

**Eliminierung IgE-positiver B Lymphozyten
mit Hilfe eines rekombinanten
bispesifischen anti-IgE/anti-CD3 Antikörpers**



Ludwig-Maximilians-Universität

München 2010

**Aus dem Institut für Immunologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
ehem. Vorstand: Professor Dr. med. Dr. h. c. Gert Riethmüller
Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Thomas Brocker**

Eliminierung IgE-positiver B Lymphozyten mit Hilfe eines rekombinanten bispezifischen anti-IgE/anti-CD3 Antikörpers

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Oktay Kirak**

**geboren in
Hanau**

2010

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gert Riethmüller

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Wollenberg
Priv. Doz. Dr. med. Bianca Schaub**

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Peter Kufer**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2010

DANKSAGUNG

Meinem Chef, Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Gert Riethmüller, für die langjährige intensive Förderung meines wissenschaftlichen Werdegangs, die Überlassung dieses höchst interessanten Projektes und die ermutigenden Worte.

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Peter Kufer, für seine außerordentliche Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die aufbauenden Worte.

Eugen Kropp, Andreas Wolf, Patrick Hoffmann und Ralf Lutterbüse für ihre hervorragende Zusammenarbeit.

Evelyn Schaller und Monika Meyer für die ausgezeichnete Assistenz bei der Durchführung von Experimenten.

Monika Bertram und Bernhard Polzer für die Korrektur und die anregenden Diskussionen während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Meiner Familie für die moralische Unterstützung und die aufbauenden Worte während der ganzen Zeit.

Meinen Freunden, die mich über all die vielen Jahre begleitet, unterstützt und ermuntert haben

DANKE

Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, flossen auch in folgende Publikation mit ein:

Elimination of IgE-positive B cells via a novel non-anaphylactogenic anti-IgE/anti-CD3 antibody

Kirak O., et al., (Manuskript in Vorbereitung)

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 10 |
| 1.1 | IgE-vermittelte allergische Krankheiten | 12 |
| 1.2 | Das Asthma bronchiale | 15 |
| 1.3 | Die Standardtherapie des allergischen Asthma bronchiale | 19 |
| 1.4 | Die Rolle IgE-positiver B-Lymphozyten | 22 |
| 1.5 | Bispezifische Antikörper | 25 |
| 1.6 | Zielsetzung der Arbeit | 29 |
| 2 | MATERIAL | 30 |
| 2.1 | Chemikalien | 30 |
| 2.2 | Puffer und sonstige Lösungen | 31 |
| 2.3 | Antikörper | 33 |
| 2.4 | Enzyme | 33 |
| 2.5 | Kommerzielle Kits | 33 |
| 2.6 | Plasmide und Oligonukleotide | 34 |
| 2.7 | Zellen, -Medien und Zellzusätze | 35 |
| 2.8 | Bakterien, -Medien und Bakterien-Zusätze | 37 |
| 3 | METHODEN | 38 |
| 3.1 | Zellbiologische Methoden | 38 |
| 3.1.1 | Präparation kompetenter Escherichia coli XL I Blue | 38 |
| 3.1.2 | Expression von humanem membranständigem IgE auf Mauszellen | 39 |
| 3.1.3 | Produktion des IgExCD3 Antikörpers durch CHO-Zellen | 40 |
| 3.1.4 | Subkultivierung und Kryo-Konservierung von Kulturzellen | 41 |
| 3.1.5 | Nachweis der Bindung des bispezifischen Antikörpers auf Zellen | 42 |
| 3.1.6 | Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut | 43 |
| 3.1.7 | Nachweis der Aktivierung von T-Lymphozyten mittels Expression von Oberflächenmarkern | 44 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.8 | Nachweis der Aktivierung von PBMC mittels Freisetzung von Zytokinen | 45 |
| 3.1.9 | Nachweis der Zytotoxizität mit Hilfe des ⁵¹ Chrom Tests | 45 |
| 3.1.10 | Nachweis der Degranulation von Mastzellen | 46 |
| 3.2 | Molekularbiologische Methoden | 48 |
| 3.2.1 | DNA-Techniken | 48 |
| 3.2.1.1 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)..... | 48 |
| 3.2.1.2 | Agarose-Gel-Elektrophorese..... | 49 |
| 3.2.1.3 | Isolation von DNA aus Agarose-Gelen | 50 |
| 3.2.1.4 | Amplifikation von Plasmid-DNA durch Transformation kompetenter Escherichia coli | 50 |
| 3.2.1.5 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien | 51 |
| 3.2.1.6 | Enzymatischer Verdau von dsDNA und cDNA-Fragmenten..... | 52 |
| 3.2.1.7 | Ligation | 52 |
| 3.2.1.8 | Sequenzierung mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger | 53 |
| 3.2.1.9 | Klonierung der variablen Regionen des anti-IgE Antikörpers | 53 |
| 3.2.1.10 | Konstruktion des bispezifischen single-chain Antikörpers..... | 54 |
| 3.2.1.11 | Klonierung der humanem Membran-ständigen schweren Epsilon-Kette | 54 |
| 3.2.2 | RNA-Techniken | 56 |
| 3.2.2.1 | Isolierung der Gesamt-RNA | 56 |
| 3.2.2.2 | Reverse Transkription | 56 |
| 3.2.3 | Protein-Techniken | 57 |
| 3.2.3.1 | Aufreinigung rekombinanter Antikörper | 57 |
| 3.2.3.2 | Analyse des IgExCD3 Antikörpers im SDS-Polyacrylamidgel | 58 |
| 3.2.3.3 | Analyse von Proteinen mittels ELISA..... | 59 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 60 |
| 4.1 | Klonierung der variablen Domänen des anti-IgE Antikörpers | 60 |
| 4.2 | Konstruktion des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers..... | 62 |
| 4.3 | Produktion des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 durch CHO-Zellen | 64 |
| 4.4 | Aufreinigung des bispezifischen single-chain Antikörpers | 66 |
| 4.5 | Analyse von Größe und Reinheit des bispezifischen Antikörpers | 68 |
| 4.6 | Klonierung des humanen membranständigen Immunglobulin E..... | 69 |
| 4.7 | Expression von humanem IgE auf J558L-Mauszellen | 70 |
| 4.8 | Nachweis der spezifischen Bindungseigenschaften beider Fv-Domänen | 72 |
| 4.9 | Zytotoxizität von CD8-positiven T-Lymphozyten und PBMC..... | 73 |

| | | |
|------|--|------------|
| 4.10 | Einfluss von löslichem IgE auf die zytotoxische Aktivität | 76 |
| 4.11 | Aktivierung von humanen T-Zellen..... | 78 |
| 4.12 | Beladung des FcEpsilon-Rezeptor I mit löslichem IgE..... | 82 |
| 4.13 | Analyse der zytotoxischen Aktivität gegenüber Mastzellen | 84 |
| 4.14 | Analyse der Mastzell-Degranulation in Gegenwart des IgExCD3 Antikörpers..... | 85 |
| 4.15 | Beladung des FcEpsilon-Rezeptor II mit löslichem IgE..... | 86 |
| 4.16 | Analyse der zytotoxischen Aktivität gegenüber CD23-positiven Zellen | 89 |
| 5 | DISKUSSION | 91 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 102 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 105 |
| 8 | LEBENS LAUF | 110 |

1 EINLEITUNG

Prausnitz und Küstner hatten bereits 1921 die Vermutung geäußert, dass es im Blut von allergischen Patienten einen Faktor geben muss, der sowohl für die Symptome als auch für die „Übertragbarkeit“ der Allergie verantwortlich ist [1]. Sie bezeichneten diesen Faktor als „Reagin“. Aufgrund der niedrigen Konzentration, in der dieser Faktor im Blut vorkommt, konnte er erst 1966 durch Ishizaka als Immunglobulin E identifiziert werden [2]. Da IgE-vermittelte Krankheiten häufig vorkommen, und IgE bei atopischen Krankheiten eine zentrale Rolle spielt, weiß man mehr über seine Fehlfunktion als über seine physiologische Aufgabe im menschlichen Immunsystem. Versucht man alle Krankheiten, in denen IgE eine Rolle spielt, zusammenzufassen, so fällt auf, dass es sich um eine heterogene Gruppe von Krankheiten aus den unterschiedlichsten Gebieten der Medizin handelt. Im Einzelnen handelt es sich dabei um Erkrankungen aus den Bereichen:

- Immundefekte (Hyper-IgE-Syndrom)
- Onkologie (monoklonales IgE-Myelom) und
- Allergie (zum Beispiel: allergische Asthma bronchiale)

Das Hyper-IgE-Syndroms ist eine sehr seltene Erkrankung [3-5]. Bis heute sind daran weltweit weniger als 300 Menschen erkrankt. Die Patienten fallen durch rezidivierende Abszesse der Haut, hauptsächlich hervorgerufen durch den Erreger *Staphylokokkus aureus*, auf. Daneben kommen Infekte der Lunge, überwiegend bedingt durch *Streptokokkus pneumoniae*, und chronische Entzündungen der Haut (Dermatitis) vor. Im Serum der Erkrankten findet man immer erhöhte Spiegel des Immunglobulin E und sehr oft eine erhöhte Anzahl von eosinophilen Granulozyten (Eosinophilie). Des Weiteren sind in einigen Fällen eine verminderte Anzahl von T-Gedächtniszellen und eine verminderte chemotaktische Aktivität von neutrophilen Granulozyten beschrieben. Phänotypisch fallen einige dieser Erkrankten durch Veränderungen im Kopf- und Gesichtsbereich, verschiedene Skelettanomalitäten und Zahndefekte auf. Diagnostisch steht der erwähnte erhöhte IgE-Spiegel im Serum im Vordergrund. In den meisten Fällen wurden Werte zwischen 0,240 und 2,4 µg/ml bestimmt (Referenzbereich für Erwachsene: 0,012–0,240 µg/ml). In Einzelfällen wurden Konzentrationen von 720 µg/ml gemessen. Der zugrundeliegende Defekt konnte bis dato noch nicht charakterisiert werden, so dass man auch über die Mechanismen, die zu dieser Erkrankung führen, nicht viel sagen kann. Die Therapie des Hyper-IgE-Syndroms richtet sich hauptsächlich nach den Symptomen. Die Abszesse werden durch chirurgische Interventionen behandelt. Die Infektionen in den unterschiedlichen Organen therapiert man, je nach Empfindlichkeit des Erregers, mit entsprechenden Antibiotika.

Bei dem IgE-Myelom handelt es sich um ein hämatologisch-onkologisches Krankheitsbild, bei dem es zu einer malignen Transformation und einer damit einhergehenden klonalen Expansion einer IgE-positiven B-Zelle kommt [6]. Die Prävalenz des IgE-Myeloms unter den Multiplen Myelomen beträgt 0,1%. Das monoklonale IgE-Myelom ist noch seltener anzutreffen als das oben beschriebene Hyper-IgE-Syndrom. Bisher sind weltweit weniger als 50 Menschen bekannt, die an solch einem Myelom erkrankten. Der erste Fall wurde 1967 von Johansson und Bennich

beschrieben [7]. Die Patienten leiden meistens unter sehr uncharakteristischen Beschwerden wie Knochenschmerzen, Gewichtsverlust und Müdigkeit. Ferner treten gehäuft rezidivierende Infekte auf. Pathognomonisch für Myelom-Krankheiten ist eine monoklonale Vermehrung der betreffenden Antikörperklasse in der Serum-Protein-Elektrophorese, siehe Abbildung 1. Der höchste bekannte IgE-Spiegel im Serum eines Patienten mit einem IgE-Myelom wird in der Literatur mit 25,6 mg/ml angegeben [8]. Allerdings kommen auch geringere Konzentrationen vor, so dass man dieses Phänomen nicht immer sehen kann.

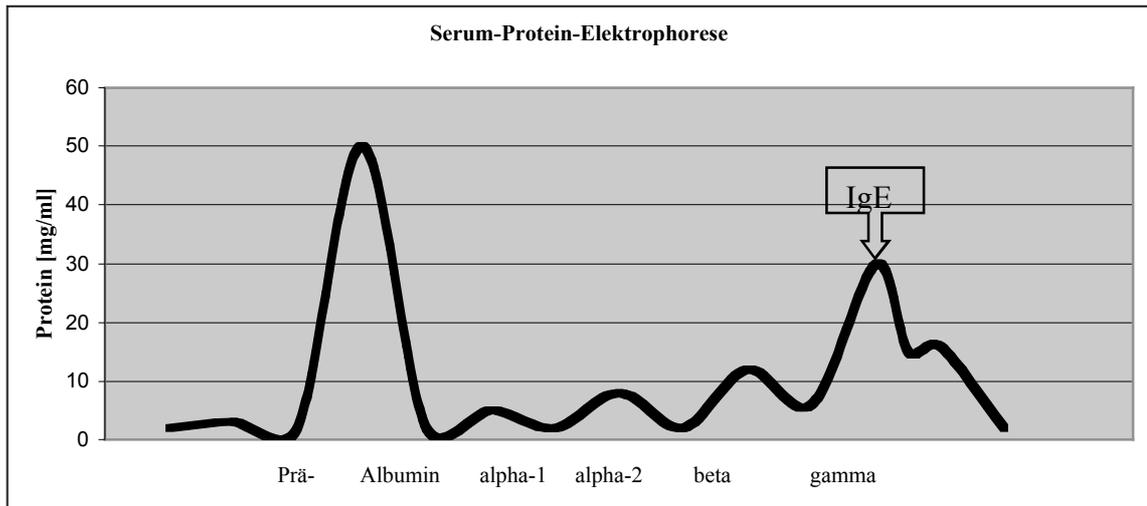


Abbildung 1 M-Gradient in der Serum-Protein-Elektrophorese eines IgE-Myeloms. Diese Grafik entspricht NICHT einem tatsächlichen Befund. Der pathognomonische Antikörper-Peak in der Serum-Protein-Elektrophorese ist aufgrund der Nachweisgrenze dieses Verfahrens selbst bei einem IgE-Myelom nicht immer zu sehen. Die Position des Peaks entspricht dem Laufverhalten von IgE in der Elektrophorese.

Bei den IgE-Myelomen und den anderen Multiplen Myelomen, sind oft osteolytische Prozesse anzutreffen [9]. Dadurch findet sich oft ein erhöhter Kalzium-Spiegel im Serum der Patienten. Die Ablagerung von Immunglobulin E in den Gefäßwänden führt häufig zu einer so genannten Amyloidose. In der Niere kommt es dadurch häufig zu Funktionseinschränkungen. Hinzu kommt in der Hälfte aller Fälle eine Anämie, die vermutlich durch die Niereninsuffizienz bedingt und meistens mit Erythropoetin behandelbar ist. Die Therapie hängt von dem zugrundeliegenden Stadium ab. Generell kommen Chemotherapeutika, Bestrahlung und Cortison zur Elimination beziehungsweise Reduktion der Tumorlast und Bisphosphonate zur Therapie und Linderung der Knochenläsionen zur Anwendung [10]. Außerdem nutzt man – sofern möglich und indiziert - eine autologe Stammzelltransplantation zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems. Die mediane Lebenserwartung von IgE-Myelom Patienten ohne Niereninsuffizienz liegt bei 19 Monaten. Im fortgeschrittenen Stadium beträgt sie, meist bedingt durch die Niereninsuffizienz, 1-13 Monate.

Tabelle 1 Übersicht über die Stadien-Einteilung der Multiplen Myelome nach Durie und Salmon (1975).

| Stadium | Hb (g/dl) | Serum-Kalzium | Osteolyse-Herde | Serum-Paraprotein (g/dl) | Bence-Jones-Protein im Urin | Überleben in Monaten |
|---------|------------------|---------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|
| I* | > 10 | normal | 0-1 | IgG < 5 IgA < 3 | < 4 g/d | > 60 |
| II | weder I noch III | | | | | 41 |
| III** | < 8,5 | > 12 mg/dl | mutipel | IgG > 7 IgA > 5 | > 12 g/d | 23 |

*alle Kriterien müssen erfüllt sein; **mindestens 1 Kriterium muss erfüllt sein wenn Kreatinin > 2 mg/100ml, wird die Bezeichnung "B" zugefügt

Die Häufigkeit, mit der allergische IgE-vermittelte Krankheiten auftreten, und damit ihre gesundheitsökonomische Bedeutung ist mit der des Hyper-IgE-Syndroms und des IgE-Myeloms nicht zu vergleichen. Allergien stellen eine Volkskrankheit dar, von der nahezu jeder fünfte Mensch in irgendeiner Form betroffen ist. Auf diese IgE-vermittelten Krankheiten wird daher im folgenden Abschnitt im Detail eingegangen.

1.1 IgE-vermittelte allergische Krankheiten

Bereits 1906 wurde der Begriff „Allergie“ von dem Wiener Kinderarzt von Pirquet eingeführt [11]. Seine Definition bezog sich auf die Beobachtung, dass Tiere und Menschen nach mehrfacher Injektion eines Antigens mit einer Änderung der Reaktionsweise im Sinne einer spezifischen, aber pathologischen Überempfindlichkeit reagierten. Daher leitet sich auch die Bezeichnung von den griechischen Wörtern „allos ergon“ ab, was soviel bedeutet wie „andere Tätigkeit“. 1923 formulierten Coca und Cooke den Begriff „Atopie“ [12]. Sie stützten ihre Definition der „Atopie“ auf die Vermutung, dass es sich bei der „Anaphylaxie“ beziehungsweise der „Allergie“ und der „Atopie“ um unterschiedliche Krankheitsbilder mit entsprechend unterschiedlichen Ursachen handelt. Sie fassten folgende Punkte als Charakteristikum der „Atopie“ zusammen:

- vererbt
- nur einen Teil der Menschen betreffend
- im Unterschied zur „Anaphylaxie“, kein Schutz möglich
- qualitativ unphysiologische Immunreaktion
- klinisch durch Heuschnupfen und Asthma bronchiale auffällig und
- assoziiert mit einer Sofortreaktion, die sich in Form von Quaddeln und Rötung zeigt.

Diese Definitionen und Auffassungen wurden aber im Laufe der Zeit revidiert. Mit der Entdeckung des Immunglobulin E und einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge erkannte man, dass die Hypothesen von Coca und Cooke mit einigen grundlegenden Fehlern

behaftet war [2, 7]. Außerdem entdeckte man viele Gemeinsamkeiten zwischen Anaphylaxie, Allergie und Asthma. In einem Versuch, die Vielfalt dieser Überempfindlichkeitsreaktionen nach immunologischen Kriterien zu klassifizieren, haben P. Gell und R. Coombs 1968 vier verschiedene pathogene Mechanismen vorgeschlagen (siehe Tabelle 2) [13]. Obwohl man heute weiß, dass diese Einteilung den komplexen Vorgängen nur bedingt Rechnung trägt, und die einzelnen Typen auch durch wechselseitige Beziehungen ineinander übergehen, hat sich diese Einteilung vor allem aus didaktischen Gründen bewährt.

Tabelle 2 Einteilung der Überempfindlichkeitsreaktionen nach Coombs und Gell (1968).

| | Typ I | Typ II | Typ III | Typ IV | | |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------------|
| Immun-komponente | IgE | IgG | IgG | TH1 | TH2 | CTL |
| Antigene | lösliche Antigene | Zell- oder matrix-assoziierte Antigene | lösliche Antigene | lösliche Antigene | lösliche Antigene | zell-assoziierte Antigene |
| Effektor-mechanismus | Mastzell-aktivierung | Fc-Rezeptor+ Zellen (z.B. Monozyten) | Fc-Rezeptor+ Zellen und Komplement-system | Makrophagen-aktivierung | Aktivierung eosinophiler Granulozyten | Zytotoxizität |
| Beispiele | Asthma bronchiale, allergische Rhinitis | manche Medikamenten-allergien (z.B. Penicillin) | Serum-krankheit, Arthus-reaktion | Kontakt-dermatitis, Tuberkulin-reaktion | chron. Asthma bronchiale, chron. allerg. Rhinitis | Kontakt-dermatitis |

Die Begriffe werden aber heutzutage immer noch teilweise kontrovers verwendet, weswegen hier die Definitionen einiger Begriffe kurz wiedergegeben werden sollen. Unter dem Begriff Atopie versteht man die genetische Prädisposition, auf körperfremde Antigene, die an sich harmlos sind, mit einer überschießenden IgE-vermittelten Immunreaktion zu antworten. Zu diesem atopischen Formenkreis zählen unter anderem folgende Krankheiten:

- die allergische Rhinito-/Konjunktivitis (Heuschnupfen)
- die allergische Enteritis (Nahrungsmittelallergie)
- das Asthma bronchiale und
- die atopische Dermatitis (Neurodermitis).

Jede dieser Krankheiten kann alleine oder in Kombination auftreten. Die WHO schätzt die Prävalenz IgE-vermittelter Krankheiten auf 20%. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der atopischen Krankheiten [14-16]. Aufgrund der enormen Anzahl an Patienten, dem chronischen Verlauf dieser Krankheiten und der beträchtlichen Einschränkungen in der Lebensqualität kommt es zu enormen volkswirtschaftlichen Schäden. Dies hat zu einem großen internationalen Engagement zur Prävention und Therapie von allergischen Krankheiten geführt. Unter anderem beteiligen sich

dabei die Weltgesundheitsorganisation (WHO), die Globale Initiative gegen Asthma (GINA) und die Kommission zur Internationale Studie von Asthma und Allergie im Kindesalter (ISAAC).

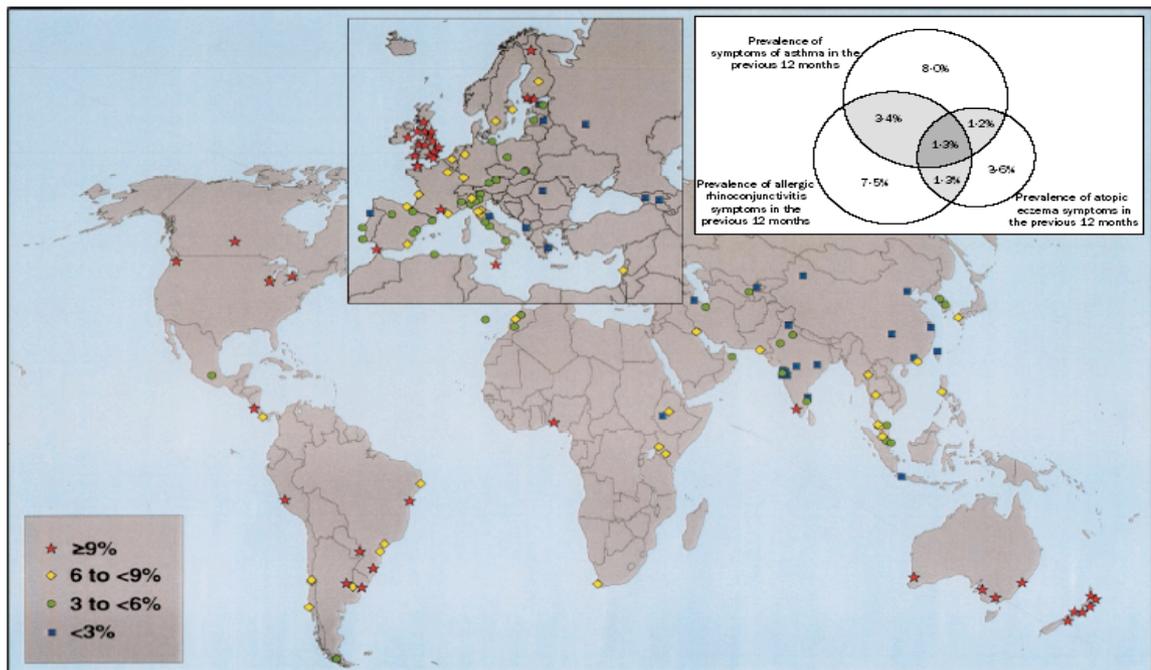


Abbildung 2 Weltweite Prävalenz von Asthma bronchiale, atopischer Dermatitis und allergischer Rhino-/Konjunktivitis [15, 16].

Klinisch finden sich bei atopischen Patienten teilweise noch so genannte indirekte Atopiezeichen. Dabei handelt es sich um:

- weißen Dermographismus
- Herthoge-Zeichen
- Dennie-Morgan-Falten
- Milchschorf, in der Regel innerhalb der ersten vier Lebenswochen
- Neurodermitis-typische Hautveränderungen (beugenbetonte Lichenifikation, Juckreiz)
- typische Provokationsfaktoren (Klima, Herbst-Winter-Gipfel, Infekte, Nahrungsmittel, Allergenexposition, emotionale Faktoren).

Die Allergie wird hier mit der Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I nach Coombs und Gallen gleichgesetzt. Man versteht darunter die Manifestation einer IgE-vermittelten Krankheit, die durch eine nachteilige und überschüssige Immunantwort auf ein harmloses körperfremdes Allergen zu Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden beziehungsweise Gewebeumbau führt. Diese Beschreibung verdeutlicht bereits, dass dieser Gruppe von Krankheiten ein gemeinsamer pathophysiologischer Mechanismus zu Grunde liegt, in dem das Immunglobulin E eine zentrale Rolle spielt. Der Ablauf einer IgE-vermittelten Sofortreaktion wird im Folgenden am Beispiel des

allergischen Asthma bronchiale detaillierter beschrieben.

1.2 Das Asthma bronchiale

Hippocrates führte bereits um 400 v.Chr. den Begriff „Asthma“ ein, um damit eine allgemeine Kurzatmigkeit beziehungsweise ein Keuchen zu beschreiben [17]. Heute verwendet man den Begriff nur noch im Zusammenhang mit der Allergie. Man unterscheidet zwei Formen:

- das extrinsische Asthma bronchiale und
- das intrinsische Asthma bronchiale.

Im Falle eines Asthma bronchiale mit bekanntem Allergen spricht man von einem extrinsischen Asthma. Beim intrinsischem Asthma findet sich kein nachweisbares auslösendes Allergen, was daran liegen konnte, dass man bei diesen Patienten das Allergen noch nicht identifizieren konnte. Weltweit leiden circa 300 Millionen Menschen unter allergischem Asthma bronchiale [14, 18]. Damit stellt das Asthma eines der häufigsten chronischen Krankheitsbilder weltweit dar. Abbildung 3 gibt die weltweite Verteilung des Asthma bronchiale wieder. Charakteristisch für das Asthma ist eine bronchiale Überreaktion, die sowohl durch die Exposition mit dem spezifischen Allergen als auch teilweise durch unspezifische Reize, wie Kälte und Stress, ausgelöst werden kann [19-21]. Darüber hinaus fällt auf, dass die Prädisposition erst dann in die eigentliche Erkrankung umschlägt, wenn ein individueller Schwellenwert an weiteren Umwelt- und andern Faktoren überschritten ist. Die Prognose im Kindes- und Jugendalter ist in 30% der Fälle günstig, da es hier zu spontanen Remissionen kommt [22]. Bei Erwachsenen kommt es meistens zu einem chronischen Verlauf.

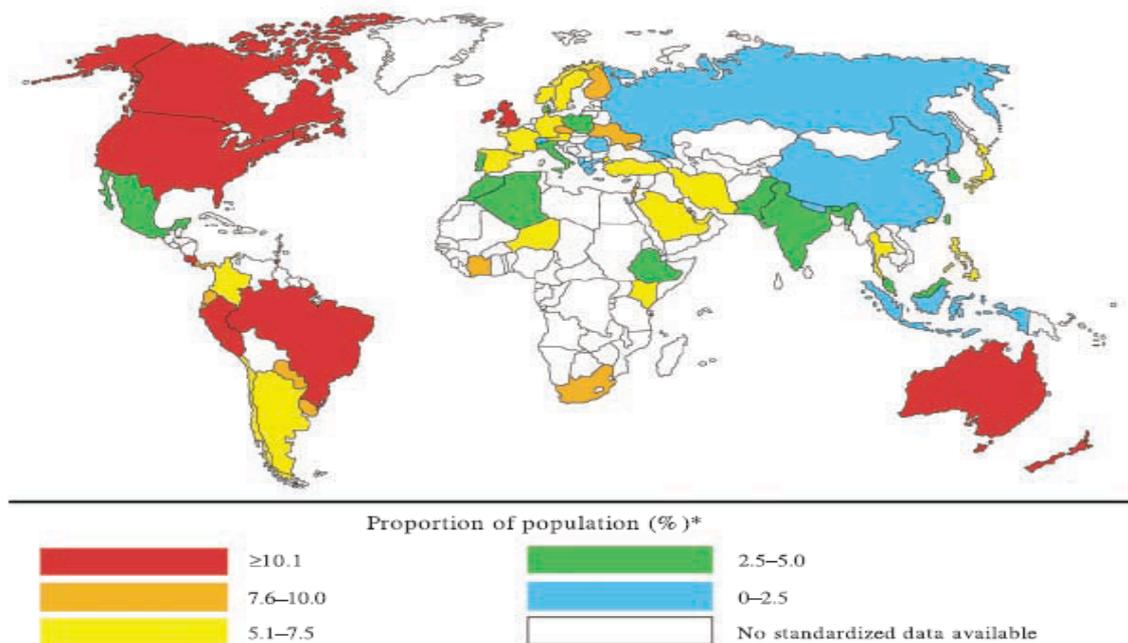


Abbildung 3 Weltweite Prävalenz des Asthma bronchiale (GINA, 2003).

Als Risikofaktor, auch bei Nicht-Atopikern, wurde ein erhöhter IgE-Spiegel identifiziert [23-25]. Meistens ist der IgE-Spiegel im Serum von atopischen Patienten aber innerhalb des Normbereichs. Der Referenzwert für den IgE-Spiegel im Serum ist abhängig vom Alter (siehe Tabelle 3). Bei Erwachsenen liegt er zwischen 0,012 – 0,240 µg/ml. In seltenen Fällen konnte ein zehnfaches des Normwertes gemessen werden.

Tabelle 3 Schwankungen des Serum IgE-Spiegel in Abhängigkeit vom Alter.

| | | | |
|---------------------------------|---------------|-----------------|----------------|
| Neugeborene | | bis 0,004 µg/ml | bis 1,50 IU/ml |
| Kinder | 1 - 6 Monat | bis 0,017 µg/ml | bis 7,20 IU/ml |
| | 7 - 12 Monat | bis 0,030 µg/ml | bis 12,2 IU/ml |
| | 1 - 5 Jahre | bis 0,140 µg/ml | bis 60,0 IU/ml |
| | 6 - 9 Jahre | bis 0,215 µg/ml | bis 90,0 IU/ml |
| | 10 - 15 Jahre | bis 0,475 µg/ml | bis 200 IU/ml |
| Erwachsene | | bis 0,240 µg/ml | bis 100 IU/ml |
| Umrechnung: IU/ml x 2,38 = µg/l | | | |

Auf die Frage der Ätiologie gibt es bis dato keine befriedigende Antwort. Die genetische Komponente ist nicht zu leugnen, da das Risiko, an einer allergischen Krankheit zu erkranken, mit der Anzahl der betroffenen Vorfahren steigt [26, 27]. So beträgt die Wahrscheinlichkeit, die Atopie auf die Kinder zu vererben, 20-40 Prozent, wenn ein Elternteil betroffen ist. Leiden beide Eltern an einer atopischen Krankheit, liegt die Wahrscheinlichkeit sogar bei 40-60 Prozent. Für Kinder ohne atopische Verwandte liegt das Risiko dagegen bei circa 10 Prozent. Allerdings gibt es nur einige wenige Gene, die im Verdacht stehen, eine Bedeutung für die Vererbbarkeit zu haben. Im Folgenden werden die wichtigsten aufgelistet:

- die Beta-Untereinheit des hochaffinen IgE-Rezeptors auf Chromosom 11q [28, 29],
- die Interleukine 3, 4 und 5 auf Chromosom 5 [30, 31],
- verschiedene HLA-DR-Gene auf Chromosom 6 [26] und
- die alpha-Kette des IL4-Rezeptors auf Chromosom 16 [32].

Die Vorgänge, die bei diesen Patienten zu einem Asthmaanfall führen und die in ähnlicher Weise auch bei den anderen atopischen Krankheiten ablaufen, wurden zum größten Teil charakterisiert (siehe Abbildung 4) [33].

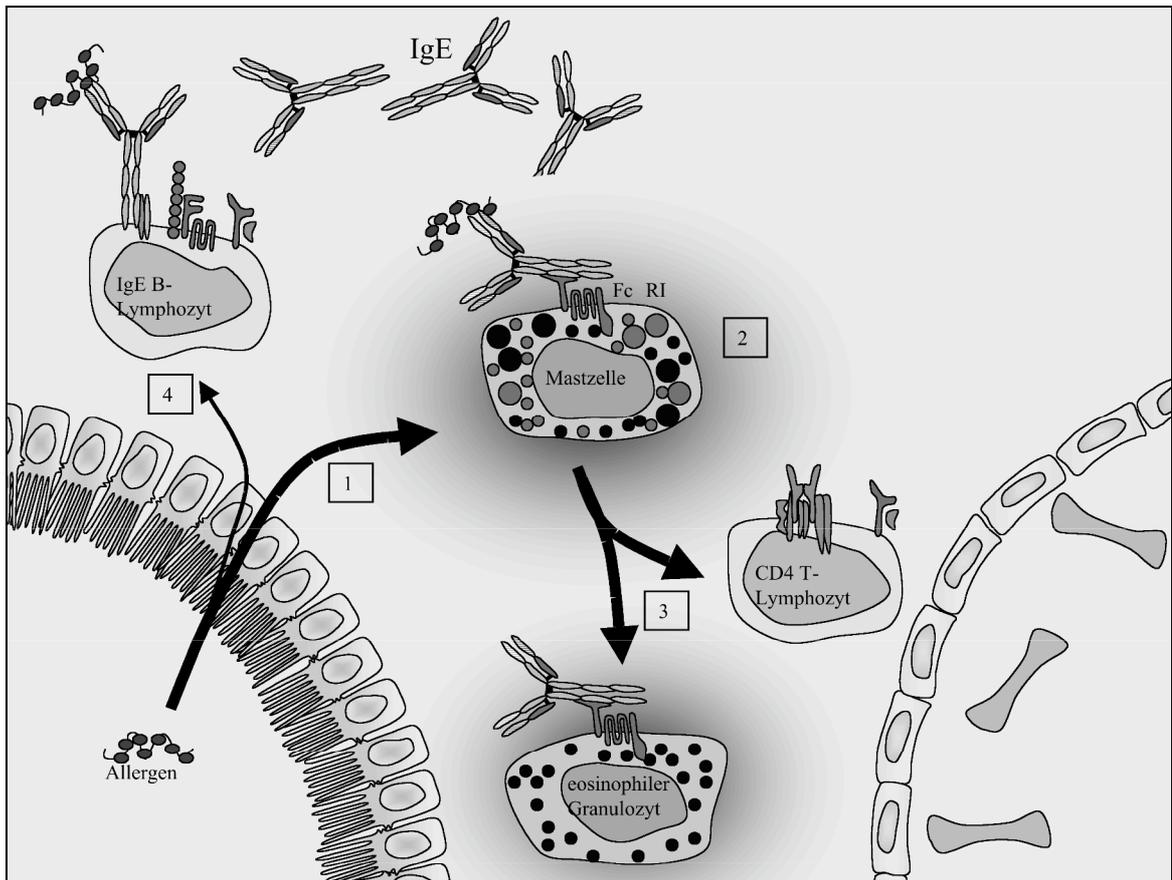


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Ablaufes eines Asthmaanfalles. 1: Nach Inhalation des Allergens, passiert das Allergen das Epithel. 2: Im Lungeninterstitium, kommt es in einer sogenannten Sofortreaktion zur Aktivierung und Degranulation von Mastzellen. 3: In der zweiten Phase werden eosinophile Granulozyten und CD4-positive T-Helfer Zellen angelockt und aktiviert. 4: IgE-positive B-Lymphozyten sind nicht direkt in die Entzündungskaskade involviert. Produzieren aber bei Aktivierung weite IgE, dass an den FcEpsilon-R-I auf Mastzellen bindet.

Bei den meisten Allergenen handelt es sich um Tierhaare beziehungsweise -schuppen, Hausstaubmilbenkot, Schimmelpilzsporen und Pollen von Gräsern und Blüten [34]. Diese besitzen oft eine proteolytische Aktivität, weswegen sie relativ einfach die Epithelbarriere der Lunge passieren können [35-37]. Damit ist die Grundvoraussetzung für eine Entzündungsreaktion gegeben. In einem sensibilisierten Menschen befinden sich dort Mastzellen, die bereits Allergenspezifisches IgE über den hochaffinen FcEpsilon-Rezeptor-I gebunden haben. Nach Inhalation des Allergens und Passieren des Epithels, kommt es zunächst zur Aktivierung und Degranulation dieser Mastzellen [23, 33]. Dabei wird der Inhalt der Granula freigesetzt, bestehend aus einer Mixtur von verschiedenen Zytokinen, Enzymen und Entzündungsmediatoren. Unter anderem enthalten die Granula:

- Mediatoren, wie Histamin und Heparin
- Enzyme, wie Tryptase und Chymase

- Zytokine, wie IL-4, IL-3 und IL-5 und
- Lipidmediatoren, wie Leukotriene und plättchenaktivierender Faktor [38-41].

Als akute Reaktion kommt es durch die Ausschüttung dieser Stoffe zu einer typischen Trias mit interstitiellem Ödem, Kontraktion der glatten peribronchialen Muskeln und vermehrter Schleimproduktion in den Alveolen. Das Ergebnis ist eine reversible Verengung der Atemwege, die sich hauptsächlich bei der Ausatmung bemerkbar macht. Subjektiv fühlt der Patient Luftnot. Die Mastzell-Degranulation löst eine Kaskade von weiteren Entzündungsreaktionen aus. Dabei kommt es zur Aktivierung und Rekrutierung weiterer Effektorzellen, wie zum Beispiel Th2-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten [42]. Nach einer gewissen Zeit kann eine zweite Phase, die sogenannte Spätreaktion folgen (siehe Abbildung 5). Der Verlauf ist individuell sehr variabel.

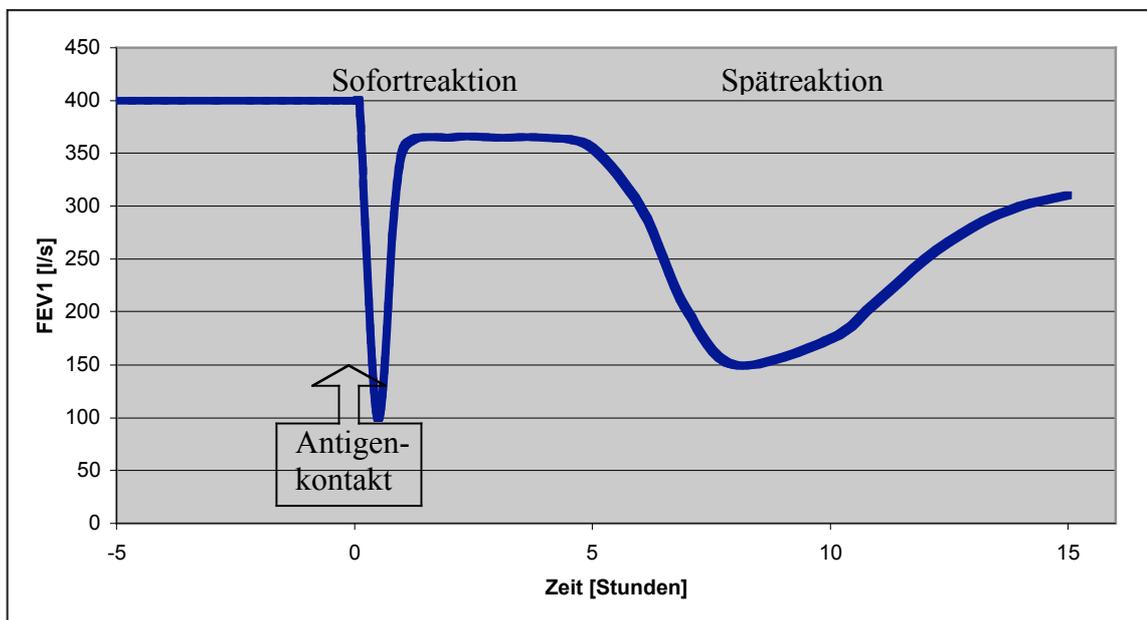


Abbildung 5 Zeitlicher Ablauf eines Asthmaanfalls. Minuten nach Allergenkontakt kommt es zu einer Sofortreaktion, die sich in einer Reduzierung des „forcierten expiratorischen Volumen in einer Sekunde“ (FEV₁) äußert. Stunden später tritt die sogenannte zweite Phase in Erscheinung. Der Verlauf kann interindividuell sehr variieren.

Klinisch imponiert neben der Dyspnoe noch Husten, meist mit zähem Auswurf, ein verlängertes Expirium, trockene Rasselgeräusche (Giemen) und ein hypersonorer Klopfeschall. Bei der Lungenfunktionsdiagnostik fällt eine Abnahme des forcierten expiratorischen Volumens in einer Sekunde (FEV₁) und der Vitalkapazität sowie eine Zunahme des Residualvolumens auf.

