinformatischen Analyse wurden die zuvor identifizierten Epitope auf die Proteinkristallstruktur der zugehörigen Proteine übertragen. Für die Proteine Pile, Mip und MOMP sind keine experimentell erfassten Kristallstrukturdaten vorhanden, weshalb mittels der I-Tasser Plattform die Proteinstruktur der genannten Proteine vorhergesagt wurde. Die

Ergebnisse

Modelle und deren zugehörige Epitope sind in Abbildung 14 mit Hilfe der PyMol Software visualisiert.

Die Epitopbereiche sind deutlich auf den jeweiligen Proteinoberfläche zu erkennen und bilden einen zusammenhängenden Bereich ab.

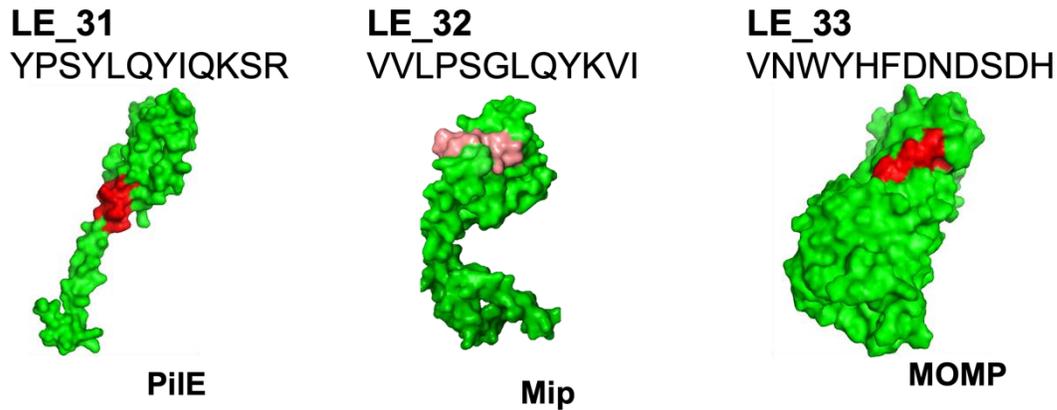


Abbildung 14: Epitop-Lokalisierung innerhalb der Proteinstrukturen von PilE, Mip & MOMP

Jeweils ein Epitop pro Protein ist mit seiner AS-Sequenz und deren Position auf dem Protein (rot) dargestellt. Die Proteinstruktur wurde mittels iTasser vorhergesagt. Die Proteinoberfläche von PilE, Mip und MOMP ist grün gefärbt.

3.2. Herstellung von rekombinanten Proteinen und Virusproteinen für die Immunisierung

3.2.1. Herstellung von Virusproteinen mit spezifischen Epitopsequenzen aus *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila*

Nachdem potenzielle Epitope als AS-Sequenzen für *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila* in der bioinformatischen Analyse identifiziert wurden, lag der nächste Schritt in der Integration der gewählten AS-Sequenzen in VPs.

Die zu den AS-Sequenzen zugehörigen Nukleotidsequenzen wurden synthetisiert, mittels Oligohybridisierung zu einem DNA-Doppelstrang verbunden und in den Vektor pET22b integriert. Die Nukleotidsequenzen wurden zielgerichtet in die Integrationsstelle *site 4* kloniert, um nach der Proteinexpression die Epitope auf der Proteinoberfläche des VPs zu präsentieren. Die Überprüfung der Klonierung mittels PCR ist in Abbildung 15 visualisiert.

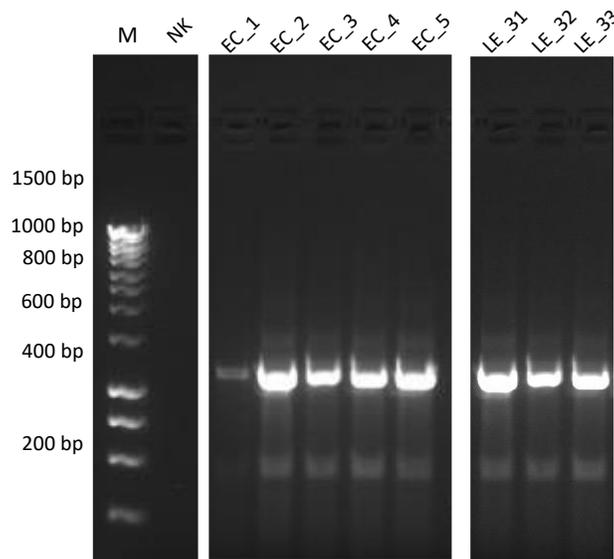


Abbildung 15: Nachweis der integrierten Nukleotidsequenzen der zugehörigen Epitope in pET22b

PCR-Ergebnis für die Amplifikation der integrierten Epitopsequenzen in den pET22b Vektor. Die Amplifikation erzeugt eine Produktbande bei etwa 1200 bp. Verwendet wurde ein 1,5 % Agarosegel; M: Hyperladder 1kb als Molekulargewicht-Marker, Bahn 1: Negativkontrolle nur mit ddH₂O, Bahn 2-8: Amplifikate der integrierten Nukleotidsequenzen

Ergebnisse

Hierfür wurde die Sequenz beginnend vom eingebauten Epitop bis zum T7-Terminator amplifiziert. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden der HyperLadder™ 1kb, sowie die PCR-Proben aufgetragen. Die dominanten Banden in Abbildung 15 weisen alle eine Bandengröße von 1200 bp auf, welche der Bandenhöhe des zu erwartenden PCR-Produktes entspricht. Zusätzlich sind kleinere PCR-Produkte auf Höhe der 600 bp Markerbande und Primer-Dimere auf Lauffronthöhe zu erkennen.

Nach der Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der Epitopsequenzen in den pET22b Vektor, wurden die neu generierten Plasmide (Tabelle 13) in *E. coli* Rosetta-gami™ 2 (DE3) transformiert. Die Proteinexpression der chimären VPs wurden unter IPTG Induktion gestartet und nach 12 h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die VPs mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt.

In Abbildung 16 ist die Reinigung der VPs exemplarisch am chimären VP EC_1 gezeigt. Verwendet wurde ein 10 % Polyacrylamid-Gel. Aufgetragen wurde der PAGERuler™ Plus Prestained Protein Marker (1), die Fraktion vor der IPTG Induktion (2), nach der IPTG Induktion und nach dem Zellaufschluss (3), der Bindungsüberstand nach dem Säulendurchlauf (4), die erste Waschfraktion (5), die zweite Waschfraktion (6), sowie die Elutionsfraktionen 1 – 3 in Bahn 7 – 9. Für die chimären VPs ist eine Bandengröße von 50 kDa zu erwarten.

Deutlich zu erkennen ist das starke Hervortreten der Bande bei 50 kDa nach IPTG Zugabe (2) im Vergleich zur Probe ohne IPTG (1). Zudem ist eine spezifische Reinigung der 50 kDa Bande im Verlauf der Affinitätschromatographie zu beobachten. Die Bandenintensität der unspezifisch gebundenen Proteine nimmt ab Probe 3 stark ab, während das zu vermutende chimäre Protein VP1 mit 50 kDa zunehmende Signalwerte zeigt. In den Banden 7 – 9 ist die 50 kDa Bande dominierend, jedoch zeigt die Gelfärbung weitere schwache Proteinbanden auf verschiedenen Höhen, die auch nach den Waschschrritten weiter vorhanden sind. Im Anschluss wurden die Elutionsfraktionen gepoolt und gegen PBS dialysiert.

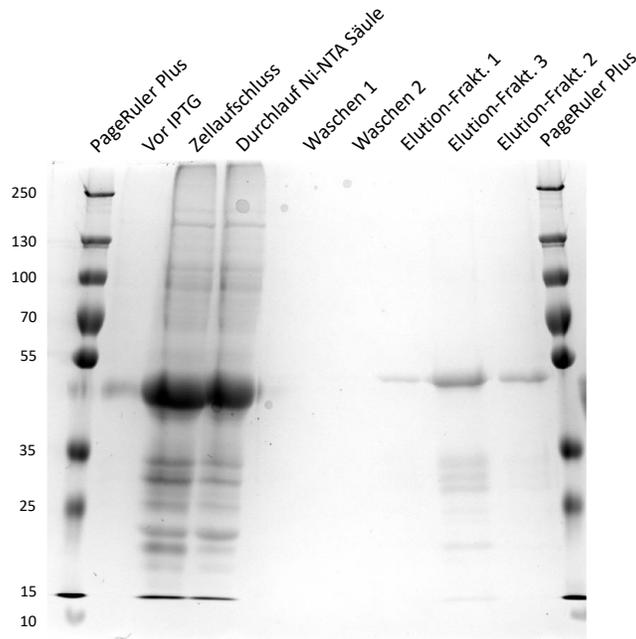


Abbildung 16: Affinitätschromatographische Reinigung von chimären VPs

Zur Dokumentation des Ni-NTA Reinigungsprozesses von chimären VPs wurde ein 10%-iges SDS-Acrylamidgel mit 20 μ L der Proben beladen und elektrophoretisch getrennt. Die Färbung der Proteine erfolgte mittels einer Coomassie Färbelösung. Als Marker wurde der PageRuler™ Plus Prestained Protein Marker verwendet.

3.2.2. Herstellung von rekombinanten Proteinen von *L. pneumophila*

Neben der Herstellung der rekombinanten VPs für die Immunisierung der Balb/c Mäuse wurden zudem die rekombinanten Proteine von *L. pneumophila* exprimiert und gereinigt. Die genomische DNA von *L. pneumophila* wurde aus den inaktivierten Zellen extrahiert und anschließend für die Amplifikation der codierenden Gene der Proteine PilE, Mip und MOMP verwendet. Das Protein MOMP wird vom Gen *mompS* codiert und besitzt laut Literaturangaben eine Basenpaarlänge von 870 bp. Das korrespondierende Gen zum Protein Mip hat eine Größe von 702 bp und für *pilE* ist eine Sequenzlänge von 450 bp angegeben. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse gezeigt. Alle drei Banden weisen die zu erwartende Bandengröße auf.

Ergebnisse

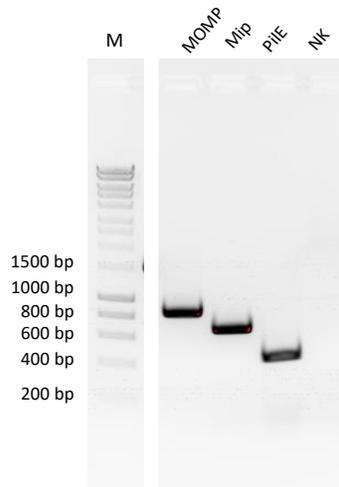


Abbildung 17: Amplifikation der Gene *pilE*, *mip* und *mompS* aus genomischer DNA

PCR-Ergebnis für die Amplifikation der Gene *pilE*, *mip* und *mompS*. Als Template wurde genomische DNA von *L. pneumophila* verwendet. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde ein 1,5%iges Agarosegel verwendet. M = Hyperladder 1kb als Molekulargewicht-Marker; NK: Negativkontrolle nur mit ddH₂O.

Nach der erfolgreichen Amplifikation der Gene aus der genomischen DNA von *L. pneumophila* wurden die PCR-Produkte in den Vektor pET21b kloniert, der innerhalb der Expressionskassette einen StrepTag II trägt. Die Transformation erfolgt in *E. coli* BL21 Zellen. Die Expression der Proteine verlief unter Zugabe von IPTG. Nach der Expression wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und mittels einer Strep-Tactin Affinitätschromatographie gereinigt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Expression und der Reinheit der Elutionsfraktionen wurden für jedes Protein eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 veranschaulicht. Als Proteinmarker wurde der PAGERuler™ Plus Prestained Protein Marker (M) verwendet. Aufgetragen wurde die Fraktion vor der IPTG Induktion (1), nach der IPTG Induktion (2) und vor der Säulenauftragung (3), der Bindungsüberstand nach dem Säulendurchlauf (4), sowie die Elutionsfraktionen 1 – 3 (5 – 7). Im Western Blot wurde ein SAV – POD Komplex für den Immunonachweis verwendet.

Ergebnisse

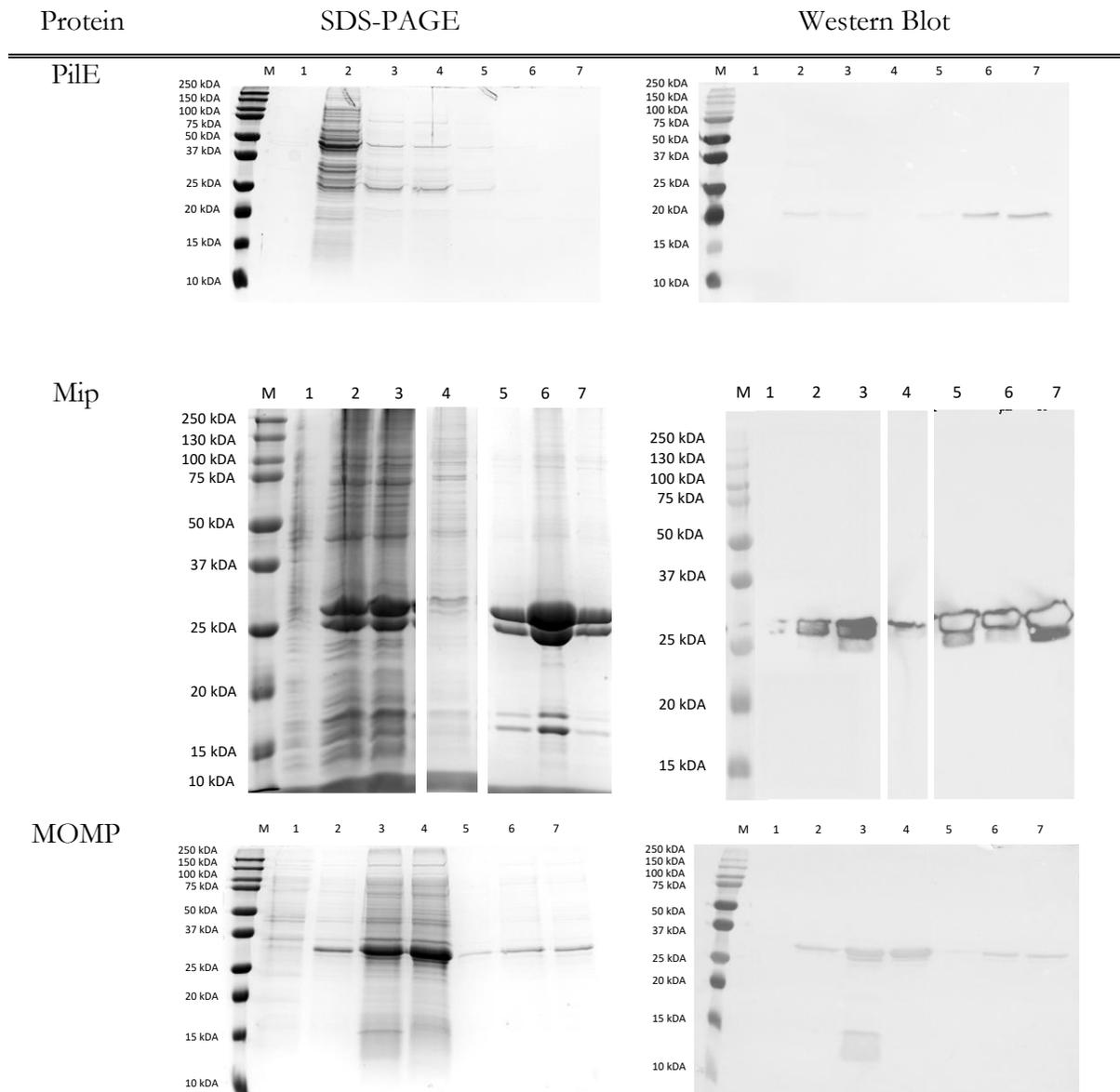


Abbildung 18: Proteinexpression und Reinigung rekombinanten Proteine von *L. pneumophila*

Zur Dokumentation des Reinigungsprozesses wurde ein 12,5%-iges SDS-Acrylamidgel mit 20 μ L je Probe beladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbung für die SDS-PAGE erfolgte in einer Coomassie Färbelösung. 1 = Fraktion vor der IPTG Induktion, 2 = nach IPTG Induktion, 3 = vor Säulenauftragung, 4 = Bindungsüberstand nach Säulendurchlauf, 5-7 = Elutionsfraktionen 1-3.

Der Immunblot zum spezifischen Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte über SAV-POD. Die Proben wurden zuvor elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

In der Abbildung 18 Reihe 1 sind in die Ergebnisse für PilE gezeigt, welches entsprechend den Literaturangaben ein Molekulargewicht von 15 kDa besitzt. In der SDS-PAGE sind keine dominanten Banden zu erkennen, die auf Höhe von 15 kDa liegen. Jedoch sind im Western Blot

Ergebnisse

auf Höhe von 20 kDa Banden detektierbar, die sowohl in der Fraktion nach IPTG Zugabe (2) als auch in den Fraktionen vor der Säulenauftragung (3) und den Elutionsfraktionen (5 – 7) zu finden sind. Die Banden sind jedoch schwach ausgeprägt.

Währenddessen sind deutlich hervortretende Banden bei den Proteinen Mip und MOMP in der Abbildung 18 Reihe 2 und 3 erkennbar. Für das Protein Mip ist eine Molekulargröße von 25 kDa und für MOMP 32 kDa zu erwarten. Die dominanten Banden sind auf den Höhen der entsprechenden Markerbanden wiederzufinden. Sowohl bei Mip als auch MOMP treten die ausgeprägten Banden nach der IPTG Zugabe auf und sind in allen folgenden Fraktionen vertreten. In den Elutionsfraktionen von Mip sind eine Reihe weiterer Proteinbanden zu erkennen, während die Elutionsfraktionen von MOMP keine irrelevanten Proteine aufweist. Die Ergebnisse im Western Blot bestätigen das Vorhandensein der exprimierten Proteine.

In Tabelle 22 sind die Ausbeuten der exprimierten und gereinigten Proteine dargestellt. Dabei zeigt sich, dass für die chimären VPs eine ausreichende Menge von 1,5 – 2 mg gereinigt werden konnte, die für die Immunisierung verwendet werden kann. Von den rekombinanten Proteinen Mip, MOMP und Pile sind die Ausbeuten deutlich geringer und liegen zwischen 0,5 mg und 1,5 mg. Diese Proteine werden im Folgenden für das Überprüfen der Immunseren und das Screening der Hybridomkulturen verwendet. Die Ausbeuten sind als ausreichend zu betrachten, da ein geringer Proteinbedarf von 0,4 mg besteht.

Tabelle 22 Übersicht Ausbeute von exprimierten und gereinigten rekombinanten Proteinen

rekombinantes Protein	Gereinigtes Protein [mg] aus 0,5 L Expressionskultur
VP EC_1	1,67
VP EC_2	1,53
VP EC_3	1,55
VP EC_4	1,89
VP EC_5	2,0
VP LE_31	1,90
VP LE_32	1,55
VP LE_33	1,76
Mip	1,5
MOMP	0,5
Pile	0,5

3.3. Immunisierungen mit chimären VPs

3.3.1. Induzierte Immunantwort in BALB/c Mäusen gegen *E. coli* O157:H7

Nachdem die bioinformatische Analyse und die Herstellung der chimären VPs abgeschlossen war, wurden diese für die Immunisierung von Balb/c Mäusen eingesetzt. Sowohl vor der ersten Antigengabe als auch nach erfolgter Immunisierung wurde den Versuchstieren Blut entnommen, das Serum aufgearbeitet und getestet.

Im ersten Schritt wurde das Serum in Verdünnungsstufen von 1:50 bis 1:3200 gegen das immunisierte chimäre VP getestet, um eine Aussage über die induzierte Immunantwort zu treffen, die in Abbildung 19 gezeigt ist. Als Kontrolle wurde exemplarisch eine Verdünnungsreihe des naiven Serums der Mäuse A&B vor Antigengabe von VP EC_1 auf den chimären VPs durchgeführt.

