Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Herstellung von murinen bispezifischen Antikörpern zur Depletion von Chemokinrezeptor-positiven Zellen

Martin Alexander Schneider

aus

München

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 11. September 2003

(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am	11. September 2003
1. Gutachter	Frau Prof. A. Vollmar
2. Gutachter	Herr Prof. D. Schlöndorff
Mündliche Prüfung am	14. Oktober 2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis VII
1 Einleitung 1
1.1 Entzündungsreaktionen 1
1.2 Chemokine und deren Rezeptoren in der Inflammation 2
1.2.1 Chemokine 2
1.2.2 Chemokinrezeptoren 4
1.2.2.1 Einteilung der Chemokinrezeptoren 4
1.2.2.2 Struktur-Funktions-Beziehung der Rezeptoren 4
1.2.3 Regulation der Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Leukozytenpopulationen 4
1.2.4 Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren in entzündlichen Erkrankungen 5
1.2.5 Die Rolle von CCR2 und CCR5 in der Maus 5
1.2.5.1 Expression von CCR2 und CCR5 in der gesunden Maus 6
1.2.5.2 Rolle von CCR2 und CCR5 in verschiedenen Mausmodellen entzündlicher Erkrankungen 6
1.2.5.3 CCR2 und CCR5 als Zielstrukturen zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen 7
1.3 T-Zell Biologie 7
1.3.1 Der T-Zell-Rezeptor (TCR) 8
1.3.2 T-Zell Aktivierung 8
1.3.2.1 Antigen-spezifische Aktivierung 8
1.3.2.2 Antigen-unabhängige Aktivierung 9
1.3.3 Effektormechanismen von $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen 10
1.3.3.1 Programmierter Zelltod (Apoptose) 10
1.3.3.2 Perforine und Granzyme 11
1.3.3.3 Fas Ligand und Fas Rezeptor Signalweg 12
1.3.3.4 Cytokine 12

1.3.4 Effektorfunktionen von $CD4^+$ T-Lymphozyten ... 12
1.4 Antikörper ... 13
1.4.1 Struktur von Antikörpern und deren Antigenbindungsstelle ... 13
1.4.2 Antikörperfunktionen ... 14
1.4.2.1 Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC) ... 14
1.4.2.2 Opsonisierung und erleichterte Phagozytose ... 14
1.4.2.3 Aktivierung von Komplement (CDC) ... 15
1.4.2.4 Neutralisation von Toxinen ... 15
1.4.3 Therapeutische Verwendung von monoklonalen Antikörpern ... 15
1.4.4 Bispezifische Antikörperkonstrukte ... 17
1.4.5 Funktionsweise von bispezifischen Antikörpern ... 19
2 Zielsetzung der Arbeit ... 23
3 Material ... 25
3.1 Chemikalien und Reagenzien ... 25
3.2 Enzyme und Reagenzien-Kits ... 26
3.3 Oligonukleotidprimer ... 27
3.4 Antikörper und Enzym-Konjugate ... 28
3.5 Bakterienstämme ... 29
3.6 Eukaryontische Zellen ... 29
3.7 Kulturmedien für Bakterien ... 29
3.8 Lösungen und Puffer ... 30
3.9 Geräte ... 32
3.10 Sonstiges ... 33
4 Methoden ... 35
4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren ... 35
4.1.1 RNA-Isolation aus Hybridomzellen ... 35
4.1.2 cDNA-Synthese ... 35
4.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion ... 36
4.1.4 Erstellung einer cDNA-Bank ... 36
4.1.5 Trennung von Nukleinsäuren ... 37
4.1.6 Isolation von DNA-Proben aus Agarosegelen ... 38

4.1.7 Präzipitation von Nukleinsäuren 38
4.1.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren 39
4.1.9 Plasmidgewinnung aus *E. coli* 39
4.1.9.1 Mini-Plasmidpräparation zum Testverdau 39
4.1.9.2 Midi-Plasmidpräparation zur Klonierung und Sequenzierung 40
4.1.9.3 Maxi-Plasmidpräparation zur Transfektion von CHO-Zellen 40
4.1.10 Plasmidsequenzierung 40
4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 40
4.2.1 Fishing-PCR 41
4.2.2 Amplifikations- und Fusions-PCR 43
4.2.3 Kolonie-PCR 45
4.3 Subklonierungen 45
4.3.1 Spezifische Spaltung von dsDNA mit Restriktionsenzymen 46
4.3.2 Verknüpfung von DNA mit T4 DNA Ligase 46
4.3.3 Vektoren 47
4.3.3.1 Struktur des pCR-Skript-Vektors 47
4.3.3.2 Aufbau des OmpA-Vektors 47
4.3.3.3 Der eukaryontische Expressionsvektor pEF-DHFR 48
4.3.4 blunt-end Klonierung in den pCR-Skript-Vektor 49
4.3.5 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation 49
4.3.6 Stabile Transfektion von CHO-Zellen mit dem pEF-DHFR-Vektor 50
4.4 Proteinexpression und –aufreinigung 51
4.4.1 Expression der scFv im Periplasma von E. coli 51
4.4.2 Produktion der bsAb durch CHO-Zellen 51
4.4.3 Aufreinigung der Antikörperkonstrukte über His-Tag 52
4.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 53
4.4.5 Coomassie-Staining 53
4.4.6 Western Blot 53
4.4.7 Konzentrationsbestimmung der Proteine durch UV-Photometrie 54

4.4.8 IgG ELISA zur Konzentrationsbestimmung der bsAb-IgG 54
4.5 Zellkultur 54
4.5.1 Hybridomzellen MC21, MC68 und MC69 55
4.5.2 CHO-Zellen 56
4.5.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen 56
4.5.2.2 Kultur nach stabiler Transfektion 56
4.6 Durchflußzytometrie 57
4.6.1 Direktfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern 58
4.6.2 Färbung der His-Tag Proteine (Sekundärfärbung) 58
4.6.3 Färbung der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 mit MC21 und MC68 59
4.6.4 Downmodulation von Rezeptoren als Negativkontrolle 59
4.6.5 Erythrozytenlyse 59
4.7 Funktionelle Tests mit den rekombinanten Proteinen 60
4.7.1 Bindungsnachweis der Konstrukte auf mCCR CHO-Zellen 60
4.7.2 Bindungsnachweis auf Mausblut 60
4.7.3 *In vitro* Lyse- und Aktivierungsassays mit CHO-Zellen 61
4.7.4 Isolation von T-Zellen mittels „Magnetic Beads“ 61
4.8 Tierversuche 62
4.8.1 Haltung der Tiere 62
4.8.2 Organentnahme 62
4.8.2.1 Narkotisierung 62
4.8.2.2 Blutabnahme 62
4.8.3 Herstellung von Zellsuspensionen aus Milz und Leber 62
4.8.4 Nierenzellsuspension 63
5 Ergebnisse 65
5.1 Herstellung der single-chain Fragmente der Antikörper 65
5.1.1 Klonierung der variablen Domänen von MC21, MC68 und MC69 65
5.1.2 Klonierung von MC68-V_H mittels cDNA-Bank 66
5.1.3 Sequenzierung der V_H- und V_L-Dömanen im Vektor 68

5.1.4 Fusion von V_H und V_L zu single-chain Fragmenten (scFv).....72

5.1.5 Expression der single-chain Fragmente in *E. coli* 74

5.1.6 Bindungsanalyse der single-chain Fragmente 75

5.2 Erzeugung der bispezifischen Antikörper.....77

5.2.1 Fusion der single-chain Fragmente.....79

5.2.2 Subklonierung in den pEF-DHFR-Vektor und stabile Transfektion der CHO-Zellen 79

5.2.3 Expression der bispezifischen Antikörper 81

5.2.4 Aufreinigung der Antikörper-Konstrukte durch Affinitätschromato-graphie (FPLC).....81

5.2.4.1 Ermittlung der Ni-NTA Menge 81

5.2.4.2 Elution der gebundenen Proteine mittels pH-Stufengradienten.....82

5.3 *In vitro* Untersuchungen der bsAb 85

5.3.1 Bindungsanalyse der bsAb 85

5.3.2 *In vitro* Lyseassays mit MC21bsAb und MC69bsAb 86

5.4 Anwendung der bsAb *in vivo* 88

5.4.1 Behandlung von gesunden Balb/c-Mäusen mit dem MC21bsAb 88

5.4.2 Behandlung von SNF1-Mäusen mit dem MC69bsAb.....89

5.5 Modifikation der bsAb mit murinem IgG1 92

5.5.1 Klonierung von der Hinge-C_H2-C_H3-Region eines murinen IgG1 an die bsAb cDNA.....93

5.5.2 Expression in CHO-Zellen und Bindungsanaylse 94

5.5.3 *In vitro* Funktionsassays mit den bsAb-IgG.....95

5.5.3.1 Aktivierungsstudien mit den bsAb-IgG1 Proteinen.....95

5.5.3.2 Einfluss des Fc-Teils auf die Aktivierung von T-Zellen durch die bsAb-IgG.....96

5.5.3.3 Kopplung von Ziel- und Effektorzelle über das bsAb-IgG Konstrukt.....98

5.5.4 Mutation der Fc-Bindungsstelle der bsAb-IgG1 98

5.5.5 Vergleich der Aktivierung von T-Zellen durch bsAb-IgG1 und bsAb-IgG1-Mt.....100

5.6 Reinigung der bsAb-IgG über einen His-Tag 101
5.7 *In vitro* Lyseeigenschaften der bsAb-IgG 104
5.8 *In vivo* Anwendung des MC21bsAb-IgG..... 106
6 Diskussion 109
6.1 Herstellung von bispezifischen single-chain Antikörpern (bsAb) 109
6.2 *In vitro* Eigenschaften der bispezifischen single-chain Antikörper (bsAb) 111
6.3 *In vivo* Untersuchungen der bsAb 113
6.4 Modifikation der bsAb zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften 115
6.5 *In vivo* Einsatz des MC21bsAb-IgG..... 117
6.6 Ausblick..... 118
7 Zusammenfassung 119
8 Literaturverzeichnis..... 121

Abkürzungsverzeichnis

mAb	monoklonaler Antikörper
ABTS	2,2´-Azino-bis(3-Ethylbenz-Thiazolin-6-Sulfonsäure)
ADCC	Antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität
APS	Amoniumpersulfat
ATCC	American Type Tissue Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bsAb	bispezifischer single-chain Antikörper
bsAb-IgG1	bispezifischer single-chain Antikörper modifiziert mit Maus-IgG1
bsAb-IgG1-Mt	Mutation der Fc-Bindung des bsAb-IgG1
C_H	konstante schwere Antikörperdomäne
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHO	chinese hamster ovary
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescent associated cell sorter
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Ig	Immunglobulin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IFN	Interferon
Linker	Kette
M	Molar (mol/l)
MTX	Methotrexat
NK-Zellen	natural killer cells
NTA	Nitrilo-tri-acetic-acid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
mRNA	messenger RNA
scFv	single-chain Fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N´,N´,-Tetramethyl-Ethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	enzymatische Einheit Unit
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Entzündungsreaktionen

Für eine Entzündungsreaktion definiert ein immunologisches Lehrbuch (Roitt, 1996) drei Merkmale:

- Die Blutversorgung des betroffenen Bereichs wird erhöht.
- Die Permeabilität der Kapillaren wird aufgrund von Veränderungen des Endothels erhöht.
- Die Einwanderung von Leukozyten in das entzündete Gewebe erfolgt.

Die Kommunikation zwischen den beteiligten Zellen wird dabei von Cytokinen vermittelt. Sie regulieren sowohl Dauer als auch Stärke einer Immunantwort, indem sie das Überleben, die Proliferation, Reifung, Differenzierung, Migration und eine Vielzahl anderer Parameter der Leukozyten beeinflussen. Im Allgemeinen haben Cytokine einen kleinen Wirkradius (Kaplan, 1996), deswegen erlauben parakrine Wege den Cytokinen im umgebenden Gewebe zu signalisieren und so z. B. eine lokale Ansammlung von Zellen und deren Aktivierung hervorzurufen. Eine Klassifizierung der Cytokine kann man anhand ihrer biologischen Hauptaktivität vornehmen (modifiziert nach (Hack, 1997):

- Proinflammatorische Cytokine wie IL-1β, IL-6, TNF-α und IFN-γ
- Anti-inflammatorische Cytokine wie IL-10 und TGF-β
- Cytokine, die zur Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten (IL-2, IFN-γ) führen
- Cytokine mit ihrer Hauptwirkung in der Entstehung und Entwicklung neuer Leukozyten (hämatopoetische Wachstumsfaktoren)
- Cytokine mit Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung
- Cytokine, die die Zellwanderung der verschiedenen Populationen kontrollieren, so genannte Chemokine.

1.2 Chemokine und deren Rezeptoren in der Inflammation

1.2.1 Chemokine

Bei den Chemokinen handelt es sich um eine Untergruppe der Cytokine. Die Chemokine sind kleine (~8-14 kDa), meist basische und lösliche Moleküle, die die Zellwanderung von verschiedenen Zellpopulationen steuern. Bis heute sind beim Menschen ca. 50 Chemokine identifiziert worden (http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp). Der Name entstand aus „chemotaktisch aktive Cytokine“, sprich Chemokine. Eine konservierte Sequenz von Aminosäuren dient zur Einteilung der einzelnen Mitglieder in vier Familien (Nelson, 1998). Aus der Primärsequenz werden dazu vier konservierte Cysteine herangezogen; es gibt C-, C-C-, C-X-C- und C-X_3-C-Chemokine. Das X repräsentiert jeweils eine dazwischen liegende Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinen der primären Aminosäuresequenz. In Abbildung 1-1 ist ein Teil der Primärsequenz von zwei der bekanntesten Vertreter der C-X-C- (IL-8) und der C-C-Familie (MCP-1) abgebildet.

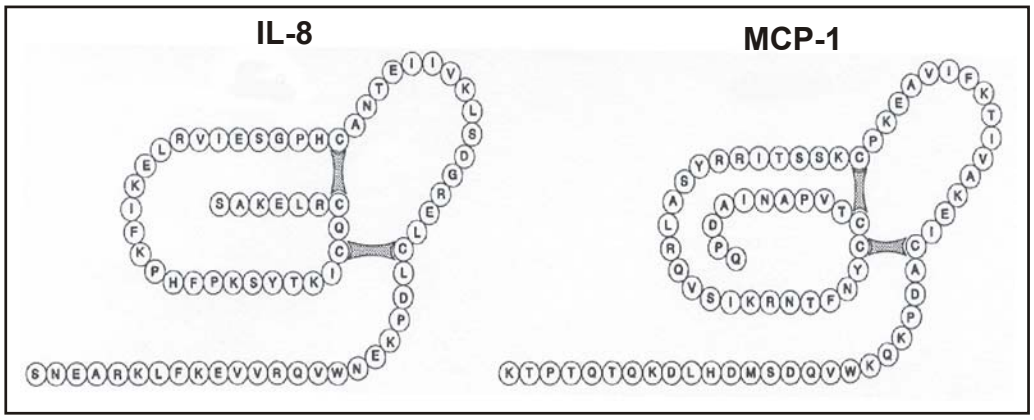

Abbildung 1-1: Abschnitt der Primärsequenz des C-X-C-Chemokins IL-8 und des C-C-Chemokins MCP-1 mit den vier konservierten Cystein-Resten, die für die Einteilung der Chemokine in ihre Familien verantwortlich sind (aus (Baggiolini, 1994).

Für viele der bekannten Chemokine existieren mehrere Namen, so dass kürzlich eine neue Nomenklatur eingeführt wurde, bei der die Reihenfolge der Cysteine mit einem L für Ligand und einer Zahl kombiniert wurde (z. B. CCL2) (Zlotnik, 2000).

Chemokine wirken hochgradig redundant (Mantovani, 1999), d. h. viele der bekannten Proteine wirken nicht nur auf eine Zellpopulation alleine. Zusätzlich exprimieren die jeweiligen Leukozytenpopulationen mehrere Rezeptoren für Chemokine. Dabei können diese Rezeptoren mit verschiedenen Chemokinen

einer Klasse interagieren. So binden z. B. alle vier MCP-Moleküle an den Rezeptor CCR2 (C-C-Chemokin-Rezeptor-2), wobei aber MCP-2, MCP-3 und MCP-4 auch an die Rezeptoren CCR1 und CCR3 binden können (Mantovani, 1999). Dies dient der Regulation und zielgenauen Wanderung der Leukozyten im Gewebe und führt so zu einem eng verflochtenen Netzwerk an Interaktionen der beteiligten Zellen. In der Abbildung 1-2 ist diese Redundanz in einem Schema dargestellt.

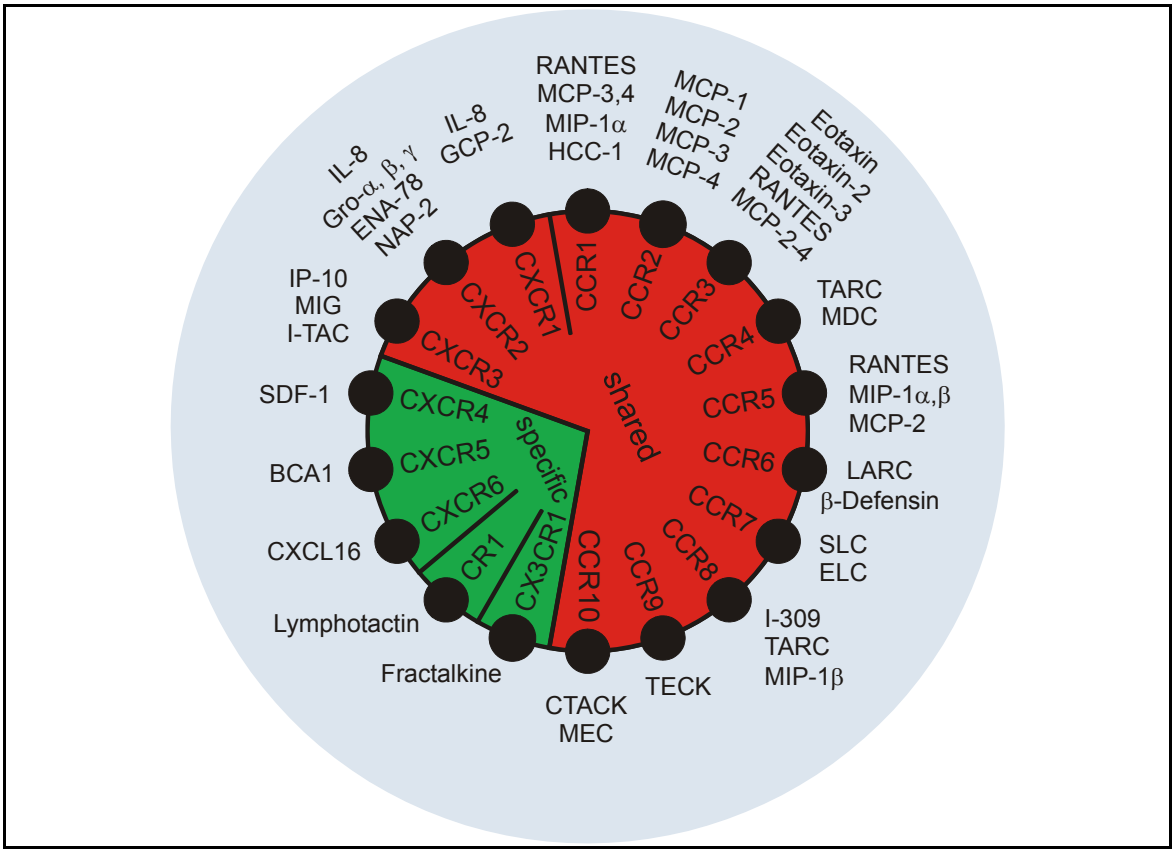

Abbildung 1-2: Redundanz der bisher bekannten humanen Chemokinrezeptoren und deren Liganden.

Als Produzenten für Chemokine sind eine Vielzahl von Zellen bekannt, neben Leukozyten auch Zellen, die nicht dem Immunsystem angehören, wie z. B. Endothelzellen (Rollins, 1990) oder verschiedene Epithelien (Standiford, 1991; Choi, 1992). Ebenso vielfältig ist die Palette der Stimuli, die eine Chemokinproduktion auslösen können (Baggiolini, 1994).

Man geht davon aus, dass die freigesetzten Chemokine mit der Gewebematrix interagieren, insbesondere mit Proteoglycanen und Glycosaminoglycanen (Tanaka, 1993; Witt, 1994). Dadurch werden die Chemokine an ihrem Wirkungsort gehalten. Wird z. B. IL-8 ins Gewebe gespritzt, so ist es noch

mehrere Stunden danach aktiv (Colditz, 1990). Ähnliche Effekte konnten auch für MIP-1β und RANTES gezeigt werden. Diese Beobachtungen tragen zu dem Konzept bei, dass die Leukozytenmigration eher durch einen festen, als durch einen löslichen Chemokingradienten vermittelt wird (Baggiolini, 1997).

1.2.2 Chemokinrezeptoren

1.2.2.1 Einteilung der Chemokinrezeptoren

Bei den Rezeptoren der Chemokine handelt es sich ausschließlich um 7-Transmembranproteine, deren Signaltransduktion an G-Proteine gekoppelt ist. Von einer Ausnahme abgesehen, binden die Chemokinrezeptoren nur Chemokine aus einer einzigen Klasse, so dass sich die Einteilung der Rezeptoren nach der Struktur der Liganden richtet. Die Chemokinrezeptoren werden in CCR1 bis CCR10, CXCR1 bis CXCR6, CR1 und CX3CR1 eingeteilt (Murphy, 2000). Die Ausnahme der Chemokinrezeptoren bildet der DARC/Duffy-Rezeptor auf Erythrozyten, der sowohl CCR-, als auch CXC-Chemokine binden kann und eine Art Scavenger-Rezeptor für Chemokine darstellt (Darbonne, 1991).

1.2.2.2 Struktur-Funktions-Beziehung der Rezeptoren

Chemokinrezeptoren liegen in unterschiedlichen Konformationen vor. Durch monoklonale Antikörper konnte gezeigt werden, dass durch verschiedene dreidimensionale Strukturen unterschiedliche Antworten der Rezeptoren ausgelöst werden (z. B. Endozytose oder G-Protein-Kopplung) (Blanpain, 2002). Zudem können die Chemokinrezeptoren sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden, die wiederum unterschiedliche funktionelle Aufgaben erfüllen (Benkirane, 1997; Lapham, 1999). Für CCR2 gelten dabei die Homodimere als funktionell aktive Form. Die Dimerisierung von CCR5 begünstigt die Internalisierung des Rezeptors (Blanpain, 2002). Heterodimere zwischen CCR2 und CCR5 scheinen die Sensitivität für die jeweiligen Liganden zu erhöhen (Mellado, 2001; Rodriguez-Frade, 2001).

1.2.3 Regulation der Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Leukozytenpopulationen

Die Expression der Chemokinrezeptoren auf Leukozyten ist stark vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand der Zellen abhängig. Aufgrund der Chemokinrezeptorexpression lassen sich deswegen auch unterschiedliche Subpopulationen bei den Leukozyten erkennen.

Neben der Einteilung der T-Zellen in cytotoxische $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ T-Helfer-Zellen, können diese u. a. anhand ihres Chemokinrezeptorprofils

weiter unterteilt werden. So unterscheiden sich naive T-Zellen in ihrer Rezeptorexpression von Effektor T-Zellen, Effector Memory T-Zellen (T_{EM}), Central Memory T-Zellen (T_{CM}), follikuläre Helfer T-Zellen (T_{FH}), T_H1 und T_H2 Zellen (Sallusto, 1999; Breitfeld, 2000; Sallusto, 1998). Während naive T-Zellen z. B. CCR7 und CXCR4 exprimieren (Randolph, 1999), tragen Effektor und Memory T-Zellen CCR2 bis CCR6, CCR8, CCR9 und CXCR5 auf ihrer Oberfläche (Sallusto, 1999; Bleul, 1997; Sallusto, 1997; Campbell, 1999; Zabel, 1999; Legler, 1998).

1.2.4 Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren in entzündlichen Erkrankungen

Man kann die Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auch grob in zwei Gruppen einteilen. Induzierbare Chemokinrezeptoren, die von Leukozyten in Stresssituationen wie z. B. in der Entzündungsreaktion exprimiert werden. Und in konstitutiv exprimierte Chemokinrezeptoren wie CCR7, die zur normalen Leukozytenwanderung und -zirkulation dienen (Gerard, 2001). Bei einer Reihe von entzündlichen, insbesondere autoimmunen Erkrankungen des Menschen, konnte bereits eine Anreicherung von induzierbaren Chemokinrezeptoren auf den infiltrierenden Leukozyten beschrieben werden. Insbesondere CCR2 und CCR5 scheinen dabei eine wichtige Rolle einzunehmen.

So wurde gezeigt, dass es z. B. bei verschiedenen Arthitiden zu einer starken, lokalen Ansammlung von CCR2 und CCR5 exprimierenden T-Zellen und Monozyten im entzündeten Gelenk kommt (Mack, 1999; Bruhl, 2001b). Im peripheren Blut der Patienten hingegen ist die Expression von CCR2 und CCR5 auf T-Zellen gering. Bei entzündlichen Nierenerkrankungen konnte eine Korrelationen zwischen der Schwere der Erkrankung und der Expression von Chemokinrezeptoren erstellt werden (Segerer, 1999; Segerer, 2000). Im Liquor und Hirngewebe von Multiple Sklerose Patienten wurde eine Anreicherung von CCR5 gezeigt (Balashov, 1999). Und schließlich wird die Transplantatabstoßung stark von Chemokinen und deren Rezeptoren beeinflusst (Segerer, 2001).

1.2.5 Die Rolle von CCR2 und CCR5 in der Maus

Aufgrund dieser Befunde und der Bedeutung der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 in den unterschiedlichen Erkrankungen würden diese beiden Rezeptoren gute Zielstrukturen für eine therapeutische Intervention abgeben. Dabei spielt die präklinische Analyse von Tiermodellen eine entscheidende Rolle. Um den Einfluss der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 auf entzündliche Erkrankungen in der Maus genauer untersuchen zu können,

wurden in unserem Labor monoklonale Antikörper gegen Maus-CCR2 (MC21) und CCR5 (MC68, MC69) hergestellt (Mack, 2001).

1.2.5.1 Expression von CCR2 und CCR5 in der gesunden Maus

Mit Hilfe dieser Antikörper konnte das Expressionsmuster der beiden Rezeptoren in Blut, Milz und Lymphknoten von Mäusen untersucht werden. Ähnlich wie beim Menschen zeigt sich dabei eine homogene Expression von CCR2 auf murinen Monozyten. CCR2 lässt sich auch auf einer kleinen Subpopulation von $CD4^+$ T-Zellen nachweisen. CCR5 hingegen wird in der Maus im Unterschied zum Menschen homogen und sehr stark auf NK-Zellen exprimiert. Hinsichtlich der Expression von CCR5 auf T-Zellen und Monozyten zeigte sich kein Unterschied zum Menschen (Mack, 2001).

1.2.5.2 Rolle von CCR2 und CCR5 in verschiedenen Mausmodellen entzündlicher Erkrankungen

In den bisherigen *in vivo* Untersuchungen der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 wurden hauptsächlich knock-out Mäuse verwendet. So sind CCR2-defiziente Mäuse resistent gegen die Induktion der murinen Multiplen Sklerose (EAE, experimentelle allergische Enzephalitis) (Izikson, 2000; Fife, 2000). CCR5 -/- Mäuse hingegen zeigen in der Herztransplantation eine deutlich gesteigerte Überlebensrate des Spenderorgans gegenüber Wildtyp-Mäusen (Hancock, 2000). Aber auch Studien zur Rezeptorexpression in Mausmodellen wie EAE, RA oder Transplantation weisen auf eine wichtige Rolle von CCR2 und CCR5 bei der Krankheit hin. So zeigten fischer et al., dass bei EAE-Mäusen CCR2 und CCR5 auf Leukozyten exprimiert werden, die an der Krankheit beteiligt sind (Fischer, 2000). In einem Modell für Graft-versus-Host-Disease (GvHD) wurde gezeigt, das die infiltrierenden $CD8^+$ T-Zellen CCR5 exprimieren (Murai, 1999). Mit einem MCP-1 Antagonisten konnte die Entstehung einer Arthritis bei MRL/lpr Mäusen verhindern (Gong, 1997), was auf einen Einfluß von CCR2 hinweist. Auch im MRL/lpr Modell für die Lupus Nephritis wurde ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und den Chemokinrezeptoren gezeigt (Perez de Lema, 2001).

Durch den Einsatz der murinen CCR2 und CCR5 Antikörper konnte nun auch in der Maus eine Korrelation zwischen entzündlichen Erkrankungen und der Chemokinrezeptorexpression erstellt werden. So zeigt sich bei der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) ein ähnliches Bild wie bei humanen Arthritiden, nämlich eine starke CCR2 Expression auf Monozyten und auch auf $CD4^+$ T-Zellen im Gelenkinfiltrat im Vergleich zum peripheren Blut (Brühl, eingereicht). Bei dem SNF1-Mausmodell für eine Lupus Nephritis konnte eine Zunahme an $CCR2^+$ und $CCR5^+$ T-Zellen in der Milz und der Niere gezeigt werden (nicht publizierte Daten, s. a. Abbildung 5-23).

1.2.5.3 CCR2 und CCR5 als Zielstrukturen zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen

Somit könnten diese beiden Rezeptoren auch für die Untersuchung verschiedener Mausmodelle von entzündlichen Erkrankungen interessant sein. In Bezug auf die Blockade von Chemokinrezeptoren ist jedoch anzumerken, dass in den meisten Entzündungsmodellen nur dann ein Behandlungserfolg zu erkennen war, wenn eine prophylaktische Behandlung durchgeführt wurde. In der CIA konnte z. B. der Krankheitsverlauf nach dem Einsetzen der Entzündungsreaktion nicht mehr beeinflusst werden (Plater-Zyberk, 1997).

Außerdem werden die meisten chronisch entzündlichen Erkrankungen beim Menschen erst in einem späten Stadium diagnostiziert. Zu diesem Zeitpunkt hat bereits eine deutliche Infiltration von Leukozyten stattgefunden, eine reine Blockade der Infiltration durch monoklonale Antikörper dürfte hier nicht mehr erfolgreich sein. Als alternative Behandlungsstrategie für bereits etablierte Erkrankungen wäre deshalb eine selektive Depletion von CCR2 bzw. CCR5 positiven Zellen viel versprechend. In einem solchen Ansatz würden die beiden Rezeptoren lediglich als Marker dienen, um die Leukozytenpopulationen zu identifizieren, die wesentlich an der chronischen Erkrankung beteiligt sind.

Eine solche Depletion kann z. B. durch einen bispezifischen Antikörper (s. a. 1.4.4) erreicht werden. Ein bispezifischer Antikörper besitzt im Gegensatz zum monoklonalen Antikörper zwei Bindungsspezifitäten. Durch einen derartigen Antikörper wird eine Zielzelle an eine Effektorzelle (s. a. Abbildung 1-8) gekoppelt. Die Effektorzelle wird aktiviert und es kommt zur Lyse der Zielzelle. Ein humanes, bispezifisches Konstrukt führte in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis zu einer Depletion von $CCR5^+$ Zellen. Dabei waren $CD3^+$ T-Zellen die Effektorzellen, als Zielzellen dienten $CCR5^+$ Zellen (Bruhl, 2001a).

Um die Funktionsweise einer solchen Zelldepletion zu erklären, wird im folgenden Abschnitt zunächst auf die T-Zell Biologie der Immunantwort eingegangen. Abschließend werden Antikörper und die bispezifischen Konstrukte näher betrachtet.

1.3 T-Zell Biologie

Ziel der vorliegende Arbeit war es einen bispezifischen Antikörper herzustellen, der T-Zellen rekrutiert, um Chemokinrezeptor-positive Zellen zu depletieren. Dabei erfolgt die T-Zellaktivierung über den Komplex aus T-Zell-Rezeptor (TCR) und CD3-Rezeptor. Dieser Rezeptorkomplex, sowie die Möglichkeiten T-Zellen zu aktivieren und die Effektormechanismen der T-Lymphozyten werden in den folgenden Abschnitten behandelt.

1.3.1 Der T-Zell-Rezeptor (TCR)

Der T-Zellrezeptor (TCR) besteht aus einem multimeren Proteinkomplex. Das sind zum einen die variablen Glycoproteine des TCR - die α und β-Kette - die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Über diese beiden Untereinheiten erfolgt die Antigenerkennung im Zusammenspiel mit den MHC-Molekülen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) (Clevers, 1988). Das α/β-Heterodimer besitzt jedoch nur eine kurze Transmembrandomäne und assoziiert deshalb zur Signaltransduktion mit dem CD3-Proteinkomplex. Der CD3-Komplex wiederum besteht aus den Untereinheiten γ, δ, ε, und ζ, die unterschiedliche Aufgaben bei der Signalübermittlung ins Zellinnere übernehmen (Clevers, 1988). Ein schematischer Aufbau der TCR/CD3-Komplexes ist in Abbildung 1-3 gezeigt.

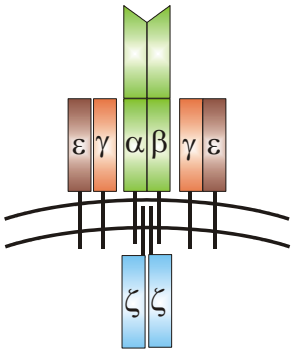

Abbildung 1-3: Schematischer Aufbau des TCR/CDR3-Komplexes. Dargestellt sind die Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors (TCR) in grün und die Untereinheiten des CD3-Komplexes.

1.3.2 T-Zell Aktivierung

1.3.2.1 Antigen-spezifische Aktivierung

Zur Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen in einer Immunantwort werden mindestens zwei Signale benötigt. Der entscheidende erste Schritt ist dabei die Präsentation von prozessierten Antigenen auf den MHC-Komplexen (MHC) von APCs. Dieser pMHC-Komplex bindet anschließend an den TCR und den CD4 bzw. CD8 Corezeptor auf den T-Zellen. Auf diese Bindung erfolgt die zweite Stufe der Aktivierung, die Costimulation zwischen den T-Zellen und den APCs (Croft, 1997). Bis heute ist eine Vielzahl von costimulatorischen Molekülen bekannt, die bei der T-Zell-Aktivierung unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Zu den bekanntesten zählen CD80, CD86, CD154 und ICOS (Van Gool, 1996; Grewal, 1996). Zusätzlich sind noch verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt, um zwischen den beiden Zellen einen festen

Kontakt herzustellen. Der gesamte Aktivierungsprozess mündet in der Formation einer immunologischen Synapse, in der die beteiligten Membranproteine vereint werden (Bromley, 2001; Grakoui, 1999) und so zu einem engen Kontakt zwischen beiden Zellen führt. Insbesondere für die Ausschüttung von Effektormolekülen ist der Aufbau eines dauerhaften und räumlich engen Kontakts von großer Bedeutung (s. a. 1.3.3).

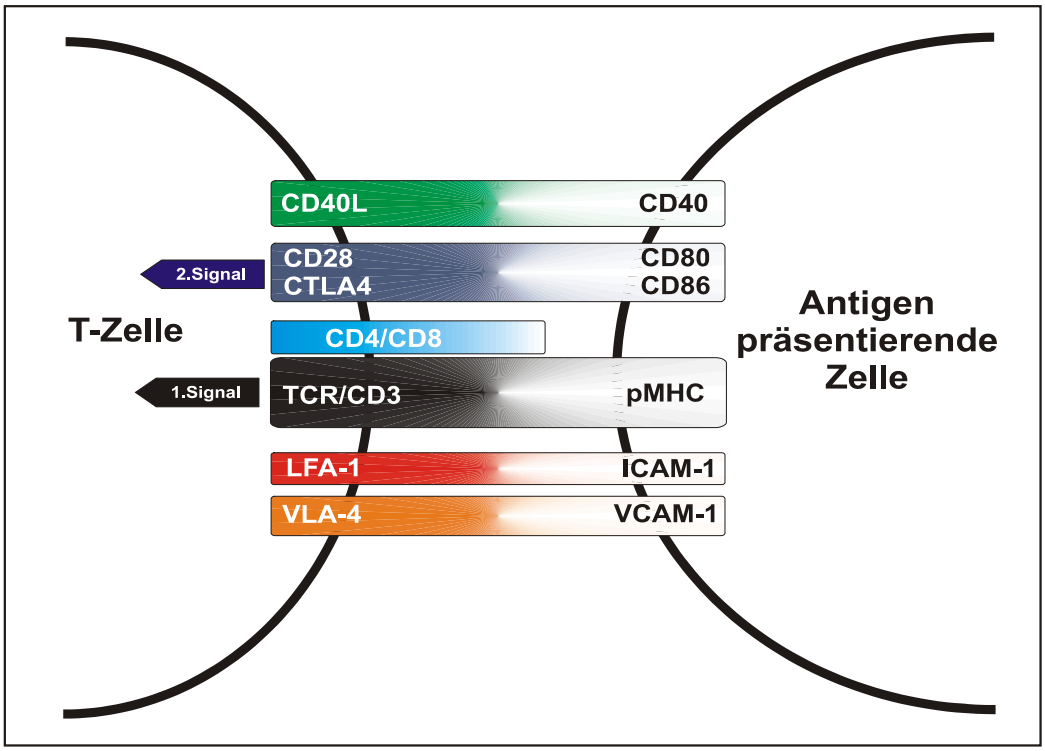

Abbildung 1-4: Rezeptoren und Liganden, die an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind.

Erst bei einer ausreichenden Aktivierung der Zellen erfolgt eine klonale Expansion (Lumsden, 2003), d. h. die aktivierten T-Zellen schütten Cytokine aus und proliferieren. Gleichzeitig differenzieren die naiven T-Zellen und werden so zu Effektorzellen mit verschiedenen Aufgaben. Hier unterscheidet man zwei Effektorpopulationen: $CD4^+$ Helfer T-Zellen oder $CD8^+$ cytotoxische T-Zellen. Auf die Effektorfunktionen dieser beiden Zelltypen wird unter 1.3.4 genauer eingegangen.

1.3.2.2 Antigen-unabhängige Aktivierung

Neben der spezifischen Aktivierung über Antigene lassen sich T-Zellen auch durch andere Mechanismen aktivieren. Im Unterschied zur spezifischen Aktivierung, bei der nur die Zellen aktiviert werden, die ein passendes Antigen

erkennen, werden bei einer polyklonalen Aktivierung eine Vielzahl von Antigen-unspezifischen T-Zellen aktiviert.

Zu den Molekülen, die unspezifisch wirken können, gehören z. B. Superantigene. Diese bakteriellen Proteine koppeln Antigen-unabhängig T-Zellen und APCs und führen zu einer polyklonalen Expansion von T-Zellen. Dadurch wird u. a. ein Cytokincocktail gebildet, der supprimierend auf das Immunsystem wirkt (Janeway, 1997). In der Transplantatabstoßung wirken fremde MHC-Komplexe ebenfalls als unspezifische Aktivatoren von T-Zellen.

Eine weitere Möglichkeit der polyklonalen Stimulation von T-Zellen bilden die so genannten Mitogene. Dabei handelt es sich um Substanzen, die bei Zellen die Zellteilung aktivieren und so zur Expansion der T-Zellen führen.

Schließlich lassen sich T-Zellen noch durch agonistisch wirkende Antikörper aktivieren. So führt z. B. der humane anti-CD3 Antikörper OKT3 zu einer starken polyklonalen Expansion von T-Zellen, wodurch die unterschiedlichen Effektorfunktionen ausgeübt werden (Smith, 1997). In der Maus führt der 145-2c11 Antikörper, der an die ε-Kette des CD3-Komplexes bindet, zu einer Stimulation der T-Zellen (Ferran, 1990). Bei diesen beiden Antikörpern folgt allerdings auf eine starke polyklonale T-Zell-Stimulation, eine Cytokinausschüttung, die im weiteren Verlauf der Reaktion zu einer Anergie und der Depletion von T-Zellen und dadurch zu einer Immunsuppression führt (Smith, 1997).

1.3.3 Effektormechanismen von $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen

Fast alle cytotoxischen Aktivitäten von $CD8^+$ T-Zellen werden durch die Exozytose von Granula oder den Fas Ligand – Fas Rezeptor Signalweg vermittelt. Cytokine wie TNF-α hingegen tragen nur einen kleinen Teil zur cytotoxischen Aktivität von T-Zellen bei.

1.3.3.1 Programmierter Zelltod (Apoptose)

In den folgenden Abschnitten werden die Effektorfunktionen der T-Zellen beschrieben, die auf verschiedenen Wegen zur Einleitung des programmierten Zelltods in den Zielzellen führen. Bei der Apoptose handelt es sich um einen vorprogrammierten Prozess, der für eine gefahrlose Beseitigung von Zellen verantwortlich ist (Ashe, 2003). Die Apoptose tritt sowohl in der Entwicklung, d. h. also unter physiologischen Bedingungen, als auch bei verschiedenen krankhaften Erscheinungen (Thompson, 1995) auf. Die Zelle, die in die Apoptose geht, erhält dabei Signale von Außen oder aus dem Zellinneren, die zur Einleitung spezifischer Signaltransduktionswege führen, die in einem kontrollierten Abbau der Zelle münden. Im Anschluss an den programmierten Zelltod werden die apoptotischen Zellen meist durch professionelle Phagozyten

aufgenommen (Fadok, 1998). Dadurch werden die toten Zellen aus dem Gewebe beseitig, ohne dass umliegende Zellen beschädigt werden. Insgesamt handelt es sich bei der Apoptose um einen nicht-entzündlichen Weg Zellen zu eliminieren, im Gegensatz zur Nekrose, bei der es auch zu einer Schädigung der Gewebeumgebung und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen kommt (Fadok, 1998; Thompson, 1995).

Ein Mechanismus des programmierten Zelltods ist die Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind intrazelluläre Proteine, die an der Initiation, aber v. a. auch an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind. Die Enzyme liegen als Proform vor und werden durch unterschiedliche Signale in ihre aktive Form überführt. Nach ihrer Aktivierung spalten die Caspasen ihre Substrate an definierten Stellen, wodurch die Zielproteine aktiviert oder inaktiviert werden. Zu den Substraten der Caspasen gehören u. a. Proteine, die für die Zellmorphologie verantwortlich sind, aber auch Proteine des Zellzyklus, des DNA Metabolismus und der Signaltransduktion (Nicholson, 1997). Die Spaltung der Substrate führt schließlich zum kontrollierten Abbau der Zielzelle.

Eine weitere wichtige Proteingruppe der Apoptose ist die Familie der Bcl-2 Proteine. Hier unterscheidet man pro- und antiapoptotische Proteine, die im Zellinnern vorliegen (Korsmeyer, 1999; Kroemer, 1997a). Die Mechanismen, über die die Mitglieder der Bcl-2 Familie die Apoptose beeinflussen, sind vielfältig. Der bekannteste Mechanismus ist sicherlich der Einfluss des antiapoptotischen Bcl-2- und des proapoptotischen Bax-Proteins auf die Auslösung der Apoptose über die Mitochondrien einer Zelle (Reed, 1997; Kroemer, 1997b).

Und schließlich kann die Apoptose noch durch Rezeptor-vermittelte Signale ausgeübt werden. Zu den Rezeptoren, die daran beteiligt sind gehören u. a. der Fas Rezeptor und der TNF Rezeptor 1. Diese beiden Mechanismen werden unter 1.3.3.3 und 1.3.3.4 beschrieben.

1.3.3.2 Perforine und Granzyme

$CD8^+$ Effektor-T-Zellen führen ihre Funktionen u. a. durch die Ausschüttung von cytotoxischen Granula aus. Im Gegensatz zu einer anderen cytotoxischen Zellpopulation, den NK-Zellen, werden die Granula der $CD8^+$ T-Zellen erst im Verlauf der Aktivierung hergestellt, so dass eine maximale lytische Aktivität erst nach einem bis drei Tagen erreicht wird (Russell, 2002). Innerhalb des ersten Tages nach der Aktivierung werden die Granula synthetisiert, die verschiedene Granzyme und Perforin enthalten. Nach weiteren Signalen fusionieren die Granula mit der äußeren Zellmembran, wo ihr Inhalt in den engen interzellulären Spalt zwischen Ziel- und Effektorzelle ausgeschüttet wird.

Nach der Freisetzung von Perforin in diesen Spalt, formt dieses ein kanalartiges Multimer in der Gegenwart von Ca^{2+}. Diese Struktur wird in die Membran der

Zielzelle eingeführt. Ob die Granzyme über diesen Kanal eingeschleust werden oder ob diese Proteasen anderweitig von der Zielzelle aufgenommen werden, ist im Moment noch Gegenstand reger Diskussion (Russell, 2002).

Bei Granzym B handelt es sich um eine Serinprotease, die nach der Einschleusung in die Zelle ihre proteolytische Aktivität ausübt. Zu den Zielstrukturen des Granzym B gehören u. a. die Procaspase 3, Bid und ICAD: Moleküle, die in ein proapoptotisches Signal münden und so zum programmierten Zelltod führen (Thomas, 2001; Trapani, 2002).

1.3.3.3 Fas Ligand und Fas Rezeptor Signalweg

Eine weitere Art der Cytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen wird über Membranrezeptoren wie den Fas Liganden vermittelt. Der Fas Ligand (FasL) ist ein Mitglied der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie. Er bindet an den Fas Rezeptor (CD95) und induziert dadurch den kontrollierten Zelltod, die Apoptose. Während CD95 auf einer Vielzahl von Zellen vorkommt, wird der Ligand hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Nagata, 1995). Durch die Ligation des Rezeptors kommt es in der Zelle zur Ausbildung einer Plattform (DISC, „death inducing signaling complex“) von verschiedenen Signalproteine, welche schließlich in der Aktivierung von proteolytischen Enzymen, den Caspasen, münden. Diese Caspasen wiederum spalten bestimmte Substrate der Zellen, die zum aktiven Zelltod beitragen (Nagata, 1997; Cohen, 1997).

1.3.3.4 Cytokine

Zu einem weitaus geringeren Teil führen die von den T-Zellen ausgeschütteten Cytokine zur Lyse von Zellen. Zu nennen sind hier v. a. TNF-α und TNF-β (Lymphotoxin). Die Wirkung dieser Cytokine wird über deren Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt, wobei hauptsächlich TNFR1 zur Auslösung einer Caspaseaktivierung und somit zur Apoptose der Zellen führt (Tartaglia, 1993).

1.3.4 Effektorfunktionen von $CD4^+$ T-Lymphozyten

Neben den $CD8^+$ T-Zellen können aber auch $CD4^+$ T-Zellen zur Lyse von Zellen führen (Ju, 1994; Ramsdell, 1994). Dabei scheinen T_H1 Zellen eine stärkere lytische Aktivität als T_H2 Zellen zu besitzen. Allerdings wird die Cytotoxizität ausschließlich über der FasL ausgeübt. Das Perforin-Granzym System ist nur in $CD8^+$ T-Zellen aktiv. Das lytische Potential der $CD4^+$ Zellen ist bei einer cytotoxischen T-Zell-Antwort eher gering.

Zu den Hauptaufgaben der $CD4^+$ T-Zellen gehört jedoch die aktive Hilfe zur Etablierung einer gezielten Immunantwort. Sie leiten dabei die Effektormechanismen anderer Immunzellen, wie z. B. der B-Zellen und Makrophagen, ein und koordinieren das Zusammenspiel der verschiedenen

Immunzellen. Dies geschieht zum größten Teil über die Ausschüttung von Cytokinen und der Regulation von Oberflächenrezeptoren. Anhand ihres Cytokinprofils unterscheidet man T_H-Zellen in T_H1-Zellen, die zur zellulären Antwort über Makrophagen führen und T_H2 Zellen, die eher eine humorale Antwort durch B-Zellen einleiten (Roitt, 1996; Santana, 2003).