Tabelle 4 Einteilung der Schweregrade des Asthma bronchiale gemäß dem National Institute of Health (NIH) [43].

| Schwere der Erkrankung | Klinische Parameter vor Behandlung | Nächtliche Symptome | Lungenfunktion |
|-------------------------------|---|---|---|
| Leicht | intermittierende, kurz anhaltende Symptome < 1 - 2/Woche | nächtliche Asthma-symptomatik < 2/Monat | Peak-flow > 80 % Soll |
| | asymptomatisch zwischen akuten Episoden | | Peak-flow-Variabilität < 20 % Soll |
| | | | Peak-flow-Normalisierung nach Gabe eines Bronchodilatators |
| Mittelschwer | Anfälle > 1 - 2/Woche | nächtliche Asthma-symptomatik > 2/Monat | Peak-flow 60 - 80 % Soll |
| | | | Peak-flow-Variabilität 20 - 30 % Soll |
| | | | Peak-flow-Normalisierung nach Gabe eines Bronchodilatators |
| Schwer | häufige Anfälle, ständige Symptomatik | häufig nächtliche Asthmasymptome | Peak-flow < 60 % Soll |
| | Einschränkung der körperlichen Belastung | | Peak-flow-Variabilität > 30 % Soll |
| | Krankenhausaufenthalt während des letzten Jahres wegen Asthma | | Peak-flow unterhalb des Normalwertes trotz optimaler Therapie |
| | lebensbedrohende Exazerbationen | | |

Der Schweregrad des Asthma bronchiale wird nach dem internationalen Konsensusbericht klassifiziert, (siehe Tabelle 4) [21, 44]. Ausschlaggebend für die Diagnostik ist ein positiver Nachweis des Allergen-spezifischen IgE. Dabei testet man meistens zuerst mittels Pricktest (die Testlösung wird auf die Haut aufgetropft und anschließendes mit einer feinen Nadel eingestochen) eine Mixtur aus verschiedenen Gruppen von Allergenen, wie zum Beispiel früh blühende Bäume. Bei einem positiven Test verfeinert man die Suche mit Hilfe eines Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) oder eines Enzym-Allergo-Sorbent-Test (EAST). Da in dieser Arbeit ein neuer Ansatz in der Therapie IgE-vermittelter Krankheiten vorgestellt werden soll, ist es von Vorteil, zuerst die aktuelle Therapie und ihre Wirkung zu erläutern.

1.3 Die Standardtherapie des allergischen Asthma bronchiale

Die heutige Therapie orientiert sich hauptsächlich an den Symptomen, die bei einem Asthmaanfall durch die Trias Schleimproduktion, Kontraktion der peribronchialen Muskulatur und interstitielles Ödem, bedingt durch leukozytäres Infiltrat, gekennzeichnet sind. Des Weiteren spielt das individuelle Profil des Patienten und seine sonstigen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Die Wahl und Dosierung des Medikaments hängt dabei vom Schweregrad der Symptomatik und dem Patienten an sich ab [20, 21, 44, 45]. Die untenstehende Tabelle 5 gibt Anhaltspunkte zu den Einsatzmöglichkeiten der Arzneimittel in der Behandlung des Asthma bronchiale.

Zur Verminderung der überhöhten Schleimproduktion und zur Minimierung der entzündlichen Komponente werden Kortikosteroide, wie zum Beispiel Beclometason, Budesonid und Fluticason-17-propionat eingesetzt.

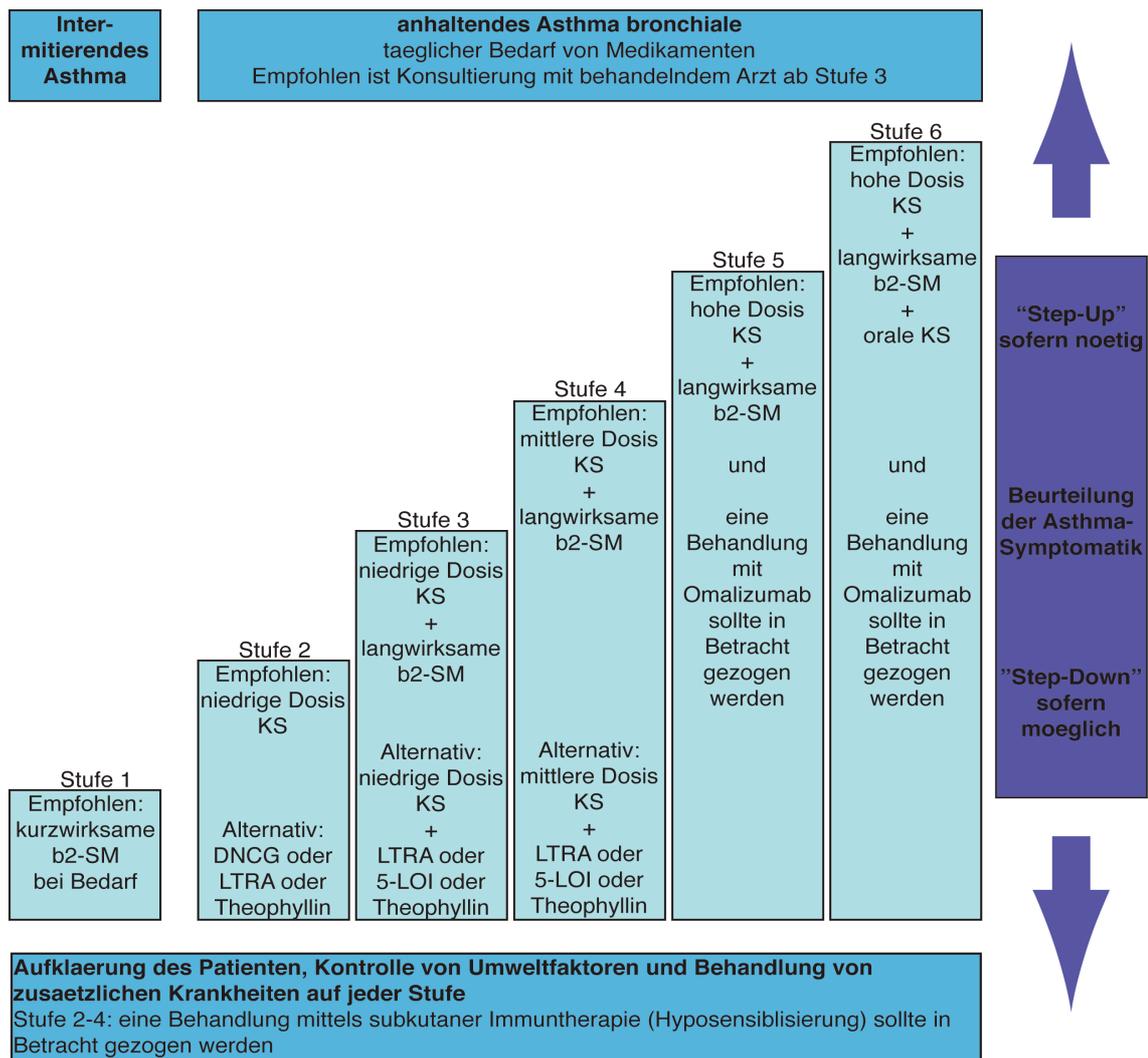
Außerdem kommen Antihistaminika zum Einsatz, die den entsprechenden H1-Rezeptor auf verschiedenen Zellen, wie zum Beispiel dem Gefäßendothel, blockieren. Dadurch kommt es zu einer verminderten Permeabilität und zur Reduktion des entzündlichen Infiltrates.

Gegen die Kontraktion der glatten Muskulatur stehen Parasympatholytika, wie zum Beispiel Ipratropiumbromid und Tiotropiumbromid, und Beta-2-Sympathomimetika zur Verfügung. Letztere werden aufgrund ihrer Wirkungsdauer in kurzwirksame (vor allem Salbutamol, Fenoterol und Terbutalin) und langwirksame Beta-2-Sympathomimetika (wie Salmeterol und Formoterol) eingeteilt.

Ferner kommen in der medikamentösen Therapie des Asthma bronchiale noch Di-Natrium-Chromo-Glycinsäure (DNCG) und Theophyllin zum Einsatz [46]. Bei DNCG geht man davon aus, dass es die Membran der Mastzellen auf noch nicht geklärte Weise stabilisiert. Die entzündungshemmende Wirkung von Theophyllin vermutet man sowohl in der Antagonisierung von Adenosin-Rezeptoren als auch in der Hemmung der zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterase.

Als neuestes Mittel in der Behandlung des allergischen Asthmas kommen noch Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten, wie Montelukast, zum Zuge [47-49]. Ihr Ziel ist es, die Effekte der Lipidmediatoren, die bei einem Anfall freigesetzt werden, zu reduzieren.

Tabelle 5 Richtlinien zur Therapie des allergischen Asthma bronchiale fuer Kinder im Alter von 12 Jahren und aelter (adaptiert entsprechend dem Expert Panel Report-3, 2007).



Die Stufentherapie sollte jedoch nur als Richtlinie dienen und immer dem Individuum angepasst werden. Auch die Wirksamkeit der einzelnen Medikamente ist nicht vorherzusagen, so dass diese im Einzelnen ausgetestet werden müssen. Die Allergenkarenz stellt selbstverständlich immer noch die beste Möglichkeit dar, Anfälle zu vermeiden. Allerdings ist dies nicht immer möglich oder führt teilweise zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität.

Eine weitere Möglichkeit, allergische IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen zu behandeln, ist die Hyposensibilisierung [50, 51]. Diese kommt vor allem bei therapieresistenten oder zur Eskalation neigenden Formen in Betracht. Eine weitere Indikation besteht darin, einen so genannten Etagenwechsel, zum Beispiel einen Übertritt der Überempfindlichkeit im Bereich von Augen oder Nasen auf das Bronchialsystem, zu verhindern. Bei dieser Therapie injiziert man zuerst sehr kleine Konzentrationen des auslösenden Allergens subkutan. Über einen langen Zeitraum versucht man die Dosis schrittweise zu erhöhen, um die Bereitschaft zur

Überempfindlichkeit zu reduzieren, beziehungsweise sofern möglich für eine gewisse Zeit zu eliminieren. Die genauen Mechanismen, die dieser Art von Therapie zugrunde liegen, sind noch nicht im Detail verstanden. Man vermutet, dass die Hyposensibilisierung zur Produktion von kompetitiven Antikörpern der IgG-Klasse führt, die ebenfalls spezifisch für das auslösende Allergen sind. Durch diese Antikörper sollen die Allergene abgefangen werden, bevor sie das Rezeptor-gebundene IgE auf Mastzellen erreichen und damit die Aktivierung der Mastzellen auslösen würden. Ein weiterer Effekt soll durch die Affinität dieser Antikörper zu den inhibitorischen FcGamma-Rezeptoren II-BI und II-BII auf B-Zellen und Mastzellen erreicht werden. Dadurch soll einerseits die Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten unterdrückt werden und andererseits die Schwelle zur Aktivierung der Mastzellen angehoben werden. Insgesamt soll es somit zu einer Modulation des Immunsystems und einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th1-Antwort kommen.

Betrachtet man sich die heutige medikamentöse Standardtherapie etwas genauer, so fällt auf, dass die Medikamente hauptsächlich dazu dienen, einen möglichen Anfall beziehungsweise dessen Symptome zu minimieren. Obwohl die Abläufe, die solch einer allergischen IgE-vermittelten Überempfindlichkeit zugrunde liegen bekannt sind, ist es bis heute nicht möglich, den Ausbruch effektiv zu verhindern oder das Ausmaß zu reduzieren.

Im Hinblick auf die Startreaktion des allergischen Asthma bronchiale sticht die Bedeutung der Aktivierung und Degranulation der Mastzelle ins Auge, da sie die gesamte Entzündungskaskade in Gang setzt. Die eigentliche Ursache für die Degranulation stellt das Kreuzvernetzen des Rezeptor-gebundenen Immunglobulin E auf der Oberfläche dieser Zellen dar. Die Produktion und Spezifität des Immunglobulin E wird jedoch von ganz anderen Zellen vermittelt, die bei der eigentlichen Entzündungsreaktion im Hintergrund agieren, den B-Lymphozyten. Auf diese soll im folgenden Kapitel 1.4 näher eingegangen werden.

1.4 Die Rolle IgE-positiver B-Lymphozyten

Wie in Abbildung 4 bereits dargestellt, ist die Aktivierung und Degranulation der Mastzellen von entscheidender Bedeutung für die Startreaktion der Entzündungskaskade. Dieser Vorgang wird durch das Quervernetzen von Rezeptor-gebundenem IgE ausgelöst [39]. Der Antikörper der Klasse E wird jedoch, wie jeder Antikörper, von B-Lymphozyten gebildet. Der eigentliche Auslöser eines Asthmaanfalls ist folglich nicht bei den Mastzellen zu suchen, sondern bei den B-Lymphozyten. Wieso es bei diesen Zellen zu einem Klassenwechsel kommt und warum sie gegen diese Art von Antigenen auf diese Weise reagieren, ist Gegenstand aktueller Forschung [52-54].

Zu den genetischen Veränderungen, die einer IgE-vermittelten Krankheit zugrunde liegen können und die bereits in Abschnitt 1.2 aufgelistet wurden, kommen noch weitere Faktoren hinzu. Unter anderem ist zu beobachten, dass es in industriellen Ländern mehr Betroffene gibt als in ärmeren Ländern [55, 56]. Außerdem fällt auf, dass es sowohl innerhalb der industriellen Länder als auch

der ärmeren Länder einen Unterschied zwischen der Stadt- und der Landbevölkerung gibt. Des Weiteren kommt hinzu, dass allergische Menschen in ärmeren Regionen, die gleichzeitig an parasitären Infektionen leiden, zum Beispiel Schistosomen oder Askaridien, frei von allergischen Symptomen sind. Therapiert man die Wurminfektion, kommt es zu einer Zunahme der Krankheitszeichen der Allergie. Eine Steigerung der Symptomatik ist auch nach Exazerbation der Infektion zu beobachten. Man hat außerdem festgestellt, dass nach der Wiedervereinigung Deutschlands die Zahl der ehemaligen DDR-Bürger, die an IgE-vermittelten Krankheiten leiden, zugenommen hat, obwohl sich gleichzeitig die Umweltsituation verbessert hat [57]. Diese und andere Beobachtungen führten zur Formulierung der so genannte „Hygiene-Hypothese“. Sie besagt, dass die Hauptaufgabe des Immunglobulin E in der Abwehr parasitärer Mikroorganismen liegt. In industriellen Ländern kommt es aufgrund des hohen hygienischen Standards zu weniger Infektionen. Dadurch soll es zu einer Fehl- beziehungsweise Überreaktion gegen Antigene kommen, die an sich harmlos sind.

Wie bereits angedeutet, handelt es sich bei den Allergenen meistens um proteolytisch aktive Enzyme. Dabei werden nur sehr geringe Mengen an Antigen inhaliert. Man schätzt die aufgenommene Dosis pro Jahr auf höchstens 1 µg. Die geringe Allergendosis und die Lokalisation des Antigeneintritts begünstigen ebenfalls einen Isotyp-Wechsel [35-37]. Das Allergen wird in der Lunge von dendritischen Zellen, überwiegend vom myeloiden Phänotyp, aufgenommen und zum nächsten Lymphknoten transportiert [58]. Hier kommt es zur Aktivierung naiver CD4-positiver T-Helfer-0 Zellen und zu deren Differenzierung in T-Helfer-2 Lymphozyten. Bis jetzt weiß man nicht, wie die myeloiden dendritischen Zellen diese Differenzierung in die Wege leiten. Ein IL-4-reiches präformiertes Milieu, welches durch NK1.1⁺-Zellen produziert wurde, wird diskutiert [59-61]. Diese CD4-positiven TH2-Zellen vermitteln den B-Lymphozyten zwei Signale für einen Isotyp-Wechsel. Bei dem ersten Signal handelt es sich um die Interleukine IL-4 und IL-13, die durch ihre Rezeptoren auf der Oberfläche der B-Lymphozyten zur Aktivierung von intrazellulären „Janus-Tyrosin-Kinasen“ (JAK1 und JAK3) beitragen. JAK1 und JAK3 wiederum phosphorylieren das „Signal transducer of activated T-cells“-Protein 6 (STAT6) [23, 52-54, 62-64]. Das zweite Signal stellt die Interaktion von CD154 (CD40-Ligand) auf der Oberfläche der CD4-TH2 Zelle und dem CD40 auf den B-Lymphozyten dar [65-67]. Letzteres führt in den B-Lymphozyten zur Aktivierung von „Nuclear-Faktor-Kappa-B“ (Nfκ-B). Beide Interaktionen sind für einen Isotyp-Wechsel notwendig. Fehlt eines der beiden Signale, kommt es zu einer Störung beim Antikörper-Klassenwechsel. Zum Beispiel kommt es bei einem Defekt in der Interaktion CD40-CD154 zu einem so genannten Hyper-IgM-Syndrom [68, 69]. Dieses ist dadurch charakterisiert, dass fast nur die primär gebildeten Immunglobuline der M-Klasse vorkommen, da ein Wechsel zu anderen Isotypen nicht möglich ist. Darüber hinaus gibt es noch andere Moleküle, welche die Produktion von IgE beeinflussen können (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Auflistung der Zytokine und Moleküle, die einen Einfluss auf die IgE Produktion haben.

| | Zytokine | Kontaktmoleküle |
|---------------------------------------|--|------------------------------------|
| Verstärkung der IgE-Produktion | IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15 | CD23-CD21 CD28-CD86 CD58-CD2 |
| Hemmung der IgE-Produktion | IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-alpha, IFN-gamma, TGF-beta | CD54-LFA-III |

Der Aufbau des Immunglobulin E unterscheidet sich von dem anderer Immunglobuline wie IgG oder IgA durch eine zusätzliche konstante Domäne in der schweren Kette (CH4) [23]. Das Molekulargewicht von IgE beträgt 190 kDa. Das lösliche IgE wird vor allem über den hochaffinen FcEpsilon-Rezeptor-I an die Oberfläche von Mastzellen gebunden. Daneben kommt es noch in geringerem Maße auf eosinophilen und basophilen Granulozyten vor. Der niedrig-affine FcEpsilon-Rezeptor II (CD23) ist bei den atopischen Krankheiten von untergeordneter Bedeutung. In Kapitel 1.2 wurde der Ablauf einer allergischen Reaktion, am Beispiel des Asthma bronchiale, geschildert. Die Anwesenheit von IgE-positiven B-Zellen und die Produktion von IgE vor Ort wurde sowohl in der Schleimhaut der Nase als auch der Lunge nachgewiesen. Abbildung 6 zeigt einen Doppelfärbung von Präparaten aus der Nasenschleimhaut verschiedener Patienten, die an allergischer Rhinitis leiden. Der Pfeil in Bild A zeigt auf einen IgE-positive B-Lymphozyten, der Pfeil in Bild B auf eine IgE-positive Plasmazelle. Die Pfeile in den Bildern C und D zeigen auf Plasmazellen, die in der Lage sind markierte Allergene zu binden, was höchstwahrscheinlich über membranständiges IgE vermittelt wurde.

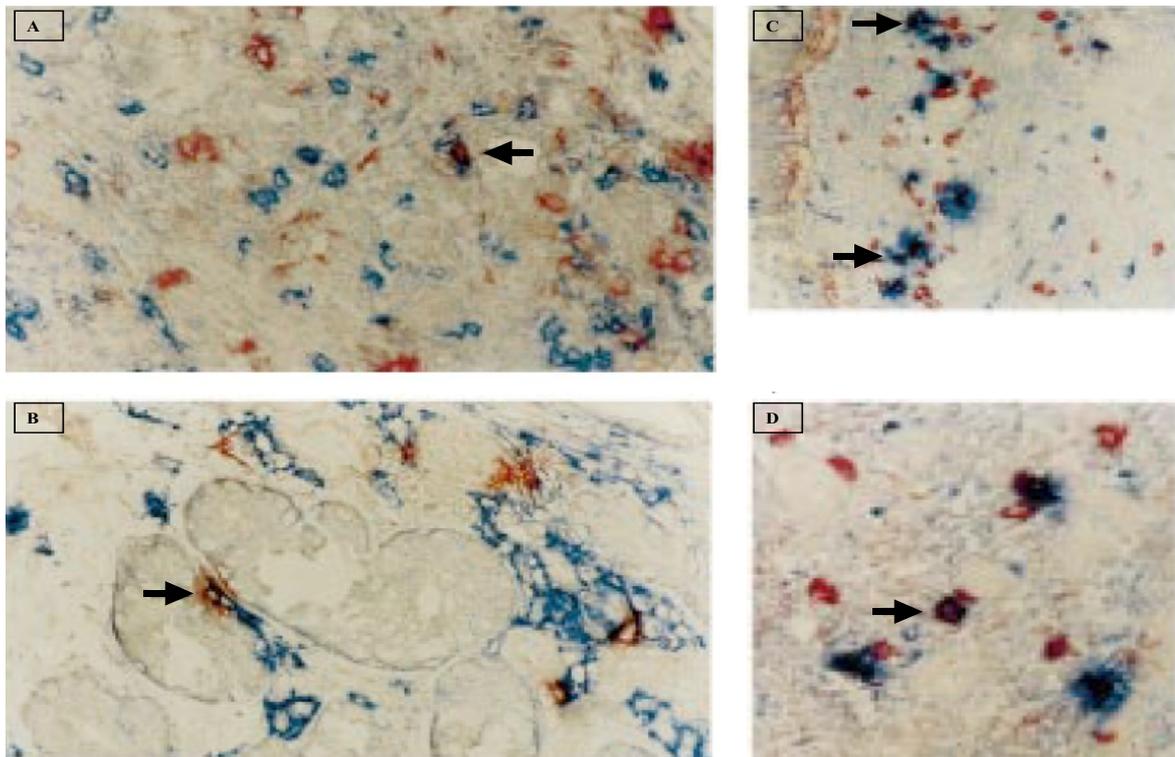


Abbildung 6 Immunhistochemische Doppel-Färbungen. Die Präparate stammen aus der Nasenschleimhaut verschiedener Patienten, die unter allergischer Rhinitis leiden. A: rot = anti-human-IgE, blau = anti-CD19; B: rot = anti-human-IgE, blau = anti-CD138; C und D: blau = markiertes Antigen, rot = anti-CD138. Aus KleinJan et al., [70].

Das Wissen darüber, dass die Quervernetzung des Immunglobulin E auf den Mastzellen eine Schlüsselrolle in der Auslösung der Entzündungskaskade spielt, hat man bereits versucht therapeutisch zu nutzen. Dazu hat man einen monoklonalen rekombinanten Antikörper hergestellt, der spezifisch an die CH3-Domäne des IgE bindet. Ziel dieses anti-IgE Antikörpers (Eigename Omalizumab) soll es sein, die Bindung von löslichem IgE an den hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I zu blockieren [71, 72]. Die klinischen Daten belegen, dass Omalizumab durchaus in der Lage ist, einen Asthmaanfall zu verhindern beziehungsweise die Symptome zu reduzieren [73]. Außerdem konnte der Einsatz von Kortikosteroiden reduziert werden. Allerdings bleiben die erwünschten Effekte hinter den Erwartungen zurück. Man vermutet, dass es daran liegt, dass der monoklonale Antikörper aufgrund seiner Größe von 180 kDa schlecht in das Gewebe penetriert, um vor Ort die Beladung der Mastzellen zu verhindern.

1.5 Bispezifische Antikörper

Bereits um 1900 war es Paul Ehrlichs (1854-1915) große Vision die „Zauberkegel“ zu finden. Er verstand darunter eine Arzneiform, mit deren Spezifität es gelingen sollte, Krankheitserreger im

menschlichen Körper von alleine aufzuspüren und zu eliminieren, ohne dabei körpereigene gesunde Zellen anzugreifen. Als G. Köhler und C. Milstein 1974 den Grundstein zur Herstellung monoklonaler Antikörper legten, war man sich sicher, diese „Zauberkegel“ in der Hand zu halten [74]. Mit ihrer Hilfe sollte es gelingen, pathogene Zellen spezifisch aufzuspüren und körpereigene Abwehrzellen anzulocken. Die ersten Versuche mittels monoklonaler Antikörper krankheitserregende Zellen zu eliminieren, schlugen jedoch fehl [75, 76]. So wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, die Effektivität von Antikörpern zu steigern. Dies sollte sowohl durch Reduktion der Nebenwirkungen als auch durch Verstärkung des Wirkungsmechanismus erreicht werden. Ausserdem kam es urch den Einsatz therapeutischer Antikörper, welche häufig murinen Ursprungs waren, zur Produktion von Antikörpern gegen die Spezies-fremden Immunglobuline [75]. Um dies zu reduzieren beziehungsweise zu verhindern, hat man chimäre (weisen neben humanen konstanten nur murine variable Domänen auf) und humanisierte (außer den „complementary determining regions“, sind diese human) Varianten dieser Immunglobuline hergestellt. Um einen gesteigerten Toxizität gegenüber den pathogenen Zellen zu erzielen, wurden auch Substanzen wie zum Beispiel Antibiotika oder radioaktive Moleküle an die Antikörper gekoppelt [77-80]. Eine Auswahl verschiedener Varianten ist in Abbildung 7 dargestellt.

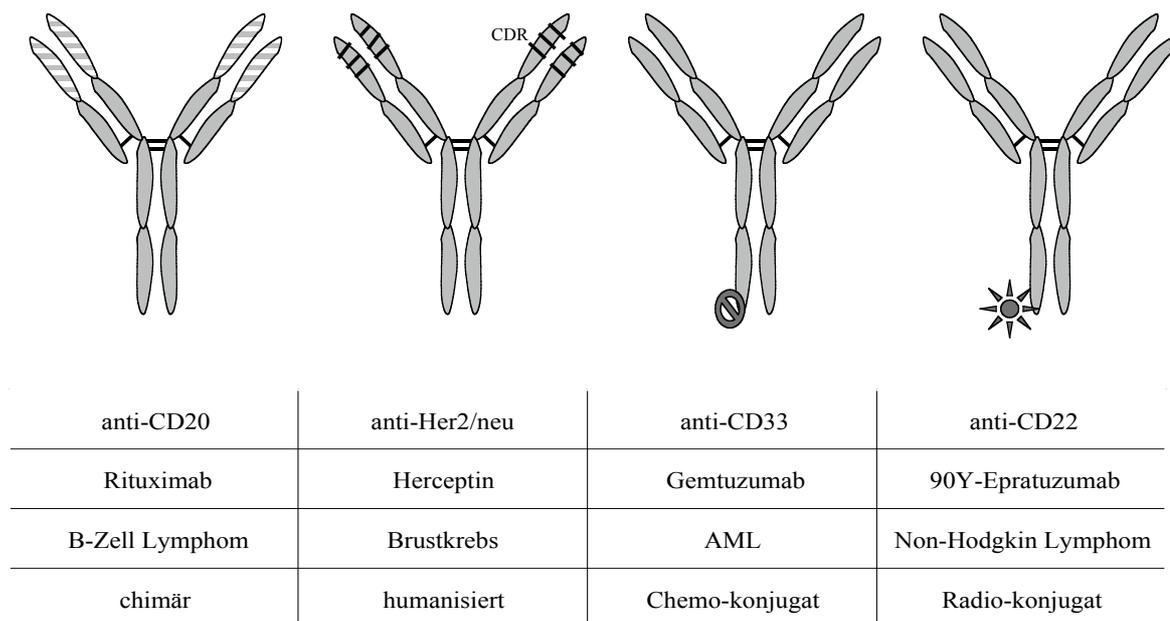


Abbildung 7 Verschiedene Beispiele zu klinisch eingesetzten Antikörper-Varianten. Die Veränderungen sollen dazu dienen, die Antikörper-vermittelte Toxizität zu steigern (Rituximab [81], Herceptin [82], Gemtuzumab [83] und 90Y-Epratuzumab [84]).

Eine der wichtigsten und überaus zytotoxischen Subpopulation von Zellen, die im menschlichen

Körper für die Eliminierung von pathogenen Zellen zuständig ist, sind die CD8-positiven T-Lymphozyten [85]. Allerdings besitzt dieser Zelltypus keinerlei Rezeptoren für die Fc-Domänen von IgG-Antikörpern, was ein wichtiger Grund für die limitierte Wirksamkeit monoklonaler Antikörper sein dürfte.

Wenn man die Art und Weise, mit der Antikörper Effektorzellen anlocken und aktivieren, etwas vereinfacht betrachtet, so kann man sagen, dass sie nichts anderes tun, als mittels der Fab-Domäne ein spezifisches Antigen und mittels der Fc-Domäne eine Effektorzelle zu binden. Antikörper stellen vereinfacht gesagt nichts anderes als eine Art Bindeglied oder Adapter zwischen zwei Molekülen auf verschiedenen Zellen dar. Diese Betrachtungsweise führte zum Konzept der bispezifischen Antikörper [86, 87]. Dabei versucht man auf unterschiedliche Weise, einem Antikörper, der mit seinen beiden Fab-Domänen normalerweise nur ein Antigen auf der Oberfläche einer Zielzelle erkennen kann, die Fähigkeit zu geben, ein weiteres Antigen beziehungsweise Aktivierungsmolekül zu erkennen, welches sich auf Effektorzellen befindet. Dies soll die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen spezifisch gegen die Zielzellen dirigieren, so dass diese schließlich zerstört werden (siehe Abbildung 7).

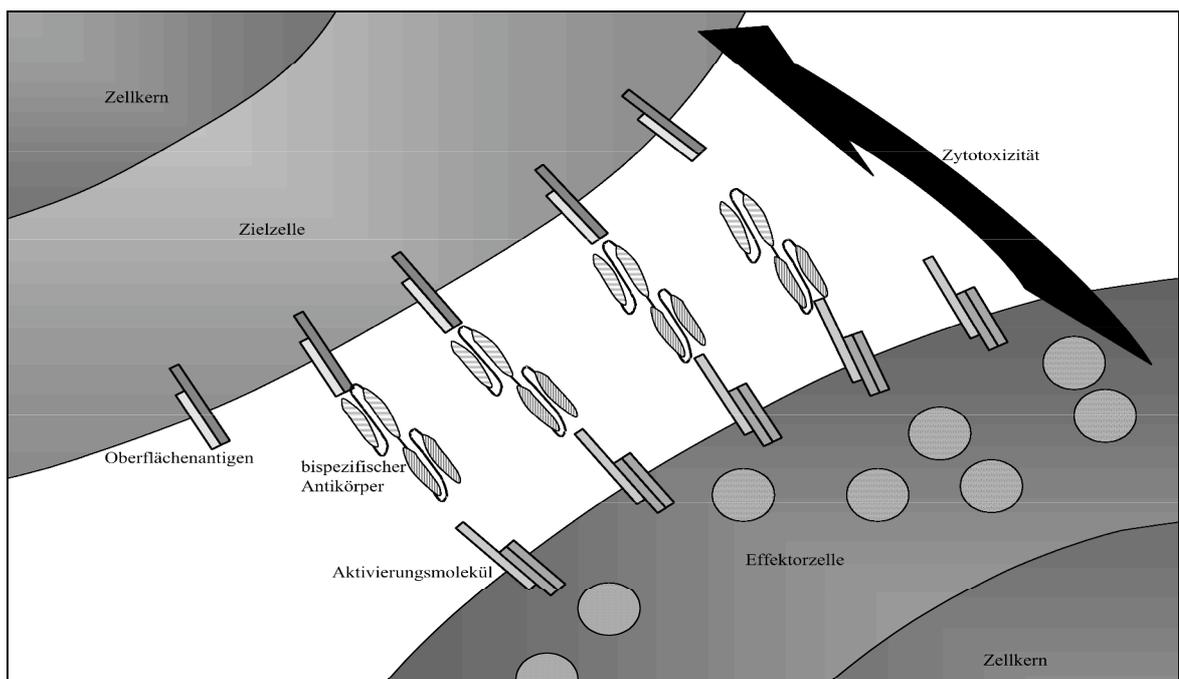
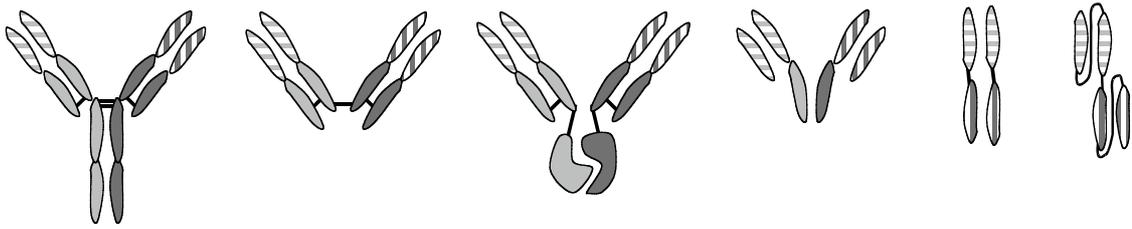


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von bispezifischen Antikörpern.

Das Konzept der bispezifischen Antikörper führte zu einer ganzen Reihe von verschiedenen Formaten. Abbildung 8 gibt einen Überblick über verschiedene molekulare Formate bispezifischer Antikörper und ihre gebräuchlichen Bezeichnungen.



| | | | | | |
|----------|--------------------|---------------------|------------------|---------|-------------|
| Quadroma | F(ab) ₂ | Heterodimerer F(ab) | Heterodimerer Fv | Diabody | Tandem scFv |
|----------|--------------------|---------------------|------------------|---------|-------------|

Abbildung 9 Darstellung der unterschiedlichen bispezifischen Antikörper-Formate und ihre gebräuchlichen Bezeichnungen (Quadroma [88], Diabody [89, 90] und Tandem scFv [87, 91]).

Abgesehen von den strukturellen Unterschieden der verschiedenen bispezifischen Antikörper, weichen die Formate auch in ihrer Effektivität und damit in ihrer zytotoxischen Wirkung stark voneinander ab. Da durch bispezifische Antikörper zudem verschiedene Arten von Effektorzellen rekrutiert werden können, kommen dementsprechend auch verschiedene Aktivierungsmoleküle zum Einsatz [87, 91-93]. Tabelle 7 fasst die wichtigsten Ansätze unter Angabe der verwendeten bispezifischen Antikörperformate mit ihren Vor- und Nachteilen zusammen.

Tabelle 7 Auflistung der bispezifischen Antikörper-Formate in ihrer angewandten Form und Vergleich ihrer Vor- und Nachteile.

| Zielmoleküle | CD64 | CD89 | CD16 | CD3 | |
|---|--|---------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| bispezifisches Antikörperformat | F(ab') ₂ | F(ab') ₂ | Quadroma F(ab') ₂ | F(ab') ₂ | Tandem scFv |
| | | | Tandem scFv | Diabody | |
| Effektorzellen | Monozyten und neutrophile Granulozyten | | NK Zellen | T Zellen | |
| Notwendigkeit von Prä- oder Kostimulation | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein |
| ED ₅₀ range [µg/ml] | 0.1-1 | 0.1-1 | 0.03-1 | 0.1-1 | 10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁴ |
| E:T ratio | ≥ 40:1 | 100:1 – 200:1 | 50:1 | ≥ 10:1 | ≤ 1:10 |

Für ein erfolgsversprechendes Format sollten diverse Voraussetzungen erfüllt sein. Unter anderem sollte man im Hinblick auf eine einfache therapeutische Anwendung auf eine Prä- oder Kostimulation der Effektorzellen verzichten können. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist das

Verhältnis von Zielzellen zu Effektorzellen, da die Effektorzellen gegenüber den Zielzellen in vivo in der Regel im Unterschuss vorliegen dürften. Das heißt ein Format, dass mit weniger Effektorzellen auskommt, hat bessere Aussichten auf Erfolg. Darüber hinaus spielt auch die Höhe der wirksamen Antikörperkonzentration eine wichtige Rolle, da sich hieraus der Materialbedarf und damit die Produzierbarkeit des bispezifischen Antikörpers in ausreichenden Mengen ergibt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen bispezifischen Antikörper im Tandem single-chain Fv-Format (scFv) zu generieren [87, 91]. Dieser sollte einerseits spezifisch gegen die CH3-Domäne des humanen Immunglobulin E und andererseits spezifisch mit der CD3-Komponente des T-Zell-Rezeptor-Komplexes reagieren. Dazu sollten die variablen Regionen aus Hybridomzellen, welche einen entsprechenden monoklonalen anti-IgE Antikörper produzieren, kloniert und zu einem bispezifischen single-chain Konstrukt rekombiniert werden [94].

Zur Produktion und Aufreinigung des IgExCD3 Antikörpers benötigt man ein geeignetes Expressionssystem und ein passendes Verfahren zur Isolierung des Konstruktes. Dafür sollten Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen stabil transfiziert werden. Die CHO-Zellen sollten den bispezifischen Antikörper als voll funktionsfähiges rekombinantes Protein in den Zellkulturüberstand sezernieren, um es daraus schließlich mit geeigneten Mitteln aufzureinigen.

Um den bispezifischen Antikörper zu charakterisieren, bedarf es der Etablierung verschiedener Testmethoden. Da IgE-positive B-Lymphozyten im peripheren Blut von Menschen in zu geringer Zahl vorkommen um sie daraus zu isolieren, musste eine geeignete Zielzelllinie kloniert werden. Dazu musste das humane Immunglobulin E in seiner membranständigen Form in einer Maus-B-Zell-Lymphom-Zelllinie exprimiert werden.

Zur weiteren Charakterisierung des bispezifischen single-chain Antikörpers IgExCD3, musste nachgewiesen werden, dass dieses Konstrukt spezifisch IgE-positive B-Lymphozyten eliminiert. Zellen, die Immunglobulin E entweder über den hoch- oder den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor auf ihrer Oberfläche präsentieren, durften nicht eliminiert werden. Diese Nachweise sollten mit Hilfe eines ⁵¹Chrom-Freisetzungstest erbracht werden.

Außerdem musste sichergestellt werden, dass durch den bispezifischen single-chain Antikörper IgExCD3 keine Degranulation von Mastzellen induziert wird. Dazu musste ein Verfahren etabliert werden, um die Ausschüttung der Granula zu messen. Dies sollte durch die Messung des Enzyms Beta-Hexosaminidase, welches ein Bestandteil dieser Granula ist, untersucht werden.

Mit der Herstellung und Charakterisierung des bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörpers sollte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen innovativen und vielversprechenden Ansatz in der Therapie IgE-vermittelter Krankheiten, wie zum Beispiel dem allergischen Asthma bronchiale, handelt.

2 MATERIAL

Im Folgenden werden sämtliche Materialien, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, aufgelistet. Bei einigen dieser Materialien handelt es sich um toxische oder kanzerogene Materialien. Daher ist eine allgemeine Vorsicht bei dem Umgang mit diesen Stoffen immer angebracht. Grundsätzlich sollte immer mit Handschuhen gearbeitet werden und wenn nötig ein Mundschutz aufgesetzt werden.