Festzustellen ist, dass in allen immunisierten Balb/c Mäusen eine Immunantwort gegen ihr spezifisches chimäre VP messbar ist. Die Immunsereen gegen VP EC_1, VP EC_2, VP EC_3 und VP EC_4 weisen alle eine Signalstärke von über 1,0 für eine Verdünnung von 1:100 auf. Einzig das Serum gegen VP EC_5 zeigt eine schwächere Immunantwort auf das chimäre VP. Dessen Signalstärke liegt bei einer 1:100 Verdünnung bei 0,5. Ferner ist zu erkennen, dass die Immunantworten von Maus A und B innerhalb eines immunisierten Epitops sich nur geringfügig unterschieden. Eine Ausnahme bildet das VP EC_1, deren Signalstärken zwischen Maus A und Maus B in den Verdünnungsstufen bis 1:800 konstant 0,3 Einheiten voneinander entfernt liegen. Jedoch sind beide Signalstärken bei einer 1:00 Verdünnung über 1,0. Im Vergleich zu allen immunisierten Seren liegt die Kontrollgruppe mit naiven Seren bei Werten zwischen 0,01 und 0,1.

Ergebnisse

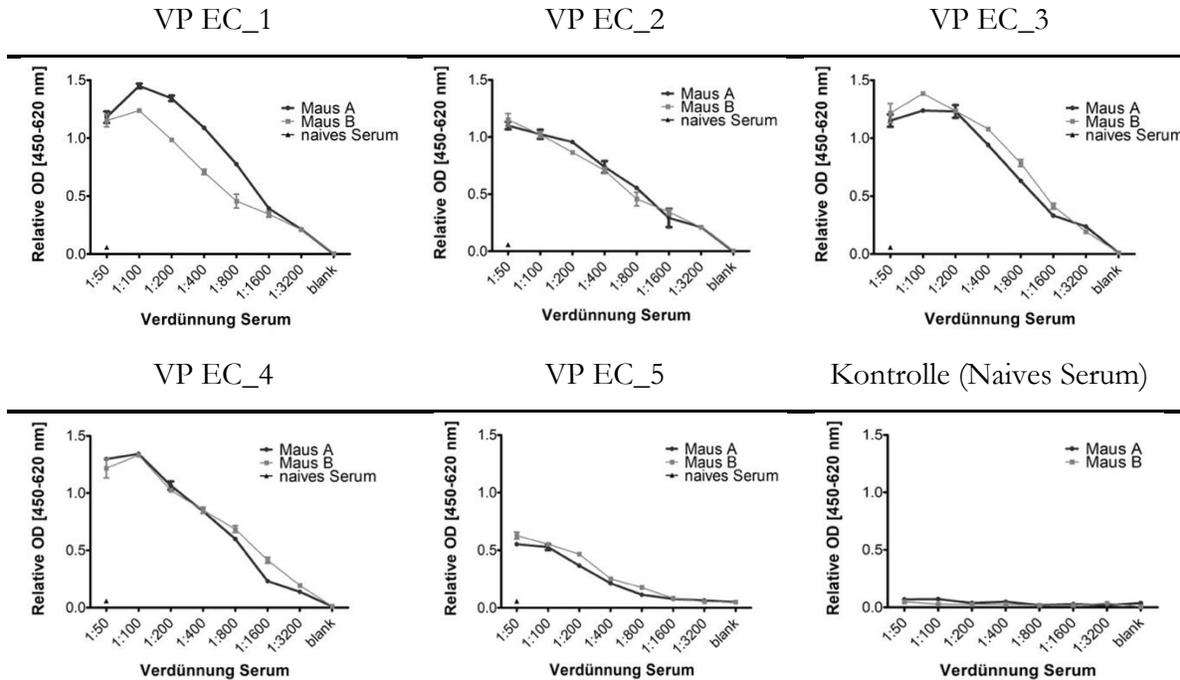


Abbildung 19: Induzierte Immunantwort gegen chimäre VPs mit *E. coli* O157:H7 Epitopen

Bestimmung der induzierten Immunantwort im indirekten ELISA mit immobilisierten chimären VPs (5 µg/mL) und titriertem immunisiertem Maus-Serum (1:50 – 1:3200). Als Kontrolle wurde naives Mausserum eingesetzt. Die Antikörperbindung wurden mit einem HRP-gekoppelten Ziege Anti-Maus IgG Antikörper nachgewiesen und bei 450 nm detektiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus $n=3 \pm \text{SEM}$. Quelle: Modifiziert nach Göthel et al., 2021

Um festzustellen, ob die Mäuse eine spezifische Immunantwort gegen den Mikroorganismus *E. coli* O157:H7 entwickelt haben, wurden inaktivierte Zellen mit dem Serum angefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 gezeigt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen ausschließlich mit dem PE-markierten Maus anti-Kaninchen IgG Antikörper (Sekundärantikörper) gefärbt (hellgrau dargestellt). Als Positivkontrolle fungierte ein polyklonales Kaninchen anti-*E. coli* Antikörpergemisch (dunkelgrau dargestellt). Die Kontrollgruppe umfasst die Seren vor der Immunisierung. Für vier von fünf Epitopen konnten signifikante positive Färbungen gemessen werden, während die Signalstärken aus der Kontrollgruppe nur geringe Signale aufweisen. Die Seren von Mäusen, die mit VP EC_5 immunisiert wurden, zeigten in der Durchflusszytometrie nur eine schwache Färbung, was mit den geringeren ELISA-Signalen zum entsprechenden VP korreliert. Somit konnte in vier von fünf Proben eine anti-*E. coli* O157:H7-spezifische Immunantwort induziert werden.

Ergebnisse

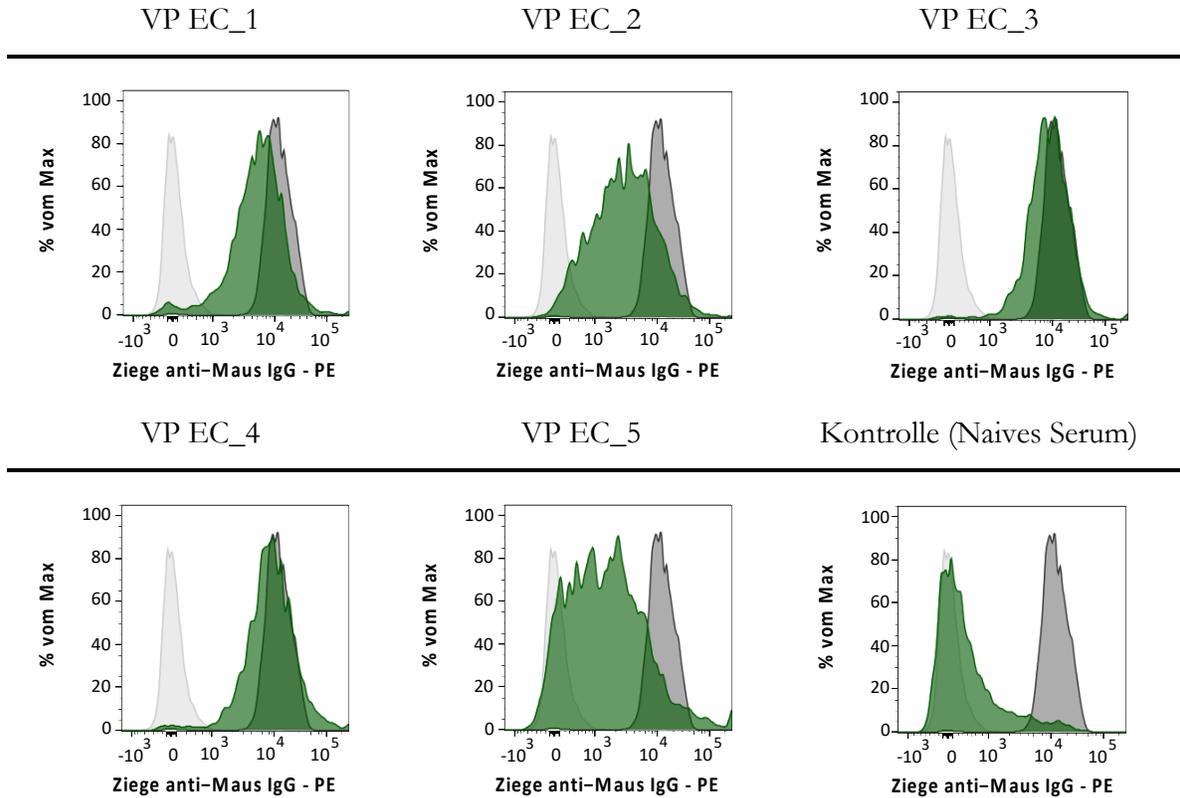


Abbildung 20: Induzierte Immunantwort gegen das Antigen *E. coli* O157:H7

Nachweis der gemessenen spezifisch induzierten Immunantwort gegen *E. coli* O157:H7 in der Durchflusszytometrie. Inaktivierte *E. coli* O157:H7 Zellen (5×10^5 Zellen) wurden mit Seren (1:100, grün) inkubiert. Zur Detektion wurde ein polyklonales PE-konjugiertes Ziegen Anti-Maus Antikörpergemisch verwendet (1:500). Ein polyklonaler Kaninchen anti-*E. coli* Antikörper (dunkelgrau) diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle (hellgrau) wurden die Zellen nur mit dem PE-konjugierten Ziegen Anti-Maus Antikörper angefärbt. Die Messung erfolgte am BD FACS Melody.

3.3.2. Induzierte Immunantwort von BALB/c Mäusen gegen *Legionella pneumophila*

Nachdem die drei spezifischen Epitopsequenzen für PilE, Mip und MOMP in die VPs integriert und die chimären VPs exprimiert und gereinigt wurden, erfolgte die Immunisierung der Balb/c Mäuse. Jeweils eine Balb/c Maus wurde mit einem chimären VP immunisiert. Das Mausserum wurde vor der ersten Antigengabe und 7 Tage nach der letzten Antigengabe abgenommen und sowohl im ELISA als auch im Durchflusszytometer getestet.

Im ersten Schritt wurde das Mausserum gegen die chimären VPs in einem indirekten ELISA getestet. Hierfür wurde das Serum in verschiedenen Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:3200

Ergebnisse

zu den immobilisierten chimären VPs gegeben und die Antikörperbindung detektiert. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse für die Immunsereen gegen VP LE_31, VP LE_32 und VP LE_33. Als Kontrolle wurden das naive Serum der Mäuse A&B vor Antigengabe von VP LE_31 ebenso auf den chimären VPs getestet.

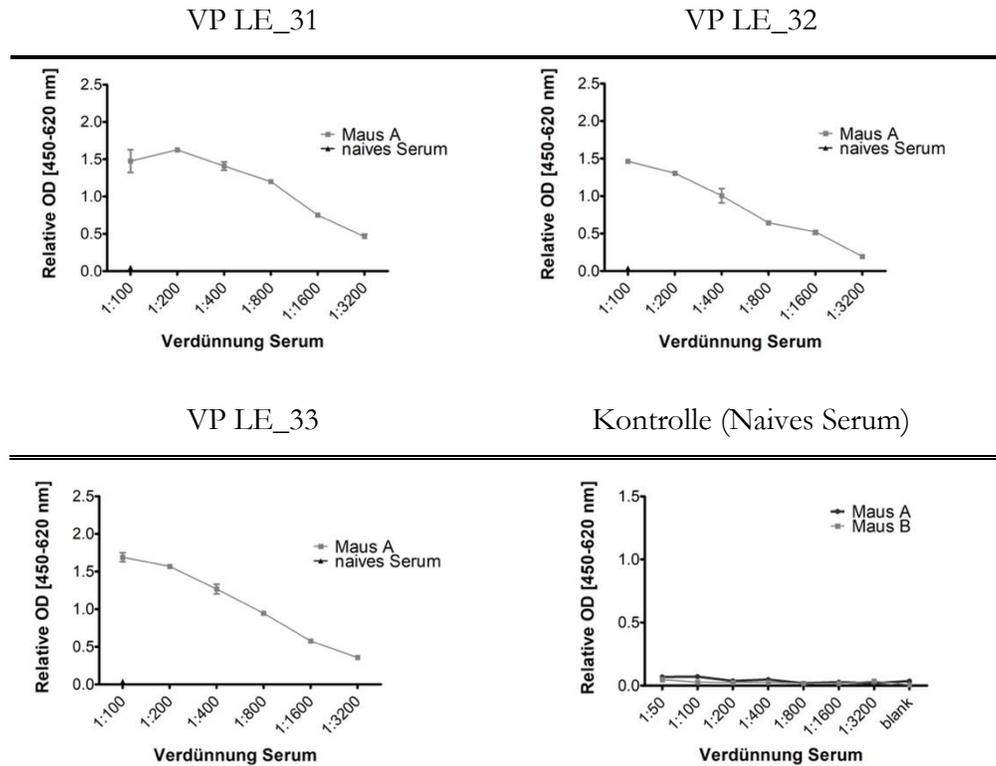


Abbildung 21: Induzierte Immunantwort gegen chimäre VPs mit *L. pneumophila* Epitopen

Nachweis der induzierten Immunantwort mit immobilisierten chimären VPs (5 µg/mL) und titriertem immunisiertem Maus-Serum (1:50 – 1:3200) im indirekten ELISA. Naives Mauserum wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Bindung wurde mit einem HRP-gekoppelten Ziege Anti-Maus IgG Antikörper nachgewiesen und bei 450 nm gemessen. Präsentiert ist der Mittelwert aus $n=3 \pm \text{SEM}$.

Deutlich zu erkennen ist bei allen Seren eine positive Immunantwort gegen die VPs. Die höchsten Signale liefert das Serum gegen VP LE_31. Die Signalstärke liegt bei einer 1:200 Verdünnung bei etwa 1,5 und erreicht einen Signalwert von 0,5 noch bei einer Verdünnung von 1:3200. Die Werte von VP LE_32 und VP LE_33 sind miteinander vergleichbar. Bei einer 1:100 Verdünnung liegen beide Messwerte bei etwa 1,5 und fallen danach kontinuierlich ab bis etwa 0,3 bei einer 1:3200 Verdünnung. Das naive Serum liegt bei allen drei Immunsereen bei einer Signalstärke von 0,1.

Im zweiten Schritt wurden die Immunsereen gegen das zugehörige rekombinante Protein im

Ergebnisse

ELISA getestet (Abbildung 22). Die Immunsereen wurden in Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:3200 gegen Pile, Mip oder MOMP aufgetragen und deren Bindungsstärke gemessen. Das Immunsereum gegen VP LE_31 zeigt gegen das rekombinante Protein Pile eine Signalstärke von 0,35 bei einer 1:100 Verdünnung. Die Signalwerte fallen bis zu einer Verdünnung von 1:800 und erreichen nachfolgend geringfügig Messwerte von 0,05 – 0,08. Für die Seren gegen VP LE_32 und VP LE_33 gegen das rekombinante Protein Mip bzw. MOMP ist der gleiche Verlauf zu beobachten. Das Serum gegen VP LE_32 weist zu Beginn eine Signalstärke von 0,4 auf und das Serum gegen VP LE_33 den geringsten Wert mit etwa 0,2. Die Werte sinken bei beiden bis zu einer Verdünnung von 1:400 und stagnieren konstant um den Wert 0,05. Die naiven Seren zeigen kein Signal auf die rekombinanten Proteine.

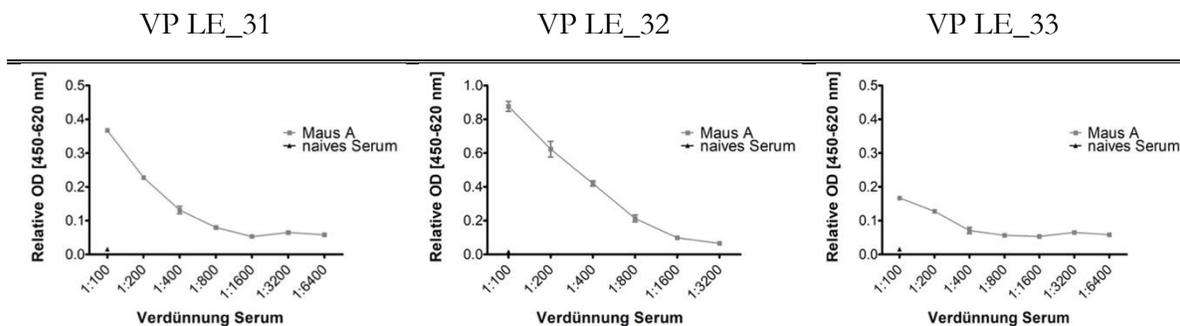


Abbildung 22: Induzierte Immunantwort gegen rekombinante Proteine von *L. pneumophila*

Nachweis der induzierten Immunantwort mit 5 µg/mL immobilisierten rekombinanten Proteinen und titriertem immunisiertem Maus-Serum (1:100 – 1:6400) im indirekten ELISA. Das Immunsereum gegen VP LE_31 wurde gegen rekombinante Pile, Immunsereum gegen VP LE_32 gegen rekombinante Mip und Immunsereum gegen VP LE_33 gegen rekombinante MOMP getestet. Naives Mausserum wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Bindung wurde mit einem HRP-gekoppelten Ziege Anti-Maus IgG Antikörper nachgewiesen und bei 450 nm gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus $n=3 \pm \text{SEM}$.

Im letzten Schritt wurden inaktivierte *L. pneumophila* Zellen mit den Immunsereen immungefärbt und im Durchflusszytometer vermessen (Abbildung 23). Als Negativkontrolle wurden die inaktivierten Zellen zum einen nur mit den PE-gekoppelten Ziege anti-Maus IgG Antikörper gefärbt. Zum anderen wurde erneut das naive Mausserum verwendet, um mögliche Hintergrundsignale auszuschließen (hellgrau). Als Positivkontrolle kam der Maus anti – *L. pneumophila* Antikörper H61F2F8 zum Einsatz (dunkelgrau).

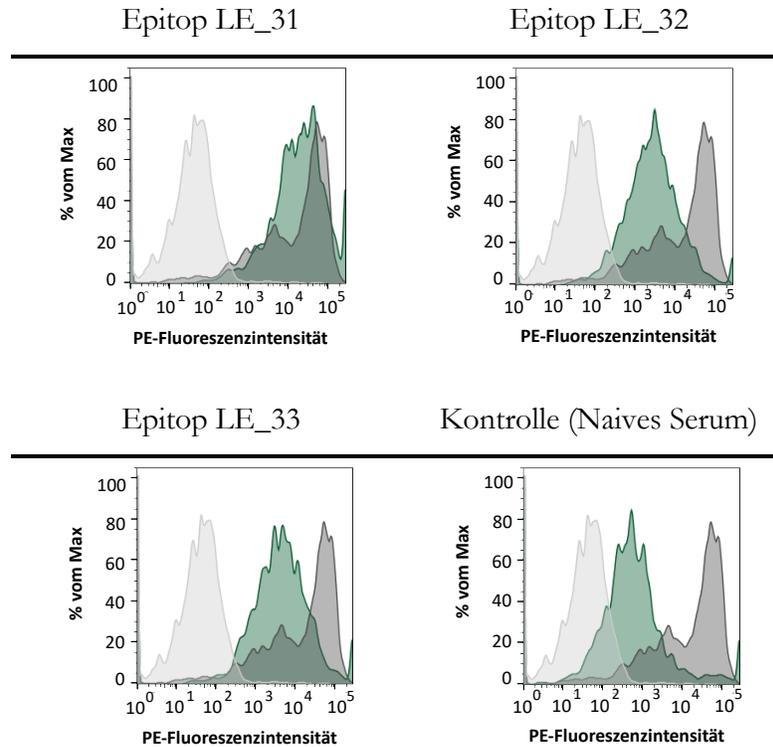


Abbildung 23: Induzierte Immunantwort gegen das Antigen *L. pneumophila*

Durchflusszytometrische Bestätigung der induzierten spezifischen Immunantwort gegen *L. pneumophila*. Inaktivierte *L. pneumophila* Zellen (5×10^5 Zellen) wurden mit Serum (1:100, grün) inkubiert und mit einem polyklonalen PE-konjugiertes Ziegen Anti-Maus Antikörper (1:500) die Bindung nachgewiesen. Der monoklonale Maus anti-*L. pneumophila* Antikörper H61F2F8 (dunkelgrau) diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle (hellgrau) wurden die Zellen nur mit dem PE-konjugierten Ziegen Anti-Maus Antikörper angefärbt. Die Messung erfolgte am BD FACS Melody.

Die Messungen im Durchflusszytometer zeigen bei allen drei Immunsereen ein deutliches Signal. Die Immunsereen gegen VP LE_31 und VP_LE_32 weisen eine Signalstärke von 10^3 bis 10^4 im PE-Kanal auf. Das Fluoreszenzsignal für das Immunsereum gegen VP LE_33 liegt nochmals höher im Bereich zwischen 10^4 und 10^5 , welches in der Nähe der Positivkontrolle bei 10^5 liegt. Die Messwerte der Immunfärbung mit dem PE-gekoppelten Ziege anti-Maus IgG Sekundärantikörper befinden sich deutlich unterhalb der anderen Zellfärbung im Bereich von 10^1 bis 10^2 . Die Immunfärbung mit dem naiven Serum liegt geringfügig über der Zellfärbung mit dem Sekundärantikörper.