1.4 Antikörper

1.4.1 Struktur von Antikörpern und deren Antigenbindungsstelle

Neben der zellulären Abwehr verfügt das Immunsystem noch über einen weiteren hochspezifischen Abwehrmechanismus, die Antiköper. Antikörper bestehen aus zwei Proteinketten, einer so genannten schweren und leichten Kette. Beide Ketten besitzen je eine variable Domäne V_H bzw. V_L, die die Bindungsstelle für das Antigen bilden. Während die leichte Kette nur eine konstante Domäne C_L besitzt, verfügt die schwere Kette je nach Isotyp über drei bis vier konstante Regionen (C_H1 bis C_H4). Über eine Gelenkregion zwischen der C_H1- und C_H2-Region bilden sich zwischen zwei schweren Ketten Disulfidbrücken, die zu einer Dimerisierung führen. Die schwere und leichte Kette wiederum sind durch Schwefelbrücken zwischen C_L und C_H1 verbunden. Der Y-förmige Aufbau eines IgG Antikörpers mit den jeweiligen Untereinheiten ist in Abbildung 1-5 dargestellt.

Ebenfalls in dieser Abbildung schematisch gezeigt, sind die hypervariablen Bereiche der V-Regionen eines Antikörpers. Die V-Regionen bestehen aus vier Framework Bereichen, die drei hypervariable Bereiche flankieren. Während die Frameworkregionen (FR1-FR4) eine Abfolge von konservierten Aminosäuren sind, finden sich in den hypervariablen Bereichen oder auch „complementarity determining region“ (CDR) starke Unterschiede in den Aminosäuren zwischen verschiedenen Antikörpern (Mian, 1991). Erst durch die dreidimensionale Faltung der Proteine kommt es zu einer Zusammenlagerung der CDR von V_H und V_L, so dass diese Strukturen zusammen die einzigartige, spezifische Bindungsstelle für das Antigen bilden.

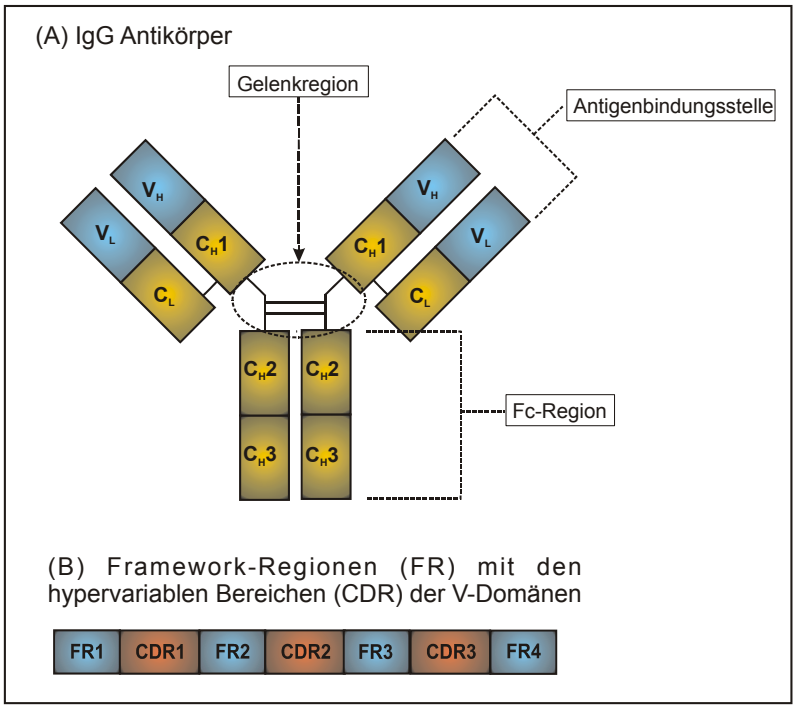

Abbildung 1-5: (A) Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers mit den variablen Domänen der schweren und leichten Kette, sowie den konstanten Regionen. (B) Schematische Abfolge der Frameworkregionen und der hypervariablen Bereiche (CDR) der variablen Domänen.

1.4.2 Antikörperfunktionen

Während die variablen Regionen der Antigenerkennung dienen, werden die Effektorfunktionen von Antikörpern durch die konstante Region ausgeübt. Hier lassen sich vier Funktionen unterscheiden:

1.4.2.1 Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC)

Über die konstante Domäne können Antikörper an Fc-Rezeptoren (FcR) binden. Diese FcR befinden sich auf verschiedenen Effektorzellen des Immunsystems, wie z. B. NK-Zellen und Makrophagen. Im Falle der NK-Zellen führt z. B. die Bindung der Antikörper an die FcR zu einer Aktivierung der Zellen und so zur Ausschüttung von cytotoxischen Granula. Auf diese Weise wird der durch den Antikörper markierte, körperfremde Organismus zerstört.

1.4.2.2 Opsonisierung und erleichterte Phagozytose

Im Falle der Makrophagen/Monozyten wird der fremde Organismus nicht durch Ausschüttung von Granula beseitigt, sondern durch die Phagozytose. Die Antikörper opsonisieren den fremden Organismus durch ihre Bindung und erleichtern damit FcR positiven Phagozyten an den Organismus zu binden und

ihn aufzunehmen. Anschließend wird der Fremdkörper in lytischen Vesikeln der Phagozyten abgebaut.

1.4.2.3 Aktivierung von Komplement (CDC)

In der Fc-Region befindet sich auch eine Bindungsstelle für Komplementfaktoren. Bei diesen Proteinen handelt es sich um kleine, lösliche Serumproteine mit enzymatischen Funktionen. Nach der Bindung bestimmter Komplementfaktoren an Antikörpern, die ihr Antigen gebunden haben, erfolgt eine Kaskade verschiedener enzymatischer Prozesse, wodurch es zur Ablagerung weiterer Komplementfaktoren auf der Oberfläche der fremden Zellen kommt. Dies führt letztendlich ebenfalls zur Lyse der Zielzelle.

1.4.2.4 Neutralisation von Toxinen

Eine letzte Funktion von Antikörpern ist die Neutralisation von bakteriellen Toxinen. Durch die Bindung der Antikörper an die Proteinstruktur der Toxine können diese z. B. nicht mehr in die Zelle gelangen, um dort ihre toxische Wirkung auszuüben. Gleichzeitig werden die Proteine markiert und von Phagozyten aufgenommen und abgebaut.

1.4.3 Therapeutische Verwendung von monoklonalen Antikörpern

1975 entwickelten Köhler und Milstein eine Technologie mit deren Hilfe monoklonale Antikörper hergestellt werden konnten: die Hybridomtechnologie (Kohler, 1975). Diese Maushybridomzellen waren die erste zuverlässige Quelle aus der eine Vielzahl an monoklonalen Antikörper für therapeutische Zwecke hervorging (Hudson, 2003). Seit dieser Zeit wurde die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern für den *in vivo* Einsatz stetig verbessert und so unerwünschte Wirkungen minimiert. Monoklonale Antikörper (mAbs) vereinen dabei eine einzigartige Spezifität mit einer hochaffinen, bivalenten Bindung eines Antigens und verschiedenen Effektorfunktionen.

So können mAbs als Blockade von löslichen Proteinen und Rezeptoren eingesetzt werden. In der Behandlung der rheumatoiden Arthritis wird z. B. ein blockierender TNF-α Antikörper (Infliximab) mit großem Erfolg eingesetzt (Paleolog, 2003; Braun, 2003). Auch in der Transplantatabstoßung wird ein monoklonaler Antikörper in der Behandlung eingesetzt. Daclizumab und Basiliximab sind beides humane IgG Antikörper die an die α-Untereinheit des humanen IL-2 Rezeptors binden und durch die Blockade des Rezeptors die Allograft Abstoßung beeinflussen (Waldmann, 1998). Der murine monoklonale Antikörper Muromab (OKT3) wird u. a. bei akuter renaler, hepatischer und kardiologischer Abstoßungsreaktion eingesetzt (Sgro, 1995). Desweiteren gibt

es monoklonale Antikörper die zur antiviralen Prophylaxe verwendet werden oder als anti-thrombotische Reagenzien eingesetzt werden (Glennie, 2000).

Über ihren Fc-Teil können monoklonale Antikörper neben den rein blockierenden Funktionen, zusätzlich noch andere Effektorfunktionen ausführen. Insbesondere in der Krebstherapie wird die Aktivierung von Effektorzellen wie NK-Zellen und Monozyten durch Antikörper ausgenützt. Hier können die Tumorzellen über spezifische Oberflächenmarker für das Immunsystem markiert und über verschieden Effektormechanismen vernichtet werden (Carter, 2001a). So kommt es neben der Aktivierung von T-Zellen und der Auschüttung von Cytokinen zu Antikörper-abhängigen Cytoxizität (ADCC) durch FcR^+ Zellen wie NK-Zellen und Monozyten. Auch die Komplement-abhängige Cytoxizität (CDC) spielt in der Elimination von Tumorzellen eine Rolle (Glennie, 2000), (Carter, 2001a).

Allerdings treten bei mAbs auch einige unerwünschte Nebenwirkungen auf. So führt die Fc-Bindung häufig zu einer sehr breiten Aktivierung von Effektorzellen und der Ausschüttung von verschiedenen Cytokinen, die zu toxischen Reaktionen führen können. Die Funktion des humanen anti-CD3 Antikörpers OKT3 bei der Transplantatabstoßung geht mit starken Nebenwirkungen einher. So können neben einer Überaktivierung des Immunsystem durch eine systemische Cytokinproduktion, auch neurologische Komplikationen sowie eine gestörte Coagulation auftreten (Sgro, 1995).

Ebenso ist die Immunogenität von Spezies fremden Antikörpern wie z. B. Maus ein Problem, so dass *in vivo* häufig neutralisierende Antikörper gegen das therapeutische Protein produziert werden. Diese bezeichnet man häufig als HAMA, humane anti-Maus Antikörper. Deswegen wurden mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden die Herstellung von therapeutischen Antikörper weiterentwickelt. Ein ersten Schritt ist dabei die Humanisierung von Mausantikörpern gewesen. Dabei wird die murine konstante Domäne des Antikörpers durch eine humane konstante Domäne ausgetauscht. Lediglich die CDR Bereiche des Antikörpers, also dessen Bindungsstellen bleiben erhalten. Dadurch wird gewährleistet, dass die Bindungaffinität des Antikörpers weiterhin vorhanden ist. Das chimäre Protein wird im Menschen jedoch nicht weiter als fremd erkannt und ist deswegen weniger immunogen. Seit kurzer Zeit ist auch die Herstellung von vollständig humanen monoklonalen Antikörpern möglich. Hierzu wird die Phage Display Technologie oder transgene Mäuse verwendet. Die Herstellung und Verwendung von monoklonalen Antikörpern in klinischen Versuchen wird in der Arbeit von Glennie zusammengefasst (Glennie, 2000).

Und schließlich sind die pharmakokinetischen Eigenschaften therapeutischer Proteine von großer Bedeutung. Während die Halbwertszeit der Antikörper sehr hoch ist, ist die Größe der Proteine von ~150 kDa in manchen Geweben nachteilig für die Verteilung (Colcher, 1998; Carter, 2001a). Außerdem verfügen

die monoklonalen Antikörper zwar über zwei Bindungsstellen, aber nur für ein bestimmtes Antigen.

1.4.4 Bispezifische Antikörperkonstrukte

Im Laufe der letzten Jahre wurden deswegen verschiedene chemische und molekularbiologische Methoden entwickelt, um bispezifische Antikörperkonstrukte herzustellen (Carter, 2001b; Todorovska, 2001; van Spriel, 2000). Bispezifiche Antikörper vereinen zwei Bindungsspezifitäten für unterschiedliche Antigene mit der Möglichkeit zwei Zellen – eine Zielzelle mit einer Effektorzelle – zu verbinden. Je nach Aufbau der Konstrukte können unerwünschte Nebeneffekte wie Komplementaktivierung und Immunogenität minimiert werden (Hudson, 2003). Dabei variiert v. a. die Anzahl der Bindungsstellen und die Größe der Proteine, was unterschiedliche Affinitäten zu den Antigenen hervorruft und auch die Gewebeverteilung stark beeinflusst (Colcher, 1998). Verschiedene rekombinante Antikörperkonstrukte sind in der Abbildung 1-6 gezeigt.

Die kleinste mögliche Bindungseinheit eines Antikörpers ist das variable Fragment (Fv), bestehend aus der variablen Region der schweren und der leichten Kette. Durch das Einfügen eines Peptidlinkers zwischen dem C-Terminus von V_L und dem N-Terminus vom V_H entsteht ein single-chain Fragment (scFv). Zwei scFv können durch einen weiteren Peptidlinker zu einem bispezifischen single-chain Antikörper (bsAb) fusioniert werden (s. a. Abbildung 1-7).

Dies ist das kleinste derzeit mögliche Format von bispezifischen Antikörpern und wird auch als Miniantikörper, Diabodies oder scFv-BsAb bezeichnet. Für die Verwendung derartiger Konstrukte spricht v. a. ihre minimale Größe, wodurch eine optimale Gewebepenetration gewährleistet ist. Insbesondere bei der Behandlung von festen Tumoren spielt die Gewebepenetration eine entscheidende Rolle (Goel, 2001; Nielsen, 2000; Adams, 2001; Tahtis, 2001; Colcher, 1998). In der Abbildung 1-7 sind die bispezifischen Konstrukte, die in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, schematisch dargestellt.

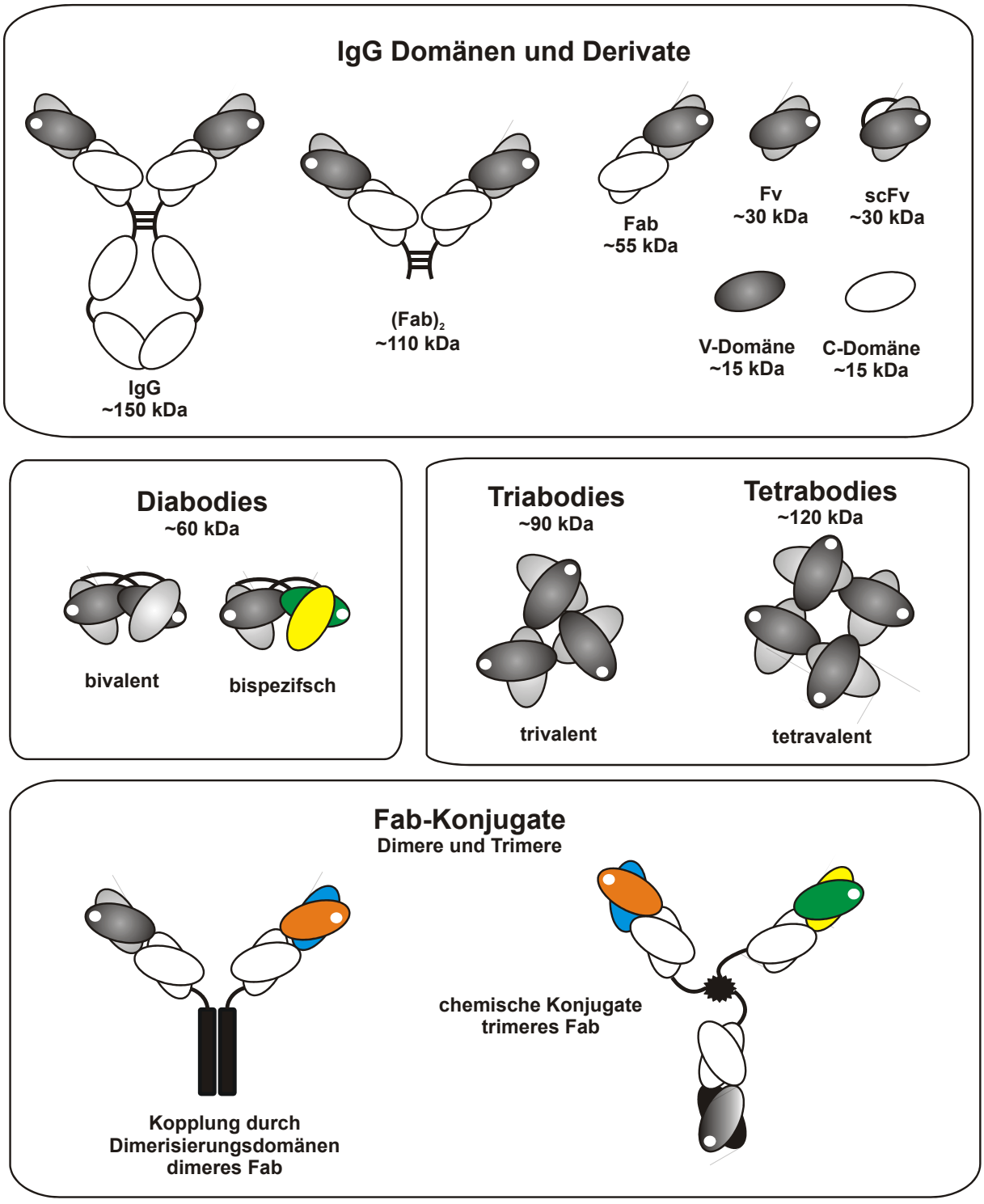

Abbildung 1-6: Schematische Darstellung verschiedener rekombinanter Antikörperkonstrukte mit den variablen Domänen (gefüllte Ellipsen) und den konstanten Regionen (weiße Ellipsen). Die verschiedenen Bindungsstellen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die schwarzen Linien stellen Peptidlinker dar. Der weiße Punkt in der jeweiligen Domänen kennzeichnet die Antigenbindungsstelle (modifiziert nach (Hudson, 2003)).

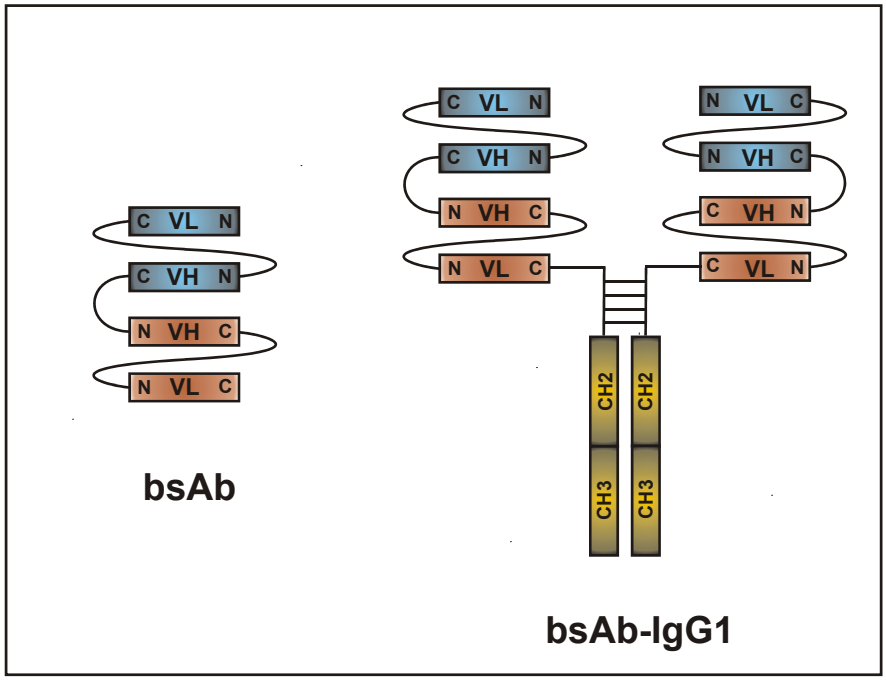

Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der bispezifischen Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden.

1.4.5 Funktionsweise von bispezifischen Antikörpern

Ziel solcher bispezifischer Konstrukte ist die Rekrutierung von Effektorzellen zur Elimination unerwünschter Zellen. In der Krebstherapie werden Immunzellen zur Depletion von Tumorzellen angeregt. Dabei dient die eine Spezifität des Antikörpers lediglich zur Markierung der Zielzellen, während die zweite Bindungsstelle die Effektorzelle rekrutiert und aktiviert, um so die Mechanismen zur Ausschaltung der Zielzelle in Gang zu setzen.

Die möglichen Effektorzellen variieren dabei ebenso wie die Rezeptoren zur Aktivierung der Zellen. So wurden neben T-Zellen, v. a. NK-Zellen und Monozyten als Effektorzellen rekrutiert. Als Rezeptoren dienen dabei häufig der CD3-Rezeptor und Fc-Rezeptoren (van Spriel, 2000). Zur Markierung der Zielzelle jedoch werden einzigartige Oberflächenmarker ausgewählt, die nur von diesen Zellen exprimiert werden. Dadurch ist eine hochspezifische und streng gerichtete, zelluläre Immunantwort gegen die Ziele möglich. (Mack, 1997; De Jonge, 1998; Cohen, 2003). In der Abbildung 1-8 ist die Funktionsweise eines bispezifischen Konstruktes dargestellt.

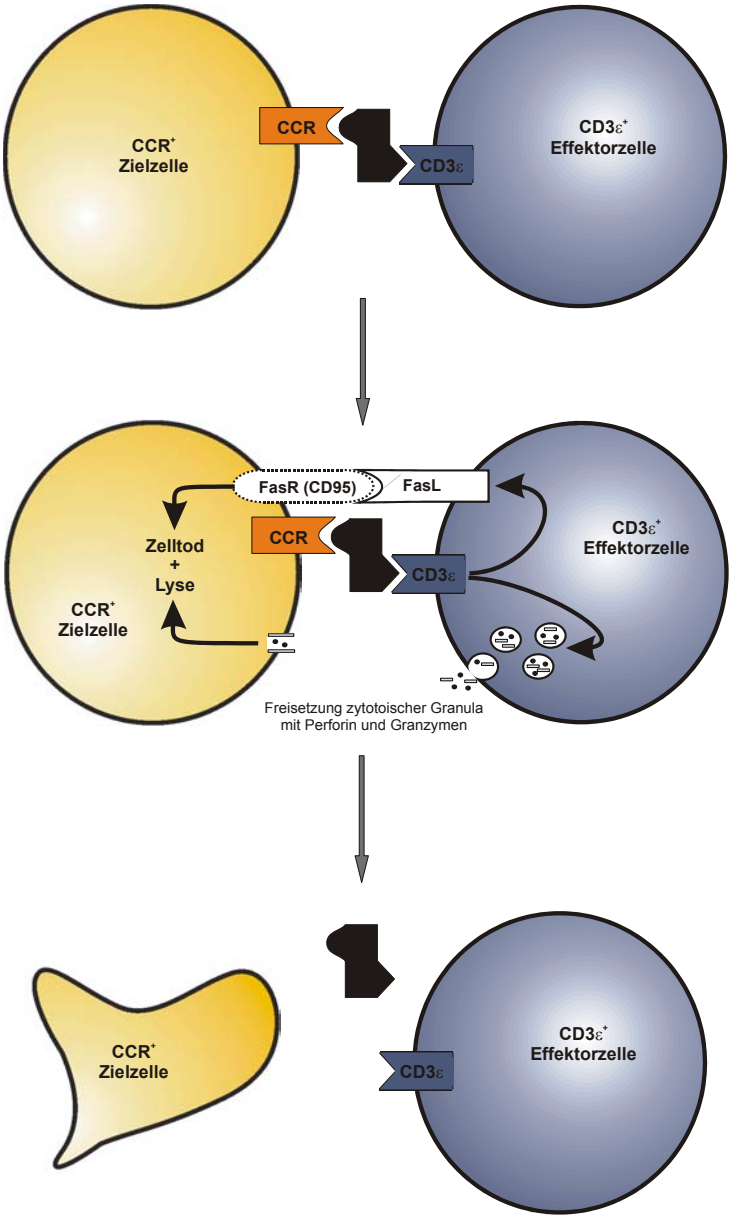

Abbildung 1-8: Funktionsweise bispezifischer Proteinkonstrukte zur Depletion von Zielzellen. Dargestellt sind die Ziel- und Effektorzellen, die als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienen.

Durch die Kopplung der Effektorzelle an die Zielzelle kommt es zur Aktivierung der Effektorzelle über den entsprechenden Rezeptor. Im Falle einer T-Zelle wird der CD3-Komplex verwendet. Die Aktivierung der T-Zellen führt u. a. zur Expression des CD25-Rezeptors, aber v. a. zur Hochregulation des FasL auf der Effektorzelle. Gleichzeitig wird die Produktion von cytotoxischen Granula angeregt, deren Inhalt anschließend in den engen interzellulären Spalt ausgeschüttet wird. Die Freisetzung der Granula, sowie die Aktivierung des Fas-Rezeptors führen letztendlich zur Lyse der Zielzelle. Die Effektorzelle lebt weiter und der bispezifische Antikörper wird frei, um weitere Zellen aneinander

zu koppeln. Dieses Prinzip wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen angewendet. So konnte für einen humanen bispezifischen single-chain Antikörper gegen CCR5 und CD3 gezeigt werden, dass CCR5 positive Zellen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis lysiert werden (Bruhl, 2001a).

2 Zielsetzung der Arbeit

Bis heute ist die Depletion von Zielzellen durch Kopplung über bispezifische Antikörperkonstrukte an cytotoxischen Zellen hauptsächlich in der Onkologie verwendet worden. Vorraussetzung für eine solche Depletion ist jedoch nur die spezifische Expression von Oberflächenmolekülen auf den „unerwünschten" Zielzellen, um diese von „gesunden" Zellen zu unterscheiden.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, murine, bispezifische Antikörperkonstrukte zur Depletion von CCR2 bzw. CCR5 positiven Zellen herzustellen. Diese beiden Rezeptoren werden in verschiedenen Tiermodellen verstärkt auf infiltrierenden Zellen exprimiert, die zur Schädigung des Gewebes beitragen. Eine Depletion dieser autoreaktiven Zellen könnte somit entscheidend in den Krankheitsverlauf von entzündlichen Erkrankungen eingreifen.

Für die Kopplung von $CD3^+$ T-Zellen an $CCR2/CCR5^+$ Zielzellen sollten aus den monoklonalen Antikörpern MC21, MC68, MC69 und 145-2c11 bispezifische Antikörperkonstrukte hergestellt werden. MC21 bindet dabei an murines CCR2, MC68 und MC69 binden an murines CCR5. 145-2c11 ist ein Antikörper gegen die ε-Kette des Maus-CD3-Komplexes, der zur Aktivierung von T-Zellen führt.

Zunächst sollten von den Antikörpern gegen die Chemokinrezeptoren (MC21, MC68, MC69) die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette kloniert werden. Im Anschluss an die Verifizierung der klonierten Sequenzen sollten die V-Regionen zu single-chain Fragmenten (scFv) fusioniert und diese in E. coli exprimiert werden, um deren Bindungseigenschaften zu überprüfen. Danach sollten aus den scFv der CCR-Antikörper bispezifische single-chain Antikörpern (bsAb) in Kombination mit dem scFv des 145-2c11 hergestellt werden.

Nach weiteren Bindungsanalysen und der Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der Konstrukte wurden diese mittels des eingebauten Histidin-Tags aufgereinigt. Mit Hilfe der gereinigten Konstrukte wurden die Lyseeigenschaften der bsAb zuerst *in vitro* ermittelt, um anschließend Depletionsversuche *in vi*vo auszuführen.

Um für *in vivo* Behandlungen von verschiedenen Mausmodellen von Autoimmunerkrankungen bessere pharmakokinetische Eigenschaften der hergestellten murinen bsAb zu schaffen, sollten die bsAb durch die Gelenkregion, sowie die C_H2- und C_H3-Domäne eines Maus IgG1 modifiziert werden.

Diese bsAb-IgG1 Konstrukte sollten ebenfalls über einen Histidin-Tag aufgereinigt und auf ihre *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften (Bindung, Aktivierung und Lyse) untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose Ultra Pure	Gibco BRL Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, Low Melting Sea Plaque GTG	BioWitthaker Molecular Application, Rockland, ME USA
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
ABTS Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
BSA	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
DMSO	Sigma, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethanol (100 % p. A.)	Merck, Hamburg
2-Propanol (100 % p. A.)	Merck, Hamburg
FCS	Gibco BRL Invitrogen, Karlsruhe
IPTG	Biomol, Hamburg
X-gal	Biomol, Hamburg
Proteinstandard	Sigma, München
1 Kb DNA-Leiter	Gibco BRL Invitrogen, Karlsruhe
Methotrexat (MTX)	Sigma, München
Aqua-Phenol	Roth, Karlsruhe
TE-Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	PAA Laboratories, Wien
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Wien
Tween 20	Fluka, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Wien

Saponin	Sigma, München
Hexanukleotide	Roche Diagnostics, Mannheim
Ni-NTA	Qiagen, Hilden
Imidazol	Boehringer Mannheim, Mannheim
Propidium Iodid	Sigma, München
Carboxy fluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Kollagenase	Sigma, München
HBSS	Gibco BRL Invitrogen, Karlsruhe
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
α^{32}-dATP	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
DEPC	Fluka, Taufkirchen
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Dormitor	Pfizer, Karlsruhe
Dormicum V	Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen
Anexate 0,5	Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen
Naloxon 0,4 mg	Curamed, Karlsruhe
Antisedan	Pfizer, Karlsruhe
Fentanyl	Curamed, Karlsruhe

3.2 Enzyme und Reagenzien-Kits

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs Deutschland und Boehringer Mannheim Deutschland bezogen. Die optimalen Reaktionspuffer waren im Lieferumfang enthalten. Die PFU-Polymerase stammte von Stratagene, die Taq-Polymerase von Applied Biosystems, Darmstadt. Der pCR-Skript-Amp Cloning Kit war von Stratagene, Amsterdam, Niederlande.

Die Plasmidpräparationskits (HiSpeed Plasmid Maxi Kit und Endo-free Plasmid Maxi Kit), sowie der Kit für die Isolation der mRNA (Oligotex mRNA Kit) stammten von Qiagen Deutschland, der Kit zur Herstellung der cDNA-Bank (Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Cloning) wurde von GibcoBRL Invitrogen hergestellt.

3.3 Oligonukleotidprimer

Alle Oligonukleotidprimer wurde von GibcoBRL Invitrogen synthetisiert. Die Primer zur Amplifikation der variablen Antikörperdomänen sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. In Tabelle 4-3 sind die Primer für die Herstellung der single-chain Fragmente beschrieben. Des Weiteren wurden für die verschiedenen Subklonierungen und Sequenzierungen der Plasmide folgende Oligonukleotidprimer verwendet.

Tabelle 3-1: Oligonukleotidprimer für Subklonierungen und Sequenzierungen.

Primername	Primersequenz	Verwendung
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	pCR-Skript-Vektor Kolonie-PCR, Sequenzierung
T7	GTAATACGACTCACTCTAGGGC	pCR-Skript-Vektor Kolonie-PCR, Sequenzierung
pEF-Pro	GACCTTGGTTCATTCTCAAGCC	pEF-DHFR-Vektor Kolonie-PCR, Sequenzierung
pEF-Rev	ATACCGGAGTACTAGCCGCC	pEF-DHFR-Vektor Kolonie-PCR, Sequenzierung
5´-Fsp1-2c11	AAATGCGCAGGCCGAGGTCAAGC TGGTGGGAGT	Klonierung scFv in OmpA-Vektor
5´-MC69-VL-Fsp1	AAATGCGCAGGCCGACATTGTGAT GACCCAATCTC	Klonierung scFv in OmpA-Vektor
5´-MC68-VL-Fsp1	AAATGCGCAGGCCGACGTCGTGA TGACC	Klonierung scFv in OmpA-Vektor
5´-MC21-VL-Fsp1	AAATGCGCAGGCCGACATCGTGA TGACCCAATCT	Klonierung scFv in OmpA-Vektor
3´-Sal1-His6	GCCGTCGACTTAGTGATGGGTGA TGGTGATG	Klonierung scFv in OmpA-Vektor
M13/pUC-Reverse	AGCGGATAACAATTTCACACAGG	pSPORT1-Primer
M13/pUC-Forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	pSPORT1-Primer
5´-pUC-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	OmpA Kolonie-PCR

Primername	Primersequenz	Verwendung
3´-FvLE	CGCAGTAGCGGTAAACGG	OmpA Kolonie-PCR
5´-BamH1-Hinge-Mut	ATAAGGGATCCTGTGGTTGTAAGC CTTGTATATGTACAGTCCCAGAAT GGCAATCTGTCTTCATCTTCCCC	Mutation der Fc-Bindungsstelle des IgG1
5´-BamH1-Hinge	CGGGATCCGTGCCCAGGGATTGT GGTTGTAAGCCTTGTATATGTACA GTC	Amplifikation IgG1
3´-Sal1-CH3	TTGCGGTCGACTTATTTACCAGGA GAGTGGGAGAG	Amplifikation IgG1
3´-IgG1-His6-Sal1	CCTGTCGACTTAGTGATGGTGATG GTGATGTTTACCAGGAGAGTGGG AGAG	Einführung des His-Tags in IgG1

3.4 Antikörper und Enzym-Konjugate

Für die FACS-Analyse der vorliegenden Arbeit wurden die in der Tabelle 3-2 und Tabelle 4-7 aufgeführten Antikörper verwendet.

Tabelle 3-2: Verwendete mono- und polyklonale Antikörper.

Antikörperklon	Antigen	Hersteller	Verdünnung
CD11b-FITC	CD11b	Pharmingen, Heidelberg	1:50
CD19-PE	CD19	Pharmingen, Heidelberg	1:75
CD25-PE	CD25	Pharmingen, Heidelberg	1:50
CD4-APC	CD4	Pharmingen, Heidelberg	1:100
CD8-Tricolor	CD8	Pharmingen, Heidelberg	1:100
GR1-APC	GR1	Pharmingen, Heidelberg	1:1000
13/45/31	His-Tag	Dianova, Hamburg	1:50
R0439	Maus-IgG	Dako, Hamburg	1:50
MC21	Maus CCR2	Dr. M. Mack	5 µg/ml
MC68	Maus CCR5	Dr. M. Mack	5 µg/ml
Ratten IgG2b	-	Pharmigen, Heidelberg	5 µg/ml

Antikörperklon	Antigen	Hersteller	Verdünnung
IgG1	-	Sigma, München	1 µg/ml
E0468-Biotin	Ratten IgG	Dako, Hamburg	1:250
CD45-FITC	CD45	Pharmigen, Heidelberg	1:50
HRP260	Maus IgG	Dako, Hamburg	1:100
Anti Maus IgG	Maus IgG (H+L)	Jackson, Bar Harbor, ME, USA	1:100

Zur Anfärbung von Biotin-markierten Antikörpern wurde entweder Streptavidin-RPE (R0438, Dako) oder Streptavidin–Cy5.5 verwendet (C0050, Dako). Die murinen Chemokine MIP-1α und JE/MCP-1 zur Downmodulation stammten von Peprotech.

3.5 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit dem E. coli Stamm JM 83 gearbeitet, der von Dr. M. Mack zur Verfügung gestellt wurde.

3.6 Eukaryontische Zellen

Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien, sowie die verwendeten Zelllinien sind unter 4.5 beschrieben.

Zur T-Zellisolation wurden der pan T-Zell Kit und die $CD90^+$ MicroBeads der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Je nach Zellzahl wurden MS- bzw. LS-Säulen in Kombination mit den passenden Magneten benutzt.

3.7 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium	1 % Pepton
	0,5 % Hefeextrakt
	0,5 % NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar

SOC-Medium	2 % Bacto Trypton
	0,5 %Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM $MgSO_4$
	10 mM $MgCl_2$
	20 mM Glukose

Den Medien wurde im Falle einer Selektion noch Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

3.8 Lösungen und Puffer

50 fach TAE	40 mM Trisacetat
	1 mM EDTA
	in H_2O
10 % Polyacrylamidgel	10 % Acrylamid
	375 mM Tris pH 8,8
	0,1 % SDS
	0,05 % APS
	1,5 % TEMED
	in H_2O
12 % Polyacrylamidgel	12,5 % Acrylamid
	375 mM Tris pH 8,8
	0,1 % SDS
	0,05 % APS
	1,5 % TEMED
	in H_2O

Sammelgel	4 % Acrylamid
	125 mM Tris pH 6,8
	0,1 % SDS
	0,05 % APS
	1 % TEMED
	in H_2O
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS
	200 mM Glycin
	0,1 % SDS
	in H_2O
Paris-Puffer	20 mM TRIS
	125 mM NaCl
	10 mM KCl
	10 mM Na-Acetat
	5 mM Glukose
	pH 7,4
10 fach HBSS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	50 mM KCl
	3 mM KH_2PO_4
	1,5 M NaCl
	40 mM Na_2HPO_4
Solution D	4 M Guanidinthiocyanat
	25 mM Na-Citrat
	0,5 % Sarcosyl
	0,1 M β-Mercaptoethanol
DNA-Auftragspuffer	25 % Ficoll 400
	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanol
Proteinauftragspuffer reduzierend	Nicht-reduzierender Auftragspuffer mit 10 % β-Mercaptoethanol

Proteinauftragspuffer	125 mM Tris pH 6,8
nicht-reduzierend	2 % SDS
	10 %Glycerin
	0,25 % Bromphenolblau
Coomassie Färbelösung	1,5 mM Coomassie
	50 % Methanol
	10 % Essigsäure
	50 % H_2O
Sonication Puffer	300 mM NaCl
	25 mM Na_2HPO_4
	25 mM NaH_2PO_4
	pH 8,0
FPLC-Puffer A	300 mM NaCl
	20 mM Na_2HPO_4
	pH 7,5
FPLC-Puffer B	300 mM NaCl
	20 mM Na_2HPO_4
	pH 3,3

3.9 Geräte

Megafuge 1,0 R	Hereaus, Hanau
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
ÄKTA FPLC	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Gene Pulser und Capitance Extender	BioRad, München
E. coli Pulser	BioRad, München

3.10 Sonstiges

ELISA Platten Nunc MaxiSorp	Nalgene Nunc International, Wiesbaden
Suspensionskulturplatten 96 well Rundboden (Lyseassay)	Greiner Bio One, München
96 well Microplatten Rundboden (FACS)	Greiner Bio One, München
Kapillaren zur Blutabnahme	K+K Laborbedarf
Triple Flask Zellkulturflaschen	Nalgene Nunc International, Wiesbaden

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.1.1 RNA-Isolation aus Hybridomzellen

Alle Puffer für die Isolation von Gesamt-RNA – außer aminhaltige - wurden mit DEPC-Wasser hergestellt, um ubiquitär vorhandene RNAsen zu inaktivieren. Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden zuerst die semi-adhärenten Hybridomzellen (MC21, MC68 und MC69) geerntet (s. a. 4.5.1). Die Zellen wurden drei Mal mit sterilem PBS gewaschen und bei 1000 U/min zentrifugiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Solution D. Dazu wurde das Pellet solange mit Solution D versetzt, bis sich die Suspension gut pipettieren ließ. Es folgte die Zugabe von 1/10 des Volumens 2 M Natriumacetat pH 4,0 und einem Teil Aqua-Phenol. Zuletzt wurde 2/10 des Gesamtvolumens Chloroform beigemischt und mindestens 30 sec stark gemischt, bis eine weiße Emulsion entstand. Diese wurde sofort für 15 min auf Eis gestellt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 4 min bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein steriles 2 ml Eppendorf-Cup überführt und mit gleichem Volumen 2-Propanol gefällt (s. a. 4.1.7). Es folgte eine weitere Lyse mit Solution D und eine Fällung der RNA mit 2-Propanol. Das RNA-Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 100 µl DEPC-Wasser gelöst.

4.1.2 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte enzymatisch durch reverse Transkription mit Superscript II. Dabei wurde die präparierte Gesamt-RNA in komplementäre DNA, so genannte cDNA umgeschrieben. Als Primer wurden Hexanukleotide verwendet. Diese Art des „priming“ führt zu einem zufälligen Umschreiben von RNA, im Gegensatz zum spezifischen Primen mit Oligonukleotiden, die an bestimmte Sequenzen der RNA binden. Die cDNA-Synthese teilte sich in zwei Schritte auf. Zunächst erfolgte das Aufschmelzen von 5 µg Gesamt-RNA in Einzelstrang-RNA für 10 min bei 70°C, gefolgt von einer kurzen Inkubation auf Eis, bei der die eingesetzten Hexanukleotide an die Einzelstrang-RNA banden. Die reverse Transkritption fand für 1 h bei 37°C, dem Temperaturoptimum der Superscript-Transkriptase, statt. Vorher wurden die nötigen Reagenzien zur Transkription zugegeben: 1/5 des mitgelieferten 5-fach Synthese-Puffers, 0,1 M DTT, 1/20 einer 25 mM Desoxynukleotid-Lösung (dNTP).

4.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Um Nukleinsäuren von Proteinen und anderen organischen Substanzen zu isolieren, wurde die Phenolextraktion angewandt. Dabei wurden die Verunreinigungen durch Phenol und ein Phenol/Chloroform-Gemisch von der wässrigen Nukleinsäurelösung getrennt. Die wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde abpipettiert und gefällt (s. a. 4.1.7). Dadurch konnte eine größere Reinheit der Nukleinsäuren erreicht werden.

4.1.4 Erstellung einer cDNA-Bank

Zur Isolation der schweren Kette der variablen Domäne von MC68 wurde eine cDNA-Bank aus den Hybridomzellen hergestellt. Dazu wurde das „Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning“ der Firma GibcoBRL verwendet. Zur Herstellung der cDNA-Bank wurde das mitgelieferte Herstellerprotokoll verwendet. Der Ablauf des Protokolls wird hier nur kurz wiedergegeben. Der Funktionsweise des Kits ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

Zunächst wurde aus den Hybridomzellen RNA gewonnen. In einem anschließenden Schritt wurde mit Hilfe des Qiagen mRNA-Kits aus der Gesamt-RNA die mRNA isoliert. Diese mRNA wurde zunächst zur Synthese des ersten cDNA-Strangs verwendet. Als Primer wurde der mitgelieferte Not1-Primer-Adaptor verwendet. Dabei handelt es sich um die Poly-A Sequenz der mRNA gefolgt von einer Nukleinsäuresequenz mit verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, u. a. Not1. Für die spätere Aufreinigung der cDNA über eine Größenausschlußchromatographie wurde die Erststrangsynthese mit radioaktiven α-^{32}P-dATP versehen. Im Anschluss an die Erststrangsynthese wurde der zweite Strang der cDNA hergestellt und beide Stränge mittels T4 DNA Ligase verbunden. An die doppelsträngige cDNA wurde an beide Enden eine vorgeschnittene Sal1-Sequenz angefügt. Danach erfolgte ein Verdau der cDNA mit NotI. Somit entstanden cDNA-Fragmente mit asymmetrischen Enden, einem 5´-Sal1-Ende und einem 3´-Not1-Ende. Da bei der Erststrangsynthese auch sehr kleine, unvollständige Nukleinsäure-sequenzen entstanden, wurde die so hergestellte doppelsträngige cDNA noch durch eine Säulenchromatographie fraktioniert. Die Säule für diesen Vorgang war im Lieferumfang enthalten. Zusätzlich wurden durch die Fraktionierung noch vorhandene Sal1-Adaptoren und die abgeschnittenen Not1-Fragmente von der erwünschten cDNA getrennt. Durch die verwendete Radioaktivität konnten die größeren cDNA-Fragmente detektiert werden, dabei galt je höher die Radioaktivität, desto größer das Fragment. Anschließend wurden die ersten beiden Fraktionen mit ausreichender cDNA Größe und Menge gepoolt und zur Ligation in den mitgelieferten Vektor verwendet. Die so entstandene cDNA-Bank im pSPORT1-Vektor wurde in E. coli JM83 transformiert und die

entstandenen Klone mittels Kolonie-PCR auf ihre enthaltene cDNA hin untersucht (s. a. 5.1.2).

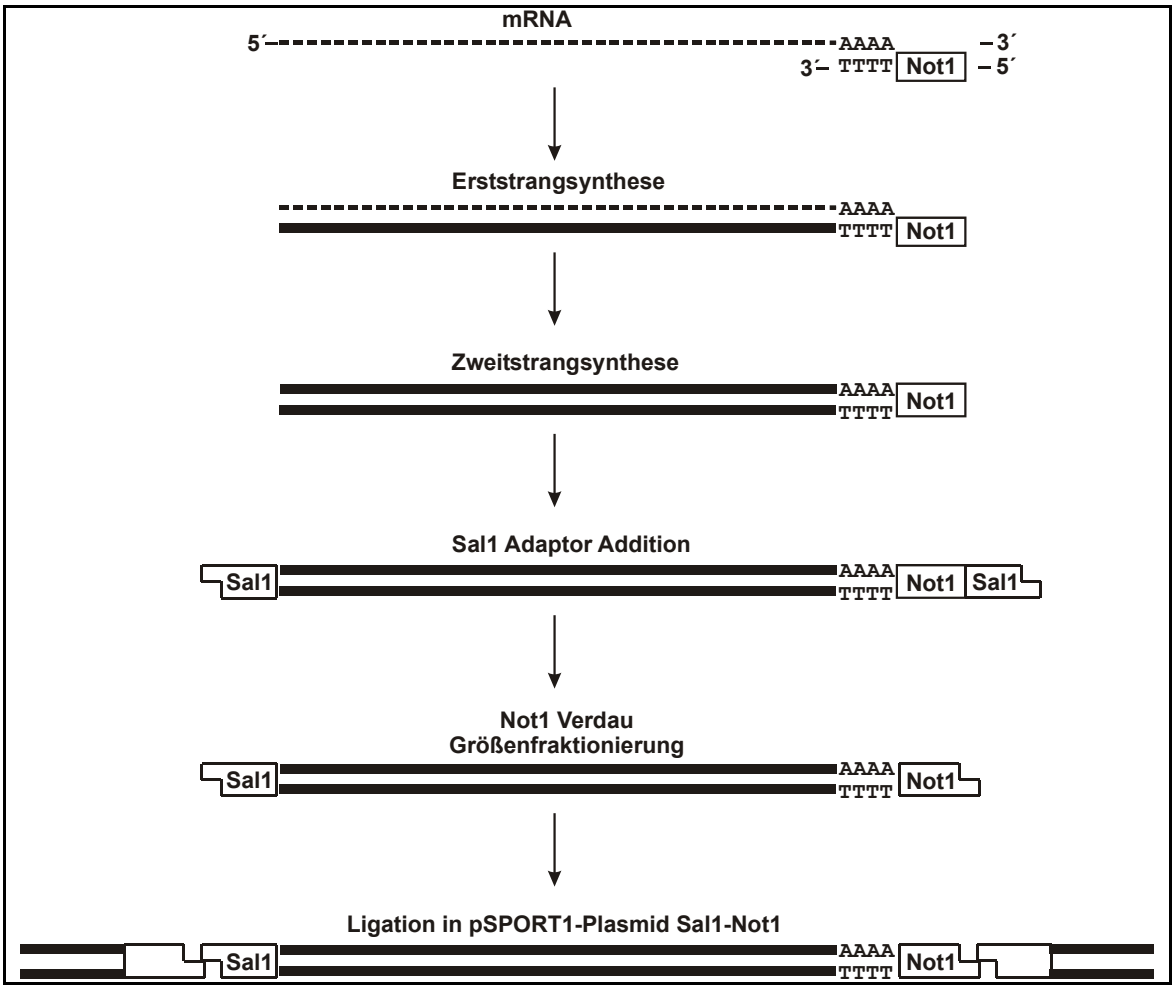

Abbildung 4-1: Schematische Darstellung zur Herstellung einer cDNA-Bank mit dem „Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning“.

4.1.5 Trennung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren wurden nach ihrem Molekulargewicht durch Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt. Die Wahl der Gelkonzentration entsprach der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren. Eine hohe Agarosekonzentration ermöglichte dabei die Auftrennung kleiner DNA-Fragmente. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,8 bis 2 %-ige Agarosegele für Fragmente zwischen 300 und 6000 Basenpaaren verwendet. Je nach weiterer Verwendung der DNA-Fragmente wurde entweder normale Agarose oder Low-Melting-Agarose verwendet, um die aufgetrennten DNA-Fragmente aus dem Gel zurückgewinnen zu können (s. a. 4.1.6). Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle geschmolzen. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde

anschließend 0,1 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen und zum Aushärten bei 4°C gelagert. Die Elektrophorese erfolgte nach Auftragung der Proben und einer 1 kb-dsDNA-Leiter als Standard, bei 80 bis 140 V, je nach verwendeter Agarose. Mit Hilfe des Ethidiumbromids, das in Nukleinsäuren interkaliert, konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis der Auftrennung wurde mit einer Sofortbildkamera festgehalten.