2.1 Chemikalien

Chemikalien

| | | |
|-----------------------------|--|-------------------------|
| Agar-Agar | | Roth, Karlsruhe |
| Agarose GTG Seakem | | Biozym, Hess. Oldendorf |
| Ammoniumazetat | | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid | | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat | | Amersham, Freiburg |
| APDS | AmmoniumPeroxoDiSulfat | Roth, Karlsruhe |
| ATP | | Roche, Mannheim |
| Borsäure | | Sigma, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | | Sigma, Deisenhofen |
| Calciumchlorid | | Merck, Darmstadt |
| CFSE | Carboxy-Fluoresceindiacetate-Succinimidylester | Invitrogen, Karlsruhe |
| D-(+)-Glucose-Monohydrat | | Roth, Karlsruhe |
| Di-Kalium-Hydrogenphosphat | | Roth, Karlsruhe |
| Di-Natrium-Hydrogenphosphat | | Merck, Darmstadt |
| DNA-Größenmarker | | Invitrogen, Karlsruhe |
| dNTP-Set | (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | Amersham, Freiburg |
| DTT | | Invitrogen, Karlsruhe |
| EDTA | EthylenDiaminTetraAcetat | Sigma, Deisenhofen |
| Glycerin | | Roth, Karlsruhe |
| Harnstoff | | Sigma, Deisenhofen |
| HEPES | 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazinEthanSulfonsäure | Biomol, Hamburg |
| Isopropanol | | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumazetat | | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | | Sigma, Deisenhofen |
| Kalium-Dihydrogencarbonat | | Merck, Darmstadt |
| Kalium-Dihydrogenphosphat | | Sigma, Deisenhofen |
| Kaliumhydroxid | | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid | | Sigma, Deisenhofen |
| Magnesiumsulfat | | Merck, Darmstadt |
| Mangan-Chlorid-Tetrahydrat | | Roth, Karlsruhe |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure | Roth, Karlsruhe |
| Natriumazetat | | Roth, Karlsruhe |
| Natriumazid | | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | | Merck, Darmstadt |
| Natriumcitrat-Dihydrat | | Sigma, Deisenhofen |
| Natrium-Dihydrogen-Phosphat | | Roth, Karlsruhe |

| | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Natrium-Dihydrogen-Phosphat | | Roth, Karlsruhe |
| Natrium-Hydrogencarbonat | | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid-Plätzchen | | Merck, Darmstadt |
| Natriumnitrit | | Sigma, Deisenhofen |
| Natrium-Thiosulfat | | Roth, Karlsruhe |
| PNAG | p-Nitrophenyl-Acetyl-b-D-Glucosamin | Sigma, Deisenhofen |
| SDS | Natrium-Lauryl-Sulfat | Sigma, Deisenhofen |
| TRIS | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan | Sigma, Deisenhofen |
| Trypan-Blau | | Fluka, CH 9470-Buchs |
| Xylol | | Roth, Karlsruhe |
| Zitronensäure | | Roth, Karlsruhe |

2.2 Puffer und sonstige Lösungen

Puffer

| | | | | |
|----------------------------|------------------|--|-------|------------|
| PBS | Phosphate | NaCl | Merck | 150 mM |
| | Buffered | Na ₂ HPO ₄ | Merck | 10 mM |
| | Saline | KH ₂ PO ₄ | Merck | 2 mM |
| PBST | PBS-Tween | PBS plus 0,05% Tween 20 | | |
| TBE | Tris | Tris | Merck | 89 mM |
| | Borate | Borsäure | Merck | 89 mM |
| | EDTA | EDTA | Merck | 2 mM |
| TBS | Tris | Tris | Merck | 50 mM |
| | Buffered | NaCl | Merck | 150 mM |
| | Saline | | | |
| TBST | TBS-Tween | TBS plus 0,05% Tween 20 | | |
| TfB I (steril) | | KAc | Merck | 30 mM |
| | | MnCl ₂ | Merck | 50 mM |
| | | KCl | Merck | 100 mM |
| | | CaCl ₂ | Merck | 10 mM |
| | | Glycerol | Merck | 15 % (w/v) |
| TfB II (steril) | | Na-MOPS | Merck | 10 mM |
| | | KCl | Merck | 10 mM |
| | | CaCl ₂ | Merck | 50 mM |
| | | Glycerol | Merck | 15 % (w/v) |
| Tyrode-Puffer (20x) | | NaCl | Merck | 160.0 g |
| | | KCl | Merck | 4.0 g |
| | | NaH ₂ PO ₄ (2H ₂ O) | Merck | 1.0 g |
| | | MgCl ₂ | Merck | 1.3 g |

SDS-PAGE-Puffer

| | | |
|--------------------------------------|----------------------------|-------------|
| 10x SDS-PAGE-Laufpuffer | Tris | 30.3 g |
| | Glycin | 144.1 g |
| | SDS | 10 g |
| 5x SDS-PAGE-Ladepuffer pH 6,8 | 0,5 M, pH 6,8 Tris/HCl | 10 ml |
| | 10% SDS | 25 ml |
| | Glycerin | 35 ml |
| | 0,2 % (w/v) Bromphenolblau | 15 ml |
| | beta-Mercaptoethanol | 15 ml |
| | Glycerol | 15 ml |
| Blocklösung | Magermilchpulver | 2.5 % (w/v) |
| | TBS | |
| Blott-Puffer | SDS-Page-Laufpuffer | 900 ml |
| | Methanol | 100 ml |
| Gel-Fixier-Lösung | Iso-Propanol | 25 % (v/v) |
| | Essigsäure | 10 % (v/v) |

sonstige Lösungen

| | | |
|-----------------------------|--|---------------------|
| ABTS | 2,2'-Azino-Di-(3-EthylBenzThiazolin) Sulfonsäure | Roche, Mannheim |
| Acrylamid | Acrylamid-/Bisacrylamidgemisch | Roth, Karlsruhe |
| Chloroform | | Roth, Karlsruhe |
| Coomassie-Blau | | Roth, Karlsruhe |
| Eisessig 100% | | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | | Merck, Darmstadt |
| Ethanol unvergällt | | JT Baker, Griesheim |
| Ethanol vergällt | | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | | Merck, Darmstadt |
| Formaldehyd | | Sigma, Deisenhofen |
| Methanol | | Merck, Darmstadt |
| Phenol/Chloroform | | Roth, Karlsruhe |
| Propanol | | Merck, Darmstadt |
| Salzsäure (rauchend) | | Merck, Darmstadt |
| TEMED | N,N,N',N'-TetraMethylEthylenDiamin | Amersham, Freiburg |
| Triton X-100 | | Sigma, Deisenhofen |
| Tween 20 | Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat | Sigma, Deisenhofen |

2.3 Antikörper

| Antigen | Konjugat | Spezies | Isotyp | Hersteller | Katalog-Nr. |
|-----------------------|----------------------------------|---------|-------------|------------------|-------------|
| Histidin ₅ | Biotin | Maus | IgG1 | Qiagen | 34440 |
| Histidin ₆ | Peroxidase (POX) | Maus | IgG1 | Roche | 1965085 |
| human CD4 | AlloPhycoCyanin (APC) | Maus | IgG1, kappa | Becton Dickinson | 555349 |
| human CD8 | AlloPhycoCyanin (APC) | Maus | IgG1, kappa | Becton Dickinson | 555369 |
| human CD23 | R-PhycoErythrein (R-PE) | Maus | IgG1, kappa | Becton Dickinson | 555711 |
| human CD25 | PhycoErytrin-Cyanin5 (PE-Cy5) | Maus | IgG1, kappa | Becton Dickinson | 555433 |
| human CD69 | PhycoErytrin-Cyanin5 (PE-Cy5) | Maus | IgG1, kappa | Becton Dickinson | 555532 |
| human IgE | Fluorescein IsoThioCyanat (FITC) | Hase | polyklonal | Dako | F035202 |
| Nip | | Mensch | IgE | Serotec | MCA333B |

2.4 Enzyme

| | | |
|--|---------------------|-------------|
| DNase 1, RNAse-frei | Roche, Mannheim | 104159 |
| Reverse Transkriptase | Roche, Mannheim | 3531317001 |
| Taq DNA-Polymerase | Roche, Mannheim | 11647679001 |
| Taq Expand High Fidelity | Roche, Mannheim | 11732641001 |
| Restriktionsenzyme | | |
| Eag I, EcoR I, Xba I, Xho I, PspOM I, Sac I, Sal I | New England Biolabs | |
| BamH I, BspE I, BsrG I, Kpn I, Nco I, Nde I | Roche, Mannheim | |

2.5 Kommerzielle Kits

Zytokin-ELISA-Kits

| | | | |
|-----------|--------|------------------|----------|
| TNF-alpha | OPTEIA | Becton Dickinson | SE555212 |
| INF-gamma | OPTEIA | Becton Dickinson | SE555142 |
| IL-6 | OPTEIA | Becton Dickinson | SE555220 |
| IL-2 | OPTEIA | Becton Dickinson | SE555190 |

Molekularbiologische-Kits

| | | | |
|----------------------------|--|--------|-------|
| Qiafilter Plasmid Midi Kit | | Qiagen | 12143 |
| Rneasy Mini Kit | | Qiagen | 74103 |

2.6 Plasmide und Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Klonierung des humanen Membran-ständigen IgE

| | |
|-------------|--|
| 5'- CH4-IgE | 5'-AAAGAGCTCGAATTCGGGATCCATGCCATGGGCAGGCCGGGGTCGT GGGGGAAGGGAGGGAGCGAGTGAGCGTGGCCC-3' |
| 3'- CH4-IgE | 5'-CGGGGTACCTCTAGAGCGGGCCCGCTGGACGGTCTGTGA-3' |
| 5'- MS-IgE | 5'-CAGCCGGCCGTGTCTGTAAATCCCGAGCTGGACGTGTGCGTGGA GGAG-3' |
| 5'- ML-IgE | 5'-CAGCCGGCCGTGTCTGTAAATCCCGGGCTGGCTGGCGGCTCC GCGCAG-3' |
| 3'- M-IgE | 5'-CTAGTCTAGACTAGGCGTGGGGCTGGAGGACGTTG-3' |

Oligonukleotide zur Klonierung des bispezifischen single-chain Antikörpers IgExCD3

| | |
|------------------------|--|
| 5'- VL-anti-IgE | 5'-AGGTGTACTACTCCGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCC-3' |
| 3'- VL-anti-IgE | 5'-TTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3' |
| 5'- VL-anti-IgE-GSL | 5'-GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGAGCTCGTGAT GACCCAG-3' |
| 3'- VL-anti-IgE-BspE I | 5'-AATCCGGATTTTCAGCTCCAGCTTGG-3' |

| | |
|------------------------|--|
| 5'- VH-anti-IgE | 5'-GAGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG-3' |
| 5'- VH-anti-IgE-BsrG I | 5'-AGGTGTACTACTCCGAGGTCCAGCTTCTCGAG-3' |
| 3'- VH-anti-IgE-GSL | 5'-GGAGCCGCCGCCGCCAGAACCACCACCACCGGAGGAGACTGTG AGAG-3' |
| 3'- VH-anti-IgE | 5'-CTTGCCCCAGTGGTCAAATCCCCCGTAGGTACTGCGGCC TCTAGTAC-3' |

2.7 Zellen, -Medien und Zellzusätze

Zellen

| | | | | |
|---------------------|---|------------------|------------|---------------------|
| CHO | Chinese Hamster Ovary | alpha-MEM-Medium | 37 °C | 5 % CO ₂ |
| CHO-IgExCD3 | CHO plus pEF/DHFR-IgExCD3-Vektor Selektion mit: | Methotrexat | 20 nM | |
| J558L | Balb/c Maus B-Zell-Lymphom | RPMI-Medium | 37 °C | 5 % CO ₂ |
| J558L-MSIgE | J558L plus pEF/NPT-huIgE-MS-Vektor Selektion mit: | Geneticin | 1000 µg/ml | |
| J558L-MLIgE | J558L plus pEF/NPT-huIgE-ML-Vektor Selektion mit: | Geneticin | 1000 µg/ml | |
| RBL-2H3 | Ratte Mastzell | RPMI-Medium | 37 °C | 5 % CO ₂ |
| RBL-2H3/3025 | RBL-2H3 plus pEF/NPT-huFcEpsilon-alpha-Vektor Selektion mit: | Geneticin | 1000 µg/ml | |
| HPB-ALL | Human T-Zell-Lymphom | RPMI-Medium | 37 °C | 5 % CO ₂ |
| HOM2 | Human EBV-infiziert | RPMI-Medium | 37 °C | 5 % CO ₂ |

Medien

| | | | | |
|----------------------------|--------------------------------|--------|------------|-------------|
| RPMI-Medium | RPMI-1640 | Gibco | 21875-091 | |
| | Zusätze: FCS | Gibco | 10270-016 | 10 % (v/v) |
| | L-Glutamin | Gibco | 25030-024 | 2 mM |
| | Penicillin-Streptomycin | Gibco | 15140-122 | 100 U/ml |
| D-MEM-Medium | D-MEM | Gibco | 31885-023 | |
| | Zusätze: FCS | Gibco | 10270-016 | 10 % (v/v) |
| | L-Glutamin | Gibco | 25030-024 | 2 mM |
| | Penicillin-Streptomycin | Gibco | 15140-122 | 100 U/ml |
| alphaMEM-Medium (-) | alpha-MEM ohne Nucleotide | Gibco | 22561-021 | |
| | Zusätze: FCS-dialysiert | Gibco | 26400-044 | 10 % (v/v) |
| | L-Glutamin | Gibco | 25030-024 | 2 mM |
| | Penicillin-Streptomycin | Gibco | 15140-122 | 100 U/ml |
| alphaMEM-Medium (+) | alpha-MEM mit Nucleotide | Gibco | 22561-021 | |
| | Zusätze: FCS | Gibco | 10270-016 | 10 % (v/v) |
| | L-Glutamin | Gibco | 25030-024 | 2 mM |
| | Penicillin-Streptomycin | Gibco | 15140-122 | 100 U/ml |
| | 200x Nucleotide | | | 0.5 % (v/v) |
| HyQ PF CHO | HyQ PF CHO Liquid Soy | Perbio | SH30359.02 | |
| | Zusätze: L-Glutamin | Gibco | 25030-024 | 2 mM |
| | Penicillin-Streptomycin | Gibco | 15140-122 | 100 U/ml |

Zellkultur-Bedarf

| | | | | |
|--------------------------------|----------------------------|----------|-----------|--------------|
| FCS | Fetal Calf Serum | Gibco | 10270106 | 10 % (v/v) |
| FCS dialysiert | Fetal Calf Serum | Gibco | 26400044 | 10 % (v/v) |
| Hank's | Hank's Salt Solution | Biochrom | L2045 | 50 % (v/v) |
| Ficoll | Ficoll Separating Solution | Biochrom | L6115 | 7.5 % (v/v) |
| DMSO | Di-Methyl-Sulf-Oxid | Sigma | D2650 | 10 % (v/v) |
| L-Glutamin | | Gibco | 25030-024 | 2 mM |
| Penicillin-Streptomycin | | Gibco | 15140-122 | 100 U/ml |
| Geneticin | (G418) | Gibco | 11811-031 | 1000 µg/ml |
| Methotrexat | (MTX) | Sigma | A6770 | 20-100 nM |
| EDTA | EthylenDiaminTetraAcetat | Gibco | 15575-038 | 0.02 % (v/v) |

2.8 Bakterien, -Medien und Bakterien-Zusätze

Bakterien

| | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Escherichia coli | kompetent | XL I Blue | LB-Medium |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|

Medien und Bakterien-Bedarf

| | | | | | |
|------------------|----------------|--------------|-------|-----------|-------------|
| LB | Luria | Trypton | Gibco | 30392-021 | 10 g/L |
| | Bertani | Hefe-Extrakt | Gibco | 30393-029 | 5 g/L |
| | | NaCl | Merck | | |
| Ampicilin | | | Sigma | A6140 | 50 µg/ml |
| Agar-Agar | | | Gibco | 2266.1 | 1.5 % (v/v) |

3 METHODEN

Im folgenden sind die Methoden, die in dieser Arbeit angewendet wurden, um den bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörper herzustellen und zu charakterisieren aufgelistet. Grundsätzlich ist bei jeder Methode auf exaktes und sauberes Arbeiten zu achten. Einige Methoden wurden für verschiedene Nachweise öfters angewendet, wobei das Prozedere teilweise geändert werden musste. In solchen Fällen ist die Methode erklärt mit einem Hinweis, dass einzelne Vorgänge oder Materialien unterschiedlich eingesetzt wurden. Grundsätzlich ist bei jeder Methode auf das Mitführen sogenannter positiver und negativer Kontrollen zu achten. Nur durch deren Einsatz, kann man letztendlich auf die Korrektheit schließen.

3.1 Zellbiologische Methoden

Bei den zellbiologischen Methoden ist zu beachten, dass teilweise Proben von Patienten, wie zum Beispiel Blut verwendet wird. Daher sollte immer mit Handschuhen gearbeitet werden, um das potentielle Infektionsrisiko zu minimieren. Teilweise wurde mit genetisch verändertem Material gearbeitet, die einen besonderen sorgsamem Umgang erfordern, wie zum Beispiel transformierte *Escherichia coli* Bakterien mit Antibiotikaresistenz.

3.1.1 Präparation kompetenter *Escherichia coli* XL I Blue

Einige Bakterien, wie zum Beispiel das *Bazillus subtilis*, besitzen die natürliche Fähigkeit DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Diese Eigenschaft nennt sich Kompetenz. Die aufgenommene DNA wird wie die bakterieneigene DNA mit jeder Teilung vermehrt. Neben dieser natürlichen Kompetenz kann man Bakterien durch spezielle Wachstumsbedingungen zur Aufnahme von Fremd-DNA bewegen. Mg^{2+} -Ionen spielen dabei eine wichtige Rolle, wobei der Mechanismus nicht bekannt ist. Diese induzierte Kompetenz soll im Laufe dieser Arbeit zur Amplifikation von DNA angewendet werden. Dazu muss der gewünschte Bakterienstamm, in diesem Fall *E. coli* XL I Blue (Bullock et al., 1987), zuerst präpariert werden.

Protokoll:

- 5 ml LB-Medium werden mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft und über Nacht auf einem Rotationsschüttler kultiviert
- 500 µl dieser Bakterien-Suspension werden am nächsten Morgen in 100 ml LB-Medium überführt, welchem man 1 ml 1 M $MgCl_2$ zugefügt hat
- Die Suspension wird bis zu einer optischen Dichte bei 550 nm (OD_{550}) von 0,6-0,8 kultiviert und anschließend bei 1000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 40 ml eisgekühlter TfB I resuspendiert und für 10

Minuten auf Eis inkubiert

- nach einer erneuten Zentrifugation bei 1000 g für 10 Minuten bei 4°C, wird der Überstand dekantiert und das Pellet in 4 ml gekühlter TFB II resuspendiert
- 100 µl dieses Ansatzes werden jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, welche auf Trockeneis lagerten, überführt und dabei schockgefroren

3.1.2 Expression von humanem membranständigem IgE auf Mauszellen

Da es nicht möglich ist IgE-positive B-Zellen aus dem peripheren Blut aufzureinigen, mussten IgE-positive Zellen in vitro hergestellt werden. Da die Expression der Epsilon-Schwere-Kette für sämtliche anschließenden Versuche ausreicht, sollte diese in eine geeignete Zelllinie stabil transfiziert werden. Dazu eignet sich die Maus J558L-Zellen sehr gut, da sie nur eine Kappa-Leichte-Kette exprimiert. Die Klonierung des humanen IgE wurde in Kapitel 3.2.1.11 beschrieben. Dieses Gen wurde mit Hilfe entsprechender Restriktions-Enzyme in einen pEF-NPT-Vektor eingefügt. Die Grundlage dieses Vektors ist der Promotor für den Elongations-Faktor-1-alpha (EF-Promotor). Aufgrund dieses Promotors wird das „Gen von Interesse“ (GvI) in nahezu jeder Zelle abgelesen. Das Enzym Neomycin-Phospho-Transferase (NPT) verleiht den Zellen, welche das Konstrukt erfolgreich ins Genom integriert haben, eine Resistenz gegenüber dem sonst toxischen Genetizidin (G418). Zwischen dem GvI und dem NPT liegt eine ribosomale Reiniitierungsstelle (IRES), welche die Translation von zwei Proteinen auf einer mRNA ermöglicht. Die Aufnahme des linearisierten Konstruktes wird durch eine Elektroporation erreicht, bei der es kurzzeitig zu kleinen Poren in der Membran kommt durch die das Konstrukt in die Zelle dringen kann. Durch Zugabe von G418 in das entsprechende Medium, können so die Zellen selektioniert werden, welche das Konstrukt erfolgreich in ihr Genom eingebaut haben und dieses auch translatieren.

Protokoll:

- 100 µg des Konstruktes wurden mit 100 Einheiten des Enzyms Nde I linearisiert (Kontrolle erfolgte im Agarosegel)
- Die DNA wurde mit Hilfe eines Qiafilter Plasmid Mini Kit (Qiagen) von dem Enzym getrennt und die DNA in 800 µl PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei) aufgenommen
- Dicht gewachsene J558L-Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche (circa 10⁷ Zellen) wurden bei 500 g für 5 Minuten bei 37°C zentrifugiert
- Das Zellpellet wurde zweimal mit 30 ml PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei) gewaschen und 500 g für 5 Minuten bei 37°C zentrifugiert
- Das Zellpellet wurde anschließend in den 800 µl DANN/PBS-Lösung resuspendiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt

- Nach fünf Minuten Inkubation wurden sie mittels eines Genepulsers (260 V, 960 μ F) elektroporiert.
- Die Zellen wurden anschließend in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und für 48 Stunden in Vollmedium kultiviert
- Zur Selektion wurde dem Medium G418 in einer Konzentration von 1000 μ g/ml zugefügt und die Zellen anschließend subkloniert

3.1.3 Produktion des IgExCD3 Antikörpers durch CHO-Zellen

1991 wurde ein Expressionssystem beschrieben, welches auf der stabilen Transfektion von „Chinese Hamster Ovary“ Zellen (CHO) beruht [95]. Dieses eukaryontische Expressionssystem macht sich den Mangel von Di-Hydro-Folat-Reduktase (DHFR) in diesen Zellen zunutze. Der entscheidende Stoffwechselschritt ist in Abbildung 23 zu sehen. Die Klonierung des bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörpers wurde in Kapitel 3.2.1.10 beschrieben [96]. Dieses Gen wurde mit Hilfe entsprechender Restriktions-Enzyme in einen pEF-DHFR-Vektor eingefügt. Die Grundlage dieses Vektors ist der Promotor für den Elongations-Faktor-1-alpha (EF-Promotor). Aufgrund dieses Promotors wird das „Gen von Interesse“ (Gvl) in nahezu jeder CHO-Zelle abgelesen. Die DHFR verleiht den Zellen, welche das Konstrukt erfolgreich ins Genom integriert haben, die Fähigkeit in Abwesenheit von Nukleotiden zu überleben. Zusätzlich kann durch die Zugabe von Methotrexat (MTX) eine Amplifikation des Gvl erreicht werden. Dies ermöglicht eine ribosomale Reiniertungsstelle (IRES), welche zwischen dem Gvl und dem DHFR liegt und die Translation von zwei Proteinen auf einer mRNA ermöglicht. Die Aufnahme des linearisierten Konstruktes wird durch eine Elektroporation erreicht, bei der es kurzzeitig zu kleinen Poren in der Membran kommt durch die das Konstrukt in die Zelle dringen kann. Durch Entzug der Nukleotide und Zugabe von MTX in verschiedenen Konzentrationsstufen kommt es zu einer Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen und zu einer gesteigerten Produktion des bispezifischen Antikörpers.

Protokoll:

- 100 μ g des Konstruktes wurden mit 100 Einheiten des Enzyms Nde I linearisiert (Kontrolle erfolgte im Agarosegel)
- Die DNA wurde mit Hilfe eines Qiafilter Plasmid Mini Kit (Qiagen) von dem Enzym getrennt und die DNA in 800 μ l PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei) aufgenommen
- CHO-Zellen, die in einer 75 cm² Kulturflasche (circa 10⁷ Zellen) dicht gewachsen waren, wurden mit 2 ml 0,02 %iger EDTA-PBS-Lösung von der Flasche abgelöst
- die Zellen wurden in 40 ml PBS aufgenommen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 g für 5 Minuten bei 37°C zentrifugiert
- Das Zellpellet wurde zweimal mit 30 ml PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei) gewaschen und bei 500 g für 5 Minuten bei 37°C zentrifugiert

- Das Zellpellet wurde anschließend in den 800 µl DANN/PBS-Lösung resuspendiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt
- Nach fünf Minuten Inkubation wurden sie mittels eines Genepulsers (260 V, 960 µF) elektroporiert.
- Die Zellen wurden anschließend in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und für 48 Stunden in Vollmedium, welches mit Nukleotiden supplementiert war, kultiviert
- Zur Selektion wurden die leicht konfluend gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen und Medium ohne Nukleotide zugegeben
- für die erste Amplifikationsrunde wurde ein Teil dieser selektionierten Zellpopulation in eine andere 75 cm² Kulturflasche überführt und MTX in einer Endkonzentration von 20 nM zugefügt
- für die zweite Amplifikationsrunde wurde MTX schließlich in einer Endkonzentration von 100 nM zugefügt

3.1.4 Subkultivierung und Kryo-Konservierung von Kulturzellen

Die Medien von Zellen (HyQ, DMEM, RPMI oder alpha-MEM) enthalten fötales Kälberserum (FCS) zu einem Anteil von 10 %. Daneben werden noch Antibiotika, wie zum Beispiel Penicillin/Streptomycin zu jeweils 100 Einheiten/ml, und L-Glutamin bei Bedarf zugesetzt. Die Zellen werden bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Das Passagieren von Zellen (Subkultivierung) hängt davon ab, ob die Zellen an die Kulturflasche anhaften oder nicht.

Protokoll:

- Adhärente Zellen werden durch Zugabe von 1 ml 0,02 %iger EDTA-PBS-Lösung von der Flasche gelöst und anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in welches bereits 40 ml PBS vorgelegt wurde.
- Nach Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C wird der Überstand dekantiert.
- Das Zellpellet wird anschließend in 5 ml Medium resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau gezählt.
- Ein Teil der Zellen wird in einer neuen 75 cm² Kulturflasche überführt.
- Suspensions-Zellen werden passagiert, in dem man 20 ml der Kultur bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau gezählt und entsprechend dem Bedarf in eine neue 75 cm² Kulturflasche überführt.

Zur Lagerung und Sicherung von Zellen können diese eingefroren werden. Dies geschieht entweder bei -80°C in einer Ultratiefkühltruhe oder bei -150°C in der Gasphase von flüssigem Stickstoff. Als Gefriermedium dient eine Mischung aus 10% DMSO und 90% FCS.

Protokoll:

- 4×10^6 Zellen werden in PBS gewaschen und bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 4 ml Gefriermedium resuspendiert
- jeweils 1 ml dieser Suspension wird in ein 1 ml Kryoröhrchen überführt und in eine Styroporschachtel gegeben.
- diese wird zuerst bei -80°C gelagert, wobei es durch die Styroporschachtel zu einer gleichmäßigen verzögerten Einfrieren kommt
- zur Langzeitlagerung können die Kryoröhrchen nach 5 Tagen in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt werden

3.1.5 Nachweis der Bindung des bispezifischen Antikörpers auf Zellen

Um die Bindung des bispezifischen IgExCD3 Antikörpers an Oberflächenantigene von Zellen zu analysieren, eignet sich die Durchfluß-Zytometrie. Mit Hilfe dieser Technik kann analysiert werden, ob und in welchem Maße der Antikörper sein Antigen auf der Oberfläche von Zellen erkennt. Der Nachweis des bispezifischen Antikörpers erfolgt dabei durch einen zweiten Antikörper, der den Histidin-Schwanz am Ende des IgExCD3 erkennt. Der Nachweis-Antikörper ist mit einem Fluorochrome markiert, welches bei der Anregung durch einen Laser definierter Wellenlänge eine charakteristische Strahlung aussendet. Die ausgesendete Strahlung wird von Detektoren erfasst und an einem Computer grafisch wiedergegeben. Je nach Versuchsansatz können dabei 1-4 Fluorochrom-markierte Antikörper zum Einsatz.

Protokoll:

- Die Zellen, die das erwünschte Antigen präsentieren, werden gewaschen und bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- Der Überstand wird dekantiert, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in einer Neubauerzählkammer die Zahl der lebenden Zellen bestimmt
- 1×10^6 Zellen werden in eine 96-Loch-Platte, mit V-Boden, überführt und diese bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- der Überstand wird durch kurzes Kippen der Platte entfernt und das Zellpellet durch Schütteln aufgelockert
- 30 μl des bispezifische IgExCD3 Antikörpers werden anschließend darauf in entsprechenden

- Verdünnungsstufen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- zweimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C
 - Inkubation mit dem Nachweis-Antikörper in entsprechender Konzentration für 30 Minuten bei Raumtemperatur
 - zweimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C
 - gegebenenfalls Inkubation mit Sekundär-Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur
 - zweimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C
 - Resuspendierung des Pellets in 100 ml einer 1 %igen Formaldehyd-PBS-Lösung
 - Analyse der Färbung mit Hilfe der Durchfluß-Zytometrie am Gerät FACScan der Firma Becton Dickinson

3.1.6 Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut

Für einige Experimente ist es nötig humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut aufzureinigen. Man erreicht dies durch den Einsatz eines Ficoll-Gradienten, der die Zellpopulationen des Blutes aufgrund ihrer Dichte trennt. Die Erythrozyten und Granulozyten fallen dabei als Pellet aus, während die mononukleären Zellen in einer sogenannten Interphase angereichert werden. Die Zellzahl wird durch eine Vitalfärbung mit Trypanblau bestimmt und anschließend entsprechend dem weiteren Experiment behandelt. Als Ausgangsmaterial wurde hier frisch entnommenes Vollblut von gesunden Patienten verwendet. Zur Entfernung der Thrombozyten wurde dem Ficoll-Dichtegradienten ein extra Waschschrift mit Hanks-Salz vorgeschaltet.

Protokoll:

- 25ml Vollblut wurden mit 25 ml Hanks-Salz in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 200 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- Die obere Phase enthält die Thrombozyten und wird entfernt. Die untere Phase wird auf 15 ml Ficoll langsam überschichtet, welches zuvor in ein 50 ml Zentrifugen-röhrchen vorgelegt wurde, und bei 800 g für 25 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- Die Interphase wird vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Zentrifugen-röhrchen übergeben. Anschließen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 600 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- Der Überstand wird dekantiert und das Pellet erneut mit 50 ml PBS gewaschen. Zentrifugation bei 600 g für 10 Minuten bei 4°C
- Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert
- Die Zahl der lebenden Zellen wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau

bestimmt

- Weiteres Vorgehen entsprechend den anschließenden Experimenten

3.1.7 Nachweis der Aktivierung von T-Lymphozyten mittels Expression von Oberflächenmarkern

Bei einer Aktivierung von T-Lymphozyten kommt es zu Veränderungen von Oberflächenmolekülen im Sinne einer verstärkten beziehungsweise verminderten Expression. Bei einigen dieser Moleküle sind relativ klassische Verläufe bekannt. Bei zwei dieser Strukturen handelt es sich um CD25 und CD69. Das CD69 ist ein sehr früher Marker für Aktivierung, welcher circa 24-36 Stunden nach Aktivierung hochreguliert wird. Bei CD25 kommt es erst nach 72-96 Stunden zu einer verstärkten Expression. Mit Hilfe von Fluorochrom-markierten Antikörpern und der Durchfluß-Zytometrie können diese Oberflächenmodulationen festgestellt und grafisch wiedergegeben werden. Um die Aussagekraft über die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten durch den bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörper während der Eliminierung IgE-positiver B-Zellen zu erhöhen, wurde parallel dazu die Proliferation mit CFSE (3.1.7) und die Ausschüttung von Zytokinen mit einem ELISA (3.1.9) in einem Ansatz gemessen.

Protokoll:

- Die isolierten und gewaschenen PBMZ werden je nach Versuchsaufbau in einer 96-Loch-Platte entsprechend dem Ansatz für 24 oder 72 Stunden kultiviert
- Danach wurde die Platte bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in diesem Versuch für eine parallele Analyse abpipettiert (siehe 3.1.9)
- Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit PBS gewaschen und bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- Das Pellet wurde danach in 200 µl PBS resuspendiert und jeweils 50 µl in ein Loch einer 96-V-Platte gegeben
- die V-Platte mit den Zellsuspensionen wurde anschließend bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- das Pellet wurde durch schütteln gelockert und die Antikörper dazupipettiert. Dabei wurde in ein Loch entweder eine Kombination aus
 - 1) CD4/APC, CD69/FITC und CD25/PE-Cy5 oder
 - 2) CD8/APC, CD69/FITC und CD25/PE-Cy5dazugegeben und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert
- die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert
- das Zellpellet wurde zur Fixation in einer 1 %igen Formaldehyd-PBS-Lösung resuspendiert

- Die Analyse erfolgte computergestützt an einem FACScalibur der Firma Becton Dickinson

3.1.8 Nachweis der Aktivierung von PBMC mittels Freisetzung von Zytokinen

Aktivierete T-Lymphozyten schütteten Zytokine in ihr umgebendes Milieu aus. Abhängig vom ausgeschütteten Zytokin kommt es dabei zu unterschiedlichen Effekten in der Umgebung der T-Zellen. Eine Liste der untersuchten Zytokine, ihre Wirkung und welche Zellen diese freisetzen ist in Tabelle 24 dargestellt. Die Zytokine können mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) nachgewiesen werden. Dazu wurden kommerzielle ELISA-Kits der Firma Becton Dickinson verwendet. Um die Aussagekraft über die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten durch den bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörper während der Eliminierung IgE-positiver B-Zellen zu erhöhen, wurde parallel dazu die Proliferation mit CFSE (3.1.7) und die Expression von Aktivierungsmolekülen mit der Durchfluß-Zytometrie (3.1.8) in einem Ansatz gemessen.

Protokoll:

- ELISA-Platten wurden über Nacht mit 100 µl der entsprechenden „Fang-Antikörper“-PBS-Lösung beschichtet.
- Überstand wurde weggekippt und die Platte mit einer Blocklösung über Nacht inkubiert, um nicht beschichtete Teile der Platten abzudecken. Vor deren Einsatz wurden die Platte zweimal mit PBS gewaschen
- von dem gleichen Ansatz wie in 3.1.8 wurden 200 µl der Überstände abpipettiert
- jeweils 50 µl dieser Überstände wurden auf die beschichteten ELISA-Platten gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- die Platten wurden zweimal mit PBS gewaschen
- anschließend wurde die Platte mit 100 µl der „Nachweis-Antikörper“-PBS-Lösung inkubiert. Die Nachweis-Antikörper sind dabei mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (POX) markiert
- die Platten wurden zweimal mit PBS gewaschen
- Inkubation mit 200 µl des Substrats ABTS, welches durch POX in eine farbige Lösung umgesetzt wird, welche mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden kann

3.1.9 Nachweis der Zytotoxizität mit Hilfe des ⁵¹Chrom Tests

Ein Verfahren, um die zytotoxische Aktivität gegenüber Zellen zu messen, ist der ⁵¹Chrom Freisetzungstest. Dazu werden die potentiellen Zielzellen mit radioaktivem Natrium-Chromat

beladen. Da in dieser Arbeit unterschiedliche Zielzellen verwendet wurden, werden hier nur allgemein Zielzellen (Z) erwähnt. Bei einer Zerstörung der Zielzellen wird das ⁵¹Chrom freigesetzt und kann im Überstand mittels einer Gammazählers nachgewiesen werden. Abhängig vom Versuchsaufbau kann dies nach einer beliebigen Zeit durchgeführt werden. Die ermittelte Anzahl der Zerfälle pro Minute wurde gemäß der Formel in Tabelle 23 verrechnet. Dadurch kann die effektive prozentuale Lyse bestimmt werden. In einigen Versuchen wurden unstimulierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut als Effektorzellen (E) verwendet. Um in einigen Ansätzen eine mögliche Nebenwirkung des IgExCD3 Antikörpers offenzulegen, wurden vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten eingesetzt.

Protokoll:

- Zielzellen werden schonend gewaschen und in 50-100 µl fötales Kälberserum (FCS) resuspendiert
- Zugabe von 50-100 µl einer Natrium-Chromat-RPMI-Lösung (Aktivität des ⁵¹Chrom-Isotops lag bei circa 37×10^5 Becquerel) und Inkubation bei 37°C für 45 Minuten
- zweimaliges Waschen der Zellen in RPMI
- 1×10^6 Zielzellen in 100 µl RPMI werden in eine 96-Loch-Platte aliquotiert
- 1×10^5 Effektorzellen in 100 µl RPMI werden dazupipettiert (je nach Ansatz unstimulierte PBMZ oder vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten)
- 50 µl des bispezifische IgExCD3 Antikörpers, beziehungsweise des EpCAMxCD3 Kontroll-Antikörpers, wurden in unterschiedlichen Konzentrationen dazugegeben. Zur Bestimmung des Maximalwertes wurde 50 µl einer 2,5 %igen Triton-X-100-Lösung und zur Bestimmung des Leerwertes 50 µl RPMI dazugegeben
- Inkubation der Ansätze bei 37°C und 5 % CO₂ für 4-24 Stunden
- pro Ansatz wurden 50 µl des Überstandes entnommen und in ein geeignetes Zählrohr für den Gammazähler überführt.
- Die Anzahl der Zerfälle in einer Minute wurde bestimmt und mit Hilfe der Formel in Tabelle 23 verrechnet

3.1.10 Nachweis der Degranulation von Mastzellen

In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob es durch den bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörper zu einer Degranulation von Mastzellen kommt. Da es sich bei Mastzellen um Gewebszellen handelt sind diese aus dem peripheren Blut nicht aufzureinigen. Von L.Vogel wurde die Ratten-Mastzell-Zelllinie RBL-2H3 zur Verfügung gestellt, welche mit der humanen Alpha-Kette des FcEpsilon-Rezeptor-I stabil transfiziert wurde. Diese Zellen können somit mit humanem IgE beladen werden und mimen gewissermaßen humane Mastzellen. Bei einer Degranulation der RBL-

2H3-Zellen kommt es zur Freisetzung verschiedener Moleküle. Unter anderem wird das Enzym Beta-Hexosaminidase ausgeschüttet, was man sich zunutze machen kann. In Anwesenheit dieses Enzyms kommt es zur Umsetzung des farblosen Substrats p-Nitrophenyl-Acetyl- β -D-Glucosamin (PNAG) in ein nachweisbares Produkt 4-Nitrophenyl. Die Menge des freigesetzten 4-Nitrophenyl kann im Photometer bei 405 nm bestimmt werden und erlaubt einen Rückschluss auf die Degranulation von Mastzellen.

Protokoll:

- Die RBL-2H3-Zellen werden mit 1 ml einer 0,02 %iger EDTA-PBS-Lösung von einer 75 cm² Kulturflasche abgelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt in welches 40 ml PBS vorgelegt wurde
- nach Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C wird der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert
- die Zahl der lebenden Zellen wird mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau bestimmt
- jeweils 1×10^5 Zellen werden in 100 μ l RPMI pro Loch einer 96-Loch-Platte gegeben und für 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert
- humanen lösliches IgE wurde mit RPMI gemischt, Konzentration 25 μ g/ml
- 100 μ l dieser IgE-RPMI-Mischung wurden zu den RBL-Zellen pipettiert und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Kontrolle wurde die Hälfte der Zellen ohne lösliches IgE inkubiert
- der Überstand wurde abgekippt und die Zellen zweimal mit Tyrode-Puffer gewaschen
- zu den Ansätzen, die isolierte PBMZ benötigten, wurden 10×10^5 CD3-positive T-Zellen in 50 μ l Tyrode-Puffer dazugeben. Zu den Ansätzen, die keine PBMZ benötigten, wurde nur Tyrode-Puffer dazugegeben
- direkt im Anschluß wurden 50 μ l des IgExCD3 Antikörpers, welcher ebenfalls in Tyrode-Puffer gelöst wurden, dazupipettiert
- als positive Kontrolle wurde statt T-Zellen und IgExCD3 Antikörper ein monoklonaler anti-IgE Antikörper, gelöst in Tyrode-Puffer, dazugegeben
- zur Bestimmung der Maximallyse wurde 100 μ l einer 1 %ige Triton-X-100-Lösung beziehungsweise zur Bestimmung der Spontanlyse nur Tyrode-Puffer dazupipettiert
- Inkubation der Ansätze bei 37°C und 5 % CO₂ 1 Stunde
- 30 μ l des Überstandes wurden entnommen und in eine 96-Loch-Platte überführt
- zu diesen Aliquots wurde jeweils 50 μ l der PNAG-Substrat-Lösung dazugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert
- anschließend Zugabe von 100 μ l Stopplösung und Messung des Substratumsatzes im

Photometer bei 405 nm

- die prozentuale effektive Degranulation wurde analog zur Formel in Tabelle 23 berechnet

3.2 Molekularbiologische Methoden

Viele molekularbiologische Arbeiten werden mit toxischen Reagenzien durchgeführt. Einige sind nachgewiesenermaßen kanzerogen, weshalb besonders mit diesen Stoffen sehr auf sauberes arbeiten geachtet werden muss. Handschuhe sind selbstverständlich unverzichtbar.

3.2.1 DNA-Techniken

Die DNA stellt quasi den Baustein des Lebens dar. Sie ist prinzipiell sehr stabil und verträgt auch hohe Temperaturen. Genomische DNA ist bedingt durch ihre Länge anfällig gegenüber Scherkräften. Daher ist bei dem Umgang mit genomischer DNA darauf zu achten, vorsichtig zu pipettieren und Pipettenspitzen mit größer Öffnung zu benutzen. Außerdem sollte sie deswegen auch nicht eingefroren werden sondern bei 4°C gelagert werden. Plasmid-DNA ist kürzer und daher auch stabiler. Diese kann zum Lagern bei -20°C eingefroren werden.

3.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Standard-Verfahren, um bestimmte DNA-Regionen selektiv zu amplifizieren. Ermöglicht wird dies vor allem durch das Enzym Taq-Polymerase (Taq-Pol). Dabei handelt es sich um eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde und mittlerweile als rekombinantes Protein erhältlich ist. Zur Amplifikation werden folgende Reagenzien benötigt:

- Matrix-DNA, nur auf dieser Vorlage kann eine Amplifikation stattfinden
- Taq-Pol ist hitzestabil und in der Lage an ein vorhandenes DNA-Fragment Desoxy-Nukleotid-Triphosphate (dNTPs) anzubauen, komplementär zur Matrix-DNA
- Zwei Oligonukleotide, die an das jeweilige 5'- und 3'-Ende der bestimmten DNA-Region komplementär binden. Diese haben meistens eine Länge von 15-25 Nukleotiden und werden benötigt, weil eine de novo Synthese nicht möglich ist. Außerdem ist es möglich mit diesen Schnittstellen oder Mutationen in die DNA einzufügen, um sie zum Beispiel in einen Vektor zu klonieren
- dNTPs, sind energiereiche Verbindungen und dienen als Substrat für die Taq-Pol
- ein entsprechender Puffer, der durch seine Eigenschaften einen optimalen Reaktionsablauf ermöglicht

Tabelle 8 Allgemeine Angaben zu den Reagenzien, die in einer PCR eingesetzt werden. Ein möglicher Ablauf eines PCR-Programms. Die optimalen Konzentrationen der Reagenzien und der Ablauf des Programms müssen für jede PCR neu etabliert werden.

| | | | | | |
|----------|------------|---------------|----------|----------------|--|
| cDNA | 0,1-500 ng | Denaturierung | 95 °C | 5 Minuten | |
| Taq-Pol | 1 U | | | | |
| 5'-Oligo | 0,1-0,5 µM | Denaturierung | 95 °C | 20-30 Sekunden | Ein Zyklus bestehend aus diesen drei Schritten wird 25-35 mal wiederholt |
| 3'-Oligo | 0,1-0,5 µM | Anlagerung | 55-65 °C | 20-40 Sekunden | |
| dNTP | 50-500 ng | Verlängerung | 72 °C | 30-60 Sekunden | |
| | | Verlängerung | 72 °C | 5 Minuten | |

Tabelle 8 zeigt Angaben zu den eingesetzten Reagenzien. Diese müssen für jede PCR neu etabliert werden. Dies schließt auch das PCR-Programm mit ein. Die Werte in der Tabelle dienen lediglich der Orientierung. Das erhaltene PCR-Produkt wird bei 4°C gelagert.

3.2.1.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Ein Standard-Verfahren um DNA nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen ist die Gelelektrophorese. Diese kann entweder unter Verwendung von Agarose- oder Acrylamid-Gelen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden Agarose-Gele verwendet, welche zu präparativen oder analytischen Zwecken eingesetzt werden können. Dabei unterscheidet sich die verwendete Agarose in ihrer Schmelztemperatur. Präparative Agarose schmilzt bereits bei niedrigen Temperaturen und kann somit zur weiteren Verarbeitung der DNA dienen (siehe 3.2.1.3). Zur Visualisierung der DNA wird dem Gel Ethidiumbromid zugegeben, welches mit der DNA interkaliert und bei Betrachtung unter UV-Licht fluoresziert. Das Molekulargewicht der DNA wird dadurch bestimmt, dass ein Größenstandard mit aufgetragen wird.