3.4. Erstellen einer Zellfärbung zum Sortieren antigenspezifische Hybridome

Das Verfahren von Listek et al. zur Sortierung von Hybridomzellen bildet die Basis für die Erstellung der Zellfärbung zum Sortieren von Hybridomen, die Antikörper gegen *E. coli* O157:H7 bzw. *L. pneumophila* produzieren. Die publizierte Methode wurde für den Ansatz mit inaktivierten Bakterienzellen angepasst und um zusätzliche Färbeschritte erweitert. Die Ergebnisse der notwendigen Adaptierungsschritte sind nachfolgend dargelegt. Das vollständige Protokoll für die Zellfärbung ist im Abschnitt 2.7.3 zu finden.

Charakterisierung der transgene SP2/0 Myelomzellen

Im ersten Schritt wurden die transgene Sp2/0 Myelomzellen auf ihre gegenwärtigen Eigenschaften überprüft. Hierfür wurde die Expression des artifiziellen Oberflächenrezeptors und die Zelloberflächenpräsenz der Antikörperfänger-Matrix im Durchflusszytometer gemessen und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 gezeigt.

Die Verifizierung des artifiziellen Oberflächenrezeptors erfolgte über die Bindung von SAV-PE an das gebundene Biotin am Rezeptor. Als Negativkontrollen wurden die SP2/0 Zellen ohne den artifiziellen Oberflächenrezeptor sowie in Kombination mit der SAV-PE Färbung betrachtet (vgl. Abbildung 24A & B). Beide Zellpopulationen liegen im 4. Quadranten und zeigen eine geringe Signalstärke im PE-Kanal von 10^2 - 10^3 . Die Ergebnisse in Abbildung 24C zeigen die Verschiebung der Population in den zweiten und dritten Quadranten zu einer Signalintensität von 10^5 . Dementsprechend tragen 99% aller Zellen den biotinylierten artifiziellen Oberflächenrezeptor auf der Zelloberfläche.

Ergebnisse

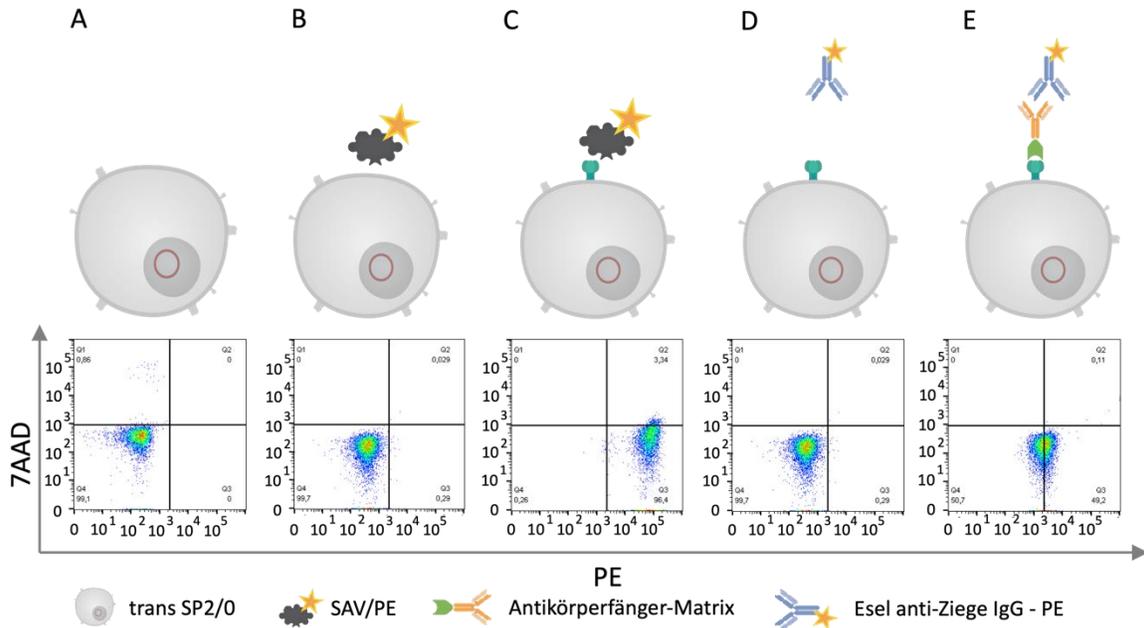


Abbildung 24: Verifizierung der vorhandenen Eigenschaften der Myelomzellen

Ergebnis der durchflusszytometrischen Messungen zum Nachweis der charakteristischen Eigenschaften der trans SP2/0 Myelomzelllinie. Abgebildet sind der schematische Zellfärbeansatz und die zugehörige Messung. Der Dotplot zeigt den Live-Dead-Marker 7AAD gegen das PE-Signal. (A) Kontrolle: ungefärbte trans SP2/0 Zellen (B) Kontrolle: transgene SP2/0 Zellen mit SAV-PE (C) Nachweis des biotinylierten artifiziellen Oberflächenrezeptors mit SAV-PE (D) Kontrolle: trans SP2/0 Zellen mit PE-gekoppelten Esel anti-Ziege IgG Antikörper (E) Nachweis der gebundenen Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplexes an der Zelloberfläche von transgene SP2/0 Zellen. Die Messungen wurden am BD FACS Melody durchgeführt.

Die Antikörperfänger-Matrix, die aus dem Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplex und dem artifiziellen biotinylierten Oberflächenrezeptor besteht, wurde mittels der Bindung des PE-gekoppelten Esel anti-Ziege IgG Antikörpers nachgewiesen. Aus den Messungen im Durchflusszytometer ist eine Verlagerung der Population von 10^2 zu 10^3 bis 10^4 im PE-Kanal zu erkennen (vgl. Abbildung 24E). Zum Vergleich wurden die Myelomzellen mit dem biotinylierten artifiziellen Oberflächenrezeptor mit dem Esel anti-Ziege IgG – PE Antikörper gefärbt und weisen, wie in Abbildung 24D dargestellt, keine Bindung auf.

Die weiteren Ergebnisse sind nachfolgend für die Mikroorganismen *L. pneumophila* und *E. coli* O157:H7 einzeln gezeigt.

3.4.1. Konfiguration des Sortieraufbaus mit dem Antigen *E. coli* O157:H7

Der Gesamtaufbau der Zellfärbung zum Sortieren von Hybridomzellen, die einen anti-*E. coli* O157:H7 IgG Antikörper produzieren, ist in Abbildung 25 gezeigt.

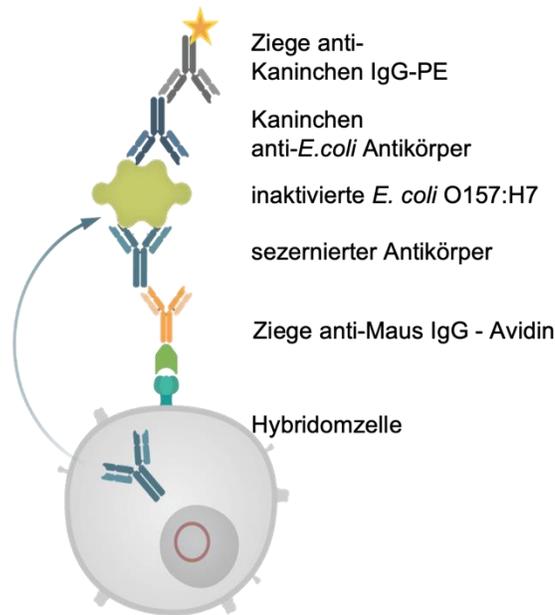


Abbildung 25: Aufbau der Immunfärbung für die Zellsortierung von Hybridomzellen mit dem Antigen *E. coli* O157:H7

Grafische Darstellung der Immunfärbung zur Zellsortierung von Hybridomzellen, die einen anti-*E. coli* spezifischen Antikörper sezernieren. Hybridomzellen tragen nach der Zellfusion einen artifiziellen biotinylierten Oberflächenrezeptor, an den ein Komplex aus Avidin und Ziege anti-Maus IgG Antikörper bindet, welcher den sezernierten Antikörper fängt. Das Antigen *E. coli* O157:H7 wird vom sezernierten Antikörper gebunden. Die Sortierung erfolgt mittels eines Detektionskomplexes aus einem polyklonalen Kaninchen anti-*E. coli* Antikörper und einem PE-gekoppelten polyklonalen Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörpergemisch.

Die immunologische Färbung ist wie folgt aufgebaut. Transgene SP2/0 Zellen tragen einen biotinylierten artifiziellen Oberflächenrezeptor, der zusammen mit einem Avidin markierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper eine Matrix um die Zelle bildet, um sezernierte Antikörper zu binden. Der sezernierte Antikörper bindet inaktivierte *E. coli* 157:H7 Zellen, die das Antigen darstellen. Als Detektionseinheit wird ein polyklonaler Kaninchen anti-*E. coli* Antikörper zusammen mit dem PE-markierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt. Das Ziel ist die Erstellung und Bestätigung eines Färbepanels, welches mit den gezeigten Komponenten nachweislich funktionell und zum Sortieren von Hybridomzellen geeignet ist.

Positivkontrolle für einen sezernierten anti-E. coli O157:H7 Antikörper

Für den funktionellen Nachweis des Sortieraufbaus war es entscheidend einen geeigneten Antikörper zu ermitteln, der den sezernierten Antikörper der Hybridomzelle imitiert.

Für diesen Zweck wurden ein kommerzieller Maus anti-LPS, ein kommerzieller polyklonaler Maus anti-*E. coli* Antikörper und das Mausimmenserum von VP EC_3 verwendet, um eine geeignete Positivkontrolle zu etablieren. Die inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen wurden mit jeweils 10 µg/mL Antikörper bzw. einer 1:200 Verdünnung des Mausimmenserums gefärbt. Die Detektion erfolgte im Durchflusszytometer. Als Negativkontrolle fungierte die Färbung der inaktivierten *E. coli* Zellen mit dem PE-markierten Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgG (hellgrau). Als Referenz für ein hohes Signal wurde der polyklonale Kaninchen anti-*E. coli* IgG verwendet (dunkelgrau).

Wie aus der Abbildung 26 zu entnehmen, liegen sowohl die gemessenen Signale mit dem Maus anti-LPS als auch für den Maus anti-*E. coli* Antikörper auf Höhe der Negativkontrolle. Währenddessen zeigt das Mausserum ein Signal im Bereich von 10^3 bis 10^4 im PE-Kanal, welches vergleichbar mit der Signalstärke des polyklonalen Kaninchen anti-*E. coli* IgG ist.

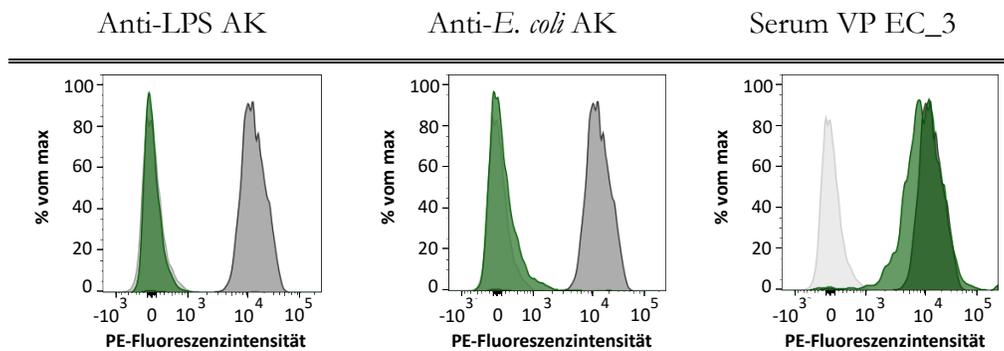


Abbildung 26: Test verschiedener anti-*E. coli* Antikörper

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen von verschiedenen anti-*E. coli* Antikörpern (dunkelgrün). Polyklonaler Maus Anti-LPS Antikörper (5 µg/mL), monoklonaler Maus anti-*E. coli* Antikörper (5 µg/mL) oder Mausimmenserum (1:200) wurden mit 5×10^5 inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen inkubiert und mittels einem PE-markierten Ziege anti-Maus IgG Detektionsantikörper. Als Positivkontrolle fungierte ein polyklonaler Kaninchen anti-*E. coli* Antikörper (dunkelgrau). Die Negativkontrolle sind gefärbte inaktivierte *E. coli* Zellen mit dem Detektionsantikörper. Gemessen wurde im PE Kanal des BD FACS Melody.

Für die nachfolgenden Etablierungsversuche wurde daher das Mausimmenserum gegen das VP EC_3 verwendet, um den sezernierten Antikörper in der Zellfärbung nachzubilden.

Ergebnisse

Um die Bindung des Mausserums an den gebundenen Avidin – Ziege anti-Maus IgG Antikörperkomplex zu evaluieren, wurde ein Testversuch durchgeführt. Als Kontrolle wurden transgene SP2/0 Myelomzellen ungefärbt betrachtet sowie Myelomzellen, die nur die Antikörperfänger-Matrix auf ihrer Oberfläche tragen und diese mit einem PE-markierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper inkubierten. In der Abbildung 27 ist deutlich zu erkennen, dass die Antikörperfänger-Matrix das Mausserum bindet. Die Signalstärke steigt auf 10^4 im Vergleich zu den Messwerten der Kontrollgruppen, die bei 10^2 liegen.

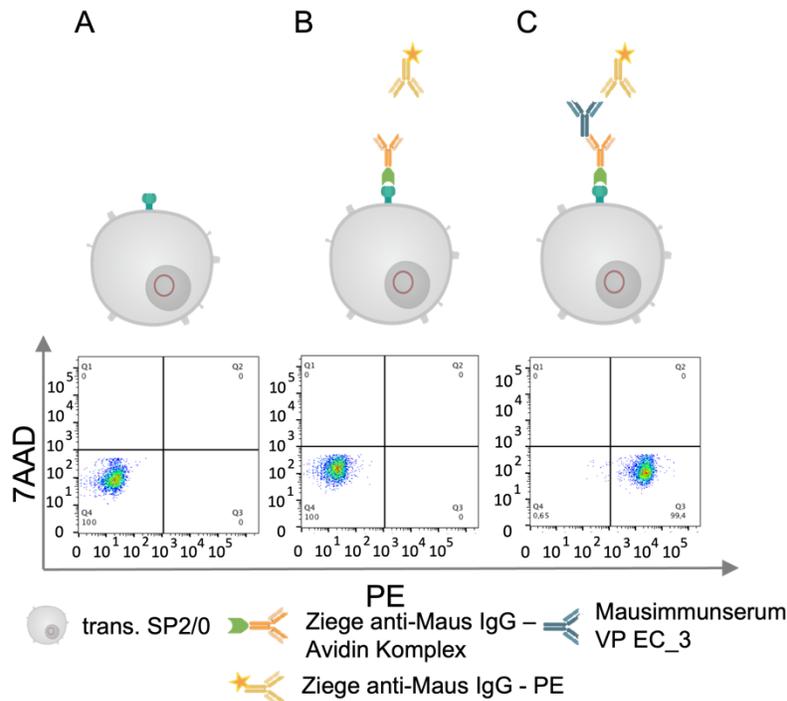


Abbildung 27: Bindung des Mausserums an den Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplex

Bindungsnachweis des Mausserums VP_EC3 an den gebundenen Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplex auf der Zelloberfläche von transgenen SP2/0 Zellen. Abgebildet sind der schematische Zellfärbansatz und die zugehörige Messung. Der Dotplot zeigt den Live-Dead-Marker 7AAD gegen das PE-Signal. (A) Kontrolle: ungefärbte transgene SP2/0 Zellen (B) Kontrolle: gefärbte transgene SP2/0 Zellen mit dem Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplex und dem Detektionsantikörper PE-markierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper (C) Nachweis des gebundenen Mausserums an die gefärbten SP2/0 Zellen. Die Messung erfolgte am BD FACS Melody im PE Kanal.

Bestimmung der Menge an inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen

Als nächstes folgte die Ermittlung der Antigenmenge der inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen für den Sortieraufbau. Die Menge an Antigen variierte zwischen 5×10^6 Zellen und 1×10^7 Zellen

Ergebnisse

bezogen auf 1×10^5 Myelomzellen pro Ansatz. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Antigentitration gezeigt. Als Kontrolle wurde der Ansatz ohne Zugabe von inaktivierten Bakterienzellen gewählt, um etwaige Hintergrundsignale, die durch Bindung der Komponenten untereinander entstehen, auszuschließen.

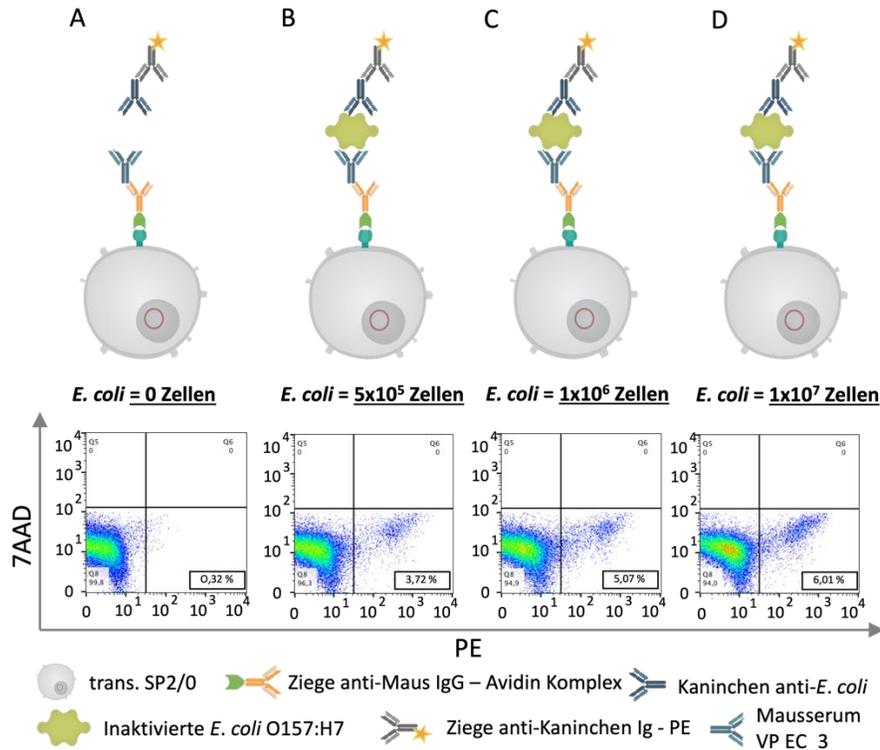


Abbildung 28: Bestimmung der Antigenmenge für den Sortieraufbau

Ergebnis der Antigentitration von inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen. Abgebildet sind der schematische Zellfärbeansatz und die zugehörige Messung. Der Dotplot zeigt den Live-Dead-Marker 7AAD gegen das PE-Signal. Transgene SP2/0 Zellen wurden mit allen Komponenten des Färbepanels gefärbt. (A) Kontrolle ohne inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen (B) Ansatz mit 5×10^5 inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen (C) Ansatz mit 1×10^6 inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen (D) Ansatz mit 1×10^7 inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen. Die Messung erfolgte im PE-Kanal am BC FACS Calibur.

Wie in Abbildung 28A zu erkennen, liegt die Signalstärke der Kontrolle bei 10^1 . Die Zugabe des Antigens führt zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils positiver Hybridomzellen. Bei einer Antigenmenge von 5×10^5 Zellen sind 3,72 % der Zellen ausreichend angefärbt, während bei 1×10^6 Zellen 5,07 % positiv sind und bei 1×10^7 Zellen 6,01 %. Zudem ist eine geringe Verschiebung der gesamten Zellpopulation in Richtung eines starken PE-Signals zu erkennen.

Daraus folgend wurde für einen Sortieransatz von 1×10^5 Hybridomzellen die Antigenmenge von

Ergebnisse

1×10^7 inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen gewählt, um den höchsten Anteil an positiv gefärbten Zellen zu erhalten.

Bestimmung des Hintergrundsignals

Im letzten Schritt galt es mögliche Hintergrundsignale zu detektieren und zu eliminieren. Hierfür wurden verschiedene Ansätze der Zellfärbung und deren Signale gemessen. Als Vergleichskontrolle wurden erneut ungefärbte transgene Sp2/0 Myelomzellen betrachtet. In Abbildung 29 sind die verschiedenen Ansätze aufgeführt, die ein Signal durch eine unspezifische Bindung hervorrufen.