4.1.6 Isolation von DNA-Proben aus Agarosegelen

Mit Hilfe von Low-Melting-Agarose konnten DNA-Fragmente nach der Elektrophorese aus dem Gel zurückgewonnen und zum Klonieren weiter verwendet werden. Diese Agarose besitzt einen Schmelzpunkt bei 65°C. Beim Aufschmelzen der Agarose bei dieser Temperatur kommt es nicht zu einer Denaturierung der Proben. Die benötigte DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Das Gewicht der ausgeschnitten Bande wurde bestimmt und auf ein Volumen von 300 bis 500 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Das Gemisch wurde noch mit 1/10 des Gesamtvolumens 3 M Natriumacetat pH 9,0 versetzt und für 10 min bei 65°C im Thermoblock geschüttelt. Die Trennung der Agarose von den Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von einem Volumen TE-Phenol und starkem Schütteln für 30 sec, bis eine weiße Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde für 10 min bei 14000 U/min zentrifugiert und die wässrige Phase abgenommen und nochmals mit einem Volumen Phenol/Chloroform versetzt und gleichermaßen zentrifugiert. Dadurch wurden Agaroserückstände aus der wässrigen Phase entfernt. Aus der erhaltenen wässrigen Phase wurde die Nukleinsäuren gefällt (s. a. 4.1.7) und weiter verwendet.

4.1.7 Präzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren fallen durch Zugabe einer hohen Konzentration monovalenter Kationen aus. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Fällung, soweit nicht anders beschrieben, 3 M Natriumacetat pH 5,0 verwendet. Die Probe wurde entweder mit dem 2,5 fachen Volumen 100 %-igem Ethanol oder dem einfachen Volumen 2-Propanol versetzt und gemischt. Durch vorherige Inkubation der Probe auf Eis oder bei -20°C erhöht sich die Ausbeute der Präzipitation. Dies wurde v. a. bei kleinen Nukleinsäuremengen angewandt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden für 20 min bei 4°C und 14000 U/min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in Wasser gelöst.

4.1.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mittels Spektralphotometrie. Dabei wurde die Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von eins entsprachen 50 mg/ml dsDNA, 35 mg/ml ssDNA und 40 mg/ml RNA. Der Reinheitsgrad von Nukleinsäuren in Bezug auf Proteine ließ sich durch den Quotienten aus der OD bei 260 nm zu 280 nm bestimmen. Reine Nukleinsäuren lagen bei einem Wert von 1,8 bis 2 vor. Proteinkontaminationen würden diesen Faktor reduzieren.

4.1.9 Plasmidgewinnung aus *E. coli*

Nach der Transformation von Bakterien mit einem Vektor (s. a. 4.3.5) kann man das eingebrachte Plasmid durch das Wachstum der Bakterien vermehren und für präparative Zwecke zurückgewinnen. Dazu wurden die jeweiligen Klone in unterschiedlichen Mengen LB-Medium angeimpft, 5 mg/ml Ampicillin hinzugefügt und bei 37°C über Nacht hochgeschüttelt. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation für 5 bis 15 min bei 14000 U/min bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet weiter verwendet. Für die Art der folgenden Plasmid-Isolation waren zum einen die benötigte Reinheit der DNA und zum anderen die Ausbeute an Plasmid-DNA ausschlaggebend.

4.1.9.1 Mini-Plasmidpräparation zum Testverdau

Die Präparation kleinster Plasmidmengen aus *E. coli* diente analytischen Zwecken. Die jeweiligen Klone wurden dafür in 2 ml LB-Medium angeimpft. Nach der Ernte wurde das Bakterienpellet in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe des gleichen Volumens Lysepuffers wurde für 5 min bei RT inkubiert. Die Mischung der Lösungen geschah durch Schütteln per Hand; vortexen würde zu einem Aufbrechen genomischer DNA führen. Die Lyse wurde durch Zugabe von 200 µl Neutralisationpuffer beendet. Das Gemisch kam für 15 min auf Eis und wurde danach bei 4°C und 14000 U/min für 15 min zentrifugiert, um die Nukleinsäuren von den zellulären Bestandteilen der lysierten Bakterien zu trennen. Nach Überführung des Überstandes erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren mittels 2-Propanol (s. a.4.1.7). Die erhaltenen Plasmide wurden in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen und anschließend verdaut. Für den Verdau wurden 10 µl Plasmid mit den Restriktionsenzymen geschnitten, mit denen auch die Subklonierung vorgenommen wurde (s. a. 4.3). Durch den Verdau und die anschließende Trennung der Nukleinsäuren im Agarose-Gel konnte festgestellt werden, ob das isolierte Plasmid auch tatsächlich die gewünschte DNA enthält. Die verwendeten Puffer entsprachen den Lösungen des Qiagen Plasmid Präparation Kits.

4.1.9.2 Midi-Plasmidpräparation zur Klonierung und Sequenzierung

Die Präparation mittlerer Plasmidmengen zur Sequenzierung (s. a. 4.1.10) und Subklonierung (s. a. 4.3) der eingebauten DNA erfolgte durch den HiSpeed-Plasmid-Kit der Firma Qiagen nach dem Herstellerprotokoll. Dadurch konnte eine hohe Ausbeute (> 100 µg/ml) an reiner Plasmid-DNA erreicht werden. Dafür wurden 50 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterien-Klon angeimpft und geerntet. Nach der Isolation wurde die Plasmid-DNA in 250 µl sterilem Wasser resuspendiert.

4.1.9.3 Maxi-Plasmidpräparation zur Transfektion von CHO-Zellen

Zur Transfektion von CHO-Zellen (s. a. 4.3.6) wurden die Plasmide mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen isoliert. Dies gewährleistete eine hohe Ausbeute (~500 µg) an reiner Plasmid-DNA, die frei von Endotoxinen der Bakterien war. Hierzu wurden 250 ml LB-Medium mit dem zu isolierenden Klon angeimpft. Auch hier wurde das mitgelieferte Herstellerprotokoll angewandt. Die Plasmid-DNA wurde in 250 µl sterilem Wasser gelöst.

4.1.10 Plasmidsequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide, meist aus einer Midi-Präparation (s. a. 4.1.9.2), wurde von der Firma MWG Biotech vorgenommen. Dazu wurde 1 µg der Plasmide pro Sequenz präzipitiert, luftgetrocknet und an die Sequenzierfirma geschickt. Zum Sequenzieren der DNA im pCR-Skript-Vektor wurden die Primer T3 und T7 verwendet, die von MWG Biotech zur Verfügung gestellt wurden. Im Falle der Analyse des pEF-Vektors wurden 10 µl Primer pEF-Pro und pEF-Rev in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Cup mit der Plasmid-DNA mitgeschickt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit der Software „Sequence Navigator“.

4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion, kurz PCR, ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA. Dabei wird ein begrenztes Stück einer Muster-DNA (sog. Template) durch den Einsatz zweier Oligonukleotidprimer und einer DNA-Polymerase durch zyklische Wiederholungen verschiedener Inkubationsschritte vermehrt. Ein Zyklus besteht typischerweise aus der Denaturierung des Templates bei 95°C, dem Annealing der Primer bei der errechneten Hybridisierungstemperatur (HT) und der Kettenverlängerung beim Temperaturoptimum der jeweiligen Polymerase (meist 72°C). Die HT bestimmt sich aus folgender Formel: HT = (Anzahl der Basen G und C) x 4°C + (Anzahl der Basen A und T) x 2°C - 4°C. Als Template dienten die eingesetzte cDNA sowie alle

neu synthetisierten Kopien des gewünschten DNA-Stücks. Daraus resultierte eine exponentiell zur Zykluszahl zunehmende Fragmentmenge.

Als Polymerasen standen in der vorliegenden Arbeit die Taq- und die PFU-Polymerase zur Verfügung. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase besitzt die PFU-Polymerase die Fähigkeit zur Fehlerkorrektur und hat somit eine niedrigere Fehlerquote beim Einbau von Nukleotiden. Deswegen wurde bei Subklonierungen in dieser Arbeit, wenn nicht anders vermerkt, die PFU-Polymerase verwendet. Die Reaktionspuffer wurden mit den jeweiligen Enzymen mitgeliefert und Desoxynukleotide der PCR-Reaktion in einer Endkonzentration von 200 µM zugesetzt.

Bei der Primerauswahl wurde auf eine gleiche Annealing-Temperatur geachtet. Die PCR-Primer können am 5´-Ende der Template-komplementären Sequenz eine nicht-komplementäre Sequenz enthalten. Diese fügt dem Amplifikat z. B. eine Schnittstelle zur weiteren Klonierung oder eine bestimmte Aminosäure-sequenz hinzu. Die Primerkonzentration der PCR-Reaktionen lag bei 1 µM.

4.2.1 Fishing-PCR

Trotz unterschiedlicher Bindungsspezifitäten der einzelnen Antikörper befinden sich in den Framework-Bereichen der variablen Domänen starke Sequenz-homologien. Für die Klonierung der variablen Domänen der Antiköper wurden deswegen verschiedene Bereiche aus der Framework-Region (s. a. 1.4.1, 5.1.1) zur Auswahl der Primersequenz genutzt. Mit Hilfe von publizierten Sequenzen von Ratten-IgG 2b Antikörpern wurden aus dem 5´-Bereich der variablen Domänen sieben Primer für die schwere Kette (V_H) und sechs Primer für die leichte Kette (V_L) synthetisiert. Die Sequenzen der Primer enthalten so genannte gemischte Basen (s. a. Tabelle 4-1), so steht z. B. der Buchstabe S für die Basen C oder G. Der 3´-Primer wurde aus dem Beginn der konstanten Domäne von C_H und C_L synthetisiert.

Tabelle 4-1: Primer für die Klonierung der variablen Antikörperdomänen. Für die gemischten Basen wurden folgende Abkürzungen verwendet: S = C + G; R = A + G; W = A+T; K = T + G; Y = C + T.

Primername	Sequenz	Primernutzung
5´-VH1-Rat	CAGGTGAAGCTKCWGGAG TCAGGACCTRGCCTGGTG	Amplifikation Heavy Chain
5´-VH2-Rat	CAGGTGCAGCTGCTSSAGT CWGG	Amplifikation Heavy Chain
5´-VH3-Rat	GARGTKCAGCTGCARCAGT CTGG	Amplifikation Heavy Chain
5´-VH4-Rat	GAAGTCCAGCTGCAGCAAT CWGG	Amplifikation Heavy Chain
5´-VH5-Rat	GCGGTGCAGCTTGTKGART CTGG	Amplifikation Heavy Chain
5´-VH6-Rat	GAGGTGAARCTGTTGGAAT CWGG	Amplifikation Heavy Chain
5´-VH7-Rat	CAGGTGCARCTGMAGGAG TCAGG	Amplifikation Heavy Chain
3´-Rat-HC1	ACAGGGCTC CAG AGTTCCA	Amplifikation Heavy Chain
3´-Rat-HC2	CATCCAGGAGCCAGTGGAT A	Amplifikation Heavy Chain
5´-VL1-Rat	GACRTYSWGATGACYCAGT CTCC	Amplifikation Light Chain
5´-VL2-Rat	GACRTYSWGCTGACYCAGT CTCC	Amplifikation Light Chain
5´-VL3-Rat	GACRTYSWGGTGACYCAGT CTCC	Amplifikation Light Chain
5´-VL4-Rat	GACRTYSWGATGACYCAAT CTCC	Amplifikation Light Chain
5´-VL5-Rat	GACRTYSWGCTGACYCAAT CTCC	Amplifikation Light Chain
5´-VL6-Rat	GACRTYSWGGTGACYCAAT CTCC	Amplifikation Light Chain
3´-Rat-LC1	TACAGTTGGTGCAGCATCA G	Amplifikation Light Chain

Diese Primer wurden dann zusammen mit der cDNA aus den Hybridomzellen MC21, MC68 und MC69 in einer Fishing-PCR eingesetzt. Dabei wurde jeder der sieben V_H bzw. sechs V_L 5´-Primer mit dem jeweiligen 3´-Primer kombiniert und ein PCR-Programm mit zwei verschiedenen Zyklen gefahren (s. a. Tabelle 4-2). Zu Beginn der Reaktion wurde eine niedrige Annealing-Temperatur von 40°C gewählt, um sicher zu stellen, dass die Primer auch bei einigen

Fehlpaarungen binden. Die Spezifität war dadurch zwar erniedrigt, die Wahrscheinlichkeit der DNA-Vermehrung aber erhöht. In einem zweiten Zyklus wurde die Annealing-Temperatur auf 56°C erhöht, was eine spezifischere Amplifikation der gewünschten DNA zur Folge hatte. Dadurch konnte aus der eingesetzten cDNA die variablen Antikörper-Domänen kloniert werden.

Tabelle 4-2: PCR-Programm zur Amplifikation der variablen Antikörperdomänen.

Temperatur [°C]	95	95	40	72	95	56	72	72
Zeit [min]	4:00	0:45	1:30	1:00	0:45	1:00	1:00	10:00
Zyklenzahl	1		10			25		1

Die amplifizierte DNA wurde anschließend im Low-Melting-Agarose-Gel aufgetrennt (s. a. 4.1.5), isoliert (s. a. 4.1.6) und subkloniert (s. a. 4.3.2).

4.2.2 Amplifikations- und Fusions-PCR

Um aus den einzelnen variablen Domänen eines Antikörpers ein single-chain Fragment (scFv) herzustellen, wurde die klonierte DNA der Domänen durch eine PCR fusioniert. Dazu wurden zunächst die V_H- und V_L-Domänen aus dem pCR-Skript-Vektor amplifiziert. Über einen nicht-komplementären Teil der Primer hängt man am 5´-Ende der V_L-Region eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym FspI an, am 3´-Ende fügt man einen Teil des Aminosäure-Linkers hinzu. Bei dem V_H-Fragment kommt an das 5´-Ende der Aminosäure-Linker und an das 3´-Ende die Schnittstelle SalI, eine Abfolge von sechs Histidinen (His-Tag) und ein Stop-Codon (s. a. Tabelle 4-3). In einer Amplifikations-PCR wurden somit die beiden DNA-Fragmente mit den zusätzlichen Basen hergestellt und über ein Agarose-Gel gereinigt und isoliert.

Die Amplifikations-PCR wurde generell dazu verwendet, um über einen Primer neue Schnittstellen und Aminosäuresequenzen an die gewünschte DNA anzubauen. Insbesondere bei der Herstellung der bsAb und des bsAb-IgG Konstruktes wurden neue Sequenzen eingefügt (s. a. 5.2 und 5.5).

Durch eine zweite PCR sollten die beiden modifizierten DNA-Fragmente fusioniert werden. Dabei ist entscheidend, dass die beiden eingefügten $(Gly_4\,Ser_3)_2$ der V_L- und V_H-Kette in dem jeweils endständigen $(Gly_4\,Ser_3)_1$-Linker identisch sind. In der PCR werden zusätzlich der 5´-VL-Primer und der 3´-V_H-Primer zur Amplifikation eingesetzt. Durch die komplementäre Überlappung der Linkersequenz fusionieren die beiden DNA-Stränge in der Annealingphase und werden in der Elongationsphase der PCR vervollständigt. Die gesamte Prozedur ist in Abbildung 4-2 schematisch dargestellt.

Tabelle 4-3: Primer zur Amplifikation der V-Domänen für die anschließende Fusions-PCR: Der Primer 3´-MC21-VL-Linker wurde auch zur Amplifikation der V_L-Kette der MC68 und MC69 Sequenzen verwendet.

Name	Primersequenz
5´-Fsp1-MC21-VL	AAATGCGCAGGCCGACATCGTGATGACCCAATCT
3´-MC21-VL-Linker	GGAGCCGCCGCCGCCAGAACCACCACCACCTTTCAGTTCCA GCTTGGTCC
5´-MC21-VH-Linker	GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGGTGCAGC TGCAGGAGT
3´-MC21-VH-His6Sal1	GCCGTCGACTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGGAGACTG TGACCATGA
5´- MC69-VL-Fsp1	AAATGCGCAGGCCGACATTGTGATGACCCAATCTC
5´- MC69-VH-Linker	GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGGTGCAGC TGCAGGAGTC
3´- MC69-VH-His6Sal1	GCCGTCGACTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGGAGACTG TGACCATGACT
5´-MC68-VL-FspI	AAATGCGCAGGCCGACGTCGTGATGACC
5´-MC68-VH-Linker	GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGAGGTTCACC TGGTAGAGTC
3´-MC68-VH-His6Sal1	GCCGTGGACTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGGACACGG TGACCACG

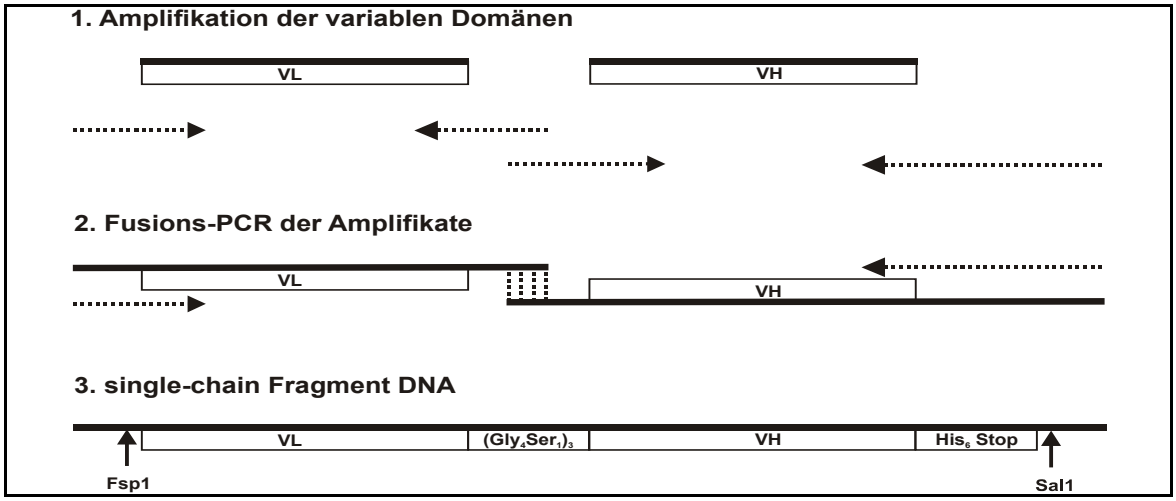

Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Amplifikations- und Fusion-PCR.

4.2.3 Kolonie-PCR

Diese Art der PCR diente ebenso wie die Mini-Plasmidpräparation zur Analyse der vorgenommenen Subklonierungen. Von den ausgewählten Klonen einer Transformation wurden je 1 µl pro PCR eingesetzt. Als Primer wurden ein 5´- und ein 3´-Vektorprimer verwendet, zwischen denen die Multiple Cloning Site (MCS, s. a. 4.3) des Vektors liegt. In der ersten Denaturierungsphase des PCR-Programms werden nicht nur die Nukleinsäuren denaturiert, sondern v. a. die Bakterienhülle zerstört und somit die Nukleinsäuren für die PCR erst freigesetzt. Im weiteren Verlauf der PCR wird das DNA-Fragment zwischen den Primern amplifiziert. Im Falle einer erfolgreichen Subklonierung konnte im Agarose-Gel eine Bande der erwarteten Größe beobachtet werden, wobei sich zur Größe der Ziel-DNA noch die Größe der Vektorstücke bis zu den beiden verwendeten Primern addierten. Diese Art der Überprüfung sagt jedoch nichts über die Orientierung der klonierten DNA-Fragmente im Vektor aus, wenn es sich um eine „blunt-end“ Klonierung handelt (s. a. 4.3.2). Um diese Information mit einzuschließen, wurde aus dem Vektor nur der 5´-Primer verwendet. Für das 3´-Ende wurde ein Primer aus der spezifischen Sequenz der Ziel-DNA gewählt. Nur im Falle eines 5´-3´-Einbaus der DNA kam es hier zu einer Amplifikation des Produktes.

4.3 Subklonierungen

Vor Beginn einer Subklonierung gibt es verschiedene Dinge zu beachten, um die Effizienz der Klonierung der gewünschten DNA zu erhöhen.

Die Klonierung mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen führt in der geschnittenen DNA zu überhängenden Enden, sog. „sticky ends“. Diese Art der Klonierung ist in der Regel effizienter als die Verwendung von DNA-Fragmenten ohne überhängende Enden („blunt ends“). Mit „sticky ends“ lässt sich zudem die Orientierung der eingebauten DNA beeinflussen. Zudem sollten Restriktionsenzyme verwendet werden, die maximal einmal in der zu klonierenden Sequenz und im verwendeten Vektor vorkommen.

Entscheidend für den Erfolg der Subklonierung ist auch die Präparation der Ziel-DNA und des Vektors. Der Einbau von PCR-Fragmenten ist dabei schwerer als die Verwendung von Vektorfragmenten, da Restriktionsenzyme an freien DNA-Enden mit einer geringeren Effizienz schneiden. Der präparierte Vektor sollte grundsätzlich mit einem hohen Enzymüberschuss verdaut werden, um einen kompletten Verdau zu garantieren. Eine Aufreinigung von Fragment und Vektor über Low-Melting-Agarose ist obligat, damit der geschnittene Vektor gut von den ausgeschnittenen Fragmenten getrennt werden kann.

4.3.1 Spezifische Spaltung von dsDNA mit Restriktionsenzymen

Zum Schneiden von dsDNA verwendet man Restriktionsendonukleasen. Dabei handelt es sich um bakterielle Enzyme, die bestimmte Sequenzabschnitte auf der DNA erkennen und schneiden. Die Erkennungssequenzen bestehen aus vier bis über acht Basen und sind meist palindromisch, d. h. symmetrisch aufgebaut. Die Länge der Erkennungssequenz bestimmt die Wahrscheinlichkeit mit der eine gewählte DNA-Sequenz von einem bestimmten Enzym geschnitten wird. Am häufigsten werden Enzyme mit Erkennungssequenzen von sechs Basen verwendet.

Bei bestimmten Restriktionsenzymen (z. B. BspeE1) verhindert eine Methylierung der Erkennungssequenz die Aktivität des Enzyms. Diese DNA muss aus Methylase-defizienten Bakterienstämmen isoliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der *E. coli* Stamm JM83 verwendet, der keine Methylase-Aktivität besitzt.

Die eingesetzte Enzymmenge wird in Units (U) angegeben, dabei schneidet 1 U Enzym 1 µg dsDNA pro Stunde. Das Temperaturoptimum der eingesetzten Enzyme wurde den Herstellerangaben entnommen, der optimale Puffer wurde mit dem Enzym geliefert. Die eingesetzte Menge des Enzyms sollte jedoch 1/10 des Gesamtvolumens des Ansatzes knapp unterschreiten, um die sog. „star-Aktivität“ zu vermeiden. Hierbei handelt es sich um eine Sequenz-unabhängige Enzymaktivität. Die Enzymmenge wurde generell so gewählt, dass ein vollständiger Vedau in maximal zwei Stunden stattfand.

Befindet sich in der Ziel-DNA die Erkennungssequenz des verwendeten Enzyms mehr als einmal, so muss man einen partiellen Verdau der dsDNA vornehmen. Dies erreicht man indem man entweder die Inkubationszeit oder die Enzymmenge beschränkt. Um eine optimale Menge an geschnittener DNA der gewünschten Fragmentlänge zu erhalten, müssen die Inkubations-bedingungen bei einem partiellen Verdau experimentell bestimmt werden und die Fragmente über ein Agarosegel überprüft und gereinigt werden (s. a. 5.2.2)

4.3.2 Verknüpfung von DNA mit T4 DNA Ligase

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5´-Phosphatgruppe und der 3´-Hydroxylgruppe von dsDNA. Es kann dadurch sowohl DNA mit glatten als auch mit überhängenden Enden verknüpft werden. Der Ansatz war wie folgt. 10 µg linearisierter Vektor-DNA wurden nach der Präparation in 10 µl sterilem Wasser gelöst. Davon wurde 1 µl in den Ligationsansatz gegeben. Die aus dem Agarose-Gel isolierte Ziel-DNA wurde in 14 µl sterilem Wasser gelöst und 7 µl verwendet. Hinzu kam 1 µl mitgelieferter 10-fach Puffer und 0,8 µl T4 DNA Ligase. Die Ligation fand über Nacht bei 16°C statt.

4.3.3 Vektoren

4.3.3.1 Struktur des pCR-Skript-Vektors

Der pCR-Skript-Vektor enthält das lacZ-Operon, das für das Enzym ß-Galaktosidase codiert. Die ß-Galaktosidase setzt das Substrat X-gal um, wodurch die Bakterienkolonien eine blaue Färbung erlangen. Mit Hilfe dieser Sequenz zeigt sich bereits an der Färbung der Kolonien auf der LB-Platte der Klonierungserfolg. Die MCS des pCR-Skript-Vektors befindet sich in dem lacZ-Operon. Bei weißen Klonen wurde eine DNA-Sequenz in das Operon kloniert, wodurch zugegebenes X-gal nicht mehr umgewandelt werden kann. Blaue Klone hingegen besitzen noch ein intaktes Operon und können nach IPTG-Induktion der ß-Galaktosidase den Stoff umsetzen.

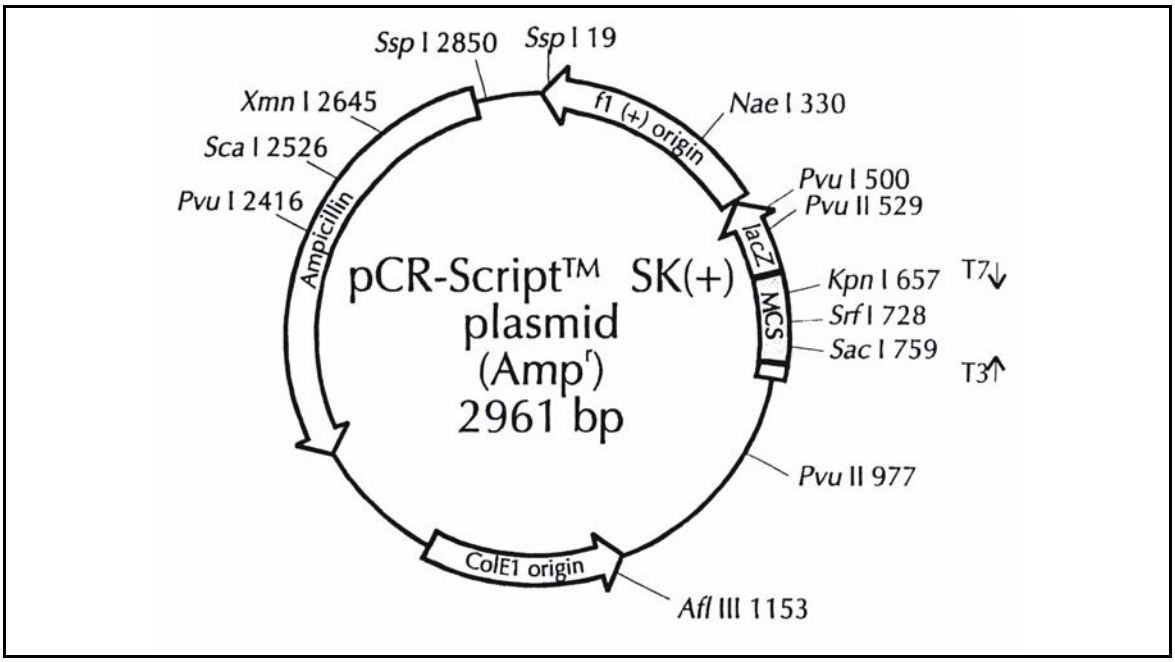

Abbildung 4-3: Aufbau des pCR-Skript-Vektors der Firma Stratagene.

4.3.3.2 Aufbau des OmpA-Vektors

Der OmpA-Vektor ist ein „high copy“ Plasmid mit dem „origin of replication“ (ORI) und dem Ampicillinresistenzgen der pUC-Vektor-Familie. Die Expressionseinheit besteht aus dem Lactoseoperon, gefolgt von der Signalsequenz für den Proteintransport ins Periplasma (OmpA). Im Anschluss an diese Sequenz befindet sich die MCS, in die die DNA-Sequenz eingebaut wird. Diese Expressionssequenz ist in Abbildung 4-4 schematisch dargestellt.

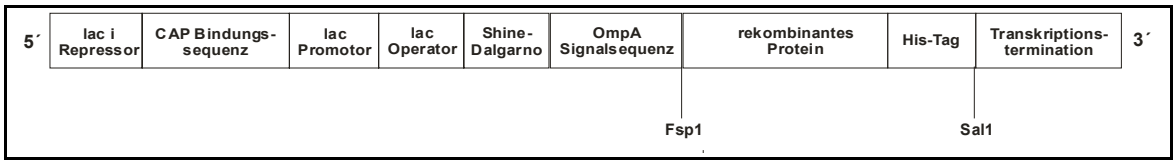

Abbildung 4-4: Schematische Darstellung der Expressionssequenz des OmpA-Vektors.

Das lac i Repressorgen codiert für das Lactose-Repressorprotein. Dieses Protein bindet an den lac-Operator und verhindert dadurch den Transkriptionsstart am lac-Promotor. Mit Hilfe des lac-Operons erhält man die Kontrolle über die Proteinexpression, denn einige exprimierte Proteine sind toxisch für Bakterien, deshalb ist eine konstitutive Expression nicht möglich. Durch Zugabe von IPTG verhindert man eine Anlagerung des Lactose-Repressors an den lac-Operator und induziert somit den Transkriptionsstart. Die „CAP binding sequence“ dagegen führt in Anwesenheit von cAMP und dem bakteriellen CAP-Protein zu einer 50-fachen Steigerung der Transkription. Die Proteinexpression beginnt nach der Shine-Dalgarno-Sequenz mit dem AUG-Start-Codon der OmpA-Signalsequenz. Diese Signalsequenz wird beim Transport des Proteins ins Periplasma abgespalten.

4.3.3.3 Der eukaryontische Expressionsvektor pEF-DHFR

Dieser Vektor ist ein Derivat des Expressionsvektors pMT2PC (Kaufman, 1990) und wurde von Dr. M. Mack zur Verfügung gestellt (Mack, 1995). Ein Teil des Vektors ist in Abbildung 4-5 dargestellt. Er verfügt über eine bicistronische Transkriptionseinheit bestehend aus dem Promotor für den Elongationsfaktor 1 α und einem Polylinker für die Aufnahme des zu exprimierenden Gens. Weitere Elemente sind eine ribosomale Reinitiierungsstelle (POL), das Dihydrofolatreduktase-Gen (DHFR) als Selektionsmarker und die Polyadenylierungsstelle der frühen SV40-mRNA (SV40 poly(A)). Zur Amplifikation des Plasmids in Bakterien trägt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen (AMP), sowie einen bakteriellen „origin of replication“ (ORI).

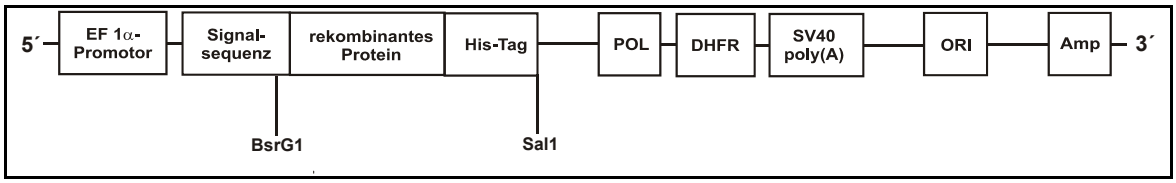

Abbildung 4-5: Aufbau der Transkriptionseinheit des pEF-DHFR-Vektors.

4.3.4 blunt-end Klonierung in den pCR-Skript-Vektor

Ein Großteil der PCR-Fragmente wurde mit Hilfe des pCR-Skript-Vektor Systems der Firma Stratagene kloniert. Durch die Amplifikation der cDNA mit der PFU-Polymerase entstehen keine überhängenden Enden. Das Klonierungssytem basiert auf einer „blunt-end“ Schnittstelle des Enzyms Srf1 in der MCS des Vektors. Der geschnittene Vektor wird gleichzeitig mit Srf1, dem PCR-Fragment und einer T4 DNA Ligase inkubiert. Durch die Ligation des Fragments mit den Vektorenden verschwindet die Srf1-Erkennungsstelle aus dem Vektor. Bei einer Selbstligation des Vektors ohne das PCR-Fragment entsteht die Srf1-Erkennungssequenz erneut und wird durch das vorhandene Enzym wieder geschnitten.

Der Ansatz wurde nach Herstellerangaben erstellt. Bei einer Herstellung der Fragmente mit Taq-Polymerase, bei der kein „blunt end“-Fragment entsteht, kann die DNA vor dem Einbau in den Vektor mit PFU-Polymerase vorbehandelt werden. Die Exonukleaseaktivität des Enzyms führt dann zu den benötigten „blunt end“ Fragmenten. Inwieweit die erwünschte DNA in den pCR-Skript-Vektor eingebaut wurde, wurde durch eine Kolonie-PCR (s. a. 4.2.3) überprüft.

4.3.5 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Zum Einbringen der Plasmid-DNA in den *E. coli* Stamm JM83 wurde grundsätzlich die Elektroporation verwendet. Dazu muss die Plasmid-DNA frei von gelösten Ionen sein, was durch zweimaliges Waschen der präzipitierten Ligation mit 70 %-igem Ethanol erreicht wurde. Die Ligation wurde in 5 µl Wasser gelöst. Die Elektroporationsküvette und ein 1,5 ml Eppendorf-Cup wurden für 10 min auf Eis vorgekühlt. In dem Cup wurde anschließend 1 µl der Ligation mit 50 µl kompetenten JM83 Bakterien gemischt. Die Elektroporation fand durch die Entladung eines Kondensators (1,8 kV) bei einer Zeitkonstante von 4 – 5 ms statt. Sofort danach wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Kultur für 1 h bei 37°C geschüttelt.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Bakterien geerntet und in einer 1:10 und einer 1:1 Verdünnung auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (5 mg/ml) ausplattiert. Die Platten inkubierten bei 37°C über Nacht. Ein Teil der gewachsenen Kolonien wurden in 100 µl LB-Medium in ein steriles Eppendorf-Cup überführt und bei 4°C gelagert. Zur Identifikation der Subklone wurde entweder eine Kolonie-PCR (s. a. 4.2.3) und/oder eine Mini-Plasmidpräparation (s. a. 4.1.9.1) mit anschließendem Restriktionsverdau gemacht.

4.3.6 Stabile Transfektion von CHO-Zellen mit dem pEF-DHFR-Vektor

Bei der stabilen Transfektion von eukaryontischen Zelllinien wird der eingebrachte Vektor im Verlauf der Replikation und Zellteilung in das Genom der Zellen integriert und kann so an die Tochterzellen weitergegeben werden. In einer transienten Transfektion hingegen wird das Plasmid nicht ins Genom eingebaut, sondern liegt nur extrachromosomal vor und geht im Verlauf der Zellteilungen verloren.

Die erste Beschreibung des eukaryontischen Expressionsvektors mit dem DHFR (Dihydrofolatreduktase)-defiziente CHO-Zellen stabil transfiziert werden konnten, stammt von Kaufman (Kaufman, 1990). Dabei handelt es sich um eine bicistronische Expression von Proteinen, die von nur einem Promotor gesteuert wird. Neben dem eingebauten Ziel-Gen wird gleichzeitig das DHFR Enzym transkribiert. Dieses Enzym dient zur Produktion der beiden Purine Thymidin und Glycin. Werden nun DHFR-defiziente CHO-Zellen nach einer Transfektion in einem Selektionsmedium ohne Thymidin und Glycin gehalten, so überleben nur die Zellen, die den Vektor erfolgreich in ihr Genom integriert haben und somit das DHFR Enzym herstellen können (Selektion). Einen verstärkten Selektionsdruck übt man aus, wenn zusätzlich noch Methotrexat (MTX) dem Medium zufügt wird. Hierbei handelt es sich um einen Hemmstoff des DHFR Enzyms. Es kommt dadurch zu einer Genamplifikation. Mit der Erhöhung der DHFR Produktion durch Selektion mit MTX erfolgt eine erhöhte Transkription des eingebauten Ziel-Gens, da beide Gene unter der Kontrolle des gleichen Promotors stehen (Wood, 1990).

Für die Transfektion wurden DHFR-defiziente CHO-Zellen verwendet. Diese Zellen sind zur Purinbiosynthese nicht fähig. Die Purine wurden den Zellen in einem Vollmedium geliefert (s. a. 4.4.8). Zur Transfektion wurden 100 µg pEF-DHFR-Plasmid mit dem Enzym Nde1 linearisiert, phenolisiert, präzipitiert, in 70 %-igem Ethanol gewaschen und schließlich in 800 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem PBS resuspendiert.

Die adhärenten CHO-Zellen wurden geerntet (s. a. 4.4.8) und zweimal in Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem PBS gewaschen. 10^7 Zellen wurden 3 min bei 1000 U/min abzentrifugiert und das Pellet in den 800 µl DNA-haltigem PBS gelöst. Die Zellen wurden in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Zellen mehrmals durch leichtes Schütteln aufgewirbelt. Darauf folgte ein Strompuls mit 260 V und 960 µF in einer Elektroporationsvorrichtung, eine weitere 10 minütige Inkubation auf Eis und die Überführung der Zellen in 20 ml Vollmedium. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert, bevor die Selektion durch das Ersetzen des Vollmediums durch ein nukleosidfreies Medium erfolgte. Die weitere Behandlung von stabil transfizierten CHO-Zellen ist unter 4.5.2 zu finden.

4.4 Proteinexpression und –aufreinigung

4.4.1 Expression der scFv im Periplasma von E. coli

Die scFv konnten durch den Einbau in den OmpA-Vektor (s. a. 4.3.3.2) in Bakterien exprimiert werden. Einige rekombinante Proteine können toxisch für die Bakterien sein, deswegen wird bei diesem Vektor das Protein nicht konstitutiv produziert. Erst nach Zugabe des Induktors IPTG wird die Herstellung des Proteins begonnen.

Die Expression der scFv fand im E. coli Stamm JM83 statt. Dazu wurde ein erfolgreich transformierter Klon in 50 ml LB-Medium angeimpft. 1 ml Über-Nachtkultur wurde in je 50 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und bei 37°C hochgeschüttelt bis die Kultur eine OD von 0,5 bis 0,8 bei 600 nm erreicht hatte. Die Kultur befand sich dann in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach dem Abkühlen der Kultur auf RT, wurde die Proteinexpression mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für 3,5 h bei RT geschüttelt. Bei RT ist die äußere Bakterienmembran wenig durchlässig, der Transport der Proteine in den periplasmatischen Raum zwischen den Membranen ist jedoch verstärkt. Dies führt zu einer Anreicherung der gewünschten Proteine im periplasmatischen Raum.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt, um eine Aktivität von endogenen Proteasen zu vermindern. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min bei 4000 U/min) und je 50 ml Kultur in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Darauf folgte ein 4-facher Gefrier-Auftau-Zyklus. Der Gefriervorgang fand in einem Trockeneis-Ethanol (96 %)-Gemisch statt. Das Auftauen erfolgte bei 37°C im Wasserbad für je 4 min. Dadurch wurde selektiv das Periplasma der Bakterien aufgeschlossen und die exprimierten Proteine freigesetzt. Die Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation (10 min bei 10000 U/min) von den teillysierten Bakterien getrennt. Der Überstand wurde für Bindungsanalyse bzw. zur Proteinreinigung verwendet.

4.4.2 Produktion der bsAb durch CHO-Zellen

In Bakterien kann nur eine beschränkte Expression von eukaryontischen Proteinen vorgenommen werden, da die Bakterien nicht alle Faltungen und eventuelle Glykosylierungen der Proteine vornehmen können. Schon die Verbindung zweier scFv zu einem bsAb kann von Bakterien nicht mehr korrekt exprimiert werden. Ein weiterer Nachteil der bakteriellen Expression von Proteinen ist die Verunreinigung mit Endotoxinen, die bei einem Einsatz der Proteine im Tierversuch zu Verfälschungen der Ergebnisse führen könnten.

Zur Expression der bsAb wurden deswegen eukaryontische CHO-Zellen verwendet, die zum einen eine korrekte Faltung der Proteine vornehmen, zum anderen kein Endotoxin enthalten. Nach der stabilen Transfektion mit dem pEF-DHFR-Vektor produzieren diese Zellen das rekombinante Protein. Aufgrund der Signalsequenz, die sich vor der Proteinsequenz befindet (s. a. Abbildung 4-5), wird das Protein in den Zellkulturüberstand sezerniert. Nachteil dieser Expressionsart ist die geringe Ausbeute und eine Verunreinigung mit FCS aus dem Kulturmedium. Der Zellkultur-Überstand wurde von den adhärenten Zellen abgenommen und bei 4000 U/min für 5 min zentrifugiert, um tote Zellen und Zellbestandteile abzutrennen.

4.4.3 Aufreinigung der Antikörperkonstrukte über His-Tag

Die bispezifischen Konstrukte enthalten C-terminal einen HIS-Tag, bestehend aus sechs Histidinen. Dadurch ist eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen, wie Zn^{2+} oder Ni^{2+} möglich. Als Säulenmaterial wurde Ni^{2+}-NTA-Agarose (nitrilo-tri-acetic acid) der Firma Qiagen verwendet. Das Ni^{2+} hat eine hohe Bindungsaffinität zum HIS-Tag, wodurch eine effiziente Reinigung der rekombinanten Proteine aus dem Periplasmalysat und dem Zellkulturüberstand möglich ist (Gaberc-Porekar, 2001).

Zunächst wurden die Überstände mit der Ni-NTA inkubiert, um die Proteine an das Material zu binden. Dazu wurde das Säulenmaterial zuerst im Bindungspuffer (Sonication Buffer pH 8) gewaschen (Zentrifugation für 2 min bei 300 U/min). Je nach Überstand wurde die optimale Menge an Säulenmaterial zur Komplettadsorption des Proteins ausgetestet (s. a. 5.2.3). Die Ni-NTA wurde anschließend für 1 h bei 4°C mit dem Überstand inkubiert und alle 15 min aufgewirbelt, um bessere Depletionsergebnisse zu erreichen.

Nach dem letzten Absetzen der Ni-NTA wurde der Überstand abgenommen und das Material einmal mit dem 10-fachem Volumen des Säulenmaterials in Sonication Puffer gewaschen. Das Ni-NTA-Pellet wurde in eine Säule der Firma Amersham Pharmacia gepackt und luftblasenfrei verschlossen. Die Säule wurde an ein FPLC-Gerät angeschlossen und zunächst mit einem 1:1 Gemisch der Elutionspuffer A und B gespült und äquilibriert. Die Elution der rekombinaten Antikörper fand mit Hilfe einer stufenweisen Erniedrigung des pH-Wertes durch Änderung der Mischungsverhältnisse der Elutionspuffer A und B statt. Das verwendete Programm zur Elution der HIS-Tag Proteine ist unter 5.2.3 zu finden. In den Fraktionsröhrchen wurde jeweils 50 µl Tris pH 8,8 vorgelegt, um den sauren pH-Wert des Elutionspuffers zu neutralisieren. Der MC69bsAb wurde in Kooperation mit der Firma Micromet (München, Deutschland) aufgereinigt.

4.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Größentrennung zur Untersuchung der Proteinfraktionen fand im SDS-Polyacrylamid-Gel statt. Bei dieser Trennung wird das Protein durch das Detergens Natriumdodecylsulfat denaturiert, gleichzeitig erhält der Komplex aus Protein und SDS eine stark negative Ladung. Diese Ladung ist proportional zur Größe des Proteins, wobei die Proteineigenladung vernachlässigt werden kann. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines so geladenen Proteins in einem elektrischen Feld wird nur durch das Molekulargewicht der Proteine beeinflusst.

Zur Analyse der Reinigung der bsAb aus dem Zellkulturüberstand der CHO-Zellen wurden 12,5 %-ige Gele gegossen. Die bsAb-IgG wurden in einem 8-10 %-igem Gel getrennt. Die Proteinproben wurde vor Auftragung im Verhältnis 5:1 mit einem reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Auftragspuffer gemischt und 5 min bei 95°C erhitzt, um eventuell vorliegende Multimere zu denaturieren. Um später die Proteingröße zu bestimmen, wurde ebenfalls ein Größenmarker aufgetragen. Das Gel lief für 1 h bei einer maximalen Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 90 mA in einem SDS-haltigen Laufpuffer.

4.4.5 Coomassie-Staining

Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese für 30 min in einer Coomassie-Lösung bei leichtem Schütteln gefärbt. Zur schnellen Entfärbung wurde das Gel in Reinstwasser überführt und dieses wurde drei Mal für 5 min in einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend gewechselt. Eine vollständige Entfärbung erfolgte über Nacht in Reinstwasser.

4.4.6 Western Blot

Mittels SDS-Page aufgetrennte Proteine könne durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran überführt werden. Dazu wurde das Verfahren des Semidry-Blottings verwendet. Das SDS-Gel wird auf eine Nitrozellulose-membran gelegt und zwischen mehrere Schichten Whatmanpapier gelegt, das zuvor in TBS-Puffer getränkt wurde. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte in einer Semidry Transfer Zelle von Biorad. Der Transfer wurde im Anschluss durch eine Ponceau-Färbung geprüft.

Die Nitrozellulosemembran kann nun mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden, wodurch die Proteine auf der Membran spezifisch markiert werden und später auf einem Negativfilm sichtbar gemacht werden können. Zuvor muss die Membran jedoch mit geblockt werden um unspezifische Bindungen auf der Membran zu vermeiden. Dies geschah durch eine 1-stündige Inkubation in 5 % Magermilch. In der vorliegenden Arbeit wurden die bsAb-IgG mit einem

HRP-markierten anti-Maus IgG angefärbt. Die so gefärbte Membran wurde in einer ECL-Lösung (Chemilumineszenz) der Firma Amersham Pharmacia inkubiert und die Membran anschließend auf einem Film exponiert, der in einer Entwickler-maschine (Agfa Curix 60) der Firma Agfa entwickelt wurde. Die Western Blots der vorliegenden Arbeit wurden von Frau Alexandra Wechselberger durchgeführt.

4.4.7 Konzentrationsbestimmung der Proteine durch UV-Photometrie

Zur Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fraktionen der FPLC wurde die OD von 100 µl je Fraktion bei 280 nm im Spektralphotometer in Dreifachwerten gemessen. Bei einer OD_{280} von eins, beträgt die Proteinkonzentration 0,71 µg/µl.

4.4.8 IgG ELISA zur Konzentrationsbestimmung der bsAb-IgG

Für die Konzentrationsbestimmung der IgG1-Konstrukte wurde ein ELISA für murines IgG verwendet. Auf einer 96-well Flachbodenplatte wird ein Capture-Antikörper über Nacht bei 4 °C gebunden. Freie Bindungsstellen der Platte wurden anschließend mit PBS und 3 % BSA geblockt. Nach dem Probenauftrag wurden nicht gebundene Proteine ausgewaschen und die Proben mit einem HRP-markierten polyklonalen anti-Maus-IgG Antikörper detektiert. Durch Zugabe des Substrates ABTS wird zuletzt der Detektionsantikörper sichtbar gemacht und in einem Lesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm die optische Dichte bestimmt und mit einem ebenfalls aufgetragenen Standard IgG1-Antikörper verglichen.

4.5 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2 gehalten. Je nach Kulturgröße wurden unterschiedliche Kulturflaschen verwendet. Die Medien der Zellen sind in Tabelle 4-4 zu finden.

Zur Zellernte wurden die verschiedenen Zellarten von der Kulturflasche entweder mit Trypsin/EDTA oder nur mit PBS/EDTA abgelöst und in ein entsprechendes Röhrchen überführt (15 bzw. 50 ml Volumen), für 3 min bei 1000 U/min abzentrifugiert und im jeweils benötigten Volumen mit Medium oder sterilem PBS resuspendiert. Die Passage der Kulturen erfolgte nach dem Ablösen je nach Dichte und Zellart in 1:3 bis 1:10 Verdünnungen.

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Zellpellet nach der Ernte in 2 ml normalem Kulturmedium resuspendiert und mit 2 ml eines 2-fach Einfriermedium (übliches Kulturmedium mit 40 % FCS und 20 % DMSO) gemischt. Je 1 ml wurde in ein Einfrierröhrchen gegeben und in einer Einfrierbox mit 2-Propanol für eine Nacht

bei -80°C gelagert. Das 2-Propanol führt dabei zu einem graduellen Temperaturabfall und somit zu einem schonenden Gefriervorgang. Die Röhrchen mit den gefrorenen Zellen wurden anschließend in flüssigen Stickstoff zur weiteren Lagerung überführt.