Protokoll:

- 0,75-2,0 g Agarose werden mit TBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und in einer Mikrowelle unter gelegentlichem Mischen aufgeköcht
- während das Gel langsam abkühlt werden 20 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) darin vermischt solange das Gel noch flüssig ist
- die Masse wird in eine Gelkammer gegossen, in welcher bereits ein Kamm eingesetzt ist, der die benötigten Geltaschen formt
- nach Erhärten des Gels, wird der Kamm entnommen, und der Gelbehälter mit TBE-Puffer soweit aufgefüllt, dass das Gel benetzt ist
- die Proben werden mit einem Proben-Puffer vermengt und in die Taschen pipettiert
- die Elektrophorese wird, abhängig von dem Molekulargewicht der Probe, bei 80-160 V für 30-

60 Minuten durchgeführt

- die Auftrennung kann unter einer UV-Lampe beurteilt werden und wird mit einer Kamera dokumentiert

3.2.1.3 Isolation von DNA aus Agarose-Gelen

Nach einer Gelelektrophorese (siehe 3.2.1.2) besteht die Möglichkeit, die aufgetrennten DNA-Fragmente aus dem Gel zu isolieren. Diese kann mit einem sauberen und scharfen Skalpell unter einer UV-Lampe ausgeschnitten und anschließend verarbeitet werden. Dazu verwendet man eine „Low-Melt-Agarose“, welche bereits bei niedrigen Temperaturen schmilzt und so die DNA wieder freigibt. Das Verfahren kann eingesetzt werden, um zum Beispiel PCR-Produkte nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und DNA-Fragmente falscher Größe auszuschließen. Dadurch erreicht man eine höhere Effektivität in der späteren Klonierung.

Protokoll:

- 0,75-2,0 g Low-Melt-Agarose werden mit TBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und in einer Mikrowelle unter gelegentlichem Mischen aufgeköcht
- während das Gel langsam abkühlt werden 20 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) darin vermischt solange das Gel noch flüssig ist
- die Masse wird in eine Gelkammer gegossen, in welcher bereits ein Kamm eingesetzt ist, der die benötigten Geltaschen formt
- nach Erhärten des Gels, wird der Kamm entnommen, und der Gelbehälter mit TBE-Puffer soweit aufgefüllt, dass das Gel benetzt ist
- die Proben werden mit einem Proben-Puffer vermengt und in die Taschen pipettiert
- die Elektrophorese wird, abhängig von dem Molekulargewicht der Probe, bei 80-160 V für 30-60 Minuten durchgeführt
- die Auftrennung kann unter einer UV-Lampe beurteilt werden und wird mit einer Kamera dokumentiert
- die gewünschte DNA-Bande wird unter einer UV-Lampe mit einem sauberen und scharfen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt
- die Auflösung des Gels und die anschließende Aufreinigung der DNA wurde mit Hilfe eines QIAquick Gel Extraction Kits entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt

3.2.1.4 Amplifikation von Plasmid-DNA durch Transformation kompetenter *Escherichia coli*

Um zirkuläre DNA wie zum Beispiel Plasmide zu amplifizieren werden kompetente Bakterien verwendet, welche die Fremd-DNA durch Stimuli wie Hitze oder Elektroschock aufnehmen können.

Plasmide kommen natürlicherweise frei in Bakterien vor und werden unabhängig von den Bakterien-Chromosomen vervielfältigt. Diese können in einer Kopienzahl von ein paar Hundert pro Zelle (low copy) oder sogar bis zu ein paar Tausend (high copy) vorkommen. Neben Genabschnitten, die für die Replikation in Bakterien benötigt wird, befinden sich auf dem Plasmid unter anderem das „Gen von Interesse“ (Gvi) und Gene für Antibiotika-Resistenz, die eine Selektion der Bakterien ermöglichen. Dadurch lassen sich Plasmide sehr effektiv in großen Mengen herstellen und mit geeigneten Mitteln aus den Bakterien isolieren.

Protokoll:

- pro Transformation werden 2 LB_{Amp}-Platten benötigt. Dazu wird 100 ml LB-Medium mit 1,5 g Agar versetzt und aufgekocht. Wenn die Flüssigkeit abgekühlt ist werden 200 µl Ampicillin (Konzentration 50 mg/ml) vorsichtig eingerührt und in 5-10 Petrischalen vorsichtig gegossen
- kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut, das Plasmid wird untergemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert
- Gefäß wird anschließend für 5 Minuten in ein 37°C Wasserbad gestellt
- 450 µl LB-Medium werden dazugegeben und für 1 Stunde bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert
- 50 beziehungsweise 500 µl der Bakteriensuspension werden jeweils auf eine LB_{Amp}-Platten mittels Drygalski-Spatel aufgetragen
- die Platten werden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Positive Klone können am nächsten Tag gepickt und weiter verarbeitet werden

3.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Bakterien können Plasmide, die sich frei im Zellinneren befinden, unabhängig von ihren eigenen Chromosomen vermehren. Da die Anzahl der Plasmide pro Bakterium ein paar Hundert (low copy Plasmid) oder ein paar Tausend (high copy Plasmid) beträgt und sich Bakterien sehr schnell vermehren, stellt dieses Verfahren eine sehr einfache Methode dar, um Plasmide in großen Mengen herzustellen. Mit Hilfe verschiedener Verfahren können die entsprechenden Plasmide aus den Bakterien isoliert werden.

Protokoll:

- Für eine sogenannten Midi-Präparation verwendet man entweder 25 ml LB-Amp-Medium für high copy Plasmide oder 100 ml für low copy Plasmide. Die Animpfung des Medium erfolgt entweder über eine Kolonie von einer LB_{Amp}-Platten oder aus einer eingefrorenen bereits bestehenden Kultur
- im Thermoschüttler werden diese über Nacht bei 37°C inkubiert
- Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 6000 g für 15 Minuten bei 4°C

- die Präparation an sich wurde mit einem Qiagen Plasmid Midi Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt

3.2.1.6 Enzymatischer Verdau von dsDNA und cDNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen (RE) sind Enzyme von Bakterien, die DNA zerschneiden (verdauen) und eigentlich der Abwehr (Restriktion) von Phagen dienen. Heutzutage sind sie eine der wichtigsten Hilfsmittel in der Molekularbiologie. Es sind drei Klassen von Restriktionsendonukleasen bekannt. Die Enzyme der Klasse II sind die am häufigsten eingesetzten. Sie haben folgende Eigenschaften, die sie in der Anwendung so wertvoll machen:

- 1) sie besitzen eine Erkennungssequenz, innerhalb derer auch geschnitten wird
- 2) die Erkennungssequenzen bestehen aus 4-8 Nukleotiden
- 3) die Erkennungssequenzen sind spiegelbildlich ("palindromisch")
- 4) sie benötigen außer Magnesium-Ionen keine weiteren Effektoren

Bei dem Verdau von DNA können Fragmente entstehen die glatte oder überstehende Enden besitzen abhängig von der jeweiligen RE. Bei einem Verdau können auch zwei Enzyme mit Unterschiedlichen Schnittstellen und Schnittmustern eingesetzt werden. Dies ermöglicht eine gerichtete Klonierung zum Beispiel von Genen in Plasmide. Die Bezeichnung der Restriktionsendonukleasen werden in der Regel nach ihrem Ursprung benannt. Am Beispiel von Eco RI: E (Escherichia) =Gattung, co (coli) = Art, R = Stamm, I erste RE.

Protokoll:

- das Restriktionsenzym wird mit seinem entsprechendem Puffer in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt
- in H₂O gelöste DNA wird dazupipettiert. Dabei ist zu beachten, dass eine Einheit RE 1 µg DNA in einer Stunde verdaut
- anschließend wird der Agarose-Ladepuffer dazugegeben und der Ansatz zur Erfolgskontrolle und Auftrennung der Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetragen (siehe 3.2.1.2)

3.2.1.7 Ligation

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor zu integrieren, müssen beide zuerst mit Hilfe von Restriktionsenzymen (RE) geschnitten werden. Dabei ist es von Vorteil zwei RE einzusetzen, die zu unterschiedlichen inkompatiblen Enden führen, um eine Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern und damit die Effektivität der Ligation zu erhöhen. In diesem Falle kommt es nur zu einer Schließung des Vektors, wenn das Fragment mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde. Die T4-Ligase, die dazu verwendet wird, ist ein ATP-abhängiges Enzym, welches zu einer Veresterung zwischen dem 5'-Phosphat-Ende und dem 3'-Hydroxy-Ende führt.

Protokoll:

- die T4-Ligase wird mit ihrem entsprechenden Puffer in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt
- in H₂O gelöstes DNA-Fragment und Vektor werden dazupipettiert. Dabei ist zu beachten, dass eine Verhältnis von 1:1 die Effektivität optimiert. Das Gesamtvolumen eines Ligations-Ansatzes kann zwischen 10-20 µl variieren
- Die Ligation erfolgt in einem Wasserbad bei 14°C über Nacht. Das Produkt kann anschließend entweder direkt für eine Transformation genutzt werden oder bei -20°C eingefroren werden

3.2.1.8 Sequenzierung mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger

Zur Sequenzierung von DNA-Fragment kommen unterschiedliche Techniken zum Einsatz. Das am meisten angewendete Verfahren ist die Strangabbruchmethode nach Sander. Sämtliche DNA-Fragment, die in dieser Arbeit kloniert wurden, wurden von der Firma SequiServe (Vaterstetten) in Auftragsarbeit durchgeführt. Die jeweiligen erhaltenen Sequenzen wurden mit den Sequenzen in der Literatur auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.2.1.9 Klonierung der variablen Regionen des anti-IgE Antikörpers

Die Beschreibung und der Zweck der Klonierung der variablen Regionen des anti-IgE Antikörpers wurde in Kapitel 4.2 bereits erläutert. Dort findet sich auch eine grafische Darstellung der Vorgehensweise (Abbildung 34). An dieser Stelle soll lediglich das experimentelle Vorgehen beschrieben werden.

Protokoll:

- die Isolierung der Gesamt-RNA aus einem Lysat des Hybridoms [97] wurde in Kapitel 3.2.2.1 erläutert
- die Reverse Transkription der isolierten Gesamt-RNA in cDNA wurde in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben
- basierend auf dieser cDNA wurde für die VL-Kette zuerst eine PCR mit dem Primer-Paar 5'-VL-anti-IgE und 3'-VL-anti-IgE durchgeführt. Anschließend wurde auf dem Produkt der ersten PCR eine zweite mit dem Primer-Paar 5'-VL-anti-IgE-GSL und 3'-VL-anti-IgE-BspE I ausgeführt. Die Methode der PCR ist in Kapitel 3.2.1.1 erläutert. Die Sequenz der eingesetzten Primer ist in Kapitel 2.6 gezeigt
- für die VH-Kette wurde auf der cDNA zuerst eine PCR mit dem Primer-Paar 5'-VH-anti-IgE und 3'-VH-anti-IgE durchgeführt. Auf dem erhaltenen PCR-Produkt wurde anschließend eine zweite PCR mit dem Primer-Paar 5'-VH-anti-IgE-BsrG I und 3'-VH-anti-IgE-GSL ausgeführt. Die Methode der PCR ist in Kapitel 3.2.1.1 erläutert. Die Sequenz der eingesetzten Primer ist in Kapitel 2.6 gezeigt

- um die VH- und die VL-Kette zu verbinden wurden die jeweiligen PCR-Produkte aus der zweiten Runde in einem Gefäß zusammengeführt und eine dritte PCR mit dem Primer-Paar 5'-VH-anti-IgE-BsrG I und 3'-VL-anti-IgE-BspE I durchgeführt
- das Konstrukt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen BsrG I und BspE I in einen entsprechend präparierten Bluescript-Vektor subkloniert. Methode siehe Kapitel 3.2.1.6 und 3.2.1.7
- das Plasmid wurde anschließend in Bakterien vermehrt (siehe Kapitel 3.2.1.4) und aus diesen isoliert (siehe Kapitel 3.2.1.5)
- das Konstrukt wurde anschließend in Auftragsarbeit von der Firma SequiServe sequenziert und auf seine Richtigkeit überprüft

3.2.1.10 Konstruktion des bispezifischen single-chain Antikörpers

Die Konstruktion des bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörpers stellt den Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Über die Hintergründe, das Einsatzgebiet und die Erwartungen, die an diesen speziellen Antikörper gerichtet sind, wurde in der Einleitung, den Ergebnissen, der Diskussion und auch in der Zusammenfassung berichtet. Zur Konstruktion des bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörpers bedarf es vieler verschiedener Verfahren, die in einigen Kapitel dieser Arbeit bereits erläutert wurden. An dieser Stelle soll deswegen nur auf Fertigstellung des Konstruktes eingegangen werden.

Protokoll:

- die Klonierung der VH- und der VL-Regionen des anti-IgE Antikörpers wurden in Kapitel 3.2.1.9 erläutert
- bei den VH- und VL-Regionen des anti-CD3 Antikörpers konnte auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe P. Kufer zurückgegriffen werden [98]
- mit Hilfe entsprechender Restriktionsenzyme (Methode 3.2.1.6) und der T4-Ligase (Methode 3.2.1.7) wurden die VH- und VL-Regionen beider Antikörper in einem pEF-DHFR-Vektor zusammengefügt (siehe Abbildung 34)
- der pEF-IgExCD3-DHFR-Vektor wurde in kompetente Bakterien transformiert, einige Klone gepickt und anschließend amplifiziert (Methode 3.2.1.4)
- nach der Isolation des Plasmides (Methode 3.2.1.3) wurde die Sequenz verschiedener Klone in Auftragsarbeit von der Firma SequiServe bestimmt und auf ihre Richtigkeit überprüft

3.2.1.11 Klonierung der humanem Membran-ständigen schweren Epsilon-Kette

Ziel und Zweck der Klonierung der humanen Membran-ständigen schweren Epsilon-Kette wurde in Kapitel 4.6 bereits erläutert. Dort findet sich auch eine grafische Darstellung der Vorgehensweise (Abbildung 34). An dieser Stelle soll lediglich das experimentelle Vorgehen beschrieben werden.

Protokoll:

- U266-Zellen wurden lysiert und daraus die Gesamt-RNA isoliert (Methode 3.2.2.1)
- die Reverse Transkription der isolierten Gesamt-RNA in cDNA wurde in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben
- basierend auf dieser cDNA wurde für die lange Splice-Variante der Membrandomäne (ML) zuerst eine PCR mit dem Primer-Paar 5'-ML-IgE und 3'-M-IgE durchgeführt. Die Methode der PCR ist in Kapitel 3.2.1.1 erläutert. Die Sequenz der eingesetzten Primer ist in Kapitel 2.6 gezeigt. Bei dieser PCR wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Eag I eingeführt
- um die kurze Splice-Variante der Membrandomäne (MS) zu erhalten wurde das Produkt aus der ML-PCR als Matrix genutzt. Die PCR für die MS-Variante wurde mit dem Primer-Paar 5'-MS-IgE und 3'-M-IgE durchgeführt. Die Methode der PCR ist in Kapitel 3.2.1.1 erläutert. Die Sequenz der eingesetzten Primer ist in Kapitel 2.6 gezeigt. Bei dieser PCR wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Eag I eingeführt
- um beiden Membrandomänen an die konstante Domäne CH4 der Epsilon-Kette anzuhängen, musste diese modifiziert werden. Dazu wurden eine Schnittstellen für das Restriktionsenzym PspOM I am 3'-Ende eingefügt, ohne dass die Aminosäuresequenz des Proteins verändert wurde. Dazu wurde ein Vektor zurueckgegriffen, der die CH4-Domäne erhielt als Matrix für eine PCR genutzt, die mit dem Primer-Paar 5'-CH4-IgE und 3'-CH4-IgE durchgeführt wurde [99]. Die Methode der PCR ist in Kapitel 3.2.1.1 erläutert. Die Sequenz der eingesetzten Primer ist in Kapitel 2.6 gezeigt
- die erhaltene modifizierte CH4-Domäne wurde mit den Restriktionsenzymen Sac I und Kpn I in einen Bluescript-Vektor kloniert. Die MS- beziehungsweise die ML-Domäne wurde anschließend in diesen mit den Restriktionsenzymen Eag I und Xba I kloniert. Dabei ist zu beachten, dass der Bluescript-Vektor mit den Enzymen PspOM I und Xba I geschnitten wurde. PspOM I und Eag I erkennen zwar nicht die gleiche Schnittstelle, erzeugen jedoch den gleichen Überhang. Somit können sich die Fragmente an diesen Stellen aneinander lagern, bei einer Fusion verliert sich dabei die Schnittstelle für beide Enzyme
- mit den Restriktionsenzymen Bam H I und Nco I wurden die Domänen CH1-CH3-Epsilon in den Bluescript-CH4-MS beziehungsweise –ML kloniert
- Vnip und der Leader wurden daraufhin mit EcoR I und BamH I in den Bluescript-Vektor mit den Domänen CH1-MS beziehungsweise –ML kloniert
- das komplette Konstrukt wurde daraufhin mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Xba I in einen entsprechenden pEF-NPT-Vektor kloniert
- das Plasmid wurde anschließend in kompetenten E. coli Bakterien vermehrt (siehe Kapitel 3.2.1.4) und aus diesen isoliert (siehe Kapitel 3.2.1.5)

- das Konstrukt wurde anschließend in Auftragsarbeit von der Firma SequiServe sequenziert und auf seine Richtigkeit überprüft

3.2.2 RNA-Techniken

Der Umgang mit RNA ist wegen seiner chemischen Instabilität sehr diffizil. Die Anwesenheit von RNAsen auf nahezu jeder Oberfläche, erfordern ein sehr sauberer und zügiges arbeiten. Erschwerend kommt hinzu, dass RNAsen sehr stabil sind, was ihre Eliminierung sehr erschwert. Dementsprechend muss auch bei den Geräten und den Reagenzien, welche mit RNA in Kontakt kommen sehr auf deren Sauberkeit geachtet werden. Ein separater Platz für das Arbeiten mit RNA hat sich bewehrt.

3.2.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Zellen stellt oftmals den ersten wichtigen Schritt für Molekularbiologisches arbeiten dar. Wie bereits erwähnt ist RNA sehr instabil und RNAsen allgegenwärtig. Der erste Schritt in der Isolierung der RNA, die Lyse der Zelle, ist dabei von entscheidender Bedeutung. Diese wird mittels eines GT-Lyse-Puffers durchgeführt. Dieser enthält unter anderem Guanidium Thiocyanat (GT), welches aufgrund seiner Protein-denaturierenden Wirkung, ein sehr effektiver RNAsen-Inhibitor ist. Andere Bestandteile wie Phenol und Chloroform unterstützen die Aufreinigung der RNA. Die Firma Qiagen stellt dazu ein Rneasy Mini Kit zur Verfügung welches in dieser Arbeit genutzt wurde.

Protokoll:

- 1×10^6 Zellen, welche lysiert werden sollten, wurden isoliert und zweimal mit PBS gewaschen
- das Zellpellet wurde in 350 μ l RLT-Puffer, welcher GT enthält, resuspendiert beziehungsweise lysiert und kurz geschüttelt
- das Lysat wurde auf eine QIAshredder Säule pipettiert. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers

3.2.2.2 Reverse Transkription

Da RNA den hohen Temperaturen bei einer PCR nicht stand hält, musste die isolierte Gesamt-RNA vorher in cDNA umgeschrieben werden. Dies wird durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, ermöglicht. Die RT ist eine Desoxynukleotid-Transferase, die es Retroviren ermöglicht ihre Erbinformation, die als RNA vorliegt, in DNA umzuschreiben. Dabei dient die RNA als Matrix um einen komplementäre DNA (cDNA) zu generieren. Da die RT eine Synthese nicht de novo beginnen kann, benötigt sie Oligonukleotide für den Start der Polymerisation. Da man die Gesamt-RNA umschreiben möchte, werden sogenannte Random-Nukleotide, Hexamere aus zufällig gemischten Nukleotiden in willkürlicher Reihenfolge,

eingesetzt.

Protokoll:

- die isolierte Gesamt-RNA wird mit entsprechendem Puffer und den Random-Primern in einem 70°C Wasserbad für 5 Minuten inkubiert. Dabei sollen störende Sekundärstrukturen der RNA gelöst werden
- anschließend wird der Ansatz auf 37°C gekühlt, um den Oligonukleotiden das Anlagern zu ermöglichen
- zwischenzeitlich wurde die Reverse Transkriptase mit entsprechendem Puffer und dNTPs angesetzt
- beide Ansätze werden gemischt und im Wasserbad bei 37°C für eine Stunde inkubiert
- die Reaktion wird durch Hitzedenaturierung der RNA und der RT bei 95°C für 5 Minuten gestoppt
- um das Kondensat zu sammeln wird das Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert. Die cDNA kann anschließend bei -20°C gelagert werden

3.2.3 Protein-Techniken

Da die Eigenschaften von Proteinen sehr unterschiedlich sind, gibt es keine einheitliche Richtlinien für deren Umgang. Generell muss aber auf die Anwesenheit von Proteasen geachtet werden, welche aber schwer voneinander zu unterscheiden sind, da es sich bei beiden um Proteine handelt. Bei der Lagerung sollte eine Kristallisation vermieden werden, da es dadurch zu einer Destruktion der Proteine kommen kann. Die Zugabe von Glycerol (Endkonzentration 50 % V/V) verhindert die Kristallbildung und ermöglicht das Lagern bei Minusgraden. Bei Enzymen sollte häufiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden und bis zum Einsatz auf Eis gelagert werden.

3.2.3.1 Aufreinigung rekombinanter Antikörper

Die Produktion des bispezifischen IgExCD3 single-chain Antikörpers wurde bereits in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Neben den VH- und VL-Regionen zweier verschiedener Antikörper, weist das Konstrukt noch einen 6xHistidin-Schwanz auf. Dies soll es ermöglichen das Konstrukt mit Hilfe seiner Affinität zu Kobalt aus dem Überstand aufzureinigen. Während der Produktion des Antikörpers durch die CHO-Zellen, wurden diese in einem speziellen Serum-freien Medium (HyQ) kultiviert. Dadurch wurde die Menge an störenden Fremdproteinen, wie zum Beispiel Albumin, bereits im Vorfeld stark reduziert. Als zweiter Schritt sollte eine Gel-Chromatografie für eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe dienen.

Protokoll:

- der Zellkulturüberstand, welcher den bispezifischen IgExCD3 Antikörper enthält, wurde auf

- eine Kobalt-NTA (NitriloTriAzetat)-Säule aufgetragen
- mit Hilfe eines Tris-Puffer-Gradienten wurde das Material schrittweise eluiert
- ein ELISA diente zur Bestimmung der positiven Fraktionen (Methode)
- die positiven Fraktionen wurde gemischt und auf eine Gel-Chromatografie-Säule aufgetragen
- von dieser wurde der Antikörper mittels Tris-Puffer eluiert und dabei der Größe nach aufgetrennt
- es konnten Monomer- und Dimer-Fraktionen isoliert werden, welche separat gesammelt wurden. Eine weitere kleinere Fraktion fiel auf welche, zur Analyse an die Firma XXX zur Proteinsequenzierung geschickt wurde
- um eine höhere Konzentration zu erhalten wurden die Fraktionen mittels einer Vakuum-Dialyse eingeeengt

3.2.3.2 Analyse des IgExCD3 Antikörpers im SDS-Polyacrylamidgel

Ein Standard-Verfahren um die Reinheit und die Größe eines Proteins zu quantifizieren ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei werden die Proben einschließlich eines Größenstandards auf das Gel aufgetragen und zur Visualisierung anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Ziel und Zweck dieses Verfahrens wurden in Kapitel 4.5 erläutert. An dieser Stelle soll daher lediglich die Methode beschrieben werden.

Protokoll:

- das Trenngel wird entsprechend der Tabelle 12 angesetzt und zwischen die entsprechenden Glasplatten gegossen. Dabei sollte nur 2/3 des Volumens gefüllt werden. Anschließend gibt man 1 ml Butanol darüber, um für eine Gerade Fläche zu sorgen und das Polymerisieren zu beschleunigen.
- nachdem das Trenngel polymerisiert ist, wird das Butanol dekantiert und das Sammelgel darüber geschichtet. Ein Kamm wird dabei zwischen die Glasplatten platziert, sodass sich im Sammelgel Taschen für die Beladung bilden.
- nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird es in die Elektrophorese-Vorrichtung eingesetzt und der SDS-Laufpuffer eingegossen. Danach wird der Kamm entnommen
- 15 µl der Proben beziehungsweise des Größenstandards werden mit 15 µl des SDS-Ladepuffers vermischt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Dabei kommt es zur Anlagerung von SDS an das Protein, wodurch die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar wird
- anschließend werden 20 µl der Proben oder des Größenstandards in die Taschen des Gels pipettiert
- die Elektrophorese wird, abhängig von dem Molekulargewicht der Probe, bei 80-160 V für 45-

120 Minuten durchgeführt

- anschließend wird das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und für 5 Minuten in einer Fixierlösung langsam geschüttelt
- danach wird es in einer Coomassie-Blau-Lösung über Nacht auf einem Schüttler (kleine Stufe) inkubiert
- zum Entfernen des Überschüssigen Farbstoffes, wird das Gel je nach Bedarf mit destilliertem Wasser mehrfach gewaschen. Dabei bleibt der Farbstoff nur dort im Gel erhalten, wo sich auch Protein befindet

3.2.3.3 Analyse von Proteinen mittels ELISA

Eine Methode die der Detektierung von Proteinen dient, ist der „enzyme-linkes immuno sorbent assay“ (ELISA). Dieser kann auf unterschiedlichste Weise durchgeführt werden, wobei das Prinzip aber immer das gleiche bleibt. Ein Molekül, welches das zu suchende Protein erkennt, wird an eine beschichtete Platte gekoppelt. Nachdem die restlichen freien Flächen der Platte mit Hilfe einer Blocklösung abgedeckt wurden, gibt man das Probenmaterial darauf. Anschließend nutzt man meist einen Antikörper, welcher mit der Meerrettich-Peroxidase (POX) markiert ist, zu Detektion des gebundenen und zu suchenden Proteins. Die Menge des Proteins kann indirekt über den Substratumsatz des POX-Markierten Detektierungs-Antikörper bestimmt werden. Da in dieser Arbeit verschiedene Proteine nachgewiesen wurden, wird an dieser Stelle ein allgemeines Protokoll vorgestellt.

Protokoll:

- 100 µl des „Fangmoleküls“ (meistens ein Antikörper) wurden in entsprechender Konzentration über Nacht bei 4°C auf einer 96-Loch-Platte (Maxisorb) inkubiert
- der Überstand wurde abgekippt und die Löcher dreimal mit PBS gewaschen. 200 µl einer Blocklösung daraufgegeben und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert
- Überstand wurde dekantiert und die Löcher dreimal mit PBS gewaschen. 50-100 µl der Probenlösung wurden aufgetragen und die Platte bei Raumtemperatur für 1-2 Stunden inkubiert
- anschließend wurde die Probenlösung weggekippt, die Platte dreimal mit PBS gewaschen und 100 µl der POX-markierten Detektionslösung (meistens ein POX-markierter Antikörper) dazugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert
- die Flüssigkeit wurde erneut weggekippt, die Platte dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 100 µl einer Substratlösung (zum Beispiel ABTS) dazugegeben
- die Platte wurde solange bei Raumtemperatur inkubiert bis es zu einer Verfärbung der Substratlösung kam, welche im Photometer bei entsprechender Wellenlänge gemessen wurde

4 ERGEBNISSE

Der folgende Ergebnisteil soll veranschaulichen, wie der bispezifische Antikörper IgExCD3, der nur aus variablen Immunglobulinomänen besteht, im Tandem single-chain Format hergestellt und aufgereinigt wurde. Die Eigenschaften des bispezifischen Antikörper sollen daraufhin im Detail beschrieben werden. Insbesondere ist zu zeigen, dass der bispezifische Antikörper so an das Immunglobulin E bindet, dass nur IgE-positive B-Lymphozyten eliminiert werden und keine anderen Zellen, die das IgE passiv in seiner Rezeptor-gebundenen Form präsentieren (siehe Abbildung 10).

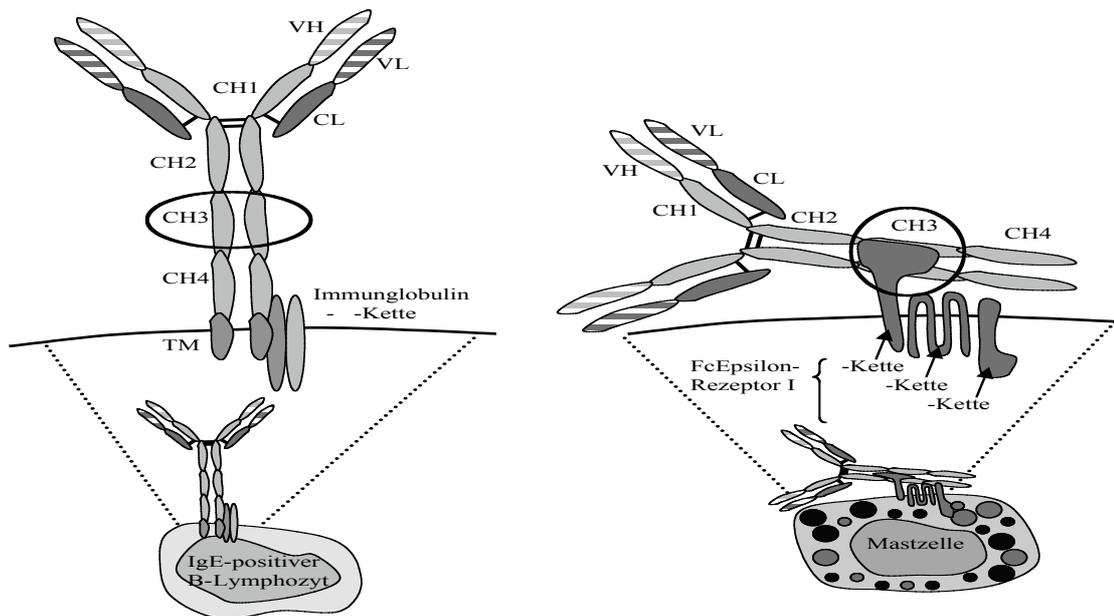


Abbildung 10 Vergleich des membranständigen Immunglobulin E auf B-Lymphozyten mit der Rezeptor-gebundenen Form auf Mastzellen. Hervorzuheben ist die CH3-Domäne, welche die Bindung an den hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I vermittelt und bei Mastzellen durch die Alpha-Kette maskiert ist.

4.1 Klonierung der variablen Domänen des anti-IgE Antikörpers

Es gibt zwei Möglichkeiten die variablen Regionen für die Herstellung von bispezifischen single-chain Antikörpern zu gewinnen:

- Phage-Display [100-102] und
- monoklonale Antikörper.

Beim Phage-Display werden die antigenbindenden variablen Regionen an ein Hüllprotein von

Bakteriophagen gekoppelt. Diese Phagen exprimieren das Fusionsprotein auf der Oberfläche. Ein Repertoire solcher Phagen, die verschiedene variable Regionen präsentieren, bildet eine kombinatorische Antikörper-Bibliothek. Aus solch einer Bibliothek kann man Phagen isolieren, die eine spezifische Affinität für ein bestimmtes Antigen besitzen.

Monoklonale Antikörper werden nach der Methode von Milstein und Köhler hergestellt [103]. Man injiziert dabei einer Maus das Antigen, wogegen man Antikörper generieren möchte. Die Effizienz dieses Verfahrens kann man durch Zugabe verschiedener Adjuvantien steigern. Nach der Immunisierung entnimmt man die Milz. Die Milzzellen werden anschließend mit Zellen einer Maus-Myelom-Zelllinie fusioniert. Erfolgreich fusionierte Hybridomzellen können in einem speziellen Medium überleben und besitzen die Eigenschaft, kontinuierlich zu wachsen, was man zu deren Selektion nutzt. Nach einer Subklonierung wählt man einen Hybridom-Klon aus, der einen spezifischen monoklonalen Antikörper produziert.

Die beschriebene Technik wurde von der Arbeitsgruppe von BM. Stadler verwendet um einen monoklonalen Antikörper herzustellen, der spezifisch mit der CH3-Domäne von humanem Immunglobulin E reagiert [97]. Ein Lysat dieser Hybridom-Zellen wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt, um daraus die Gesamt-RNA zu isolieren. Diese wurde anschließend mit Hilfe von Reverser Transkriptase und Zufalls-Hexa-Nukleotiden in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrix für ein Standard-PCR-Verfahren zur Klonierung der variablen Immunglobulindomänen VL und VH des anti-IgE Antikörpers.

Abbildung 11 stellt den Versuchsaufbau schematisch dar. Dabei wurden in einer ersten PCR-Runde die VH- und die VL-Domäne mit den hierfür angegebenen Oligonukleotiden amplifiziert. In einer zweiten PCR-Runde wurden die VH- und VL-Domänen modifiziert, indem Schnittstellen für Restriktions-Enzyme und ein Glycin-Serin-Linker integriert wurden. In der dritten PCR-Runde, der sogenannten Fusions-PCR, wurden die beiden modifizierten VH- und VL-Regionen so miteinander fusioniert, dass sie letztendlich auf einer Polypeptidkette zu liegen kommen.

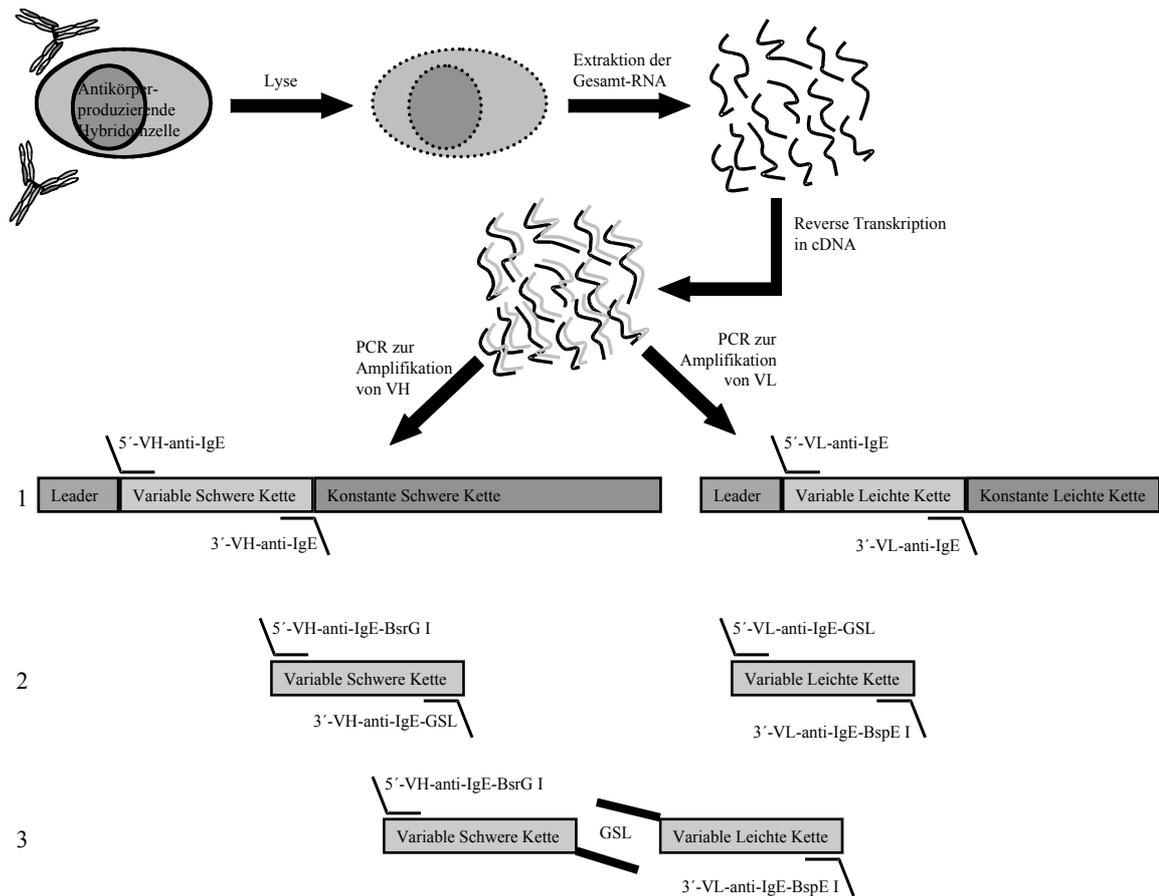


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Klonierung der VH- und VL-Region. Ausgangsmaterial war das Lysat einer Antikörper-produzierenden Hybridomzelllinie. Aus dieser wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe von Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die VH- und die VL-Domäne durch den Einsatz eines Standard-PCR-Verfahrens amplifiziert (1), die variablen Regionen in einem weiteren PCR-Verfahren modifiziert (2) und die modifizierten VH- und VL-Regionen schließlich durch eine Fusions-PCR miteinander verbunden (3).

Mit Hilfe der eingesetzten Oligonukleotide wurden gleichzeitig Schnittstellen für Restriktions-Enzyme eingefügt (siehe Abbildung 12). Nach dem Verdau der Fragmente mit den entsprechenden Restriktions-Enzymen wurden diese in einen Plasmidvektor kloniert. Die VH- und VL-Domänen wurden anschließend mittels Kettenabbruchreaktion nach Sanger sequenziert und mit den Sequenzen von BM. Stadler verglichen (siehe Sequenzen im Anhang).

4.2 Konstruktion des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers

Zur Herstellung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 im Tandem single-chain Fv Format

mussten die variablen schweren (VH) und leichten (VL) Ketten des anti-IgE [97] und eines anti-CD3 [98] Antikörpers auf einem Expressionsvektor rekombiniert werden, so dass die einzelnen variablen Domänen nacheinander auf einer einzigen Polypeptidkette zu liegen kommen.

Die variablen Immunglobulindomänen einer Antigen-spezifität sind untereinander jeweils durch einen Glycin-Serin-Linker von 15 beziehungsweise 18 Aminosäuren Länge verbunden, um zu gewährleisten, dass sie sich zu einer funktionellen Antigenbindungsstelle zusammenlagern können. Zwischen den VH/VL-Paaren des anti-IgE und der anti-CD3 Antikörpers kommt ein kurzer Glycin-Serin-Linker von nur fünf Aminosäuren Länge zum Einsatz. Damit soll einerseits eine gewisse sterische Flexibilität zwischen den beiden Bindungsarmen zugelassen und andererseits eine Fehlpaarung von nicht zusammengehörenden V-Regionen vermieden werden.

Die Klonierung und Fusion von VH und VL des anti-IgE Antikörpers wurde in Kapitel 4.1 beschrieben. Bei der VH- und VL-Domäne des anti-CD3 Antikörpers konnte auf ein fertiges Modul aus einem anderen bispezifischen Antikörper der Arbeitsgruppe Kufer zurückgegriffen werden [98]. Die einzelnen Elemente wie das Leaderpeptid für die Sekretion des Konstrukts, die variablen Immunglobulindomänen, die Glycin-Serin-Linker und der Histidin-Schwanz wurden mit Hilfe geeigneter Restriktions-Enzym-Schnittstellen, wie in Abbildung 12 dargestellt, im Expressionsvektor pEF-DHFR zu dem bispezifischen IgExCD3 Antikörper zusammengesetzt.

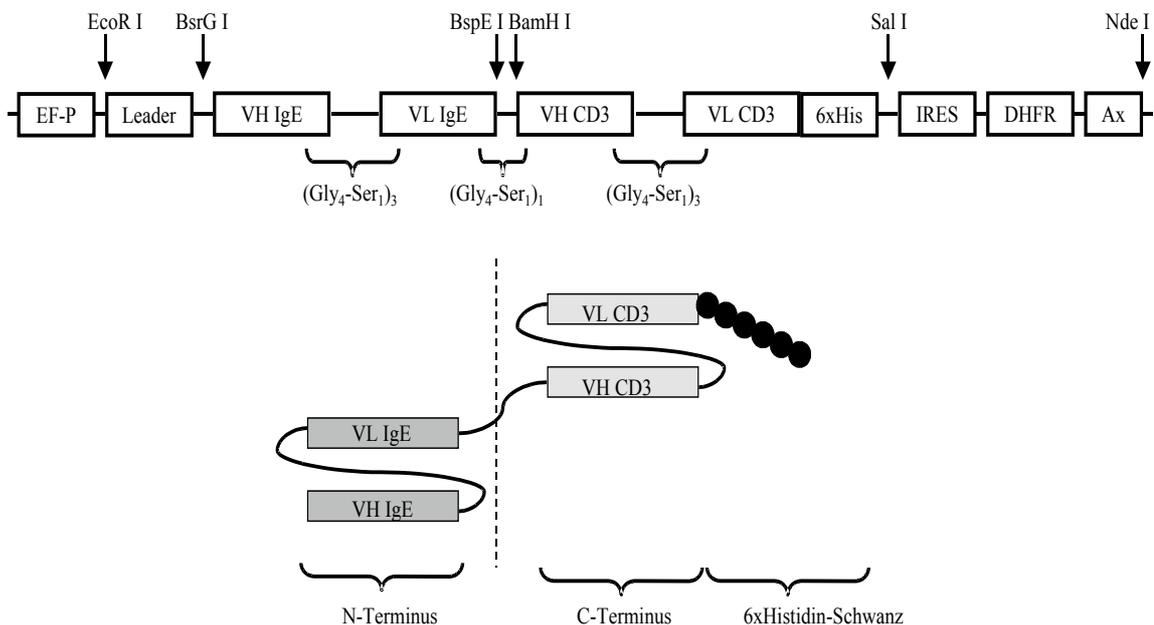


Abbildung 12 Oben: Reihenfolge der variablen Domänen des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 auf genetischer Ebene. Relevante Restriktions-Enzym-Schnittstellen sind durch Pfeile markiert. Hinter dem 6xHistidin-Schwanz befindet sich ein Stop-Codon. IRES bezeichnet eine interne ribosomale Reinitiations-Stelle. Unten: Schematische Wiedergabe der Faltung des bispezifischen single-chain Antikörpers nach der Prozessierung des Proteins.