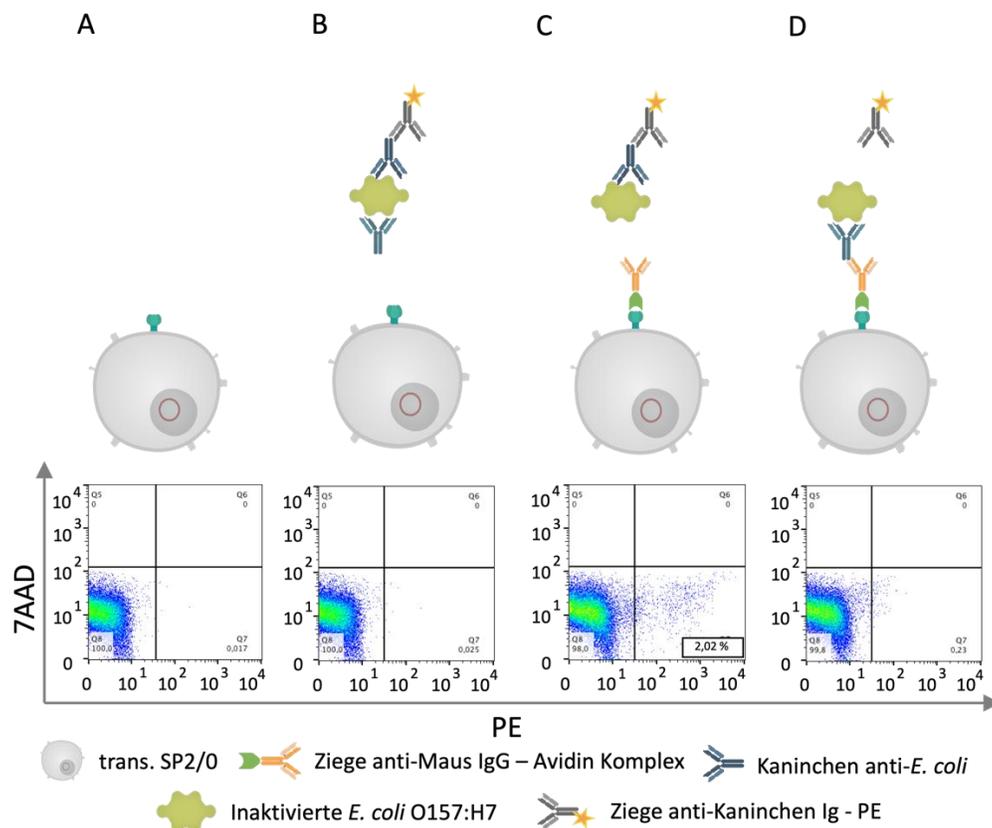


Abbildung 29: Bestimmung der Hintergrundsignale der Immunfärbung mit inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen

Bestimmung des Hintergrundsignals von Komponenten des Färbepanels für die Sortierung von Hybridomzellen. Darstellung des schematischen Zellfärbensatzes und die zugehörige Messung. Der Dotplot zeigt den Live-Dead-Marker 7AAD gegen das PE-Signal (A) Kontrolle: ungefärbte transgene SP2/0 Zellen (B) Ansatz Färbepanel ohne Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplex (C) Ansatz Färbepanel ohne Mausimmenserum (D) Ansatz Färbepanel ohne Kaninchen anti-*E. coli* Antikörper. Alle Messungen wurden am BD FACS Calibur durchgeführt. Quelle: Modifiziert nach Göthel et al., 2021.

Im ersten Versuchsaufbau (Abbildung 29B) ist kein Komplex aus Avidin und Ziege anti-Maus IgG Antikörper vorhanden. Daraus resultiert, dass die Antikörper aus dem Mausserum nicht binden können und kein Signal messbar ist. Ebenfalls kein Signal ergibt die Immunfärbung ohne den polyklonalen Kaninchen anti-*E. coli* Antikörper (Abbildung 29D), da der PE-markierte Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper keine Bindestelle in dem Komplex zum Erzeugen eines Signals hat. Ein geringes Hintergrundsignal bei der Zugabe der höchsten Menge an Antigen von 10^7 *E. coli* Zellen pro 1×10^5 Myelomzellen liegt bei Abbildung 29C vor. In diesem Aufbau ist kein Mausserum enthalten, jedoch sind 2% der Zellpopulation positiv im dritten Quadranten festzustellen. Die unspezifisch angefärbten Zellen liegen mit 2% unterhalb der 6,01 % positiv gefärbter Zellen aus Abbildung 28D. Somit ist ein Hintergrundsignal zu beobachten, welches in die spätere Betrachtung der Ergebnisse der Hybridomsortierungen nach der Zellfusion einbezogen werden muss.

3.4.2. Konfiguration des Sortieraufbaus mit dem Antigen *Legionella pneumophila*

Für das Sortierverfahren von Hybridomzellen gegen *L. pneumophila* wurden ebenso inaktivierte *L. pneumophila* Zellen verwendet. Die Zellfärbung mit dem gesamten Sortieraufbau ist in Abbildung 30 gezeigt. Auf der Zelloberfläche ist der artifizielle Oberflächenrezeptor exprimiert, an dem sich die Antikörperfängermatrix mittels der Bindung des Komplexes aus Avidin und dem Ziege anti-Maus IgG Antikörper bildet. Darauf aufbauend wird der Maus anti-*L. pneumophila* H61F2F8 Antikörper verwendet, der den späteren sezernierten Antikörper der Hybridomzelle nachahmt. Als Antigen kommen inaktivierte *L. pneumophila* Zellen zum Einsatz. Die letzte Ebene ist ein polyklonaler Kaninchen anti – *L. pneumophila* Antikörper, der an PE-gekoppelt ist, um die Zellen im Durchflusszytometer nach ihrer Fluoreszenzstärke zu sortieren.

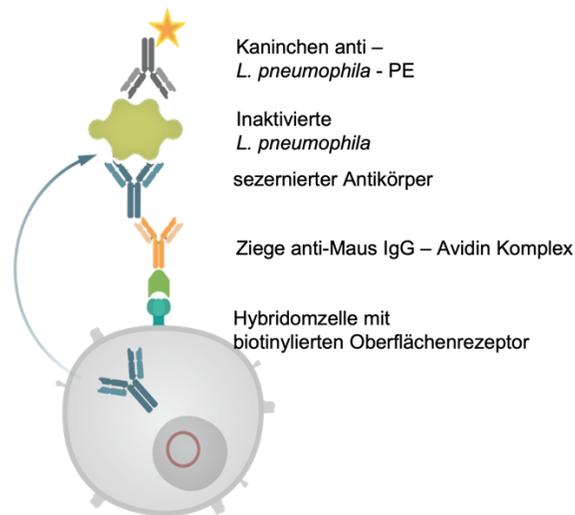


Abbildung 30: Aufbau der Immunfärbung für die Zellsortierung von Hybridomzellen mit dem Antigen *L. pneumophila*

Darstellung der Immunfärbung zur Zellsortierung von Hybridomzellen, die einen anti-*L. pneumophila* spezifischen Antikörper sezernieren. Hybridomzellen tragen auf ihrer Zelloberfläche einen biotinylierten artifiziellen Oberflächenrezeptor, der mit dem Komplex aus Avidin - Ziege anti-Maus IgG eine Matrix zur Bindung von sezernierten Antikörpern um die Zelle bildet. Als Detektionsantikörper wird ein PE-markierter Kaninchen anti-*L. pneumophila* verwendet.

Bestimmung der Positivkontrolle

Während für den Sortieraufbau mit *E. coli* O157:H7 mehrere kommerzielle Antikörper getestet werden mussten, die *E. coli* Zellen zuverlässig in der Immunfärbung binden, wurde für *L. pneumophila* der in der Arbeitsgruppe vorhandene Antikörper Maus anti – *L. pneumophila* H61F2F8 verwendet. In Abbildung 31 ist deutlich zu erkennen, dass H61F2F8 inaktivierte *L. pneumophila* Zellen spezifisch bindet. Die Signalstärke liegt im Mittel bei 10^4 im PE-Kanal und ist deutlich stärker als die Kontrollprobe, deren *L. pneumophila* Zellen nur mit dem Sekundäntikörper Ziege anti – Maus IgG gekoppelt an PE gefärbt wurden. Die Fähigkeit der Antikörperfängermatrix Maus IgG zu binden, wurde bereits in Abbildung 27 gezeigt.

Maus anti- *L. pneumophila* (H61F2F8)

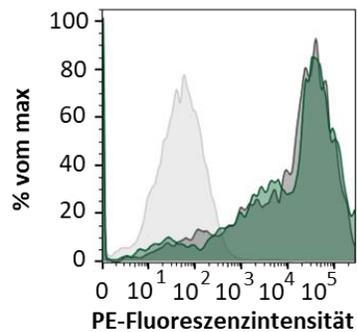


Abbildung 31: Validierung der Positivkontrolle anti - *L. pneumophila* Antikörper H61F2F8

Bestätigung der durchflusszytometrischen Messungen von Maus anti-*L. pneumophila* Antikörper H61F2F8 (dunkelgrün) als Positivkontrolle für den Sortieransatz. 5×10^5 inaktivierten *L. pneumophila* Zellen wurden inkubiert mit H61F2F8 (5 µg/mL) und mittels einem PE-markierten Ziege anti-Maus IgG Detektionsantikörper detektiert. Als Positivkontrolle fungierte ein polyklonaler Kaninchen anti-*L. pneumophila* Antikörper (dunkelgrau). Gefärbte inaktivierte *L. pneumophila* Zellen mit dem Detektionsantikörper sind die Negativkontrolle (hellgrau). Gemessen wurde im PE Kanal des BD FACS Melody.

Bestimmung der Antigenmenge

Nachdem H61F2F8 als Beispiel für einen sezernierten Antikörper ausgewählt wurde, wurde als nächstes die Antigenmenge von inaktivierten *L. pneumophila* Zellen validiert. Zur Etablierung wurden die Antigenmengen 1×10^6 und 1×10^7 für die Zellfärbung von 1×10^6 transgene SP2/0 Zellen eingesetzt und durchflusszytometrisch gemessen.

In Abbildung 32 sind die zwei verschiedenen Antigenmengen und ein Ansatz ohne inaktivierte *L. pneumophila* Zellen dargestellt. Der Ansatz ohne Zellen zeigt Signalstärken von 10^2 bis 10^3 . Bei Zugabe des Antigens ist eine Verschiebung der Zellen zu erkennen. Eine Bakterienmenge von 1×10^6 Zellen steigert den Anteil positiv gefärbter Zellen auf 8,97 %. Die höchsten Werte werden bei einer Antigenmenge von 1×10^7 erreicht. Die Messwerte liegen hier zwischen 10^3 und 10^4 und 61,09 % der Zellen sind positiv angefärbt. Für die Zellfärbung von Hybridomkulturen zur Zellsortierung wird dementsprechend eine Zellenzahl von 1×10^7 inaktivierten *L. pneumophila* bei 1×10^6 Hybridomzellen eingesetzt.

Ergebnisse

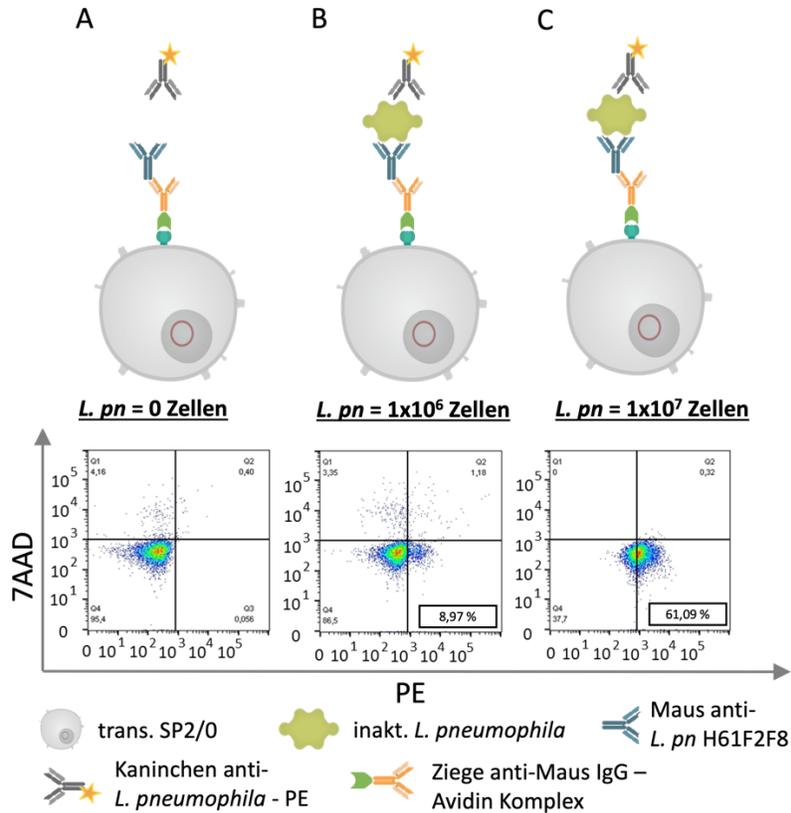


Abbildung 32: Bestimmung der Antigenmenge von inaktivierten *L. pneumophila* Zellen für den Sortieraufbau

Ergebnis der Antigentitration von inaktivierten *L. pneumophila* Zellen. Dargestellt sind der schematische Zellfärbensatz und die zugehörige durchflusszytometrische Messung. Der Dotplot zeigt den Live-Dead-Marker 7AAD gegen das PE-Signal. Transgene SP2/0 Zellen wurden mit allen Komponenten des Färbepanels gefärbt. (A) Kontrolle ohne inaktivierten *L. pneumophila* Zellen (B) Ansatz mit 1x10⁶ inaktivierten *L. pneumophila* Zellen (C) Ansatz mit 1x10⁷ inaktivierten *L. pneumophila* Zellen. Die Messung erfolgte im PE-Kanal am BC FACS Melody.

Bestimmung des Hintergrundsignals

Im letzten Teil der Etablierung wurden verschiedene Ansätze untersucht, um Kreuzreaktionen zwischen einzelnen Komponenten der Färbung auszuschließen. Die Ergebnisse dieser Hintergrundsignal-Betrachtungen sind in Abbildung 33 gezeigt. Als Vergleichskontrolle sind ungefärbte transgene Sp2/0 Zellen dargestellt (Abbildung 33A).

Im ersten Testfall in Abbildung 33B wurde die Antikörperfängermatrix aus der Zellfärbung ausgeschlossen. Die Signalstärke und die Zellpopulation ist vergleichbar mit der Kontrolle und zeigt keinerlei positives Signal. Die zweite Testkombination wurde ohne den Maus anti –

Ergebnisse

L. pneumophila Antikörper H61F2F8 gefärbt (Abbildung 33C). Auch in diesem Fall sind die Messwerte auf Höhe der Vergleichskontrolle. Der dritte Testfall wurde bereits in Abbildung 32A genauer betrachtet. Hier wurden die inaktivierten *L. pneumophila* Zellen nicht in den Sortieraufbau integriert. Die gemessenen Signale liegen ähnlich der Kontrolle in einem Bereich unterhalb von 10^3 im PE – Kanal.

Somit kann eine Kreuzreaktion zwischen den einzelnen Komponenten ausgeschlossen werden.

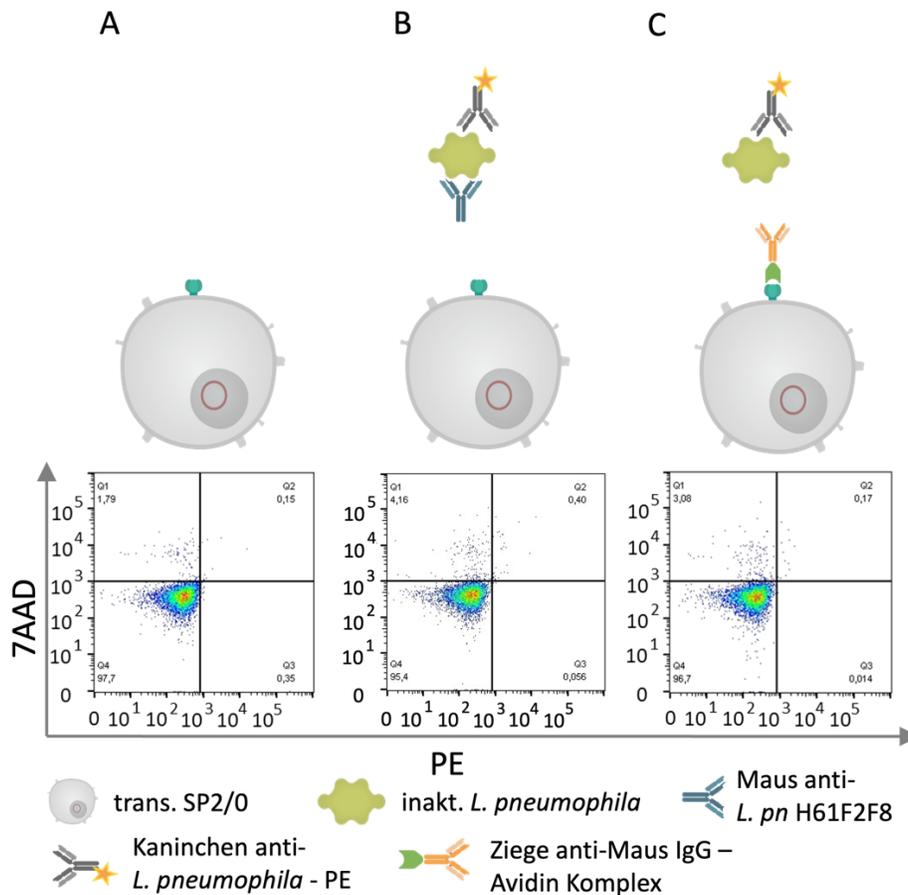


Abbildung 33: Bestimmung der Hintergrundsignale für die Zellfärbung mit inakt. *L. pneumophila* Zellen

Bestimmung des Hintergrundsignals von Komponenten des Färbepanels für die Sortierung von Hybridomzellen. Abgebildet sind der schematische Zellfärbansatz und die zugehörige Messung. Der Live-Dead-Marker 7AAD wird gegen das PE-Signal im Dotplot gezeigt (A) Kontrolle: ungefärbte transgene SP2/0 Zellen (B) Ansatz Färbepanel ohne Ziege anti-Maus IgG – Avidin Komplex (C) Ansatz Färbepanel ohne Maus anti-*L. pneumophila* Antikörper H61F2F8. Die Signalstärken wurden am BD FACS Melody aufgenommen.

3.5. Fusion und Sortierung von Hybridomzellen

Nachdem die Immunfärbung für den Selektionsaufbau der Hybridomzellen für beide Mikroorganismen erstellt war, wurden die Hybridomzellen sortiert. Eine Zellsortierung fand 14 Tage nach der Zellfusion statt. Zellen wurden nach der Sortierung am FACS Melody mit Feederzellen co-kultiviert. Der Kulturüberstand der angewachsenen sortierten Zellen wurde anschließend getestet.

3.5.1. Ergebnisse der Fusionen & Sortierungen gegen das Antigen *E. coli* O157:H7

Für die Generierung von spezifischen Antikörpern gegen *E. coli* O157:H7 wurden aus den fünf erfolgreichen Immunisierungen mit chimären VPs drei für die Zellfusion und die Hybridomsortierung ausgewählt. Diese sind das VP mit dem Epitop EC_2, EC_3 und EC_4. Die Ergebnisse für die drei Zellsortierungen sind in Abbildung 34 veranschaulicht. Die Gates zum Sortieren wurden bei einer Signalstärke von 10^4 festgelegt, um potenzielle Antikörperproduzenten zu sortieren.

Im Allgemeinen konnten in jeder Fusion Zellen gefärbt und etwa 7% der Hybridome mit einem PE-Signal von 10^4 oder höher sortiert werden. Aus der Fusion mit VP EC_2 konnten 13.000 Zellen aus einem Zellpool von 1×10^6 Zellen gewonnen werden. Für die VP EC_3 Fusion konnten 21.000 Zellen aus 6×10^5 Zellen positiv sortiert werden. Bei der Fusion VP EC_4 wurden etwa 75.000 Zellen aus einem Pool von $1,35 \times 10^6$ Hybridomzellen gewonnen.