Tabelle 4-4: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Zellart	Kulturmedium	Zusätze
DHFR-defiziente CHO-Zellen	MEMα Medium mit Glutamax, ohne Nukleoside (LifeTechnologies, Schottland)	• 10 % hitzeinaktiviertes FCS • 100 U/ml Penicillin • 100 mg/ml Streptomycin • 1 x HT-Medium
Stabil transfizierte CHO-Zellen	MEMα Medium mit Glutamax, ohne Nukleoside (LifeTechnologies, Schottland)	• 10 % hitzeinaktiviertes FCS • 100 U/ml Penicillin • 100 mg/ml Streptomycin • 0-100 nM MTX
MC21, MC69, MC68 Hybridomzellen	RPMI 1640 Medium mit Glutamax (LifeTechnologies, Schottland)	• 10 % nicht hitzeinaktiviertes FCS • 100 U/ml Penicillin • 100 mg/ml Streptomycin • 1 x nicht-essentielle Aminosäuren • 1 x HT-Medium
Maus-Leukozyten	RPMI 1640 mit Glutamax (LifeTechnologies, Schottland)	• 10 % hitzeinaktiviertes FCS • 100 U/ml Penicillin • 100 mg/ml Streptomycin

4.5.1 Hybridomzellen MC21, MC68 und MC69

Bei den Hybridomzellen handelt es sich um die Antikörper-produzierenden Zellen. Diese sezernieren in den Zellkulturüberstand die entsprechenden Antikörper (s. a. Tabelle 4-5). Die Hybridomzellen sind semi-adhärente Zellen und können durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche abgelöst werden. Die Hybridomzellen MC21, MC68 und MC69 wurden von Herr Dr. Mack und Frau Babara Köppeler zur Verfügung gestellt. Die Antikörper MC21 und MC68 sind in einer Publikation von Herrn Dr. Mack beschrieben (Mack, 2001).

Tabelle 4-5: Antikörperproduzierende Hybridomzellen.

Antikörper-Klon	Zielstruktur	Isotyp
MC21	Muriner CCR2	Ratte IgG 2b
MC68	Muriner CCR5	Ratte IgG 2b
MC69	Muriner CCR5	Ratte IgG 2b

4.5.2 CHO-Zellen

4.5.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle adhärenten CHO-Zellen wurden in T75 Kulturflaschen gehalten. Die Zellernte erfolgte im Falle der DHFR- und bsAb- CHO-Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA, das für 1 min bei 37°C inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium gestoppt. Dabei inhibiert das im Medium vorhandene FCS die Aktivität des Trypsins.

Im Falle der Rezeptor-exprimierenden, transfizierten CHO-Zellen wurde zur Ernte nur PBS/EDTA verwendet. Das Trypsin würde den Oberflächenrezeptor verdauen und damit Bindungsanalyse der Antikörper auf den Zellen beeinflussen. Nach einmaligem Ausspülen der Kulturflasche mit 10 ml PBS/EDTA wurden die Zellen solange mit 5 ml PBS/EDTA inkubiert, bis sie sich von der Flasche abklopfen ließen.

4.5.2.2 Kultur nach stabiler Transfektion

Frisch transfizierte CHO-Zellen wurden zunächst 24 h mit Vollmedium inkubiert. Danach wurde die Kulturflasche dreimal mit 30 ml PBS gründlich ausgespült, um alle Nukleosidrückstände zu entfernen. Nach Zugabe des Selektionsmediums ohne Nukleoside sterben die Zellen ab, die keinen Vektor in ihre DNA integriert haben. Die Zellen wurden solange inkubiert, bis sich erste Zellhügel (sog. Foci) von überlebenden Klonen bildeten. Diese Foci wurden bei ausreichender Größe mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche gelöst, vereinzelt und komplett in eine neue Flasche überführt, wo sie einen konfluenten Zellrasen bilden konnten.

Genauso erfolgte die weitere Selektion mit MTX. Zunächst starben die meisten Zellen durch MTX-Zugabe ab. Die überlebenden Zellen bildeten wiederum Foci und wurden anschließend vereinzelt und weiter in Gegenwart von MTX kultiviert.

4.6 Durchflußzytometrie

Eine der wichtigsten Methoden zur Analyse verschiedener Zellpopulationen ist die Durchflußzytomertrie. Hierbei werden Zellsuspensionen in einem Durchflußzytometer durch Unterdruck und den Flüssigkeitsstrom einer Trägerflüssigkeit vereinzelt und durch eine Messkammer geschleust. In dieser Kammer trifft auf die Zellen das Licht eines Lasers. Das abgehende Streulicht, sowie Lichtemissionen von verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen werden von Photomultiplyern in elektronische Signale umgewandelt. Diese könne dann mit einer entsprechenden Software am Computer aufgenommen und ausgewertet werden. Ein schematischer Aufbau einer Messkammer des Durchflußzytometers ist in Abbildung 4-6 dargestellt.

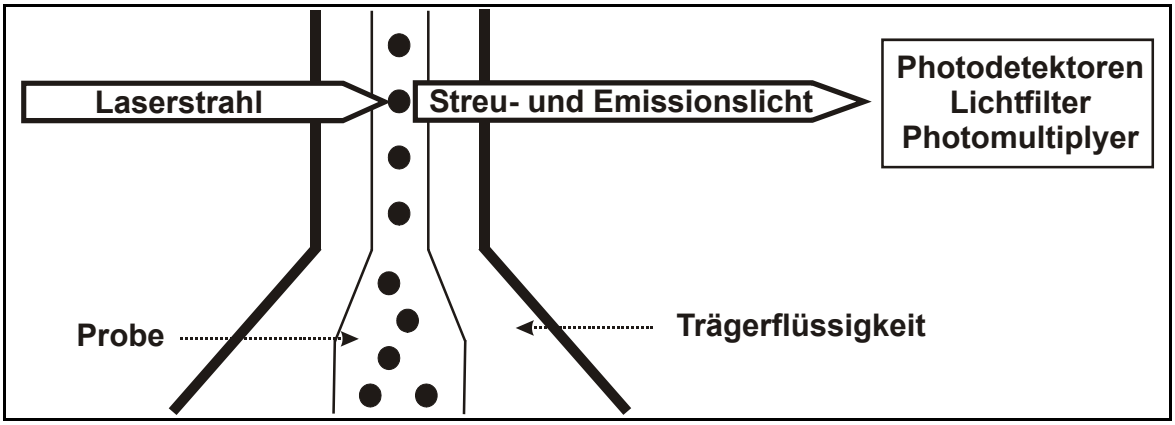

Abbildung 4-6: Schematische Darstellung einer Messkammer eines Durchflußzytometers.

Durch die Verwendung eines FACSCalibur Gerätes der Firma Beckton Dickinson mit zwei eingebauten Lasern kann man z. B. von einer einzelnen Zelle gleichzeitig sechs Parameter bestimmen. Durch das normale Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) lassen sich Aussagen über die Größe und die Granularität der Zelle treffen. Mit den beiden Lasern kann man bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe detektieren (s. a. Tabelle 4-6)

In der vorliegenden Arbeit wird die Durchflußzytometrie häufig als FACS abgekürzt. Dieser Name ist technisch gesehen nicht der richtige Ausdruck. FACS steht für „fluorescence-associated cell sorting“. Das Messprinzip beider Methoden ist das gleiche. Während aber bei der Durchflußzytometrie die Zelleigenschaften nur erfasst und gemessen werden, können bei einem FACS diese Zellen auch nach den so gemessenen Eigenschaften sortiert und wiedergewonnen werden.

Tabelle 4-6: Extinktions- und Emissionswellenlängen für Fluoreszenzfarbstoffe bei der Durchflußzytometrie mit einem FACSCalibur Gerät.

Fluorochrome	Laser (nm)	Emission (nm)
FITC	488	525
R-PE	488	575
PE-Cy 5.5	488	694
APC	633,635	660

4.6.1 Direktfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Bei einer Direktfärbung wird eine Zellsuspension mit einem Gemisch aus unterschiedlichen Antikörpern, die an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, für 30 min auf Eis inkubiert. Die Inkubation auf Eis verhindert eine eventuelle Aktivierung der Zellen durch die zugesetzten Antikörper und führt zu einem eingeschränkten Turnover zwischen Bindung und Ablösung der Antikörper vom jeweiligen Antigen. Nach dem Auswaschen nicht gebundener Antikörper kann die Zellsuspension gleich gemessen werden. Mit Hilfe dieser Färbung lassen sich Zellpopulationen und deren Subpopulationen definieren. Die in der vorliegenden Arbeit häufig verwendeten Antikörper, deren Verdünnung und deren Zielstruktur lassen sich der Tabelle 4-7 entnehmen.

Tabelle 4-7: Direkt markierte Antikörper für die Durchflußzytometrie.

Antigen	Farbstoff	Verdünnung	Zellexpression
CD11b	FITC	1:50	Monozyten, NK-Zellen
CD25	PE	1:50	$CD4^+$ T-Zellen, aktivierte T-Zellen
CD8	Tricolor	1:100	Cytotoxische T-Zellen
CD4	APC	1:100	Helfer T-Zellen
GR1	APC	1:1000	Monozyten, myeloide Zellen, Neutrophile Granulozyten

4.6.2 Färbung der His-Tag Proteine (Sekundärfärbung)

Ein Beispiel für eine Sekundärfärbung ist die Färbung der scFv und bsAb über den angefügten HIS-Tag (s. a. 4.7.1 und 4.7.2). Generell wird dabei ein nicht-markierter Antikörper durch einen Biotin- oder fluoreszenz-markierten Detektionsantikörper gekennzeichnet. Zwischen den einzelnen Inkubations-schritten wird jeweils ungebundener Antikörper durch zwei Waschschritte (1-3 min bei 2000 U/min) entfernt.

Bei einer Sekundärreaktion ist zur Kontrolle die Färbung einer Probe mit einer Isotypkontrolle obligat. Die Isotypkontrolle dient zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers, etwa über dessen Fc-Teil und wird als Negativkontrolle verwendet. Folgt auf die Sekundärfärbung eine Direktfärbung von weiteren Oberflächenmarkern, so müssen die freien Bindungsstellen der bivalenten Sekundärantikörper besetzt werden, um eine unspezifische Bindung der direkt markierten Antikörper zu vermeiden. Dazu wurden die Proben für 10 min mit einem Ratten-/Mausserum (1:10 Verdünnung) inkubiert.

4.6.3 Färbung der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 mit MC21 und MC68

Zu Beginn der Färbung wurde eine Zellsuspension mit dem primären Antikörper (MC21 oder MC68) für 1 h auf Eis inkubiert. Dabei handelt es sich um Antikörper aus der Ratte des Isotyps IgG 2b gegen eine Mausstruktur (Ratte anti-Maus). Im nächsten Schritt wurde ein Biotin-markierten polyklonaler Antikörpern gegen Ratten-Immunglobuline zur Detektion des Primärantikörpers verwendet (1 h auf Eis). Zum Schluss der Färbung wurde an Streptavidin gekoppeltes Phycoerythrin (Strepavidin-RPE) zugegeben (45 min auf Eis). Dieses bindet an den Biotin-Teil des Sekundärantikörpers und führt so zur Floureszenzmarkierung. Bei dieser Färbung wurde ein Isotyp und/oder die Downmodulation (s. a. 4.6.4) als Negativkontrolle verwendet.

4.6.4 Downmodulation von Rezeptoren als Negativkontrolle

Bei der Chemokinrezeptorfärbung wurde in dieser Arbeit häufig auch die sog. „Downmodulation“ des Rezeptors als Negativkontrolle verwendet. Man nutzt dabei die spezifische Internalisierung des Rezeptors nach Ligandbindung (Mack, 2000) aus. Dieser Prozess läuft bei einer Temperatur von 37°C ab. Dabei erscheint der Rezeptor nach etwa 45 min wieder auf der Zelloberfläche. Überführt man die behandelte Probe jedoch nach 30 min auf Eis, so wird dieser Recycling-Prozess unterbrochen und der Rezeptor bleibt internalisiert. Die Downmodulation fand vor der jeweiligen Färbung statt.

4.6.5 Erythrozytenlyse

Bei Proben, die eine hohe Anzahl an Erythrozyten enthalten (v. a. Blut und Milzzellsuspensionen), wurde eine Erythrozytenlyse vorgenommen. Dazu wurde die Lyselösung der Firma Beckton Dickinson (FACSLysis) eingesetzt. Dabei werden die Erythrozyten laut Herstellerangaben durch milde hypotonische Bedingungen lysiert. Gleichzeitig befindet sich < 15 % Formaldehyd in der Lyselösung, womit die Färbung und die Zellen fixiert

werden. Durch die Lyse optimiert man die Aufnahme der Zellen, da weniger irrelevante Einzelereignisse aufgenommen werden.

4.7 Funktionelle Tests mit den rekombinanten Proteinen

4.7.1 Bindungsnachweis der Konstrukte auf mCCR CHO-Zellen

Mit Hilfe der überexprimierenden CHO-Zellen, die auf ihre Oberfläche murines CCR2 oder CCR5 (mCCR) tragen, konnte sowohl die Bindung der scFv, der bsAb und der bsAb-IgG1-Konstrukte für MC21, MC68 und MC69 im Durchflußzytometer nachgewiesen werden. Als Detektionssystem dienten ein muriner anti-His-Tag Antikörper und RPE-markierte $F(ab')_2$-Fragmente R439 gegen Maus-Ig. Als Isotypkontrolle für die scFv wurde entweder PBS oder ein nicht-bindendes Periplasmalysat von E. coli verwendet.

Die jeweils benötigten Zellen wurden geerntet, in 50 µl PBS pro Versuchsansatz gelöst und in eine 96-well Rundbodenplatte pipettiert. Darauf kamen 100 µl des zu untersuchenden Konstruktes: bei scFv das hergestellte Periplasmalysat, bei bsAb und bsAb-IgG der Zellkulturüberstand. Nach kurzem Durchmischen auf einem Plattenschüttler wurde der Ansatz für 1 h auf Eis inkubiert. Nicht gebundene Antikörper und Proteinkonstrukte wurden nach jeder Inkubation durch zweimaliges Waschen entfernt. Der His-Tag Antikörper wurde 2 h inkubiert, gefolgt von der Färbung des murinen His-Tag Antikörpers mit R439 für 45 min. Nach der Inkubation und nochmaligem Waschen wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und mit dem Durchflußzytometer gemessen. Die bsAb-IgG Konstrukte wurden gleich mit R439 gefärbt.

4.7.2 Bindungsnachweis auf Mausblut

Zum Bindungsnachweise der Konstrukte an ihrem nativen Antigen wurde Mausblut verwendet. 100 µl Mausblut pro Ansatz wurden wie die mCCR CHO-Zellen mit Proteinkonstrukt, anti-His-Tag und/oder R439 gefärbt. Freie Bindungsstellen des His-Tag Antikörpers sowie des R439 wurden mit einer 1:1 Mischung Maus-/Rattenserum (1:10 Verdünnung) für 10 min geblockt. Darauf folgte die Direktfärbung der Zellen mit folgenden Antikörpern: CD11b-FITC, CD8-Tricolor und CD4-APC. Mit diesen Antikörpern lassen sich die Zellpopulationen identifizieren, die über CCR2, CCR5 bzw. CD3 verfügen: T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten (s. a. 1.2.3 und 1.3.1). Wie jede Probe, die eine große Anzahl an Erythrozyten enthält, wurde auch hier eine Lyse durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Lyse in 200 bis 300 µl PBS resuspendiert und im Durchflußzytometer aufgenommen. Für die scFv und

bsAb wurde CHO-Medium als Kontrolle verwendet, bei den bsAb-IgG hingegen wurde ein Maus-IgG1 Antikörper eingesetzt.

4.7.3 *In vitro* Lyse- und Aktivierungsassays mit CHO-Zellen

Die Funktionalität der bispezifischen Konstrukte wurde mit Lyse- und Aktivierungsversuchen getestet. Als Zielzellen für die *in vitro* Lyse dienten die mCCR CHO-Zellen, als Effektoren wurden T-Zellen aus der Mausmilz isoliert. Diese beiden Zellpopulationen wurden wie nachfolgend beschrieben präpariert und in einem Verhältnis von 5:1 Effektorzellen versus Zielzellen eingesetzt. Es folgte eine 24 h respektive 48 h Inkubation mit oder ohne Protein-Konstrukte in 96-well Rundbodenplatten bei 37°C und 5 % CO_2.

Zur Analyse der Cytotoxizität wurden die Zellen kurz vor der Messung im Durchflußzytometer mit Propidium Iodid (PI) (10 µg/ml) gefärbt. PI ist ein Farbstoff, der in DNA interkaliert, aber bei kurzer Färbung nicht membrangängig ist. Nur bei toten oder sterbenden Zellen, deren Zell- und Kernmembran nicht mehr intakt ist, lässt sich DNA mit PI anfärben. Zur besseren Abgrenzung von den Target-Zellen und Effektorzellen wurden die T-Zellen mit CD45-FITC markiert.

Für die Untersuchung zur Aktivierung der T-Zellen wurden die Marker CD25-PE, CD8-Tricolor und CD4-APC verwendet. CD8 und CD4 diente zur Unterscheidung der T-Zellpopulationen. CD25 ist ein Rezeptor, der nach Aktivierung von T-Zellen über den CD3-Rezeptor stark exprimiert wird.

4.7.4 Isolation von T-Zellen mittels „Magnetic Beads“

In den Lyse- und Aktivierungsversuchen mit den rekombinanten Proteinen wurden T-Zellen als Effektorzellen verwendet. Die Zellisolation fand durch Antikörper statt, die an magnetische Kügelchen (sog. „Beads“) gekoppelt waren. Diese Arbeiten wurden nach den Angaben der Firma Miltenyi durchgeführt.

Aus einer Mausmilz wurde eine Zellsuspension hergestellt, die mit den „Beads“ inkubiert wurde. Die so markierte Zellsuspension wird anschließend auf eine Säule gegeben, die an einem starken Magneten hängt. Alle mit „Beads“ markierten Zellen sind nun magnetisch und bleiben somit bei einem Waschvorgang durch das angelegte magnetische Feld in der Säule hängen. Man kann diese Methode sowohl für eine Negativ- als auch eine Positivselektion von Zellen nutzen. Die T-Zellen wurden mit CD90, CD4 und CD8 Microbeads positiv selektioniert, d. h. die gewünschten Zellen verbleiben in der Säule und werden nach dem Entfernen des magnetischen Feldes aus der Säule mit Puffer eluiert. Die Isolation der T-Zellen fand unter sterilen Bedingungen statt.

4.8 Tierversuche

Alle Tierversuche fanden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzrechts statt. Die Behandlung der Balb/c-Mäuse (s. a. 5.4.1) und der SNF1-Mäuse (s. a. 5.4.2) wurden im Rahmen des Tierversuchsantrags mit dem Aktenzeichen 211-2531-25/2000 durchgeführt.

4.8.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der Tiere erfolgte in der offenen Haltung des Instituts für physiologische Chemie und Tierernährung der tiermedizinischen Fakultät der LMU München. Verantwortlich dafür waren Herr Dr. Joseph Cihak und seine TierpflegerInnen.

4.8.2 Organentnahme

Für die Organentnahme wurden die Tiere ausschließlich durch eine Dislokation der Halswirbel getötet.

4.8.2.1 Narkotisierung

Für die Blutabnahme wurden die Tiere durch eine antagonisierbare Injektionsnarkose anästhesiert. Die Narkose enthält drei Bestandteile: ein Schmerzmittel (Fentanyl 0,05 mg/kg), ein Muskelrelaxans (Medetomidin 0,5 mg/ml) und ein Schlafmittel (Midazolam 5 mg/kg). In einer zweiten Lösung sind die jeweiligen Antagonisten gemischt: Naloxon (1,2 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Atipamezol (2,5 mg/kg). Die Narkose wird den Tieren intraperitoneal injiziert, der Antagonistenmix wird subkutan gegeben.

4.8.2.2 Blutabnahme

Die Blutabnahme bei den Mäusen erfolgte nach der Narkotisierung. Mit Hilfe einer Heparin-beschichteten Glaskapillare wurden die retrobulbären Gefäße der Maus punktiert und das Blut in EDTA-Röhrchen getropft.

4.8.3 Herstellung von Zellsuspensionen aus Milz und Leber

Alle Organverarbeitungen fanden soweit nicht anders vermerkt auf Eis statt, um Proteaseaktivitäten zu unterbinden. Für den Fall einer Primärkultur (z. B. Lyseassay) wurde unter sterilen Zellkulturbedingungen gearbeitet.

Die Milz und die Leber besitzen kein starkes Bindegewebe, weswegen einfaches mechanisches Zerkleinern des Organs zur Herstellung einer Zellsuspension ausreicht. Aufgrund der hohen Lymphozytenzahlen ist die Milz

für Zellisolation und -analysen sehr geeignet. In der Leber befindet sich eine vergleichsweise hohe Anzahl an $CCR2^+$ T-Zellen.

Das entnommene Organ wurde jeweils in 10 ml eiskaltem RPMI 1640 Medium in einer Petrischale mit zwei Pinzetten zerkleinert. Größere Gewebestücke, sowie Fettansammlungen wurden mit der Pinzette entfernt. Die Suspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension einmal für 5 min bei 1500 U/min in RPMI-Medium gewaschen. Für die Isolation von T-Zellen durch „Beads“ wurde die Suspension noch über einen Filter der Firma Miltenyi filtriert, um eine mögliche Verstopfung der Säule durch Fettpartikel zu vermeiden. Im Anschluss daran wurde die Suspension nochmals in Medium gewaschen und je nach Weiterverarbeitung (Zellisolation, FACS-Färbung) resuspendiert.

4.8.4 Nierenzellsuspension

Die kapsuläre Struktur der Niere und das starke Bindegewebe erfordern eine differenziertere Präparation des Organs für eine Zellsuspension. Neben der mechanischen Aufarbeitung erfolgte hier auch noch ein enzymatischer Verdau des Bindegewebes. Die Inkubationszeiten der Gewebeverdaue mussten hier genau eingehalten werden, um einen zu starken Abbau von Oberflächenproteinen auf den zu untersuchenden Zellen zu vermeiden.

Nach der Organüberführung in 10 ml Paris-Puffer wurde die Zerkleinerung der Niere mit einem Skalpell vorgenommen. Die zerschnittene Niere wurde nochmals mit einer Pinzette zerpflückt. Nach zweimaligem Waschen für 5 min bei 2500 U/min und RT in HBSS erfolgte der erste Verdau mit 5 mg Kollagenase (1 mg/ml) für 20 min bei 37°C. Die Suspension wurde nach zwei Waschschritten mit 5 ml HBSS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} und 2 mM EDTA ebenfalls 20 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 500 U/min abzentrifugiert, der Überstand in einem vorgekühlten 15 ml Röhrchen gelagert und das Pellet einem zweiten Kollagenase-Verdau unterzogen.

Nach dem Verdau wurde die Suspension dreimal durch eine 20 G Kanüle und eine 10 ml Spritze aufgezogen und wieder ausgespritzt, um die Zellen durch die Scherkräfte zu vereinzeln. Die Zellsuspension wurde mit dem gelagerten Überstand vereinigt und zwei Mal für 5 min und 1500 U/min in HBSS gewaschen. Jede präparierte Niere wurde in 1 ml HBSS resuspendiert und zur FACS-Färbung verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung der single-chain Fragmente der Antikörper

5.1.1 Klonierung der variablen Domänen von MC21, MC68 und MC69

Mit der isolierten RNA der Hybridomzellen MC21, MC68 und MC69 wurde eine RT-PCR durchgeführt, um die variablen Antikörper-Domänen zu klonieren. Die Primer zum Amplifizieren der variablen Ketten wurden nach bekannten Sequenzen aus der PubMed für Ratten IgG 2b synthetisiert. Dabei wurden die Sequenzen so ausgewählt, dass die Primer im 5´-Bereich der Frameworkregion 1 an möglichst viele bekannte variable Domänen binden. Da in der 5´-Region der schweren und leichten Kette eine gewisse Variabilität bestand, war es notwendig, z. T. degenerierte Primer herzustellen. Dies bedeutet, dass die Primerlösung Primer enthält, die an der gleichen Position unterschiedliche Basen aufweisen. Die Primer, mit denen V_H und V_L der Antikörper amplifiziert werden konnten, sind in Tabelle 5-1 gezeigt.

Tabelle 5-1: V_H und V_L Primer, mit denen die variablen Antikörperdomänen von MC21, MC68 und MC69 kloniert wurden. Für die gemischten Basen wurden folgende Abkürzungen verwendet: S = C + G; R = A + G; W = A+T; K = T + G; Y = C + T.

Antikörperdomäne	Primername	Sequenz
MC21-VH	5´-VH7-Rat	CAG GTG CAR CTG MAG GAG TCA GG
MC21-VL	5´-VL4-Rat	GAC RTY SWG ATG ACY CAA TCT CC
MC69-VH	5´-VH7-Rat	CAG GTG CAR CTG MAG GAG TCA GG
MC69-VL	5´-VL4-Rat	GAC RTY SWG ATG ACY CAA TCT CC
MC68-VL	5´-VL1-Rat	GAC RTY SWG ATG ACY CAG TCT CC
konstante Region der schweren Kette	3´-Rat-HC1	ACA GGG CTC CAG AGT TCC A
konstante Region der leichten Kette	3´-Rat-LC1	TAC AGT TGG TGC AGC ATC AG

Das Ergebnis der Amplifikationen der variablen Domänen ist am Beispiel des monoklonalen Antikörpers MC69 gegen murinen CCR5 in Abbildung 5-1 dargestellt. Zu erkennen sind die unterschiedlichen Größen der schweren und

der leichten Domänen. Während für MC21-V_H, -V_L und MC68-V_L die PFU-Polymerase verwendet werden konnte, ließen sich beide variablen Domänen von MC69 nur durch die weniger empfindliche Taq-Polymerase amplifizieren. Die schwere Kette des MC68 Antikörpers konnte hingegen mit der Fishing-PCR nicht amplifiziert werden. Diese wurde durch die Erstellung einer cDNA-Bank und einer anschließenden Kolonie-PCR isoliert (s. a. 5.1.2).

Die amplifizierten DNA-Banden wurden aus dem Low-Melting-Agarosegel isoliert, „blunt-end“ in den pCR-Skript-Vektor kloniert und in E. coli JM83 transformiert. Zur Überprüfung der Subklonierung wurde eine Kolonie-PCR angewandt und anschließend von je zwei positiven Subklonen das Plasmid präpariert und die eingebaute DNA sequenziert.

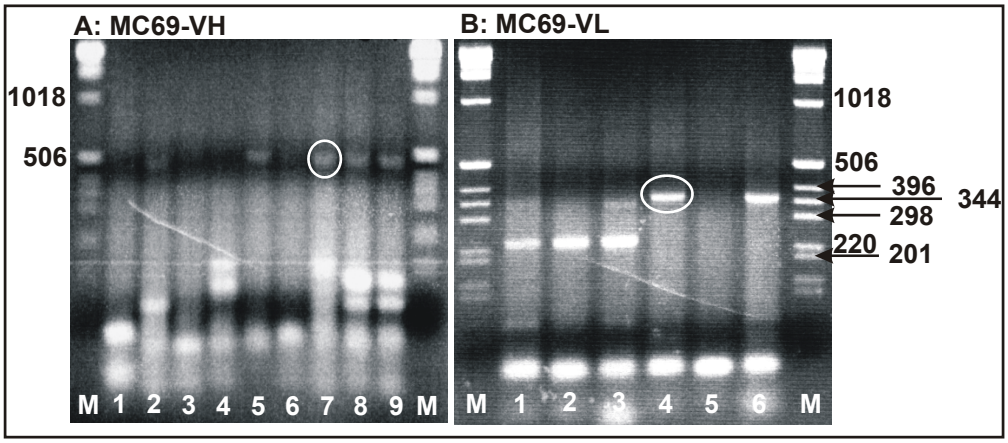

Abbildung 5-1: Amplifikation der schweren (A) und leichten (B) variablen Domänen des monoklonalen Antikörpers MC69. Die für die Klonierung isolierten Banden sind durch einen Kreis markiert. Die Zahlen an den Rändern geben die Größe des Markers (M) an.

5.1.2 Klonierung von MC68-V_H mittels cDNA-Bank

Die Fishing-PCR ergab für MC68-V_H kein Ergebnis. Um dennoch die variable Region zu erhalten, wurde mit Hilfe des Superscript Plasmid Systems der Firma LifeTechnologies eine cDNA-Bank der MC68-Hybridomzellen erstellt (s. a. 4.1.4). Dabei enthielt jeder Klon eine bestimmte cDNA. Die Klone wurden durch eine Kolonie-PCR auf die Größe ihres Inserts untersucht. Als 5`-Primer wurde ein Vektorprimer verwendet (M13/pUC Reverse). Als 3´-Primer fungierte der 3´-Rat-HC1 Primer, der in der C_H1-Region des Antikörpers bindet. Das Insert wurde durch den gerichteten Einbau über Sal1 und Not1 in 3´-5´-Richtung in den Vektor eingebaut. Die Position der Primer für die Kolonie-PCR, sowie die Größe der erwartenden Produkte sind in Abbildung 5-2 nochmals dargestellt. Bei einer amplifizierten Bande von ~750 bp wurde eine zweite PCR mit dem gleichen Klon angesetzt, diesmal jedoch mit dem 3´-Rat-HC2 Primer. Dieser

Primer bindet 100 bp weiter innen als der 3´-Rat-HC1 Primer. Somit ergab die PCR ein Produkt von nur noch ~650 bp.

Nachdem mögliche positive Klone mit der zweiten PCR geprüft worden waren, wurde zusätzlich noch ein Restriktionsverdau vorgenommen. Dadurch dass sich die variable Region des Antikörpers im 5´-Bereich befindet, das Priming für die Erstellung der cDNA über den Poly-A Schwanz der mRNA aber am 3´-Bereich beginnt, musste das Insert die volle Länge der mRNA von 1700 bp enthalten, um sicher zu gehen, das sich der gesamte 5`- Bereich des Antikörpers in der Sequenz befindet. Bei einem Verdau einer Mini-Plasmidpräparation mit HindIII und EcoR1 muss man im Falle der vollen Länge der cDNA ein Produkt von 1700 bp erhalten, dies entspricht der Länge einer schweren Antikörperkette. Mit Hilfe dieser drei Verifizierungsmethoden konnte der Klon Nr. 398 als ein möglicher Kandidat für ein passendes Insert identifiziert werden.

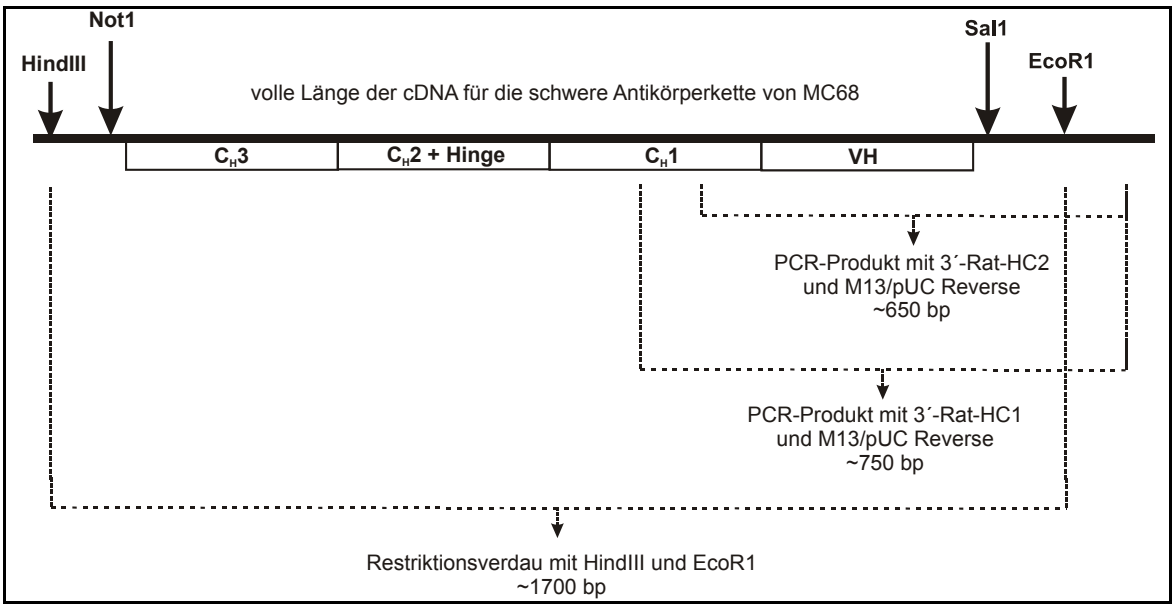

Abbildung 5-2: Position der Screening-Primer für die cDNA-Bank von MC68, sowie die Größe der Produkte in einer Kolonie-PCR.

In Abbildung 5-3 ist die PCR mit 3´-Rat-HC1 und im Vergleich dazu mit 3´-Rat-HC2 für Klon 398 gezeigt. Das Produkt mit 3´-Rat-HC1 hat etwa ~750 bp, mit dem 3´-Rat-HC2 Primer ist das Produkt um etwa 100 bp kürzer. Auch der anschließende Restriktionsverdau des Plasmids mit EcoR1 und HindIII zeigt eine passende Bande für eine Volllängen-cDNA einer schweren Antikörperkette.

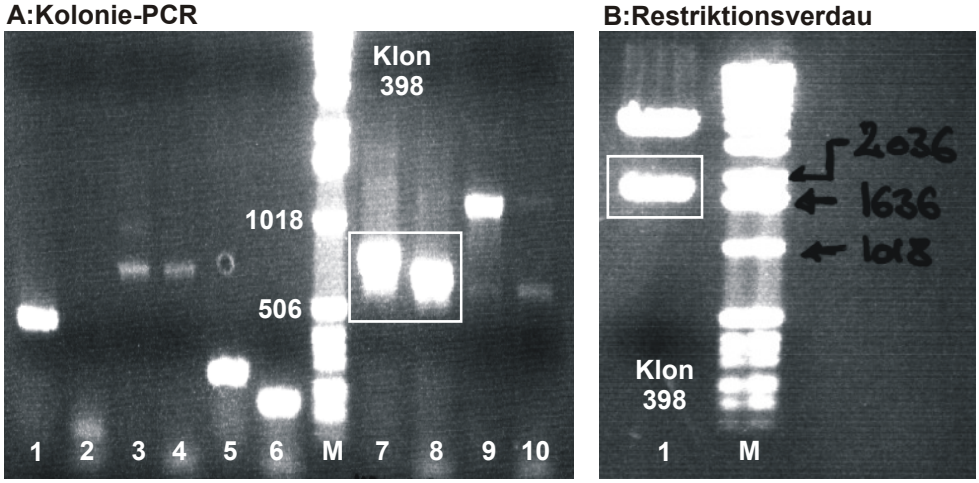

Abbildung 5-3: A: Kolonie-PCR mit 3´-Rat HC1 (Spur 7) und 3´-Rat HC2 (Spur 8) für Klon 398. B: Restriktionsverdau des Klons 398 mit EcoR1 und HindIII. Ergebnis ist ein Produkt von etwa 1700 bp, das der Größe der mRNA einer schweren Antikörperkette entspricht.

Klarheit über die Art des Inserts wurde schließlich durch die Sequenzierung und einen Sequenzvergleich des Klons 398 mit einer Nukleotid-Datenbank (BLAST) gewonnen (s. a. 5.1.3).

5.1.3 Sequenzierung der V_H- und V_L-Dömanen im Vektor

Die Sequenzen der subklonierten V-Segmente wurden von der Firma MWG Biotech mit den Vektorprimern T3 und T7 des pCR-Skript-Vektors erstellt. Für MC68-V_H wurden die Sequenzierprimer des pSPORT1-Vektors verwendet. Um festzustellen, ob es sich bei den eingebauten DNA-Fragmenten um variable Antikörperdomänen handelt, wurden die Sequenzen mit bekannten V-Domänen in einer Nukleotid-Datenbank (BLAST) verglichen. Ein Teil des Vergleichs für MC69-V_H ist in Abbildung 5-4 gezeigt.

Anschließend erfolgte eine Analyse der jeweiligen Sequenz mit der Software Sequence Navigator. Die Aminosäuresequenz wurde ermittelt und damit die hypervariablen Bereiche der Antikörper definiert. Die Sequenzen für MC21 und MC69 sind in Abbildung 5-5 und Abbildung 5-6 gezeigt. Dargestellt sind bereits die single-chain Fragmente der beiden Antikörper, bestehend aus der V_L-Kette, gefolgt von der V_H-Domäne. Die hypervariablen Bereiche und der Aminosäure-Linker zwischen V_L und V_H sind durch Rahmen hervorgehoben.

Die Sequenz des MC68scFv ist nicht gezeigt, da dieses Produkt nach den Bindungsanalyse (s. a. 5.1.6) nicht mehr zu einem bsAb weiter entwickelt wurde.

```
>gi|4323162|gb|AF098323.1|AF098323

Rattus norvegicus immunoglobulin heavy chain variable region

(VHHAR.2) gene, partial cds
Length = 468

 Score =  452 bits (228), Expect = e-124
 Identities = 276/292 (94%)
 Strand = Plus / Plus

aggtgcagctgcaggagtcaggggaggcttagtgcagcctggaaggtccctgaaactct
||||||||||  |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
aggtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgcagcctggaaggtccctgaaactct

cctgtgcagcctcaggattcagtttgagtgactatatcatggcctgggtccgccaggctc
|||||||||||||||||||| ||| |||||||||| ||||||||||||||||||||||
cctgtgcagcctcaggattcactttcagtgactataacatggcctgggtccgccaggctc

caaagaagggtctggagtgggtcgcaaccattgcttatgatagtagtagtagtttctatc
|||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||| ||||||| | || |||||
caaagaagggtctggagtgggtcgcaaccattagttatgatggtagtagcacttactatc

gagactccgtgaggggccgattcaccatctccagagataatgcaaaaaacaccctatatt
|||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
gagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagataatgcaaaaagcaccctatacc

tgcaaatggacagtctgaggtctgaggacacggccacttattactgtacaag
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
tgcaaatggacagtctgaggtctgaggacacggccacttattactgtacaag
```

Abbildung 5-4: Sequenzvergleich der klonierten MC69-V_H DNA mit einer bekannten Sequenz der Nukleotiddatenbank BLAST. Dieser Vergleich ergab 94 % Identität der klonierten DNA mit einer variablen Region einer schweren Antikörperkette der Ratte (Rattus norvegicus).

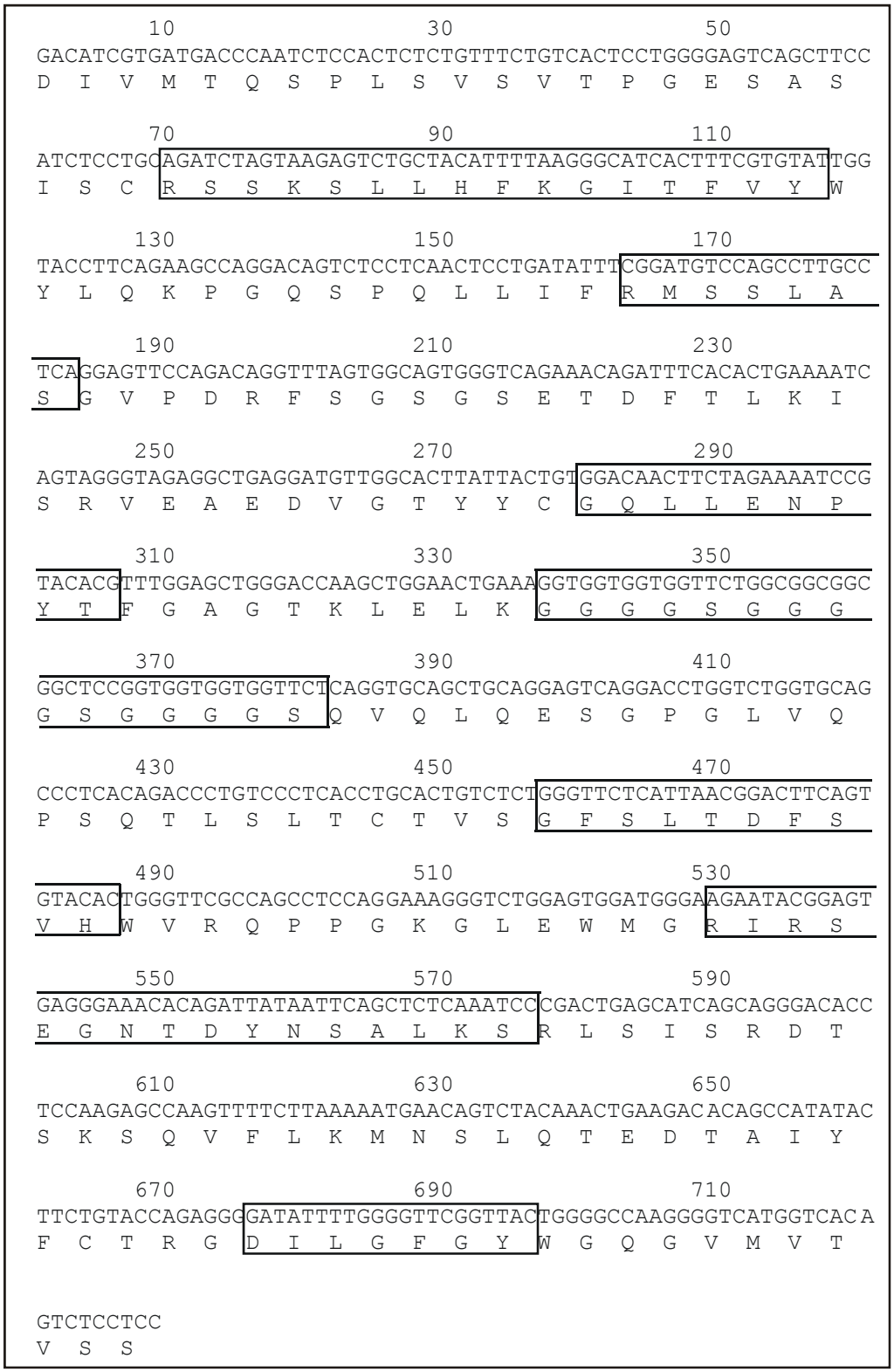

Abbildung 5-5: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des MC21scFv. Gekennzeichnet sind die hypervariablen Bereiche der variablen Domänen und der Aminosäurelinker: V_L mit CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, Linker, V_H mit CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3.

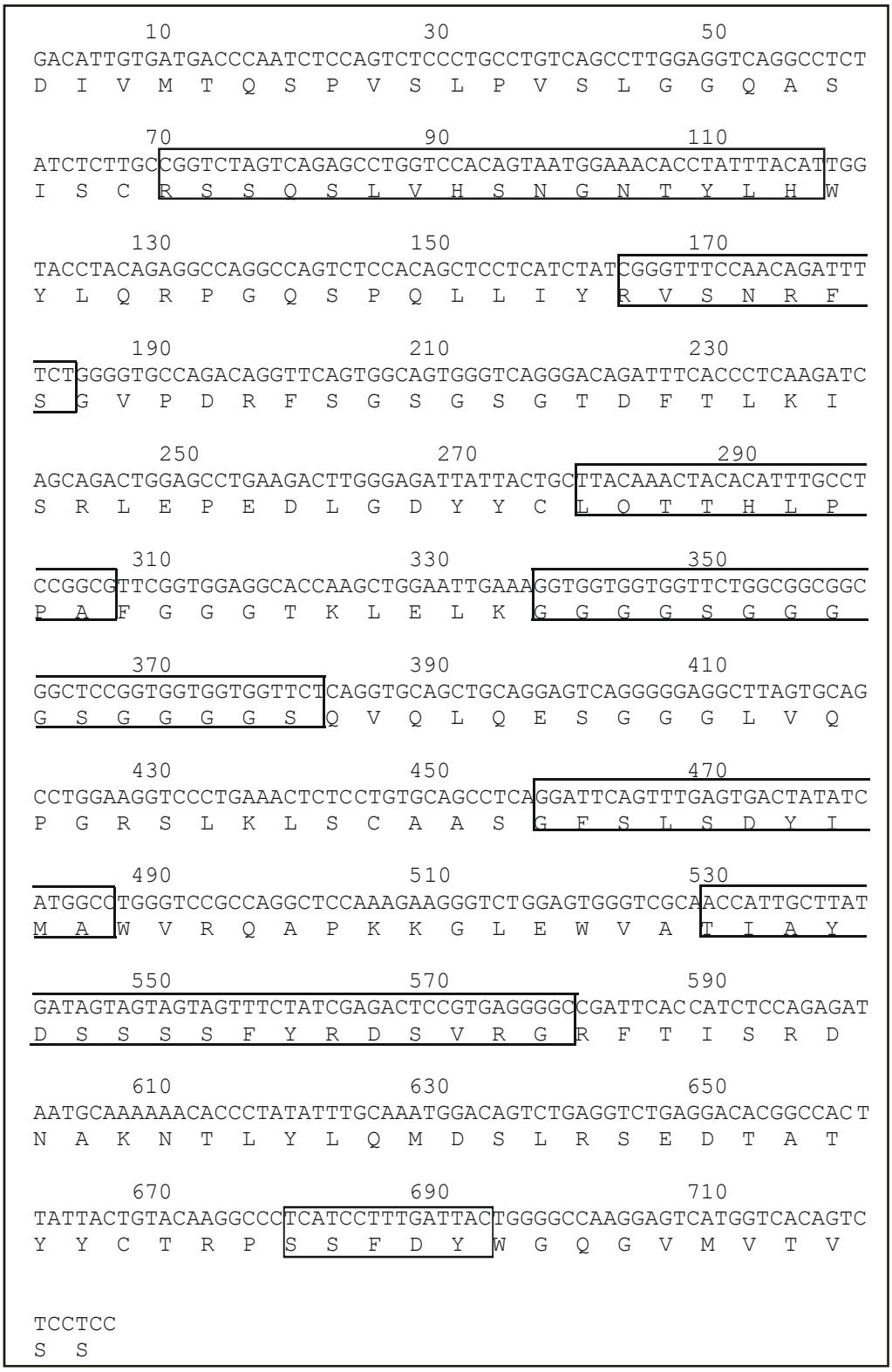

Abbildung 5-6: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von MC69scFv. Gekennzeichnet sind die hypervariablen Bereiche der variablen Domänen und der Aminosäurelinker: V_L mit CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, Linker, V_H mit CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3.

5.1.4 Fusion von V_H und V_L zu single-chain Fragmenten (scFv)

Um aus den V-Domänen der einzelnen Antikörper scFv herzustellen und diese in den bakteriellen OmpA-Expressionsvektor zu klonieren, mussten zunächst die nötigen Schnittstellen und der Aminosäure-Linker in die Sequenzen eingeführt werden.

Dazu wurden Primer für V_L synthetisiert, die jeweils am 5´-Ende in einem nicht-komplementären Teil eine Fsp1-Schnittstelle enthalten, gefolgt von der jeweils komplementären 5´-V_L-Sequenz. Der 3´-Primer begann mit der komplementären 3´-V_L-Sequenz, an die die Sequenz für 2/3 des Linkers angereiht wurde. Der 5´-V_H-Primer begann mit der $(Gly_4Ser_1)_2$ Linker-Sequenz, gefolgt von der 5´-V_H-Sequenz. Der jeweilige 3´-V_H-Primer wurde aus der 3´-V_H-Sequenz erstellt, gefolgt von einer His_6-Sequenz, einem Stop-Codon und der Sal1-Schnittstelle. Die Primer sind in Tabelle 4-3 aufgeführt. Mit diesen Primern wurden die jeweiligen Domänen aus dem Vektor amplifiziert und über ein Low-Melting-Agarosegel isoliert (s. a. Abbildung 5-7).