Die korrekte Struktur des Konstrukts auf DNA-Ebene wurde durch probeweisen Verdau mit den in Abbildung 12 gezeigten Restriktions-Enzymen und anschließender Sequenzanalyse bestätigt. Das Konstrukt steht unter der Kontrolle des EF-Promotors und bildet zusammen mit dem murinen DHFR-Gen ein bicistronisches Transkript. Die DHFR-Translation wird dabei durch eine interne ribosomale Reinitiierungs-Stelle (IRES) vermittelt. Die Di-Hydro-Folat-Reduktase (DHFR) dient als Selektionsmarker für die stabile Transfektion des bispezifischen IgExCD3 Konstrukts in DHFR-defizienten CHO-Zellen (chinese hamster ovary). Der 6xHistidin-Schwanz dient dabei sowohl der Aufreinigung des Konstruktes aus dem Zellkultur-Überstand als auch seinem Nachweis mit Hilfe eines anti-Histidin Antikörpers.

4.3 Produktion des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 durch CHO-Zellen

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kufer war bekannt, dass einzelkettige Antikörperkonstrukte, die mehr als drei Immunglobulinodomänen enthalten, in der Regel nicht funktionell in prokaryontischen Zellen exprimiert werden. Deshalb wurde ein eukaryontisches Expressionssystem auf der Basis von Chinese Hamster Ovary cells (CHO-Zellen) verwendet [96].

Den verwendeten CHO-Zellen fehlt das Enzym Di-Hydro-Folat-Reduktase (DHFR). Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Desoxy-Thymidin-Mono-Phosphat (dTMP). Ein wichtiger Schritt in dessen Synthese ist die Methylierung von Desoxy-Uracil-Mono-Phosphat (dUMP) (siehe Abbildung 13). Die erforderliche Methylgruppe wird durch die Umwandlung von N⁵,N¹⁰-Methylen-Tetra-Hydro-Folsäure zu Di-Hydro-Folsäure (DHF) bereitgestellt. Zur Regeneration der DHF wird das Enzym DHFR benötigt. Daher sind CHO-Zellen, denen dieses Enzym fehlt, nicht in der Lage, dTMP zu synthetisieren und sind somit auf eine externe Zufuhr angewiesen, was man sich bei der stabilen Transfektion von CHO-Zellen zunutze macht. Der pEF-Vektor enthält in diesem Fall neben dem Konstrukt noch das Enzym DHFR. Erfolgreich transfizierte Zellen können daher ohne Zugabe von Nukleotiden überleben. Durch Zugabe von Methotrexat kann außerdem eine genetische Amplifikation des Konstruktes erreicht werden.

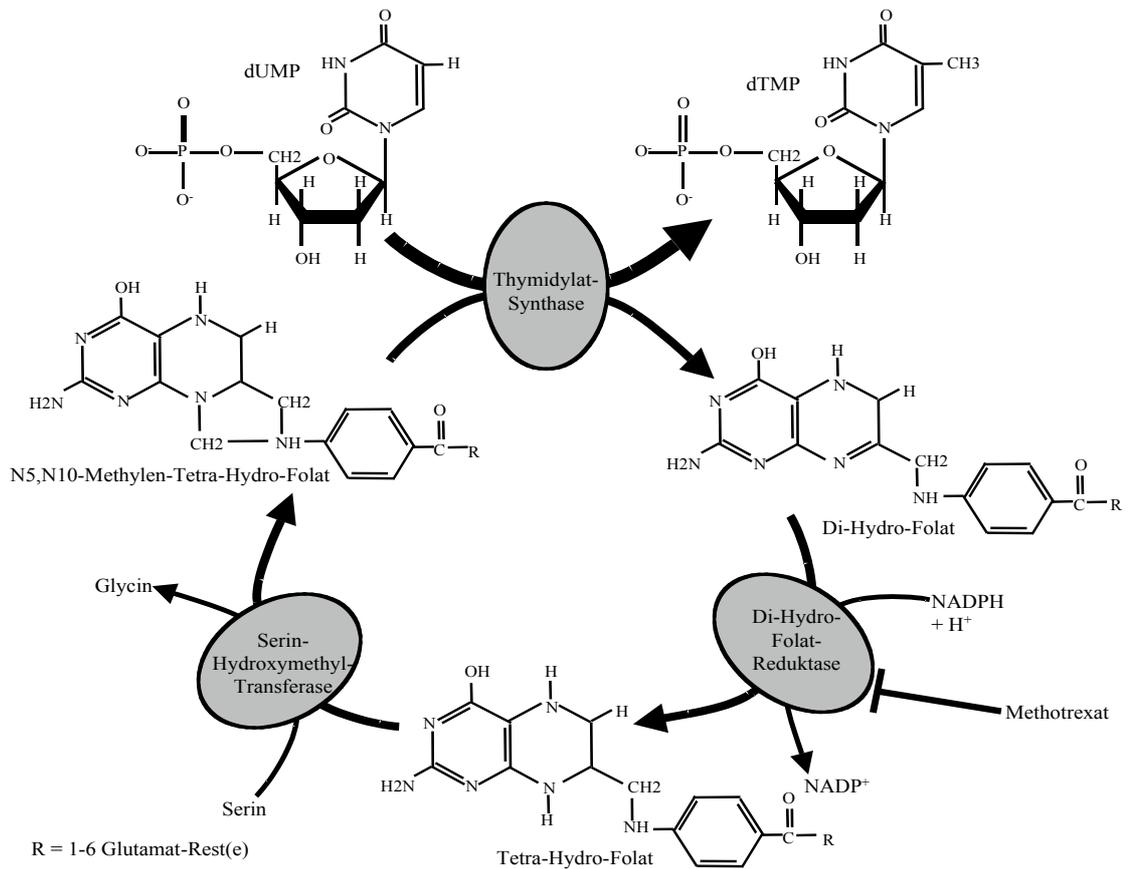


Abbildung 13 Methylierung von dUMP zu dTMP. Regeneration der N⁵,N¹⁰-Methylen-Tetra-Hydro-Folsäure und Wirkmechanismus von Methotrexat.

Zur stabilen Transfektion der CHO-Zellen wurde das Expressionsplasmid pEF-IgExCD3-DHFR zuerst in großen Mengen in *E. coli* Bakterien hergestellt. Nach der Linearisierung des Vektors wurde er durch Elektroporation in die Zellen eingebracht. Das Konstrukt wird dabei an einer zufälligen Stelle im Genom integriert. Nach der Transfektion wurden die Zellen durch den Entzug von Nukleotiden selektioniert. Zur Genamplifikation wurde Methotrexat in einer Endkonzentration von 20 nM (erste Amplifikationsrunde) und 100 nM (zweite Amplifikationsrunde) zugegeben. Durch die interne ribosomale Reinitierungs-Stelle (IRES), die innerhalb des bicistronischen Transkripts aus bispezifischem Antikörper und DHFR liegt, sollte eine Steigerung der Methotrexat-Konzentration mit einer entsprechend gesteigerten Expression des bispezifischen Antikörpers einhergehen.

Der bispezifische IgExCD3 Antikörper konnte mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs im Überstand der CHO-Zellen nachgewiesen werden. Dazu immobilisiert man lösliches IgE über Nacht an einer ELISA-Platte und inkubiert anschließend darauf den Zellkultur-Überstand. Ein anti-Histidin Antikörper, der mit der Meerrettich-Peroxidase (POX) markiert ist, ermöglicht es, den gebundenen IgExCD3 Antikörper zu detektieren. POX setzt das farblose Substrat Azino-bis-(3-ethyl-Benz-Thioazolin-6-Sulfonsäure) (ABTS) in eine farbige Lösung um. Diese kann im Photometer bei einer

Wellenlänge von 405 nm gemessen werde.

Nach der stabilen Transfektion gaben die CHO-Zellen den bispezifischen single-chain Antikörper IgExCD3 in den Überstand ab. Dies konnte mit einem Sandwich-ELISA bestätigt werden. Die Zugabe von Methotrexat (MTX) in einer Konzentration von 100 nM brachte keinen Vorteil gegenüber einer MTX-Konzentration von 20 nM. Um eine größere Menge des Antikörpers herzustellen, wurden die Transfektanten in „Rollerflaschen“ überführt und bei einer MTX-Konzentration von 20 nM kultiviert (siehe Abbildung 14).

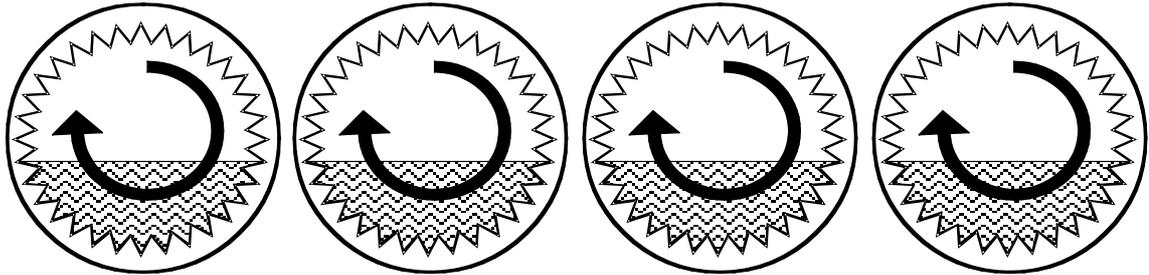


Abbildung 14 Kultivierung von CHO-Zellen in „Rollerflaschen“. Der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper wird dabei in den Überstand abgegeben.

Bei den Rollerflaschen handelt es sich um Zellkulturflaschen, die eine vergrößerte Oberfläche besitzen. Durch kontinuierliche Rotation dieser Flaschen um die eigene Achse kann man eine effektivere Produktion erzielen. Diese wird erreicht, da eine größere Anzahl von Zellen, die den Antikörper in den Überstand abgeben, mit weniger Medium auskommen.

4.4 Aufreinigung des bispezifischen single-chain Antikörpers

Der Überstand der transfizierten CHO-Zellen enthält neben dem bispezifische single-chain Antikörper IgExCD3 noch eine Reihe anderer Proteine. Um die Menge an Fremd-Proteinen so gering wie möglich zu halten wurde ein spezielles proteinarmes Nährmedium (HyQ von Perbio) für die CHO-Transfektanten verwendet. Da der IgExCD3 Antikörper einen 6xHistidin-Schwanz besitzt, kann dieser mit dem freien Elektronenpaar am Stickstoff einen Komplex mit Metallen bilden. Für eine hohe Reinheit und Konzentration des Antikörpers wurde der Überstand mit Hilfe einer "immobilized metal ion affinity chromatography" (IMAC) und einer anschließenden Gel-Chromatographie aufgereinigt.

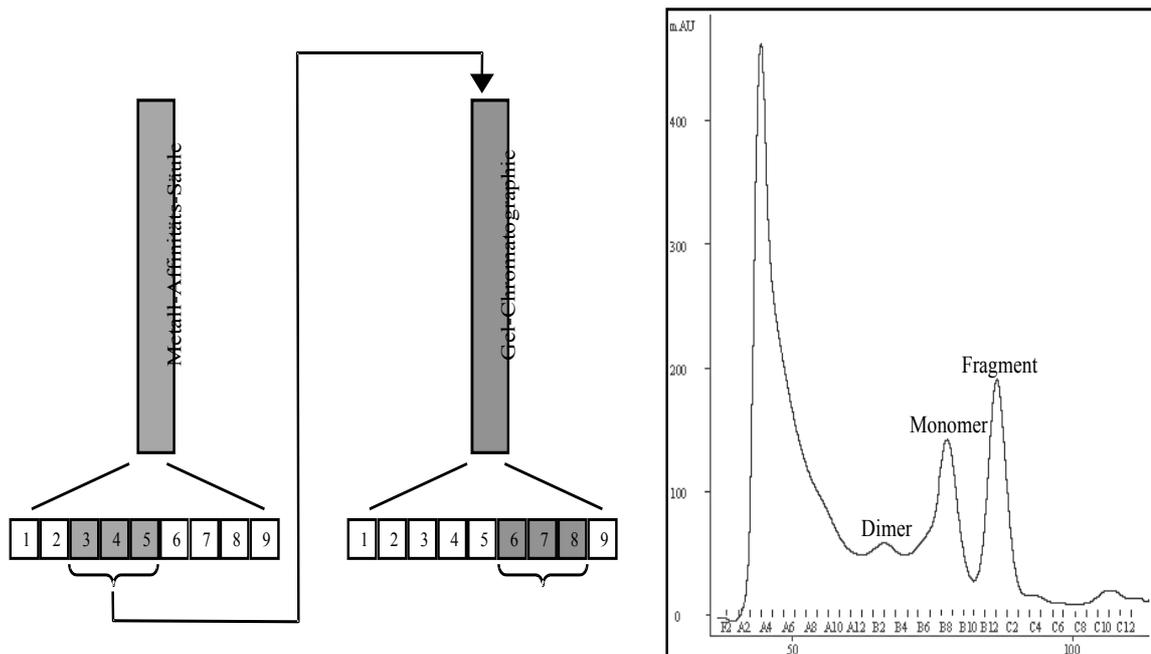


Abbildung 15 Veranschaulichung der Aufreinigung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3. Links: Der Überstand wurde zuerst auf eine IMAC-Säule aufgetragen. Die eluierten Fraktionen wurde im Sandwich-ELISA getestet. Die positiven IMAC-Fraktionen wurden gemischt und durch eine anschließende Gelfiltration weiter aufgetrennt. Rechts: Chromatogramm der Gelfiltration. Dargestellt sind eine Monomer- und eine Dimer-Fraktion. Ein großer Teil des Proteins lag als Fragment vor. Dieses wurde separat analysiert.

Die Produktion in den Rollerflaschen erbrachte circa zehn Liter Zellkulturüberstand. Dieser wurde zuerst auf eine IMAC-Säule aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe eines Imidazol-haltigen Puffer-Gradienten von der Säule eluiert. Auf diese Weise erhielt man eine Auftrennung des Überstands und die einzelnen Fraktionen wurden mittels eines Sandwich-ELISAs getestet. Die positiven IMAC-Fraktionen wurde schließlich gemischt und durch Gelfiltration ihrer Größe nach getrennt. Abbildung 15 gibt den Ablauf der Aufreinigung schematisch wieder.

Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt, der Gelfiltration, lag der bispezifische single-chain Antikörper IgExCD3 in einer Monomer- und einer Dimer-Fraktion vor. Die Konzentration wurde zum einen über das Integral der Kurve ermittelt und zudem durch einen Bi-Cinchoninic Acid (BCA) Protein-Bestimmungs-Test quantifiziert. Es wurde eine Konzentration von 92,5 µg/ml bestimmt. Um die Reinheit und Konzentration zu bestätigen, wurde noch ein weiteres Verfahren, die SDS-Gel-Elektrophorese, durchgeführt.

4.5 Analyse von Größe und Reinheit des bispezifischen Antikörpers

Nach der Aufreinigung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 musste geklärt werden, ob das Produkt frei von Unreinheiten ist. Eine Standard-Methode, mit der man sowohl die Reinheit als auch die Größe von Proteinen sehr gut beurteilen kann, ist die sogenannte SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).

Bei diesem Verfahren werden die Proben zuerst in einem Puffer, der Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) enthält, bei 95°C denaturiert. Dabei lagert sich ein SDS-Molekül an etwa zwei Aminosäuren an. Da das SDS negativ geladen ist, kann die Eigenladung des Proteins vernachlässigt werden. So erreicht man, dass sich Proteine in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe trennen. Parallel zu den Proben wird ein Protein-Standard aufgetragen. Dieser besteht aus verschiedenen Proteinen bekannter Größe und ermöglicht es, damit auf die molekulare Masse des untersuchten Proteins zu schließen. Das Gel wird anschließend zur Visualisierung mit Coomassie-Blau gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich unspezifisch an alle Proteine an. Die Intensität der Bande korreliert dabei mit der Konzentration. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei circa 200 ng.

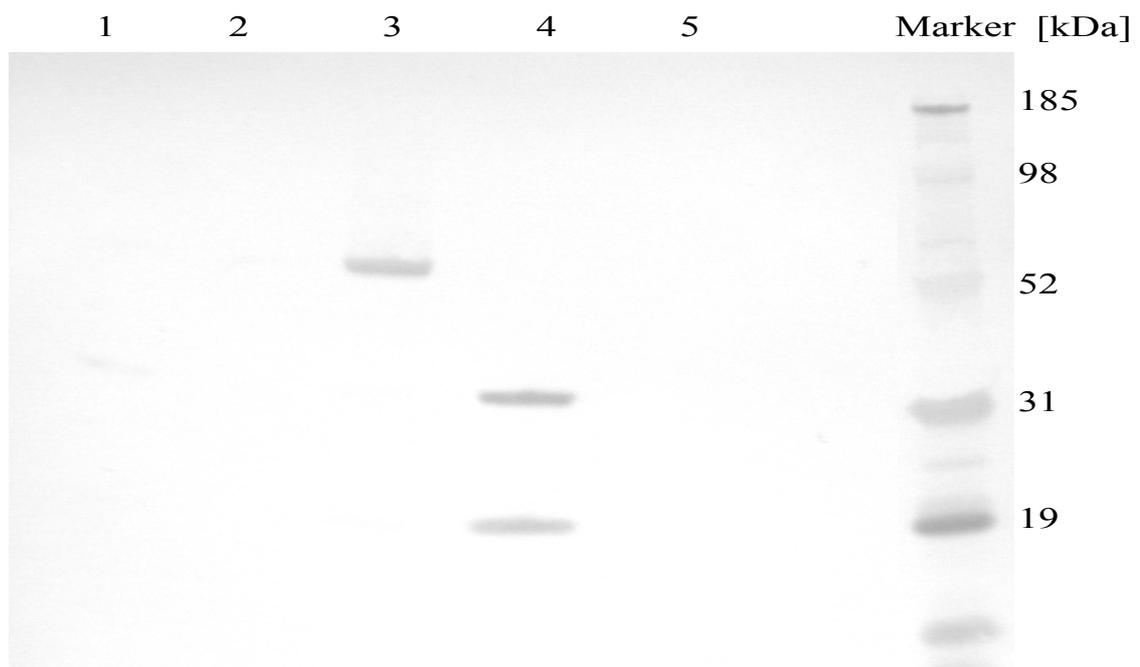


Abbildung 16 Darstellung der SDS-Gel-Elektrophorese. Aufgetragen sind die Fraktionen nach der Gelfiltration. In Reihe 1 sind die Fraktionen A3-A6, in Reihe 2 die Fraktionen B2-B3, in Reihe 3 die Fraktionen B8-B9, in Reihe 4 die Fraktionen B12 + C1 + C2 und in Reihe 5 die Fraktionen C10 + C11. Rechts ist der Proteinstandard dargestellt.

Wie aus Abbildung 16 zu ersehen ist, liegt die molekulare Masse des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 bei etwa 55 kDa (Reihe 3). Dieser Wert wurde auch rechnerisch ermittelt und bestätigt das Ergebnis aus dem Chromatogramm. Eine Dimer-Fraktion, die sich isolieren lässt, ist in Reihe 2 dargestellt. Da die Konzentration sehr niedrig ist, ist die Bande auf dem Gel nur sehr schwer zu erkennen. In Reihe 4 sind die Fragmente aufgetragen, die beiden Produkte haben zusammen eine Größe von circa 55 kDa. Der Verdacht liegt nahe, dass es sich dabei um Spaltprodukte des bispezifischen Antikörpers handelt. Diese wurden detaillierter untersucht und ergaben, dass sich in der VL_{IgE}-Domäne eine Schnittstelle der Proteinase Stromelysin I befindet.

4.6 Klonierung des humanen membranständigen Immunglobulin E

Neben der Herstellung und Aufreinigung des single-chain Antikörpers IgExCD3 sollte seine funktionelle Aktivität charakterisiert werden. Ziel dieses Konstruktes ist es, zytotoxische T-Lymphozyten zu rekrutieren um IgE-positive B-Zellen zu eliminieren. Da sich aus dem peripheren Blut des Menschen keine IgE-positiven B-Lymphozyten zu Testzwecken aufreinigen lassen und auch keine entsprechenden Zelllinien verfügbar sind, musste zuerst eine Zelllinie, die humanes transmembranes IgE exprimiert, konstruiert werden. Der Aufbau des membranständigen Immunglobulin E auf humanen B-Lymphozyten ist in Abbildung 10 gezeigt. Da sowohl für die Verankerung des Immunglobulin E in der Membran als auch für die Erkennung durch den IgExCD3 Antikörper nur die Schwere-Kette ausschlaggebend ist, musste nur diese kloniert werden.

Als variable Region wurde die VH-Domäne aus dem pSV-V_{np}-H_ε-Vektor gewählt, die spezifisch mit dem Hapten 4-hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetate reagiert (NP) [99]. Von der Schwere-Kette des humanen IgE existiert nur eine Subklasse. Die entsprechenden CH1- bis CH4-Domänen konnten ebenfalls aus dem oben genannten Plasmid entnommen werden. Von der Membrandomäne des Immunglobulin E weiß man, dass es sie in zwei Isoformen gibt, welche durch alternatives Spleißen entstehen. Die lange Variante (ML) unterscheidet sich dabei von der kurzen (MS) durch zusätzliche 52 Aminosäuren am C-terminalen Ende, beziehungsweise 156 Nukleotide am 5'-Ende. Obwohl diese Region keine Rolle für die Eliminierung von IgE-positiven B-Lymphozyten durch den IgExCD3 Antikörper spielt, wurden dennoch beide Varianten aus U266-Zellen kloniert.

Die humane IgE-sezernierende Zelllinie U266 exprimiert die lange Variante der Membrandomäne (ML) auf mRNA-Ebene, translatiert diese aber nicht. Nach der Lyse dieser Zelllinie, wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe von Zufalls-Hexa-Nukleotiden und Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der ML-Domäne erfolgte durch Standard-PCR-Verfahren. Die 3'- und 5'-Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass sie zusätzlich Schnittstellen für Restriktions-Enzyme einfügen. Die Klonierung der kurzen Variante (MS) erfolgte auf der Grundlage der bereits klonierten ML-Variante. Abbildung 17 soll einem besseren Verständnis des Versuchsaufbaus dienen.

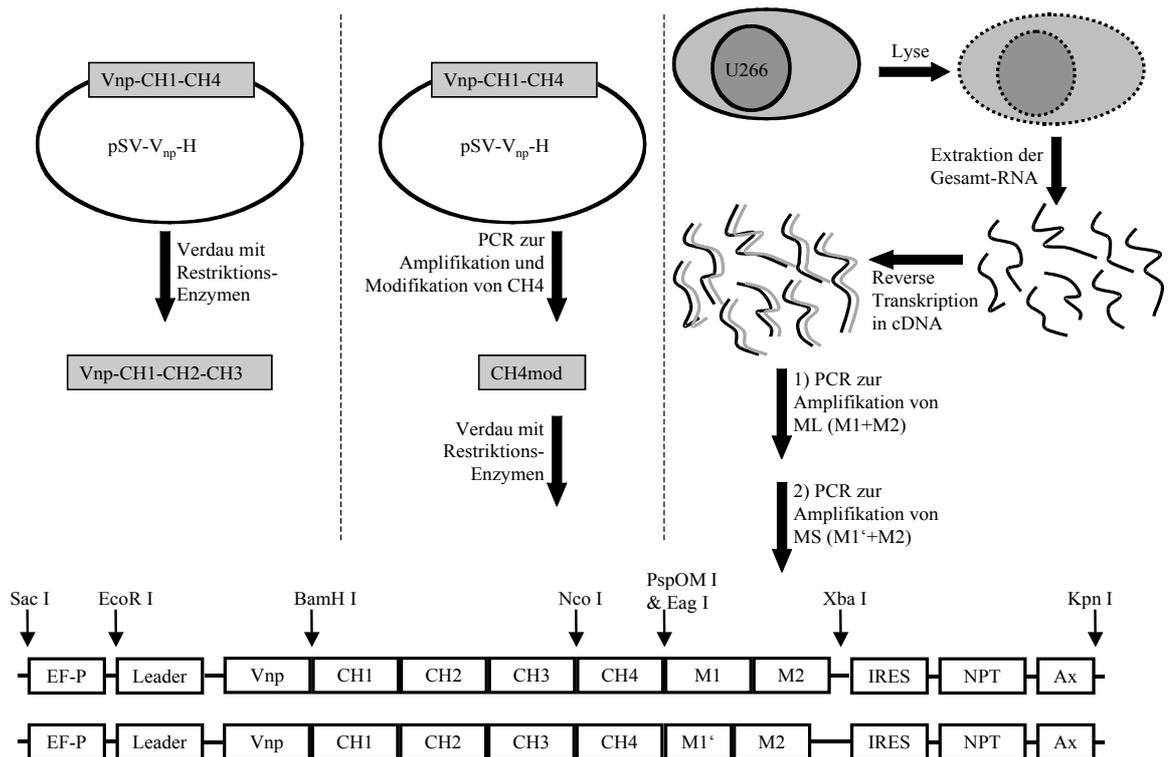


Abbildung 17 Oben: Klonierung der einzelnen Domänen des membranständigen Immunglobulin E. Unten: Genetische Kartierung des Vektors. Relevante Restriktions-Enzym-Schnittstellen sind mit Pfeilen markiert. M1-M2 stellt die lange (ML) und M1'-M2 die kurze (MS) Membrandomäne dar. Hinter ML und MS befindet sich jeweils ein Stop-Codon. IRES bezeichnet eine interne ribosomale Reinitiiierungsstelle. NPT ist die Abkürzung für das Enzym Neomycin-Phospho-Transferase.

Die PCR-Produkte wurden mittels Kettenabbruchreaktion nach Sanger sequenziert und mit den bekannten Sequenzen verglichen. Die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt. Durch die eingesetzten Oligonukleotide wurden gleichzeitig auch Restriktions-Enzym-Schnittstellen eingefügt. Nach dem Verdau mit den entsprechenden Enzymen wurden die Domänen in einem pEF-Vektor zusammengefügt (siehe Abbildung 17). So entstand ein pEF-V_{np}-IgE_{MS}-NPT-Vektor und ein pEF-V_{np}-IgE_{ML}-NPT-Vektor.

4.7 Expression von humanem IgE auf J558L-Mauszellen

Da nur die humane Schwere-Kette des Immunglobulin E kloniert wurde, musste diese in eine Zelllinie stabil transfiziert werden, die bereits eine leichte Immunglobulinkette exprimiert. Dazu wurde die murine Myelom-Zelllinie J558L gewählt, die nur eine Maus-Lambda-Leichte-Kette sezerniert jedoch keine schwere Kette produziert.

Zur stabilen Transfektion der J558L-Zellen wurden der pEF-V_{np}-IgE_{MS}-NPT- und der pEF-V_{np}-IgE_{ML}-NPT-Vektor zuerst in E. coli Bakterien vervielfältigt. Nach der Linearisierung der Vektoren wurden die J558L-Zellen entweder mit der MS- oder der ML-Variante durch Elektroporation transfiziert. Das Enzym Neomycin-Phospho-Transferase verleiht den Zellen, welche das Konstrukt erfolgreich ins Genom integriert haben, eine Resistenz gegen das toxische Geneticin (G418). Dieses wurde dem Medium in einer Konzentration von 1000 µg/ml zugesetzt.

Als Resultat der Transfektion präsentieren diese Maus-Zellen ein chimäres Immunglobulin E auf ihrer Oberfläche. Die Leichte-Kette ist dabei murinen Ursprungs. Die konstante Schwere-Kette sollte aus der humanen Epsilon-Kette bestehen, welche entweder die ML- und oder die MS-Variante der transmembranen IgE-Region enthält. Da die Effektivität einer Transfektion sehr variabel ist, sollten die J558L-IgE_{MS} und die J558L-IgE_{ML} anschließend kloniert werden.

Um zu zeigen, dass die Zellen tatsächlich human-murines IgE auf ihrer Oberfläche exprimieren und um die Expressionsstärke der erhaltenen Klone zu beurteilen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Klone gewaschen und für 30 Minuten mit einem anti-human-IgE Antikörper, der mit dem Fluorochrom FITC markiert ist, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in einer 1%-igen Formaldehyd-Lösung resuspendiert. Als Auswertegerät diente ein FACScan der Firma Becton Dickinson.

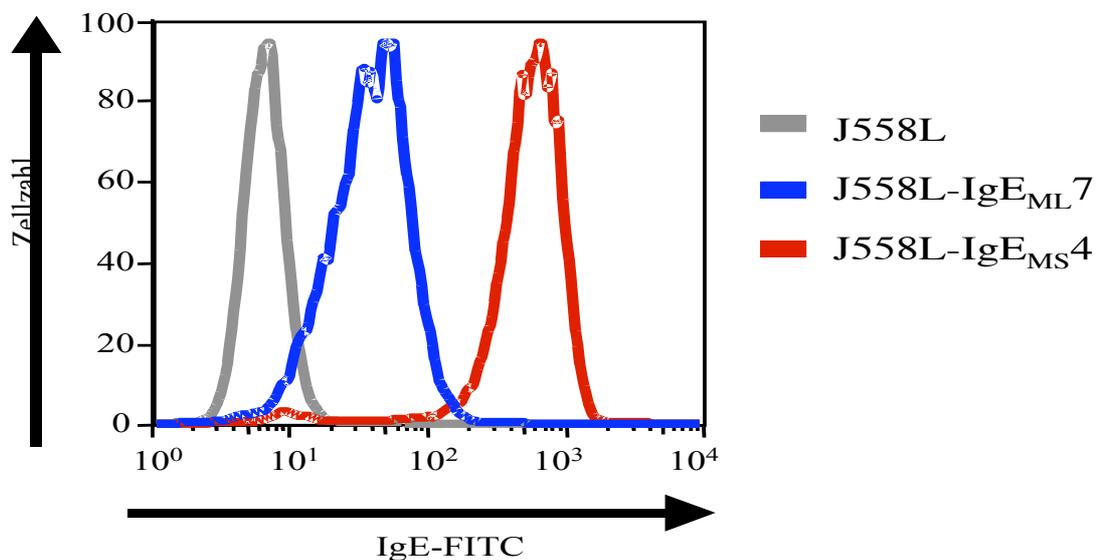


Abbildung 18 FACS-Analyse der J558L-Zellen nach stabiler Transfektion mit der schweren Kette des membranständigen humanen IgE. Es wurde sowohl die kurze (MS) als auch die lange (ML) Transmembrandomäne kloniert.

Es wurden jeweils 20 Klone der J558L-IgE_{MS}- und der J558L-IgE_{ML}-Variante auf ihr Expressionsniveau hin getestet. Als Beispiel sind in der Abbildung 18 die Klone J558L-IgE_{MS}4 und

J558L-IgE_{ML}7 aufgeführt. Wie aus der Abbildung 18 hervorgeht, exprimieren beide Klone humanes Immunglobulin E in seiner transmembranen Form. Der Unterschied im Expressionsniveau der beiden Klone ist bedingt durch die Variabilität der Transfektion.

4.8 Nachweis der spezifischen Bindungseigenschaften beider Fv-Domänen

Nachdem der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper aufgereinigt worden war, musste gezeigt werden, dass dieser in der Lage ist, zwei verschiedene Antigene zu binden. Dazu wurden zwei verschiedene Zelllinien benötigt, die entweder das humane IgE oder den humanen CD3-Komplex exprimieren. HPB-ALL-Zellen wurden gewählt, da es sich dabei um eine humane T-Lymphom-Zelllinie handelt auf deren Oberfläche CD3 präsentiert wird. Die Klonierung der IgE-positiven J558L-IgE_{MS}4 und J558L-IgE_{ML}7 wurde in Kapitel 4.7 beschrieben. So standen drei Zelllinien zur Verfügung mit deren Hilfe der Nachweis der spezifischen Bindung erbracht werden konnte.

Für die FACS-Analyse wurden der J558L-IgE_{MS}4- und der J558L-IgE_{ML}7-Klon und die HPB-ALL-Zellen jeweils mit dem bispezifischen IgExCD3 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde ein Maus anti-Histidin Antikörper dazugegeben, und dieser wiederum mit einem PE-markiertem anti-Maus-FcGamma Antikörper nachgewiesen. Als Auswertegerät diente wieder ein FACScan der Firma Becton Dickinson.

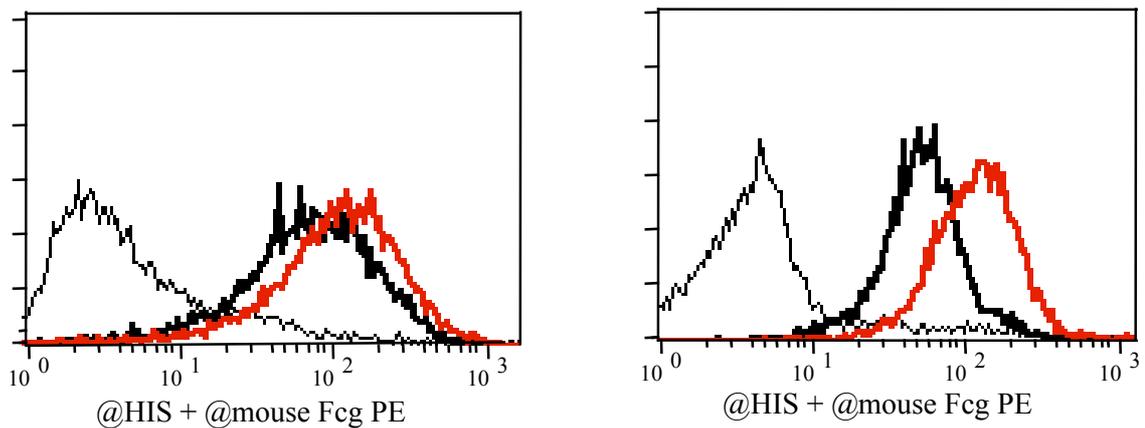


Abbildung 19 FACS-Analyse der Bindungseigenschaften des IgExCD3 bispezifischen Antikörpers. A: Bindung auf IgE-positive J558L-IgE_{MS}4 und J558L-IgE_{ML}7 Zellen. B: Bindung auf CD3-positiven HPB-ALL-Zellen. Der Nachweis wurde jeweils mit einem Maus anti-Histidin Antikörper und anschließender Inkubation mit einem PE-markierten anti-Maus-FcGamma durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt die grafische Auswertung der FACS-Analyse. Auf dem Bild A erkennt man die Bindung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 an die Transfektanten J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7}, welche membranständiges humanes IgE auf ihrer Oberfläche präsentieren. Bild B zeigt die Bindung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 an HPB-ALL-Zellen, welche humanes CD3 exprimieren. Der Nachweis des gebundenen bispezifischen Antikörpers erfolgte beide Male mit einem anti-Histidin Antikörper und einem PE-markiertem anti-Maus-FcGamma Antikörper.

4.9 Zytotoxizität von CD8-positiven T-Lymphozyten und PBMC

Im vorhergehenden Kapitel wurde demonstriert, dass der bispezifische single-chain Antikörper IgExCD3 in der Lage ist, IgE-positive Zellen zu binden. Das eigentliche Ziel dieses Konstruktes ist aber nicht nur die Bindung an IgE-positive Zellen, sondern deren Eliminierung. Dies soll durch die CD3-Spezifität vermittelt werden, die zur Rekrutierung zytotoxischer T-Lymphozyten führen soll.

Ein Standardverfahren zur Messung zytotoxischer Aktivität ist der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest. Dabei wurden die potentiellen Zielzellen, in diesem Fall die IgE-positiven Klone J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7}, für eine Stunde mit radioaktivem Natrium-Chromat inkubiert und danach gewaschen. Als Effektorzellen wurden sowohl unstimulierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) als auch vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten verwendet. In jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurden 10.000 Zielzellen und 100.000 Effektorzellen pipettiert. Anschließend wurde der bispezifische Antikörper IgExCD3 in Konzentrationen von 0,064-5000 ng/ml dazu titriert. Nach 24 Stunden wurde die Platte zentrifugiert und 50 µl des Überstandes entnommen. Mit Hilfe eines Gamma-Zählers wurde ermittelt, wie viel radioaktives Natrium-Chromat von den Zielzellen freigesetzt wurde. Zur Bestimmung der Spontanlyse wurde kein bispezifischer Antikörper zugegeben. Um die Maximallyse zu bestimmen wurde eine 0,5%ige Triton-X-100-Lösung dazugefügt. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und jeweils das arithmetische Mittel daraus bestimmt. Die spezifische Zytotoxizität wurde nach folgender Formel berechnet:

Tabelle 9 Berechnung der effektiven spezifischen Lyse

$$Z_e = (Z_b - Z_s) / (Z_m - Z_s) \times 100\%$$

Z_b entspricht der Menge an Radioaktivität, welche nach Zugabe des bispezifischen Antikörpers abgegeben wurde.

Z_s stellt die Menge an Radioaktivität dar, welche in Abwesenheit des bispezifischen Antikörpers freigesetzt wurde = Spontanlyse

Z_m ist die Menge an Radioaktivität, welche durch Zugabe einer 0,5%igen Triton-X-100-Lösung maximal freigesetzt werden konnte = Maximallyse

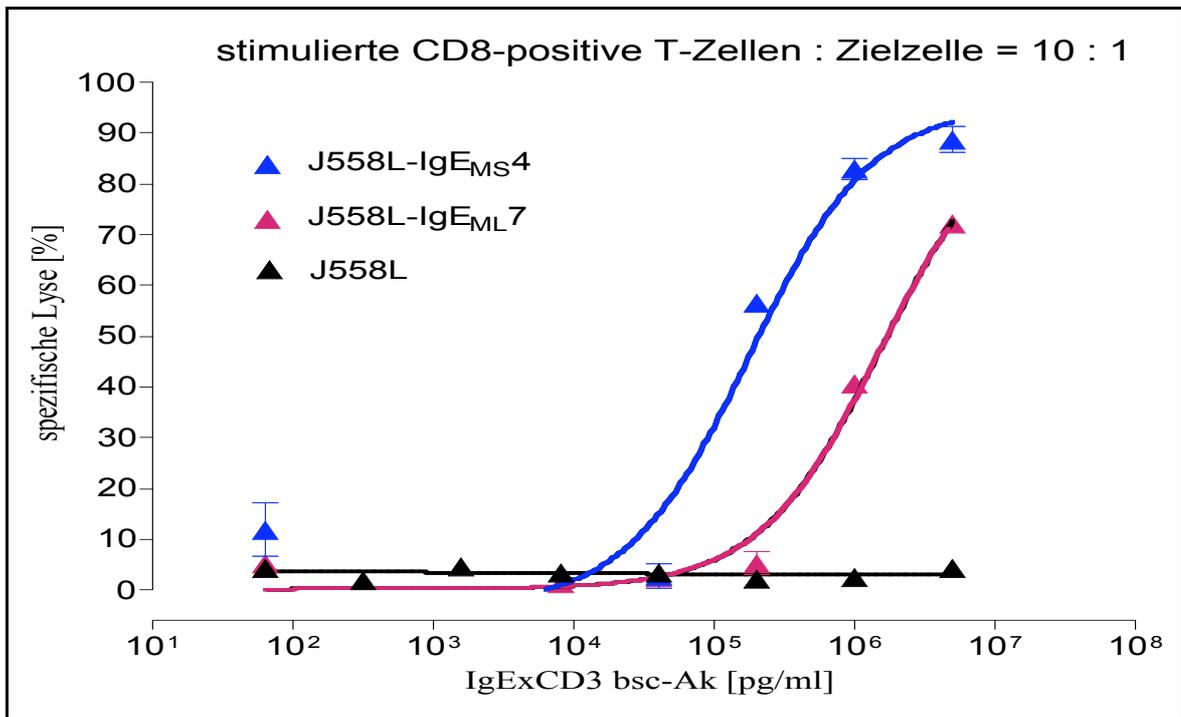


Abbildung 20 Freisetzung von radioaktivem Natrium-Chromat. Als Effektorzellen wurden stimulierte humane CD8-positive T-Lymphozyten verwendet. Als Zielzellen wurden J558L und die IgE-positiven Klone J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} eingesetzt. Der IgExCD3 Antikörper wurde in Konzentrationen von 0,064-5000 ng/ml titriert.

In Abbildung 20 ist die effektive prozentuale spezifische Lyse des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 wiedergegeben. Wie aus der Darstellung ersichtlich ist, kommt es bei den transfizierten J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} zu einer konzentrationsabhängigen spezifischen Lyse. Die effektive Dosis, bei der 50% der maximalen Lyse erreicht wird, die EC₅₀, beträgt bei den J558L-IgE_{MS4} 178 ng/ml. Die EC₅₀ der J558L-IgE_{ML7} Zellen liegt bei 1540 ng/ml. Die untransfizierten J558L-Zellen, die kein membranständiges humanes IgE auf ihrer Oberfläche präsentieren, werden selbst in Anwesenheit von hohen Konzentrationen des bispezifischen IgExCD3 Antikörpers nicht lysiert.

Um die Variabilität der spezifischen Lyse in Abhängigkeit der verwendeten PBMC darzustellen wurde der Zytotoxizitäts-Test nochmals mit J558L-IgE_{MS4}-Zellen und unstimulierten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) verschiedener Spender durchgeführt.