Zur weiteren Analyse wurden die Zellen monoklonal und polyklonal kultiviert. Inaktivierte *E. coli* O157:H7 Zellen wurden mit den Kulturüberständen gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen. Die höchste Anzahl positiver Hybridome war in der Fusion VP EC_4 detektierbar, die bereits im Serum-Assay ein signifikantes Signal zeigte. Insgesamt wurden 98 % der ausgesäten Polyklone (154 von 156) und etwa 80 % der ausgesäten Monoklone (44 von 55) positiv auf *E. coli* O157:H7 getestet. Von der VP EC_2 Fusion wurden 30 % der Monoklone und 20 % der Polyklone als spezifisch getestet. Die VP EC_3 Fusion wies die geringste Anzahl an Monoklonen auf, die spezifische Antikörper produzierten (4). 35 von 175 Polyklonen zeigten ein positives Signal bei dieser Fusion.

Ergebnisse

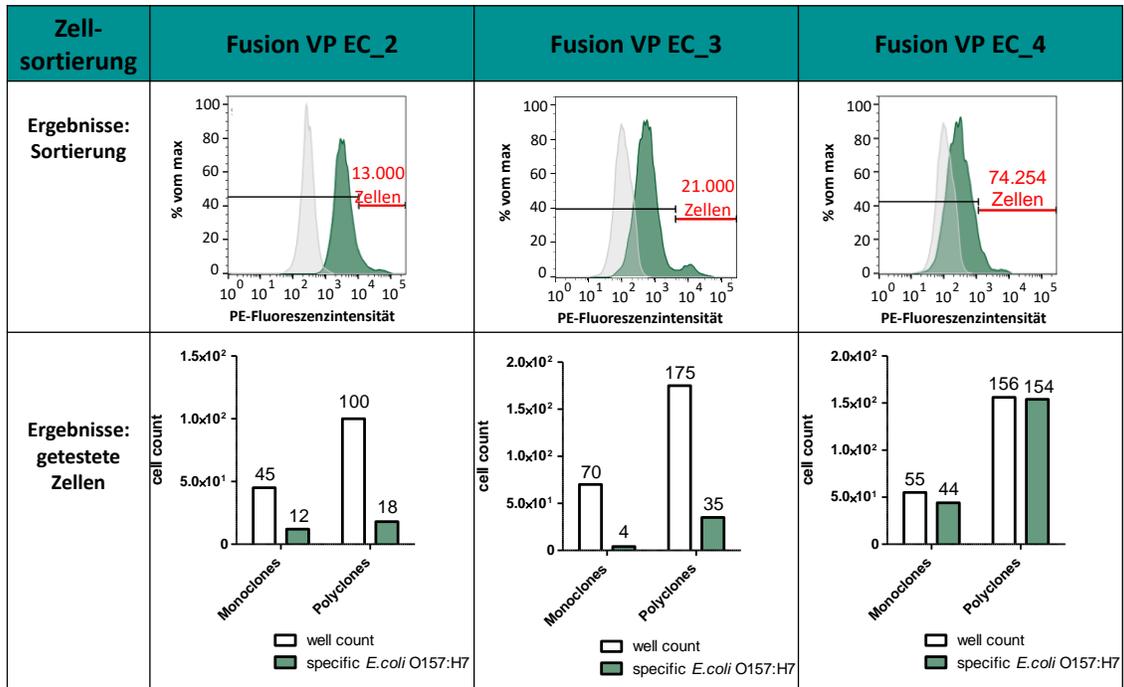


Abbildung 34: Ergebnisse der Sortierungen der Hybridomzellen gegen *E. coli* O157:H7

Messergebnisse der sortierten Hybridome aus den Zellfusionen mit den chimären VPs gegen *E. coli* O157:H7. Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellsortierungen und der getesteten Monoklonen bzw. Polyklone nach der Zellsortierung. Die Anzahl der sortierten Zellen ist in rot gezeigt. Ungefärbte Hybridome sind hellgrau bzw. gefärbte Hybridome mit dem Färbepanel sind dunkelgrün veranschaulicht. Es wurden nur Zellen aus dem Hybridom-Zellpool sortiert, die ein PE-Signal höher 10^4 aufwiesen. Die sortierten Zellen wurden 5 Tage kultiviert und anschließend in der Durchflusszytometrie auf antigenspezifische Antikörper getestet. Detektiert wurde am BD FACS Melody. Quelle: Modifiziert nach Göthel et al., 2021.

Aufgrund der Anzahl an positiv getesteten Klonen im Durchflusszytometer, wurden fünf Monoklonen ausgewählt und deren mAK weiter charakterisiert. Diese sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23 Ausgewählte Klone für weitere Charakterisierungen

Name Zelllinie / AK	Immunisiertes VP	Ursprung-Antigen
H3-2-B8	VP EC_2	FimH
H3-3-G1	VP EC_2	FimH
H4-2-F4	VP EC_4	OmpG
H4-3-D10	VP EC_4	OmpG
H4-3-E10	VP EC_4	OmpG

3.5.2. Ergebnisse der Fusionen & Sortierungen gegen das Antigen *Legionella pneumophila*

Für die Generierung von spezifischen mAK gegen *L. pneumophila* wurden drei Zellfusionen durchgeführt. Fusioniert wurden die Splenozyten der immunisierten Balb/c Mäuse mit VP LE_31, VP LE_32 und VP LE_33. Die Ergebnisse der Zellsortierungen sind in Abbildung 35 dargestellt. Sortiert wurden Hybridomzellen, deren Signalstärke im PE-Kanal im Bereich von 10^4 oder höher lagen.

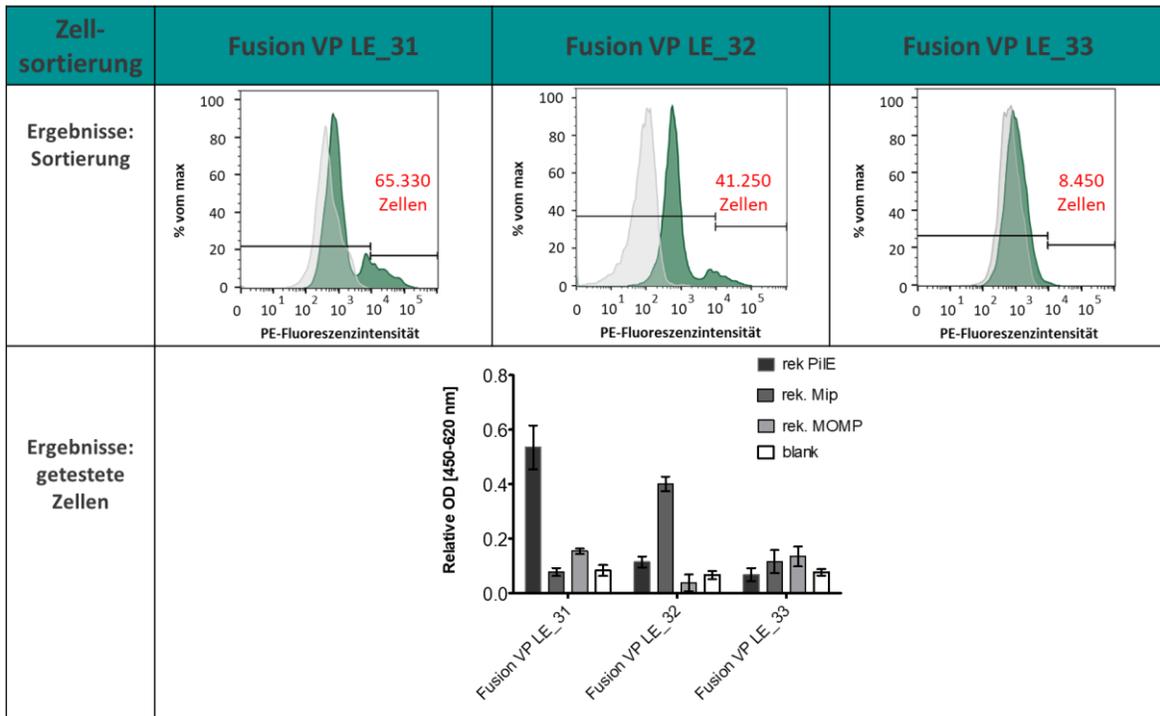


Abbildung 35: Ergebnisse der Sortierungen der Hybridomzellen gegen *L. pneumophila*

Messergebnisse der sortierten Hybridome aus den Zellfusionen mit den chimären VPs gegen *L. pneumophila*. Reihe 1: Gezeigt sind die Ergebnisse der Zellsortierungen am FACS. Die Anzahl der sortierten Zellen ist in rot gezeigt. Ungefärbte Hybridome sind hellgrau bzw. gefärbte Hybridome mit dem Färbepanel sind dunkelgrün veranschaulicht. Es wurden nur Zellen aus dem Hybridom-Zellpool sortiert, die ein PE-Signal höher 10^4 aufwiesen. Gemessen wurde am BD FACS Melody. Reihe 2: Die sortierten Zellen wurden 5 Tage kultiviert und die Kulturüberstände auf die rekombinanten immobilisierten Proteine (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) im indirekten ELISA auf antigenspezifische Antikörper getestet. Detektiert wurde bei 450 nm. Dargestellt ist der Mittelwert aus $n=3 \pm \text{SEM}$.

Im Allgemeinen variierte die Zellzahl an positiv sortierten Zellen aus den Zellfusionen stark. Während aus dem Hybridompool gegen VP LE_31 65.330 Zellen aus $1,5 \times 10^6$ Zellen gewonnen werden konnten, wurde aus der Fusion mit VP LE_32 41.250 Zellen positiv sortiert. Die

geringste Zellzahl an sortierten Zellen wurde aus der Fusion mit VP LE_33 erzielt. Von den 700.000 Zellen hatten nur 8.450 Zellen eine Signalstärke von 10^4 oder höher.

Zu weiteren Analyse wurde der Kulturüberstand der sortierten gepoolten Hybridomzellen gegen die rekombinanten Proteine getestet, um spezifische Antikörper nachzuweisen. Positive spezifische Signale sind in den Kulturüberständen der sortierten Fusion mit VP LE_31 und VP LE_32 zu erkennen (Abbildung 35). Die sortierten Zellen aus der Fusion VP LE_31 zeigen ein Messsignal von 0,55 gegen das rekombinante Pile. Für die sortierten Zellen aus der Fusion gegen VP LE_32 liegt die Signalstärke bei 0,4 gegen das rekombinante Mip. Alle weiteren Signale befinden sich auf Höhe der Negativkontrolle (blank). Einzig die Messsignale des Kulturüberstandes aus der Fusion VP LE_33 zeigen keine deutliche Signalerhöhung und liegen nur geringfügig oberhalb der Negativkontrolle.

3.6. Herstellung & Charakterisierung monoklonaler Antikörper

3.6.1. Antikörper-Reinigung & Bestimmung der Subklasse

Aus den Zellfusionen sind eine Vielzahl an monoklonale Zellkulturen hervorgegangen. In Tabelle 23 sind die Klone aufgelistet, deren Kulturüberstand gesammelt und die Antikörper mittels einer Sepharose Protein A Affinitätschromatographie gereinigt wurden. Die Menge an gereinigten mAK aus 500 ml Kulturüberstand variieren dabei. Aus der Reinigung von H4-2-F6 und H3-3-G1 konnten etwa 1,5 mg Antikörper gereinigt werden, während aus H4-3-E10, H4-3-D10 und H3-2-B8 nur 600-800 μg gereinigter Antikörper gewonnen werden konnte. Die mAK wurden anschließend in PBS pH 7,4 dialysiert und 10 μg Antikörper in der SDS-PAGE aufgetragen. Deutlich zu erkennen sind in allen Proben die leichte Kette bei 25 kDa und die schwere Kette bei 50 kDa. Zudem sind Banden zu erkennen zwischen 130 und 250 kDa, die auf ungespaltene Antikörper hinweisen. Zudem befindet sich bei allen Proben auf Höhe von 70 kDa eine Bande, die auf das Vorhandensein von BSA hinweist, welches eine Molekulargröße von 66 kDa besitzt.

Ergebnisse

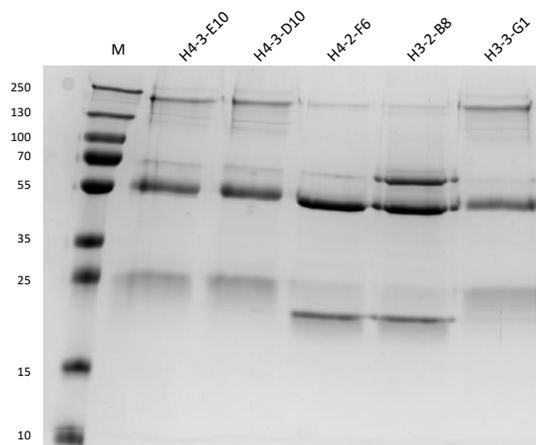


Abbildung 36: mAK nach Protein A Reinigung

Zur Dokumentation des Reinigungsprozesses von murinen mAK aus 500 mL Kulturüberständen wurde ein 12,5-%iges SDS-Acrylamidgel mit 10 µg der Proben beladen und elektrophoretisch getrennt. Die Färbung der Proteine erfolgte mittels einer Coomassie Färbelösung. Als Proteinmarker wurde der PageRuler™ Plus Prestained Marker verwendet.

Im nächsten Schritt wurden die Subklassen der einzelnen Antikörper bestimmt. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse des Tests ausgewiesen.

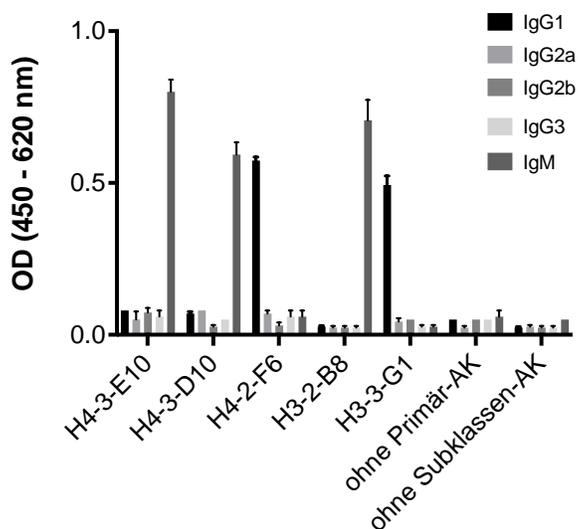


Abbildung 37: Subklassenbestimmung der gereinigten mAK

Bestimmung der Antikörpersubklasse der gereinigten mAK im indirekten ELISA. Die mAK wurden an die feste Phase immobilisiert (5 µg/mL) und verschiedenen biotinylierten Subklassen-Antikörper hinzugegeben (1:10.000 Verdünnung). Der Nachweis erfolgte mit einem Komplex aus SAV-POD. Als Negativkontrolle wurde statt den gereinigten mAK PBS in die Kavitäten gegeben bzw statt den Subklassen-Antikörpern PBS pipettiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus $n=3 \pm \text{SEM}$.

Als Negativkontrolle wurden die Subklassen-AK, sowie SAV-POD auf dem Blockmittel inkubiert, um mögliche Kreuzreaktionen auszuschließen. Als Positivkontrolle wurde ein bekannter kommerzieller IgG1 Antikörper statt den gereinigten mAK verwendet. Die Antikörper H4-3-E10, H4-3-D10 und H3-2-B8 gehören eindeutig zur Klasse der IgM. Die Messwerte liegen zwischen 0,6 bis 0,8 im Vergleich zu den anderen Messwerten der anderen Subklassen-Antikörper. Diese liegen auf Höhe der Negativkontrollen. Währenddessen sind die mAK H4-2-F6 und H3-3-G1 IgG1 Antikörper. Die gemessenen Werte liegen im Bereich von 0,5 – 0,6. Alle anderen Werte sind vergleichbar mit den Messwerten der Negativkontrollen.

3.6.2. Sequenzierung der Antikörper

Neben der Subklasse der Antikörper wurden für das Hybridom H4-3-E10 zusätzlich die Sequenzen der variablen Bindedomäne der leichten und schweren Kette bestimmt. Die Verknüpfung dieser Sequenzen zu einer dreidimensionalen Struktur ergibt das Paratop, welches an das Epitop des Antigens FimH bindet. In Abbildung 2 ist die Lokalisierung dieser Regionen gezeigt. Die Sequenzen sind in Tabelle 24 aufgelistet. Die Sequenzlänge umfasst dabei eine Größenordnung von 5 bis 17 AS.

Tabelle 24 Sequenzen der ermittelten CDRs aus Hybridomsequenzierung von H4-3-E10

Region	Sequenz	Länge [AS]
CDR-H1	SYGVS	5
CDR-H2	VIWGDGSTNYHSALIS	16
CDR-H3	GNWFAY	6
CDR-L1	KSSQSLLSRTRKNYLA	17
CDR-L2	WASTRES	7
CDR-L3	KQSYNLWT	8

3.6.3. Charakterisierung der Kreuzreaktivität der monoklonalen Antikörper

Die mAK wurden ferner auf ihre Bindung zu *E. coli* O157:H7 sowie auf ihre Kreuzreaktivität zu *E. coli* K12 und *L. pneumophila* untersucht. Als Positivkontrollen wurden für *E. coli* O157:H7 der polyklonale Kaninchen anti-*E. coli* Antikörper eingesetzt und für *L. pneumophila* der murine

Ergebnisse

Antikörper H61F2F8. Die Färbung der Zellen nur mit dem Sekundärantikörper fungierte als Negativkontrolle. Die Ergebnisse in Abbildung 38 zeigen die gereinigten mAK und ihre signifikanten Signalstärken im Vergleich zur negativen Kontrolle.

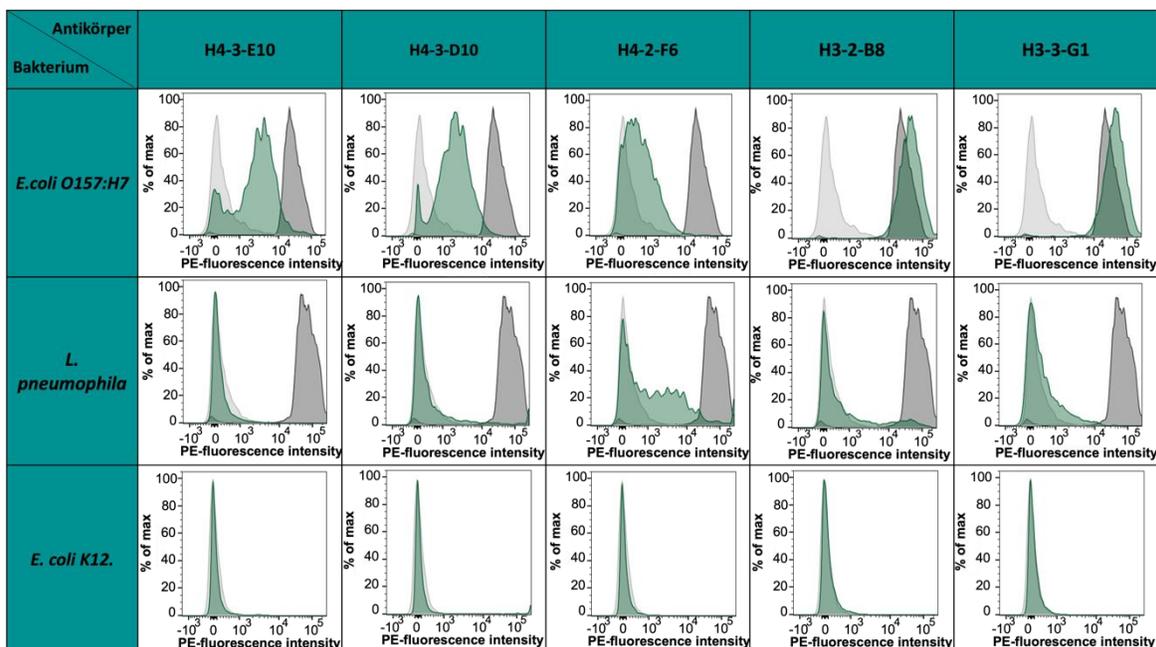


Abbildung 38: Nachweis spezifischer Antikörperbindung zu *E. coli* O157:H7, *L. pneumophila* und *E. coli* K12.