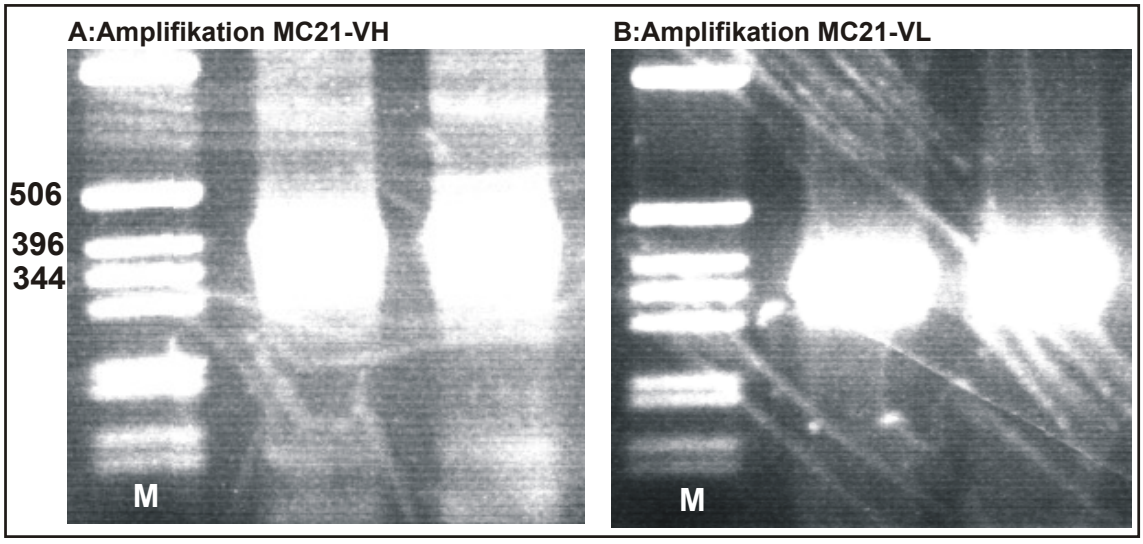

Abbildung 5-7: Amplifikations-PCR für die V-Domänen von MC21.

Die PCR-Produkte wurden nach der Isolation in eine Fusions-PCR eingesetzt. Entscheidend bei dieser PCR war, dass die eingeführten Linkersequenzen in V_L und V_H in der jeweils endständigen Gly_4Ser_1-Sequenz komplementär waren. Die Annealing-Temperatur wurde so gewählt, dass die Linkersequenzen zu einem Doppelstrang fusionierten und gleichzeitig als Primer für die Elongationsphase dienten. Um die Elongation noch zu optimieren, wurden der PCR noch der 5´-V_L-Primer und der 3´-V_H-Primer zugesetzt. Das Ergebnis einer solchen

Fusions-PCR wird in Abbildung 5-8 gezeigt. Die Länge der jeweiligen PCR-Produkte ist in Tabelle 5-2 beschrieben.

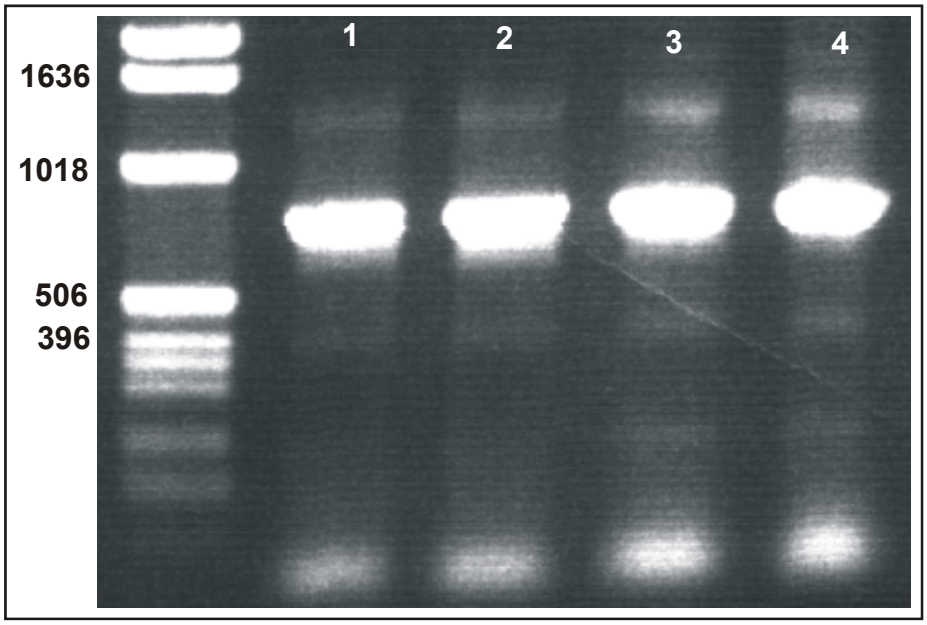

Abbildung 5-8: Fusions-PCR für V_L und V_H von MC21. In den Spuren 1 bis 4 wurde jeweils ein 20 µl Aliquot einer PCR-Reaktion aufgetragen. Auf Höhe des 396 bp Markers sind Reste des Ausgangsmaterials (Amplifikate von V_H und V_L) der PCR zu erkennen.

Tabelle 5-2: Größen der DNA-Konstrukte in Basenpaaren (bp): Angegeben sind die jeweilige Anzahl der Nukleotide ohne den His_6-Tag und das Stop-Codon.

Domäne	MC21	MC69	2c11
V_L	339	336	342
V_H	345	345	354
scFv	729	726	741
bsAb	1485	1482	X

Die PCR-Produkte sind über ein Low-Melting-Agarosegel aufgetrennt worden. Die Banden wurden isoliert und zur Expression des scFv in Bakterien in den OmpA-Vektor subkloniert. Die Subklonierung der Fusions-PCR ist in Abbildung 5-9 schematisch gezeigt.

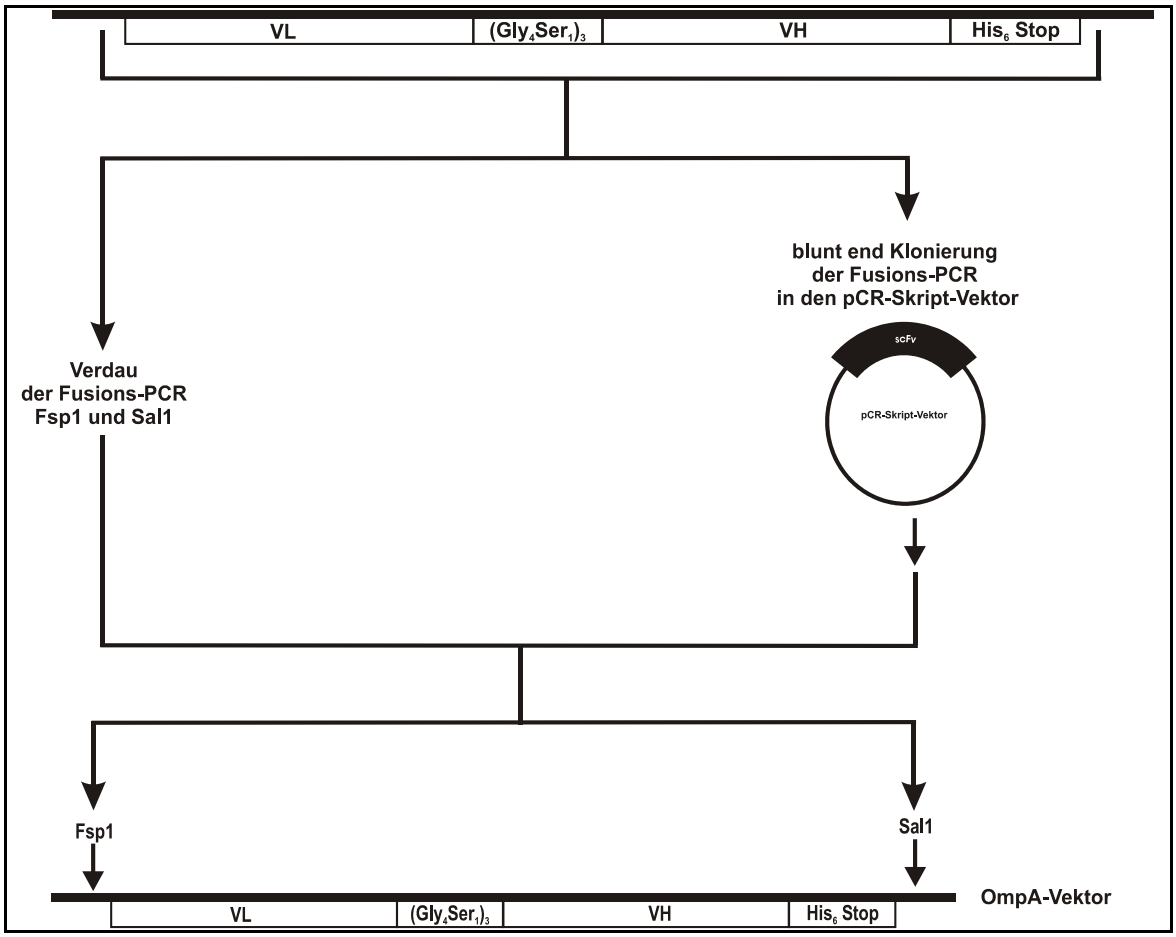

Abbildung 5-9: Subklonierung der Fusions-PCR in den OmpA-Vektor zu Expression der scFv in E. coli.

5.1.5 Expression der single-chain Fragmente in *E. coli*

Für eine schnellere Subklonierung wurde zunächst versucht, die PCR-Fragmente der Fusions-PCR mit Fsp1 und Sal1 zu verdauen und diese in den OmpA-Vektor zu klonieren. Nicht bei jedem scFv war diese Strategie erfolgreich. Das Fusionsprodukt wurde dann erst „blunt-end“ in den pCR-Skript-Vektor eingebaut und die Klonierung mittels Kolonie-PCR verifiziert. Von je zwei positiven Klonen erfolgte eine Midi-Plasmidpräparation, aus der dann das scFv über Fsp1 und Sal1 ausgeschnitten, aufgereinigt und isoliert wurde. Mit dem so erstellten Fragment war die Effizienz der Subklonierung in den OmpA-Vektor weitaus höher als mit den verdauten PCR-Fragmenten (s. a. 4.3); es wurde jedoch eine zusätzliche Subklonierung benötigt.

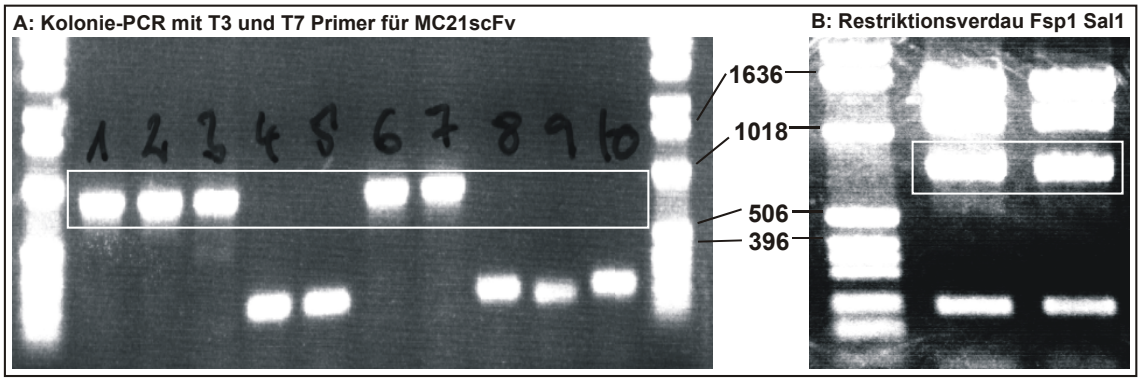

Abbildung 5-10: Subklonierung von MC21scFv über den pCR-Skript-Vektor. A: Kolonie-PCR der „blunt-end" Klonierung des Fusionsproduktes. Die positiven Klone mit einer Größe von ~800 bp sind weiß umrahmt. B: Präparation des scFv-Fragments mit Fsp1 und Sal1 aus dem pCR-Skript-Vektor zur Subklonierung in den OmpA-Vektor.

Der Erfolg der Subklonierung in den OmpA-Vektor wurde bei den positiven Klonen zuerst über eine Kolonie-PCR mit den Vektorprimern 5´-pUC-Reverse und 3´-FvLE durchgeführt und danach durch einen Testverdau einer Mini-Plasmidpräparation bestätigt. Verdaut wurde mit Fsp1 und HindIII, anstelle von Sal 1. Diese Schnittstelle befindet sich direkt im Anschluss an die Sal1-Sequenz im Vektor. Der Vorteil von HindIII lag in der Verwendung des gleichen Puffers wie für Fsp1, wodurch ein Coverdau angewandt werden konnte.

Zur Expression der scFv wurde je ein positiver Klon angeimpft, am nächsten Tag die Proteinexpression durch IPTG induziert und ein Periplasmalysat (PPL) hergestellt (s. a. 4.4.1).

Das scFv des CD3-bindenden Antikörpers 145-2c11 wurde uns freundlicherweise von Dr. K. Thielemans (De Jonge, 1998) zur Verfügung gestellt. Für das Fragment wurde nur ein 5´-Primer mit der Fsp1 Schnittstelle und der komplementären V_L-Sequenz und ein 3´-Primer mit der V_H- und der His6-Stop-Sal1-Sequenz hergestellt. Mit diesen Primern wurde das Fragment aus dem alten Vektor amplifiziert und in den Expressionsvektor OmpA eingebaut.

5.1.6 Bindungsanalyse der single-chain Fragmente

Die Bindung von MC21scFv, MC68scFv und MC69scFv wurden zuerst auf den CHO-Zellen getestet, die den jeweiligen murinen Chemokinrezeptor auf ihre Oberfläche exprimieren. In Abbildung 5-11 ist zu erkennen, dass sowohl das MC21-Fragment als auch das MC69-Fragment eine gute Bindung an den Chemokinrezeptor zeigen. Auch das MC68-Fragment bindet an seinen Rezeptor, aber deutlich schwächer. Als Negativkontrolle wurde ein PPL eines nicht-exprimierenden E. coli bzw. PBS verwendet.

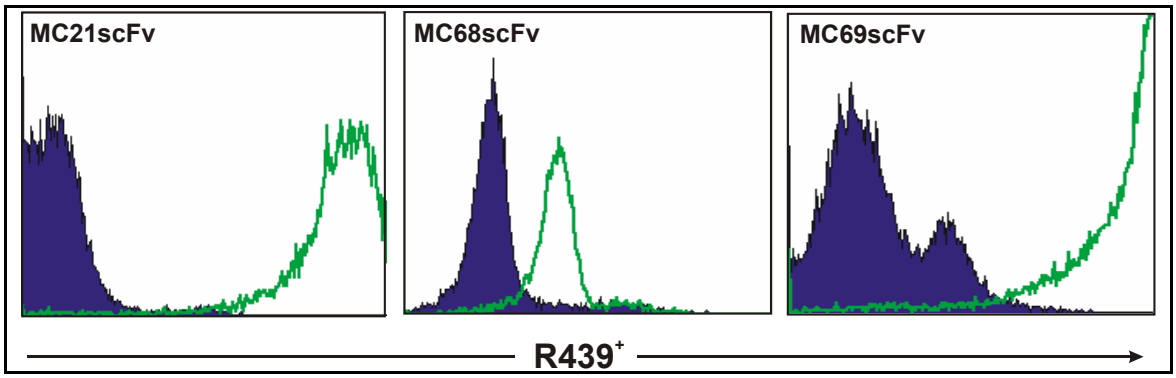

Abbildung 5-11: Bindung der scFv an ihren jeweiligen Rezeptor auf überexprimierenden CHO-Zellen. Sowohl MC21scFv als auch das MC69scFv zeigen eine starke Bindung an die CHO-Zellen (grüne Linie). Im Vergleich dazu ist die Bindungsstärke des MC68scFv niedrig.

Zur Überprüfung unspezifischer Bindungen wurden die Fragmente auf den jeweils „falschen“ CHO-Zellen getestet, also MC68scFv und MC69scFv auf mCCR2 CHO-Zellen und MC21scFv auf mCCR5 CHO-Zellen. Hier zeigten jedoch alle Fragmente keine Bindung.

Bei den benutzten CHO-Zellen handelt es sich um stabil transfizierte Zellen, die den entsprechenden Rezeptor in großer Menge an ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Situation entspricht jedoch nicht dem natürlichen Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren 2 und 5. Außerdem standen für das 2c11-Fragmente keine überexprimierenden CHO-Zellen zur Verfügung. Deswegen wurde die Bindungsfähigkeit der scFv auf den nativen Antigenen getestet. Als Probe diente Blut von Balb/c-Mäusen. Zunächst erfolgte für jedes Fragment eine Sekundärfärbung mit Hilfe des Histidin-Tags am C-Terminus der Proteine, gefolgt von einer Direktfärbung der Oberflächenantigene CD11b, CD8 und CD4. Die Direktfärbung diente zur Definition der einzelnen Zellpopulationen (T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen) zur Korrelation mit der scFv-Färbung.

Murines CCR2 wird wie bereits in 1.2.3 gezeigt, auf 90 % der $CD11b^+$ Monozyten exprimiert. Das scFv von MC21 bindet an diese Zellpopulation, wie aus Abbildung 5-12 zu erkennen ist. MC69scFv bindet auf $CD11b^{medium}CCR5^+$ NK-Zellen und das 2c11-Fragment auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Nur das Fragment des MC68 Antikörpers zeigte in diesem Versuch keine Bindung an $CD11b^{medium}CCR5^+$ NK-Zellen, wobei dieses scFv bereits eine schwache Bindung an mCCR5 CHO-Zellen aufwies.

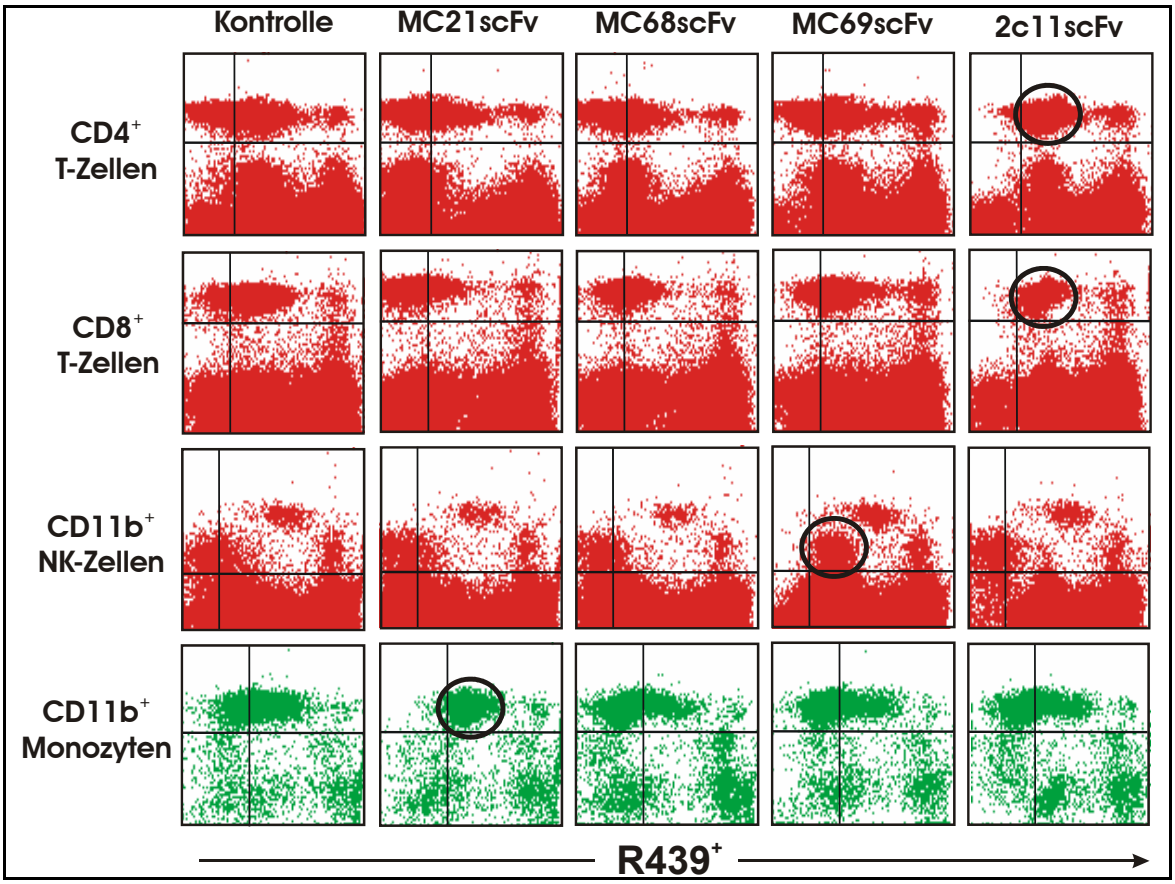

Abbildung 5-12: Bindung der scFv für MC21, MC68, MC69 und 2c11 auf Mausleukozyten. Die positiven Populationen sind durch Kreise hervorgehoben. Dabei bindet MC21scFv CCR2$^+$ Monozyten, MC69scFv CCR5$^+$ NK-Zellen und 2c11scFv CD3$^+$ CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen. Nur das MC68scFv zeigt keine Bindung auf seinem Antigen CCR5 auf NK-Zellen. Als Kontrolle wurde ein nicht-bindendes Periplasmalysat von E. coli JM83 eingesetzt.

5.2 Erzeugung der bispezifischen Antikörper

Nachdem sich in den Bindungsanalysen der scFv gezeigt hatte, dass das MC68scFv schlechtere Eigenschaften aufweist als das MC69scFv, wurde die Herstellung eines bispezifischen Konstruktes mit MC68 nicht weiter verfolgt.

Für die Fusion der scFv zu bispezifischen single-chain Antikörpern (bsAb) wurde eine neue Klonierungsstrategie angewendet. Über ein weiteres Set an Primern wurden in die scFv zunächst neue Schnittstellen, sowie ein weiterer Aminosäure-Linker aus einer Abfolge von Gly_4Ser_1 eingefügt. Die Klonierungsstrategie zur Herstellung der bsAb ist in Abbildung 5-13 schematisch gezeigt.

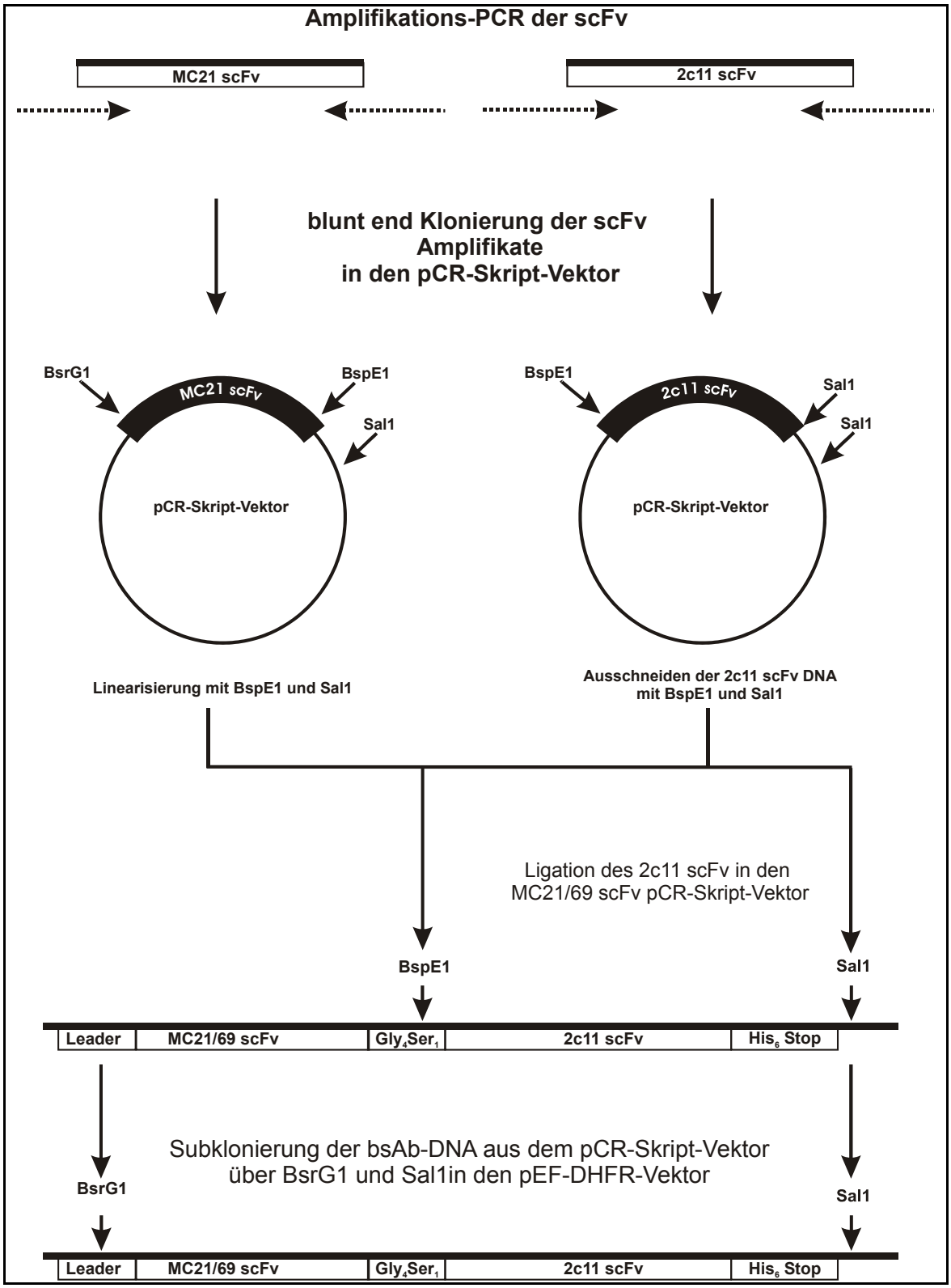

Abbildung 5-13: Schema zur Klonierungsstrategie der bsAb in den pCR-Skript-Vektor und zur Subklonierung in den pEF-DHFR-Vektor.

5.2.1 Fusion der single-chain Fragmente

Nach der Amplifikation aller drei scFv (MC21, MC69 und 2c11) mit den neuen Primern wurden die DNA-Fragmente „blunt-end“ in den pCR-Skript-Vektor subkloniert. Um für die weitere Klonierung der Konstrukte in den eukaryontischen Expressionsvektor den Open-Reading-Frame (ORF) nicht zu verändern, musste allerdings für die „blunt-end“ Klonierung auch die richtige Orientierung (5´-3´) der DNA im Vektor garantiert sein. Diese Überprüfung der Klonierung fand mittels einer Kolonie-PCR statt. Als 5´-Primer wurde der jeweilige 5´-BsrG1-V_L verwendet, mit dem das Konstrukt amplifiziert worden war. Der 3´-Primer hingegen stammte aus dem Vektor. Dadurch konnte nur die DNA in der Kolonie-PCR amplifiziert werden, die in einer 5´-3´-Orientierung in den pCR-Skript-Vektor eingebaut war.

Auch die 5´-3´-Orientierung des 2c11scFv musste gewährleistet sein. Am 5´-Ende des 2c11-Fragments befindet sich der Linker mit einer BspE1 Schnittstelle und am 3´-Ende die His6-Stop-Sal1 Sequenz. Im pCR-Skript-Vektor befindet sich im 3´-Bereich nach der „blunt-end“ Klonierungsstelle auch noch eine Sal1 Schnittstelle, die für den weiteren Zusammenbau der bsAb ausgenutzt wurde. Läge das 2c11-Fragment nun in einer 3´-5´-Orientierung im Vektor vor, so würde bereits durch einen Sal1 Verdau ein Fragment aus dem Vektor geschnitten werden. Ein solches Fragment hätte zwei gleiche Enden und ließe sich nicht in einen BspE1 und Sal1 geschnittenen Vektor klonieren. Ein folgender BspE1 Verdau dieses Fragments wäre nicht sehr effizient, da die BspE1 Stelle zu nahe an der Sal1 Stelle des geschnittenen Fragments liegt (s. a. Abbildung 5-13).

Der Linker der beiden scFv für ein bispezifisches Konstrukt besteht aus fünf Aminosäuren, vier Glycine gefolgt von einem Serin. Die codierenden Triplets für diese Aminosäuren kann man so wählen, dass sich in der Sequenz eine BspE1 Schnittstelle befindet. Aus den hergestellten drei pCR-Skript-Vektoren mit den scFv wurden die beiden bispezifischen Konstrukte kloniert. Dafür wurde das 2c11-Fragment mit BspE1/Sal1 ausgeschnitten und in den MC21 bzw. MC69scFv-Vektor eingefügt. Diese beiden Vektoren sind durch einen BspE1/Sal1-Verdau linearisiert worden. Die Subklonierung wurde mittels einer Kolonie-PCR mit den Vektorprimern T3 und T7 überprüft.

5.2.2 Subklonierung in den pEF-DHFR-Vektor und stabile Transfektion der CHO-Zellen

Von den so erstellten bsAb im pCR-Skript-Vektor wurden je zwei Klone für eine Midi-Plasmidpräparation benutzt. Die DNA-Konstrukte wurden mit Sal1 und BsrG1 ausgeschnitten und in den ebenso linearisierten pEF-DHFR-Vektor

ligiert. Für die BsrG1 Präparation der DNA musste ein partieller Verdau angewendet werden, da sich sowohl in der MC21-V_H-Sequenz als auch in der MC69-V_H-Sequenz ebenfalls eine BsrG1 Schnittstelle befindet. Um die optimalen Bedingungen für die Verdauzeit und eingesetzte Enzymmenge zu ermitteln, wurden beide Vektoren zunächst einem Testverdau unterzogen.

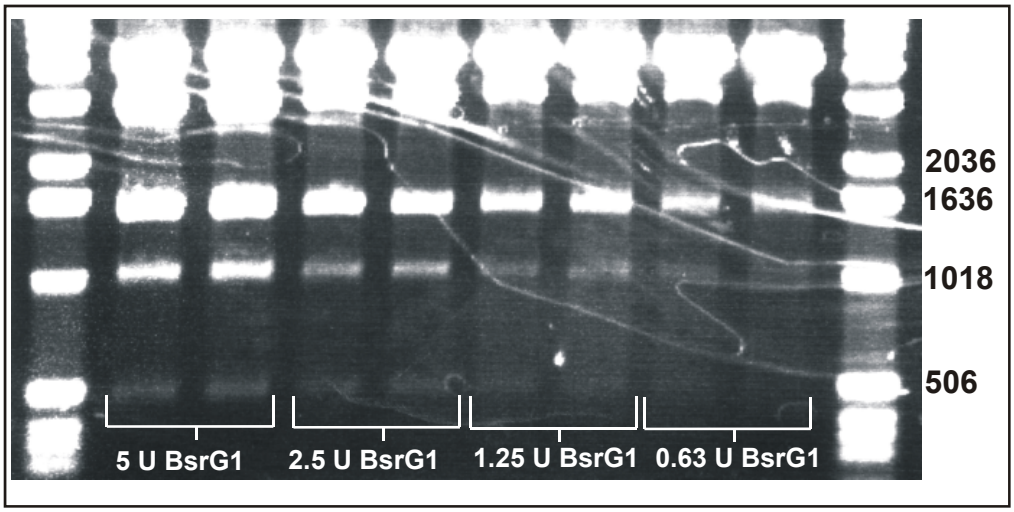

Abbildung 5-14: Partieller BsrG1-Verdau von MC21bsAb mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen. Bei einer Dauer von 15 min wurden verschiedene Enzymkonzentrationen verwendet. Bei 5 U BsrG1 erkennt man, dass zwar das passende Produkt von ~1500 bp entsteht, zusätzlich aber auch ein kleineres Fragment durch die interne BsrG1-Schnittstelle bei ~1000 bp erscheint. Isoliert und subkloniert wurde das Fragment bei ~1500 bp für die Konzentrationen von 5 U und 2.5 U BsrG1.

In der Abbildung 5-14 ist zu erkennen, dass ein Verdau von 15 min bei 37°C mit einer Enzymkonzentration von 5 U genügt, um ausreichend Material für eine Subklonierung zu gewinnen. Die folgende Subklonierung wurde mit dem Testverdau mit den Enzymen EcoR1 und Sal1 überprüft. Die EcoR1 Schnittstelle befindet sich im pEF-DHFR-Vektor im 5´-Bereich vor der BsrG1 Stelle. Sie wurde für den Testverdau zum einen wegen der internen BsrG1 Schnittstellen in den V_H-Segmenten des Antikörpers verwendet und zum anderen ist der Puffer für EcoR1 und Sal1 identisch, d. h. es konnte ein Coverdau angesetzt werden.

Von den positiven Klonen wurde je einer für eine Endotoxin-freie Maxi-Plasmidpräparation ausgewählt. 100 µg der so isolierten Plasmide wurde anschließend mit dem Enzym Nde1 linearisiert, phenolisiert, gefällt und für die stabile Transfektion von CHO-Zellen eingesetzt.

5.2.3 Expression der bispezifischen Antikörper

Vor der MCS des pEF-DHFR-Vektors befindet sich eine eukaryontische Signalsequenz, d. h. an die rekombinanten Antikörper wird eine Proteinsequenz angehängt, die zur Ausschleusung der bispezifischen Konstrukte aus den CHO-Zellen führt. Durch diese Art der Expression wurden die Antikörper in den Zellkulturüberstand sezerniert, aus dem die Konstrukte anschließend über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten.

5.2.4 Aufreinigung der Antikörper-Konstrukte durch Affinitätschromatographie (FPLC)

Zur Aufreinigung wurde eine größere Menge an Überständen gewonnen. Dazu wurden die transfizierten Zellen in Zellkulturflaschen mit drei Böden gehalten. Auf diesen drei Böden wachsen im Vergleich zu normalen Kulturflaschen deutlich mehr CHO-Zellen, wodurch sich das sezernierte Protein stärker anreichert. Die so erhaltenen Überstände wurden durch Zentrifugation von Zelltrümmern getrennt und für erste Bindungs- und Lyseversuche eingesetzt bzw. zur Aufreinigung über FPLC verwendet.

5.2.4.1 Ermittlung der Ni-NTA Menge

Zunächst musste die optimale Ni-NTA Menge ermittelt werden, mit der die gewonnenen Überstände nahezu komplett von den bsAb depletiert werden konnten. Dazu wurden unterschiedliche Menge Ni-NTA zu jeweils 100 ml Überstand gegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Vor und nach der Inkubation des Säulenmaterials mit den Überständen wurde von jeder Probe ein Aliquot von 1 ml entnommen. Mit diesen Aliquots wurde in einer Verdünnungsreihe die Bindung auf mCCR CHO-Zellen im FACS ermittelt. In Abbildung 5-15 ist eine dieser Messungen dargestellt.

Bei der 1:9 Verdünnung beginnt der lineare Bereich der Verdünnungsreihe. Dort hat der Überstand mit 2 ml Ni-NTA eine Aktivität von 25 % (232 MFI) gegenüber dem nicht depletierten Überstand (930 MFI). Das bedeutet, dass 75 % des MC21bsAb aus dem Überstand an die Ni-NTA gebunden hat. Für alle weiteren Aufreinigungen wurden deswegen 2 ml Ni-NTA pro 100 ml Überstand für die Depletion der Zellkulturüberstände verwendet.

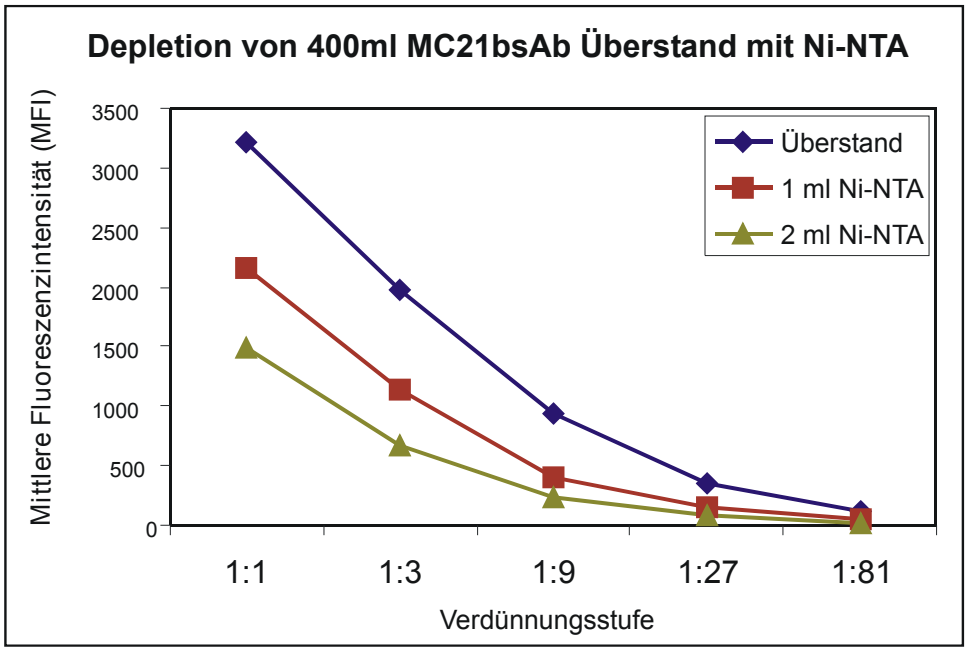

Abbildung 5-15: Depletion von 100 ml MC21bsAb Überstand mit unterschiedlichen Mengen an Ni-NTA.

5.2.4.2 Elution der gebundenen Proteine mittels pH-Stufengradienten

Zur Elution der gebundenen Proteine wurde ein pH-Stufengradient verwendet. Der pH-Stufengradient entsteht aus dem Mischungsverhältnis zweier Puffer: Puffer A mit pH 7,4 und Puffer B mit pH 3,3. Je höher dabei die Konzentration von Puffer B ist, desto saurer wird der pH und desto stärker die Elution von Proteinen.

Tabelle 5-3: pH-Werte des Stufengradienten zur Elution der His-Tag Proteine.

% Puffer B	0	50	70	95	100
pH-Wert	7,5	6,5	6	4,9	3,3

In zwei Schritten wurde zunächst mit 50 % und 70 % Puffer B unspezifisch gebundene Proteine entfernt, bevor mit 95 % der bsAb eluiert wurde. Die letzte Stufe von 100 % Puffer B diente zur kompletten Elution noch restlicher Proteine. Der niedrige pH-Wert in den eluierten Fraktionen könnte zu einer sauren Hydrolyse der Proteine führen. Um dies zu verhindern, wurde der pH-Wert mit einer 1,5 M TRIS-Lösung pH 8,8 auf ein neutrales Niveau von 7,4 eingestellt. Das Elutionsprofil einer solchen Säulenchromatographie ist in Abbildung 5-16 dargestellt, dass dazugehörige SDS-Proteingel wird in Abbildung 5-17 gezeigt.

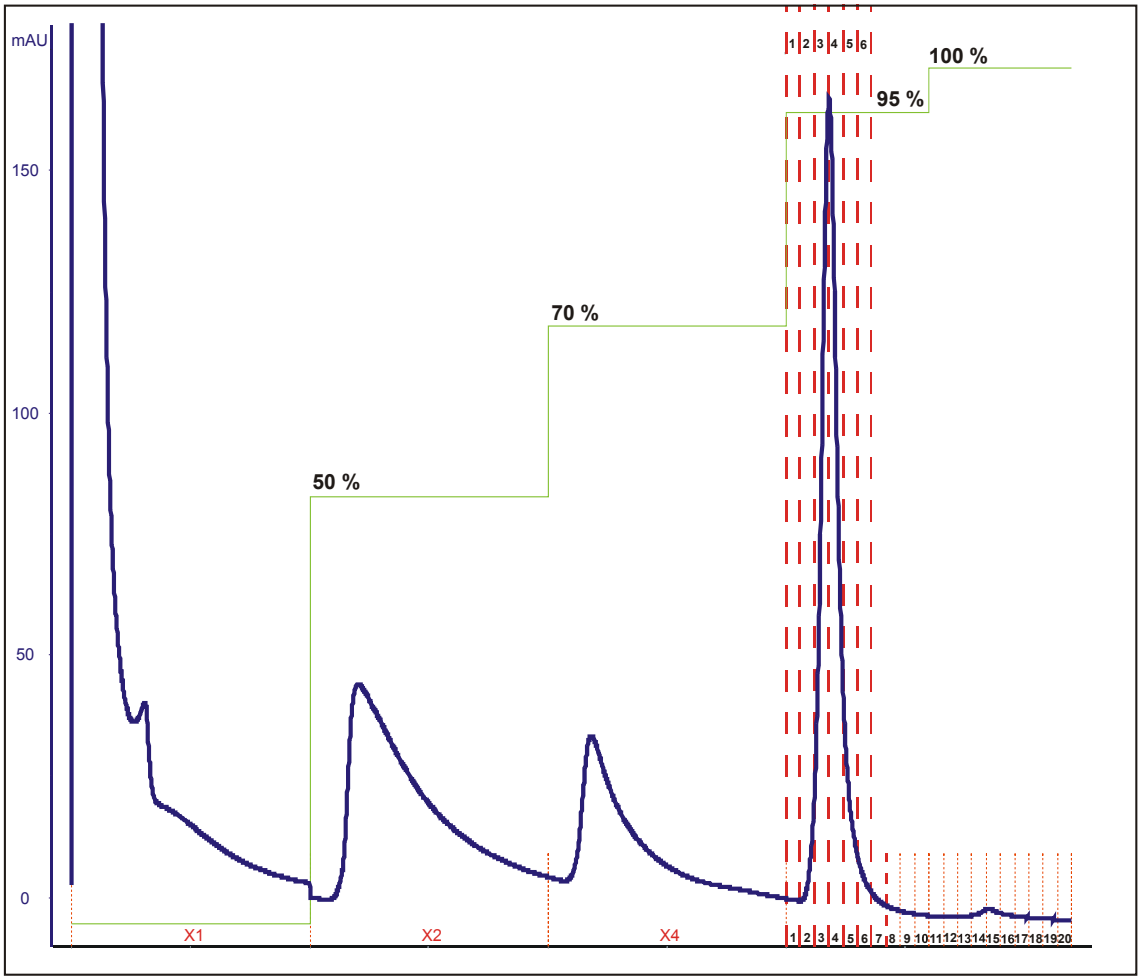

Abbildung 5-16: Elutionsprofil der Aufreinigung des MC21bsAb aus 400 ml Überstand. Bei 50 % und 70 % Puffer B werden unspezifische gebundene Protein eluiert. Erst bei 95 % erscheint ein klarer, höherer Peak, der mit der Aktivität des MC21bsAb korreliert.

Der Grad der Konzentrierung und die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde durch eine Bindungsanalyse auf mCCR CHO-Zellen überprüft. Dazu wurde ebenfalls eine 1:3 Verdünnungsreihe hergestellt und die Bindungsstärke mit dem Ausgangsmaterial verglichen.

Dabei zeigt die Fraktion 4 in Korrelation zum Elutionsprofil und dem SDS-Gel die höchste Aktivität. Selbst bei einer Verdünnung von 1:81 liegt der Wert von 3078 MFI noch über der Aktivität des Ausgangsmaterials bei der 1:1 Verdünnung. Die Fraktionen 3 und 6 zeigen auch noch eine erhöhte Aktivität gegenüber dem Ausgangsmaterial.

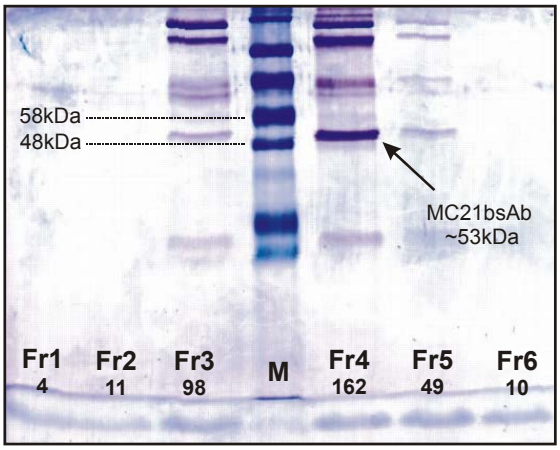

Abbildung 5-17: 12,5 % SDS-Proteingel für eine MC21bsAb-Aufreinigung. Dargestellt sind die Fraktionen (Fr) 1 bis 6 des Elutionsprofils aus Abbildung 5-16. Die Zahl unterhalb des Fraktionsnummern gibt die Proteinmenge in µg/µl an. Fraktion 4 korreliert mit dem Peak des Elutionsprofils und mit der Aktivität auf CHO-Zellen.

Die Proteinbestimmung bei OD_{280} ergibt eine Proteinkonzentration von 162 µg/ml für die Fraktion 4. Da sich aber noch Verunreinigungen in der Fraktion befinden, entspricht dieser Wert nicht der Konzentration der bsAb. Die Proteinkonzentration der bsAb wurde deswegen anhand der Bandenstärke im SDS-Gel (s. a. Abbildung 5-17) abgeschätzt. Für erste *in vitro* Untersuchungen der Lyseeigenschaften der bsAb war diese Reinheit der Fraktionen und Art der Konzentrationsbestimmung ausreichend.

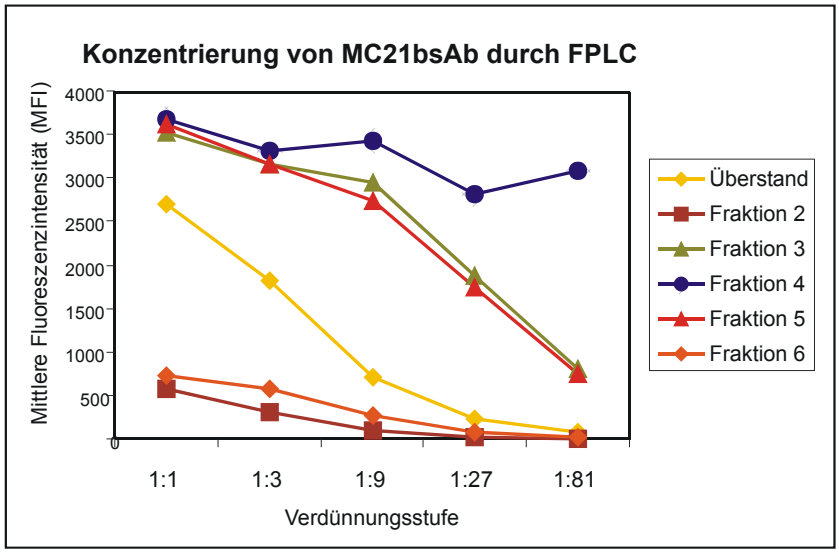

Abbildung 5-18: Konzentrierung des MC21bsAb durch die FPLC. Überprüfung der Aktivität der einzelnen eluierten Fraktionen.

Für das hier aufgeführte Beispiel wurde so eine MC21bsAb Konzentration von ~54 µg/ml ermittelt. Dies wäre 1/3 der gemessenen Proteinkonzentration von 162 µg/ml der Fraktion 4. Die so gereinigten Proteine wurde anschließend in *in vitro* Lyseassays auf ihre Funktionalität geprüft (s. a 5.3.2). Das MC69bsAb-Konstrukt wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Micromet aus München aufgereinigt.

5.3 *In vitro* Untersuchungen der bsAb

5.3.1 Bindungsanalyse der bsAb

Jede Veränderung eines rekombinanten Proteins kann auch zu einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften des Konstruktes führen. Durch das Zusammenfügen der scFv zu bsAb kann es z. B. zu Modifikationen in der Faltung der Proteine kommen und somit zum Verlust der Bindungseigenschaften. Um dies auszuschließen, wurden für die bsAb die gleichen Bindungsanalysen wie für die scFv durchgeführt. Zunächst wurde die Bindung der bsAb auf mCCR CHO-Zellen untersucht und anschließend die Bindung auf den nativen Antigenen CCR2, CCR5 und CD3 überprüft. Für diese Bindungsanalyse wurden Zellkulturüberstände und nicht gereinigte Proteine verwendet. Aus Abbildung 5-19 ist zu erkennen, dass die bsAb die Bindungseigenschaften der scFv beibehalten haben. Der MC21bsAb bindet neben CD3 auf T-Zellen auch CCR2 auf $CD11b^{+}$ Monozyten. Die Bindung des MC69bsAb auf $CD11b^{medium}$ NK-Zellen ist schwach, aber erkennbar.