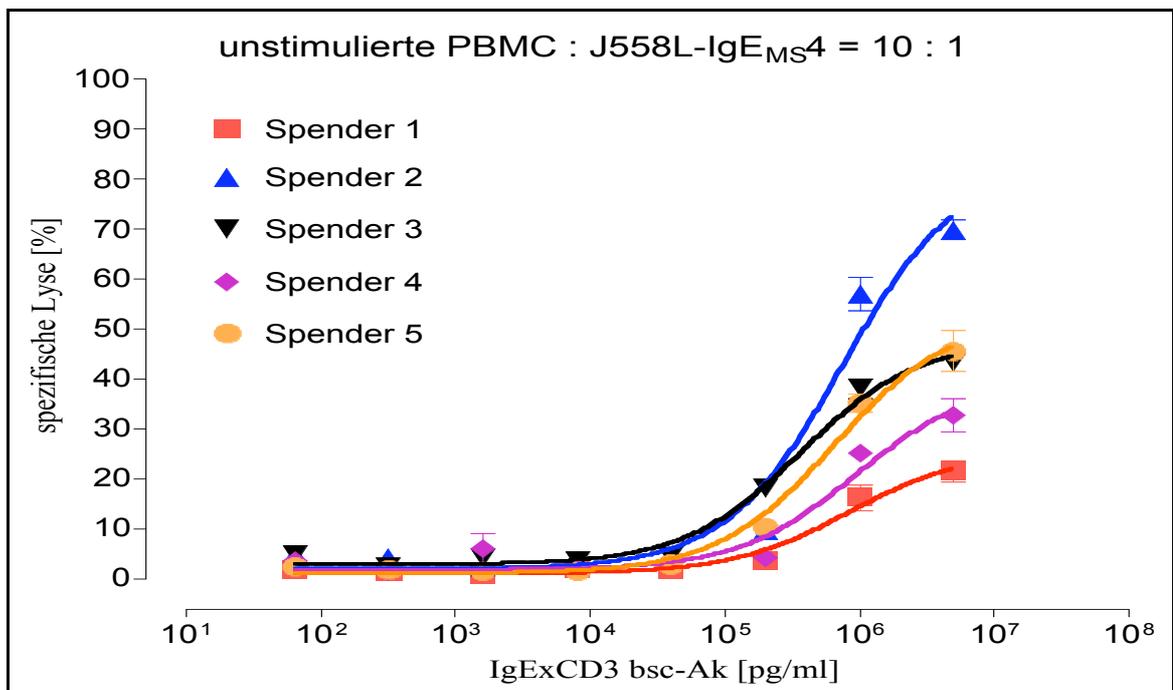


Abbildung 21 ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut verschiedener Spender. Als Zielzellen wurden die IgE-positiven J558L-IgE_{MS4}-Zellen eingesetzt.

Wie aus der Abbildung 21 zu erkennen ist, kommt es zu Unterschieden im Lyseverhalten der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut verschiedener Spender. Die höchste Konzentration des bispezifischen IgExCD3 Antikörpers, die bei diesem Test eingesetzt wurde, liegt bei 5 µg/ml. Bei dieser Konzentration schwankt die effektive Lyse zwischen 20% und 70%. Die EC50-Konzentration variieren zwischen 365 und 936 ng/ml.

Eine weitere Methode, um die zytotoxische Aktivität gegenüber IgE-positiven Zellen zu zeigen, besteht in der mikroskopischen Beobachtung. Dabei wurden 10.000 J558L-Zellen beziehungsweise die IgE-positiven Zellen J558L-IgE_{MS4} mit 100.000 CD3-positiven T-Lymphozyten kultiviert. Dieser Ansatz wurde mit dem bispezifischen Antikörper IgExCD3 für 24 Stunden inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung betrachtet.

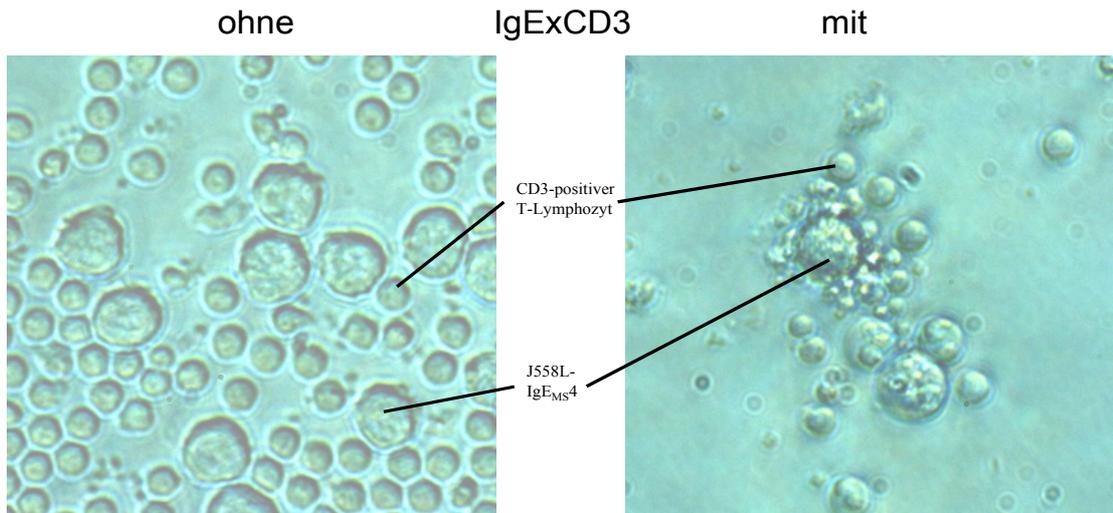


Abbildung 22 Mikroskopische Aufnahme bei 400facher Vergrößerung. Dargestellt sind die IgE-positiven Zellen J558L-IgE_{MS4} nachdem sie 24 Stunden mit CD3-positiven Zellen inkubiert wurden. Links: ohne Zugabe des bispezifischen Antikörpers IgExCD3. Rechts: mit Zugabe des bispezifischen Antikörpers IgExCD3.

Wie in der Abbildung 22 zu erkennen ist, kommt es ohne den IgExCD3 Antikörper zu keiner Interaktion zwischen den IgE-positiven Zellen J558L-IgE_{MS4} und den CD3-positiven T-Lymphozyten. Bei Zugabe des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 kommt es zu einer Anlagerung der beiden Zellen, wobei sich in diesem Fall mehrere T-Lymphozyten an die J558L-IgE_{MS4}-Zellen binden. Die IgE-positiven Zellen verändern sich auch mikroskopisch sichtbar. Es kommt zur Bildung kleiner Granula, zu einer Umstrukturierung der Membran und zur Lyse der J558L-IgE_{MS4}-Zellen.

4.10 Einfluss von löslichem IgE auf die zytotoxische Aktivität

Wie bereits in Abschnitt 1.6 erläutert, erkennt der bispezifische single-chain Antikörper IgExCD3 die CH3-Domäne des Immunglobulin E. Diese Struktur ist allerdings nicht nur auf dem membranständigen IgE von B-Lymphozyten sondern auch auf löslichem IgE frei zugänglich. Daher stellt sich die Frage, inwieweit lösliches IgE zu einer Inhibition der Zytotoxizität führen kann.

Der Effekt sollte, ähnlich wie im vorhergegangenen Abschnitt, in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest untersucht werden. Bei den Effektorzellen (E) handelt es sich um stimulierte CD3-positive Zellen aus dem peripheren Blut. Als Zielzellen (Z) wurden die Klone J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} eine Stunde lang mit ⁵¹Chrom beladen. Zu 10.000 Zielzellen und 100.000 Effektorzellen wurde der IgExCD3 Antikörper in Konzentrationen von 0,064-5000 ng/ml gegeben. Zusätzlich wurde zu diesem Ansatz lösliches humanes IgE titriert. Als Anhaltspunkt für die eingesetzte Konzentration

des IgE diene die Serum-IgE-Konzentration beim Menschen. Wie in Abschnitt 1.4 erläutert, liegt der obere Normwert bei 0,24 µg/ml. Der höchste IgE-Spiegel, der bei einem allergischen Patienten jemals festgestellt wurde, liegt laut Literatur bei rund 2,4 µg/ml. Um in vitro eine Situation zu schaffen, die der im Menschen möglichst nahe kommt, wurde deshalb das lösliche IgE in einem Bereich von 0,04-5,0 µg/ml titriert. Die maximale Lyse wurde durch Zugabe einer 1%-igen Triton-X-100-Lösung bestimmt. Nach 24 Stunden wurde die freigesetzte Menge an radioaktivem Natrium-Chromat durch einen Gamma-Zähler bestimmt. Die Berechnung der prozentualen spezifischen Lyse erfolgte auf der Basis der in Abschnitt 4.9 vorgestellten Formel.

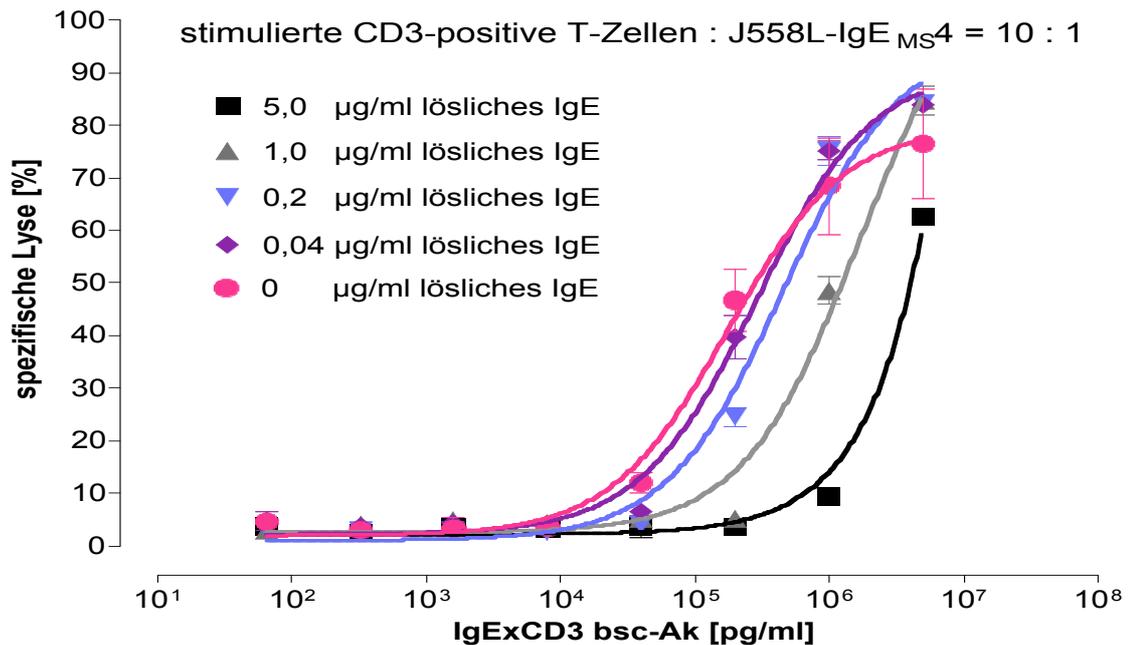


Abbildung 23 Grafische Darstellung der Freisetzung von ⁵¹Chrom. Als Effektorzellen (E) wurden stimulierte CD3-positive T-Zellen aus dem peripheren Blut verwendet. Die Zielzellen wurden in einer zehnfach höheren Konzentration eingesetzt. Der bispezifische Antikörper IgExCD3 wurde in Konzentrationen von 0,064-5000 ng/ml eingesetzt und lösliches humanes IgE in einem Bereich von 40-5000 ng/ml dazu titriert.

Abbildung 22 veranschaulicht die Konkurrenz der Zytotoxizität durch lösliches humanes IgE. Eine Konzentration von 0,2 µg/ml lösliches IgE entspricht in etwa dem Wert der bei gesunden Menschen vorliegt. Bis dahin kommt es zu keiner signifikanten Einschränkung der Lyse. Die EC50 beträgt hier 450 ng/ml. Erst bei Zugabe von löslichem IgE in einer Konzentration von 1 µg/ml tritt eine merkliche Reduktion der spezifischen Lyse ein; die EC50 fiel dabei auf 1670 ng/ml. Trotzdem findet weiterhin eine spezifische Zerstörung der Zielzellen statt. Erst bei einer IgE-Konzentration von 5 µg/ml, die bereits über den höchsten bei Allergikern gemessenen IgE-Werten liegt, zeigt sich eine erhebliche Blockade der spezifischen Lyse.

4.11 Aktivierung von humanen T-Zellen

Um einen weiteren Beweis zu erbringen, dass der bispezifische Antikörper IgExCD3 tatsächlich zytotoxische CD3-positive Effektorzellen rekrutiert, soll deren Verhalten während der Eliminierung von IgE-positiven Zellen genauer betrachtet werden. Als Subpopulationen der Effektorzellen kommen sowohl CD4-positive als auch CD8-positive T-Lymphozyten in Frage. Daher sollten deren Reaktionen bei einer Ko-Inkubation mit IgE-positiven Zielzellen und dem bispezifischem Antikörper IgExCD3 charakterisiert werden. Dies sollte durch die Analyse der Zytokine, die von T-Lymphozyten freigesetzt werden, und die Expression von bekannten Aktivierungsmarkern untersucht werden.

Dazu wurden 10.000 J558L-IgE_{MS4}- beziehungsweise J558L-IgE_{ML7}-Zellen zusammen mit 100.000 unstimulierten CD3-positiven T-Zellen aus dem peripheren Blut und dem IgExCD3 Antikörper in einer Konzentration von 500 ng/ml in einer 96-Loch-Platte kultiviert. Dieser Ansatz wurde dreimal durchgeführt, um die zu untersuchenden Parameter nach 24, 48 und 72 Stunden zu bestimmen. Zu diesen Zeitpunkten wurden die jeweiligen Platten zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden jeweils für die Untersuchung der Zytokine verwendet. Die Ausschüttung dieser Zytokine wurde mit Hilfe von kommerziellen Sandwich-ELISAs untersucht. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Das Zellpellet wurde resuspendiert und in zwei Fraktionen aufgeteilt.

Die Expressionsanalyse von Oberflächenmarkern auf T-Lymphozyten stellt ein Verfahren dar, um deren Aktivierung zu demonstrieren. Man nutzt dazu die Kenntnis, dass aktivierte T-Lymphozyten nach einer gewissen Zeit verschiedene Marker präsentieren. Im Einzelnen handelt es sich dabei insbesondere um:

Tabelle 10 Auflistung der Eigenschaften von CD25 und CD69

| | | |
|------|----------------|---|
| CD25 | Expression | aktivierte T-Lymphozyten |
| | Wirkung | IL-2 Rezeptor, Proliferation von T-Lymphozyten |
| | Hochregulation | im Vergleich zu CD69 eher spät |
| CD69 | Expression | aktivierte Makrophagen, NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten |
| | Wirkung | genaue Funktion unbekannt |
| | Hochregulation | früh nachweisbar |

Zur Expressionsanalyse dieser Aktivierungsmarker mittels FACS wurde daher das oben genannte Zellpellet nach folgendem Schema untersucht:

- 1) CD4-positive Zellen, Expression von CD69 und CD25
- 2) CD8-positive Zellen, Expression von CD69 und CD25

CD4-positive T-Lymphozyten

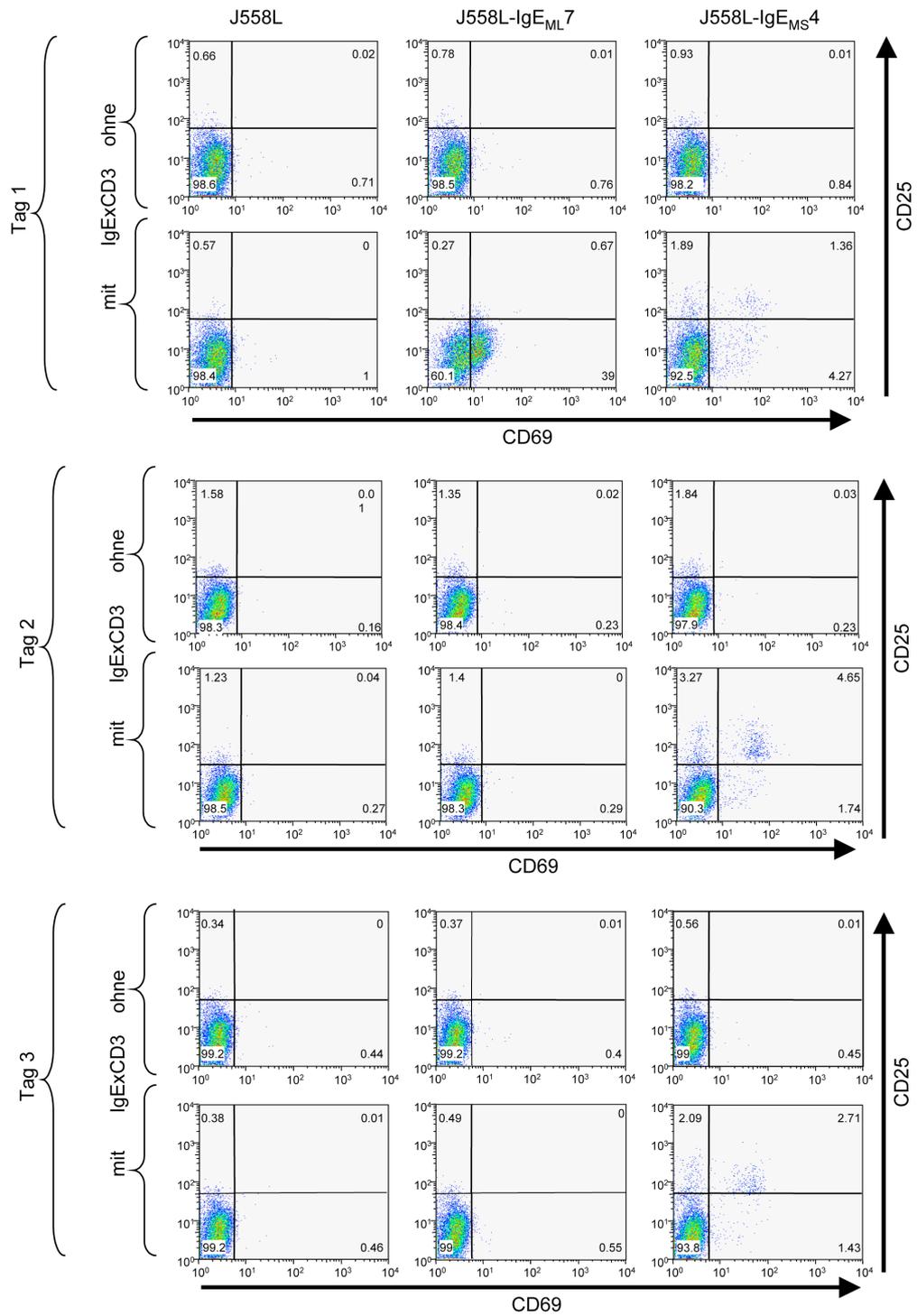


Abbildung 24 Darstellung der Expressionanalyse von CD25 und CD69 auf CD4-positiven Lymphozyten mittels FACS. Die Auswertung erfolgte jeweils an Tag 1, 2 und 3.

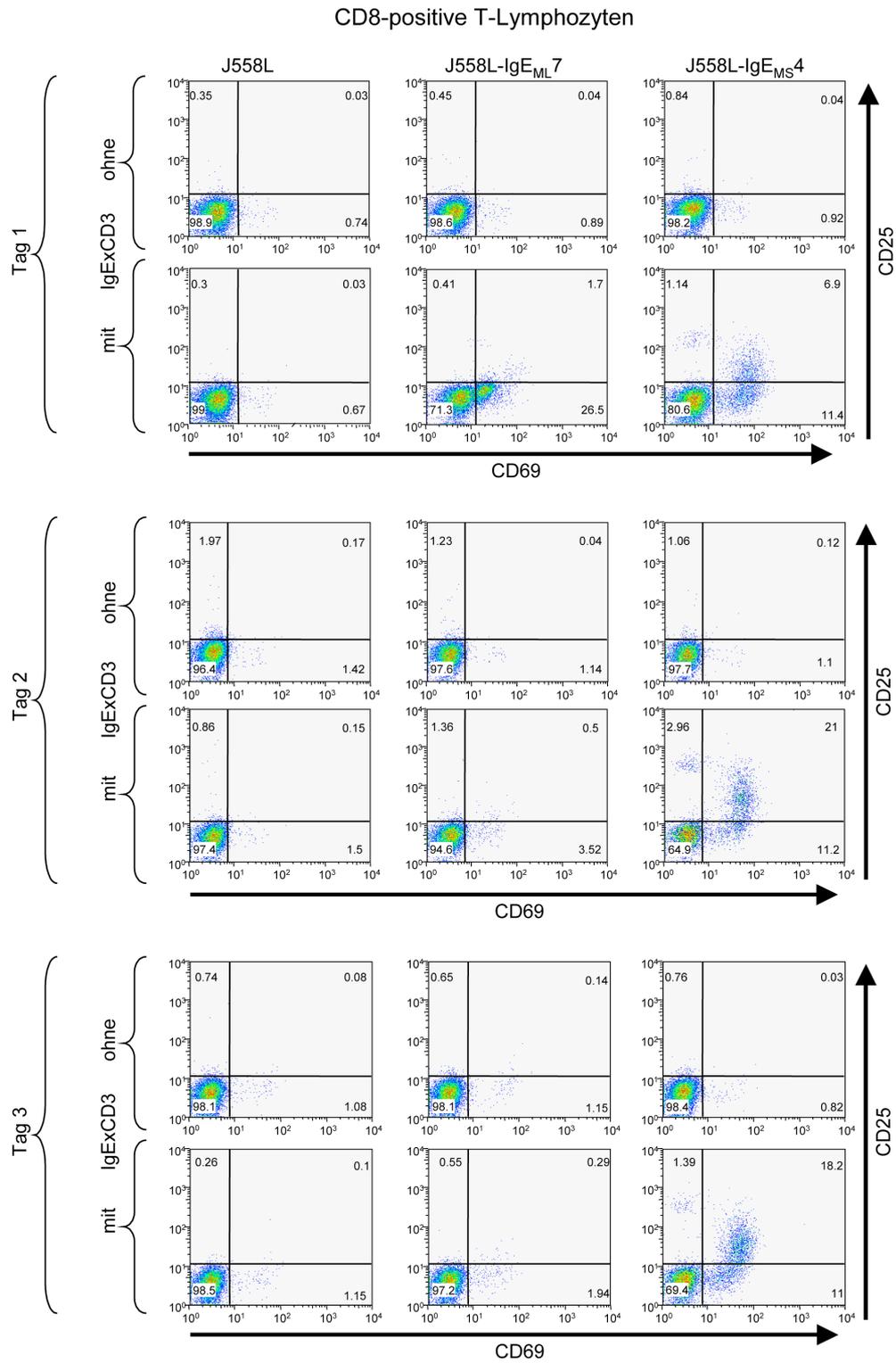


Abbildung 25 Darstellung der Expressionanalyse von CD25 und CD69 auf CD8-positiven Lymphozyten mittels FACS. Die Auswertung erfolgte jeweils an Tag 1, 2 und 3.

Wie in Abbildung 24 und 25 wiedergegeben, kommt es während der Eliminierung von IgE-positiven

Zellen zu einer verstärkten Expression von CD25 und CD69. Vor allem auf CD8-positiven T-Lymphozyten ist das Expressionsniveau beider Aktivierungsmarker deutlich erhöht. Bei den CD4-positiven T-Zellen kann ähnliches beobachtet werden. Die Expression entsprechender Oberflächenmoleküle erfolgte hier jedoch im Vergleich verzögert und ist weniger stark ausgeprägt.

Um zusätzliche Informationen über die Aktivierung von T-Lymphozyten während der Eliminierung IgE-positiver B-Zellen zu erhalten, kann man ebenfalls die Freisetzung folgender Zytokine in Betracht ziehen:

Tabelle 11 Auflistung von Zytokinen, ihrer Wirkung und ihres Produktionsortes

| | | |
|-----------|------------|--|
| TNF-alpha | Produktion | T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen |
| | Wirkung | Aktivierung von Endothelzellen |
| INF-gamma | Produktion | T-Lymphozyten und NK-Zellen |
| | Wirkung | Aktivierung von Makrophagen |

Dazu wurden 50 µl der entsprechenden Überstände entnommen und mit Hilfe kommerzieller ELISA-Kits auf die Ausschüttung entsprechender Zytokine hin beurteilt. Die Messung erfolgte jeweils an Tag 1, 2 und 3.

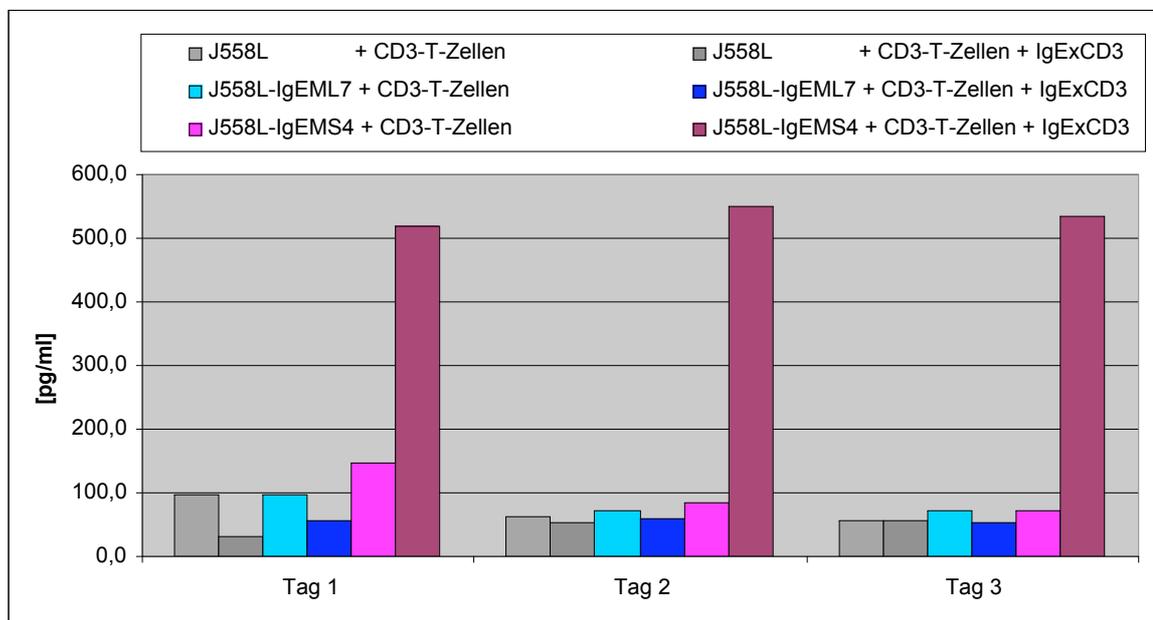


Abbildung 26 Messung der Freisetzung von Interferon-Gamma nach 1, 2 und 3 Tagen. Als Effektorzellen wurde unstimulierte CD3-positive T-Lymphozyten verwendet. Als Zielzellen kamen sowohl die J558L-Zellen als auch die IgE-positiven Zellen J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} zum

Einsatz. Die Konzentration des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 betrug 500 ng/ml.

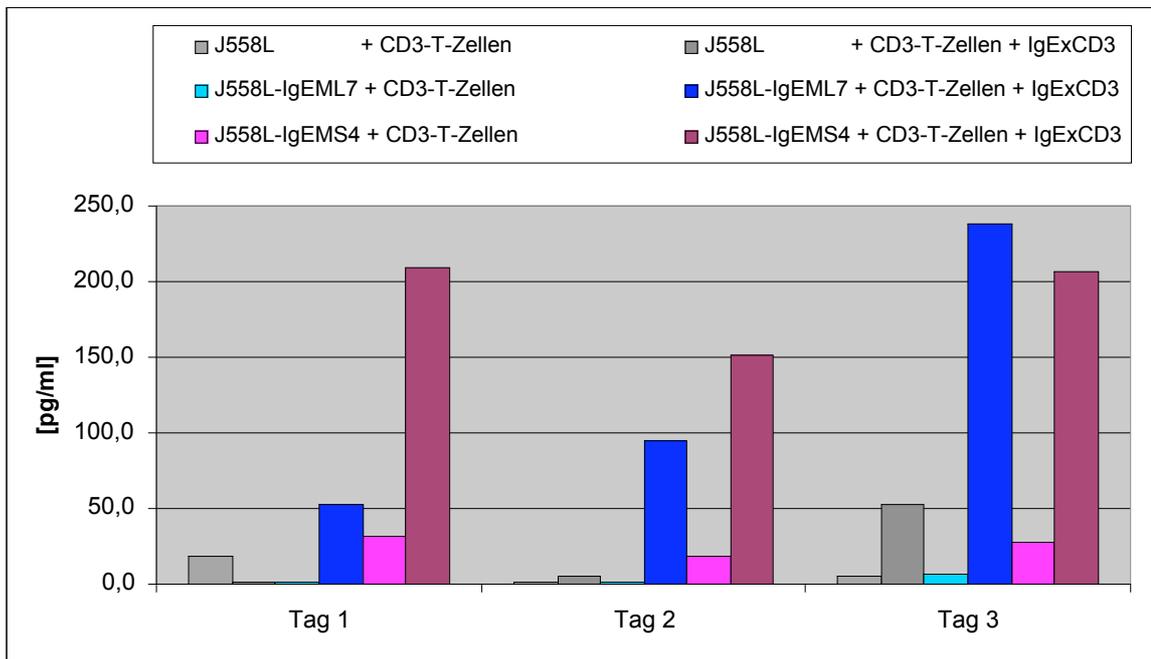


Abbildung 27 Messung der Freisetzung von TNF-Alpha nach 1, 2 und 3 Tagen. Als Effektorzellen wurde unstimulierte CD3-positive T-Lymphozyten verwendet. Als Zielzellen kamen sowohl die J558L-Zellen als auch die IgE-positiven Zellen J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} zum Einsatz. Die Konzentration des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 betrug 500 ng/ml.

In den Abbildung 26 und 27 ist die Freisetzung von TNF-Alpha beziehungsweise INF-Gamma dargestellt: Wie zu erkennen ist, kommt es während der Eliminierung von IgE-positiven B-Zellen zu einer signifikanten Freisetzung von INF-Gamma nur dann, wenn sowohl die CD3-positiven Effektorzellen als auch die IgE-positiven Zielzellen als auch der bispezifische Antikörper IgExCD3 ko-inkubiert wurden. Eine Ausschüttung von INF-Gamma während der Inkubation mit den J558L-IgE_{ML7}-Zellen war nicht zu beobachten, was an der schwächeren Expression von transmembranem IgE liegen dürfte. Ergänzend dazu, konnte die Ausschüttung von TNF-Alpha bei beiden IgE-positiven Klonen nachgewiesen werden. Hierbei wurde während der Ko-Inkubation mit den J558L-IgE_{MS4}- und den J558L-IgE_{ML7}-Zellen eine unterschiedliche Menge von TNF-Alpha freigesetzt, korrespondierend mit der Expression von transmembranem Immunglobulin E auf deren jeweiliger Oberfläche.

4.12 Beladung des FcEpsilon-Rezeptor I mit löslichem IgE

In Abbildung 10 wurde bereits dargestellt, dass der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper

spezifisch gegen die CH3-Domäne der Epsilon-Kette reagiert. Diese Domäne sollte bei dem Rezeptor-gebundenem Immunglobulin E, wie es auf Mastzellen vorkommt, durch die Alpha-Kette des hochaffinen FcEpsilon-Rezeptor I blockiert und damit als Zielstruktur für den IgExCD3 Antikörper nicht erkennbar sein. Dies ist von enormer Wichtigkeit, da eine Erkennung von Mastzellen fatale Folgen, wie zum Beispiel einen anaphylaktischen Schock, haben könnte.

Da sich Mastzellen beziehungsweise basophile Granulozyten nur schwer aus menschlichem Primärmaterial aufreinigen lassen, musste auf eine Zelllinie zurückgegriffen werden. Der FcEpsilon-Rezeptor I besteht aus den drei verschiedenen Kette: Alpha, Beta und Gamma. Da aber nur die Alpha-Kette für die Bindung des löslichen IgE zuständig ist, sollte eine nicht-humane Mastzelllinie, die mit der humanen Alpha Kette des FcEpsilon-Rezeptors I transfiziert ist, in der Lage sein lösliches humanes IgE zu binden. Von der Arbeitsgruppe Vogel wurde freundlicherweise die Ratten-Mastzelllinie RBL-2H3 zur Verfügung gestellt, welche stabil mit der humanen Alpha-Kette des hochaffinen FcEpsilon-Rezeptor I transfiziert wurde.

Durch den Einsatz der FACS-Analyse sollte festgestellt werden, ob es möglich ist, die transfizierten RBL-2H3 Zellen mit löslichem humanem IgE zu beladen. Außerdem sollte bestimmt werden bei welcher Konzentration das Optimum der Beladung erreicht ist. Dazu wurden die Zellen jeweils für 30 Minuten mit löslichem humanem IgE inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein FITC -markierter anti-IgE Antikörper dazugegeben. Die Zellen wurden anschließend erneut gewaschen und in 1%-iger Formaldehyd-Lösung resuspendiert. Als Auswertegerät diente ein FACScan der Firma Becton Dickinson.

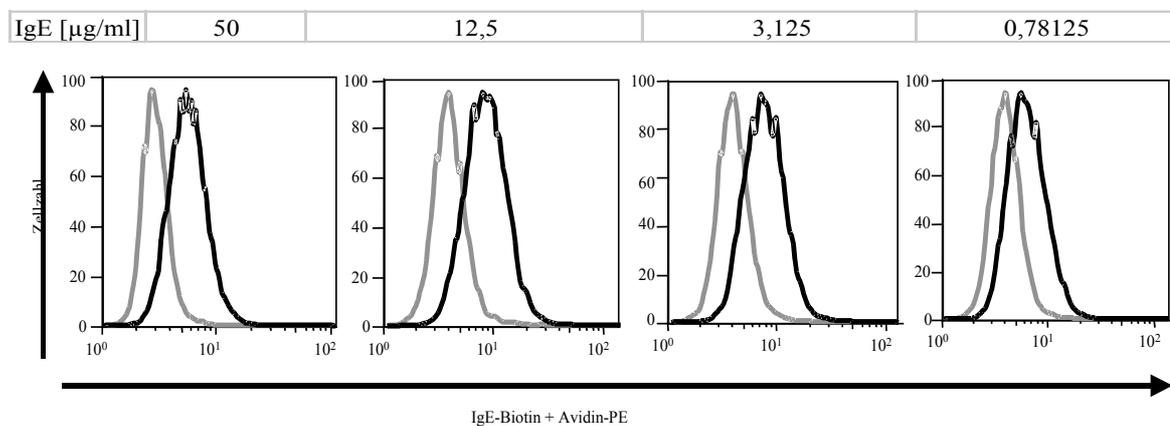


Abbildung 28 Beladung der Ratten-Mastzelllinie RBL-2H3, die mit der humanen Alpha-Kette des hochaffinen FcEpsilon-Rezeptors I transfiziert ist, mit löslichem humanem IgE. Das IgE wurde dabei in einem Konzentrationsbereich von 0,78-50 $\mu\text{g/ml}$ titriert. Zur negativen Kontrolle dienten die RBL-2H3-Zellen ohne Zugabe von löslichem IgE.

Die Abbildung 28 zeigt zum einen, dass sich die transfizierte RBL-2H3 Zelllinie mit löslichem

humanem Immunglobulin E beladen lassen. Zum anderen kann die optimale Konzentration von löslichem IgE für die Beladung der Mastzelllinie mit 12,5 µg/ml angegeben werden.

4.13 Analyse der zytotoxischen Aktivität gegenüber Mastzellen

In Abschnitt 4.13 wurde gezeigt, dass es möglich ist, die transfizierten Ratten-Mastzellen RBL-2H3 mit löslichem humanem Immunglobulin E zu beladen. Mit Hilfe dieser Zellen sollte analysiert werden, ob das Rezeptor-gebundene IgE auf diesen Zellen durch den IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörper erkannt und dadurch eine Eliminierung der Mastzellen ausgelöst wird.

Dies sollte durch einen ⁵¹Chrom-Freisetzungstest untersucht werden. Dazu wurden 10.000 RBL-2H3-Transfektanten für eine Stunde mit radioaktivem Natrium-Chromat beladen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit humanem IgE in einer Konzentration von 12,5 µg/ml beladen. Nach erneutem Waschen wurden 100.000 vorstimulierte aufgereinigte CD8-positive T-Lymphozyten hinzugegeben. Der bispezifische Antikörper IgExCD3 wurde in einem Konzentrationsintervall von 0,064-1000 ng/ml dazu titriert. Die maximale Lyse wurde durch Zugabe einer 1%-igen Triton X-100 Lösung bestimmt. Nach 24 Stunden wurde mit Hilfe eines Gamma-Zählers die freigesetzte Menge an radioaktivem Natrium-Chromat ermittelt. Zur Bestimmung der prozentualen spezifischen Lyse wurde die Formel angewendet, die in Tabelle 8 vorgestellt wurde.

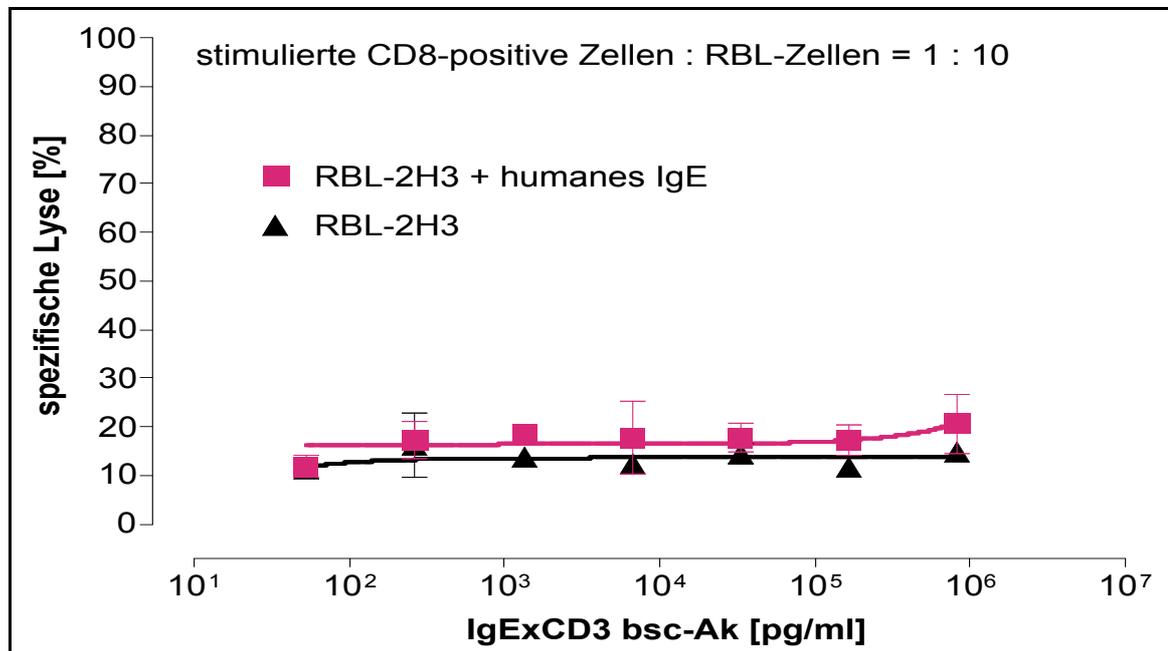


Abbildung 29 Grafische Darstellung der spezifischen Lyse von Mastzellen. Das freigesetzte radioaktive Natrium-Chromat wurde mit Hilfe eines Gamma-Zählers bestimmt. Als Effektorzellen wurden stimulierte CD8-positive T-Lymphozyten verwendet. Der IgExCD3 Antikörper wurde in Konzentrationen von 0,064-1000 pg/ml eingesetzt. Als negative Kontrolle wurden die unbeladenen

RBL-2H3-Zellen eingesetzt. Um die Funktionalität des Experiments zu kontrollieren, wurden die J558L-Zellen und die entsprechenden IgE-positiven J558L-IgE_{MS4}-Zellen im gleichen Ansatz mitgetestet (gestrichelte Linien).

Nach der Beladung der RBL-2H3-Transfektanten präsentieren diese Zellen Rezeptor-gebundenes humanes Immunglobulin E auf ihrer Oberfläche. Es wurden vorstimulierte aufgereinigte CD8-positive T-Lymphozyten eingesetzt, um eine spezifische Zellyse, sofern vorhanden, aufzuzeigen. Abbildung 29 verdeutlicht, dass selbst vorstimulierte CD8-positive T-Zellen in Anwesenheit des bispezifischen Antikörper IgExCD3 nicht zur Eliminierung von IgE-beladenen Mastzellen führen. Selbst in Gegenwart höchster Antikörper-Konzentrationen kommt es zu keiner signifikanten Lyse von Mastzellen.

4.14 Analyse der Mastzell-Degranulation in Gegenwart des IgExCD3 Antikörpers

In Kapitel 4.14 konnte gezeigt werden, dass es durch den bispezifischen Antikörper IgExCD3 nicht zu einer Eliminierung von IgE-beladenen Mastzellen kommt. Neben der Eliminierung der Mastzellen besteht als weitere Gefahr die Möglichkeit, dass es durch den Einsatz des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers zu einer Kreuzvernetzung des Rezeptor-gebundenen IgE auf den Mastzellen und damit zu einer Aktivierung beziehungsweise Degranulation der Mastzellen kommt. Um dies zu untersuchen, macht man sich folgende Eigenschaft der Ratten-Mastzellen RBL-2H3 zunutze: Ähnlich wie humane Mastzellen, enthalten auch diese Mastzellen Granula. Diese sind angefüllt mit unterschiedlichen Entzündungsmediatoren und Enzymen. Unter anderem enthalten sie das Enzym Beta-Hexosaminidase, welches folglich bei einer Degranulation der Mastzellen freigesetzt wird. Dieses Enzym vermag von dem farblosen Substrat p-Nitrophenyl-Acetyl- β -D-Glucosamin (PNAG) das nachweisbare 4-Nitrophenyl abzuspalten. Die Menge des freigesetzten 4-Nitrophenyl kann im Photometer bei 405 nm bestimmt werden.