Nachweis der spezifischen Antikörperbindung an *E. coli* O157:H7 ohne Kreuzreaktivität zu *L. pneumophila* und *E. coli* K12. Zwei Millionen Zellen wurden mit den gereinigten mAK (10 µg/mL) H4-3-E10, H4-3-D10 oder H4-2-6 in MACS-Puffer bzw. der Kulturüberstand von H3-2-B8 und H3-3-G1 gefärbt. Detektiert wurde mit einem PE-markierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper. Als Positivkontrolle (dunkelgrau) wurde für *E. coli* ein polyklonaler Kaninchen-anti-*E. coli* Antikörper und für *L. pneumophila* ein Maus anti-*L. pneumophila* Antikörper (H61F2F8) verwendet. Bei den Negativkontrollen (hellgrau) handelt es sich um Färbungen nur mit dem PE-markierten Nachweisantikörper. Quelle: Modifiziert nach Göthel et al., 2021.

Die gereinigten Antikörper H4-3-E10 und H4-3-D10 wurden gegen OmpG generiert und zeigten die beste Bindung, die leicht unter der der Positivkontrolle zwischen 10^4 und 10^5 lag. Die Messungen von H3-2-B8 und H3-3-G1 zeigten ein hohes Signal auf demselben Niveau wie die Positivkontrolle. Beide Antikörper wurden gegen das Protein FimH hergestellt. Bei der Überprüfung der Antikörper gegen *L. pneumophila* und *E. coli* K12 wurden nur geringe Signalveränderungen festgestellt. Die Signalstärken liegen durchweg auf dem Niveau der Negativkontrolle. Nur H4-2-F6 zeigt eine leichte Kreuzreaktivität mit einigen *L. pneumophila* Zellen.

3.6.4. Validierung der spezifischen Epitopbindung

Um zu beweisen, dass die mAK der sortierten Hybridomazellen das integrierte Epitop der chimären VPs binden, wurden alle Antikörper auf ihre Bindung an das entsprechende VP sowie an das native VP ohne integriertem Epitop getestet. Als Positivkontrolle wurde der in der AG generierte Antikörper P157 verwendet, der gegen VP1 gerichtet ist. Als Negativkontrolle wurde nur der Sekundärantikörper zu den VPs hinzugegeben.

Die ELISA-Daten bestätigten, dass alle neu generierten mAK die entsprechenden Epitope, die sich auf den chimären VPs für die Immunisierung befinden, wiedererkennen (Abbildung 39).

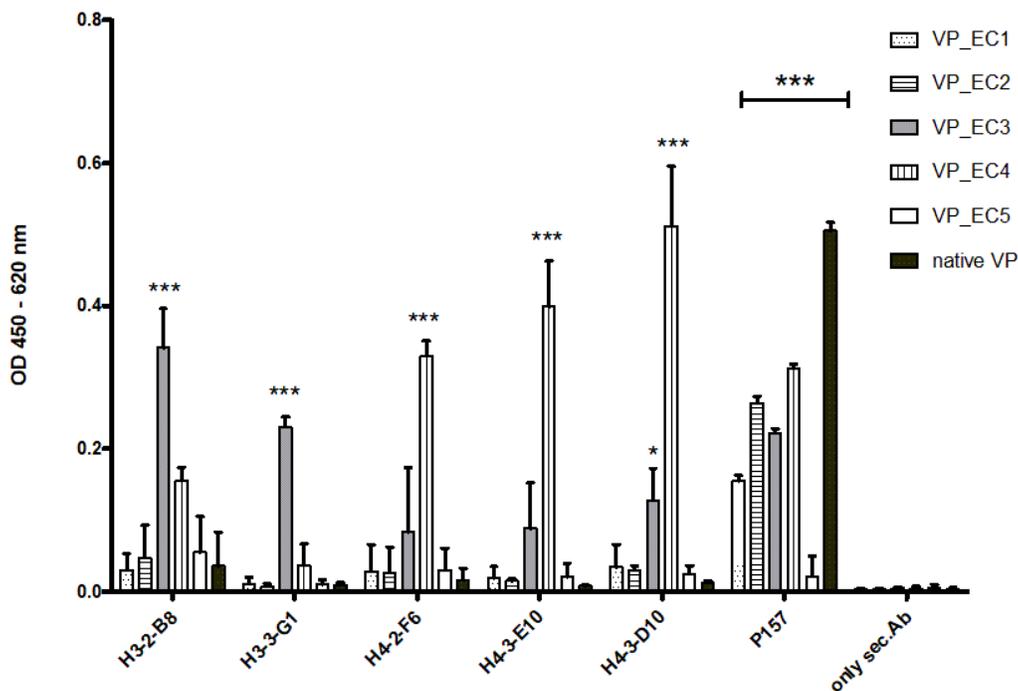


Abbildung 39: Spezifische Epitop-Bindung der mAK an die chimären VPs

Nachweis der spezifischen Bindung der mAK an die integrierten Epitopsequenzen der chimären VPs im indirekten ELISA. Die chimären und nativen VPs wurden an die feste Phase immobilisiert (5 µg/mL). Die mAK wurden mit einer Konzentration von 5 µg/mL für 1 h in den Kavitäten inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem HRP-gekoppelten Ziege anti-Maus IgG Antikörper. Die Signale wurden 15 min nach Zugabe von TMB-Substrat bei 450 nm gemessen. Der P157 (anti-VP) mAK wurde als positive Kontrolle verwendet. n = 3. * p < 0,05, *** p < 0,001 im Vergleich zur Kontrollgruppe durch One-Way-ANOVA. Quelle: Modifiziert nach Göthel et al., 2021

Ergebnisse

H3-2-B8 und H3-3-G1 zeigten eine signifikante Bindung zu VP EC_3. Ein leicht erhöhtes Signal wurde für VP EC_4 festgestellt, während keine weitere Bindung an die anderen chimären VPs gemessen wurde. Ebenso zeigten die Antikörper H4-2-F6, H4-3-D10 und H4-3-E10 eine spezifische Bindung an das integrierte Epitop in VP EC_4. Ein leicht erhöhtes Hintergrundsignal konnte für VP_EC3 festgestellt werden.

Alle Anti-*E. coli* O157:H7 mAK zeigten kein Signal für die nativen VPs ohne Epitop integrierte Sequenzen. Ebenso ist mit dem sekundären Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper - POD keine unspezifische Bindung an chimäre oder native VPs nachweisbar. Die Positivkontrolle Maus anti-VP1 Antikörper P157 hat an alle nativen und chimären VPs außer VP_EC5 gebunden.

4. Diskussion

4.1. Bedeutung von mAK für den Nachweis von pathogenen Mikroorganismen

Monoklonale Antikörper sind für die derzeitige Diagnostik und Biomedizin ein unabdingbares Werkzeug, indem sie mit ihrer Konsistenz und Stabilität beste Voraussetzungen als Diagnose- und Forschungsreagenz zum Nachweis von Molekülen erfüllen (Parola et al., 2018). Währenddessen unterscheiden sich polyklonale Antikörper in ihrer Antikörper-Klasse, differieren in ihrer Epitop-Spezifität und Antikörper-Affinität. Im Vergleich zu einem polyklonalen Antikörpergemisch erkennen mAK ein spezifisches Epitop mit einer konstanten Affinität. Diese Eigenschaften ermöglichen die präzise Identifizierung des nachzuweisenden Analyten. Speziell in Anwendungsfeldern, die einen schnellen sofortigen Nachweis benötigen, ist ein antikörperbasiertes vor-Ort Verfahren von pathogenen Mikroorganismen von großer Bedeutung. Ein antikörperbasiertes POC System wäre beispielsweise in Krankenhäusern von Nutzen, um Patienten mit hoch infektiösen Krankheiten wie Tuberkulose schnell zu identifizieren oder ein Trinkwassermonitoring in Industrieländern oder Entwicklungsländern zu ermöglichen (Kumar et al., 2019). Bisherige Nachweisverfahren setzen auf Gesamtkeimzahlbestimmungen durch Agar-Kultivierung oder den molekularbiologischen Nachweis mittels PCR (Rajapaksha et al., 2019; Van Nevel et al., 2017). Diese Methoden benötigen jedoch eine Laborausstattung und sind zeit- und materialaufwendig. Der vor-Ort Nachweis mittels mAK in einem POC System zeigt eine Alternative zu den bisherigen Methoden auf und verweist auf die Notwendigkeit von spezifischen mAK, um quantitative und qualitative Ergebnisse zu erhalten (Bharadwaj et al., 2021).

4.2. Herausforderungen in der Generierung spezifischer mAK gegen Mikroorganismen und deren Adressierung im neuen Workflow

Während bereits die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen ein einzelnes Protein eine Herausforderung darstellt, ist die Generierung eines spezifischen mAK gegen ein bestimmtes Bakterium mit einer zusätzlichen Vielzahl an Problemen verbunden.

Zu Beginn des Antikörperentwicklungsprozesses steht die Identifizierung geeigneter Epitope für den zu generierenden Antikörper. Insbesondere bei Mikroorganismen ist es jedoch schwierig, speziesspezifische Epitope zu identifizieren, da sich hochkonservierte Genregionen bzw. deren zugehörigen Proteine stark mit anderen Spezies überschneiden (Moor et al., 2016). Zudem bilden Peptidoglykane den Hauptbestandteil der Zelloberfläche von Mikroorganismen. Diese werden von *Toll-like* Rezeptoren erkannt und erzeugen eine Immunantwort, die vorwiegend gegen diese molekulare Muster gerichtet ist.

Weitere beeinflussende Faktoren im Entwicklungsprozess liegen in der Immunisierungsmethode und Screeningstrategie der zu testenden Hybridome. Die Identifizierung geeigneter Hybridome, deren Antikörper ausschließlich an stamm- oder speziesspezifische Ziele binden, ist hierbei äußerst herausfordernd. Bei der Suche nach geeigneten Bindern werden im Allgemeinen ELISA/ELISPOT-Techniken und Western- oder Dot-Blotting-Methoden eingesetzt. Diese Methoden weisen jedoch einige Nachteile auf, die mit der Reinheit der verwendeten Komponenten, der unspezifischen Bindung an Kunststoff oder der evolutionären Verwandtschaft zwischen den Stämmen zusammenhängen (Moor et al., 2016).

Die vorliegende Arbeit befasste sich daher mit der Fragestellung, ob spezifische mAK gegen Mikroorganismen mit einem neuen interdisziplinären Ansatz zielgerichteter und effektiver generiert werden können. Fokussiert wurde eine Kombination von drei Aspekten, um einen umfassenden *Workflow* für Mikroorganismen-spezifische mAK zu etablieren, der in Abbildung 40 dargestellt ist.

Der erste Aspekt beinhaltete eine *in silico* Analyse zur Identifizierung einzigartiger und speziesspezifischer Epitope. Hier wurde das Prinzip der RV (Abschnitt 1.5) aufgenommen und in den neuen *Workflow* transferiert. Der zweite Aspekt enthält die Immunisierung mit dem Virushüllprotein VP1, welches mit den zuvor identifizierten Epitopen zu einem chimären Protein modifiziert wurde zur Erzeugung einer spezifischen Immunantwort (Abschnitt 1.2) gegen das angestrebte Bakterium. Der dritte Aspekt impliziert die Adaption eines neuen angepassten Selektionssystems zur Sortierung der generierten Hybridomzelllinien nach Antigen-spezifischen antikörperproduzierenden Hybridomen (Abschnitt 1.3.3). Die Ergebnisse der einzelnen Teile des neuen *Workflows* werden im Folgenden genauer betrachtet und in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext gesetzt. Für diesen *Proof-of-concept* Ansatz wurden als Modellorganismen *E. coli* O157:H7 (Abschnitt 1.6.1) und *L. pneumophila* (Abschnitt 1.6.2)

verwendet. Als Anwendungsfall für die neu zu generierenden mAK wurde die Trinkwasseranalyse gewählt.

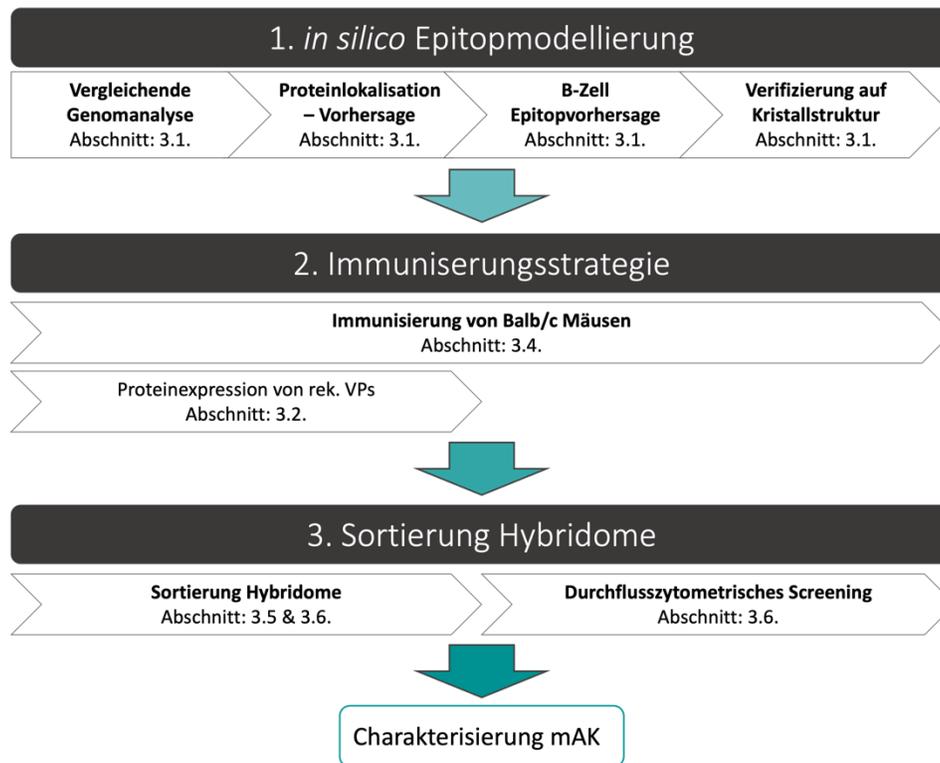


Abbildung 40: Schematische Darstellung des neu entwickelten *Workflows* im Zusammenhang mit den generierten Ergebnissen

Gezeigt sind die verschiedenen Teilschritte des *Workflows* zur Generierung spezifischer mAK gegen Mikroorganismen und deren zugehörigen Ergebnisse.

4.3. Identifizierung spezifischer Epitope für *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila* mittels bioinformatischer Analysen

Der erste Teil des neuen *Workflows* umfasst eine bioinformatische Analyse, die sich aus den Einzelschritten vergleichende Genomanalyse, Proteinlokalisierung, Epitop-Vorhersage und Strukturanalyse zusammensetzt. Mit diesem ersten Teil der Arbeit wurde das Problem adressiert, geeignete spezifische Epitope für den zu generierenden mAK zu identifizieren. Die Kombination dieser einzelnen Analyseschritte ist auch als RV bezeichnet (Rappuoli, 2001). Dieses Prinzip basiert auf dem Ansatz, dass alle Proteinantigene im Genom codiert sind und durch *in silico* Analysen spezifische Gene bzw. deren zugehörige Proteine aus dem Genom gefiltert werden können (Sette and Rappuoli, 2010). Da eine vergleichende Genomanalyse von

allen bekannten Mikroorganismen und deren Genome technisch nicht realisierbar ist, wurde für das hier gezeigte *Proof-of-Concept* eine spezifische Anwendung gewählt, um die Anzahl zu untersuchender Mikroorganismen einzuschränken und dennoch eine realitätsnahe Anwendung vorzuweisen. Ziel war es daher spezifische Epitope für *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila* in der Trinkwasseranalyse zu identifizieren.

Für die bioinformatische Analyse (Abschnitt 3.1) wurden der Referenzstamm *E. coli* O157:H7 mit acht Indikator-Mikroorganismen verglichen, die häufig mit kontaminiertem Trinkwasser in Verbindung gebracht werden (Cabral, 2010; National Research Council (US) Subcommittee on Microbiological Criteria., 1985), sowie mit dem CORE-Genom von *E. coli*. Das Genom des Referenzstammes umfasst 5540 Gene, die durch die *in silico* Analyse auf 1203 stammspezifische Gene reduziert werden konnten. Von diesen waren 53 Proteine mit der Zelloberfläche assoziiert. Die Anzahl der zu untersuchenden Proteine konnte somit deutlich minimiert werden. Die bioinformatische Analyse mit *L. pneumophila* als Referenzstamm führte zu 1699 spezifischen Genen, von denen 36 Proteine mit der Zelloberfläche assoziiert sind.

Die deutliche Reduzierung der zu untersuchenden Proteine durch das Prinzip der RV ist bereits mehrfach in wissenschaftlichen Studien beschrieben worden (Michalik et al. 2022; Soleymani et al. 2021) und stellt einen großen Vorteil für den dargelegten Ansatz dar. Während in traditionellen Ansätzen zur Antigenidentifizierung nur eine geringe Anzahl an potenziellen Antigenkandidaten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht werden konnte, bietet der bioinformatische Ansatz die Möglichkeit alle Proteinantigene in einem Genom zu identifizieren und zu analysieren. Die erste Studie wurde 2001 von Rappuoli an *Meningococcus B* für die Identifikation eines neuen Vakzins (Rappuoli, 2001) durchgeführt.

Kritisch an dieser Stelle ist anzumerken, dass nur genombasierte Daten für die Analyse herangezogen wurden. Dies lässt keine Aussagen über den Expressionslevel und damit die Häufigkeit des Epitops auf der Zelloberfläche zu. Die Folge bei einem niedrigen Expressionslevel des Zielproteins wäre ein spezifischer Antikörper, der jedoch kein ausreichend starkes Signal zur Detektion der Mikroorganismen im Detektionssystem liefert.

Das für diese Arbeit verwendete Mikroorganismen-Panel bietet eine valide Datengrundlage zur Demonstration des neuen *Workflows* in dem hier gezeigten *Proof-of-Concept*. Das Panel umfasst coliforme Bakterien sowie weitere Bakterienarten, die im Trinkwasser vorkommen. Für eine

industrielle Anwendung sollte das Panel entsprechend den Zielvorgaben angepasst und erweitert werden.

Von den 53 Genen aus dem Referenzstamm *E. coli* O157:H7 und den 36 Genen aus dem Genom von *L. pneumophila* wurden zwei bzw. drei Vertreter ausgewählt, deren Funktion und Eigenschaften charakterisiert sind. Für *E. coli* O157:H7 wurde *fimH* und *ompG* ausgesucht und für *L. pneumophila* *mip*, *pilE* und *mompS*. Das zu korrespondierende Protein FimH zu *fimH* ist Teil der Fimbrie von *E. coli*, setzt sich aus mehreren Proteinen zusammen und ist für die Adhäsion der Bakterienzelle an die Wirtszelle verantwortlich (Tchesnokova et al., 2011). Das Protein OmpG ist ein Transmembranprotein, welches für die Aufnahme von größeren Oligosacchariden verantwortlich ist (Subbarao and van den Berg, 2006). Das Protein Mip ist ein Virulenzfaktor von *L. pneumophila* und für die Infektion in Menschen von tragender Bedeutung (DebRoy et al., 2006). Währenddessen ist PilE Teil des Pilus des Bakteriums und MOMP stellt ein Porin in der äußeren Membran dar (Chen et al., 2020). Sowohl das Protein FimH als auch PilE sind in anderen wissenschaftlichen Veröffentlichungen als potentielle Kandidaten für Vakzine identifiziert worden (Michalik et al., 2016; Pritam et al., 2018) und validieren den hier dargelegten bioinformatischen Ansatz.

Für die Identifizierung von geeigneten Epitopen wurden mehrere Vorhersage- und Lokalisierungswerkzeuge wie IEDB, PSORTb v3.0 und BioCyc kombiniert. Die Kombination dieser verschiedenen Tools hat sich bereits in vorherigen Studien zur Identifizierung neuer Impfstoffe gegen Mikroorganismen bewährt (Kardani et al., 2020; Mehla and Ramana, 2016; Pritam et al., 2018). Anzumerken ist, dass speziell für die Vorhersage von B-Zell Epitopen unterschiedliche Tools existieren, die auf unterschiedlichen Algorithmenansätzen beruhen (maschinelles Lernen, semi-statistisches Verfahren), weshalb ihre Ergebnisse verschieden ausfallen können (Usmani et al., 2018).

Aus den hier verwendeten Tools der IEDB Datenbank sind fünf Epitopsequenzen gegen *E. coli* O157:H7 und drei Sequenzen gegen *L. pneumophila* hervorgegangen, die die benötigten Kriterien (lineares Epitop, Proteinoberflächenzugänglichkeit und immunogene Sequenzabschnitte) erfüllen.