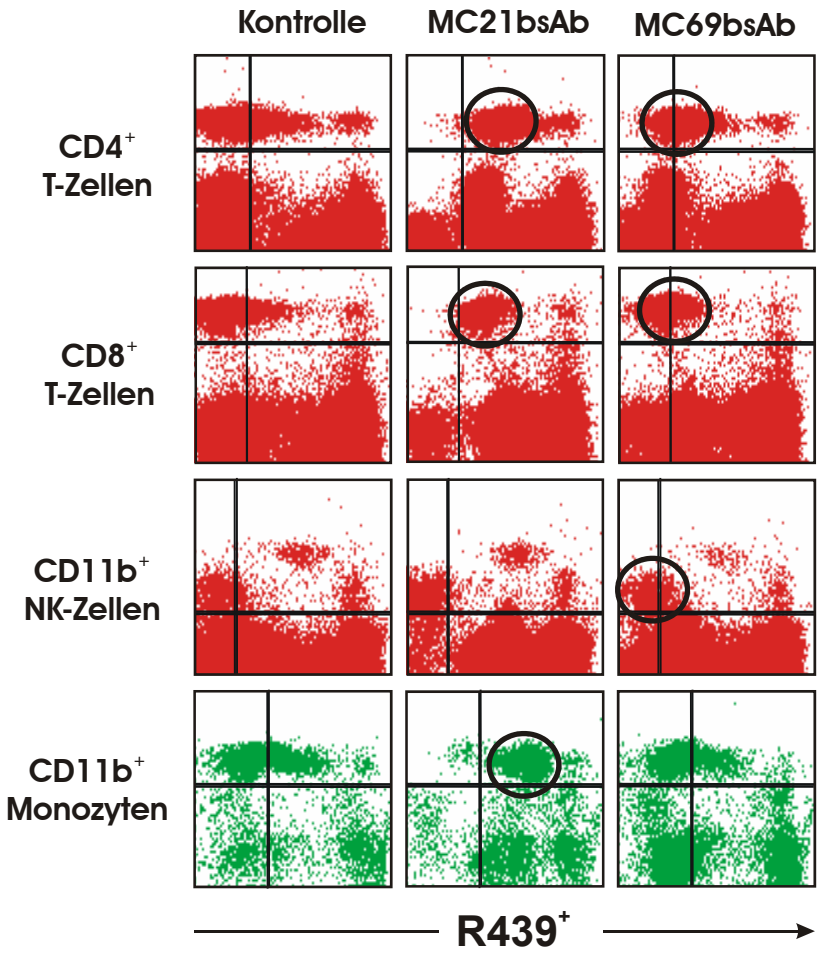

Abbildung 5-19: Bindung der bsAb auf Balb/c-Mausblut. Die Kontrolle ist nur mit PBS inkubiert und zeigt keine spezifische R439-Markierung. Während der MC21bsAb eine gute Bindung sowohl an CD3 auf T-Zellen, als auch an CCR2 auf Monozyten zeigt, ist die Färbung der Oberflächenmarker durch den MC69bsAb zwar erkennbar, aber schwächer. Insbesondere die Markierung von CCR5 auf NK-Zellen ist nicht sehr stark.

5.3.2 *In vitro* Lyseassays mit MC21bsAb und MC69bsAb

Beide Konstrukte binden an ihre jeweiligen Rezeptoren, inwieweit sie aber zur erwünschten Koppelung von Effektor- und Targetzelle und zur Aktivierung der Effektorzelle führen, wurde zunächst durch *in vitro* Lyseversuche untersucht. Dazu wurden als Zielzellen die überexprimierenden CHO-Zellen verwendet, als Effektoren wurden aus der Mausmilz $CD90^+$ T-Lymphozyten isoliert.

Die präparierten Zellpopulationen wurden in einem Verhältnis von fünf Effektoren zu einer Targetzelle (5:1) in einer 96-well-Rundbodenplatte inkubiert. Durch den Einsatz der Rundbodenplatte war die räumliche Nähe der beiden Zellpopulationen zueinander gewährleistet. Von den Konstrukten wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen der gereinigten Proteine eingesetzt. Nach 24 und 48 h wurde die Lyseffizienz gemessen. Dazu wurde der Ansatz

mit Propidium Iodid gefärbt, um tote Zellen identifizieren zu können. Die spezifische Lyse wurde über folgenden Quotienten ermittelt:

$$spezifischeLyse = \frac{Messwert - Leerwert}{Totallyse - Leerwert} x100\%$$

Der Messwert ist die Prozentzahl der PI positiven Zellen in der Probe, der Leerwert entspricht der Prozentzahl der PI^+ Zellen in der Kontrolle ohne bsAb. Die Totallyse wurde durch Zugabe von 0,1 %-igem Saponin in einer Kontrolle ohne bsAb ermittelt und lag bei 100 % PI^+ Zielzellen. In der Abbildung 5-20 ist die spezifische Lyse von mCCR CHO-Zellen nach 24 und 48 h für die beiden bsAb gezeigt.

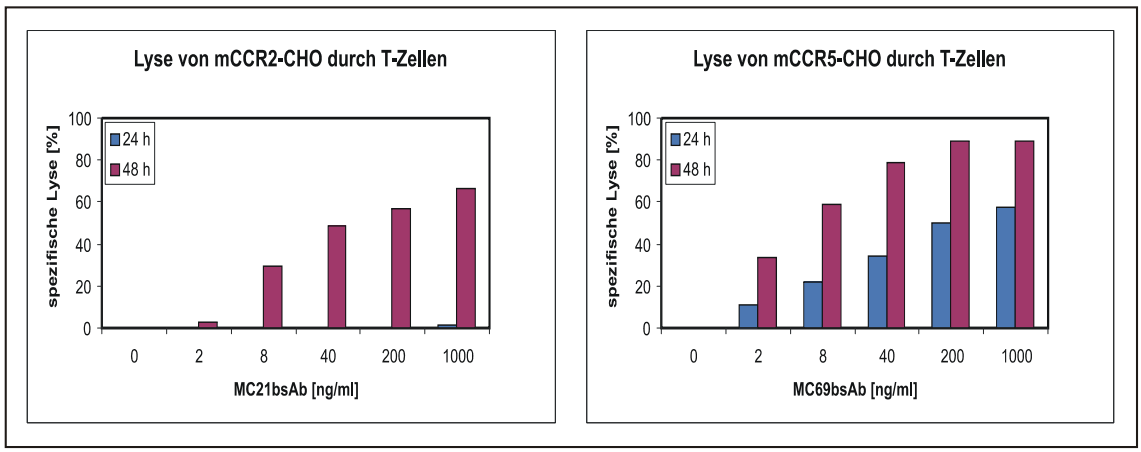

Abbildung 5-20: Spezifische Lyse von mCCR CHO-Zellen durch den jeweiligen bispezifischen Antikörper nach 24 und 48 h. Dargestellt ist die Prozentzahl der spezifischen Lyse. Dargestellt ist ein Experiment von drei repräsentativen Experimenten.

Für den MC21bsAb ergab sich dabei nach 24 h keine spezifische Lyse. Nach 48 h stieg die Lyseeffizienz des MC21bsAb auf knapp 70 % bei 1 µg/ml. Nimmt man diese 70 % als Maximallyse, so lag die effektive Dosis bei der die Hälfte aller Zielzellen tot ist (ED_{50}) zwischen 8 ng/ml und 40 ng/ml für den MC21bsAb nach 48 h. Bei dem MC69bsAb zeigte sich bereits nach 24 h eine spezifische Lyse von ~50 % bei 1 µg/ml. Nach 48 h stieg die Rate auf 90 % an. Hier lag die ED_{50} Konzentration nach 48 h bei etwa 8 ng/ml.

Einhergehend mit der Lyse der CHO-Zielzellen war eine Dosis-abhängige Aktivierung der Effektorzellen zu erkennen. Dies ließ sich durch eine FACS-Analyse des CD25-Oberflächenrezeptors verdeutlichen. In der Abbildung 5-21 ist die konzentrationsabhängige Expression von CD25 auf CD4 und CD8 positiven T-Zellen nach 24 h dargestellt. Auch hier lag die halbmaximale Aktivierung der T-Zellen durch die beiden Proteinkonstrukte bei ~8 ng/ml. Nach 48 h zeigt sich kein weiterer Unterschied der CD25 Expression bei allen Konzentrationen. Die T-Zellen waren gleich stark aktiviert.

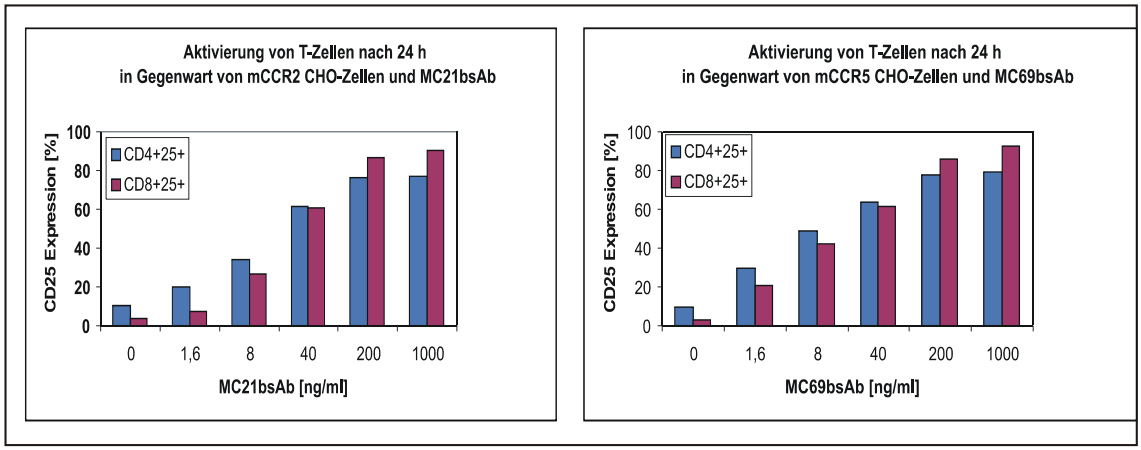

Abbildung 5-21: CD25 Expression auf aktivierten T-Zellen in Gegenwart der bispezifischen Antikörper und der jeweiligen CHO-Zielzellen.

Insgesamt wies der MC21bsAb gegenüber dem MC69bsAb etwas schlechtere *in vitro* Lyseeigenschaften auf.

5.4 Anwendung der bsAb *in vivo*

5.4.1 Behandlung von gesunden Balb/c-Mäusen mit dem MC21bsAb

Nach den Ergebnissen der *in vitro* Lyseassays wurde als nächstes die Wirksamkeit der bsAb-Konstrukte *in vivo* untersucht. Dazu wurden zwei gesunde Balb/c-Mäuse für vier Tage täglich mit 12,5 µg des gereinigten MC21bsAb behandelt. Diese Menge würde bei einem Blutvolumen von ~2 ml bei der Maus eine Konzentration von 6 µg bsAb/ml ergeben, also einen 150 fachen Überschuss bezogen auf die ED_{50} des Konstruktes. Die Injektion des Proteins erfolgte i. v.. Die Proteinmenge entsprach dabei dem Maximalvolumen (0,2 ml) das Mäusen i. v. injiziert werden kann. Zwei weitere Tiere wurden als Kontrolltiere verwendet. Diese bekamen 0,2 ml isotonische Kochsalzlösung (NaCl) injiziert.

Am Tag 5 nach Behandlungsbeginn wurden den Tieren Blut abgenommen. Anschließend wurden die Tiere getötet und aus Milz und Leber der Tiere wurden Zellsuspensionen hergestellt (s. a. 4.8.3). Blut, Milz- und Leberzellsuspensionen wurden im FACS mit folgenden Färbungen auf $CCR2^+$ Zellpopulationen hin untersucht:

- CD44-FITC, CD25-PE, CCR2-Cy5, CD4-APC
- CD11b-FITC, CD11c-PE, CCR2-Cy5, GR1-APC

Mit Hilfe dieser Färbungen konnten folgende $CCR2^+$ Zellpopulationen identifiziert werden:

- $CD4^+$ $CD44^+$ T-Zellen
- $CD11b^+$ $GR\text{-}1^+$ Monozyten

Als Negativkontrolle der CCR2-Färbung wurde die Downmodulation (s. a. 4.6.4) des Rezeptors mit MCP-1 verwendet. Die Anzahl der CCR2 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl (Monozyten) bzw. zur Lymphozytenzellzahl ist in der Abbildung 5-22 graphisch dargestellt.

Im Blut, der Milz und der Leber der Tiere zeigte sich zwischen den beiden Kontrolltieren (Tier 1 und Tier 2, weiße Balken) und den behandelten Tieren (Tier 3 und Tier 4, schwarze Balken) kein Unterschied in der Zahl der $CCR2^+$ Zellen. Ein Depletion der Zellen scheint also nicht stattgefunden zu haben.

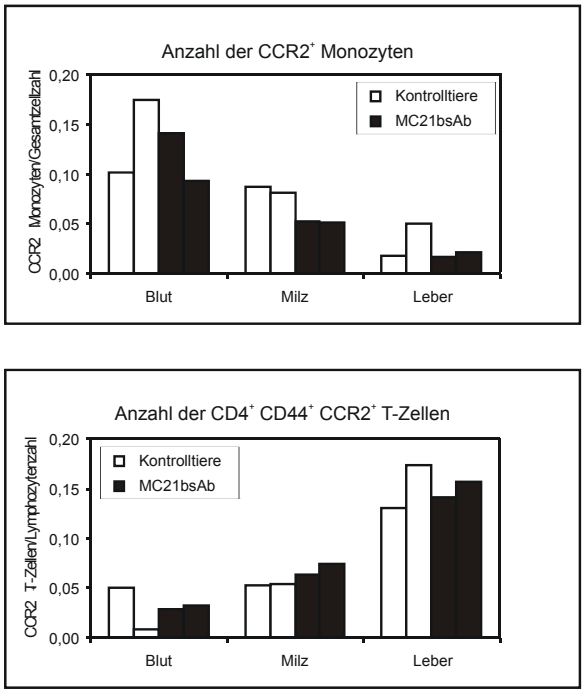

Abbildung 5-22: Zahl der $CCR2^+$ Zellen in Blut, Milz und Leber von Balb/c-Mäusen nach Behandlung mit MC21bsAb. Tier 1 und 2: Kontrolltiere (weiße Balken), Tier 3 und 4 behandelte Tiere (schwarze Balken). Dargestellt ist das Verhältnis der $CCR2^+$ Zellen zur Gesamtzellzahl bzw. zur Lymphozytenzellzahl.

5.4.2 Behandlung von SNF1-Mäusen mit dem MC69bsAb

Die Unwirksamkeit des MC21bsAb kann mehrere Gründe haben. Zum einen ist die Ausgangskonzentration des bsAb niedrig. Zum anderen kommt es in gesunden Tieren nicht zu einer örtlichen Ansammlung von CCR positiven

Zellen, so dass lokal kein ausreichender Spiegel von bsAb, Effektor- und Targetzelle zustande kommen könnte.

Um letztere Möglichkeit auszuschließen und auch die verabreichte bsAb Konzentration zu erhöhen, wurde ein weiterer Depletionsversuch unternommen. Diesmal wurden neun Monate alte, weibliche SNF1 Tiere verwendet.

Bei diesen Tieren handelt es sich um die F1-Generation der Kreuzung aus New Zealand Black (NZB) und Swiss Webster (SWR) Mäusen (Kalled, 1998). Die weiblichen Mäuse der F1-Generation entwickeln ab dem sechsten Monat eine Lupus Nephritis mit einer Ansammlung von CCR positiven Zellen in Niere und Milz (s. a. Abbildung 5-23). Insbesondere CCR5 wird auf den beiden T-Zellpopulationen in Milz und Niere stark exprimiert. Diese sind in der Abbildung 5-23 durch Kreise hervorgehoben. Diese Zellpopulationen waren durch ihre CCR5 Expression, sowie durch die lokale Anreicherung in den beiden Organen gute Ziele für eine Depletion durch den MC69bsAb.

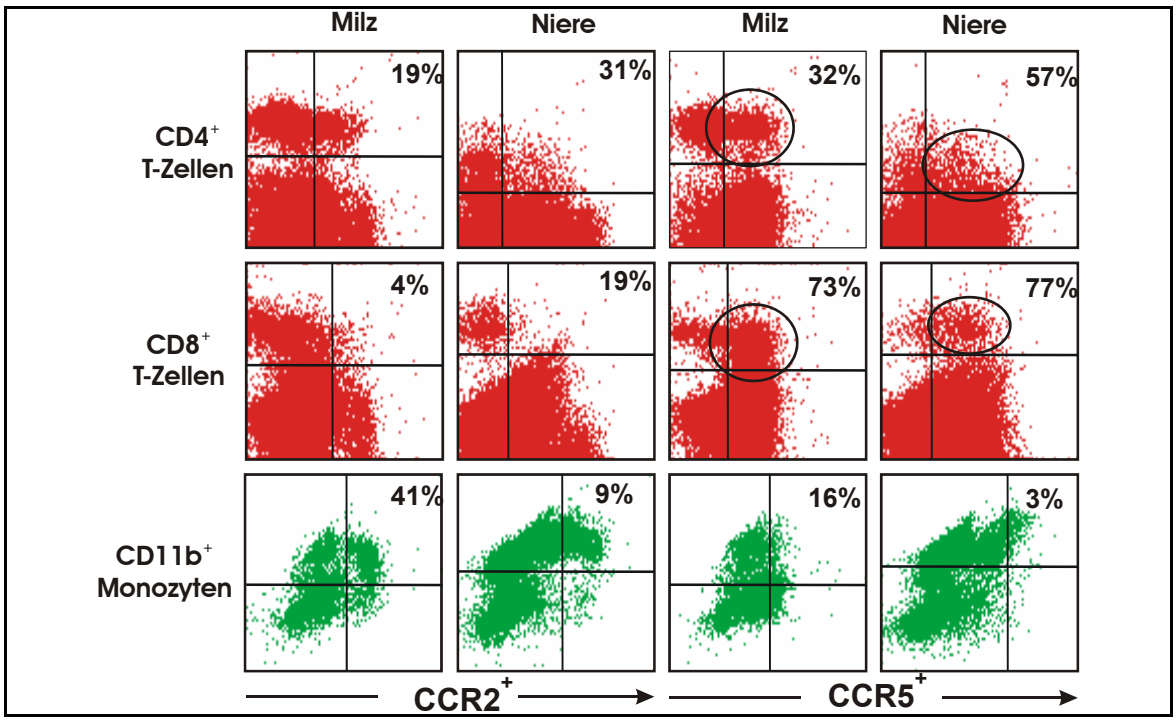

Abbildung 5-23: Expression von CCR2 und CCR5 in Milz und Niere einer neun Monate alten, weiblichen SNF1-Maus.CCR5 positive Populationen in der Milz und in der Niere sind durch Kreise hervorgehoben. Diese Zellen wären Zielzellen für eine Behandlung mit dem MC69bsAb. Die Quadranten der Bilder wurden jeweils an der Negativkontrolle ausgerichtet.

Der MC69bsAb lag in einer höheren Konzentration als der MC21bsAb vor, so dass die Dosis der Behandlung erhöht werden konnte. Vier SNF1-Tiere im Alter von neun Monaten wurden zweimal täglich (morgens und abends) mit je 70 µg

MC69bsAb i. p. behandelt. Als Kontrolle wurde eine Gruppe mit ebenfalls vier Tieren mit dem gleichen Volumen NaCl behandelt. Bei der i. p. Injektion wurde ein Volumen von 1 ml pro Injektion verabreicht. Die Behandlung morgens und abends sollte zu einer Aufrechterhaltung des bsAb-Spiegels in den Tieren beitragen.

Am Tag 5 nach Behandlungsbeginn wurden die Tiere getötet und die Milz und die Nieren der Tiere zu Zellsuspensionen verarbeitet. Die Zellpopulationen wurden mit einer CD11b-FITC, CCR5-PE, CD8-Tricolor, CD4-APC Färbung im FACS analysiert. Dadurch konnten $CD11b^+$ Monozyten und beide T-Zellpopulationen untersucht werden. Als Negativkontrolle wurde auch hier die Downmodulation verwendet. Für CCR5 wurde dafür MIP-1α verwendet.

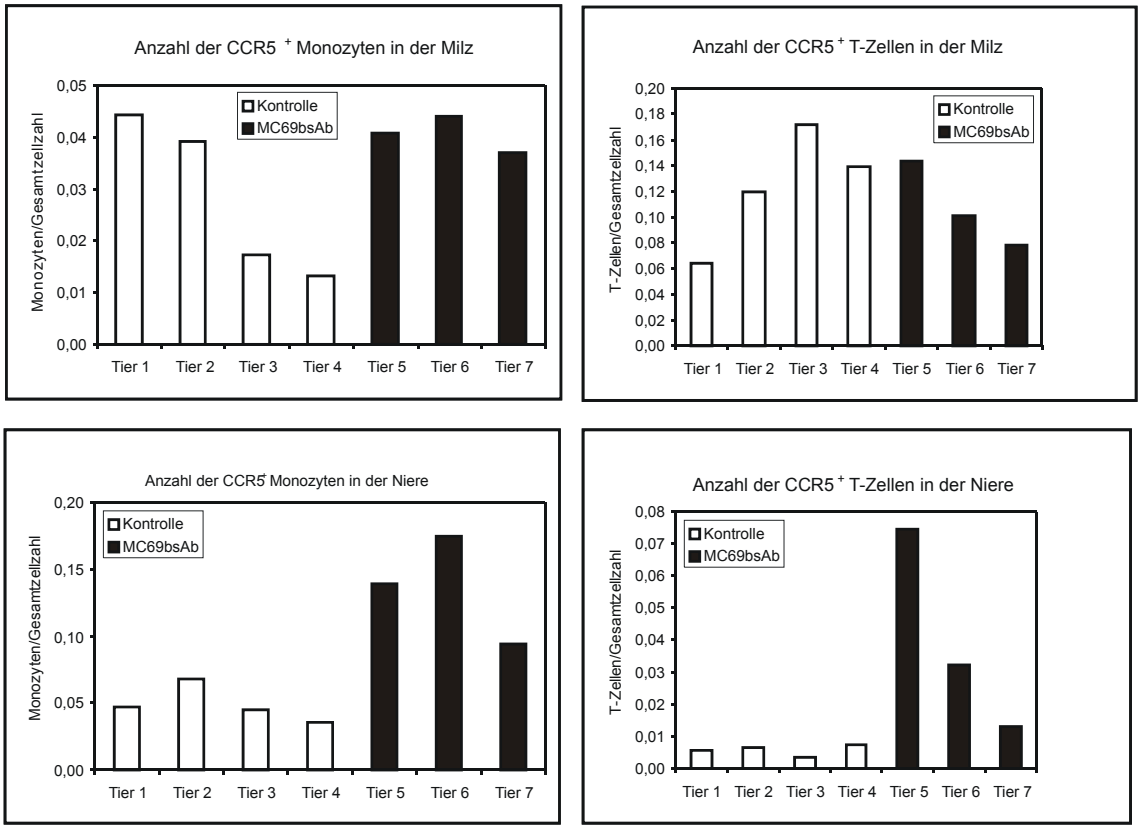

Abbildung 5-24: Depletion von $CCR5^+$ Zellen in neun Monate alten, weiblichen SNF1-Mäusen mit 140 µg MC69bsAb. Weiße Balken stellen die Kontrolltiere dar, die schwarzen Balken zeigen die MC69bsAb behandelten Tiere.

In der Abbildung 5-24 ist das Ergebnis dieser Behandlung zu sehen. Gezeigt ist jeweils die Anzahl der $CCR5^+$ Monozyten und T-Zellen in der Milz und der Niere der Tiere im Verhältnis zur aufgenommenen Gesamtzellzahl. Tier 1-4 sind dabei die mit NaCl behandelten Kontrolltiere (weiße Balken) und Tier 5-7 die behandelten Tiere (schwarze Balken). Beide Gruppen bestanden ursprünglich

aus je vier Tieren. Tier Nr. 8 der Behandlungsgruppe verstarb jedoch während der Behandlung. In der Milz zeigte sich zwischen den beiden Gruppen keine Veränderung der $CCR5^+$ Zellen. In der Niere war jedoch ein Anstieg sowohl der Monozyten als auch der T-Zellen in zwei von drei der behandelten Tiere zu sehen.

Die SNF1-Tiere leiden im Alter von neun Monaten bereits an einer schweren Nephritis. Bei Überlebensstudien wurde gezeigt, dass die Tiere im Alter von acht Monaten zu sterben beginnen; bis zum zwölften Monat ist die Erkrankung letal (Kalled, 1998). Dies kann den Verlust eines der Tiere aus der Behandlungsgruppe erklären.

Der Anstieg der Monozyten und T-Zellen in der Niere ist eventuell auf eine verstärkte Entzündungsreaktion zurückzuführen. Die *in vitro* Untersuchungen des MC69bsAb zeigten eine erhöhte Expression des CD25 Rezeptors in Gegenwart von $CCR5^+$ Zielzellen. CD25 ist der Rezeptor für den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2. Dieses Cytokin wird bei der T-Zell Aktivierung ausgeschüttet und führt zu einer verstärkten T-Zellproliferation (Janeway, 1997). Es besteht die Möglichkeit, das es bei den MC69bsAb behandelten Tieren durch $CCR5^+$ Zielzellen zu einer Aktivierung der T-Zellen kam und somit zur IL-2 Ausschüttung. Dies könnte nach einer anfänglichen Depletion von $CCR5^+$ Zellen zu einer Proliferation von T-Zellen führen und dadurch den Anstieg der T-Zellzahl in den Milzen und Nieren der behandelten Tiere erklären. Ebenso könnte es zu einer verstärkten Neubildung von Monozyten kommen und auch eine erhöhte Infiltration von Monozyten und T-Zellen durch Ausschüttung verschiedener Chemokine nach der T-Zell-Aktivierung ist denkbar.

5.5 Modifikation der bsAb mit murinem IgG1

Beide bsAb zeigten also keine *in vivo* Wirksamkeit, obwohl die Konstrukte *in vitro* zu einer sehr effizienten Lyse von CCR positiven Zielzellen führten. Ein Grund für die Ineffektivität *in vivo* könnte die sehr kurze Halbwertszeit von bispezifischen single-chain Antikörpern sein (Colcher, 1998). Durch weitere Modifikationen soltten die bsAb vergrößert werden, um somit die Halbwertszeit zu erhöhen. Zu den stabilsten Proteinen im Serum gehören Antikörper (Colcher, 1998), (Kim, 1994). Trotz ihrer Größe besitzen Antikörper eine gute Bioverfügbarkeit. Um diese Eigenschaften von Antikörper – eine hohe Halbwertszeit sowie eine gute Bioverfügbarkeit – auszunutzen, wurde an die bispezifischen single-chain Antikörper das Fc-Motiv eines murinen IgG1-Antikörpers angefügt. Ein Fc-Konstrukt bestehend aus der Gelenk-, C_H2- und C_H3-Domäne des murinen IgG1 weist z. B. eine mittlere Verweildauer im Plasma von knapp 100 Stunden auf (Kim, 1995). Zusätzlich könnte durch das

Anfügen des IgG1-Stücks eine Dimerisierung der bispezifischen Konstrukte erreicht werden. Durch die Dimerisierung könnte möglicherweise eine Verbesserung der Aktivität herbeigeführt werden. Der Aufbau dieses bsAb-IgG ist bereits schematisch in der Abbildung 1-7 gezeigt.

5.5.1 Klonierung von der Hinge-C_H2-C_H3-Region eines murinen IgG1 an die bsAb cDNA

Zunächst wurden die Schnittstellen BamH1 und Sal1 in die IgG1-cDNA mittels PCR eingefügt. Der Vektor mit der cDNA für murines IgG1 wurde freundlicherweise von Herrn P. Kufer (Institut für Immunologie, LMU München) zur Verfügung gestellt. Bei der in den Vektor eingebauten cDNA handelt es sich um genomische DNA, die neben den kodierenden Sequenzen, den Exons, auch noch Introns enthält. Für die Expression des Konstruktes in CHO-Zellen ist dies jedoch nicht von Bedeutung, da die Introns im Verlauf der Transkription der DNA herausgeschnitten werden. Allerdings entspricht die Größe der amplifizierten DNA aus dem Vektor nicht der Länge der einzelnen Untereinheiten, sondern ergibt sich aus der Summe der Exons und Introns. Anhand der Sequenz von Herrn Kufer wurden zwei Primer zur Amplifikation der cDNA hergestellt.

Am 3´-Ende des 2c11-scFv befindet sich vor dem His-Tag noch eine BamH1 Schnittstelle. Diese Schnittstelle wurde dazu genutzt, die amplifizierte cDNA des IgG1 zunächst in den MC21bsAb pCR-Skript-Vektor einzubauen. Von diesem Vektor aus wurde anschließend über BspE1 und Sal1 die DNA an das jeweilige MC21/69scFv im pEF-DHFR-Vektor angehängt. Über diese Subklonierung ließ sich ein erneuter partieller Verdau mit BsrG1 vermeiden. Der Ablauf der Subklonierungen von der Amplifikation der IgG1 cDNA bis hin zum Einbau der fertigen cDNA für das bispezifische Konstrukt in den pEF-DHFR-Vektor ist in Abbildung 5-25 gezeigt.

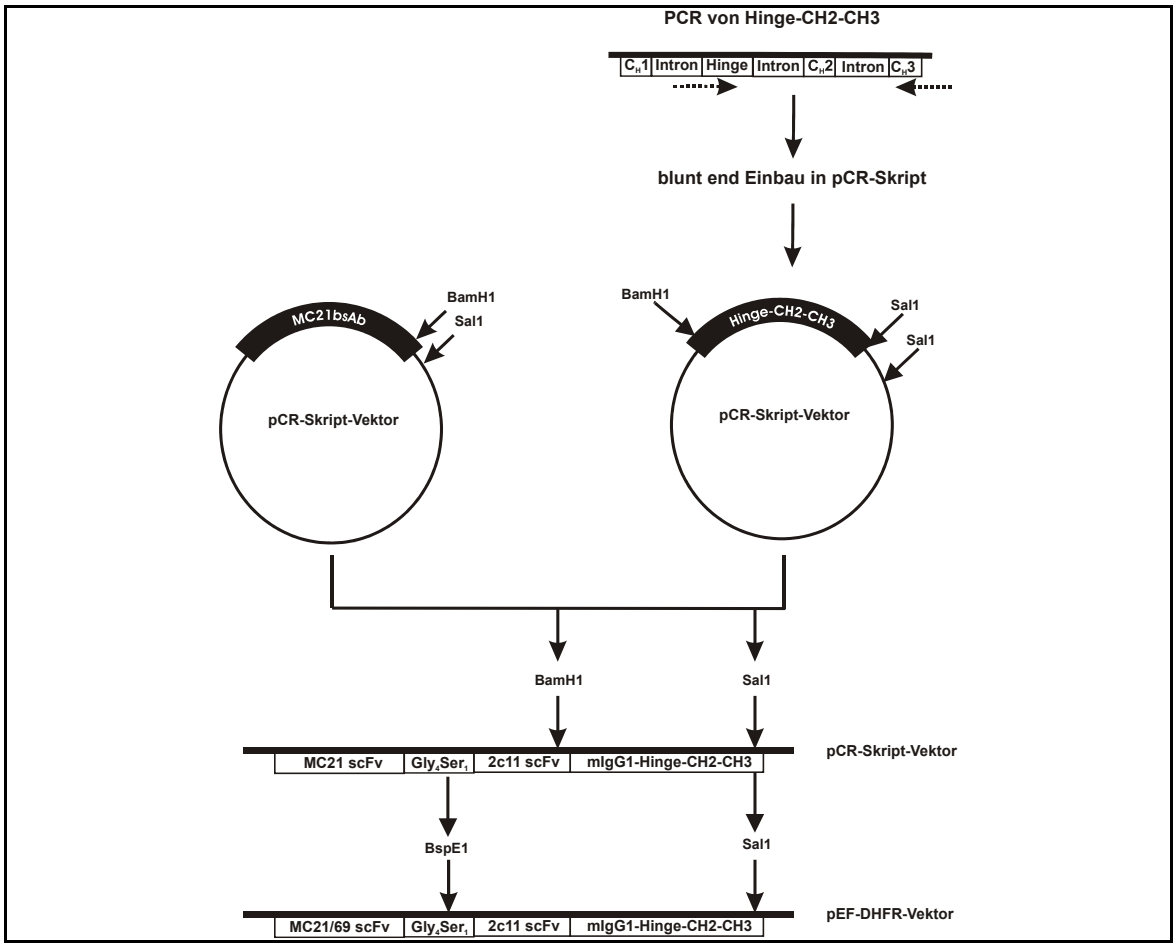

Abbildung 5-25: Subklonierungsstrategie für die Modifikation der bsAb-Konstrukte mit einem murinen IgG1 Fc-Teil.

Die cDNA für die bispezifischen Konstrukte wurde dabei an den C-Terminus der Gelenk- oder Hinge-Region angehängt. Die CH1-Domäne hätte in einem solchen Konstrukt keine Funktion und würde nur zur Vergrößerung des Proteins führen. Dagegen ist die Gelenkregion von großer Bedeutung für die Beweglichkeit der bsAb auf dem IgG1-Teil. Außerdem findet über die Cysteinreste in der Gelenkregion die Dimerisierung der beiden Untereinheiten statt.

5.5.2 Expression in CHO-Zellen und Bindungsanaylse

Im Anschluss an die Subklonierung wurden die beiden pEF-DHFR-Vektoren stabil in die CHO-Zellen transfiziert und die bsAb-IgG in den Zellkulturüberstand sezerniert. Auch hier wurde wieder eine Bindungsanalyse auf Mausblut vorgenommen, um auszuschließen, dass durch die Modifikationen der Proteine die Bindung auf ihren Zielantigenen beeinflusst wurde. Das Färbeprotokoll wurde allerdings abgeändert. Die Färbung der Konstrukte über den HIS-Tag

musste nicht mehr vorgenommen werden. Die Proteine konnten direkt mit dem R-PE markierten anti-Maus F(ab)$_2$ R439 gefärbt werden.

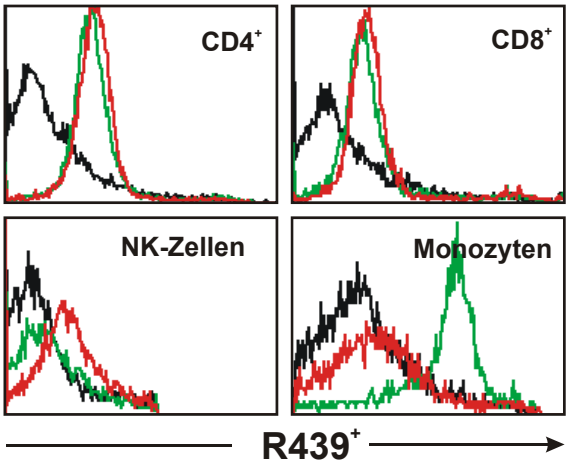

Abbildung 5-26: Färbung des CCR2 und CCR5, und des CD3-Rezeptors über die bsAb-IgG-Konstrukte auf Mausblut. Dargestellt sind die Histogramme der Bindungen auf den jeweiligen Zellpopulationen. Die schwarze Linie zeigt die IgG1 Isotypkontrolle, rot steht für MC69bsAb-IgG und grün bezeichnet den MC21bsAb-IgG. Beide Konstrukte zeigen eine Bindung an CD3$^+$ CD4 und CD8 T-Zellen und an CCR5$^+$ NK-Zellen bzw. CCR2$^+$ Monozyten.

Dabei zeigte sich, dass beide Konstrukte weiterhin an ihre Oberflächenmarker binden. MC21bsAb-IgG1 bindet an CCR2$^+$ Monozyten und CD3$^+$ CD4 und CD8 T-Zellen, das MC69-Konstrukt färbt CCR5$^+$ NK-Zellen und ebenfalls CD3$^+$ CD4 und CD8 T-Zellen. Anzumerken ist, dass das MC69-Protein keine unspezifische Bindung auf Monozyten zeigt, obwohl dies über den angefügten Fc-Teil möglich wäre, da diese Zellen eine hohe Zahl an Fc-Rezeptoren tragen. Auch das MC21-Konstrukt zeigt keine Bindung an die Fc-Rezeptoren der NK-Zellen. Allerdings erfolgt die Färbung der Oberflächenmarker mit den bispezifischen Proteinen nur für 1 h bei 4 °C, weswegen eine mögliche unspezifische Wirkung der Antikörper über den Fc-Teil nicht eintreten müsste, da für die Bindung an die FcR mehr Zeit benötigt wird. Nach einer 24-stündigen Inkubation der bsAb-IgG in einer Milzzellsuspension trat die Bindung an Fc-Rezeptoren jedoch auf (s. a. Abbildung 5-27).

5.5.3 *In vitro* Funktionsassays mit den bsAb-IgG

5.5.3.1 Aktivierungsstudien mit den bsAb-IgG1 Proteinen

In der nächsten Stufe wurde die Aktivität der neuen Konstrukte zur Aktivierung von T-Zellen untersucht. Dazu wurden Milzzellsuspensionen von Mäusen mit den jeweiligen Antikörpern für 24 h inkubiert. Daraufhin wurde eine FACS-

Analyse der T-Zellen vorgenommen und die Expression des Aktivierungsmarker CD25 analysiert.

Als Zielzellen für das MC69-Protein wären $CCR5^+$ NK-Zellen möglich. Unter den gegebenen Kulturbedingungen in einer Rundbodenplatte überleben diese Zellen aber ebenso wenig wie $CCR2^+$ Monozyten. Daher bleiben als Zielstrukturen für die Koppelung durch die bispezifischen Antikörper nur CCR^+ T-Zellen. Im unstimulierten Zustand exprimieren jedoch nur etwa 5 % der $CD4^+$ T-Zellen CCR2. CCR5 wird weder auf $CD4^+$ noch $CD8^+$ Zellen exprimiert. Wie sich aber in Abbildung 5-27 zeigt, führten die bsAb-IgG zu einer erhöhten CD25-Expression auf den T-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

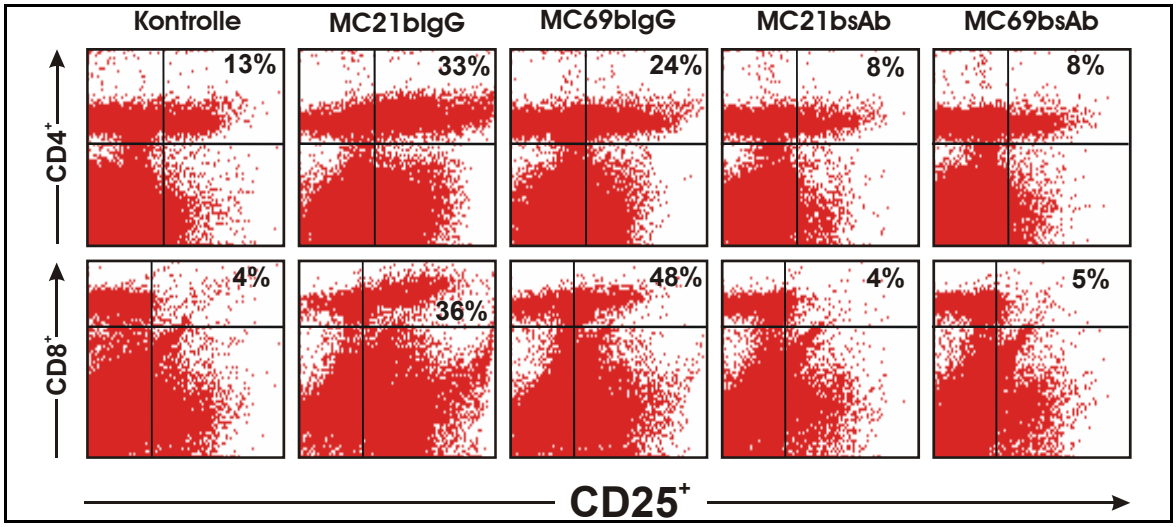

Abbildung 5-27: CD25 Expression auf T-Zellen einer Milzzellsuspension nach 24-stündiger Inkubation mit den bsAb und den bsAb-IgG1.

5.5.3.2 Einfluss des Fc-Teils auf die Aktivierung von T-Zellen durch die bsAb-IgG

Diese starke Aktivierung kann durch eine Immobilisation der IgG-Konstrukte über Fc-Rezeptoren auf APCs und die anschließende Bindung an den CD3-Rezeptor auf den T-Zellen entstehen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Koppelung von zwei T-Zellen über die beiden CD3-Bindungsstellen des IgG Dimers.

Um diese beiden Möglichkeiten zu untersuchen, wurde zum einen die Inkubation der bsAb-IgG1 in Gegenwart eines blockierenden Antikörpers gegen Fc-Rezeptoren durchgeführt und zum anderen 98 % reine $CD4^+$ T-Zellen, die über einen Zellsortierer aufgereinigt wurden, mit und ohne B-Zellen und den

Proteinen inkubiert. Die sortierten Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Ellwart des Hämatologikums der GSF, München isoliert.

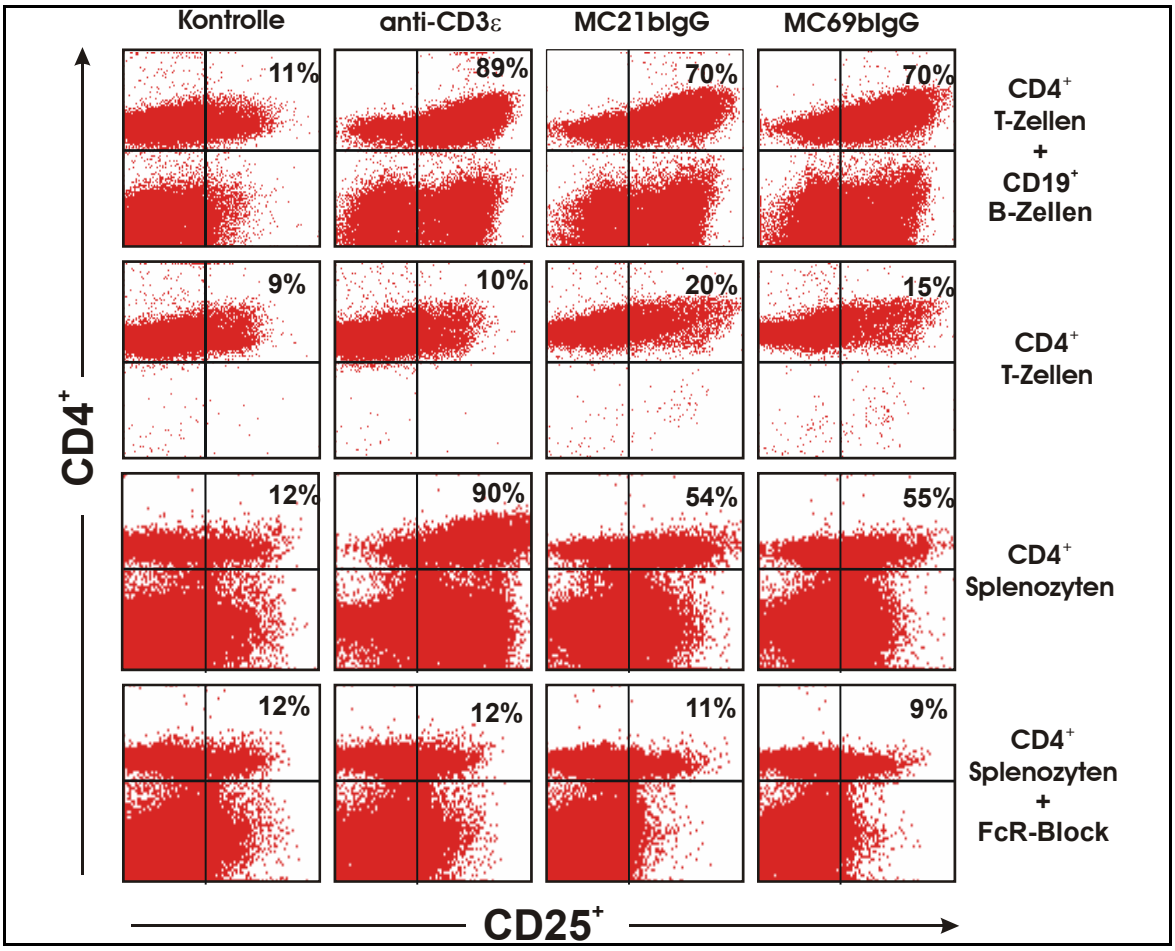

Abbildung 5-28: Blockade der FcR durch Antikörper und Aktivierung von reinen $CD4^+$ Zellen durch die bsAb-IgG1.

In Abbildung 5-28 ist zu erkennen, dass die Aktivierung der T-Zellen durch die IgG-Konstrukte durch die Blockade der Fc-Rezeptoren komplett unterbunden wird. Außerdem ist zu erkennen, dass T-Zellen in Abwesenheit von FcR^+-Zellen, die die Konstrukte immobilisieren könnten, nicht aktiviert werden. Erst wenn FcR^+ B-Zellen vorhanden sind, kommt es zur Expression von CD25 auf T-Zellen. Dies bedeutet, dass die Aktivierung der T-Zellen durch eine Bindung der Konstrukte an FcR erfolgt. Eine Kopplung zweier T-Zellen kann durch die Ergebnisse mit den isolierten T-Zellen ausgeschlossen werden. Als eine Positivkontrolle für T-Zellaktivierung wurde der 145-2c11 monoklonale CD3-Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurde die Aktivierung von T-Zellen durch die bsAb in einer Milzzellsuspension herangezogen (s. a. Abbildung 5-27).

5.5.3.3 Kopplung von Ziel- und Effektorzelle über das bsAb-IgG Konstrukt

Obwohl das IgG Konstrukt über Fc-Rezeptoren zu einer allgemeinen T-Zell-Aktivierung führt, wurde dennoch geprüft, inwieweit die bsAb-IgG in der Lage waren, Ziel- und Effektorzelle zu verbinden und darüber zur Aktivierung der Zellen zu führen. Dazu wurden sortierte $CD4^+$ T-Zellen als Effektorzellen verwendet und mit den mCCR CHO-Zellen inkubiert. Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von FcR^+ Zellen nur die jeweils spezifischen mCCR CHO-Zellen zur Aktivierung der T-Zellen führen. MC21bsAb-IgG führt in Gegenwart von $mCCR2^+$ Zellen zur CD25 Expression auf T-Zellen und MC69bsAb-IgG bei $mCCR5^+$ Zellen (s. a. Abbildung 5-29).

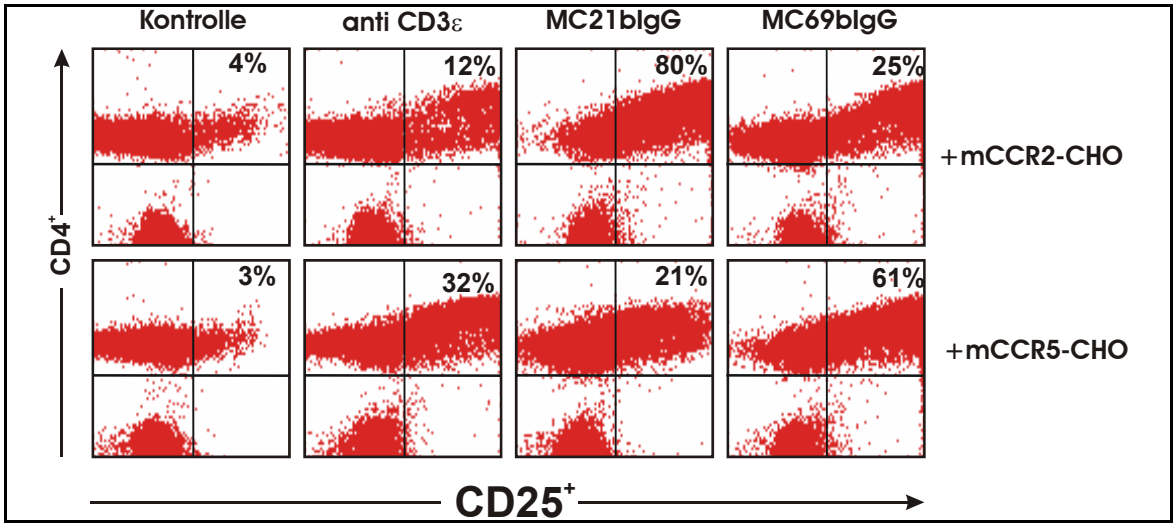

Abbildung 5-29: Spezifische Aktivierung von sortierten $CD4^+$ T-Zellen durch die bsAb-IgG in Anwesenheit von $mCCR2^+$ bzw. $mCCR5^+$ Zielzellen.