10.000 transfizierte RBL-2H3 Zellen wurden pro Loch in eine 96-Loch Platte gegeben und eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurde zur Beladung dieser Zellen lösliches humanes IgE in einer Konzentration von 12,5 μ g/ml dazu pipettiert. Nach 20 Stunden wurden die Zellen gewaschen und 100.000 unstimulierte CD3-positive T-Zellen aus dem peripheren Blut hinzugefügt. Der bispezifische Antikörper IgExCD3 wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,064-5000 ng/ml dazu titriert. Als positive Kontrolle wurde ein kommerzieller monoklonaler anti-IgE Antikörper dazugegeben. Nach einer Stunde wurden 30 μ l des Überstandes abgenommen, mit 50 μ l PNAG vermischt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung angehalten und das abgespaltene 4-Nitrophenyl im Photometer bestimmt. Die prozentuale spezifische Degranulation wurde analog zu der in Abschnitt

4.9 erwähnten Formel berechnet.

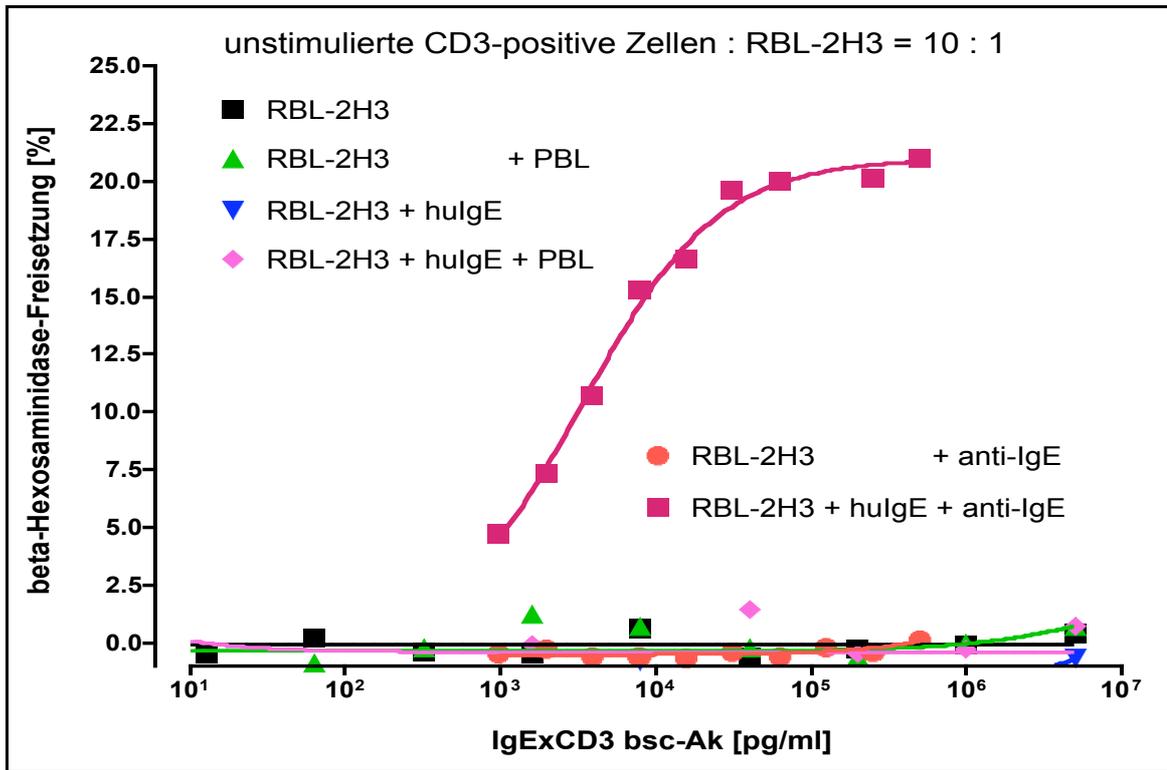


Abbildung 30 Grafische Darstellung der prozentualen spezifischen Degranulation von Mastzellen. Gemessen wurde die Umsetzung des Substrates PNAG durch das Enzym Beta-Hexosaminidase. Als Stimulatorzellen wurden unstimulierte CD3-positive T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut eingesetzt. Der IgExCD3 Antikörper wurde in Konzentrationen von 0,064-5000 pg/ml eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde ein monoklonaler anti-IgE Antikörper verwendet, der durch Quervernetzung des IgE, welches über den FcEpsilon-Rezeptor I an die Mastzellen gebunden ist, die Degranulation auslöst.

In Abbildung 30 ist die prozentuale spezifische Degranulation von Mastzellen wiedergegeben. Die Darstellung lässt erkennen, dass es bei den transfizierten RBL-2H3 Zellen, die auf ihrer Oberfläche Rezeptor-gebundenes IgE präsentieren, durch die Zugabe von CD3-positiven T-Lymphozyten und bispezifischem Antikörper IgExCD3 zu keiner Degranulation kommt. Im Gegensatz dazu führt der monoklonale anti-IgE Antikörper zu einer konzentrationsabhängigen Freisetzung von Beta-Hexosaminidase.

4.15 Beladung des FcEpsilon-Rezeptor II mit löslichem IgE

Neben dem hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I existiert im Menschen noch ein niedrig-affiner

FcEpsilon-Rezeptor II, den man auch als CD23 bezeichnet. Außer auf eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten wird dieser unter anderem auch auf reifen B-Lymphozyten exprimiert. Obwohl über die Rolle von CD23 und CD23-positiven Zellen nicht sonderlich viel in Bezug auf die Allergie bekannt ist, sollten diese CD23-positiven Zellen selbstverständlich ebenfalls nicht durch den Einsatz des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 eliminiert werden.

Um dies in einem später folgendem Experiment auszuschließen, musste zuerst sichergestellt werden, dass CD23-positive Zellen passiv mit löslichem humanem IgE beladen werden können. Die Arbeitsgruppe Wank stellte freundlicherweise die humane B-Zelllinie HOM2 zur Verfügung, welche durch eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisiert wurde. Diese Zelllinie wurde zunächst durch FACS-Analyse auf die Expression des CD23-Moleküls hin untersucht. Daraufhin sollte festgestellt werden, ob und in welcher Konzentration diese Zellen mit löslichem humanem IgE beladen werden können. Dazu wurden die HOM2-Zellen für 30 Minuten mit löslichem IgE inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde ein FITC-markierter anti-IgE Antikörper dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in einer 1%-iger Formaldehyd-Lösung resuspendiert. Die FACS-Analyse erfolgte an einem FACScan der Firma Becton Dickinson.

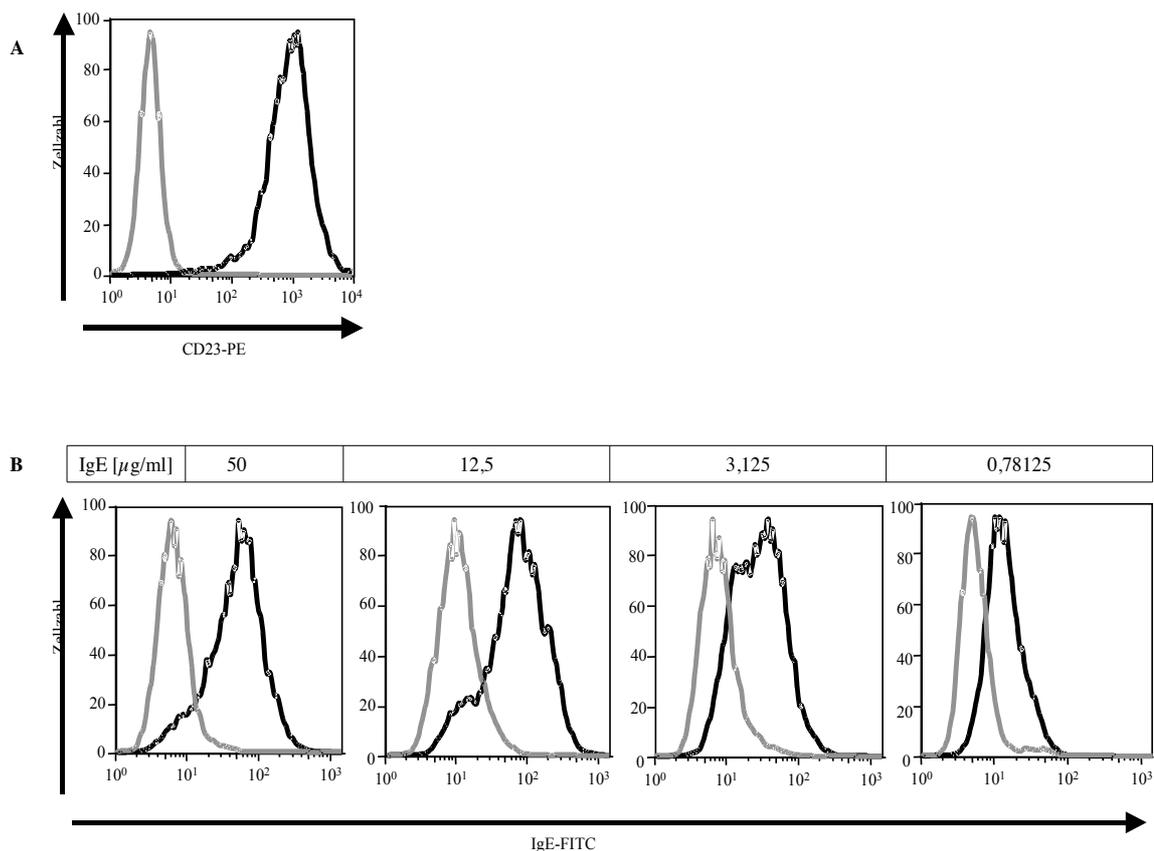


Abbildung 31 A: Expression von CD23 auf HOM2-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit einem PE-markierten anti-CD23 Antikörper. B: Beladung des niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptors II mit löslichem humanem IgE. Dieses wurde dabei im Bereich von 0,05-50 $\mu\text{g/ml}$ titriert. Der Nachweis

erfolgte mit einem FITC-markierten anti-IgE Antikörper. . Zur negativen Kontrolle dienten die HOM2-Zellen ohne Zugabe von löslichem IgE.

Wie die Auswertung der FACS-Analyse in Abbildung 31A zeigt, exprimieren die HOM2-Zellen CD23 auf ihrer Oberfläche. Abbildung 31B zeigt, dass es möglich ist diese Zellen mit humanem löslichem Immunglobulin E zu beladen. Die optimale Konzentration ist bei 12,5 µg/ml erreicht. Um sicherzustellen, dass es sich bei der Beladung der HOM2-Zellen nicht um ein Artefakt im Sinne einer unspezifischen Bindung des IgE an die Zellen handelt, sollte anschließend versucht werden, die Beladung durch Zugabe eines anti-CD23 Antikörpers kompetitiv zu hemmen. Dazu wurden die HOM2-Zellen zuerst mit einem PE-markierten anti-CD23 Antikörper in einem Konzentrationsbereich von 0,1-100 µg/ml inkubiert. Danach wurde das lösliche IgE in einer konstanten Konzentration von 12,5 µg/ml dazugegeben. Anschließend wurde ein FITC-markierter anti-IgE Antikörper dazu pipettiert.

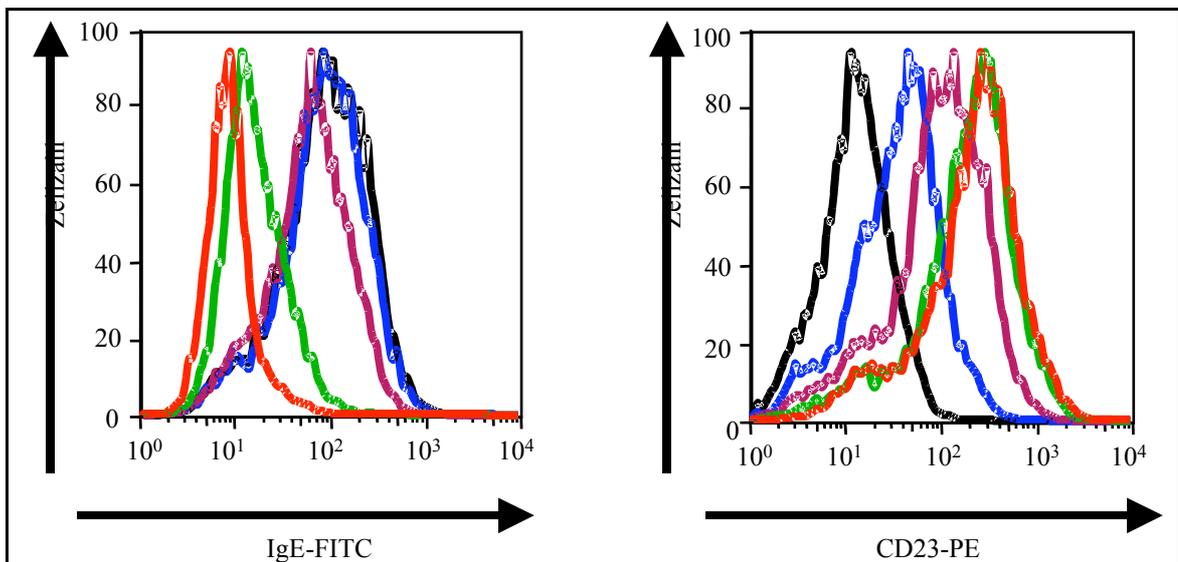


Abbildung 32 Die Beladung des niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptors II auf HOM2-Zellen wurde mit löslichem humanem IgE durchgeführt. Die Menge an gebundenem IgE wurde mit einem FITC-markiertem anti-IgE Antikörper nachgewiesen. Durch Titration eines PE-markierten anti-CD23 Antikörpers sollte versucht werden, diese Beladung zu inhibieren. Die Aufnahmen erfolgten simultan. Rechts: Darstellung der Titration und der Bindung des anti-CD23 Antikörpers an den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptors II. Links: Durch Zugabe des anti-CD23 Antikörpers kommt es zu einer entsprechend entgegengesetzten Reduktion der Beladung mit IgE.

Die Auswertung der FACS-Analyse ergab, dass es in Anwesenheit des PE-markierten anti-CD23 Antikörpers zu einer Blockierung der IgE-Beladung an den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor II

kommt. Wie aus der Abbildung 32 ersichtlich, ist dies konzentrationsabhängig. Je mehr von dem blockierenden anti-CD23 Antikörper eingesetzt wird, desto geringer ist die Beladung der HOM2-Zellen mit humanem löslichen Immunglobulin E. Daraus lässt sich schließen, dass die Beladung der HOM2-Zellen spezifisch über den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor II stattfindet und es sich nicht um ein Bindungsartefakt handelt.

4.16 Analyse der zytotoxischen Aktivität gegenüber CD23-positiven Zellen

Wie in Abschnitt 4.16 gezeigt wurde, ist es möglich die HOM2-Zellen mittels des niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptors II spezifisch mit humanem löslichem IgE zu beladen. Um zu ermitteln, ob diese Zellen durch den Einsatz des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers eliminiert werden, wurde mit diesen Zellen ebenfalls ein ⁵¹Chrom-Freisetzungstest durchgeführt.

Dazu wurden 10.000 HOM2-Zellen eine Stunde lang mit radioaktivem Natrium-Chromat beladen. Danach wurden die Zellen mit humanem löslichem Immunglobulin E in einer Konzentration von 12,5 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden 100.000 aufgereinigte und vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten dazugegeben. Der bispezifische Antikörper IgExCD3 wurde in Konzentrationen von 0,064-1000 ng/ml hinzugefügt. Die maximale Lyse wurde durch Zugabe einer 1%-igen Triton-X-100-Lösung bestimmt. Nach 20 Stunden wurde mit Hilfe eines Gamma-Zählers die freigesetzte Menge an radioaktivem Natrium-Chromat ermittelt. Die spezifische prozentuale Lyse der HOM2-Zellen wurde analog zur Formel in Abschnitt 4.9 berechnet.

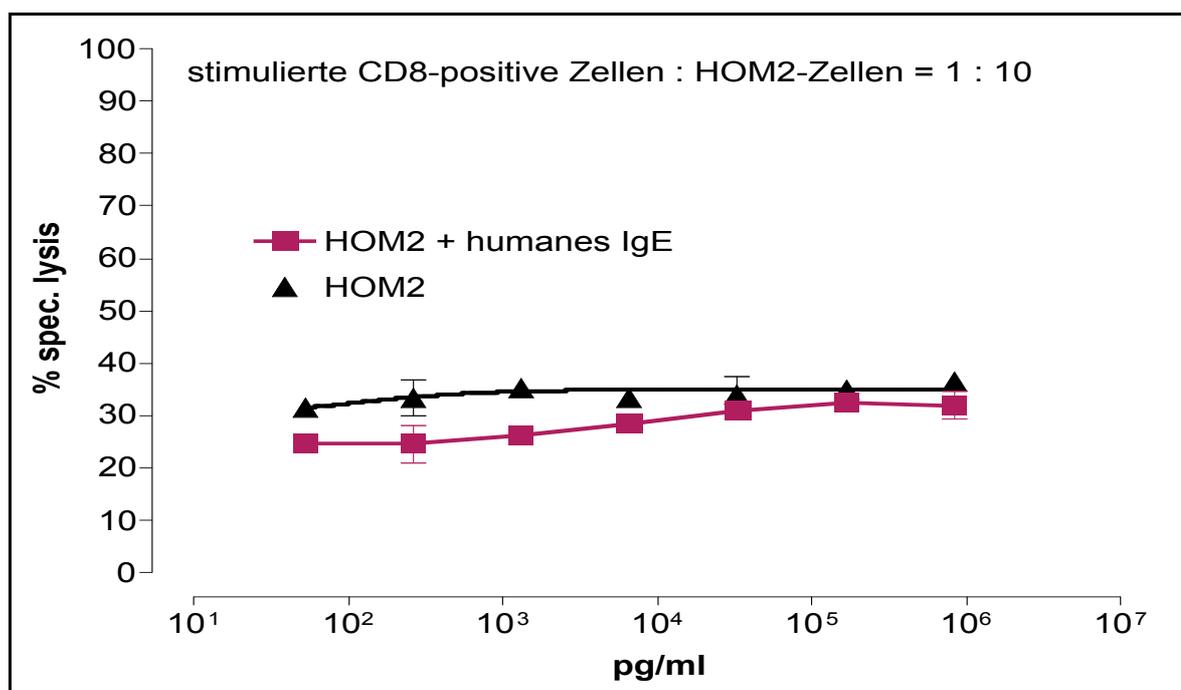


Abbildung 33 Grafische Darstellung der Freisetzung von $^{51}\text{Chrom}$. Als Zielzellen wurden HOM2-Zellen verwendet, die mit löslichem humanem IgE beladen wurden. Zur negativen Kontrollen dienten die unbeladenen HOM2-Zellen. Vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten wurden als Effektorzellen in einer zehnfach höheren Anzahl eingesetzt. Der IgExCD3 Antikörper wurde in Konzentrationen von 0,064-1000 ng/ml eingesetzt. Um die Funktionalität des Experiments zu kontrollieren, wurden die J558L-Zellen und die entsprechenden IgE-positiven J558L-IgE_{MS4}-Zellen im gleichen Ansatz mitgetestet (gestrichelte Linien).

Abbildung 33 gibt die prozentuale spezifische Lyse der HOM2-Zellen, welche mit humanem löslichem IgE beladen wurden, wieder. Als Effektorzellen wurden zehnmal so viele vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten verwendet. Aus der Grafik ist zu entnehmen, dass es selbst bei einem Einsatz dieser äußerst potenten Effektorzellen und höchster Konzentrationen des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 zu keiner signifikanten Lyse der CD23-positiven Zielzellen kommt.

5 DISKUSSION

In die Gruppe der IgE-vermittelten Erkrankungen gehören neben dem seltenen Hyper-IgE Syndrom und dem IgE-Myelom hauptsächlich allergische Krankheiten. Zu diesen zählen die allergische Rhino-/Konjunktivitis, das Asthma bronchiale, die Nahrungsmittelallergie, die Anaphylaxie, und in gewissem Maße auch die atopische Dermatitis [104, 105]. Die allergischen IgE-vermittelten Krankheiten stellen, gemessen an der Anzahl der betroffenen Menschen, eine der größten Volkskrankheiten weltweit dar. Die stetig steigende Zahl an Patienten, der chronische Verlauf und die erheblichen Einschränkungen in der Lebensqualität führten zu einem internationalen Engagement.

Die „Internationale Studie zu Asthma und Allergien in der Kindheit“ (ISAAC) hat die Prävalenz von Asthma bronchiale, allergischer Rhino-/Konjunktivitis und atopischer Dermatitis weltweit ermittelt [15]. Dabei wurden Kinder im Alter von 6-7 Jahren und 13-14 Jahren in die Studie einbezogen. Für das Asthma bronchiale ergab sich eine Prävalenz von 2,1-32,2 % in der Gruppe der 13-14-jährigen und 4,1-32,1 % in der Gruppe der 6-7-jährigen. Die Prävalenz der allergischen Rhino-/Konjunktivitis unter den Kindern zwischen 6 und 7 Jahren betrug 0,8-14,9 % und unter denen zwischen 13 und 14 Jahren 1,4-39,7 %. Für die atopische Dermatitis wurde eine Prävalenz von 2-16 % bei den 6-7-jährigen und von 1-17 % bei den 13-14-jährigen Kindern ermittelt. Allein unter Asthma bronchiale leiden weltweit 300 Millionen Menschen (GINA) [44]. In Abbildung 4 ist die weltweite Prävalenz des Asthma bronchiale dargestellt. Wie aus dieser Karte und den in der ISAAC ermittelten Prävalenzen zu entnehmen ist, ist die Verteilung sehr variabel. Man muss bei der Auswertung dieser Daten beachten, dass nicht in jedem Land gleichermaßen Tests auf allergische Erkrankungen durchgeführt werden. Dadurch ergeben sich große Schwankungen in den Prävalenzen, was sich im Laufe der nächsten Jahre aber durch standardisierte Verfahren und größere internationale Beteiligung verbessern dürfte. Außerdem gibt es auch Eigenheiten einzelner Länder, welche das Auftreten von atopischen Krankheiten fördern. Als Beispiel sei hier Neuseeland genannt, das eine hohe Prävalenz an Asthma bronchiale zu verzeichnen hat, obwohl oder gerade weil es sehr sauber und grün ist (siehe Hygiene-Hypothese, Kapitel 1.3). Bedingt durch die wirtschaftlichen und politischen Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern ist die medikamentöse Standardtherapie nicht überall gleichermaßen erhältlich. Deshalb sterben weltweit, vor allem in Entwicklungsländern, immer noch viele Menschen an den Folgen des Asthma bronchiale. Abbildung 31 veranschaulicht die weltweite Verteilung der Todesfälle unter Asthmapatienten. Auf dieser Karte ist zu beachten, dass für viele Staaten keine Daten verfügbar sind.

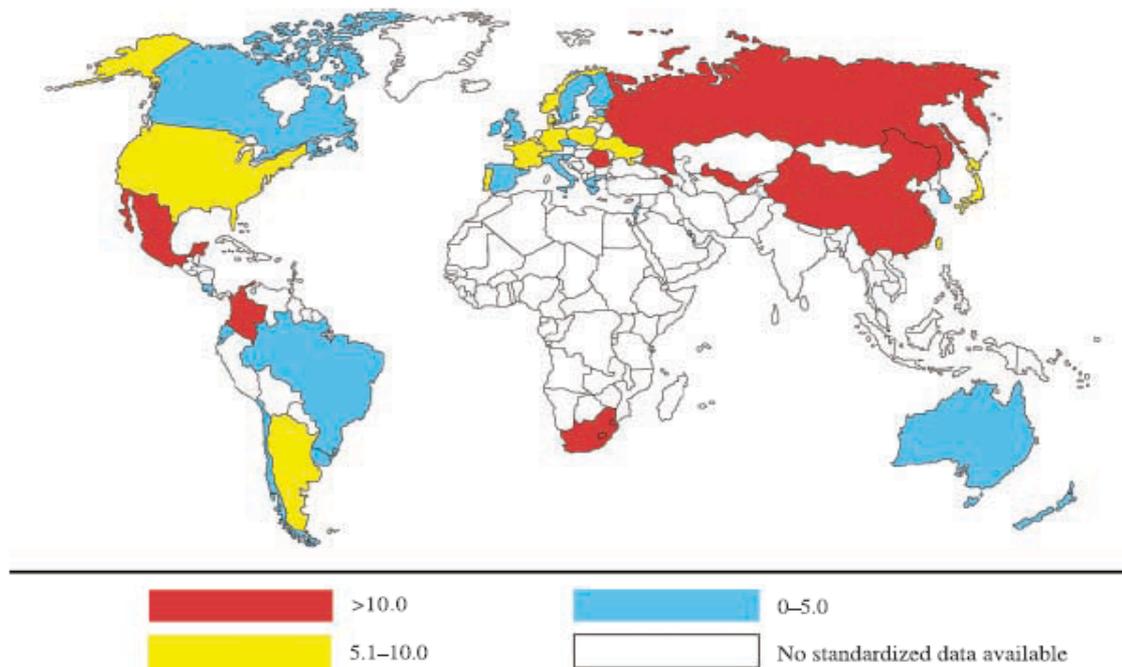


Abbildung 34 Weltweite Verteilung der Letalität des Asthma bronchiale (GINA, 2003). Staaten ohne Daten sind weiß dargestellt und nicht als ereignislos zu verstehen.

Wie schon seit einiger Zeit bekannt, teilen sich die allergischen IgE-vermittelten Krankheiten einen gemeinsamen Pathomechanismus [23, 31]. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf das Asthma bronchiale als einen Vertreter der allergischen Krankheiten. Im Zentrum dieser Krankheiten steht das Immunglobulin E, welches von B-Zellen sezerniert wird und sich dabei meist gegen ein Antigen richtet, welches an sich harmlos ist. Nachdem dieses IgE auf Mastzellen gebunden hat, kann es eine Überempfindlichkeitsreaktion auslösen, sobald es mit seinem spezifischen Antigen in Kontakt kommt. Dabei kommt es zur Degranulation von Mastzellen und der anschließenden Rekrutierung von CD4-positiven T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. Dies führt zu einer übermäßigen Schleimproduktion, zu einem interstitiellen Ödem und zur Kontraktion der glatten peribronchialen Muskulatur, was der Patient als akute Luftnot verspürt.

In dieser Arbeit soll ein neuer Ansatz zur Therapie der allergischen IgE-vermittelten Krankheiten vorgestellt werden. Dieser beruht auf der Rekrutierung von körpereigenen zytotoxischen Effektorzellen durch den IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörper mit dem Ziel einer Eliminierung von IgE-positiven Zellen. Es wurde bereits gezeigt, dass es in der nasalen und bronchialen Schleimhaut von allergischen Patienten sowohl Plasmazellen als auch B-Lymphozyten gibt, die dort einen Isotyp-Wechsel hin zum Immunglobulin E vollziehen. Diese IgE-positiven Zellen geben das IgE in die Umgebung ab, wo es von den Mastzellen über ihren hochaffinen FcEpsilon-Rezeptor I an der Oberfläche gebunden wird. Dies stellt die Grundvoraussetzung für die Aktivierung und Degranulation von Mastzellen und damit auch für das in Gang setzen der

Entzündungskaskade dar. Deswegen spielen die IgE-positiven Zellen die zentrale Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der allergischen Erkrankungen.

Der bispezifische IgExCD3 single-chain Antikörper wurde durch Fusion von zwei Domänenpaaren, bestehend jeweils aus einer variablen Schwere-Kette (VH) und einer variablen Leichte-Kette (VL) hergestellt. Dabei ist ein Domänenpaar gegen CD3 und das andere gegen IgE gerichtet. Die einzelnen Domänen wurden mit Glycin-Serin-Linkern so verbunden, dass sich die variablen Domänen einer Spezifität funktionell zusammenlagern können. Abbildung 8 stellt schematisch die Faltung des Antikörpers dar. Nach stabiler Transfektion von CHO-Zellen geben diese den bispezifischen Antikörper IgExCD3 als ein voll-funktionsfähiges Protein in den Zellkultur-Überstand ab, worin der entsprechende Vorteil gegenüber bakteriellen Expressionssystemen besteht, die nicht zur funktionellen Expression von bispezifischen single-chain Antikörpern befähigt sind.

Der Zellkulturüberstand wurde zuerst mit Hilfe einer „immobilisierten Metall-Ionen Affinitäts-Chromatographie“ (IMAC) vorgereinigt. Anschließend wurden die Fraktionen, welche in einem entsprechenden ELISA positiv getestet wurden, durch Gelfiltration ihrer Größe nach getrennt. Aus dem Chromatogramm war bereits ersichtlich, dass sich der bispezifische Antikörper IgExCD3 als eine singuläre Fraktion abzeichnete. Allerdings fiel bei der Gelfiltration eine zusätzliche Fraktion mit geringerem Molekulargewicht auf. Eine Analyse dieser Fraktion ergab, dass es sich dabei um ein Spaltprodukt des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers handelte. Die Sequenzierung der Peptidfragmente und die Analyse der Sequenz ergab schließlich, dass der bispezifische Antikörper IgExCD3 durch die Protease Stromelysin 1, auch bekannt als Matrix Metallo-Proteinase III, gespalten wurde. Die charakteristische Schnittstelle für diese Endoproteinase ist Glutamin-Schnittstelle-Leucin-Lysin. Eine Optimierung des IgExCD3 Konstruktes wäre daher in dem Austausch der Aminosäure Leucin an Position 238 durch Isoleucin zu sehen, wodurch die Schnittstelle für Stromelysin 1 so verändert würde, dass es von diesem Enzym nicht mehr erkannt und damit auch nicht mehr geschnitten würde. Die Struktur und Funktion des Antikörpers dürfte sich aufgrund der Ähnlichkeit von Leucin und Isoleucin und der Tatsache, dass sich die Position außerhalb der Antigenbindungsregionen (den „complementary determining regions“) befindet, nicht nachteilig verändern. Dadurch sollte der Abbau des Antikörpers verhindert und so eine höhere Ausbeute erreicht werden.

Die Analyse der Größe des IgExCD3 Antikörpers in einer SDS-Gel-Elektrophorese konnte die Ergebnisse aus der Gelfiltration bestätigen. Das Molekulargewicht wurde beide Male mit circa 55 kDa bestimmt, was auch der errechneten Größe entspricht. Eine Verunreinigung nach den beiden Aufreinigungsschritten konnte weitestgehend ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 12).

Um die Eigenschaften des IgExCD3 Antikörpers zu testen bedurfte es IgE-positiver Zellen. Die Schwere-Kette des humanen Immunglobulin E wurde zu diesem Zweck in die murine Myelomzelllinie J558L stabil transfiziert. Nach erfolgreicher Transfektion konnten mehrer Klone isoliert werden, die humanes IgE mit entweder der langen (ML) oder der kurzen (MS) Isoform der Transmembrandomäne exprimieren. Durch eine FACS-Analyse wurde jeweils ein Klon bestimmt,

welcher das humane IgE exprimiert. Abbildung 12 zeigt eine Auswahl der Ergebnisse der Durchfluß-Zytometrie. Da die Effektivität einer stabilen Transfektion sehr unterschiedlich ist, ist auch das Expressionsniveau von humanem IgE auf diesen beiden gezeigten Klone J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} unterschiedlich. Für die anschließenden Experimente wurden jeweils die Klone J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} eingesetzt.

Nachdem Zellen zur Verfügung standen, die das humane Immunglobulin E in seiner membranständigen Form exprimieren, sollte an diesen die Bindung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 getestet werden. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass der bispezifische IgExCD3 Antikörper sowohl an den Klon J558L-IgE_{MS4} als auch an den Klon J558L-IgE_{ML7} bindet (siehe Abbildung 23). Die unterschiedlich starken Färbungen sind darauf zurückzuführen, dass der Klon J558L-IgE_{MS4} das humane IgE stärker auf seiner Oberfläche exprimiert als der Klon J558L-IgE_{ML7} (siehe Abbildung 22). Die Bindung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 an den humanen CD3-Komplex auf HPB-ALL Zellen wurde ebenfalls in der FACS-Analyse gezeigt (siehe Abbildung 23). Der Nachweis des gebundenen IgExCD3 Antikörpers auf den beiden J558L-Klonen und den HPB-ALL Zellen erfolgte jeweils mit einem anti-Histidin Antikörper und anschließender Inkubation mit einem PE-markierten anti-Maus-FcGamma Antikörper. Somit wurde gezeigt, dass der bispezifische Antikörper IgExCD3 seine zwei Antigene auf der Oberfläche entsprechender Zellen erkennt.

Das Ziel des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers ist es, IgE-positive B-Zellen durch Rekrutierung zytotoxischer T-Lymphozyten zu eliminieren. Dies sollte in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest gezeigt werden. Die IgE-positiven Klone J558L-IgE_{MS4} und J558L-IgE_{ML7} sollten hierbei als Zielzellen dienen. Nachdem die beiden Klone mit radioaktivem Natrium-Chromat beladen worden waren, konnte gezeigt werden, dass stimulierte CD8-positive T-Lymphozyten in der Lage sind diese Zielzellen in Anwesenheit des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 zu eliminieren. Dies geschah in einer dosisabhängigen spezifischen Lyse. Die EC50-Konzentration gibt die Dosis an, bei der 50% der Maximallyse erreicht ist. Diese beträgt für die J558L-IgE_{MS4} 178 ng/ml und für die J558L-IgE_{ML7} 1540 ng/ml. Die unterschiedlichen ED50-Konzentrationen sind durch das unterschiedliche Expressionsniveau von IgE auf den J558L-Klonen bedingt, welches in FACS-Analyse bereits gezeigt wurde (siehe Abbildung 22). Dadurch, dass der Klon J558L-IgE_{MS4} mehr IgE auf seiner Oberfläche präsentiert, kann er auch mehr IgExCD3 Antikörper binden und damit auch mehr Effektorzellen rekrutieren. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass es nur dann zu einer dosisabhängigen Zytotoxizität kommt, wenn die Zielzellen humanes membran-gebundenes IgE exprimieren und zusätzlich sowohl T-Effektorzellen als auch der bispezifische Antikörper IgExCD3 anwesend sind (siehe Abbildung 22).

Anschließend sollte gezeigt werden, dass auch unstimulierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) in der Lage sind IgE-positive Zellen zu eliminieren. Daher wurde der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest mit unstimulierten Zellen durchgeführt. Um die Unterschiede von Effektorzellen zu zeigen wurden dabei PBMC verschiedener Spender eingesetzt. Als IgE-positive Zelllinie wurde dabei der Klon J558L-IgE_{MS4} verwendet. Wie aus der Abbildung 22 zu erkennen ist, sind auch unstimulierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut in der Lage IgE-positive B-

Zellen zu eliminieren. Die EC₅₀ Konzentration liegt dabei im Bereich von 365-936 ng/ml. Interessanterweise ist der Bereich, wo die ersten lytischen Effekte einerseits und eine gewisse Sättigung der Lyse andererseits auftreten, relativ homogen. Die Unterschiede zwischen den PBMC der verschiedenen Spender liegen damit in den Unterschieden der Lyse-Effektivität begründet. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nur ein kleiner Teil der eingesetzten Zellen tatsächlich für die Eliminierung aktiviert wird. Ist dieser Anteil einmal aktiviert führt auch eine höhere Konzentration an IgExCD3 bispezifischen Antikörper nicht zu einer erhöhten Eliminierung. In diesem Bereich hängt die Lyse dann von der Anzahl der zytotoxischen Zellen ab, die rekrutierbar sind. Je mehr davon vorhanden sind, desto effektiver ist die Lyse. Damit wird auch klar, dass eine Steigerung der Effektivität, zum Beispiel bei Spender 1, in diesem Bereich vor allem durch eine längere Anwendung erreichbar ist. Dieses Phänomen könnte für die spätere Anwendung in der Klinik wichtig sein.

Da der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper gegen die CH₃-Domäne des Immunglobulin E gerichtet ist, ist es denkbar, dass lösliches humanes IgE zu einer Reduktion der spezifischen Lyse führen könnte. In einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest sollte daher auf diesen Aspekt eingegangen werden. Zu dem IgE-positiven Klon J558L-IgE_{MS4} wurde neben stimulierten CD8-positive T-Lymphozyten und dem IgExCD3 bispezifischen Antikörper lösliches humanes IgE dazu titriert. Dabei konnte gezeigt werden, dass es in Anwesenheit von löslichem humanem IgE in Konzentrationen von bis zu 0,2 µg/ml nur zu einer leichten Inhibierung der spezifischen Lyse kommt. Die EC₅₀ Konzentration sank dabei von 174 ng/ml auf 454 ng/ml. Erst eine Dosis von 1,0 µg/ml führt zu Einschränkungen in der Zytotoxizität. Die EC₅₀-Konzentration sank dabei auf 1670 ng/ml. Eine Konzentration von 5,0 µg/ml an löslichem humanem IgE führt schließlich zu einer noch deutlicheren Reduktion der zytotoxischen Aktivität und einer EC₅₀ Konzentration von 1936 µg/ml. Zu beachten ist dabei, dass bei gesunden Erwachsenen der obere Grenzwert für den IgE-Spiegel im Serum bei 0,24 µg/ml liegt. Eine Erhöhung über diesen Wert kommt nur bei circa einem Drittel aller atopischen Patienten vor. Der Maximalwert, der jemals bei einem allergischen Patienten gemessen wurde, liegt bei circa 2,4 µg/ml. Damit dürfte die Anwesenheit von löslichem IgE in Konzentrationen, wie sie unter physiologischen und allergischen Bedingungen anzutreffen sind, in den meisten Fällen zu keiner wesentlichen Einschränkung der zytotoxischen Aktivität des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 in vivo führen (siehe Abbildung 17).

In Kapitel 4.9 wurde bereits gezeigt, dass es sich bei der Eliminierung von IgE-positiven Zellen um einen T-Zell-vermittelten Vorgang handelt. Um weitere Hinweise auf die Vorgänge zu erhalten, die sich während der Zerstörung von Zielzellen abspielen, sollten die T-Lymphozyten selbst und die freigesetzten Zytokine analysiert werden. Aktivierte T-Lymphozyten sind dafür bekannt, dass sie Zytokine freisetzen und das Expressionsmuster von einigen Oberflächenmolekülen verändern. Zwei dieser Moleküle sind CD69 und CD25, deren Expression bei einer Aktivierung von T-Lymphozyten gesteigert wird. Diese Veränderungen auf der Oberfläche der T-Lymphozyten sollten mit einer FACS-Analyse untersucht werden. Dabei wurden 100.000 unstimulierte CD3-positive T-Zellen mit 10.000 IgE-positiven Zielzellen kultiviert. Aus Abbildung 22 geht hervor, dass bei dieser

Ko-Inkubation mit IgE-positiven B-Zellen und IgExCD3 bispezifischem Antikörper sowohl CD8-positive als auch in geringerem Maße CD4-positive T-Lymphozyten aktiviert werden. Dabei kommt es auf beiden Zelltypen zu einer verstärkten Expression von CD69 und CD25. CD8-positive T-Zellen erhöhen die Expression von CD69 bereits nach 24 Stunden und von CD25 nach 48 Stunden. Ihre Rolle bei der Eliminierung von Zielzellen spiegelt sich damit auch im unterschiedlichen Grad der Aktivierung wieder. Parallel dazu wurden die Überstände der Ansätze auf die Freisetzung von Zytokinen hin untersucht. Die Messung der Zytokine TNF-Alpha und INF-Gamma erfolgte jeweils im Überstand desselben Ansatzes. Nur in Gegenwart von CD3-positiven Effektorzellen, IgE-positiven Zielzellen und IgExCD3 bispezifischem single-chain Antikörper kam es zu einer signifikanten Ausschüttung der Zytokine. Fehlte eine dieser Komponenten kam es weder zur T-Zell-Aktivierung noch zur Ausschüttung von Zytokinen. Zu beobachten war ebenfalls, dass sich sowohl das Ausmaß der Aktivierung als auch die Menge an freigesetzten Zytokinen in Abhängigkeit der eingesetzten IgE-positiven Klone J558L-IgE_{MS4} beziehungsweise J558L-IgE_{ML7} voneinander unterscheidet. Dies liegt in der Stärke der Expression des Immunglobulin E auf diesen Zellen begründet.

Die zukünftige Anwendung beim Menschen setzt voraus, dass der IgExCD3 bispezifische Antikörper zu keinerlei Interaktionen mit dem Rezeptor-gebundenem Immunglobulin E auf Mastzellen führt. Um dies experimentell zu testen, sollte zuerst die Beladung einer Mastzelllinie aus der Ratte (RBL-2H3), welche mit der humanen Alpha-Kette des hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I stabil transfiziert wurde, getestet werden. In einer FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass es möglich ist diese RBL-2H3-Zellen mit löslichem humanem IgE zu beladen. Das Optimum für die Beladung ist dabei bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml erreicht (siehe Abbildung 20).