4.4. Induzierte Immunantwort gegen *E. coli* O157:H7 & *L. pneumophila*

Die ausgewählten Epitope wurden in ein VP-System kloniert, das eine oberflächenbezogene Präsentation der Epitopsequenz auf dem Trägerprotein VP1 ermöglicht (Lua et al., 2014). Ein weiterer Vorteil der Verwendung eines solchen Systems für die Immunisierung ist die sehr schnelle und spezifische Indizierung einer Immunantwort gegen VP1 bzw. die integrierten Epitope, wie in Abschnitt 3.3 dargestellt.

Die Ergebnisse für die Generierung eines anti - *E. coli* O157:H7 Antikörpers in der Abbildung 19 zeigen, dass gegen vier von fünf chimären VPs innerhalb von vier Wochen eine starke Immunantwort gebildet wurde. Einzig gegen das chimäre VP EC_5 fiel die Immunantwort hingegen schwächer aus. Zudem zeigen die durchflusszytometrischen Ergebnisse in Abbildung 20, dass eine induzierte Immunantwort gegen die integrierten Epitope stattgefunden hat. Während im Präimmunserum keine Antikörperbindung gegen *E. coli* O157:H7 Zellen nachweisbar war, konnten nach abgeschlossener Immunisierung spezifische Antikörper detektiert werden. Auch hier weisen vier von fünf Immunseren einen hohen spezifischen Titer gegen das Bakterium *E. coli* O157:H7 in den Messungen auf. Nur die Signalstärke gegen das chimäre VP EC_5 fällt geringer aus, was mit der zuvor gemessenen schwächeren Immunantwort gegen die VPs korreliert.

Bezogen auf die Ergebnisse für *L. pneumophila* zeigt sich ein ähnliches Bild. Ebenfalls konnte, wie in Abbildung 21 gezeigt, eine starke Immunantwort gegen die chimären VPs bei allen drei Epitopen induziert werden. Ein spezifischer Titer gegen die integrierten Epitope ist aus den Abbildung 22 und Abbildung 23 abzuleiten. Hier wurden die Seren auf die zugehörigen rekombinanten Proteine getestet, sowie auf die inaktivierten *L. pneumophila* Zellen im Durchflusszytometer. In beiden Fällen zeigt sich, dass gegen *L. pneumophila* Antikörper gebildet wurden und eine Immunreaktion stattgefunden hat.

Kritisch zu betrachten sind die Ergebnisse im Hinblick auf die Reinheit der für die Immunisierung verwendeten VPs. Die elektrophoretische Auftrennung der Elutionsfraktionen im SDS-Gel nach Coomassie Färbung zeigt deutlich die dominanten Proteinbanden mit korrelierendem Molekulargewicht für VP1 (Abbildung 16). Jedoch sind weitere schwächere Proteinbanden zu erkennen. Dies weist auf potenzielle Kontaminationen mit Fremdproteinen

bzw. Abbauprodukte hin. Da kein Western Blot durchgeführt wurde, sind diese schwächeren Proteinbanden nicht eindeutig bestimmten Proteinen zuzuschreiben. Diese Proteinbanden sind Teil der Antigengabe und könnten ein Immunantwort erzeugen, die zu den Signalmessungen gegen *E. coli* O157:H7 möglicherweise beitragen. Für *L. pneumophila* erscheint dies jedoch wenig wahrscheinlich, da spezifische Signale im Immunserum gegen das chimäre VP und die rekombinanten Proteine im ELISA (Abbildung 21 und Abbildung 22), sowie gegen die inaktivierten *L. pneumophila* Zellen im Durchflusszytometer (Abbildung 23) gemessen wurden. Daher erscheint eine induzierte Immunantwort aufgrund von Fremdproteinen unwahrscheinlich.

Die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen integrierte Epitope in chimären VP1 konnte bereits in mehreren Studien erfolgreich gezeigt werden. Unter anderem in der Arbeit von Gedvilaite et al. konnte gegen das Hepatitis B Virus eine spezifische Immunantwort in C57Bl6 Mäusen nachgewiesen werden (Gedvilaite et al., 2000). Diese wurden mehrmals mit einem chimären VP1 immunisiert, welches die spezifische Sequenz DPAFR für den Hepatitis B Virus trug. Das in dieser Arbeit verwendete Immunisierungsprotokoll wurde in der Arbeitsgruppe entwickelt und seine erfolgreiche Anwendung mehrfach bewiesen (Lütkecosmann et al., 2017; Messerschmidt et al., 2012). Gegenüber herkömmlichen Immunisierungsstrategien mit Trägerproteinen wie BSA oder KLH, deren Immunisierungszeiträume bis zu drei Monate umfassen und zusätzlich die Gabe von Adjuvantien erfordern, stellt die Immunisierung mit chimären VPs einen bedeutenden Fortschritt dar. Eine weitere erfolgreiche Studie ist unter anderem die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen humanes Mucin-1 (Zvirbliene et al., 2006).

Somit ist festzuhalten, dass sowohl bei den Epitopen gegen *E. coli* O157:H7 als auch gegen *L. pneumophila* innerhalb von 4 Wochen ein spezifischer Titer induziert werden konnte, ohne dass ganze Bakterienzelleextrakte immunisiert werden mussten. Dies ist dahingehend von Vorteil, da die alternative Verwendung von inaktivierten Bakterien oder Bakterienzelleextrakten für die Immunisierung einige Risiken birgt (van der Woude 2011). Viele Bakterienarten zeigen phänotypische Veränderungen in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsphase, den Kulturmedien oder anderen Umweltfaktoren. Die Folge sind veränderte Proteinexpressionsmuster, die die Präsentation spezifischer Epitopsequenzen auf der Zelloberfläche beeinflussen und möglicherweise verhindern können (Bidmos et al., 2018).

4.5. Sortierung von Antigen-spezifischen Hybridomzellen

Im nächsten Teil der Arbeit wurde ein bakterienspezifisches Färbe- und Sortierprotokoll für antikörperproduzierende Hybridome entwickelt, welches auf der Arbeit von Listek et. al (2020) basiert. In dieser Methode wurde die transgene SP2/0 Myelomzelllinie verwendet, die auf der Zelloberfläche einen artifiziellen Oberflächenrezeptor exprimiert. Dieser ermöglicht eine Antigen-spezifische Sortierung von Hybridomzellen, indem der sezernierte Antikörper mit der Ursprungszelle verknüpft wird (Abschnitt 1.3.3). Im Vergleich zu konventionellen Screening-Methoden mittels ELISA und Verdünnungsklonierung verkürzt dieser Ansatz den Selektionsprozess signifikant. Bestehende Probleme von Screening-Methoden für Antikörper gegen Bakterien wie die Beschichtung von ELISA-Platten mit Mikroorganismen oder unspezifische Antikörperbindungen an Plastik werden damit umgangen (Moor et al., 2016).

Die Ergebnisse der Sortierung der Hybridomzellen gegen *E. coli* O157:H7 aus Abbildung 34 zeigen, dass aus allen drei Fusionen spezifische Hybridome selektiert werden konnten. Aus der Fusion der B-Zellen nach Immunisierung mit dem chimären VP EC_4 konnten bis zu 75.000 spezifische Hybridome selektiert werden. Von diesen sortierten Zellen wurden die Kulturüberstände von 55 monoklonalen und 156 polyklonalen Zellpopulationen im Durchflusszytometer getestet. Als anti-*E. coli* O157:H7 spezifisch konnten 44 Monoklone und 154 Polyklone eingestuft werden, was einen optimalen Fall darstellt (Abbildung 34). Für die Fusionen VP EC_2 und VP EC_3 konnte eine Ausbeute von jeweils 18 % positiv getesteten Hybridomkulturen erzielt werden. Bei diesen Ergebnissen sind deutliche Unterschiede in der Ausbeute an positiv getesteten Hybridomkulturen zwischen den einzelnen Epitopen nach der Zellsortierung zu erkennen. Die Ursache könnte in der generellen Instabilität der Hybridomzellen nach einer Fusion und Selektion liegen (Castillo et al., 1994). Jedoch ermöglicht diese Selektionsmethode dennoch eine hohe Anzahl von potenziellen mAK-Kandidaten schnell und effektiv selektieren zu können.

Die Ergebnisse der Sortierungen mit inaktivierten *L. pneumophila* Zellen aus Abbildung 35 bestätigen das zuvor beschriebene Gesamtbild. Aus den Fusionen gegen die immunisierten VP LE_31 und VP LE_32 konnten 65.000 bzw. 42.000 Zellen sortiert werden. Hingegen wurden nur etwa 9.000 Hybridomzellen aus der Sortierung der Fusion gegen VP LE_33 gewonnen. Im Gegensatz zu den Fusionen gegen *E. coli* O157:H7 wurden die Zellen nach der Sortierung gepoolt und deren Kulturüberstand im Durchflusszytometer getestet (Abbildung 35).

Die Ergebnisse zeigen, dass die sortierten Hybridomzellen spezifische Antikörper gegen *L. pneumophila* produzieren und sezernieren.

Die Sortierung von Hybridomzellen mit dem neuartigen Selektionsprinzip von Listek, et al. (2020) wurde bisher nur für Proteine und Haptene gezeigt. Eine Sortierung mit inaktivierten Bakterienzellen stellt ein Novum für diese Technologie dar. Anhand der Ergebnisse der Etablierung der Zellfärbung (Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2) ist zu erkennen, dass dieser Sortieraufbau spezifische antikörperproduzierende Hybridomzellen gegen *E. coli* O157:H7 bzw. *L. pneumophila* anfärbt. Die Färbung mit inaktivierten Mikroorganismen bietet den Vorteil, dass eine rekombinante Proteinexpression von Membranproteinen umgangen werden kann, die allgemein als herausfordernd beschrieben ist (Itoh et al., 2002). Zudem befinden sich die zu detektierenden Epitopstrukturen bei inaktivierten Mikroorganismen in ihrer nativen Umgebung auf der Zelloberfläche. Folglich sind die Proteine native gefaltet (de Marco, 2013) und die *in silico* vorgesagte Epitopstruktur wird während dem Selektionsprozess auf ihre Zelloberflächenpräsentation *in vivo* überprüft. Eine alternative Selektionsmethode, basierend auf der Immobilisierung von Bakterienzellen auf Mikrotiterplatten, liefert zumeist stark abweichende Resultate und führt zu einer schlechten Reproduzierbarkeit von Ergebnissen (Poxton, 1995).

Kritisch anzumerken ist eine zu beobachtende unspezifische Bindung bei der Färbung mit inaktivierten *E. coli* O157:H7 Zellen (Abbildung 29). Etwa 2% der gefärbten Zellen erscheinen hier als falsch positiv. Mögliche Interaktionen mit Oberflächenrezeptoren wie dem Toll-Like 4 Rezeptor könnten die Ursache für diese Bindung sein. Des Weiteren bildet der Inaktivierungsprozess von Bakterien und den damit einhergehenden biochemischen und physiochemischen Veränderungen in der Zelle eine unbekannt Komponente. Epitopstrukturen auf der Zelloberfläche können während des Inaktivierungsprozesses zerstört werden oder weiterhin erhalten sein.

4.6. Spezifische Bindung mAK

Im letzten Teil der Arbeit wurden fünf monoklonale Hybridomkulturen exemplarisch aus den Fusionen, die gegen *E. coli* O157:H7 gerichtete sind, ausgewählt und deren mAK gereinigt und auf ihre charakteristischen Eigenschaften untersucht.

Die erhaltenen Antikörperkandidaten gehören zur Gruppe der IgG1 oder IgM Subklasse von

Antikörper. Der Nachweis von IgM Antikörpern ist unerwartet, da zum einen der Komplex aus Avidin und Ziege anti-Maus IgG Antikörper im Färbepanel zum Sortieren von Hybridomzellen nur Immunglobulin der Klasse G binden sollten. Jedoch kann dieses Ergebnis durch eine Kreuzreaktivität des Ziege anti-Maus IgG Antikörpers zu IgM erklärt werden. In verschiedenen Studien (Lua et al., 2014; Lütkecosmann et al., 2017), die chimäre VP1 als Trägerprotein eines Epitops für die Immunisierung einsetzen, ist der IgM Titer nicht weiter aufgeführt. IgG Antikörper sind allgemein physiochemisch stabiler als IgM Antikörper und für den Einsatz in POC-Test besser geeignet. Für eine Steigerung des IgG-Titers sollte daher ein zusätzliche Antigengaben durchgeführt werden, die den Antikörper-Subklassenwechsel begünstigt und zu einer Erhöhung des Anteils an IgG führt.

Des Weiteren wurden die mAk auf eine mögliche Kreuzreaktivität gegen andere Bakterienstämme wie *L. pneumophila* und *E. coli* K12 charakterisiert. Wie in Abbildung 38 zu sehen, waren alle Antikörperkandidaten mit Ausnahme von H4-2-F6, welcher eine leichte Kreuzreaktivität zeigte, negativ für die getesteten Bakterienarten und ausschließlich positiv für *E. coli* O157:H7. Es ist jedoch anzumerken, dass *E. coli* K12 über kodierende Gene für *ompG* verfügt. Studien haben jedoch gezeigt, dass die Expression unter Laborbedingungen nahezu nicht vorhanden ist (Fajardo et al., 1998).

Im letzten Charakterisierungsschritt wurden die mAK auf ihre spezifische Bindung zum immunisierten Epitop überprüft. Aus den Ergebnissen in Abbildung 20 und Abbildung 22 hat sich gezeigt, dass im naiven Serum geringe Mengen an Antikörpern vorhanden sind, die an *E. coli* O157:H7 oder *L. pneumophila* binden können. Aufgrund der Zellsortierung mit inaktivierten Bakterienzellen besteht die Möglichkeit, dass Hybridomzellen selektiert werden, die einen Antikörper gegen das Bakterium produzieren, jedoch nicht gegen das gewünschte identifizierte Epitop. In den Ergebnissen in Abbildung 39 ist jedoch klar zu erkennen, dass die mAK spezifisch die integrierten Epitope in den VPs binden. Zusammen mit den Ergebnissen für die Kreuzreaktivität lässt sich schließen, dass die mAK die vorhergesagten immunisierten Epitope auf der Zelloberfläche von *E. coli* O157:H7 erkennen.

4.7. Limitierungen des interdisziplinären *Workflows* und Alternativen

Das zu Beginn erwähnte Ziel dieser Studie war es einen neuen interdisziplinären *Workflow* zur Generierung spezifischer Antikörper gegen Mikroorganismen zu entwickeln. Der in dieser Arbeit gezeigte Pilotansatz scheint eine zuverlässige und schnelle Alternative zur Erzeugung von Mikroorganismen-spezifischen Antikörpern zu sein. Als Vorteile sind die schnelle, effektive und zielgerichtete Vorgehensweise zu benennen, die sowohl zeit- als auch materialsparender ist, sowie der Verzicht auf die Immunisierung mit ganzen Bakterienzellextrakten oder unzureichend reproduzierbare zellbasierte ELISA-Screenings zur Identifikation geeigneter Antikörper Kandidaten.

Neben den genannten Vorteilen weist der *Workflow* eine Reihe an Limitierungen auf. Zum einen identifiziert der bioinformatische Ansatz nur Proteine als Antigene, da diese im Genom codiert sind. Jedoch bieten andere Moleküle wie Zuckerstrukturen alternative Antigenmöglichkeiten, die im Speziellen für Mikroorganismen sehr spezifisch sein können (Navarro et al., 2016). So besitzt zum Beispiel die Serogruppe 1 von *L. pneumophila* eine spezifische Zuckerstruktur auf ihrer Zelloberfläche.

Da in dem bioinformatischen Ansatz nur Genomdaten verwendet werden, kann keine Aussage über das Vorhandensein und die Häufigkeit des gewählten Antigens getroffen werden.

Zudem ist das hier gezeigte Färbeprotokoll nur mit einem Bakterium möglich, welches kultivierbar und folglich inaktiviert werden kann. Jedoch sind eine Reihe an Mikroorganismen nicht unter Laborbedingungen kultivierbar.

Der hier gezeigte Ansatz ist als Ergänzung zu den bisherigen Verfahren anzusehen. Bisherige Verfahren zur Antikörperentwicklung basieren auf der Immunisierung von Labortieren mit ganzen Bakterienzellextrakten oder abgeschwächten Bakterien. Bei Vorhandensein eines dominanten spezifischen Epitops auf der Zelloberfläche ist dieses Verfahren weiterhin eine gute Möglichkeit spezifische Antikörper zu erzeugen. Eine weitere Alternative bieten molekulare Display Methoden wie das Phage Display. Aus einer Bibliothek an verschiedenen Bindern kann über mehrere Anreicherungsrounds ein spezifischer Binder auf der Zelloberfläche des Bakteriums angereichert werden (Mertens et al., 2001; Navarro et al., 2020).

4.8. Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dem in dieser Pilotstudie beschriebenen *Workflow* ist eine gezielte und zuverlässige Generierung spezifischer mAK gegen Mikroorganismen möglich. Es bedarf jedoch zusätzlicher Experimente, um den *Workflow* weiter zu evaluieren.

Von großer Bedeutung wäre eine zusätzliche Untersuchung der Kreuzreaktivität der mAK gegen weitere Mikroorganismen. Speziell die in Tabelle 18 aufgeführten Bakterienstämme für die vergleichende Genomanalyse sollten in Betracht gezogen werden, um dem *Workflow* besser bewerten zu können.

Zudem wäre eine vertiefende Untersuchung der generierten mAK von Bedeutung. Von den bisherigen mAK wurden bisher keine K_D -Werte bestimmt. Jedoch wäre dies von Interesse bezogen auf die sortierten Hybridomzellen. Diese wurden während der Zellsortierung aus einem *Gate* sortiert, welches im PE-Kanal im Bereich von 10^4 oder höher lag. Eine Untersuchung der K_D -Werte von weiteren mAK, deren Hybridomzellen oberhalb von 10^5 oder unterhalb von 10^4 im PE-Kanal lagen, würde Aufschluss über die Korrelation von Signalwerten während der Zellsortierung zum K_D -Wert liefern.

In dieser Pilotstudie wurden speziell für *E. coli* O157:H7 gut charakterisierte und definierte Protein gewählt, deren Kristallstruktur vorab bestimmt wurde. Es konnte jedoch anhand der Proteine von *L. pneumophila* gezeigt werden, dass durch bioinformatische Strukturvorhersage mittels Tools wie iTasser oberflächenbezogene Epitope aus weniger charakterisierten Proteinen gewählt werden können. Jedoch sind hierfür weitere Experimente mit weiteren Proteinen bzw. Mikroorganismen notwendig, um diese Aussage zu bekräftigen.

Von großem Nutzen wäre eine Erweiterung des *Workflows* um die Integration von Transkriptom- und Proteom-Datensätze zu den bisherigen Genomdaten. Aus den Genomdaten lassen sich keine Daten bezüglich der Häufigkeit der gewählten Proteine beziehen. Die zusätzlichen Datensätze könnten diese Lücke schließen und die Identifizierung von spezifischen Strukturen ermöglichen, die gleichzeitig ausreichend häufig auf der Zelloberfläche von Bakterienzellen vorkommen (Peter D. Karp et al., 2019; Listek et al., 2020).

Literaturverzeichnis

Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W., Wootton, J.C., 1994. Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet* 6, 119–129. <https://doi.org/10.1038/ng0294-119>

Amaro, F., Gilbert, J.A., Owens, S., Trimble, W., Shuman, H.A., 2012. Whole-Genome Sequence of the Human Pathogen *Legionella pneumophila* Serogroup 12 Strain 570-CO-H. *J Bacteriol* 194, 1613–1614. <https://doi.org/10.1128/JB.06626-11>

Armstrong, G.L., Hollingsworth, J., Morris, J.G., 1996. Emerging Foodborne Pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a Model of Entry of a New Pathogen into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiologic Reviews* 18, 29–51. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017914>

Baker, M., 2015. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* 521, 274–276. <https://doi.org/10.1038/521274a>

Baron, S. (Ed.), 1996. *Medical Microbiology*, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).