5.5.4 Mutation der Fc-Bindungsstelle der bsAb-IgG1

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Modifikation der bsAb mit der Fc-Region des murinen IgG1 zwar die beabsichtigte Funktion des Proteins erhalten bleibt, gleichzeitig führt der Fc-Teil jedoch zu einer starken, unspezifischen T-Zell Aktivierung über FcR^+ Zellen.

Eine solche unspezifische Aktivierung von T-Zellen kann *in vivo* zu einer starken Ausschüttung von Cytokinen wie TNF-α führen und darüber einen toxischen Schock in Tieren auslösen. Im Falle des 145-2c11 CD3-Antikörpers führt dies jedoch zu einer Cytokinausschüttung mit darauf folgender Immunsuppression der behandelten Tiere (Scott, 1990; Hirsch, 1988). Eine angestrebte spezifische Depletion von CCR^+ Zellen würde nicht mehr stattfinden.

Um die unspezifische Aktivierung der Zellen über den Fc-Teil der Proteinkonstrukte zu minimieren, wurden zwei Aminosäuren, die an der Fc-Bindung des IgG1 beteiligt sind, mutiert.

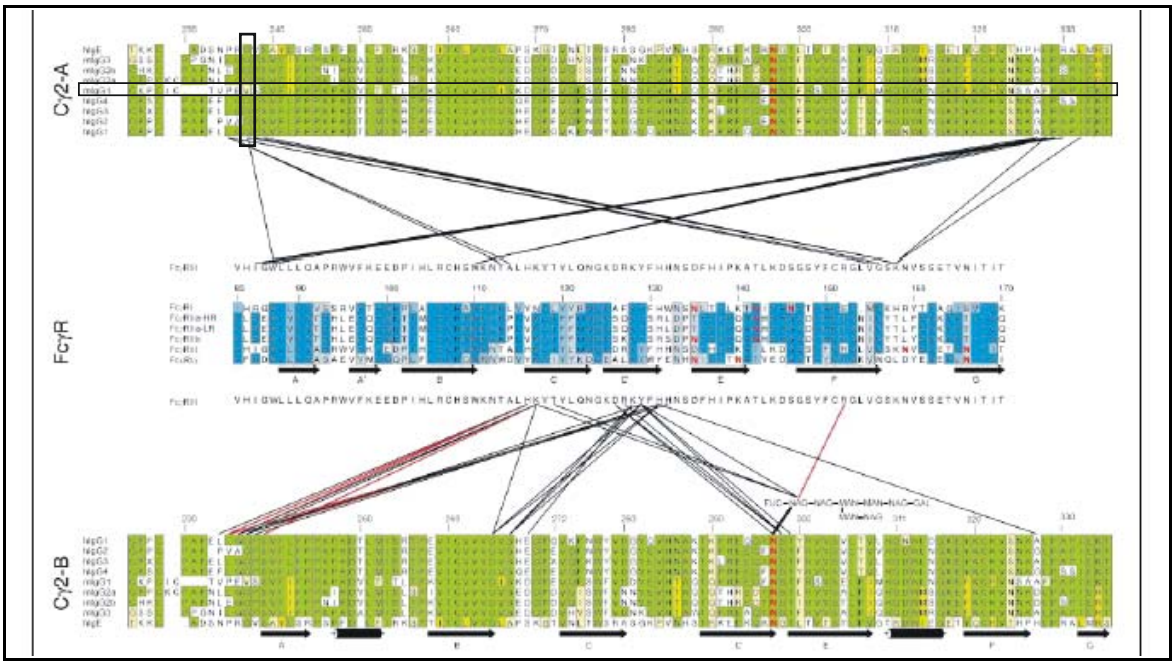

Abbildung 5-30: Bindungsstellen der Fc-Rezeptoren an die murine Immunglobuline (aus (Sondermann, 2000).

1999 beschrieb Sondermann die putativen Bindungsstellen und deren Aminosäuren der humanen und murinen Fc-Rezeptoren an die Immunglobuline (Sondermann, 2000). In Abbildung 5-30 ist die Sequenz des murinen IgG1 durch einen horizontalen Rahmen gekennzeichnet. Die an der Fc-Bindung beteiligten Aminosäuren sind durch den vertikalen Rahmen hervorgehoben. Bei murinem IgG1 befindet sich an diesen Positionen das Valin234, gefolgt von dem Serin235. Nach Korrespondenz mit Herrn Jacob und Herrn Sondermann wurden diese beiden Aminosäuren am Anfang der C_H2-Sequenz in ein Tryptophan (V234W) respektive ein Arginin (S235R) mutiert. Dazu wurde ein Primer synthetisiert, der an dieser Stelle die veränderten Basen enthält. Die beiden 5´-Primer zur Amplifikation des murinen IgG1 und deren Unterschiede sind in Abbildung 5-31 dargestellt.

Die Subklonierung des Amplifikats erfolgte nach dem gleichen Schema wie für die Herstellung der bsAb-IgG (s. a. Abbildung 5-25). Anzumerken ist, dass durch die Bindung des Mutationsprimers in der C_H2-Domäne das Intron zwischen Hinge und C_H2-Domäne verloren geht. Die Hinge-Region wird durch den Überhang des Primers am 5´-Ende erzeugt.

Nach der Mutation wurden die Proteine in CHO-Zellen exprimiert und die Bindung an Mausblut getestet. Durch die Mutation ergab sich keine Änderung der spezifischen Bindung der IgG-Konstrukte an die CCR und den CD3-Rezeptor.

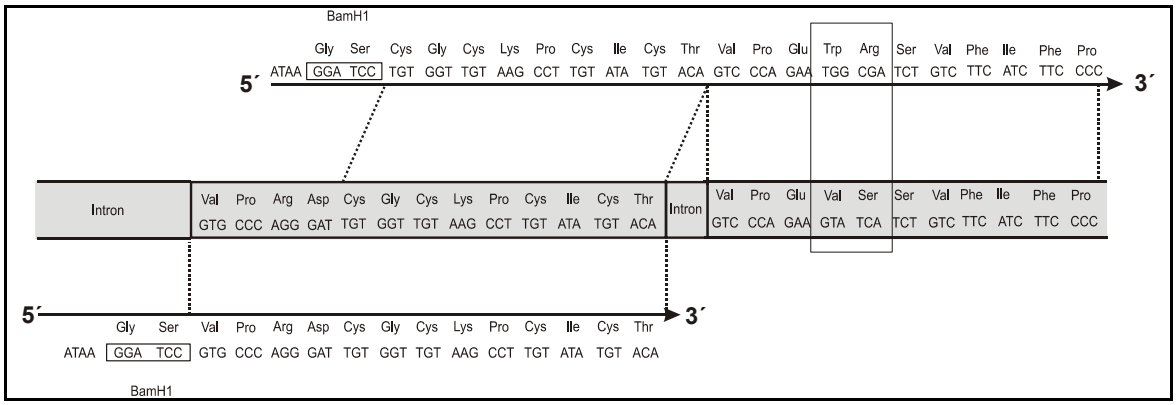

Abbildung 5-31: Mutation der Fc-Bindungsstelle durch PCR mit einem mutierten 5´-Primer. Die Mutationsstelle ist durch einen vertikalen Rahmen hervorgehoben.

5.5.5 Vergleich der Aktivierung von T-Zellen durch bsAb-IgG1 und bsAb-IgG1-Mt

Um die Effektivität der Mutation zu überprüfen, wurden wiederum Milzzellsuspensionen der Maus mit beiden bsAb-IgG1 und den bsAb-IgG1-Mt für 24 h inkubiert und anschließend die CD25 Expression auf T-Zellen untersucht.

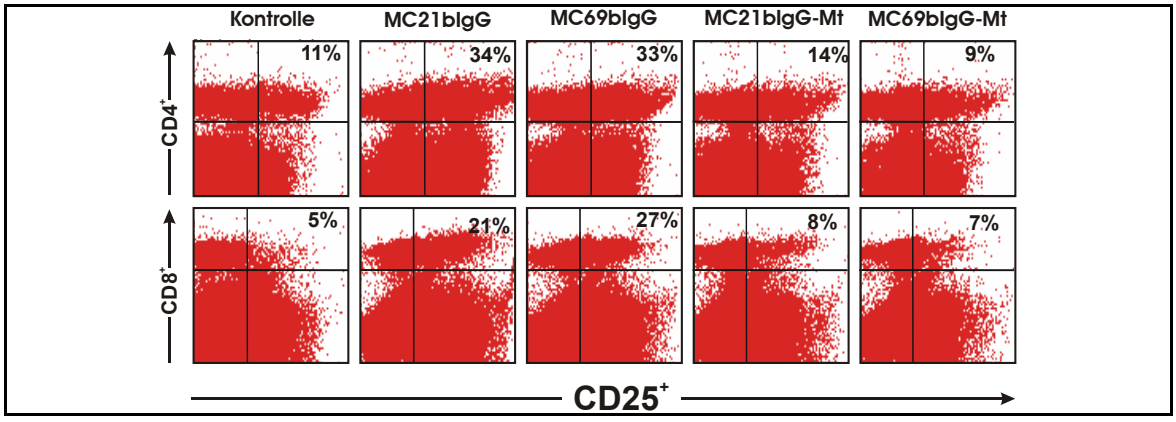

Abbildung 5-32: Aktivierung von Splenozyten durch die Stimulation mit den bsAb-IgG Konstrukten und deren Fc-Mutanten.

Während die nicht mutierten Proteine wiederum zu einer CD25 Expression führten, zeigten die mutierten Konstrukte ebenso wie die Kontrolle keine erhöhte CD25-Expression nach 24 h in Kultur (s. a. Abbildung 5-32).

5.6 Reinigung der bsAb-IgG über einen His-Tag

Nach der stabilen Transfektion von CHO-Zellen, wurden wie bei den bsAb Überstände in 3-Böden Kulturflaschen produziert und die geernteten Überstände mittels Batchverfahren mit dem Säulenmaterial Ni-NTA inkubiert. Dabei wurde die gleiche Menge an Ni-NTA zur Depletion der Überstände wie bei den bsAb verwendet, also 2 ml pro 100 ml Überstand. Dies führte zu einer 90 %-igen Depletion, wie durch die Aktivitätsbestimmung der Überstände auf mCCR CHO-Zellen vor und nach der Inkubation gezeigt werden konnte. Die beladene Säule wurde in einem FPLC-Lauf mit dem gleichen Programm der bsAb eluiert. Nach drei Waschschritten mit 0 %, 50 % und 70 % des Puffer B wurde die Fraktion mit 95 % und 100 % Puffer B eluiert. Dabei erschien bei 95 % ein klarer Peak. Das Elutionsprofil der bsAb-IgG-Mt war mit dem Profil aus Abbildung 5-16 identisch.

Im Anschluss an die Elution wurden für die zehn Fraktionen (Fr. 1-10) der Elution mit 95 % Puffer B eine Aktivitätsbestimmung auf den mCCR CHO-Zellen durchgeführt. Dabei korrelierte die Hauptaktivität gut mit den Peakfraktionen 3, 4, 5 und 6 beider bsAb-IgG-Mt. In den Fraktionen 1-2 und 7-10 fand sich keine bzw. nur minimale Aktivität wieder. Die Verteilung der eluierten Proteine auf die Fraktionen 1-10 zeigte sich auch bei der Proteinbestimmung mittels ELISA (s. a. Tabelle 5-4) Bei der Aktivitätsmessung zeigte sich bereits, dass der MC21bsAb-IgG-Mt eine deutlich höhere Konzentration enthielt, als der MC69bsAb-IgG-Mt.

Um festzustellen, ob die bispezifischen IgG-Antikörper als Dimere oder als Monomere vorlagen, wurden die Fraktion der beiden bsAb-IgG zunächst in einem 10 %-igen SDS-Gel unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert (s. a. Abbildung 5-33).

Der murine IgG1 Antikörper bildet mit drei Cysteinen in der Gelenkregion Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren Ketten (Harris, 1998). Wie sich in der Gelanalyse der eluierten MC21bsAb-IgG-Mt zeigte, ist die Dimerisierung über Disulfidbrücken auch hier der Fall. Erst unter reduzierenden Bedingungen, bei der die Dimere durch ß-Mercaptoethanol voneinander getrennt werden, erscheint im Gel eine Bande auf Höhe des 84 kDa Markers. Diese entspricht dem glykosylierten Monomer des bsAb-IgG. Dabei besitzt das Fragment aus den beiden scFv eine Größe von 53 kDa, hinzu kommt noch die Größe von 25 kDa des Hinge-C_H2-C_H3 Fragments, was eine reine Proteingröße von 78 kDa ergibt. Die C_H2-Domäne des murinen IgG1 enthält an der Aminosäure

Asn314 komplexe Oligosaccharide (Harris, 1998), die zu dem höheren Molekulargewicht (~84 kDa, eingerahmt in Abbildung 5-33 (B)) im Gel führen. Das Dimer lässt sich nicht eindeutig unter nicht-reduzierenden Bedingungen identifizieren, da trotz der Aufreinigung noch Verunreinigungen mit einem ähnlichen Molekulargewicht vorhanden sind, die sich nicht reduzieren lassen.

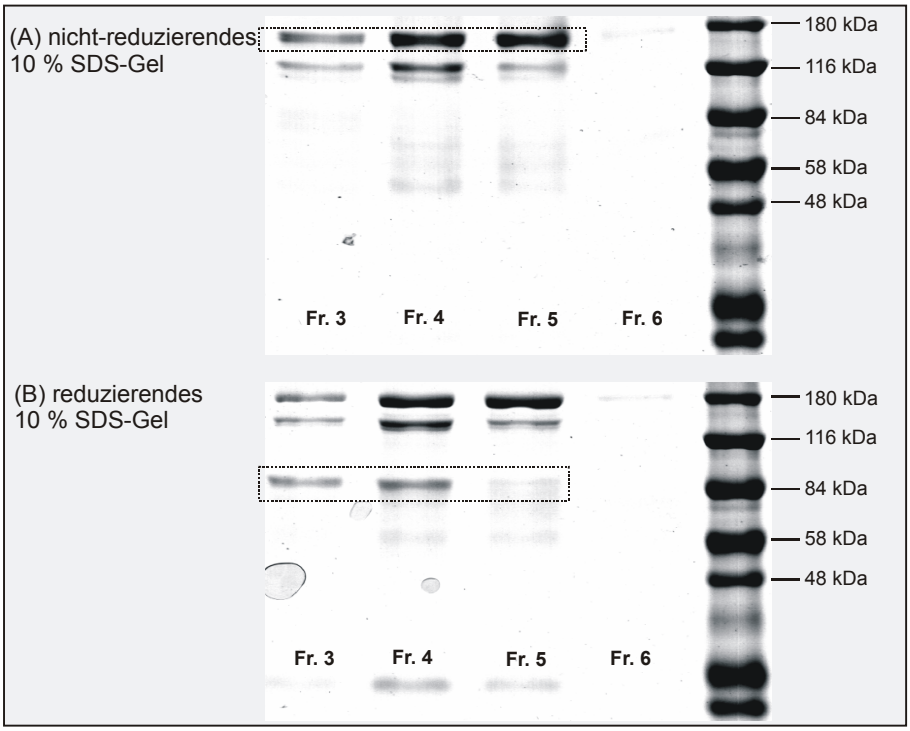

Abbildung 5-33: Nicht-reduzierendes (A) und reduzierendes (B) 10 %-SDS-Gel des MC21bsAb-IgG-Mt nach der FPLC-Aufreinigung. Im Rahmen sind die erwartenden Banden des Dimers von ~168 kDa (A) und des Monomers von ~84 kDa (B) hervorgehoben. Das Molekulargewicht ist mit der Glykosylierungen angegeben, die 5-10 kDa ausmachen.

Deswegen wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt, der spezifische Maus-IgG erkennt. In der Abbildung 5-34 ist unter reduzierenden Bedingungen eine Bande auf Höhe des 84 kDa Markers zu sehen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen laufen die Banden bei etwa 180 kDa. Dies zeigt, dass die bsAb-IgG Dimere bilden, die durch das ß-Mercaptoethanol zu Monomeren reduziert werden können.

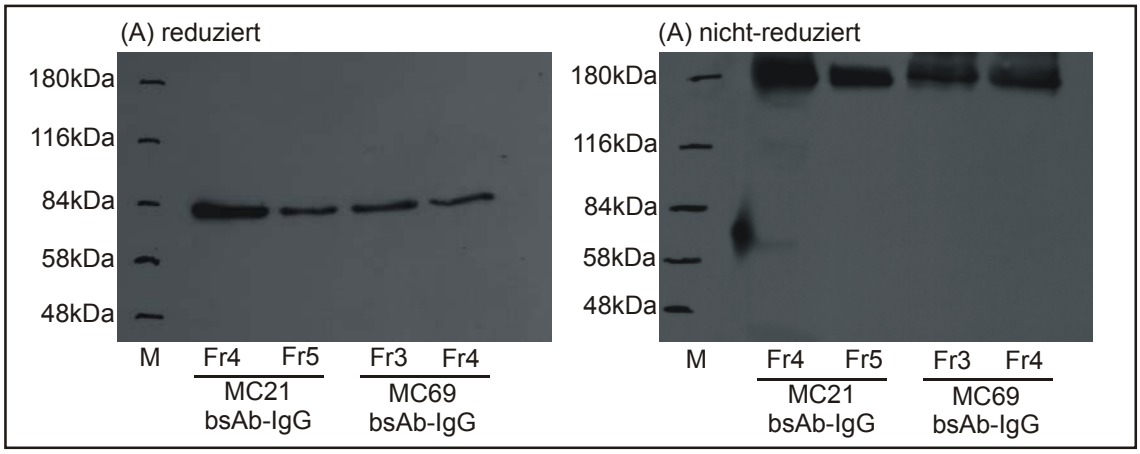

Abbildung 5-34: Western Blot für die bsAb-IgG unter reduzierenden (A) und nicht-reduzierenden (B) Bedingungen. Fr bezeichnet die Fraktion der jeweiligen Aufreinigung.

Im Gegensatz zu den bsAb, bei denen die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fraktion durch Spektralphotometrie und Abschätzen erfolgte, konnte für die bsAb-IgG-Mt ein ELISA für murines IgG verwendet werden. Daraus ergab sich in Tabelle 5-4 dargestellten Konzentrationen der einzelnen Fraktionen. Jede Fraktion enthält 3 ml Volumen.

Tabelle 5-4: Konzentrationen der Fraktionen der angereicherten, teil-gereinigten bsAb-IgG-Mt.

Fraktion	MC21bsAb-IgG-Mt [µg/ml]	MC69bsAb-IgG-Mt [µg/ml]
Fraktion 2	-	-
Fraktion 3	-	0,7
Fraktion 4	5	0,8
Fraktion 5	2,5	0,6
Fraktion 6	1,8	-
Fraktion 7	-	-

Dabei zeigte sich, dass die Konzentration des MC69bsAb-IgG im Vergleich zum MC21bsAb-IgG-Mt fast 4 fach niedriger lag. Dies war aber bereits in den Aktivitätsmessungen zu erkennen. Anzumerken ist, dass bei allen hergestellten rekombinanten Proteinen der vorliegenden Arbeit, die Konzentration der MC69-Konstrukte stets unterhalb der Werte der MC21-Konstrukte lag. Nach diesen Messungen ließen sich aus den eingesetzten 300 ml Überstand für den

MC21bsAb-IgG-Mt insgesamt 28 µg Protein herstellen, für den MC69bsAb-IgG-Mt 4,5-mal weniger, nämlich 6 µg.

5.7 *In vitro* Lyseeigenschaften der bsAb-IgG

Nach der Aufreinigung der bsAb-IgG-Mt wurde in Analogie zu den bsAb von beiden Konstrukte die Lyseaktivität gegenüber CHO-Zellen bestimmt. Dabei wurden $CD90^+$ T-Zellen als Effektorzellen eingesetzt. Nach 24 respektive 48 h wurden die Zellen mit CD45-FITC und PI gefärbt und so die spezifische Lyse in einer FACS-Analyse ermittelt.

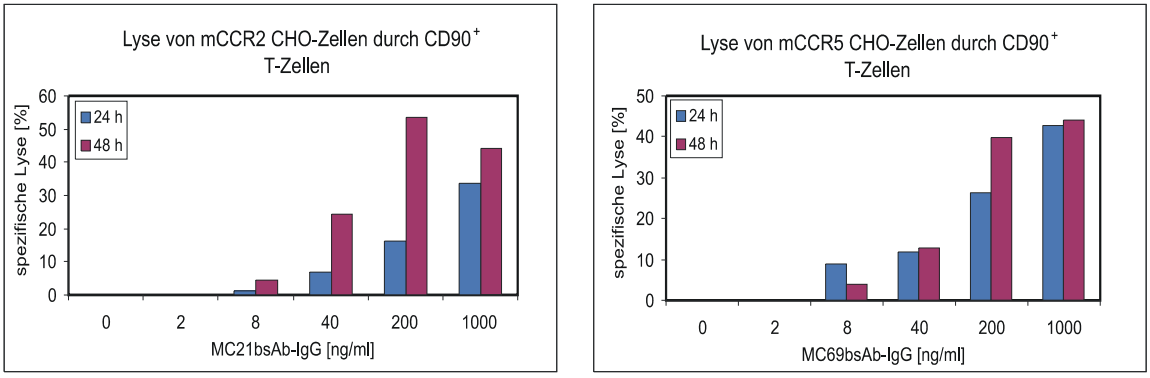

Abbildung 5-35: Spezifische Lyse von CCR positiven CHO-Zellen durch $CD90^+$ T-Zellen nach Inkubation mit den bsAb-IgG-Mt für 24 h und 48 h. Gezeigt ist ein Experiment von drei repräsentativen Experimenten.

Das MC21bsAb-IgG führt bei 1000 ng/ml nach 24 h zu einer 30 %-ige Lyse, die nach 48 h auf Werte zwischen 50 und 60 % steigt. Damit scheint das neue Konstrukt etwas schwächere Lyseeigenschaften als der bsAb zu besitzen. Gleiches gilt für den MC69bsAb-IgG. Dieser erreicht nach 48 h bei 1000 ng eine spezifische Lyse von knapp 50 %. Die ED_{50} der beiden Konstrukte läge somit zwischen 200 und 1000 ng/ml, während die bsAb eine ED_{50} von 40 bis 200 ng/ml aufweisen. Eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve ergibt sich für $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen. Allerdings ist die Lyseeffizienz von $CD4^+$ T-Zellen niedriger als bei $CD8^+$ T-Zellen (s. a. Abbildung 5-36).

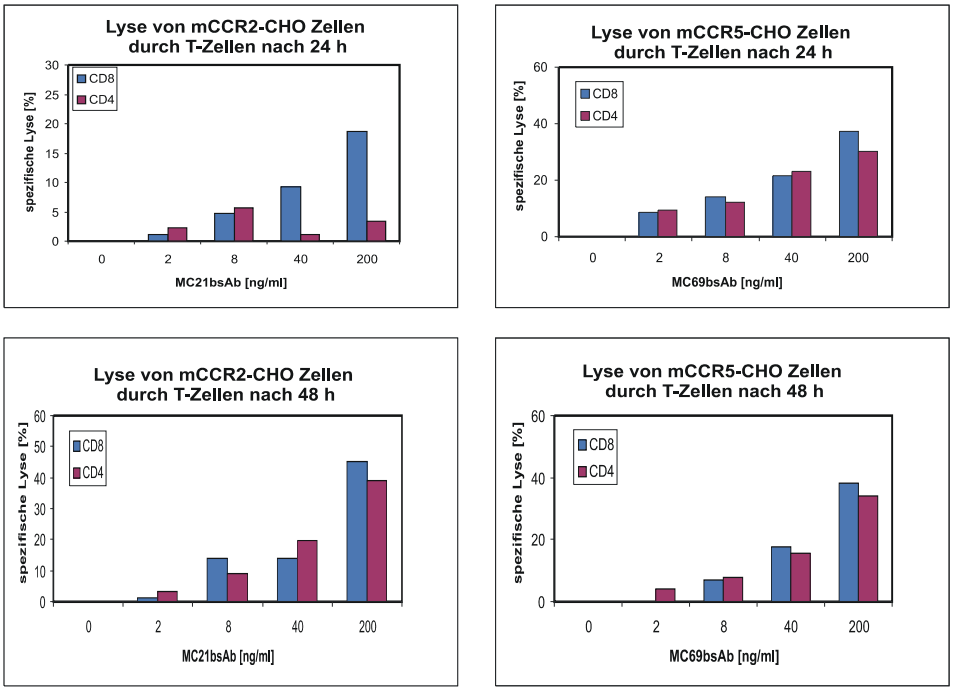

Abbildung 5-36: Lyseeffizienz von CD8$^+$ bzw. CD4$^+$ T-Zellen gegen mCCR CHO-Zellen in Gegenwart von verschiedenen bsAb-IgG Konzentrationen.

Um auszuschließen, dass diese Aktivität durch eine unspezifische Zellkopplung erfolgt, wurden zur Kontrolle die jeweils „falschen“ Zielzellen mit den bsAb-IgG für 24 h und 48 h inkubiert. MC21bsAb-IgG wurde mit mCCR5 CHO-Zellen inkubiert und MC69bsAb-IgG mit mCCR2 CHO-Zellen. In der Abbildung 5-37 ist diese Untersuchung für den MC21bsAb-IgG gezeigt.

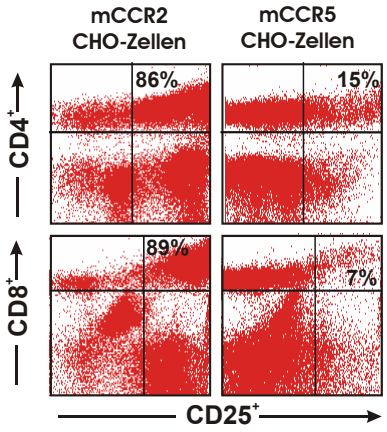

Abbildung 5-37: Abhängigkeit der Aktivierung von T-Zellen durch den bsAb-IgG von den Zielzellen. CD90$^+$ T-Zellen wurden mit mCCR2 oder mCCR5 CHO-Zellen in Gegenwart von 200 ng/ml MC21bsAb-IgG inkubiert. Nur die mCCR2 CHO-Zellen führten zu einer Aktivierung der T-Zellen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die T-Zellen nur in Anwesenheit der „richtigen“ Zielzellen durch den MC21bsAb-IgG aktiviert werden, dargestellt an der Expression von CD25. mCCR5 CHO-Zellen führen dagegen zu keiner erhöhten Expression von CD25 auf $CD90^+$ T-Zellen. Das gleiche Bild ergibt sich für die Inkubation von MC69bsAb-IgG mit verschiedenen T-Zellen.

5.8 *In vivo* Anwendung des MC21bsAb-IgG

Um die Funktion des MC21bsAb-IgG *in vivo* zu untersuchen, wurden drei gesunde Balb/c-Mäuse mit 10 µg des Proteins an Tag 1 und 5 µg an Tag 2 i. p. behandelt. Als Kontrollen wurden drei Balb/c Mäusen mit dem gleichen Volumen PBS injiziert. Vor dem Behandlungsstart wurde von allen Tieren mittels FACS ein Blutbild erstellt. Dazu wurden folgende Färbungen verwendet:

- CD44-FITC, CD25-PE, CD8-Tricolor, CD4-APC
- CD11b-FITC, CCR2-PE, CD4-Tricolor, GR-1-APC

Durch die erste Färbung wurde der Aktivierungsstatus der T-Zellpopulationen der Mäuse bestimmt. Die zweite Färbung identifizierte die $CCR2^+$ Zielzellen der Tiere vor der Behandlung mit dem Proteinkonstrukt. Am Tag 4 nach Behandlungsbeginn wurden die Tiere getötet und Blut und Milz mit den gleichen Färbungen analysiert. Zusätzlich wurde noch Serum der Tiere gewonnen.

In der Abbildung 5-38 ist die Zahl der $CD4^+$ $CCR2^+$ T-Zellen, der $CCR2^+$ $CD11b^+$ $GR\text{-}1^-$ Monozyten und von $CCR2^+$ $CD11b^+$ $GR\text{-}1^+$ myeloiden Zellen im Verhältnis zur aufgenommenen Gesamtzellzahl graphisch dargestellt. Während die $CCR2^+$ T-Zellen und $CCR2^+$ $CD11b^+$ $GR\text{-}1^-$ Monozyten sowohl in Blut und Milz im Vergleich zu Tag 1 bzw. zu den Kontrolltieren bei allen drei behandelten Tieren abnimmt, bleibt die Zahl der $CCR2^+$ $CD11b^+$ $GR\text{-}1^+$ myeloiden Zellen im Blut konstant. In der Milz der behandelten Tiere liegt die Zahl der $CCR2^+$ $CD11b^+$ $GR\text{-}1^+$ myeloiden Zellen in zwei von drei Tieren unter der Zahl in den Milzen der Kontrolltiere. Für die T-Zellen ($p < 0,05$) und die Monozyten ($p < 0,001$) im Blut ist die Abnahme signifikant (gepaarter T-Test). In der Milz sind die Werte ebenfalls signifikant verschieden für diese beiden Populationen: T-Zellen $p < 0,01$ und Monozyten $p < 0,001$ in einem ungepaarten T-Test.

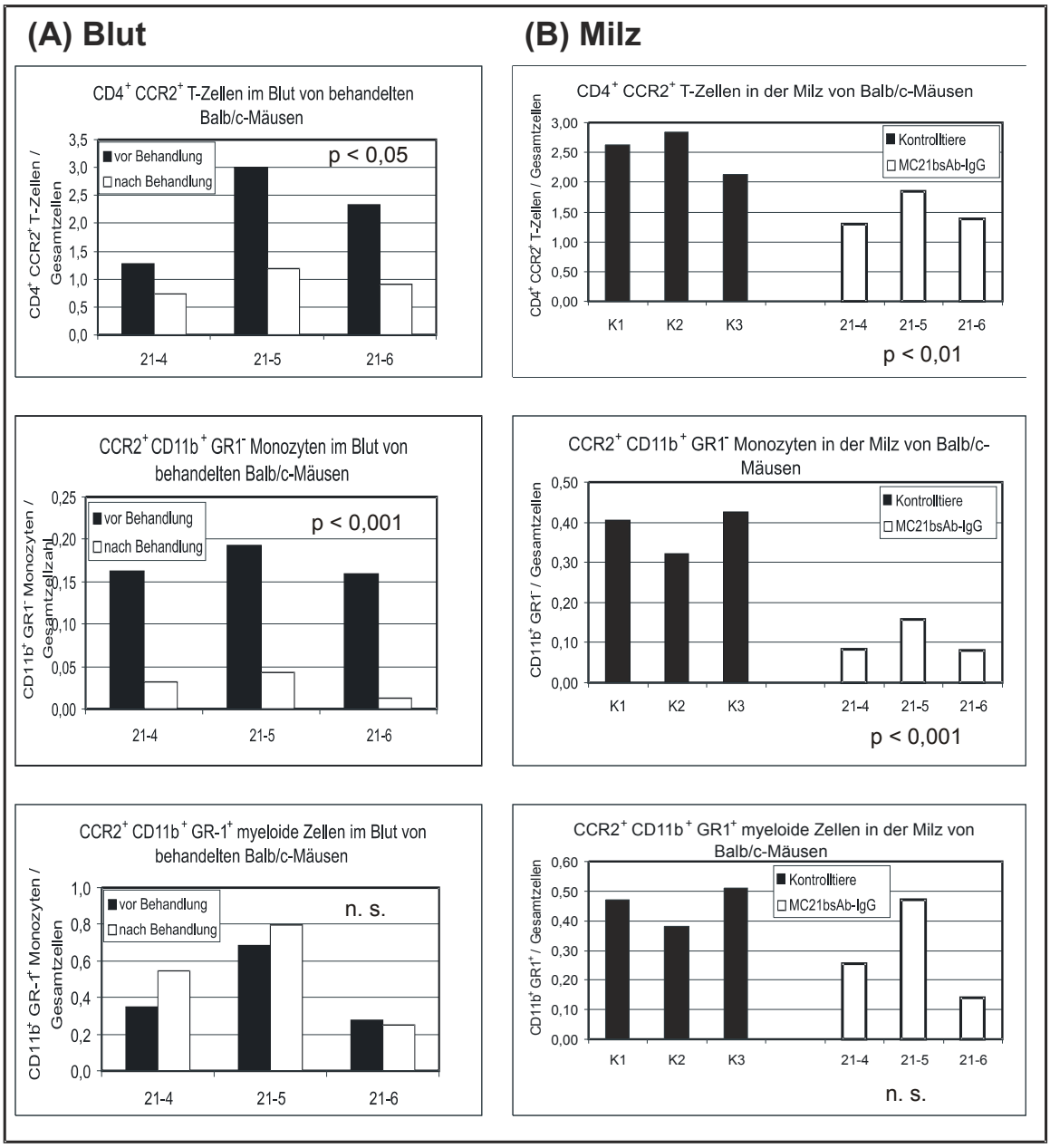

Abbildung 5-38: Anzahl der CCR2$^+$ Zielzellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in Blut und Milz von Balb/c-Mäusen nach Behandlung mit dem MC21bsAb-IgG. (A) CCR2$^+$ Zellpopulationen im Blut von Balb/c-Mäusen vor (schwarz) und nach (weiß) der Behandlung mit MC21bsAb-IgG. (B) CCR2$^+$ Zellpopulationen in der Milz von unbehandelten Kontrolltieren (schwarz) und MC21bsAb-IgG behandelten Balb/c-Mäusen (weiß). In (A) ist die statistische Signifikanz (p) des gepaarten T-Test angegeben. Bei (B) ist der T-Test ungepaart (n.s. = nicht signifikant).

Der Aktivierungsstatus der T-Zellen in Blut und Milz unterschied sich in beiden Behandlungsgruppen nicht vom Ausgangsstatus der Tiere, d. h. es war keine erhöhte CD25 Expression auf T-Zellen zu erkennen. Die CD25 Expression der

T-Zellen vor und nach der Behandlung im Blut der Tiere ist in der Tabelle 5-5 dargestellt.

Tabelle 5-5: CD25 Expression auf T-Zellen der MC21bsAb-IgG behandelten Tiere vor und nach der Behandlung.

Tier	vor Behandlung		nach Behandlung	
	CD25 CD4 [%]	CD25 CD8 [%]	CD25 CD4 [%]	CD25 CD8 [%]
21-4	10	2	8	1
21-5	10	1	10	1
21-6	10	1	7	1

Um festzustellen, ob sich im Serum der Tiere noch MC21bsAb-IgG befindet, wurde das Serum der Tiere auf mCCR2 CHO-Zellen gegeben. Anschließend wurde mit dem R439 Antikörper gefärbt und die Bindung des Serums an $CCR2^+$ Zellen im FACS ermittelt. Dabei ergaben die Kontrolltiere nur eine schwache unspezifische Bindung, während sich im Serum der drei behandelten Tieren noch ein Bindungsaktivität auf $CCR2^+$ CHO-Zellen nachweisen ließ (s. a. Tabelle 5-6). Verglichen mit der Bindungsaktivität des gereinigten MC21bsAb-IgG auf mCCR2 CHO-Zellen ergeben die MFI-Werte der Behandlungsgruppe eine MC21bsAb-IgG Konzentration zwischen 21 und 185 ng/ml. Die Verdünnungsreihe des Standards wurde dabei ebenfalls in Mausserum vorgenommen.

Tabelle 5-6: Bindung der Mausseren der Kontrolltiere und der MC21bsAb-IgG behandelten Tiere auf $mCCR2^+$ CHO-Zellen. K1-K3: Kontrolltiere; 21-4 bis 21-6: MC21bsAb-IgG Gruppe (MW = Mittelwert).

Kontrolltiere	**Mittlere Fluoreszenz-intensität (**MFI**)**	MC21bsAb-IgG Behandlungsgruppe	**Mittlere Fluoreszenz-intensität (**MFI**)**
K1	30	21-4	122
K2	45	21-5	204
K3	59	21-6	91
MW	45	MW	139

Dies zeigt, dass nach vier Tagen der MC21bsAb-IgG immer noch in der Zirkulation der behandelten Tiere nachweisbar ist.

6 Diskussion

Die spezifische Depletion von autoreaktiven Zellen könnte eine neue Möglichkeit zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen darstellen. Mit Hilfe von bispezifischen Antikörpern können verschiedene Effektorzellen des Immunsystems, wie z. B. T-Zellen zur Lyse von bestimmten Zielzellen rekrutiert werden (Kurucz, 1995; Mack, 1997; De Jonge, 1998; Dreier, 2002). Vorraussetzung für die cytotoxische Antwort ist dabei die Aktivierung der Effektorzelle durch agonistische Antikörper und die spezifische Kopplung der Zielzelle über Oberflächenmoleküle, die verstärkt auf der Zielzelle exprimiert werden. Insbesondere in der Krebstherapie wurden bereits verschiedene Oberflächenmarker von Tumoren zu diesem Zwecke genutzt (Mack, 1997; Segal, 1999; Cohen, 2003). Aber auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis konnte *in vitro* eine Depletion von $CCR5^+$ Zellen durch einen humanen, bispezifischen single-chain Antikörper gezeigt werden (Bruhl, 2001a). Auch die *in vivo* Wirksamkeit von bispezifischen Antikörpern wurde in Tiermodellen gezeigt (Brissinck, 1991; De Jonge, 1998; Dreier, 2003). So konnte z. B. die Überlebensrate von Balb/c-Mäusen mit einem BCL1 Lymphom durch die Behandlung mit einem bispezifischen Antikörper im Vergleich zu unbehandelten Tieren deutlich gesteigert werden (De Jonge, 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es murine, bispezifische Antikörper herzustellen, die T-Zellen rekrutieren, um *in vitro* und *in vivo* CCR2 bzw. CCR5 positive Zellen zu eliminieren. Aus den murinen Antikörpern gegen Maus-CCR2 (MC21) und gegen Maus-CCR5 (MC68, MC69) wurden single-chain Fragmente hergestellt. In Kombination mit dem scFv des agonistischen Antikörpers 145-2c11 gegen Maus CD3ε (Leo, 1987) wurden zwei bispezifische Antikörper zur Depletion von CCR2 bzw. CCR5 positiven Zellen produziert. Diese Antikörperkonstrukte wurden anschließend auf ihre *in vitro* und *in vivo* Lyseeigenschaften hin untersucht.

6.1 Herstellung von bispezifischen single-chain Antikörpern (bsAb)

Die kleinste bindende Einheit eines monoklonalen Antikörpers (mAb) ist das variable Fragment (Fv), bestehend aus der variablen Domäne der leichten Kette (V_L) und der variablen Domäne der schweren Kette (V_H). Sind diese beiden Domäne durch einen Polypeptidlinker verbunden, spricht man von einem

single-chain Fragment (scFv). Dabei behält das scFv die Bindungseigenschaften des „Mutterantikörpers“, lediglich die Avidität sinkt, da es nur noch monovalent ist, im Gegensatz zum bivalenten monoklonalen Antikörper (Colcher, 1998; Hudson, 1999).

Durch den Einsatz von Antikörper-spezifischen Oligonukleotidprimern lassen sich in einer RT-PCR die variablen Domänen von Immunglobulinen aus den Hybridomzellen klonieren und zu scFv verbinden (Kutemeier, 1992; Dubel, 1994). Mit der gleichen Technik konnte die V_L und V_H-Kette der beiden monoklonalen Antikörper MC21 (anti-CCR2) und MC69 (anti-CCR5) kloniert werden und zu single-chain Fragmenten fusioniert werden. Bei dem MC68 (anti-CCR5) Antikörper war die RT-PCR nur für V_L erfolgreich. Obwohl MC68-V_H im Nachhinein eine ähnliche Sequenz zu MC21 und MC69 aufwies, war es nicht möglich, die DNA durch eine RT-PCR zu amplifizieren. Gründe dafür könnte sein, dass bei einer RT-PCR, bei der degenerierte Primer eingesetzt werden, die Annealing Temperatur ein entscheidender Faktor (Dubel, 1994) ist. Ebenso dürfen nicht zu viele Stellen im Oligonukleotidprimer Mismatches mit dem Template aufweisen, um zu einer guten Amplifikation zu führen (Dubel, 1994). Weiterhin ist die Frequenz der mRNA für die schwere und die leichte Kette des Antikörpers im Vergleich zur Gesamt-RNA ein bestimmendes Element für die PCR. Durch die Erstellung einer cDNA-Bank des MC68 wurde diese Frequenz erhöht. Zum einen wurde für die reverse Transkription nur mRNA und nicht Gesamt-RNA verwendet, zum anderen wurde durch eine Größenausschlusschromatographie eine weitere Anreicherung der cDNA vorgenommen. Durch die Erstellung der cDNA-Bank konnte schließlich auch die V_H-Kette des MC68 kloniert werden.

Die hergestellten scFv für MC21, MC68, MC69 und 145-2c11 wurden in E. coli exprimiert und die Bindungseigenschaften untersucht. Wie bereits erwähnt, behalten die scFv die Affinität für ihr Antigen, die Avidität sinkt jedoch, da es sich nur noch um eine monovalente Bindung im Vergleich zum bivalenten Mutterantikörper handelt. Dies bestätigte sich auch für die in dieser Arbeit hergestellten scFv. Während die scFv von MC21, MC68 und MC69 eine gute Bindung auf CHO-Zellen zeigten, die die Chemokinrezeptor überexprimieren, banden das native Antigen auf Mausblut nur noch das MC21scFv, das MC69scFv und das 2c11scFv. Das MC68scFv zeigte hier keine Bindung mehr. Dies ist wahrscheinlich auf eine schwächere Affinität des monoklonalen MC68 Antikörpers zurückzuführen (Mack, unveröffentliche Daten). Im Vergleich zum MC69scFv, der ebenfalls murines CCR5 bindet, zeigte das MC68scFv bereits eine schlechte Bindung auf den mCCR5 CHO-Zellen. Dabei handelt es sich um überexprimierende Zellen, die im Vergleich zur nativen Expression auf Mausleukozyten deutlich mehr Rezeptoren an ihrer Oberfläche tragen. Das 145-2c11scFv zeigte ebenso wie MC21scFv und das MC69scFv eine gute Bindung auf Mausleukozyten.

Diese drei scFv (145-2c11, MC21 und MC69) wurden durch Subklonierungen mit einem weiteren Polypetidlinker verbunden und so zu zwei bispezifischen single-chain Antikörpern (bsAb) fusioniert: MC21-145-2c11 und MC69-145-2c11.

6.2 *In vitro* Eigenschaften der bispezifischen single-chain Antikörper (bsAb)

Nachdem die klonierten bsAb stabil in CHO-Zellen transfiziert waren, wurden die Zellkulturüberstände der Zellen getestet. Beide bsAb banden weiterhin an ihre Antigenstrukturen auf murinen Leukozyten. Um die bsAb auf ihre *in vitro* Eigenschaften zu untersuchen, wurden sie zunächst über den eingefügten Histidin-Tag gereinigt.

Die Reinigung der beiden bsAb aus dem Zellkulturüberstand erfolgte durch Affinitätschromatographie. Die bsAb besitzen am C-Terminus einen Histidin-Tag, mit dem die Konstrukte an zweiwertige Metallionen (z. B. Ni^{2+}) binden konnten. Über eine Gelmatrix werden die Ionen immobilisiert und so für eine Affinitätschromatographie genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der MC21bsAb selbst gereinigt, der MC69bsAb wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Micromet hergestellt. Da sich im Serum des verwendeten Zellkulturmediums aber ebenfalls Proteine befanden, die über intrinsische Histidine an die Metallionen binden konnten, traten bei der MC21bsAb Präparation Verunreinigung im hochmolekularen Bereich auf.

Mit Hilfe von verschiedenen Säulenchromatographien, z. B. einer Größen-ausschlusschromatagraphie, könnten sich für die bsAb reinere Fraktionen herstellen lassen. Durch die Zugabe von geringen Konzentrationen Imidazol könnte man die unspezifische Bindung von Proteinen aus dem Zellkulturmedium minimieren. Und auch die Verwendung anderer Metallionen (Zn^{2+}, Cu^{2+}) als Bindungspartner würden zu unterschiedlichen Reinheitsgraden führen (Gaberc-Porekar, 2001). Der MC21bsAb wurde zunächst nur für erste *in vitro* und *in vivo* Versuche hergestellt, so dass die Reinheit der Chromatographie nicht entscheidend war. Wichtig war nur eine Konzentrierung der Proteine durch die Affinitätschromatographie.

Mit den gereinigten bsAb wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt, was die Aktivierung von T-Zellen und die Lyse von mCCR CHO-Zellen betraf. Für die Aktivierung von T-Zellen wurde die Expression des CD25 Rezeptors herangezogen. Dabei handelt es sich um einen sehr sensitiven Rezeptor, der nach Ausschüttung von IL-2 auf T-Zellen bereits nach wenigen Stunden stark hochreguliert wird (Janeway, 1997). So zeigte sich bei MC21bsAb, dass eine Konzentration von 40 ng/ml nach 24 h zu einer 50 %-igen Aktivierung von

T-Zellen führte, dargestellt durch die Expression des Aktivierungsmarkers CD25. Bei dem MC69bsAb reichten bereits 8 ng/ml für eine 50 %-ige Aktivierung. Eine vollständige Aktivierung von $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen war bei beiden Konstrukten bei 1 µg/ml zu erkennen. Der Aktivierungsstatus der T-Zellen blieb nach 48 h gleich. Diese Aktivierung war abhängig von der Zielzelle und dem verwendeten bsAb. So führte der MC21bsAb in Gegenwart von mCCR5 CHO-Zellen nicht zur CD25 Expression auf T-Zellen, das gleiche galt für den MC69bsAb und mCCR2 CHO-Zellen. Dies bedeutet, das beide bsAb nur in Gegenwart der richtigen Zielzelle zu einer Aktivierung von T-Zellen führen, wodurch ein hohes Maß an Spezifität gewährleistet war und unspezifische Lyse von anderen Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Neben der Aktivierung der T-Zellen zeigte sich auch eine Dosisabhängigkeit bei der Lyse der CHO-Zielzellen. Als Maß für die Lyseaktivität wird die effektive Dosis (ED_{50}) herangezogen, bei der eine halbmaximale spezifische Lyse erreicht ist. Dabei wird die höchste, erreichte spezifische Lyse als 100 % angenommen.

Während der MC69bsAb schon nach 24 h eine ED_{50} von 40 ng/ml aufwies, war die ED_{50} des MC21bsAb zwar auch bei 40 ng/ml, aber erst nach 48 h. In den ersten 24 h war nur eine sehr geringe Effektivität des MC21bsAb zu erkennen. Diese zeitlich unterschiedliche Lyseeffizienz der beiden bsAb kann mit der Stabilität der Zielzellen zusammenhängen. Beide mCCR Zellen sind stabil transfiziert, wobei nicht jedes exprimierte Protein gleich gut von den Zellen vertragen wird. So war z. B. bei den mCCR5 CHO-Zellen ein schlechteres Wachstum gegenüber den mCCR2 Zellen und auch eine höhere Prozentzahl an toten Zellen in Abwesenheit des bsAb zu erkennen. Insgesamt schienen die mCCR5 Zellen empfindlicher gegenüber der Lyse durch T-Zellen als mCCR2 Zellen zu sein. Bei anderen bsAb zeigten sich auch Unterschiede in der Lyse bei verschiedenen Zielzellen. Ein bsAb aus 17-1A x CD3 führte bei X63-17-1A Zellen zu einer 90 %-igen spezifischen Lyse bei einer Konzentration von 61 ng/ml. Bei einer Kato-Zelllinie dagegen kommt es bei 61 ng/ml nur zu einer 30 %-igen Lyse (Mack, 1997).