Die Arbeitsgruppe von Dr. BM. Stadler hatte bereits gezeigt, dass der monoklonale anti-IgE Antikörper, aus dem die variablen Regionen für den bispezifischen Antikörper IgExCD3 kloniert wurden, zu keiner anaphylaktischen Reaktion führt[97]. Dennoch musste dies für das Format des bispezifischen single-chain Antikörpers IgExCD3 ebenfalls sichergestellt werden. Zur Analyse einer möglichen zytotoxischen Aktivität gegenüber Mastzellen wurde ein ⁵¹Chrom-Freisetzungstest durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Ratten-Mastzelllinie RBL-2H3, welche mit der humanen Alpha-Kette des hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I stabil transfiziert ist, mit radioaktivem Natrium-Chromat beladen. Eine Lyse der Rattenzellen konnte damit durch Messung der freigesetzten Radioaktivität bestimmt werden. Wie in der Abbildung 20 zu ersehen ist, kam es dabei zu keiner zytotoxischen Aktivität gegenüber den IgE-beladenen RBL-2H3. Um eine mögliche Lyse von Mastzellen sicher aufzuspüren wurden in diesem Fall bewusst zehnmal so viele vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten wie Zielzellen eingesetzt. Damit konnte gezeigt werden, dass Mastzellen selbst in Gegenwart von stimulierten zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen und höchsten Konzentrationen von IgExCD3 bispezifischem Antikörper nicht angegriffen werden.

Ergänzend musste auch gewährleistet werden, dass es durch die Anwesenheit des IgExCD3 bispezifischen Antikörper zu keiner Degranulation der Mastzellen kommt. Um dies zu testen, wurde

die Freisetzung des Enzyms Beta-Hexosaminidase aus den Granula der Ratten-Mastzellen gemessen [106]. Die Anwesenheit dieses Enzyms setzt das farblose Substrat PNAG in das nachweisbare 4-Nitrophenyl um, welches photometrisch gemessen werden kann. Zu diesem Zwecke wurden 100.000 CD3-positive T-Lymphozyten mit 10.000 beladenen Mastzellen kultiviert und der IgExCD3 bispezifische Antikörper dazu titriert. Aus der Abbildung 21 geht hervor, dass die Anwesenheit von CD3-positiven T-Lymphozyten und bispezifischem IgExCD3 Antikörper auch nicht zu einer Degranulation von Mastzellen führt, welche mit löslichem humanem IgE beladen sind. Um die Funktionalität des Testsystems zu bestätigen, wurde ein kommerzieller monoklonaler anti-IgE Antikörper als positive Kontrolle zu den beladenen Mastzellen gegeben. Dieser löste eine konzentrationsabhängige Freisetzung des Enzyms Beta-Hexosaminidase aus, was zu einem Farbumschlag führte. Mit den Ergebnissen aus dem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest und der Beta-Hexosaminidase-Bestimmung wurde eindrucksvoll demonstriert, dass der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper Mastzellen völlig unangetastet lässt, die lösliches IgE passiv an ihren hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I gebunden haben.

Zweifelsohne repräsentieren die Mastzellen die größte Zellpopulation, welche das Immunglobulin E Rezeptor-gebunden auf ihrer Oberfläche aufweisen und die eine große Rolle bei den allergischen IgE-vermittelten Krankheiten spielen. Daneben existiert noch eine heterogene Gruppe von Zellen, welche das IgE über den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor II (CD23) auf ihrer Oberfläche gebunden haben können. Über die Rolle, die diese Zellpopulationen und das CD23 bei den allergischen IgE-vermittelten Krankheiten spielen, gibt es teilweise widersprüchliche Meinungen. Um jedoch das Risiko möglicher Nebenwirkungen in vivo hier möglichst auszuschließen, sollten in dieser Arbeit auch die Interaktionen zwischen dem IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörper und dem IgE auf CD23-positiven Zellen untersucht werden. Dazu musste zuerst sichergestellt werden, dass die Zelllinie HOM2, welche das humane CD23 präsentiert (Abbildung 21), auch spezifisch mit löslichem humanem IgE zu beladen ist. Wie aus der Abbildung 22 hervorgeht konnte die Bindung des löslichen IgE an den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor II mit einem anti-CD23 Antikörper blockiert werden. Je mehr anti-CD23 dazu titriert wurde, desto weniger lösliches IgE konnte an die HOM2-Zellen binden, was für eine spezifische Interaktion zwischen CD23 und löslichem IgE spricht.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die HOM2-Zellen in der Lage sind spezifisch lösliches humanes Immunglobulin E über den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor II zu binden, sollte analysiert werden, ob der IgExCD3 bispezifische Antikörper zu einer Eliminierung dieser Zellen führen kann. Die Abbildung 21 gibt die Ergebnisse eines ⁵¹Chrom-Freisetzungstest wieder, bei dem CD23-positive Zielzellen mit humanem löslichen IgE beladen wurden. Wie aus der Kurve zu ersehen ist, kommt es zu keiner Eliminierung der IgE-beladenen CD23-positiven HOM2-Zellen. Um für diesen Nachweis eine hohe Sensitivität zu erreichen, wurden hier wieder bewusst 100.000 vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten mit 10.000 potentiellen Zielzellen inkubiert. Auch die Kombination von stark zytotoxischen Zellen mit höchsten Konzentrationen des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers führte zu keiner Zerstörung der HOM2-Zellen, die IgE an

ihren niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor II gebunden haben.

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen kann man schließen, dass der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper in der Lage ist Zellen, die humanes IgE in seiner transembranen Form präsentieren mit Hilfe körpereigener T-Lymphozyten zu eliminieren. Dies konnte in mehreren ⁵¹Chrom-Freisetzung-Tests gezeigt werden. Die Konzentrationen, bei denen die zytotoxischen Aktivitäten zu verzeichnen waren, spielten sich dabei hauptsächlich im Bereich von 0,1-1 µg/ml ab. Monoklonale Antikörper benötigen meistens das hundert- bis tausendfache an Protein benötigen, um solch eine zytotoxische Aktivität zu erzielen. Anders als monoklonale Antikörper sind CD3-reaktive bispezifische Antikörper in der Lage zytotoxische T-Zellen zu rekrutieren. Da CD3-positive T-Zellen keine FcGamma-Rezeptoren besitzen, werden diese durch normale monoklonale Antikörper auch nicht aktiviert. Damit ist die potentielle Zytotoxizität, die ein bispezifischer single-chain Antikörper auszulösen vermag, ein vielfaches höher als bei monoklonalen Antikörpern. Dadurch kann aber auch das Risiko von Nebenwirkungen erhöht sein. Deshalb wurde in dieser Arbeit sehr großer Wert auf Interaktionen gelegt, die das Konstrukt mit Zellen hervorrufen könnte, welche das Immunglobulin E an ihre hoch- oder niedrig-affinen IgE-Rezeptoren gebunden haben. Sowohl Mastzellen als auch CD23-positive Zellen, welche beide mit löslichem humanem IgE beladen waren, wurden nicht eliminiert. Bei diesen Experimenten wurden bewusst zehnmal so viele vorstimulierte CD8-positive T-Lymphozyten eingesetzt wie Zielzellen. Damit sollten mögliche zytotoxische Aktivitäten gegen beladene Mastzellen und CD23-positive Zellen aufgedeckt werden. Wie in Abbildung 22 gezeigt, kommt es selbst bei den höchsten IgExCD3 Konzentrationen zu keinerlei Zerstörung der Zellen. Auch eine potentielle Aktivierung und Degranulation von Mastzellen, die mit humanem IgE beladen sind, konnte ausgeschlossen werden. Damit verspricht der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper einen einzigartigen und innovativen Ansatz in der Therapie IgE-vermittelter Krankheiten.

Wie bereits erwähnt, wird ein monoklonaler anti-IgE Antikörper (Omalizumab) bereits klinisch zur Therapie allergischer Krankheiten erprobt. Die Wirkung dieses Antikörpers beruht darauf, die Bindung von löslichem IgE an den hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor-I auf Mastzellen zu blockieren. Durch Omalizumab konnte das Ausmaß der Symptome bei einem Teil der Patienten eingeschränkt und der Gebrauch von anderen anti-allergischen Medikamenten, wie zum Beispiel Kortison, reduziert werden [73]. Allerdings hält sich der erwünschte Effekt in Grenzen. Man vermutet, dass die eingeschränkte Wirkung unter anderem darauf beruht, dass der monoklonale Antikörper mit seinem Molekulargewicht von circa 180 kDa zu groß ist, um effektiv in das Gewebe zu penetrieren und dort die Beladung der Mastzellen mit IgE zu blockieren. Im Gegensatz dazu hat der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper nur ein Molekulargewicht von 60 kDa und damit ein Drittel der Größe des monoklonalen Antikörpers. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser in das Gewebe eindringt und dort seine Wirkung zeigt, ist dadurch viel größer.

Von entscheidender Bedeutung ist aber, dass Omalizumab nicht die Produktion beziehungsweise den Nachschub an Immunglobulin E durch die B-Zellen an sich verhindert. Im Gegensatz dazu würde eine Anwendung des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 zu einer Eliminierung der IgE-

positiven B-Zellen führen. Damit würde sich auch die allergische Situation im Patienten verändern. Die Wirkung könnte man sich wie in Abbildung 32 dargestellt vorstellen.

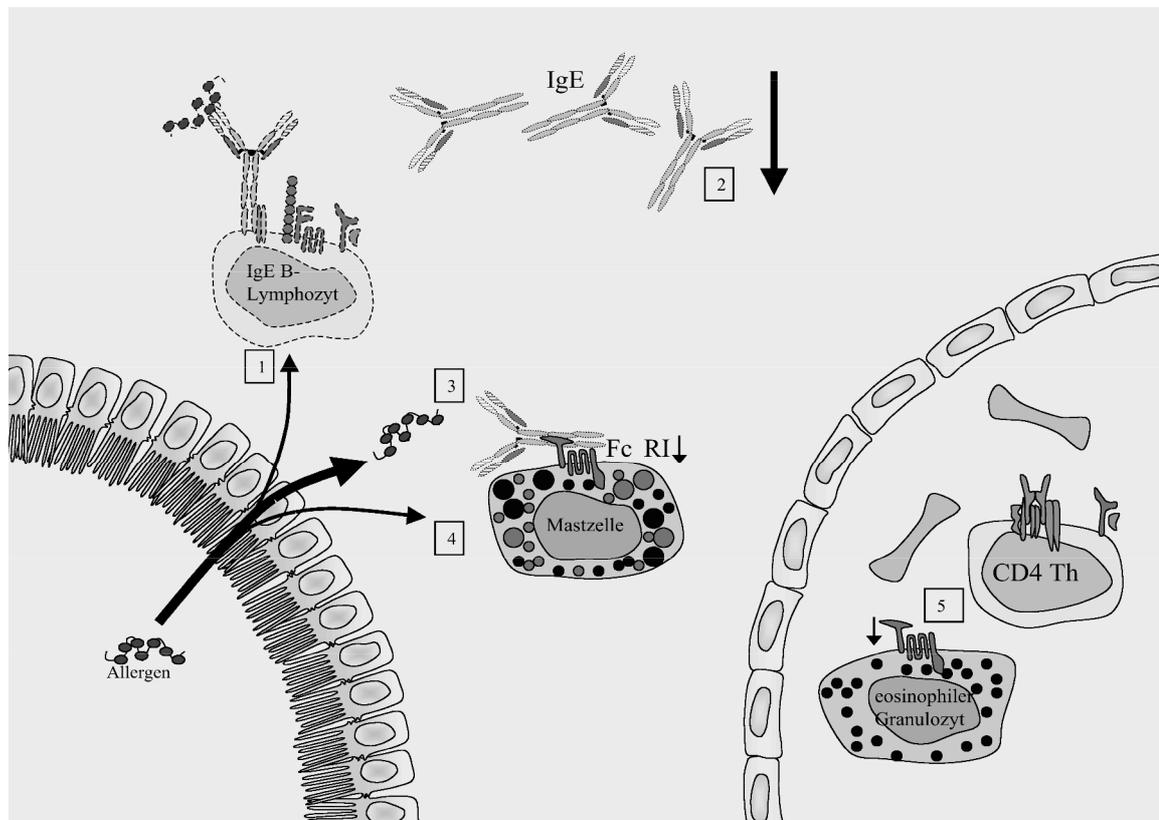


Abbildung 35 Schematische Darstellung der möglichen Verhältnisse im Lungengewebe nach Therapie mit dem IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörper. 1) Nach der Eliminierung der IgE-positiven B-Zellen kommt es 2) zu einer Reduktion von IgE im Interstitium und folglich auch auf Mastzellen. 3) Inhaftiertes Allergen passiert die Epithelbarriere. 4) Da auf den Mastzellen kein IgE gebunden ist, kann es auch nicht zu einer Aktivierung und Degranulation kommen. 5) Folglich werden auch keine eosinophilen Granulozyten oder T-Lymphozyten angelockt, welche sonst für eine zweite Phase der entzündlich-allergisch Reaktion verantwortlich wären.

Abbildung 32 zeigt, wie der Zustand im Lungengewebe nach einer Therapie mit dem bispezifischen Antikörper IgExCD3 aussehen könnte. Durch die Eliminierung IgE-positiver B-Zellen wird auch der Nachschub an löslichem IgE reduziert, welches für die Beladung des hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I benötigt wird. Da die Halbwertszeit des Rezeptor-gebundenen IgE auf Mastzellen circa zwei Wochen beträgt, würde somit auch das bereits gebundene IgE auf den Mastzellen nach einer gewissen Zeit unter eine kritische Schwelle sinken. Man kann mit dem heutigen Wissenstand nur darüber spekulieren wie lange diese Zeit beträgt und wie hoch diese kritische Menge ist. Bei einer Inhalation des Allergens in dieser Situation, gäbe es wahrscheinlich nicht ausreichend IgE auf den Mastzellen um diese zu aktivieren beziehungsweise eine Degranulation zu induzieren. Ohne

diesen entscheidenden Schritt in der Entzündungskaskade würde auch die Aktivierung und die Anlockung von weiteren CD4-positiven T-Helfer-Zellen und eosinophilen Granulozyten ausbleiben.

Da über die physiologische Wirkung von Immunglobulin E nicht viel bekannt ist, muss auch bedacht werden, welche Nebenwirkungen eine Reduktion von IgE auf die physiologische Funktion des Immunsystems haben könnte. Es ist bekannt, dass IgE bei der Abwehr von Infektionen mit Helminthen, wie zum Beispiel den Schistosomen und Askaridien, eine gewisse Rolle spielt. Auf die Frage inwieweit es durch die Eliminierung von IgE-positiven B-Zellen zu einer Zunahme von Infektionen mit Helminthen kommt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht hinreichend beantwortet werden.

Was die Applikationsweise des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 betrifft, dürfte eine intravenöse Gabe wegen der so zu erzielenden umfassenden systemischen Wirkung vorzuziehen sein; aber auch die Inhalation stellt eine attraktive Möglichkeit dar. Der ideale Zeitpunkt einer Therapie wäre zum Beispiel beim Asthma bronchiale nach der entsprechenden Allergen-Saison, wenn es sich bei dem Allergen um Gräser oder Pollen handelt. Zu betonen ist an dieser Stelle nochmals, dass das auslösende Allergen durch die variablen Regionen des Immunglobulin E determiniert ist, der IgExCD3 bispezifische single-chain Antikörper aber gegen die CH3-Domäne reagiert. Daraus folgt, dass es bei der Therapie mit dem bispezifischen Antikörper IgExCD3 nicht die geringste Rolle spielt, wogegen der einzelne Patient allergisch ist. Somit könnte einer sehr großen Population an Patienten geholfen werden.

Unklarheit herrscht unter anderem darüber, wie lange es dauert bis eine IgE-Reduktion eintritt und wie lange diese dann anhalten würde. Durch den Einsatz des bispezifischen Antikörpers IgExCD3 werden alle IgE-positiven B-Zellen außer den Plasmazellen, die kein transmembranes Immunglobulin mehr exprimieren, eliminiert. Daher lässt sich vermuten, dass die Lebensdauer der Plasmazellen der zeitbestimmende Faktor sein wird. Da man über IgE-sezernierende Plasmazellen nicht viel weiß, kann man nur Schlüsse aus dem Verhalten von IgG-sezernierenden Plasmazellen ziehen. Diese gibt es in zwei Formen, sogenannte kurz-lebige und lang-lebige Plasmazellen. Kurz-lebige Plasmazellen haben eine Lebensdauer von Tagen bis Wochen und kommen hauptsächlich außerhalb des Knochenmarks vor. Im Gegensatz dazu können lang-lebige Plasmazellen mehrere Monate überleben. Es gibt Hinweise darauf, dass diese sogar mehrere Jahre im Knochenmark überleben können. Da IgE-sezernierenden Plasmazellen vor allem in den nasalen und bronchialen Schleimhäuten nachgewiesen wurden, lässt sich vermuten, dass es sich bei diesen um kurz-lebige Plasmazellen handelt. Sicherlich gibt es auch einige wenige IgE-sezernierende Plasmazellen im Knochenmark, wobei deren Rolle für die Allergie und deren Lebensdauer schwer einzuschätzen sind. Da aber die IgE-positiven Gedächtniszellen, die den Nachschub für die Plasmazellen darstellen, durch den bispezifischen Antikörper IgExCD3 eliminiert werden können, kann man davon ausgehen, dass der Effekt einer IgE-Reduktion lange anhalten wird.

Letztendlich wird erst die Verabreichung des Antikörpers an Menschen Gewissheit über sein Für und Wider geben. Ein bispezifischer Antikörper CD19xCD3 im gleichen Format befindet sich zur

Zeit in klinischer Erprobung. Ziel dieses Konstruktes ist die Eliminierung sämtlicher B-Zellen bei Patienten mit B-Zell-Lymphom. Erste Daten weisen darauf hin, dass der CD19xCD3 Antikörper von den Patienten gut vertragen wird. Dieser bispezifische single-chain Antikörper spielt daher eine Art Vorreiter-Rolle. Weitere Ergebnisse, die im Laufe der Zeit mit diesem Antikörper erhalten werden, können Hinweise geben über eventuelle Nebenwirkungen und Risiken des IgExCD3 Antikörpers und könnten Rückschlüsse auf die optimale Darreichungsform geben.

Bei einer möglichen Therapie mit dem bispezifischen Antikörper IgExCD3 könnte auch eine Hyposensibilisierung, die im Anschluss an die Verabreichung des Antikörpers durchgeführt werden könnte, von Nutzen sein. Man könnte dadurch erreichen, dass Antikörper einer anderen Klasse, wie zum Beispiel IgG, gegen das Allergen gebildet werden, die den Effekt beziehungsweise die Dauer der IgE-Reduktion positiv unterstützen.

Der denkbare Nutzen, den der IgExCD3 Antikörper in der Therapie der IgE-vermittelten Krankheiten haben könnte, ist groß. Für das Hyper-IgE-Syndrom und das IgE-Myelom muss gesondert geklärt werden, ob diese Patienten von einer Therapie mit diesem Antikörper profitieren können. Dies wird unter anderem dadurch erschwert, dass die zugrundeliegenden Pathomechanismen sich sehr von den allergischen unterscheiden. Außerdem kommt hinzu, dass die IgE-Spiegel im Serum beider Patientenkollektive teilweise viel höher sind als bei allergischen Patienten und damit die Effektivität des IgExCD3 eingeschränkt werden würde.

Ohne Zweifel stellt aber der bispezifische IgExCD3 single-chain Antikörper einen innovativen und vielversprechenden Ansatz in der Therapie der allergischen IgE-vermittelten Krankheiten dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zu Krankheiten, bei denen das IgE eine Rolle spielt, zählen neben dem Hyper-IgE-Syndrom und dem IgE-Myelom vor allem die allergischen Krankheiten, wie zum Beispiel das Asthma bronchiale, die allergische Rhino-/Konjunktivitis und die atopische Dermatitis. Weltweit leiden circa 300 Millionen Menschen an IgE-vermittelten allergischen Krankheiten. Die pathophysiologischen Vorgänge, die sich unter anderem beim Asthma bronchiale abspielen sind bereits sehr gut charakterisiert. So stellt die Aktivierung und Degranulation der Mastzellen eine Schlüsselreaktion dar, durch die anschließend eine Entzündungskaskade in Gang gesetzt wird. Die zentrale Rolle spielt aber genau genommen nicht die Mastzelle an sich, sondern allergenspezifisches Immunglobulin E, welches über den hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I an die Mastzelloberfläche bindet. Dieses IgE wird von B-Zellen sezerniert, die sich größtenteils in der unmittelbaren Umgebung der Mastzellen befinden. Mit einem monoklonalen anti-IgE Antikörper (Xolair®, Omalizumab), welcher die Bindung des IgE an seinen hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I auf Mastzellen blockieren soll, wurde bereits versucht dieses pathophysiologische Schlüsselereignis therapeutisch zu blockieren. Erste Ergebnisse lassen darauf schließen, dass dieser Ansatz bei allergischen Patienten zu leichten Besserungen der Symptome beziehungsweise der Reduktion der erforderlichen Medikation führt. Die erhoffte Wirkung bleibt jedoch hinter den Erwartungen zurück. Man vermutet, dass dies unter anderem an der Größe des Antikörpers von circa 180 kDa liegt, welches den Übertritt in das Gewebe erschwert. Sicherlich besteht auch ein quantitatives Problem darin, dass B-Zellen kontinuierlich IgE nachproduzieren und es damit durch den anti-IgE Antikörper nie vollständig abgefangen werden kann. Dennoch ist dieser Versuch, die bekannten Mechanismen therapeutisch zu nutzen bedeutsam, da neben der Standard-Therapie mit Bronchodilatoren, Kortikosteroiden und Anti-Histaminika keine weiteren therapeutischen Alternativen bestehen.

In dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz in der Therapie IgE-vermittelter Krankheiten vorgestellt. Dabei wurde ein bispezifischer single-chain Antikörper hergestellt, der die Fähigkeit besitzt zwei verschiedene Antigene zu binden. Für diesen IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörper wurden die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten zweier verschiedener Antikörper verwendet, die auf einer gemeinsamen Polypeptidkette zu liegen kommen. Bei diesen Antigenen handelt es sich um die CH3-Domäne des Immunglobulin E und die Epsilon-Kette des CD3-Komplexes. Dadurch erreicht man eine spezifische Rekrutierung der Zytotoxizität von CD3-positiven T-Lymphozyten, welche gegen IgE-positive B-Zellen gerichtet ist. Das Konstrukt kann in CHO-Zellen exprimiert werden, die den bispezifischen Antikörper als voll-funktionsfähiges Protein in ihren Zellkultur-Überstand abgeben. Aus diesem wird der IgExCD3 Antikörper mittels verschiedener chromatographischer Säulen aufgereinigt. Da das Konstrukt nur aus den vier variablen Regionen zweier Antikörper besteht, hat es ein geringes Molekulargewicht von 55 kDa.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IgE-positive Zielzellen mit diesem bispezifischen single-chain Antikörper durch körpereigene T-Lymphozyten zerstört werden können.

Die Konzentrationen, bei denen die zytotoxische Aktivität vermittelt wird, liegen im Bereich von 0,1-1 µg/ml. Im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern, die meistens das hundert- bis tausendfache an Protein benötigen, unterstreicht dies eindrucksvoll den potenten Mechanismus mit dem diese bispezifischen single-chain Antikörper wirken. Anders als monoklonale Antikörper sind diese bispezifischen Antikörper nämlich in der Lage zytotoxische CD3-positive T-Zellen zu rekrutieren, welche die wirksamsten Effektorzellen des Immunsystems darstellen. Normale monoklonale Antikörper können diese zytotoxische Subpopulation nicht rekrutieren da T-Lymphozyten keine FcGamma-Rezeptoren besitzen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, richtet sich die zytotoxische Aktivität nur gegen solche Zellen, welche das Immunglobulin E in seiner transmembranen Form auf der Oberfläche exprimieren, da bei diesen die CH3-Domäne des Immunglobulin E frei zugänglich ist. Zellen, welche das IgE über den hoch-affinen FcEpsilon-Rezeptor I gebunden haben, wie zum Beispiel Mastzellen, werden durch den bispezifischen Antikörper IgExCD3 nicht erkannt und damit auch nicht zerstört, da bei diesen Zellen die CH3-Domäne des IgE durch den FcEpsilon-Rezeptor I maskiert ist. Auch Zellen, die das IgE über den niedrig-affinen FcEpsilon-Rezeptor II (CD23) gebunden haben, wie zum Beispiel ein Teil der B-Lymphozyten, bleiben von einem zytotoxischen Angriff verschont. Neben der zielgerichteten Eliminierung der IgE-positiven B-Zellen lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit darauf zu zeigen, dass der bispezifische Antikörper IgExCD3 zu keiner Degranulation von IgE-beladenen Mastzellen führt. Bestätigt wurde dies mit einem sensitiven Beta-Hexosaminidase-Freisetzungstest. Damit ist eine der Hauptanforderungen erfüllt, die an ein solches Konstrukt zu stellen sind, da die Degranulation von Mastzellen fatale Folgen für den Patienten haben würde.

Daneben konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass die Anwesenheit von löslichem humanem Immunglobulin E in physiologischen Konzentrationen zu keiner wesentlichen Inhibierung der Zytotoxizität führt. Erst ab einer Konzentration an löslichem IgE von 420 IU/ml kommt es zu einer relativen Reduktion der zytotoxischen Aktivität. Zu erwähnen ist hier, dass die meisten Patienten mit allergischen Krankheiten normale IgE-Spiegel im Serum haben (obere Grenzwert 100 IU/ml). In den seltensten Fällen wurden Werte über 840 IU/ml gemessen. Die zytotoxische Aktivität in Anwesenheit von 2100 IU/ml löslichem IgE war zwar deutlich inhibiert, eine ausgeprägte Lyse der Zielzellen fand aber dennoch bei höheren Konzentrationen des IgExCD3 Antikörpers statt.

Die Eigenschaften des IgExCD3 bispezifischen single-chain Antikörpers lassen sich damit folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) einfache Produktion in großen Mengen
- 2) einfache standardisierte Aufreinigung in hoher Reinheit
- 3) hohe zytotoxische Aktivität gegenüber transmembranem IgE auf B-Zellen
- 4) Zytotoxizität gegen IgE-positive Zellen unabhängig vom auslösenden Allergen
- 5) geringe Konkurrenz der Zytotoxizität durch lösliches humanes IgE

- 6) keine zytotoxische Aktivität gegenüber Mastzellen mit Rezeptor-gebundenem IgE
- 7) keine Auslösung von Mastzell-Degranulation
- 8) keine zytotoxische Aktivität gegenüber Zellen, die IgE über CD23 gebunden haben.

Damit qualifiziert sich der bispezifische Antikörper IgExCD3 als ein neuer innovativer und vielversprechender Kandidat für die Therapie von IgE-vermittelten Krankheiten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Prausnitz, C. and H. Kuestner, *Studien über die Ueberempfindlichkeit*. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., 1921. **86**: p. 160.
2. Ishizaka, K. and T. Ishizaka, *Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gammaA- or gammaG-globulin*. J Allergy, 1966. **37**(3): p. 169-85.
3. Grimbacher, B., S.M. Holland, and J.M. Puck, *Hyper-IgE syndromes*. Immunol Rev, 2005. **203**: p. 244-50.
4. Buckley, R.H., *The hyper-IgE syndrome*. Clin Rev Allergy Immunol, 2001. **20**(1): p. 139-54.
5. Erlewyn-Lajeunesse, M.D., *Hyperimmunoglobulin-E syndrome with recurrent infection: a review of current opinion and treatment*. Pediatr Allergy Immunol, 2000. **11**(3): p. 133-41.
6. Macro, M., et al., *IgE multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 1999. **32**(5-6): p. 597-603.
7. Johansson, S.G. and H. Bennich, *Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin*. Immunology, 1967. **13**(4): p. 381-94.
8. Kairemo, K.J., M. Lindberg, and M. Prytz, *IgE myeloma: a case presentation and a review of the literature*. Scand J Clin Lab Invest, 1999. **59**(6): p. 451-6.
9. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 2004. **351**(18): p. 1860-73.
10. Durie, B.G., et al., *Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation*. Hematol J, 2003. **4**(6): p. 379-98.
11. von Pirquet, C., *Allergie*. Munch Med Wochenschr, 1906(30): p. 1457-61.
12. Coca, A. and R. Cooke, *On the classification of the phenomena of hypersensitiveness*. J Immunol, 1923(8): p. 163-82.
13. Coombs, R. and P. Gell, *Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease*. Clinical Aspects of Immunology, 1968: p. 575-96.
14. Masoli, M., et al., *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report*. Allergy, 2004. **59**(5): p. 469-78.
15. Asher, M.I., et al., *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 733-43.
16. *Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee*. Lancet, 1998. **351**(9111): p. 1225-32.
17. Marketos, S.G. and C.N. Ballas, *Bronchial asthma in the medical literature of Greek antiquity*. J Asthma, 1982. **19**(4): p. 263-9.
18. Eder, W., M.J. Ege, and E. von Mutius, *The asthma epidemic*. N Engl J Med, 2006. **355**(21): p. 2226-35.
19. Tattersfield, A.E., et al., *Asthma*. Lancet, 2002. **360**(9342): p. 1313-22.
20. Wenzel, S.E., *Asthma: defining of the persistent adult phenotypes*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 804-13.
21. Holgate, S.T. and R. Polosa, *The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 780-93.
22. Weinberger, M., *Clinical patterns and natural history of asthma*. J Pediatr, 2003. **142**(2 Suppl): p. S15-9; discussion S19-20.
23. Gould, H.J., et al., *The biology of IGE and the basis of allergic disease*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 579-628.
24. Kotaniemi-Syrjanen, A., et al., *Allergen-specific immunoglobulin E antibodies in wheezing infants: the risk for asthma in later childhood*. Pediatrics, 2003. **111**(3): p. e255-61.
25. Smurthwaite, L. and S.R. Durham, *Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma*. Curr Allergy Asthma Rep, 2002. **2**(3): p. 231-8.
26. Cookson, W., *Genetics and genomics of asthma and allergic diseases*. Immunol Rev,

2002. **190**: p. 195-206.
27. Cookson, W., *The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 978-88.
 28. Donnadieu, E., et al., *Competing functions encoded in the allergy-associated F(c)epsilonRIbeta gene*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 665-74.
 29. Traherne, J.A., et al., *LD mapping of maternally and non-maternally derived alleles and atopy in FcepsilonRI-beta*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2577-85.
 30. Rosenwasser, L.J., *Promoter polymorphism in the candidate genes, IL-4, IL-9, TGF-beta1, for atopy and asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 268-70.
 31. Ono, S.J., *Molecular genetics of allergic diseases*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 347-66.
 32. Ober, C., et al., *Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(2): p. 517-26.
 33. Umetsu, D.T. and R.H. DeKruyff, *The regulation of allergy and asthma*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 238-55.
 34. Holt, P.G. and W.R. Thomas, *Sensitization to airborne environmental allergens: unresolved issues*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 957-60.
 35. Gough, L., et al., *Proteolytic activity of the house dust mite allergen Der p 1 enhances allergenicity in a mouse inhalation model*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(8): p. 1159-63.
 36. Gough, L., H.F. Sewell, and F. Shakib, *The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 enhances the IgE antibody response to a bystander antigen*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(10): p. 1594-8.
 37. Furmonaviciene, R., et al., *The protease allergen Der p 1 cleaves cell surface DC-SIGN and DC-SIGNR: experimental analysis of in silico substrate identification and implications in allergic responses*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(2): p. 231-42.
 38. Rivera, J. and A.M. Gilfillan, *Molecular regulation of mast cell activation*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(6): p. 1214-25; quiz 1226.
 39. Gilfillan, A.M. and C. Tkaczyk, *Integrated signalling pathways for mast-cell activation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 218-30.
 40. Dawicki, W. and J.S. Marshall, *New and emerging roles for mast cells in host defence*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(1): p. 31-8.
 41. Bischoff, S.C., *Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 93-104.
 42. Hegele, R.G., *The pathology of asthma: brief review*. Immunopharmacology, 2000. **48**(3): p. 257-62.
 43. *International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. Bethesda, Maryland 20892. Publication no. 92-3091, March 1992*. Eur Respir J, 1992. **5**(5): p. 601-41.
 44. Bousquet, J., et al., *GINA guidelines on asthma and beyond*. Allergy, 2007. **62**(2): p. 102-12.
 45. O'Byrne, P.M. and K. Parameswaran, *Pharmacological management of mild or moderate persistent asthma*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 794-803.
 46. Skoner, D.P., *Balancing safety and efficacy in pediatric asthma management*. Pediatrics, 2002. **109**(2 Suppl): p. 381-92.
 47. Calhoun, W.J., *Anti-leukotrienes for asthma*. Curr Opin Pharmacol, 2001. **1**(3): p. 230-4.
 48. Ogawa, Y. and W.J. Calhoun, *The role of leukotrienes in airway inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(4): p. 789-98; quiz 799-800.
 49. Barnes, P.J., *Anti-leukotrienes: here to stay?* Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(3): p. 257-63.
 50. TePas, E.C. and D.T. Umetsu, *Immunotherapy of asthma and allergic diseases*. Curr Opin Pediatr, 2000. **12**(6): p. 574-8.
 51. Kay, A.B., *Immunomodulation in asthma: mechanisms and possible pitfalls*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(3): p. 220-6.

52. Coker, H.A., S.R. Durham, and H.J. Gould, *Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5602-10.
53. Takhar, P., et al., *Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(1): p. 213-8.
54. Takhar, P., et al., *Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 5024-32.
55. Wills-Karp, M., J. Santeliz, and C.L. Karp, *The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 69-75.
56. Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree, *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis*. Science, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
57. Hermann-Kunz, E., *[Incidence of allergic diseases in East and West Germany]*. Gesundheitswesen, 1999. **61 Spec No**: p. S100-5.
58. Lambrecht, B.N., *Allergen uptake and presentation by dendritic cells*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001. **1**(1): p. 51-9.
59. Korsgren, M., et al., *Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 553-62.
60. Meyer, E.H., et al., *Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2782-7.
61. Korsgren, M., *NK cells and asthma*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(20): p. 1871-6.
62. Cameron, L., et al., *Local synthesis of epsilon germline gene transcripts, IL-4, and IL-13 in allergic nasal mucosa after ex vivo allergen exposure*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 46-52.
63. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur, *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 721-32.
64. Papatziamos, G., et al., *IgE-positive plasma cells are present in adenoids of atopic children*. Acta Otolaryngol, 2006. **126**(2): p. 180-5.
65. Oettgen, H.C., *Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of epsilon germline transcripts*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 618-23.
66. Blanco-Quiros, A., et al., *Common variable immunodeficiency. Old questions are getting clearer*. Allergol Immunopathol (Madr), 2006. **34**(6): p. 263-75.
67. Notarangelo, L.D., et al., *Defects of class-switch recombination*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p. 855-64.
68. Erdos, M., A. Durandy, and L. Marodi, *Genetically acquired class-switch recombination defects: the multi-faced hyper-IgM syndrome*. Immunol Lett, 2005. **97**(1): p. 1-6.
69. Etzioni, A. and H.D. Ochs, *The hyper IgM syndrome--an evolving story*. Pediatr Res, 2004. **56**(4): p. 519-25.
70. KleinJan, A., et al., *Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients*. Eur Respir J, 2000. **15**(3): p. 491-7.
71. Milgrom, H., *Anti-IgE therapy in allergic disease*. Curr Opin Pediatr, 2004. **16**(6): p. 642-7.
72. Chang, T.W., *The pharmacological basis of anti-IgE therapy*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 157-62.
73. Avila, P.C., *Does anti-IgE therapy help in asthma? Efficacy and controversies*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 185-203.
74. Kohler, G. and C. Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*. Eur J Immunol, 1976. **6**(7): p. 511-9.
75. Levy, R. and R.A. Miller, *Biological and clinical implications of lymphocyte hybridomas: tumor therapy with monoclonal antibodies*. Annu Rev Med, 1983. **34**: p. 107-16.
76. Ritz, J. and S.F. Schlossman, *Utilization of monoclonal antibodies in the treatment of leukemia and lymphoma*. Blood, 1982. **59**(1): p. 1-11.
77. Sharkey, R.M. and D.M. Goldenberg, *Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(4): p. 226-43.

78. Adams, G.P. and L.M. Weiner, *Monoclonal antibody therapy of cancer*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(9): p. 1147-57.
79. Wu, A.M. and P.D. Senter, *Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(9): p. 1137-46.
80. Polakis, P., *Arming antibodies for cancer therapy*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(4): p. 382-7.
81. Rastetter, W., A. Molina, and C.A. White, *Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases*. Annu Rev Med, 2004. **55**: p. 477-503.
82. Leyland-Jones, B., *Trastuzumab: hopes and realities*. Lancet Oncol, 2002. **3**(3): p. 137-44.
83. Sievers, E.L. and M. Linenberger, *Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(6): p. 522-7.
84. Berdeja, J.G., *Immunotherapy of lymphoma: update and review of the literature*. Curr Opin Oncol, 2003. **15**(5): p. 363-70.
85. Wong, P. and E.G. Pamer, *CD8 T cell responses to infectious pathogens*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 29-70.
86. Segal, D.M., G.J. Weiner, and L.M. Weiner, *Bispecific antibodies in cancer therapy*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(5): p. 558-62.
87. Wolf, E., et al., *BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity*. Drug Discov Today, 2005. **10**(18): p. 1237-44.
88. Hagensaars, M., et al., *The development of a bi-specific anti-CD161A x anti-tumor antibody for rat NK cell targeting*. Immunobiology, 1999. **200**(1): p. 31-48.
89. Poljak, R.J., *Production and structure of diabodies*. Structure, 1994. **2**(12): p. 1121-3.
90. Hudson, P.J. and A.A. Kortt, *High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies*. J Immunol Methods, 1999. **231**(1-2): p. 177-89.
91. Baeuerle, P.A., P. Kufer, and R. Lutterbuse, *Bispecific antibodies for polyclonal T-cell engagement*. Curr Opin Mol Ther, 2003. **5**(4): p. 413-9.
92. van Spriël, A.B., H.H. van Ojik, and J.G. van De Winkel, *Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies*. Immunol Today, 2000. **21**(8): p. 391-7.
93. Weiner, L.M., *Bispecific antibodies in cancer therapy*. Cancer J, 2000. **6 Suppl 3**: p. S265-71.
94. Lustgarten, J. and Z. Eshhar, *Specific elimination of IgE production using T cell lines expressing chimeric T cell receptor genes*. Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2985-91.
95. Page, M.J. and M.A. Sydenham, *High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in Chinese hamster ovary cells*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(1): p. 64-8.
96. Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufer, *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7021-5.
97. Stadler, B.M., et al., *Potential role of anti-IgE antibodies in vivo*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1989. **88**(1-2): p. 206-8.
98. Brischwein, K., et al., *MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors*. Mol Immunol, 2006. **43**(8): p. 1129-43.
99. Neuberger, M.S., et al., *A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function*. Nature, 1985. **314**(6008): p. 268-70.
100. Soderlind, E., A.C. Simonsson, and C.A. Borrebaeck, *Phage display technology in antibody engineering: design of phagemid vectors and in vitro maturation systems*. Immunol Rev, 1992. **130**: p. 109-24.
101. Winter, G., et al., *Making antibodies by phage display technology*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 433-55.
102. Hoogenboom, H.R. and P. Chames, *Natural and designer binding sites made by phage display technology*. Immunol Today, 2000. **21**(8): p. 371-8.
103. Koehler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**: p. 495-497.

104. Kay, A.B., *Allergy and allergic diseases. First of two parts.* N Engl J Med, 2001. **344**(1): p. 30-7.
105. Kay, A.B., *Allergy and allergic diseases. Second of two parts.* N Engl J Med, 2001. **344**(2): p. 109-13.
106. Kaul, S., et al., *Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization.* Clin Exp Allergy, 2007. **37**(1): p. 141-50.

8 LEBENSLAUF

CURRICULUM VITAE

Scientific Education

- 01/2005 - now** **Whitehead Institute, Cambridge/USA, Prof. R. Jaenisch**
Postdoctoral Work Project I: Generation and characterization of transnuclear mice with pre-defined T Cell Receptor specificities against *Toxoplasma gondii* obtained via Somatic Cell Nuclear Transfer (with Prof. HL. Ploegh)
Project II: Generation and characterization of a transnuclear mouse with pre-defined B Cell Receptor specificity against Ovalbumin obtained via Somatic Cell Nuclear Transfer (with Prof. HL. Ploegh)
Project III: Characterization of Fusion-mediated Reprogramming of Somatic Cells with Embryonic Stem Cells (with Prof. J. Voldmann)
- 04/2000 - 12/2004** **Institute of Immunology, Munich/Germany, Prof. G. Riethmueller, Prof. P. Kufer**
Doctoral Work Elimination of IgE-positive B cells via a novel non-anaphylactogenic anti-IgE/anti-CD3 T cell engaging bispecific single-chain antibody

Medical Education

- 04/1999 - 11/2003** **Ludwig-Maximilians-University, Munich/Germany**
Clinical Studies Clinical electives in pediatrics, hematology, and oncology (with Prof. H. Schmidt)
- 04/1997 - 03/1999** **Ruprecht-Karls-University, Heidelberg/Germany**
Preclinical Studies Preclinical exam (Physikum)
- 08/1995 - 09/1996** **German Red Cross, Buchen/Germany**
Civilian Service Paramedics

General Education

- 08/1986 - 07/1995** **Ganztagesgymnasium, Osterburken/Germany**
Grammar School University-entrance diploma (Abitur)
Major in Mathematics and Chemistry; Great Latinum

Teaching Experience

- 03/2001 - 12/2004** **Max-von-Pettenkofer-Institute, Munich/Germany**
Tutor Class of immunology and microbiology (with Prof. G. Riethmueller)
- 09/1998 - 03/1999** **Ruprecht-Karls-University, Heidelberg/Germany**
Tutor Class of anatomy and dissection of the human body (with Prof. K. Tiedemann)