Bharadwaj, M., Bengtson, M., Golverdingen, M., Waling, L., Dekker, C., 2021. Diagnosing point-of-care diagnostics for neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 15, e0009405. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009405>

Bidmos, F.A., Siris, S., Gladstone, C.A., Langford, P.R., 2018. Bacterial Vaccine Antigen Discovery in the Reverse Vaccinology 2.0 Era: Progress and Challenges. *Front. Immunol.* 9, 2315. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02315>

Birtles, R.J., Harrison, T.G., Samuel, D., Taylor, A.G., 1990. Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection. *Journal of Clinical Pathology* 43, 685–690. <https://doi.org/10.1136/jcp.43.8.685>

Bradbury, A., Plückthun, A., 2015. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature* 518, 27–29. <https://doi.org/10.1038/518027a>

Cabral, J.P.S., 2010. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *IJERPH* 7, 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>

- Carter, P.J., 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6, 343–357. <https://doi.org/10.1038/nri1837>
- Castillo, F.J., Mullen, L.J., Grant, B.C., DeLeon, J., Thrift, J.C., Chang, L.W., Irving, J.M., Burke, D.J., 1994. Hybridoma stability. *Dev Biol Stand* 83, 55–64.
- Chen, I.-M.A., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Huntemann, M., Varghese, N., White, J.R., Seshadri, R., Smirnova, T., Kirton, E., Jungbluth, S.P., Woyke, T., Eloë-Fadrosh, E.A., Ivanova, N.N., Kyrpides, N.C., 2019. IMG/M v.5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Research* 47, D666–D677. <https://doi.org/10.1093/nar/gky901>
- Chen, Yingying, Yang, Z., Dong, Y., Chen, Yu, 2020. Recombinant PAL/PilE/FlaA DNA vaccine provides protective immunity against *Legionella pneumophila* in BALB/c mice. *BMC Biotechnol* 20, 28. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00620-3>
- Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M., Asamani, G., Hill, K., Nuara, J., Feder, M., Rineer, J., Greenberg, J.J., Steshenko, V., Park, S.H., Zhao, B., Teplitskaya, E., Edwards, J.R., Pampou, S., Georghiou, A., Chou, I.-C., Iannuccilli, W., Ulz, M.E., Kim, D.H., Geringer-Sameth, A., Goldsberry, C., Morozov, P., Fischer, S.G., Segal, G., Qu, X., Rzhetsky, A., Zhang, P., Cayanis, E., De Jong, P.J., Ju, J., Kalachikov, S., Shuman, H.A., Russo, J.J., 2004. The Genomic Sequence of the Accidental Pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 305, 1966–1968. <https://doi.org/10.1126/science.1099776>
- Cotton, R.G.H., Milstein, C., 1973. Fusion of Two Immunoglobulin-producing Myeloma Cells. *Nature* 244, 42–43. <https://doi.org/10.1038/244042a0>
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., Rosenbusch, J.P., 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358, 727–733. <https://doi.org/10.1038/358727a0>
- de Marco, A., 2013. Recombinant polypeptide production in *E. coli*: towards a rational approach to improve the yields of functional proteins. *Microb Cell Fact* 12, 101. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-101>
- DebRoy, S., Aragon, V., Kurtz, S., Cianciotto, N.P., 2006. *Legionella pneumophila* Mip, a Surface-Exposed Peptidylproline *cis-trans* -Isomerase, Promotes the Presence of Phospholipase C-Like

Activity in Culture Supernatants. *Infect Immun* 74, 5152–5160. <https://doi.org/10.1128/IAI.00484-06>

Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S., Boger, J., 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55, 836–839. <https://doi.org/10.1128/jvi.55.3.836-839.1985>

Fajardo, D.A., Cheung, J., Ito, C., Sugawara, E., Nikaido, H., Misra, R., 1998. Biochemistry and Regulation of a Novel *Escherichia coli* K-12 Porin Protein, OmpG, Which Produces Unusually Large Channels. *J Bacteriol* 180, 4452–4459. <https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4452-4459.1998>

Freudenmann, M., Kurz, S., von Baum, H., Reick, D., Schreff, A.M., Essig, A., Lück, C., Gonser, T., Brockmann, S.O., Härter, G., Eberhardt, B., Embacher, A., Höller, C., 2011. Interdisziplinäres Management eines länderübergreifenden Legionellenausbruchs. *Bundesgesundheitsbl.* 54, 1161–1169. <https://doi.org/10.1007/s00103-011-1362-6>

Galanis, K.A., Nastou, K.C., Papandreou, N.C., Petichakis, G.N., Pigis, D.G., Iconomidou, V.A., 2021. Linear B-Cell Epitope Prediction for In Silico Vaccine Design: A Performance Review of Methods Available via Command-Line Interface. *IJMS* 22, 3210. <https://doi.org/10.3390/ijms22063210>

Gedvilaite, A., Frömmel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Özel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., Ulrich, R., 2000. Formation of Immunogenic Virus-like Particles by Inserting Epitopes into Surface-Exposed Regions of Hamster Polyomavirus Major Capsid Protein. *Virology* 273, 21–35. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0392>

Göthel, M., Listek, M., Messerschmidt, K., Schlör, A., Hönow, A., Hanack, K., 2021. A New Workflow to Generate Monoclonal Antibodies against Microorganisms. *Applied Sciences* 11, 9359. <https://doi.org/10.3390/app11209359>

Holzlohner, P., Hanack, K., 2017. Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *JoVE* 54832. <https://doi.org/10.3791/54832>

Ingram, R.J., Chu, K.K., Metan, G., Maillere, B., Doganay, M., Ozkul, Y., Dyson, H., Williamson, E.D., Baillie, L., Kim, L.U., Ascough, S., Sriskandan, S., Altmann, D.M., 2010. An Epitope of *Bacillus anthracis* Protective Antigen That Is Cryptic in Rabbits May Be Immunodominant in

- Humans. *Infect Immun* 78, 2353–2354. <https://doi.org/10.1128/IAI.00072-10>
- Itoh, S., Kariya, M., Nagano, K., Yokoyama, S., Fukao, T., Yamazaki, Y., Mori, H., 2002. New Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies against Bacterial Surface Antigens Using Filtration Plates. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25, 986–990. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.986>
- Jandrig, B., Krause, H., Zimmermann, W., Vasiliunaite, E., Gedvilaite, A., Ulrich, R., 2021. Hamster Polyomavirus Research: Past, Present, and Future. *Viruses* 13, 907. <https://doi.org/zv>
- Kardani, K., Bolhassani, A., Namvar, A., 2020. An overview of *in silico* vaccine design against different pathogens and cancer. *Expert Review of Vaccines* 19, 699–726. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1794832>
- Karp, Peter D, Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C.A., Latendresse, M., Kothari, A., Keseler, I.M., Krummenacker, M., Midford, P.E., Ong, Q., Ong, W.K., Paley, S.M., Subhraveti, P., 2019. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in Bioinformatics* 20, 1085–1093. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085>
- Karp, Peter D., Ivanova, N., Krummenacker, M., Kyrpides, N., Latendresse, M., Midford, P., Ong, W.K., Paley, S., Seshadri, R., 2019. A Comparison of Microbial Genome Web Portals. *Front. Microbiol.* 10, 208. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00208>
- Kennedy, D., Wilkinson, M.G., 2017. Application of Flow Cytometry to the Detection of Pathogenic Bacteria. *Current Issues in Molecular Biology* 21–38. <https://doi.org/10.21775/cimb.023.021>
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 276, 172–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-Q)
- Kumar, S., Nehra, M., Mehta, J., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Kaushik, A., 2019. Point-of-Care Strategies for Detection of Waterborne Pathogens 17.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of

- Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, L.H., Hui, S.W., 1994. Characterization of PEG-mediated electrofusion of human erythrocytes. *Biophys J* 67, 2361–2366. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80722-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80722-2)
- Lim, J.Y., Yoon, J., Hovde, C.J., 2010. A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 5–14. <https://doi.org/10.4014/jmb.0908.08007>
- Listek, M., Hönow, A., Gossen, M., Hanack, K., 2020. A novel selection strategy for antibody producing hybridoma cells based on a new transgenic fusion cell line. *Sci Rep* 10, 1664. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58571-w>
- Lua, L.H.L., Connors, N.K., Sainsbury, F., Chuan, Y.P., Wibowo, N., Middelberg, A.P.J., 2014. Bioengineering virus-like particles as vaccines: Virus-Like Particles as Vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 425–440. <https://doi.org/10.1002/bit.25159>
- Lütkecosmann, S., Warsinke, A., Tschöpe, W., Eichler, R., Hanack, K., 2017. A novel monoclonal antibody suitable for the detection of leukotriene B4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482, 1054–1059. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.157>
- Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C.D., Massignani, V., Mora, M., Scarselli, M., Tettelin, H., Brettoni, C., Iacobini, E.T., Rosini, R., D'Agostino, N., Miorin, L., Buccato, S., Mariani, M., Galli, G., Nogarotto, R., Nardi-Dei, V., Vegni, F., Fraser, C., Mancuso, G., Teti, G., Madoff, L.C., Paoletti, L.C., Rappuoli, R., Kasper, D.L., Telford, J.L., Grandi, G., 2005. Identification of a Universal Group B *Streptococcus* Vaccine by Multiple Genome Screen. *Science* 309, 148–150. <https://doi.org/10.1126/science.1109869>
- McMurry, J., Sbai, H., Gennaro, M.L., Carter, E.J., Martin, W., De Groot, A.S., 2005. Analyzing Mycobacterium tuberculosis proteomes for candidate vaccine epitopes. *Tuberculosis* 85, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2004.09.005>
- Mehla, K., Ramana, J., 2016. Identification of epitope-based peptide vaccine candidates against enterotoxigenic Escherichia coli: a comparative genomics and immunoinformatics approach. *Mol. BioSyst.* 12, 890–901. <https://doi.org/10.1039/C5MB00745C>
- Mercante, J.W., Winchell, J.M., 2015. Current and Emerging Legionella Diagnostics for

Laboratory and Outbreak Investigations. *Clin Microbiol Rev* 28, 95–133.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00029-14>

Mertens, P., Walgraffe, D., Laurent, T., Deschrevel, N., Letesson, J.-J., de Bolle, X., 2001. Selection of Phage-displayed Peptides Recognised by Monoclonal Antibodies Directed against the Lipopolysaccharide of *Brucella*. *International Reviews of Immunology* 20, 181–199.
<https://doi.org/10.3109/08830180109043033>

Messerschmidt, K., Hempel, S., Holzlöhner, P., Ulrich, R.G., Wagner, D., Heilmann, K., 2012. IgA antibody production by intrarectal immunization of mice using recombinant major capsid protein of hamster polyomavirus. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2, 231–238. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.2.2012.3.9>

Michalik, M., Djahanshiri, B., Leo, J.C., Linke, D., 2016. Reverse Vaccinology: The Pathway from Genomes and Epitope Predictions to Tailored Recombinant Vaccines, in: Thomas, S. (Ed.), *Vaccine Design, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 87–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_4

Moor, K., Fadlallah, J., Toska, A., Sterlin, D., Balmer, M.L., Macpherson, A.J., Gorochov, G., Larsen, M., Slack, E., 2016. Analysis of bacterial-surface-specific antibodies in body fluids using bacterial flow cytometry. *Nat Protoc* 11, 1531–1553. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.091>

Murphy, K., Weaver, C., 2018. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

National Research Council (US) Subcommittee on Microbiological Criteria., 1985. *An Evaluation of the Role of Microbiological Criteria for Foods and Food Ingredients*. National Academies Press (US), Washington (DC). <https://doi.org/10.17226/372>

Navarro, A., Hernández-Chiñas, U., Licona-Moreno, D., Zenteno, E., Cravioto, A., Eslava-Campos, C.A., 2016. Immunogenic peptide mimotopes from an epitope of *Escherichia coli* O157 LPS. *Biochemical Journal* 473, 3791–3804. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160687>

Navarro, A., Licona-Moreno, D., Monsalvo-Reyes, A., Hernández-Chiñas, U., Eslava-Campos, C.A., 2020. Phage Display Detection of Mimotopes that Are Shared Epitopes of Clinically and Epidemiologically Relevant Enterobacteria. *Microorganisms* 8, 780.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050780>

- Olsen, S.J., 2002. A Waterborne Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections and Hemolytic Uremic Syndrome: Implications for Rural Water Systems. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 370–375. <https://doi.org/10.3201/eid0804.000218>
- Parola, C., Neumeier, D., Reddy, S.T., 2018. Integrating high-throughput screening and sequencing for monoclonal antibody discovery and engineering. *Immunology* 153, 31–41. <https://doi.org/10.1111/imm.12838>
- Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529–533. <https://doi.org/10.1038/35054089>
- Pleckaityte, M., Bremer, C.M., Gedvilaite, A., Kucinskaite-Kodze, I., Glebe, D., Zvirbliene, A., 2015. Construction of polyomavirus-derived pseudotype virus-like particles displaying a functionally active neutralizing antibody against hepatitis B virus surface antigen. *BMC Biotechnol* 15, 85. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0203-3>
- Porath, J., 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* 3, 263–281. [https://doi.org/10.1016/1046-5928\(92\)90001-D](https://doi.org/10.1016/1046-5928(92)90001-D)
- Potocnakova, L., Bhide, M., Pulzova, L.B., 2016. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research* 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/6760830>
- Poxton, I.R., 1995. Antibodies to lipopolysaccharide. *Journal of Immunological Methods* 186, 1–15. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00123-R](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00123-R)
- Pritam, M., Singh, G., Swaroop, S., Singh, A.K., Singh, S.P., 2018. Exploitation of reverse vaccinology and immunoinformatics as promising platform for genome-wide screening of new effective vaccine candidates against 12.
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., Chapman, J., 2019. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst* 144, 396–411. <https://doi.org/10.1039/C8AN01488D>

- Rappuoli, R., 2001. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine* 19, 2688–2691. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00554-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00554-5)
- Rappuoli, R., 2000. Reverse vaccinology. *Current Opinion in Microbiology* 3, 445–450. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3)
- Rappuoli, R., Bottomley, M.J., D’Oro, U., Finco, O., De Gregorio, E., 2016. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *Journal of Experimental Medicine* 213, 469–481. <https://doi.org/10.1084/jem.20151960>
- Robert Koch-Institut, 2021. Infektionsepidemiologische Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020. Robert Koch-Institut. <https://doi.org/10.25646/8773>
- Robert Koch-Institut, 2012. Infektionsepidemiologische Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011. Robert Koch-Institut. <https://doi.org/10.25646/8773>
- Saper, C.B., 2009. A Guide to the Perplexed on the Specificity of Antibodies. *J Histochem Cytochem.* 57, 1–5. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952770>
- Saxena, T., 2015. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods 16.
- Scherneck, S., Ulrich, R., Feunteun, J., 2001. The hamster polyomavirus—a brief review of recent knowledge. *Virus Genes* 22, 93–101. <https://doi.org/10.1023/a:1008190504521>
- Schlapschy, M., Skerra, A., 2001. Purification and Analysis of Strep-Tagged Antibody-Fragments, in: Kontermann, R., Dübel, S. (Eds.), *Antibody Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 292–306. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04605-0_22
- Schrödinger, LLC, 2015. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
- Sette, A., Rappuoli, R., 2010. Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. *Immunity* 33, 530–541. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.017>
- Soria-Guerra, R.E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D.O., Rosales-Mendoza, S., 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics* 53, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
- Subbarao, G.V., van den Berg, B., 2006. Crystal Structure of the Monomeric Porin OmpG.

- Journal of Molecular Biology 360, 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.045>
- Tchesnokova, V., Aprikian, P., Kisiela, D., Gowey, S., Korotkova, N., Thomas, W., Sokurenko, E., 2011. Type 1 Fimbrial Adhesin FimH Elicits an Immune Response That Enhances Cell Adhesion of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 79, 3895–3904. <https://doi.org/10.1128/IAI.05169-11>
- Tiller, K.E., Tessier, P.M., 2015. Advances in Antibody Design. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 17, 191–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>
- Usmani, S.S., Kumar, R., Bhalla, S., Kumar, V., Raghava, G.P.S., 2018. In Silico Tools and Databases for Designing Peptide-Based Vaccine and Drugs, in: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Elsevier, pp. 221–263. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.01.006>
- Van Nevel, S., Koetzsch, S., Proctor, C.R., Besmer, M.D., Prest, E.I., Vrouwenvelder, J.S., Knezev, A., Boon, N., Hammes, F., 2017. Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research* 113, 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.065>
- Vita, R., Mahajan, S., Overton, J.A., Dhanda, S.K., Martini, S., Cantrell, J.R., Wheeler, D.K., Sette, A., Peters, B., 2019. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Research* 47, D339–D343. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1006>
- von Rheinbaben, F., Schwarzkopf, A., 2012. EHEC - Nachlese zur Epidemie des Jahres 2011. *Dialyse aktuell* 16, 281–288. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1321521>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J., Brinkman, F.S.L., 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26, 1608–1615. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249>
- Zvirbliene, A., Samonskyte, L., Gedvilaite, A., Voronkova, T., Ulrich, R., Sasnauskas, K., 2006. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *Journal of Immunological Methods* 311, 57–70.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.01.007>

Anhang

Tabelle S1: Übersicht für die identifizierten Oberflächenproteine von *E. coli* O157:H7

	SeqID	Protein	Localisation
1	Z0152	yadN putative fimbrial protein	Extracellular
2	Z0375	eaeH putative adhesin	Outer Membrane
3	Z0608	putative outer membrane export protein	Outer Membrane
4	Z0639	hypothetical protein	Extracellular
5	Z0698	nfrA bacteriophage N4 receptor, outer membrane protein	Outer Membrane
6	Z0872	ybgD putative fimbriae structural protein	Extracellular
7	Z0980	putative tail component of prophage CP-933K	Extracellular
8	Z0981	lomK putative outer membrane protein of prophage CP-933K	Outer Membrane
9	Z1026	fiu putative outer membrane receptor for iron transport	Outer Membrane
10	Z1149	hypothetical protein	Extracellular
11	Z1151	hypothetical protein	Outer Membrane
12	Z1178	putative receptor	Outer Membrane
13	Z1211	putative adhesin	Outer Membrane
14	Z1380	putative tail component encoded by cryptic prophage CP-933M; partial putative outer membrane protein Lom precursor encoded by cryptic prophage	Extracellular
15	Z1381	CP-933M	Outer Membrane
16	Z1385	putative secreted protein encoded by cryptic prophage CP-933M lomW putative outer membrane protein Lom precursor of bacteriophage BP-	Extracellular
17	Z1489	933W	Outer Membrane
18	Z1516	hypothetical protein	Extracellular
19	Z1588	hypothetical protein	Extracellular
20	Z1590	hypothetical protein	Outer Membrane
21	Z1617	putative receptor	Outer Membrane
22	Z1651	putative adhesin	Outer Membrane
23	Z1916	putative tail protein (partial) of prophage CP-933X	Extracellular
24	Z1917	putative outer membrane protein of prophage CP-933X	Outer Membrane
25	Z1972	partial putative adhesion protein	Extracellular
26	Z2066	unknown protein encoded by prophage CP-933O	Extracellular
27	Z2109	hypothetical phage protein similar to YjhS encoded within prophage CP-933O	Extracellular
28	Z2140	putative tail component of prophage CP-933O	Extracellular
29	Z2145	putative tail component of prophage CP-933O	Extracellular
30	Z2146	putative outer membrane protein Lom precursor of prophage CP-933O	Outer Membrane
31	Z2195	ydeK autotransporter family porin	Outer Membrane
	Z2196	ydeU putative ATP-binding component of a transport system and adhesin	Outer Membrane

Anhang

32		protein	
33	Z2213	yddB hypothetical protein	Outer Membrane
34	Z2323	putative surface-exposed virulence protein	Extracellular
35		partial putative outer membrane protein Lom precursor encoded by prophage	
	Z2342	CP-933R	Outer Membrane
		partial putative outer membrane protein Lom precursor encoded by prophage	
36	Z2343	CP-933R	Outer Membrane
37	Z2462	ompG outer membrane protein	Outer Membrane
38	Z2475	mycJM Glycosidase	Extracellular
39	Z6028	lomP putative Lom-like outer membrane protein of cryptic prophage CP-933P	Outer Membrane
40	Z6029	putative tail component of cryptic prophage CP-933P	Extracellular
41	Z2619	uidC putative glucuronide porin	Outer Membrane
42	Z3023	putative secreted protein	Extracellular
43	Z3026	putative secreted protein	Extracellular
44	Z3072	unknown protein encoded within prophage CP-933U	Extracellular
45	Z3075	lomU putative outer membrane protein of prophage CP-933U	Outer Membrane
46	Z3159	putative outer membrane receptor for iron compound or colicin	Outer Membrane
47	Z3310	putative Lom-like outer membrane protein of prophage CP-933V	Outer Membrane
48	Z3311	putative tail fiber protein of prophage CP-933V	Extracellular
49	Z3449	yejO putative ATP-binding component of a transport system	Extracellular
50	Z3487	yfaL putative ATP-binding component of a transport system	Outer Membrane
51	Z3920	hypothetical protein	Extracellular
52	Z3955	putative enzyme	Extracellular
53	Z5918	FimH protein	Extracellular