Die lytische Aktivität von Effektorzellen in Gegenwart von bsAb ist von mehreren Faktoren abhängig. Ein Faktor ist das Verhältnis der Effektorzellen bezogen auf die Zielzellen. Je höher dabei die Zahl der Effektorzellen, desto stärker ist die Lyse der Zielzellen. Unterhalb eines Verhältnisses von 5:1 ergeben sich deutliche Unterschiede in der Cytotoxizität (Dreier, 2002; Kurucz, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde stets ein Effektor:Ziel Verhältnis von 5:1 verwendet.

Auch die ED_{50} variiert bei verschiedenen bispezifischen single-chain Antikörpern. So zeigte z. B. eine humanes Konstrukt aus CD19 x CD3 eine ED_{50} im Bereich von wenigen Pikogramm pro ml (Dreier, 2002), während die

ED_{50} des bsAb von Kurucz bei 200 ng/ml lag (Kurucz, 1995). Ausschlaggebend dafür sind die Affinität der scFv zu ihren Antigenen und die Art über die die Effektorzellen aktiviert werden. Während die T-Zell Aktivierung in der Arbeit von Dreier unabhängig von einer Costimulation der T-Zellen ist (Dreier, 2002; Dreier, 2003), erhöht sich die Lyseeffizienz und *in vivo* Wirksamkeit eines bsAb gegen ein BCL1 Lymphom durch eine zusätzliche Aktivierung des Costimulators CD28 (Demanet, 1996). Die bsAb gegen die Chemokinrezeptoren benötigen keine zusätzliche Costimulation. Durch die alleinige Gabe der bsAb war bereits eine starke Zielzelllyse im Bereich von wenigen ng/ml erkennbar. Eine Costimulation durch die CHO-Zellen kann auch ausgeschlossen werden, da diese dazu nicht in der Lage sind, wie in der Arbeit von Natesan gezeigt wurde (Natesan, 1996).

Zusammenfassend zeigten, die in dieser Arbeit hergestellten bispezifischen single-chain Antikörper *in vitro* eine gute Lyseeffizienz gegenüber CHO-Zellen, die die jeweiligen Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche trugen.

6.3 *In vivo* Untersuchungen der bsAb

Nachdem sich in den *in vitro* Untersuchungen eine gute Effektivität der bsAb gezeigt hatte, sollten die teil-gereinigten Konstrukte auch auf ihre *in vivo* Tauglichkeit untersucht werden. In mehreren *in vivo* Behandlungen mit bsAb gegen B-Zell Lymphome konnte bereits eine gesteigerte Überlebensrate von behandelten Tieren gezeigt werden. Die Menge an bsAb, mit der die Tiere in diesen Studien behandelt wurden, variierte stark. Während de Jonge und Kollegen schon mit 5 µg/Maus ihres bsAb eine gesteigerte Überlebensrate von Balb/c-Mäusen mit einem BCL1 Lymphom sahen (De Jonge, 1998), behandelten Cohen et al. Mäuse mit dem B-Zell Lymphom 38C-13 mit 200 µg/Maus ihres bsAb (Cohen, 2003).

Für einen ersten Depletionsversuch von $CCR2^+$ Zellen in gesunden Balb/c-Mäusen wurden deswegen zunächst 12.5 µg (200 µl) des MC21bsAb i. v. täglich für vier Tage gegeben. Dies entsprach dem maximalen Volumen, das Mäusen i. v. verabreicht werden kann. Im Anschluss daran wurden Blut, Milz und Leber der Tiere auf die Anwesenheit von $CCR2^+$ Zellen mittels FACS untersucht. Hier zeigte sich keine Depletion der Zielzellen. Da es sich bei den Tieren um gesunde Mäuse handelte, könnte sowohl die geringe Anzahl an $CCR2^+$ Zellen, als auch die starke Zirkulation der Leukozyten, als Gründe für die fehlende Wirksamkeit des MC21bsAb in Frage kommen. Ebenso wäre es möglich, dass die Konzentration des MC21bsAb nicht ausreichend war, um eine Depletion zu erreichen. Deshalb wurden in einem weiteren *in vivo* Versuch neun Monate alte SNF1-Mäuse behandelt mit dem MC69bsAb. Der MC69bsAb wurde in diesem Modell verwendet, da hier eine höhere Ausgangskonzentration

des gereinigten Proteins vorlag. Zusätzlich zeigen die SNF1-Tiere ab einem Alter von sechs Monaten eine Lupus Nephritis, die mit einer starken Akkumulation von $CCR5^+$ Zellen in der Milz und der Niere einhergeht. D. h. hier hatte man also eine lokale Ansammlung von Ziel- und Effektorzellen im Gewebe, so dass der MC69bsAb besser wirken sollte. Die SNF1-Mäuse erhielten morgens und abends für vier Tage eine i. p. Injektion von 70 µg MC69bsAb. Nach Beendigung der Behandlung wurden Blut, Milz und Niere auf $CCR5^+$ Zellen untersucht. Allerdings zeigte sich auch hier keine sichtbare Depletion von $CCR5^+$ Zellen. Im Gegenteil fand sich in der Milz und den Nieren der behandelten Tiere eine erhöhte Zahl von $CCR5^+$ Monozyten und T-Zellen. Es ist durchaus möglich, dass der MC69bsAb zu einer Aktivierung von T-Zellen geführt hat und auch anfänglich eine Depletion stattfindet. Durch die Entstehung einer lokalen Entzündungsreaktion wäre aber eine vermehrte Infiltration von Monozyten und T-Zellen in die Milz und Niere der Tiere denkbar. Die aktivierten T-Zellen könnten lokal Chemokine produzieren und somit die Infiltration einleiten. Dies könnte den Anstieg der beiden Zellpopulationen in den behandelten Tieren erklären.

Die Ineffektivität der beiden bsAb könnte auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein. Zum einen besitzen bispezifische single-chain Antikörper eine sehr kurze Halbwertszeit. De Jonge zeigte, dass 40 µg eines bispezifischen single-chain Antikörpers mit dem 2c11scFv und einem scFv gegen einen Tumormarker *in vivo* nach 30 min die Hälfte der Aktivität verliert. Nach zwei Stunden lag die Aktivität nur noch bei 10 % (De Jonge, 1998). Colcher und Mitarbeiter analysierten die Gewebeverteilung eines bivalenten single-chain Konstruktes $(scFv)_2$. Hier befanden sich nach 30 min im Blut noch ~17 % der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g), in der Niere dagegen ~35 %. Nach 6 h lagen noch 1 % im Blut und 1,5 % in der Niere vor (Colcher, 1998; Pavlinkova, 1999). Die glomeruläre Filtrationsbarriere der Niere für Proteine liegt bei etwa 70 kDa, d. h. Proteine die kleiner als 70 kDa sind, werden durch die Niere ausgeschieden. Die Größe der verwendeten bsAb liegt bei 53 kDa, die Konstrukte werden also über den Urin ausgeschieden (Colcher, 1998; Kipriyanov, 1999).

Eine weitere Größe, die die *in vivo* Effektivität der bsAb beeinflusst, ist die Antigenbindung. Dabei gilt je höher die Affinität des scFv für das Antigen, desto besser die pharmakokinetischen Eigenschaften (Kipriyanov, 1999; Hudson, 1999; Worn, 2001). Ein Diabody Konstrukt aus zwei scFv zeigte eine Halbwertszeit $t_{½}$ von 8 min, während ein Tandem-Konstrukt mit vier Bindungsstellen einer höheren Affinität eine $t_{½}$ von 28 min aufwies (Kipriyanov, 1999). Dies spiegelte sich auch in der Dissoziationskonstante (K_D) der beiden Proteine wieder. Die K_D des Diabodies lag bei 1,29 nM, die des Tandemproteins bei 0,47 nM, d. h. eine stärkere Bindung an das Antigen führt gleichzeitig zu einer Erhöhung der Halbwertszeit des Proteins. Der in dieser Arbeit verwendete

monoklonale Antikörper gegen CD3 (145-2c11) besitzt laut Jost eine niedrige Affinität für sein Antigen (K_A~0,7 x 10^{-7} M^{-1}). Dies könnte ebenfalls die Ineffektivität der bsAb erklären, wobei die sehr kurze Halbwertszeit in der Zirkulation jedoch ausschlaggebend sein dürfte.

6.4 Modifikation der bsAb zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften

In der Tumortherapie ist die Gewebepenetration eine wichtige Vorraussetzung für die Wirksamkeit von Arzneistoffen. Hier weisen die bispezifischen single-chain Antiköper gute Eigenschaften auf. Trotz einer schnellen Plasma Clearance kommt es zu einer guten Verteilung der bsAb im Gewebe und zu einer starken Anreicherung in Tumorgeweben (Colcher, 1998). Da die *in vitro* Wirksamkeit derartiger bsAb bei wenigen ng/ml liegt, führt dies trotz des Verlustes der Proteine durch den Urin, dennoch zu einer guten Effektivität bei der Krebstherapie von Tumoren.

Im Falle der CCR positiven Zellen handelt es sich jedoch um sehr bewegliche Zellen, die im Falle einer Entzündung ins betroffene Gewebe auswandern und sich dort auch anreichern, aber nicht mit einem festen Tumor vergleichbar sind. Eine längere Verweildauer der bsAb gegen Chemokinrezeptoren in der Zirkulation wäre daher erstrebenswert, um die Zielzellen bereits dort angreifen zu können und den Verlust der Proteine durch die Niere zu vermeiden.

Die Proteine mit den besten Halbwertszeiten in der Zirkulation sind Antikörper. Trotz ihrer Größe von 150 kDa sind sie dennoch gewebegängig (Colcher, 1998). Murines IgG1 besitzt z. B. eine $t_{½}$ in der α–Phase von 20 h, in der β-Phase sogar 85 h. In der α–Phase findet hauptsächlich die Elimination der Proteine statt, d. h die Proteine werden ausgeschieden bzw. abgebaut. In der β-Phase kommt es zur Verteilung der Proteine im Gewebe. Die mittlere Verweildauer des murinen IgG1 liegt bei 117 h (Kim, 1995). Verantwortlich für diese hohen Halbwertszeiten ist die Fc-Region des IgG1 (Kim, 1994; Kim, 1995). Ein rekombinantes Protein bestehend aus der Gelenkregion, C_H2- und C_H3-Domäne weist noch eine mittlere Verweildauer von 100 h in der Zirkulation auf (Kim, 1995).

Das Fc-Motiv wurde aufgrund dieser Befunde an den C-Terminus der beiden bsAb fusioniert. Daraus entstand ein bsAb-IgG1. Durch diese Fusion sollten zum einen die Halbwertszeit erhöht werden, zum anderen kommt es durch eine Ausbildung von Disulfidbrücken über die Gelenkregion des Fc-Teils zu einer Dimerisierung und damit zu besseren Bindungseigenschaften.

In Aktivierungsstudien mit den bsAb-IgG zeigte sich jedoch das diese Konstrukte über ihren Fc-Teil zu einer starken CD25 Expression auf T-Zellen

führten. Dabei würde das bispezifische Konstrukt durch den IgG1-Teil auf CD16 (FcγRIII) positiven Zellen immobilisiert (Hazenbos, 1998) und führte durch das agonistische 145-2c11scFv zur Aktivierung von T-Zellen. Der monoklonale 145-2c11 Antikörper führte bei *in vivo* Untersuchungen durch eine Immobilisierung auf Fc-Rezeptoren zu einer systemischen Ausschüttung von Cytokinen wie IL-2, IL-6, IFN-γ und TNF-α (Alegre, 1995; Scott, 1990), die für die akute Toxizität des Antikörpers verantwortlich waren. Nach der ersten systemischen Reaktion der T-Zellen folgte die Induktion einer Anergie der T-Zellen gegenüber weiteren Stimulationen. Dies hat eine Immunsuppression in den Tieren zur Folge (Hirsch, 1988). Die bispezifischen Konstrukte mit dem IgG1-Teil könnten durch die Bindung des Fc-Teils an den Fc-Rezeptoren, die Wirkung des monoklonalen 145-2c11 imitieren und zu den gleichen Effekten – systemische Cytokinausschüttung und Immunsuppression – führen. Um diese Nebenwirkungen auszuschließen, waren weitere Veränderungen an den bispezifischen Antikörpern nötig.

Als Möglichkeiten der Modifikation kommen z. B. Maus-IgG3 oder die Mutation der Fc-Bindungsstelle in Frage. So ließen sich die Nebenwirkungen des 145-2c11 durch die Modifikation des Isotyps von IgG2a zu einem IgG3 Antikörper (Alegre, 1995). Allerdings tendierte der IgG3 Isotyp dazu, unlösliche Aggregate zu formen und somit seine Gewebegängigkeit zu verlieren (persönliche Kommunikation mit J. Bluestone). Im Jahr 2000 beschrieb die Arbeitsgruppe um Jacob (Sondermann, 2000) die Kristallstruktur des humanen IgG1 Fragments gebunden an den FcγRIII. In dieser Arbeit enthalten sind eine Sequenzanalyse der humanen und murinen IgG Isotypen und deren putativen Interaktionen mit Fcγ-Rezeptoren. Für murines IgG1 wäre demnach das Val234 eine der Aminosäuren, die hauptsächlich mit den Bindungsstellen der FcγR interagieren. Nach Korrespondenz mit Herrn Jacob und Herrn Sondermann wurden deswegen die Aminosäuren Val234 und Ser235 durch eine weitere Klonierung mutiert. Die eher planaren und kleinen Aminosäuren Val und Ser wurden in ein aromatisches Tryptophan und respektive ein basisches Arginin mutiert (V234W und S235R), was zu einer Blockade der Fc-Bindung führen sollte. Diese Mutation in den bispezifischen IgG1 Antikörpern führte zu einer Hemmung der Fc-abhängigen T-Zellaktivierung, bezogen auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD25. Im Gegensatz dazu blieb jedoch die spezifische Aktivierung der Effektor-T-Zellen in Gegenwart der CCR^+ Zielzellen erhalten. Diese Modifikation der Fc-Bindungsstelle, ist die erste Mutation, die anhand der Kristallstruktur des IgG-Fc-Rezeptorkomplexes hergestellt wurde und eine Inhibition der Fc-Bindung hervorruft.

Durch das Anfügen der Fc-Motivs an die bispezifischen single-chain Antikörper wurde neben der Dimerisierung ebenfalls eine deutlich erhöhte Halbwerstzeit der Konstrukte erreicht. So konnte noch nach vier Tagen im Serum von

behandelten Balb/c-Mäusen eine Bindungsaktivität des MC21bsAb-IgG-Mt auf mCCR2 CHO-Zellen nachgewiesen werden.

Die Dimerisierung hingegen führte nicht zu einer erhöhten Lyseaktivität. Ob beide Bindungsstellen für CD3 oder den CCR zugänglich sind, hängt von der Beweglichkeit der Konstrukte ab. Während die Bindungsstelle eines murinen IgG1 nach der Gelenkregion frei drehbar ist, bleibt die Gelenkregion selbst jedoch recht starr (Harris, 1998). Da sich die CD3 und CCR Bindungsstelle aber auf der gleichen Seite befinden, könnte die Bindung eines Antigens, die Aktivität der jeweils anderen Stelle sterisch behindern. Obwohl also zwei Bindungsstellen für ein Antigen vorhanden sind, wäre so nur eine frei zugänglich. Um dies zu vermeiden, könnten weitere Modifikationen an den bispezifischen Konstrukten vorgenommen werden. So wäre ein Konstrukt denkbar, das am N-Terminus der Gelenkregion eine Bindungsspezifität trägt und am C-Terminus der C_H3-Region die zweite Bindungsspezifität. Über die Gelenkregion käme es zu einer Dimerisierung, wobei sich an jedem Ende des Fc-Teils jeweils zwei Bindungsstellen für ein Antigen befänden. Dies bedarf weiterer Arbeit.

6.5 *In vivo* Einsatz des MC21bsAb-IgG

Der *in vivo* Einsatz des MC21bsAb-IgG-Mt zeigte im Gegensatz zum MC21bsAb tendenziell eine Verringerung der $CCR2^+$ $CD4^+$ T-Zellen im Blut der behandelten Tiere im Vergleich zum Status vor der Behandlung. Ebenso verringerte sich die Zahl der $CD11b^+$ $GR1^-$ Monozyten im Blut. Beide Zahlen der Zellpopulationen lagen auch in den Milzen der behandelten Tiere unterhalb der Zahl der Zellen in den Milzen der Kontrolltiere. Diese Befunde würden für eine erfolgreiche Depletion von $CCR2^+$ Zellen sprechen. Lediglich die Zahl der $CCR2^+$ $CD11b^+$ $GR\text{-}1^+$ Zellen bleibt im Blut unverändert und nimmt in der Milz in zwei von drei Tieren ab. Bei dieser Zellpopulation handelt es sich möglicherweise um myeloide Vorläuferzellen. Die Abgrenzung der einzelnen Differenzierungsstadien von myeloiden Zellen mittels Durchflußzytometrie ist schwierig. So werden myeloide Vorläuferzellen in verschiedenen Arbeiten als $CD11b^+$ $GR\text{-}1^+$ beschrieben (Bronte, 2000; Lagasse, 1996).

In einer Arbeit von Schneider et al. werden durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers 145-2c11 (anti-CD3) hämatopoetische Veränderungen in Mäusen beschrieben. Durch eine einmalige Injektion von 10 µg des 145-2c11 kommt es in Mäusen bereits nach wenigen Stunden zur Ausschüttung der beiden Cytokine IL-3 und GM-CSF. Diese beiden Wachstumsfaktoren führen bis zum Tag 4 nach der Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung von myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark und der Milz (Schneider, 1997). Die Gabe des MC21bsAb-IgG, der über die

CD3-Bindungstelle des 145-2c11 verfügt, könnte einen ähnlichen Effekt in den behandelten Tieren auslösen. Eine Aktivierung der T-Zellen durch die Kopplung von Ziel- und Effektorzellen könnte neben der Depletion von $CCR2^+$ Monozyten gleichzeitig zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und darüber zur Neubildung von myeloiden Zellen führen. Eine Depletion dieser Zellpopulation wäre dann nicht erkennbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Behandlung von gesunden Balb/c-Mäusen mit dem MC21bsAb-IgG eine Verringerung von $CCR2^+$ $CD4^+$ T-Zellen und $CCR2^+$ $CD11b^+$ Monozyten erkennbar ist. In weiterführenden *in vivo* Experimente soll die Rolle der myeloiden Vorläuferzellen bei Behandlung mit dem MC21bsAb-IgG näher charakterisiert werden. Dabei ist eine genauere Abgrenzung der myeloiden Vorläuferzellen nötig.

6.6 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten bsAb-IgG-Mt sind die ersten Konstrukte dieser Art. Im Gegensatz zu den bispezifischen Antikörper die durch die Hybrid-Hybridomtechnologie entstehen, handelt es sich bei den bsAb-IgG um rekombinante Proteine, die in den Zellkulturüberstand von stabil transfizierten CHO-Zellen sezerniert werden, wodurch eine effiziente Reinigung über einen eingefügten His-Tag möglich ist. Zusätzlich enthält das Fc-Motiv eine Mutation zur Hemmung der Bindung an Fc-Rezeptoren enthalten. Diese Mutation wurde zum ersten Mal aufgrund einer Kristallstruktur des IgG-FcR-Komplex hergestellt. Neben guten *in vitro* Lyseeigenschaften, zeigen zumindest der MC21bsAb-IgG-Mt auch *in vivo* eine deutliche Zelldepletion von $CCR2^+$ Zellen.

Beide bsAb-IgG-Mt stellen interessante Werkzeuge dar, um die Rolle der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 in verschieden Mausmodellen von entzündlichen Krankheiten weiter zu untersuchen. Insbesondere Krankheitsmodelle wie die Kollagen-induzierte Arthritis bei DBA/1-Mäusen oder verschiedene Lupus Nephritis Tiermodelle sind hier interessant. Bei diesen Modellen sind sowohl CCR2 und CCR5 positive Zellen maßgeblich am Krankheitsverlauf beteiligt. Hier kann neben der Zusammensetzung der Zellpopulationen v. a. auch der Krankheitsverlauf zur Beurteilung der Effektivität der bispezifischen Konstrukte herangezogen werden. Dadurch könnte der Einfluss einer Zelldepletion auf die Entwicklung der Krankheiten in verschiedene Stadien analysiert werden.

7 Zusammenfassung

Die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 spielen in verschiedenen murinen entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Eine Depletion der CCR2 bzw. CCR5 positiven Zellen in solchen Krankheitsmodellen könnte daher entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und molekularbiologische Herstellung von murinen bispezifischen Antikörpern mit den Spezifitäten für CD3 auf T-Zellen und CCR2 bzw. CCR5, die zur Depletion von Chemokinrezeptor-positiven Zellen eingesetzt werden können. Dazu wurden zwei unterschiedliche rekombinante bispezifische Antikörperformen hergestellt. Zum einen wurde die kleinstmögliche Form von bispezifischen Antikörpern produziert, so genannte bispezifische single-chain Antikörper (bsAb). Zum anderen wurden diese bsAb mit der Gelenk-, C_H2- und C_H3-Dömäne des murinen IgG1 Antikörpers modifiziert.

Die bsAb bestehen aus zwei single-chain Fragmenten (scFv), die über einen Polypeptidlinker verbunden sind. Ein scFv besteht dabei aus den variablen Immunglobulindomänen von monoklonalen Antikörpern, die an der Antigenbindung beteiligt sind. In dieser Arbeit wurde aus den monoklonalen Antikörpern gegen Maus-CCR2 (MC21), Maus-CCR5 (MC68, MC69) und Maus-CD3ε (145-2c11) scFv hergestellt und zu zwei verschiedenen bsAb kombiniert: CCR2 x CD3ε und CCR5 x CD3ε.

Die scFv konnten in E. coli exprimiert werden, während die bsAb von eukaryontischen CHO-Zellen produziert wurden. Alle in dieser Arbeit hergestellten Proteine wurden durch Affinitätschromatographie über einen C-terminalen Histidin-Tag aufgereinigt.

Mittels FACS-Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl die scFv als auch die bsAb-Konstrukte die Bindungsspezifität des jeweiligen Mutterantikörpers beibehalten haben.

In vitro Lyseassays zeigten, dass durch die beiden bsAb die lytische Aktivität von $CD3^+$ T-Zellen auf CHO-Zellen gerichtet werden kann, die die murinen Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 exprimierten. Die Aktivierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen, sowie die Lyse der Zielzellen war dabei abhängig von der bsAb-Konzentration. Bereits eine Konzentration von wenigen ng/ml führte dabei zu einer effektiven *in vitro* Lyse der Zielzellen.

Allerdings zeigte sich in Tierversuche nicht die gewünschte Depletion von CCR2 und CCR5 positiven Zellen durch die bispezifischen single-chain

Antikörper. Für bispezifische single-chain Antikörper ist bekannt, dass sie nur eine sehr geringe Halbwertszeit besitzen. Während die Halbwertszeit *in vivo* bei etwa 30 min liegt, ist *in vitro* erst nach 48 h eine effektive Lyse durch die hergestellten bsAb zu erkennen. Um die Halbwertszeit zu erhöhen, wurden die bsAb durch die Gelenk-, C_H2- und C_H3-Dömäne des murinen IgG1 Antikörpers modifiziert. Zusätzlich wurde die Bindungsstelle des IgG1 für Fc-Rezeptoren mittels PCR mutiert, da die nicht mutierten Fc-Konstrukte durch die Bindung an Fc-Rezeptoren zu einer starken Aktivierung von T-Zellen in Abwesenheit von CCR^+ Zellen führte. Nach der Mutation der Fc-Bindungsstelle wurden Milzzellsuspensionen nicht mehr durch die Zugabe der bispezifischen IgG1 Antikörper aktiviert.

Durch das Anfügen des IgG1-Teils an die beiden bsAb kam es zu einer Dimerisierung der Konstrukte, die durch drei Disulfidbrücken in der Gelenkregion vermittelt wird. Dabei veränderte sich aber die Wirkungskonzentration der bispezifischen IgG-Konstrukte nicht merklich gegenüber den monomeren bsAb.

In einer ersten *in vivo* Behandlung von Balb/c-Mäusen mit dem bispezifischen Anitkörper gegen CCR2 (MC21bsAb-IgG) war eine signifikant niedrigere Anzahl an $CD4^+$ $CCR2^+$ T-Zellen und $CCR2^+$ $CD11b^+$ Monozyten in Blut und Milz der behandelten Tiere zu erkennen. Ebenso konnte der bispezifische Antikörper noch vier Tage nach Behandlungsbeginn im Serum der Tiere nachgewiesen werden.

Somit konnte aus den murinen, monoklonalen Antikörpern gegen CCR2, CCR5 und CD3ε bispezifische Antikörper hergestellt werden, die die lytische Aktivität von T-Zellen gegen CCR2 bzw. CCR5 positiven Zellen richten und die viel versprechende Reagenzien für eine *in vivo* Depletion sind.

8 Literaturverzeichnis

Adams, G. P., R. Schier, A. M. McCall, H. H. Simmons, E. M. Horak, R. K. Alpaugh, J. D. Marks and L. M. Weiner (2001). High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. Cancer Res **61**(12): 4750-5.

Alegre, M. L., J. Y. Tso, H. A. Sattar, J. Smith, F. Desalle, M. Cole and J. A. Bluestone (1995). An anti-murine CD3 monoclonal antibody with a low affinity for Fc gamma receptors suppresses transplantation responses while minimizing acute toxicity and immunogenicity. J Immunol **155**(3): 1544-55.

Ashe, P. C. and M. D. Berry (2003). Apoptotic signaling cascades. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **27**(2): 199-214.

Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. Adv Immunol **55**: 97-179.

Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser (1997). Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol **15**: 675-705.

Balashov, K. E., J. B. Rottman, H. L. Weiner and W. W. Hancock (1999). CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6873-8.

Benkirane, M., D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup and K. T. Jeang (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. J Biol Chem **272**(49): 30603-6.

Blanpain, C., J. M. Vanderwinden, J. Cihak, V. Wittamer, E. Le Poul, H. Issafras, M. Stangassinger, G. Vassart, S. Marullo, D. Schlndorff, M. Parmentier and M. Mack (2002). Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. Mol Biol Cell **13**(2): 723-37.

Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1925-30.

Braun, J. and J. Sieper (2003). Overview of the use of the anti-TNF agent infliximab in chronic inflammatory diseases. Expert Opin Biol Ther **3**(1): 141-68.

Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp and R. Forster (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J Exp Med **192**(11): 1545-52.

Brissinck, J., C. Demanet, M. Moser, O. Leo and K. Thielemans (1991). Treatment of mice bearing BCL1 lymphoma with bispecific antibodies. J Immunol **147**(11): 4019-26.

Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (2001). The immunological synapse. Annu Rev Immunol **19**: 375-96.

Bronte, V., E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N. P. Restifo and P. Zanovello (2000). Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. Blood **96**(12): 3838-46.

Bruhl, H., J. Cihak, M. Stangassinger, D. Schlondorff and M. Mack (2001a). Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV. J Immunol **166**(4): 2420-6.

Bruhl, H., K. Wagner, H. Kellner, M. Schattenkirchner, D. Schlondorff and M. Mack (2001b). Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. Clin Exp Immunol **126**(3): 551-9.

Campbell, J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu and E. C. Butcher (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. Nature **400**(6746): 776-80.

Carter, P. (2001a). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. Nat Rev Cancer **1**(2): 118-29.

Carter, P. (2001b). Bispecific human IgG by design. J Immunol Methods **248**(1-2): 7-15.

Choi, A. M. and D. B. Jacoby (1992). Influenza virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. FEBS Lett **309**(3): 327-9.

Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhorst (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. Annu Rev Immunol **6**: 629-62.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J **326 (Pt 1)**: 1-16.

Cohen, S., J. Haimovich and N. Hollander (2003). Anti-idiotype x anti-LFA-1 bispecific antibodies inhibit metastasis of B cell lymphoma. J Immunol **170**(5): 2695-701.

Colcher, D., G. Pavlinkova, G. Beresford, B. J. Booth, A. Choudhury and S. K. Batra (1998). Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. Q J Nucl Med **42**(4): 225-41.

Colditz, I. G., R. D. Zwahlen and M. Baggiolini (1990). Neutrophil accumulation and plasma leakage induced in vivo by neutrophil-activating peptide-1. J Leukoc Biol **48**(2): 129-37.

Croft, M. and C. Dubey (1997). Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. Crit Rev Immunol **17**(1): 89-118.

Darbonne, W. C., G. C. Rice, M. A. Mohler, T. Apple, C. A. Hebert, A. J. Valente and J. B. Baker (1991). Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. J Clin Invest **88**(4): 1362-9.

De Jonge, J., C. Heirman, M. de Veerman, S. Van Meirvenne, M. Moser, O. Leo and K. Thielemans (1998). In vivo retargeting of T cell effector function by recombinant bispecific single chain Fv (anti-CD3 x anti-idiotype) induces long-term survival in the murine BCL1 lymphoma model. J Immunol **161**(3): 1454-61.

Demanet, C., J. Brissinck, J. De Jonge and K. Thielemans (1996). Bispecific antibody-mediated immunotherapy of the BCL1 lymphoma: increased efficacy with multiple injections and CD28-induced costimulation. Blood **87**(10): 4390-8.

Dreier, T., P. A. Baeuerle, I. Fichtner, M. Grun, B. Schlereth, G. Lorenczewski, P. Kufer, R. Lutterbuse, G. Riethmuller, P. Gjorstrup and R. C. Bargou (2003). T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. J Immunol **170**(8): 4397-402.

Dreier, T., G. Lorenczewski, C. Brandl, P. Hoffmann, U. Syring, F. Hanakam, P. Kufer, G. Riethmuller, R. Bargou and P. A. Baeuerle (2002). Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. Int J Cancer **100**(6): 690-7.

Dubel, S., F. Breitling, P. Fuchs, M. Zewe, S. Gotter, M. Welschof, G. Moldenhauer and M. Little (1994). Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers. J Immunol Methods **175**(1): 89-95.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott and P. M. Henson (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. J Clin Invest **101**(4): 890-8.

Ferran, C., K. Sheehan, M. Dy, R. Schreiber, S. Merite, P. Landais, L. H. Noel, G. Grau, J. Bluestone, J. F. Bach and et al. (1990). Cytokine-related syndrome following injection of

anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient in vivo T cell activation. Eur J Immunol **20**(3): 509-15.

Fife, B. T., G. B. Huffnagle, W. A. Kuziel and W. J. Karpus (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med **192**(6): 899-905.

Fischer, F. R., L. Santambrogio, Y. Luo, M. A. Berman, W. W. Hancock and M. E. Dorf (2000). Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. J Neuroimmunol **110**(1-2): 195-208.

Gaberc-Porekar, V. and V. Menart (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. J Biochem Biophys Methods **49**(1-3): 335-60.

Gerard, C. and B. J. Rollins (2001). Chemokines and disease. Nat Immunol **2**(2): 108-15.

Glennie, M. J. and P. W. Johnson (2000). Clinical trials of antibody therapy. Immunol Today **21**(8): 403-10.

Goel, A., J. Baranowska-Kortylewicz, S. H. Hinrichs, J. Wisecarver, G. Pavlinkova, S. Augustine, D. Colcher, B. J. Booth and S. K. Batra (2001). 99mTc-labeled divalent and tetravalent CC49 single-chain Fv's: novel imaging agents for rapid in vivo localization of human colon carcinoma. J Nucl Med **42**(10): 1519-27.

Gong, J. H., L. G. Ratkay, J. D. Waterfield and I. Clark-Lewis (1997). An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. J Exp Med **186**(1): 131-7.

Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science **285**(5425): 221-7.

Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1996). The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. Immunol Rev **153**: 85-106.

Hack, C. E., L. A. Aarden and L. G. Thijs (1997). Role of cytokines in sepsis. Adv Immunol **66**: 101-95.

Hancock, W. W., B. Lu, W. Gao, V. Csizmadia, K. Faia, J. A. King, S. T. Smiley, M. Ling, N. P. Gerard and C. Gerard (2000). Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. J Exp Med **192**(10): 1515-20.

Harris, L. J., E. Skaletsky and A. McPherson (1998). Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. J Mol Biol **275**(5): 861-72.

Hazenbos, W. L., I. A. Heijnen, D. Meyer, F. M. Hofhuis, C. R. Renardel de Lavalette, R. E. Schmidt, P. J. Capel, J. G. van de Winkel, J. E. Gessner, T. K. van den Berg and J. S. Verbeek (1998). Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). J Immunol **161**(6): 3026-32.

Hirsch, R., M. Eckhaus, H. Auchincloss, Jr., D. H. Sachs and J. A. Bluestone (1988). Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. I. Immunosuppression of transplantation responses. J Immunol **140**(11): 3766-72.

Hudson, P. J. and A. A. Kortt (1999). High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. J Immunol Methods **231**(1-2): 177-89.

Hudson, P. J. and C. Souriau (2003). Engineered antibodies. Nat Med **9**(1): 129-34.

Izikson, L., R. S. Klein, I. F. Charo, H. L. Weiner and A. D. Luster (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. J Exp Med **192**(7): 1075-80.

Janeway, C. A. a. T., P. (1997). Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Ju, S. T., H. Cui, D. J. Panka, R. Ettinger and A. Marshak-Rothstein (1994). Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4185-9.

Kalled, S. L., A. H. Cutler, S. K. Datta and D. W. Thomas (1998). Anti-CD40 ligand antibody treatment of SNF1 mice with established nephritis: preservation of kidney function. J Immunol **160**(5): 2158-65.

Kaplan, D. (1996). Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines. Immunol Today **17**(7): 303-4.

Kaufman, R. J. (1990). Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. Methods Enzymol **185**: 537-66.

Kim, J. K., M. F. Tsen, V. Ghetie and E. S. Ward (1994). Catabolism of the murine IgG1 molecule: evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for persistence of IgG1 in the circulation of mice. Scand J Immunol **40**(4): 457-65.

Kim, J. K., M. F. Tsen, V. Ghetie and E. S. Ward (1995). Evidence that the hinge region plays a role in maintaining serum levels of the murine IgG1 molecule. Mol Immunol **32**(7): 467-75.

Kipriyanov, S. M., G. Moldenhauer, J. Schuhmacher, B. Cochlovius, C. W. Von der Lieth, E. R. Matys and M. Little (1999). Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. J Mol Biol **293**(1): 41-56.

Kohler, G. and C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256**(5517): 495-7.

Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cancer Res **59**(7 Suppl): 1693s-1700s.

Kroemer, G. (1997a). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis [published erratum appears in Nat Med 1997 Aug;3(8):934]. Nat Med **3**(6): 614-20.

Kroemer, G., N. Zamzami and S. A. Susin (1997b). Mitochondrial control of apoptosis. Immunol Today **18**(1): 44-51.

Kurucz, I., J. A. Titus, C. R. Jost, C. M. Jacobus and D. M. Segal (1995). Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria. J Immunol **154**(9): 4576-82.

Kutemeier, G., C. Harloff and R. Mocikat (1992). Rapid isolation of immunoglobulin variable genes from cell lysates of rat hybridomas by polymerase chain reaction. Hybridoma **11**(1): 23-32.

Lagasse, E. and I. L. Weissman (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. J Immunol Methods **197**(1-2): 139-50.

Lapham, C. K., M. B. Zaitseva, S. Lee, T. Romanstseva and H. Golding (1999). Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. Nat Med **5**(3): 303-8.

Legler, D. F., M. Loetscher, R. S. Roos, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1998). B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. J Exp Med **187**(4): 655-60.

Leo, O., M. Foo, D. H. Sachs, L. E. Samelson and J. A. Bluestone (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. Proc Natl Acad Sci U S A **84**(5): 1374-8.

Lumsden, J. M., S. J. Prasad, R. J. Peach and F. Ronchese (2003). The effects of B7-dependent costimulation on T cell division and survival in vivo and in vitro are dependent on antigen concentration. Eur J Immunol **33**(8): 2074-82.

Mack, M., H. Bruhl, R. Gruber, C. Jaeger, J. Cihak, V. Eiter, J. Plachy, M. Stangassinger, K. Uhlig, M. Schattenkirchner and D. Schlondorff (1999). Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. Arthritis Rheum **42**(5): 981-8.

Mack, M., J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, J. Pfirstinger, M. Stangassinger and D. Schlondorff (2001).

Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. J Immunol **166**(7): 4697-704.

Mack, M., R. Gruber, S. Schmidt, G. Riethmuller and P. Kufer (1997). Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity. J Immunol **158**(8): 3965-70.

Mack, M., G. Riethmuller and P. Kufer (1995). A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7021-5.

Mack, M. and D. Schlondorff (2000). Downmodulation and Recycling of Chemokine Receptors. Chemokine Protocols. A. E. Proudfoot. Totowa, Humana Press Inc. **138:** 191-196.

Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today **20**(6): 254-7.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, S. Manes and A. C. Martinez (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. Annu Rev Immunol **19**: 397-421.

Mian, I. S., A. R. Bradwell and A. J. Olson (1991). Structure, function and properties of antibody binding sites. J Mol Biol **217**(1): 133-51.

Murai, M., H. Yoneyama, A. Harada, Z. Yi, C. Vestergaard, B. Guo, K. Suzuki, H. Asakura and K. Matsushima (1999). Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. J Clin Invest **104**(1): 49-57.

Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. Cell **88**(3): 355-65.

Nagata, S. and P. Golstein (1995). The Fas death factor. Science **267**(5203): 1449-56.

Natesan, M., Z. Razi-Wolf and H. Reiser (1996). Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. J Immunol **156**(8): 2783-91.

Nelson, P. J. and A. M. Krensky (1998). Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. Curr Opin Immunol **10**(3): 265-70.

Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.

Nielsen, U. B., G. P. Adams, L. M. Weiner and J. D. Marks (2000). Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. Cancer Res **60**(22): 6434-40.

Paleolog, E. (2003). The therapeutic potential of TNF-alpha blockade in rheumatoid arthritis. Expert Opin Investig Drugs **12**(7): 1087-95.

Pavlinkova, G., G. W. Beresford, B. J. Booth, S. K. Batra and D. Colcher (1999). Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts. J Nucl Med **40**(9): 1536-46.

Perez de Lema, G., H. Maier, E. Nieto, V. Vielhauer, B. Luckow, F. Mampaso and D. Schlondorff (2001). Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. J Am Soc Nephrol **12**(7): 1369-82.

Plater-Zyberk, C., A. J. Hoogewerf, A. E. Proudfoot, C. A. Power and T. N. Wells (1997). Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. Immunol Lett **57**(1-3): 117-20.

Ramsdell, F., M. S. Seaman, R. E. Miller, K. S. Picha, M. K. Kennedy and D. H. Lynch (1994). Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. Int Immunol **6**(10): 1545-53.

Randolph, D. A., G. Huang, C. J. Carruthers, L. E. Bromley and D. D. Chaplin (1999). The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. Science **286**(5447): 2159-62.

Reed, J. C. (1997). Cytochrome c: can't live with it--can't live without it [comment]. Cell **91**(5): 559-62.

Rodriguez-Frade, J. M., M. Mellado and A. C. Martinez (2001). Chemokine receptor dimerization: two are better than one. Trends Immunol **22**(11): 612-7.

Roitt, I. M., Brostoff, J. and Male D. K. (1996). Immunology. London, Mosby, Time Mirror International Publishers Limited.

Rollins, B. J., T. Yoshimura, E. J. Leonard and J. S. Pober (1990). Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. Am J Pathol **136**(6): 1229-33.

Russell, J. H. and T. J. Ley (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol **20**: 323-70.

Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature **401**(6754): 708-12.

Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay and A. Lanzavecchia (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J Exp Med **187**(6): 875-83.

Sallusto, F., C. R. Mackay and A. Lanzavecchia (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. Science **277**(5334): 2005-7.

Santana, M. A. and Y. Rosenstein (2003). What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. J Cell Physiol **195**(3): 392-401.

Schneider, E., V. Salaun, A. Ben Amor and M. Dy (1997). Hematopoietic changes induced by a single injection of anti-CD3 monoclonal antibody into normal mice. Stem Cells **15**(2): 154-60.

Scott, D. E., W. C. Gause, F. D. Finkelman and A. D. Steinberg (1990). Anti-CD3 antibody induces rapid expression of cytokine genes in vivo. J Immunol **145**(7): 2183-8.

Segal, D. M., G. J. Weiner and L. M. Weiner (1999). Bispecific antibodies in cancer therapy. Curr Opin Immunol **11**(5): 558-62.

Segerer, S., Y. Cui, F. Eitner, T. Goodpaster, K. L. Hudkins, M. Mack, J. P. Cartron, Y. Colin, D. Schlondorff and C. E. Alpers (2001). Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. Am J Kidney Dis **37**(3): 518-31.

Segerer, S., K. M. Mac, H. Regele, D. Kerjaschki and D. Schlondorff (1999). Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. Kidney Int **56**(1): 52-64.

Segerer, S., H. Regele, K. M. Mac, R. Kain, J. P. Cartron, Y. Colin, D. Kerjaschki and D. Schlondorff (2000). The Duffy antigen receptor for chemokines is up-regulated during acute renal transplant rejection and crescentic glomerulonephritis. Kidney Int **58**(4): 1546-56.

Sgro, C. (1995). Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. Toxicology **105**(1): 23-9.

Smith, J. A. and J. A. Bluestone (1997). T cell inactivation and cytokine deviation promoted by anti-CD3 mAbs. Curr Opin Immunol **9**(5): 648-54.

Sondermann, P., R. Huber, V. Oosthuizen and U. Jacob (2000). The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. Nature **406**(6793): 267-73.

Standiford, T. J., S. L. Kunkel, S. H. Phan, B. J. Rollins and R. M. Strieter (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. J Biol Chem **266**(15): 9912-8.

Tahtis, K., F. T. Lee, F. E. Smyth, B. E. Power, C. Renner, M. W. Brechbiel, L. J. Old, P. J. Hudson and A. M. Scott (2001). Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepentaacetic acid humanized 3S193 diabody and F(ab')(2) constructs in a breast carcinoma xenograft model. Clin Cancer Res **7**(4): 1061-72.

Tanaka, Y., D. H. Adams and S. Shaw (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. Immunol Today **14**(3): 111-5.

Tartaglia, L. A., M. Rothe, Y. F. Hu and D. V. Goeddel (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. Cell **73**(2): 213-6.

Thomas, D. A., L. Scorrano, G. V. Putcha, S. J. Korsmeyer and T. J. Ley (2001). Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14985-90.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science **267**(5203): 1456-62.

Todorovska, A., R. C. Roovers, O. Dolezal, A. A. Kortt, H. R. Hoogenboom and P. J. Hudson (2001). Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. J Immunol Methods **248**(1-2): 47-66.

Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.

Van Gool, S. W., P. Vandenberghe, M. de Boer and J. L. Ceuppens (1996). CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. Immunol Rev **153**: 47-83.

van Spriel, A. B., H. H. van Ojik and J. G. van De Winkel (2000). Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. Immunol Today **21**(8): 391-7.

Waldmann, T. A. and J. O'Shea (1998). The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. Curr Opin Immunol **10**(5): 507-12.

Witt, D. P. and A. D. Lander (1994). Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. Curr Biol **4**(5): 394-400.

Wood, C. R., A. J. Dorner, G. E. Morris, E. M. Alderman, D. Wilson, R. M. O'Hara, Jr. and R. J. Kaufman (1990). High level synthesis of immunoglobulins in Chinese hamster ovary cells. J Immunol **145**(9): 3011-6.

Worn, A. and A. Pluckthun (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. J Mol Biol **305**(5): 989-1010.

Zabel, B. A., W. W. Agace, J. J. Campbell, H. M. Heath, D. Parent, A. I. Roberts, E. C. Ebert, N. Kassam, S. Qin, M. Zovko, G. J. LaRosa, L. L. Yang, D. Soler, E. C. Butcher, P. D. Ponath, C. M. Parker and D. P. Andrew (1999). Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. J Exp Med **190**(9): 1241-56.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity **12**(2): 121-7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn PD Dr. Matthias Mack, der mir das Thema zur Verfügung gestellt hat und der mir bei der Umsetzung stets zur Seite stand. Herrn Prof. Dr. Detlef Schlöndorff möchte ich ebenfalls für seine Diskussionbereitschaft und die Begleitung meiner Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar möchte ich für die Aufnahme als externer Doktorand und für die Betreuung meiner Arbeit in der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München danken.

Herrn Dr. Bruno Luckow danke ich für sein Fachwissen, das er stets bereit war zu teilen und v. a. danke ich ihm für die hervorragende Organisation der klinischen Biochemie der Medizinischen Poliklinik. Die gesamte Arbeitsgruppe der klinischen Biochemie hat mich bei der Arbeit stets unterstützt und die KollegenInnen der Gruppe standen stets für alle Fragen zur Verfügung.

Mein Dank gilt auch Frau Barbara Köppler, für die Entwicklung des MC69 Antikörpers, ohne den die Herstellung der Konstrukte gegen CCR5 nicht möglich gewesen wären und Frau Alexandra Wechselberger für ihre technische Assistenz in den letzen Wochen der Arbeit.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir das Biologiestudium überhaupt ermöglicht haben und mich auf meinem Weg vom Beginn des Studiums bis hin zur Promotion unterstützt und begleitet haben.

Nochmals möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Hannes Fürst bedanken, der mich am Gymnasium in seinem Biologie-Leistungskurs für die moderne Biologie begeistert und so meinen Weg beeinflusst hat. Außerdem möchte ich noch das Team um Dr. David Thomas und Susan Mrose bei der Firma Biogen, USA erwähnen, die mir die Faszination der Immunbiologie zeigten.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Tina Rubic für so vieles, aber insbesondere für ihr Lächeln an den etwas „dunkleren“ Tagen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name:	Schneider
Vorname:	Martin Alexander
Geboren:	29. 08. 1973
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Beruf:	Diplom-Biologe

Ausbildung:

1980 – 1984	Grundschule St. Korbinian, Freising
1984 – 1993	Josef-Hofmiller-Gymnasium, Freising
1993 – 1994	Zivildienst als Rettungsdiensthelfer, BRK Freising
1994 – 1996	Vordiplom in Biologie, Universität Konstanz
1997 – 1999	Hauptstudium der Biologie an der Universität Konstanz
08/1999 – 06/2000	Diplomarbeit zum Thema „Immunstimulation durch Gewebeuntergang“ am Lehrstuhl Biochemische Pharmakologie, Universität Konstanz
06/2000	Abschluss des Diplom-Studiengangs Biologie an der Universität Konstanz mit der Gesamtnote „sehr gut“
08/2000	Beginn der Promotion bei Herrn Prof. D. Schlöndorff am Institut der klinischen Biochemie, Medizinische Poliklinik der LMU München

Praktika/Auslandserfahrung:

12/96 – 07/97	Biogen Corp., Cambridge, Massachusetts, USA (Abteilung Immunologie Projekt: „CD40 Ligand-Signalweg“)
06/98 – 10/98	Universität Konstanz (Entwicklung eines bakteriellen „Killing-Assays“, Lehrstuhl Biochemische Pharmakologie)

Publikationen:

- **Schneider M**., Hartung T. (2001): Induction of the chemokines IL-8 and MCP-1 in human whole blood by a cell-lysate of human fibroblast cells, Immunol Lett, 1:163-165
- Brühl H., Cihak J., **Schneider M. A.**, Plachy J., Rupp T., Wenzel I., Shakarami M., Milz S., Ellwart J. W., Stangassinger M., Schlöndorff D. und Mack M.. (eingereicht): Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis – evidence for regulatory activity of $CCR2^+$ T cells
- **Schneider M. A.**, Schlöndorff D. und Mack M. (Posterpräsentation): Production of murine bispecific antibodies recruiting T cells fort he lysis of CCR2 and CCR5 positive cells, Institut Pasteur Euroconferences “Chemokines 2 – Chemokines and their receptors as therapeutic targets”, Paris 23. – 24. Oktober 2003.

Wissenschaftliche Kurse:

- Wissenschaftlicher Grundkurs: Durchflusszytometrie der Firma Beckton Dickinson

- Versuchstierkundlicher Kurs des TIZ-Bifo (Tierschutzinfomations-zentrum für die biomedizinische Forschung der LMU München)